ANÁLISE DOS EFEITOS DO COLÁGENO BOVINO E DERIVADOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E BIOSSÍNTESE DE COLÁGENO EM FIBROBLASTOS HUMANOS

VERGIMARI RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

SÃO PAULO

2009

ANÁLISE DOS EFEITOS DO COLÁGENO BOVINO E DERIVADOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E BIOSSÍNTESE DE COLÁGENO EM FIBROBLASTOS HUMANOS

VERGIMARI RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração:

Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

SÃO PAULO

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rodrigues, Vergimari.
Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos / Vergimari Rodrigues. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia Celular.

Versão do título para o inglês: Analysis of bovine collagen and derivates effects in the cell proliferation and collagen biosyntesis in human fibroblasts.

Descritores: 1. Colágeno hidrolisado 2. Fibroblastos 3. Picrosirius 4. Ciclo celular 5. Proliferação celular 6. MTT I. Maria, Durvanei Augusto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pos-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB25/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vergimari Rodrigues.

Título da Dissertação: Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos.

Orientador(a): Durvanei Augusto Maria.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **921/06**, intitulado: **"Análise das fases do ciclo celular, apoptose e do conteúdo de DNA dos carcinomas basocelulares através da citometria de fluxo"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: Dr.(a) **Cyro Festa Neto**
Pesquisador (a) Executante: Dr.(a) **Durvanei Augusto Maria**

CAPPesq, 28 de Setembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 8º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 3069 6442 - fax: (011) - 3069 6452 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Elisabete e minha irmã Regiane Rodrigues pelo incansável apoio, incentivo, compreensão e amor.

Ao Paulo, a Nilza, a Paula e a Marcela Reimann pela acolhida e companhia como uma segunda família nestes longos anos.

À Denise Reis pela confiança, incentivo e realização deste projeto.

À Geórgia Castro pelo estímulo, apoio e dedicação.

À Vivian Zague pelas incansáveis discussões, ajudas e incentivos.

Ao Prof. Dr. Durvanei A. Maria por além de orientar, compreender, auxiliar e apoiar este projeto.

À companhia Gelita South America, pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

A todos os amigos do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Gelita South America, Cathia dos Reis, Vagner Sena, Luzia Venâncio e Fátima pelo apoio e carinho.

A todos do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, Ricardo, Adilson Kleber, Kamila, Norma, Rogério, Fernanda, Danilo e Vilma pelo convívio, amizade e auxílio.

A Ivo Lebrun, Aline Vatti pelas contribuições.

Agradecimentos ao laboratório da faculdade de medicina veterinária – USP do prof. Dr. José Roberto Kfoury.

À Caroline Valente, Marco Aso, Sandia e José Simoni por muitos auxílios.

Ao Jarbas Renato Bortolini pelo incentivo, compreensão e carinho.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

(Gandhi)

RESUMO

RODRIGUES, V. **Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos.** 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O colágeno é a proteína fibrosa predominante da matriz extracelular e é a maior proteína constituinte do tecido conectivo. Alterações nas taxas de colágeno tipo I na derme ocorrem durante o envelhecimento. A introdução de um agente eficaz para a manutenção da pele durante o envelhecimento é importante, possibilitando a redução destes efeitos. Neste projeto foram avaliados os efeitos proliferativos e de biossíntese de colágeno, em fibroblastos humanos de derme normal tratados com colágeno bovino e derivados de diferentes perfis moleculares, colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina, em diferentes experimentos, adesão e viabilidade celular, síntese de colágeno e análises das fases do ciclo celular. Os resultados sugerem que o colágeno bovino e derivados induzem as propriedades adesivas nos fibroblastos, não desencadeiam efeitos citotóxicos e induzem a biossíntese de colágeno pelos fibroblastos. Os resultados de síntese de colágeno indicam que concentrações menores de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado podem ser utilizadas em relação à amostra de gelatina. Comparando os resultados após 48 horas de cultura na síntese de colágeno e nas modificações na fase S do ciclo celular, as células tratadas com as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado induziram aumentos significativos.

Palavras-chave: Colágeno hidrolisado; Fibroblastos; Picrosirius; Ciclo celular; Proliferação.

ABSTRACT

RODRIGUES, V. **Analysis of bovine collagen and derivates effects in the cell proliferation and collagen biosynthesis in human fibroblasts.** 2009. 74 f. Master thesis (Biotecnology) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Collagen is the predominant fibrous protein of the extracellular matrix and it is a major protein constituting connective tissue. Alterations in the rate of collagen type I deposition occur during aging. The introduction of an efficient agent for the maintenance of the skin during the aging process is important as it can reduce those effects. Thus, the proliferative effects and collagen biosynthesis in normal dermis of human fibroblasts were evaluated in this project. The fibroblasts were treated with bovine collagen and its derivates from different molecular mass, as well as super hydrolysate collagen, hydrolysate collagen and gelatine. Different assays were applied as adhesion, cell viability, collagen biosynthesis, and cell cycle phases analysis. The results suggest that the bovine collagen and its derivates can induce to adhesion properties in fibroblasts, they do not produce cytotoxic effects, and they can induce the collagen biosynthesis by fibroblasts. The results also show that super hydrolysate collagen and hydrolysate collagen can be used in lower concentrations than gelatine in collagen biosynthesis analysis. Analyzing the results after 48 hours of culture, the cells treated with the samples of super hydrolysate collagen and hydrolysate collagen had significant improvement in the collagen biosynthesis and in the modifications in the S phase of the cell cycle.

Key-words: Hydrolysate collagen; Fibroblast; Picrosirius; Cell cycle; Cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da MEC 18
Figura 2 - Representação da estrutura da fibronectina 19
Figura 3 - Representação de uma GAG, AH e uma proteoglicana 21
Figura 4 - Representação da biossíntese de colágeno 24
Figura 5 - Adesão celular - colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina 40
Figura 6 - Citotoxicidade e viabilidade celular – colágeno super hidrolisado 42
Figura 7 - Citotoxicidade e viabilidade celular – colágeno hidrolisado 43
Figura 8 - Citotoxicidade e viabilidade celular – gelatina 44
Figura 9 - Comparativo da citotoxicidade e viabilidade celular 45
Figura 10 - Biossíntese de colágeno 24 horas – colágeno super hidrolisado 47
Figura 11 - Biossíntese de colágeno 24 horas – colágeno hidrolisado 48
Figura 12 - Biossíntese de colágeno 24 horas – gelatina 49
Figura 13 - Comparativo da Biossíntese de colágeno em 24 horas 50
Figura 14 - Biossíntese de colágeno 48 horas – colágeno super hidrolisado 51
Figura 15 - Biossíntese de colágeno 48 horas – colágeno hidrolisado 52
Figura 16 - Biossíntese de colágeno 48 horas – gelatina 53
Figura 17 - Comparativo da Biossíntese de colágeno em 48 horas 54
Figura 18 - Comparativo da Biossíntese de colágeno: 24 versus 48 horas 55
Figura 19 - Fotomicrografia dos fibroblastos - colágeno super hidrolisado 57
Figura 20 - Fotomicrografia dos fibroblastos - colágeno hidrolisado 58
Figura 21 - Fotomicrografia dos fibroblastos - gelatina 59
Figura 22 - Fotomicrografia dos fibroblastos - controle 60
Figura 23 - Histograma das imagens das fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento 64
Quadro 1 - Aminoácidos do colágeno tipo I e seus resíduos na cadeia α e β 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de fibroblastos - ciclo celular 24 horas.....63
Tabela 2 - Porcentagem de fibroblastos - ciclo celular 48 horas.....65
Tabela 3 - Porcentagem de fibroblastos - ciclo celular 72 horas.....66
Tabela 4 - Porcentagem de fibroblastos - ciclo celular 96 horas.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APO – Apoptose

Da - Dalton

kDa – Quilo Dalton

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinases

AGES – Produtos finais de glicação avançada (do inglês, "*Advantaced Glycation End-Products*")

GAG – Glucosaminaglicanos

RNA – Ácido Ribonucleico

AH – Ácido Hialurônico

TGF – Fator de crescimento transformante (do inglês, "*Transforming growth factor*")

TIMP-1 – Inibidor tecidual de metaloproteínase -1 (do inglês, "*Tissue inhibitor of metalloproteinases")*

Gly – Glicina

Pro – Prolina

Hip – Hidroxiprolina

aa - aminoácido

Trp – Triptofano

Glu – Ácido Glutâmico

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-brometo de 2,5-difeniltetrazólio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxi-Ribonucléico

GPC - Cromatografia de permeação em gel

HPLC – Cromatografia líquida de alta perfomance (do inglês "*High perfomance liquid cromatography*")

CCD – Dispositivo de carga acoplado (do inglês, "*charge-coupled device*")

PI – Iodeto de Propídio

SUMÁRIO

1 INTRODUCÃO **14**
1.1 Envelhecimento **14**
1.2 Fibroblastos **17**
1.3 Matriz Extracelular – MEC **18**
1.4 Colágeno **22**
1.4.1 Colágeno e colágeno hidrolisado **26**
1.5 Integrinas **27**
1.6 Interação célula – MEC **28**
2 OBJETIVOS **29**
2.1 Objetivos Gerais: **29**
2.2 Objetivos Específicos: **29**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **30**
3.1 Amostras de colágenos **30**
3.2 Preparo das soluções das amostras protéicas **30**
3.3 Preparo do meio de cultura **30**
3.4 Preparo da cultura primária. **31**
3.5 Ensaio de adesão celular - Violeta cristal **32**
3.6 Análise da capacidade proliferativa e citotoxicidade - MTT **32**
3.7 Análise das fases do ciclo celular e morte celular - Citometria de fluxo **33**
3.8 Análise da Biossíntese de colágeno **34**
3.9 Análise das imagens pelo programa Image J1.40 ..... **34**
3.10 Análise Estatística **35**
4 RESULTADOS **36**
4.1 Caracterização as amostras de colágeno e derivados **36**
4.2 Ensaio de adesão celular **36**
4.2.1 Análise do ensaio de adesão celular 37
4.3 Citotoxicidade celular e capacidade proliferativa – ensaio de MTT **38**
4.3.1 Citotoxicidade e viabilidade celular – Colágeno super hidrolisado 39
4.3.2 Citotoxicidade e viabilidade celular – Colágeno hidrolisado 40
4.3.3 Citotoxicidade e viabilidade celular – Gelatina 41
4.3.4 Análise comparativa das amostras dos colágenos nos experimentos de citotoxicidade e viabilidade celular 42
4.4 Biossíntese de Colágeno – ensaio de Picrosirius **43**
4.4.1 Biossíntese de colágeno – ensaio de Picrosirius 24 horas 44
4.4.1.1 Biossíntese de colágeno 24 horas – Colágeno super hidrolisado 44
4.4.1.2 Biossíntese de colágeno 24 horas – Colágeno hidrolisado 45
4.4.1.3 Biossíntese de colágeno 24 horas – Gelatina 46
4.4.1.4Análise comparativa da biossíntese de colágeno após 24 horas de tratamento 47
4.4.2 Biossíntese de colágeno – ensaio de Picrosirius 48 horas 48
4.4.2.1 Biossíntese de colágeno 48 horas – Colágeno super hidrolisado 48
4.4.2.2 Biossíntese de colágeno 48 horas – Colágeno hidrolisado 49
4.4.2.3 Biossíntese de colágeno 48 horas – Gelatina 50
4.4.2.4 Análise comparativa da biossíntese de colágeno no período de 48 horas de tratamento 51

4.4.2.5 Análise comparativa da biossíntese de colágeno nos períodos de 24 e 48 horas de tratamento ... 52
4.4.3 Análise das imagens das culturas de fibroblastos no ensaio de Picrosirius 48 horas pelo *software* analisador Image J ... 53
4.4.3.1 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Colágeno super hidrolisado ... 54
4.4.3.2 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Colágeno hidrolisado ... 55
4.4.3.3 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Gelatina ... 56
4.4.3.4 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Controle ... 57
4.5 Análise das fases do ciclo celular - ensaio de citometria de fluxo ... 58
4.5.1 Análise das fases do ciclo celular ... 58
4.5.1.1 Análise das fases do ciclo celular - 24 horas de tratamento ... 58
4.5.1.2 Análise das fases do ciclo celular - 48 horas de tratamento ... 59
4.5.1.3 Análise das fases do ciclo celular - 72 horas de tratamento ... 60
4.5.1.4 Análise das fases do ciclo celular - 96 horas de tratamento ... 61
5 DISCUSSÃO ... 62
6 CONCLUSÃO ... 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ... 69
ANEXOS ... 74

1 INTRODUCÃO

1.1 Envelhecimento

Os tecidos gradualmente passam por mudanças de acordo com a idade, sendo que, na pele, essas alterações são mais facilmente reconhecidas. Atrofia, enrugamento, ptose e lassidão representam os sinais mais aparentes de uma pele senil. Mudanças nas características da pele humana durante o envelhecimento são freqüentemente determinadas por forças ambientais ou extrínsecas, tais como radiação ultravioleta, assim como por fatores intrínsecos, alguns deles relacionados com alterações no tecido conjuntivo da derme. Alterações no tecido conjuntivo, que atua como alicerce estrutural para epiderme delineiam essas mudanças na aparência externa, que são refletidas no estrato córneo. As modificações do aparelho colágeno-elástico ao longo da vida estabelecem uma base morfológica substancial para compreender as adaptações bioquímicas e biomecânicas da pele com a idade. A espessura da pele e suas propriedades viscoelásticas não dependem apenas da quantidade de material presente na derme, mas também de sua organização estrutural. Uma das principais causas do envelhecimento é a perda de colágeno no organismo. Os músculos ficam flácidos, a densidade dos ossos diminui, as articulações e os ligamentos perdem elasticidade e força motora. A perda de colágeno ocorre a partir dos 30 anos, quando o corpo passa a perder 1% da proteína ao ano. As alterações cutâneas durante o envelhecimento podem ser evidenciadas nas diferentes camadas da pele e dependem de fatores individuais, geneticamente determinados, que sofrem interferência de fatores externos e internos, aos quais a pele foi exposta durante a vida. Relacionar o envelhecimento com as alterações que ocorrem na pele não é simples, pois parece que muitas mudanças da pele, que são habitualmente observadas no envelhecimento, podem não ser resultado da idade por si só, e ainda necessitam ser esclarecidas. Por tanto, as mudanças observadas no envelhecimento são mais “associadas ao” do que “causadas pelo” envelhecimento.

A firmeza da pele, a elasticidade e o tonus são gradualmente perdidos com o envelhecimento cutâneo. Estas mudanças originadas na derme estão relacionadas com a diminuição da habilidade das células, particularmente os fibroblastos, em regenerar moléculas que compõem a MEC. O envelhecimento cutâneo é caracterizado pela redução da espessura da epiderme e pelo achatamento da membrana basal. Durante o envelhecimento cutâneo a epiderme e a derme tornam-se atrofiadas e finas (YAMAMOTO et al., 2006; FREI et al., 1998).

O envelhecimento leva a uma progressiva diminuição de todos estes elementos na pele (FREI et al., 1998, GARDNER et al., 1999, HUAXU et al., 2008). Além disso, a organização tecidual e supra-molecular destas moléculas extracelulares são modificadas. Todas estas observações podem explicar a desorganização aparente da derme na pele envelhecida. É muito comum na pele envelhecida a atrofia epidérmica. Estudos histológicos da espessura da epiderme mostraram um descréscimo 20% da epiderme em peles foto-protegidas por período vital (YAMAMOTO et al., 2006; FREI et al., 1998).

O processo de envelhecimento cutâneo pode ser dividido em envelhecimento intrínsico e foto-envelhecimento. Clinicamente, a pele envelhecida naturalmente é macia, pálida e irrugada. Em contraste, a pele foto-envelhecida é áspera e associada com despigmentação e telangiectasia. Alterações no colágeno, o principal componente estrutural da pele, tem sido sugeridas como a causa das mudanças clínicas, como as rugas e a perda de elasticidade da pele, observadas no foto ou natural envelhecimento. Com o envelhecimento, a síntese de colágeno é reduzida e os níveis das MMPs são elevados nas peles protegidas do sol. Esta deficiência de colágeno, devido ao envelhecimento natural, surgiu a partir desta redução da síntese e aumento da degradação do colágeno com a concomitante elevação da expressão das MMPs (CHUNG et al., 2001).

O envelhecimento provoca modificações no tecido conectivo da derme. As bandas de colágeno nas pessoas jovens são finas e os fibroblastos são células ativas e em estreito contato com os feixes de colágeno (IMAYAMA e BRAVERMAN, 1989). As fibras de colágeno em pessoas idosas são fragmentadas e os fibroblastos estão quiescentes, sem nenhum contato com o colágeno. A lesão mais importante no envelhecimento é a destruição da relação entre os fibroblastos e a matrix intersticial. Nos fibroblastos é possível ver as mudanças na arquitetura do citoesqueleto. Estas mudanças rompem a unidade fibronectina - membrana plasmática - citoesqueleto, o que explica as mudanças metabólicas e secretórias, a disfunção da unidade matrix intersticial – célula, e também as mudanças estruturais observadas no envelhecimento.

Com o envelhecimento, mudanças maiores podem ser vistas dentro dos componentes do tecido conectivo da derme. O colágeno perde sua aparência regular e fascicular, há diminuição de material elástico e a população de fibroblastos torna-se fraca. O resultado do envelhecimento dermal é diferente para cada indivíduo e está relacionado com fatores genéticos e a exposição a múltiplos agentes (PIERAGGI et al., 1984).

O colágeno muda tanto qualitativamente quanto quantitativamente com o envelhecimento. As mudanças qualitativas refletem-se na diminuição da solubilidade e na alteração de várias propriedades físicas da molécula. O colágeno fica mais estável com a idade. À medida que a pessoa envelhece, há um acúmulo no número de ligações covalentes cruzadas entre as cadeias α das moléculas de colágeno e as moléculas de colágeno das fibrilas, o que causa um aumento na rigidez e na perda da elasticidade do tecido conjuntivo.

A diminuição da quantidade de colágeno no tecido epitelial é resultante de uma diminuição da atividade metabólica dos fibroblastos, que são as células responsáveis por sua síntese.

A elasticidade da pele decresce com a idade, pois a elastina mostra uma diminuição progressiva no seu conteúdo de lisina e de ácido glutamínico. A diminuição dos resíduos de lisina também leva à diminuição de ligações cruzadas entre eles, causando uma diminuição da elasticidade da molécula de elastina. Também ocorre uma diminuição da produção de elastina, devido a uma diminuição da atividade metabólica e do número de fibroblastos.

O termo envelhecimento aplica-se também a todas as alterações químicas e estruturais da MEC, que ocorrem nas cadeias laterais de aminoácidos, principalmente arginina, lisina e aspartato presentes no colágeno tipo I. São alterações lentas. O resultado é a redução na renovação celular e perda das propriedades físicas dos tecidos, o que diminui a sua flexibilidade e permeabilidade (BAILEY et al., 1998).

Uma das reações mais importante que ocorre no envelhecimento é a glicação envolvendo a glicose (6 carbonos) e também pode ocorrer com a ribose (5 carbonos). Nos tecidos, seus produtos são denominados como AGES (Advantaced Glycation End-Products) (BAILEY et al., 1998) e podem levar a várias consequências. A modificação da arginina pelos AGES, é uma consequência importante porque a sequência arginina- glicina- aspartato é um sítio de reconhecimento de integrinas responsáveis pela intermediação da adesão de várias células sobre a MEC (REKHTER, 1999), além de outros sítios de adesão celular que também são alterados que incluem aspartato e arginina.

Alterações envolvendo os aminoácidos lisina e arginina provocam significativas mudanças no perfil de distribuição de carga, modificando interações dependentes de ligações eletrostáticas, como a fibrinogênese do colágeno (PROCKOP e FERTALA, 1998). Outras modificações químicas e estruturais da MEC resultantes da reação de açúcares, principalmente a glicose, são reações com as cadeias laterais dos aminoácidos arginina, lisina e o aspartato presentes no colágeno tipo I, resultando na redução da renovação das células (REISER ET AL., 1992; CHAPMAM et al., 1990).

1.2 Fibroblastos

A pele é o maior órgão do corpo humano e protege o corpo de várias agressões. A pele compreende a epiderme e a derme, constituindo o epitélio escamoso estratificado e o tecido conectivo respectivamente. A derme contém grande quantidade de componentes da MEC, como colágeno e GAGs, principalmente os produzidos pelos fibroblastos (CHAMPION et al., 1992).

Os fibroblastos são as células mais numerosas do tecido conjuntivo frouxo. Sintetizam colágenos e elastina, além de outras substâncias que farão parte da matriz extracelular. Os fibroblastos são células com intensa capacidade de síntese, possuem um núcleo abundante, com muitos prolongamentos e rico em retículo endoplasmático rugoso. Já os fibrócitos são células metabolicamente quiescentes. Estes podem voltar para o estado de fibroblastos no caso de uma cicatrização, por exemplo.

O fibroblasto tem prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é claro, grande, de forma ovóide, com cromatina fina e nucléolo evidente. O citosplama é rico em retículo endoplasmático rugoso. O aparelho de Golgi é desenvolvido.

O fibrócito é uma célula menor, que tende a ser fusiforme e com menor número de prolongamentos do que o fibroblasto jovem (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

Os fibroblastos são responsáveis pela formação das fibras colágenas, reticulares e elásticas, além de proteoglicanas. Portanto, os fibroblastos participam da formação de toda a MEC. No tecido conjuntivo de um adulto os fibroblastos não se dividem com freqüência, e entram em mitose apenas por conta de uma solicitação aumentada, seja ela por sobrecarga funcional ou em resposta a lesões (MORISCOT et al., 2004). Apesar dos fibroblastos serem capazes de sintetizar e secretar vários componentes da MEC, a síntese da molécula de colágeno tipo I é a mais bem estudada, principalmente devido a sua grande abundância e ampla distribuição em vários locais do organismo.

A obtenção de colágeno pelos fibroblastos dermais consiste na síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e III conhecidas como moléculas precurssoras chamadas procolágeno.

Durante a formação das fibras de colágeno insolúvel, proteases específicas clivam os domínios carboxi e amino terminais, originando colágeno – N (pN), procolágeno originado pela clivagem do propeptídeo carboxi terminal, e colágeno – C (pC), procólageno originado da clivagem do propeptídeo amino terminal, respectivamente. Procolágeno tipo I e III, colágeno pN e colágeno pC são moléculas precurssores do colágeno maduro, geralmente os níveis destas moléculas refletem o nível de colágeno.

A síntese de colágeno tipo I, como a de qualquer proteína, se inicia no núcleo onde os genes codificadores das cadeias α1 e α2 são ativados e produzem os respectivos RNA mensageiros. Estes se deslocam do núcleo para o citoplasma, onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas que são imediatamente internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático. No interior do retículo estes polipeptídeos sofrem processamento, sendo que o evento mais importante inclui a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina. Posteriormente lisina hidroxilada (hidroxilisina) ainda sofre um processo de glicosilação. Cada cadeia α contém peptídeos de registro nas suas extremidades, que garantem o alinhamento correto destas cadeias, bem como previnem a formação de fibrilas no interior da célula. As cadeias α se organizam no interior do retículo endoplasmático em grupos de 3, formando as moléculas de procolágeno, precurssora da molécula de colágeno madura. Os resíduos de hidroxiprolina garantem a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias α, mantendo a coesão entre as mesmas. As moléculas de procolágeno são então secretadas dos fibroblastos por meio de vesículas. Na MEC as moléculas de procolágeno são digeridas por uma enzima também produzida e secretada pelos fibroblastos, o procolágeno peptidase. Finalmente o tropocolágeno se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno (isso também ocorre nas moléculas de colágeno II e III). Certas proteoglicanas e glicoproteínas estruturais desempenham papel importante na agregação do tropocolágeno para formar as fibrilas e mesmo as fibras de colágeno (MORISCOT et al., 2004).

1.3 Matriz Extracelular – MEC

A MEC é formada por glicoproteínas, colágeno, glicosaminoglicana e proteoglicanas como componentes estruturais mais importantes. Estes componentes são secretados pelas células e se organizam no meio extracelular por meio de interações múltiplas com receptores específicos da membrana plasmática (ZAGRIS, 2001). Estes componentes apresentam função estrutural e mecânica, além de exercerem controle sobre a pressão oncótica.

A MEC pode possuir componentes encontrados em todos os tecidos, ou exclusivos de apenas um tecido (STEVENS e LOWE, 1995).

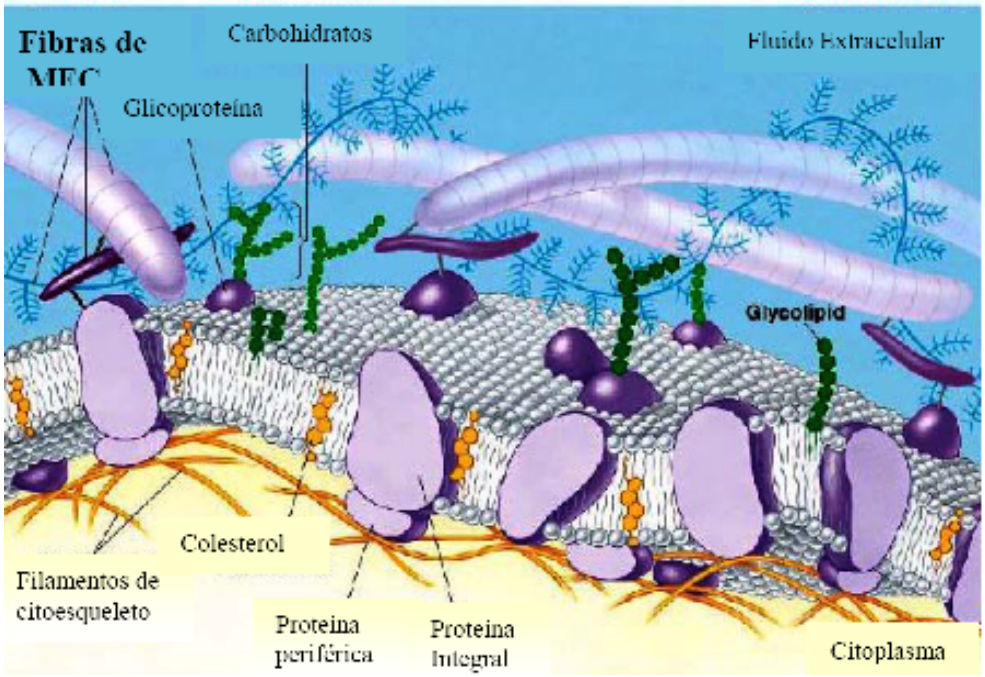


FIGURA 1 - Representação esquemática da MEC (GOISSIS, 2008).

Os principais componentes da MEC estão indicados no esquema.

Componentes macromoleculares da MEC:

Glicoproteínas: estão presentes neste grupo a fibronectina, bronectina, tenascina, entactina e laminina. Essas macromoléculas estão envolvidas no processo de adesão celular. Elas contêm múltiplos sítios de ligação, podendo interagir entre si, com outras moléculas da MEC ou com a superfície celular. São responsáveis pela organização do colágeno, das proteoglicanas e das células em uma estrutura organizada, configurando o que chamamos de tecido.

Lamininas: são glicoproteínas triméricas caracterizadas por apresentar elevada massa molecular. São importantes na adesão celular, migração direcional, modulação mitogênica, direcionamento do axônio, manutenção do fenótipo de célula diferenciada e a indução de novas maneiras de expressão celular.

Entactina: está relacionada com a migração direcional da célula.

Fibronectina: é uma proteína formada por duas cadeias polipeptídicas iguais, e apresentam domínios múltiplos de adesão. Podem ligar-se ao colágeno. Tem importância também na regulação do gene responsável pela produção da colagenase, enzima específica para a degradação do colágeno.

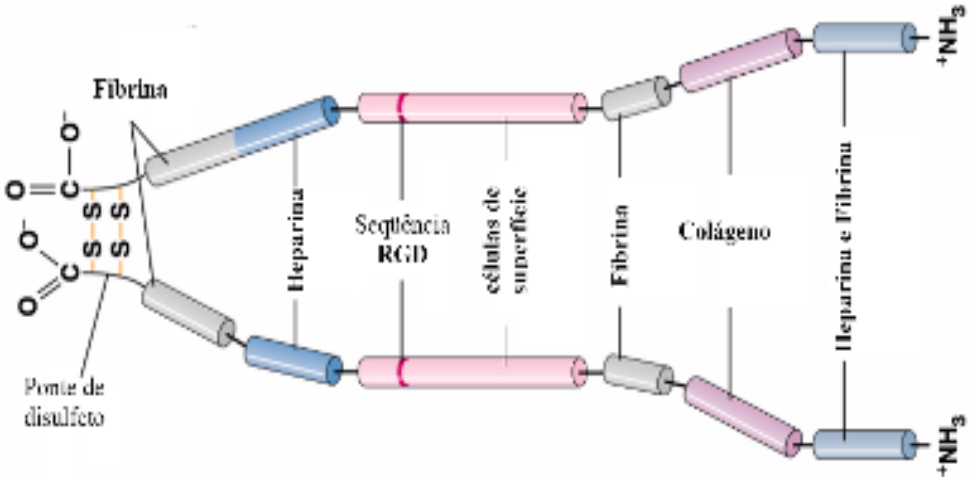


FIGURA 2 - Representação da estrutura da fibronectina (GOISSIS, 2008).

No desenho esquemático está representada a estrutura da fibronectina e seus domínios de interação com ligantes.

Glicosaminoglicanas (GAGs): são componentes importantes nos processos que controlam a proliferação celular, a migração, a diferenciação e a manutenção das estruturas morfogenéticas.

A estrutura poliônica das glicosaminoglicanas conferem uma grande capacidade de retenção de água destas estruturas. Elas também são responsáveis por algumas interações célula-matriz, e consequentemente por algumas expressões e comportamentos celulares, como diferenciação e proliferação (REINERT e JUNDT, 1999; FREI et al., 1998).

As GAGs mais importante do ponto de vista fisiológico, são o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina, o sulfato de dermatan, o sulfato de queratan e sulfato de heparam. Suas unidades básicas são dissacarídeos, formados por uma molécula de ácido urônico e uma de N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina. As GAGs apresentam alta massa molecular, com um número elevado de cargas negativas localizadas na superfície das células ou na MEC. O ácido hialurônico é o único, entre as GAGs, que não contém o grupo sulfato e também não está ligado a uma proteína central. Sua massa molecular pode variar entre 100.000 – 10.000.000 Da. Em relação à sua associação com proteínas, as GAGs podem ser divididas em dois grupos:

Grupo dos ácidos hialurônicos: moléculas de alta massa molecular que formam na MEC complexos com as proteoglicanas sem a participação de ligações covalentes.

Grupo das Proteoglicanas: é composto por macromoléculas formadas pela associação das outras GAGs, por meio de ligação covalente. As proteoglicanas

consistem em uma macromolécula formada por uma proteína central estrutural, na qual várias GAGs se ligam covalentemente. Esta estrutura liga-se então a um ácido hialurônico, formando uma proteoglicana. As proteoglicanas participam de vários processos celulares que incluem a proliferação, a migração, a adesão e a agregação celular. Além disso, são importantes no controle de processos inflamatórios e remodelagem (HOSHI et al., 1999).

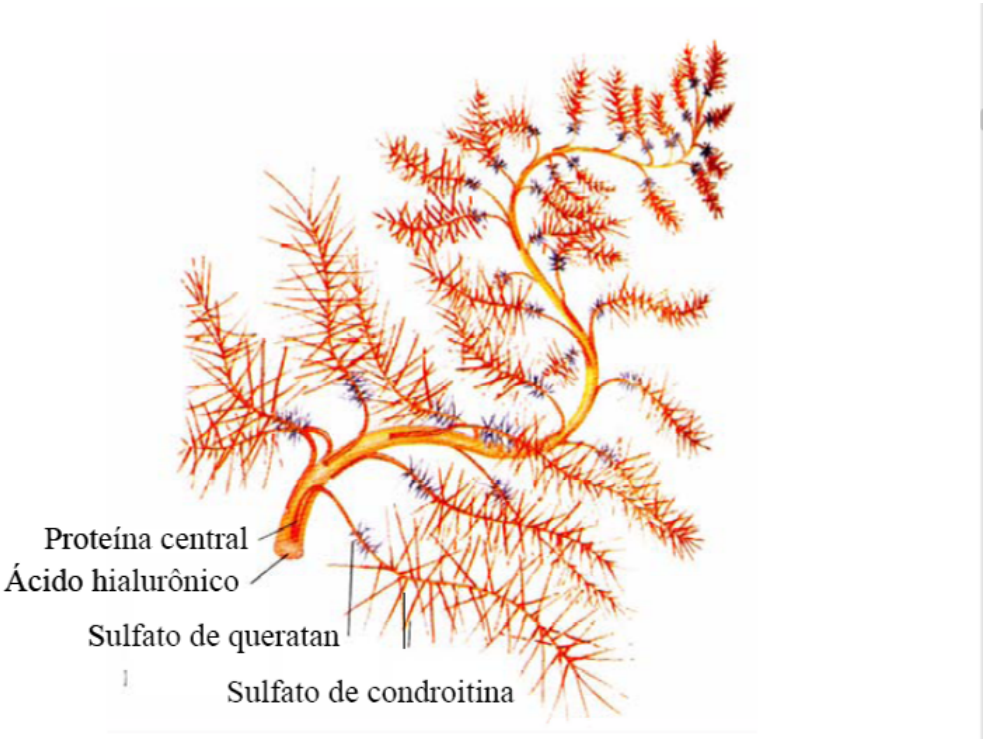


FIGURA 3 - Representação de uma GAG, AH e uma proteoglicana (GOISSIS, 2008).

Osteopontina: embora seja uma glicoproteína é descrita separadamente. É encontrada na MEC de todos os tecidos, mas tem função importante no tecido ósseo. Apresenta vários domínios de adesão de osteoblastos e osteoclastos.

Elastina: forma as fibras elásticas. As células produtoras de elastina na pele são os fibroblastos. Como o colágeno, a elastina é rica em glicina e prolina. Também possui resíduos de aminoácidos polares como aspartato, glutamato, entre outros. Além destes, a elastina contém dois aminoácidos incomuns, a desmosina e a isodesmosina, formados por ligações covalentes entre os quatro resíduos de lisina. Essas ligações cruzadas são responsáveis pela consistência elástica da elastina, que é cinco vezes mais extensível que a borracha.

Colágeno: componente de fundamental importante descrito a seguir.

1.4 Colágeno

A definição para a palavra colágeno, encontrada nos dicionários atuais consiste em, uma proteína de relevante importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Substância fundamental do tecido conjuntivo que, além de preencher as lacunas dos tecidos parenquimatosos, produz fibras colágenas, elásticas e reticulares.

O termo colágeno existe há muito tempo, deriva da palavra grega que significa cola. Sua primeira definição no dicionário surgiu em 1983 como sendo aquele constituinte dos tecidos que, por aquecimento, dá origem à gelatina (JUNQUEIRA, 1993). Os colágenos são as principais proteínas da MEC perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo, sendo os componentes estruturais primários da MEC, tendo papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz (REINERT e JUNDT, 1999). O colágeno é uma proteína fibrosa, insolúvel e de importância fundamental na MEC do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. Uma das principais funções do colágeno é a de manter a estrutura física de uma espécie, devido à sua grande resistência mecânica conferida pela sua organização macromolecular, que resulta na formação de fibras, principalmente no caso do colágeno tipo I. Os colágenos são sintetizados como pró-colágenos. Após a secreção dessas moléculas para o meio extracelular, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares, as colagenases. Com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas e estas, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas (REINERT e JUNDT, 1999).

O colágeno tipo I forma fibrilas de colágeno que são organizadas em fibras que se associam com outros tipos de fibras ou com as próprias fibrilas de colágeno (MILLER, 1976). O tamanho das fibrilas de colágeno é um fator importante para determinar a natureza física do tecido (PARRY et al., 1978). O tamanho das fibrilas de colágeno depende do tipo de tecido e das condições fisiológicas (HARALSSON e HASSEL, 1995). As taxas de síntese e de degradação do colágeno também podem determinar o tamanho das fibrilas de colágeno (ADACHI et al., 1999; BIRK et al., 1990) responsável por conferir força e resistência (CHOI et al., 2007). O colágeno tipo I é o principal componente estrutural da MEC, responsável pela manutenção da estrutura da derme (JUNG et al., 2007). Colágeno tipo I é primeiramente sintetizado pelos fibroblastos como um precursor solúvel, procolágeno tipo I, o qual é secretado pelos fibroblastos e sofre ação proteolítica para formar as fibras insolúveis de colágeno. O

TGF-β é responsável pela transformação de procolágeno em fibra de colágeno (CHOI et al., 2007). É sabido que o TGF-β potentemente estimula a síntese de colágeno, e tem sido demonstrado que o TGF-β diminui a expressão das MMP-1 e aumenta a expressão do TIMP-1. TGF é expresso em pele humana normal in vivo, em queratinócitos e fibroblastos. (SHIN et al., 2005).

O colágeno é abundantemente encontrado na pele, tendões, vasos sanguíneos, cartilagem, ossos, córnea, estão presentes também nos interstícios de todos os outros tecidos e órgãos, com excessão do sangue, linfa e tecidos queratinosos.

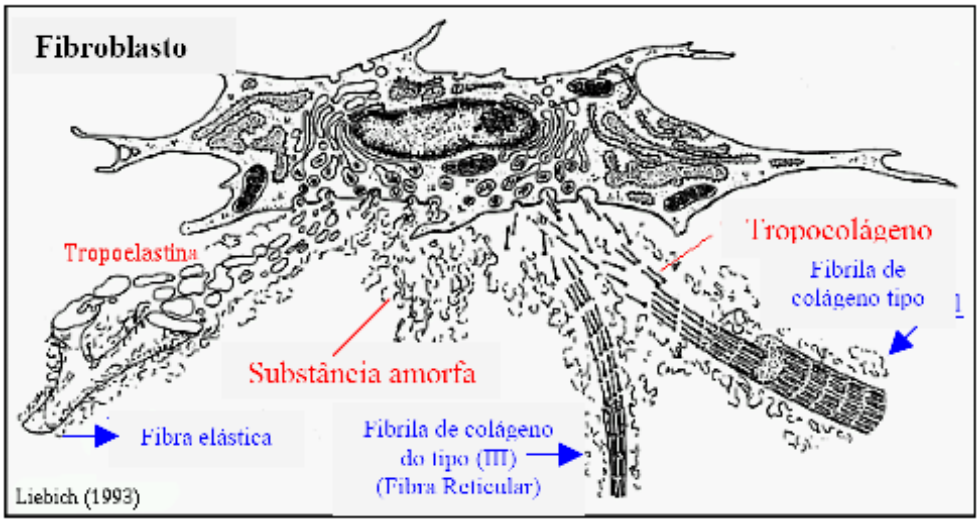


FIGURA 4 - Representação da biossíntese de colágeno (LIEBICH, 1993).

A biossíntese de colágeno pelos fibroblastos e sua organização na estrutura de fibras é mostrada no modelo esquemático.

O colágeno é uma proteína formada a partir de 19 cadeias α diferentes (cadeia α: denominação dada a cada cadeia polipeptídica que forma a tripla hélice do colágeno) e que associadas 3 a 3, dão origem à pelo menos 27 tipos diferentes de colágeno, que são classificados de acordo com as características da estrutura primária das cadeias α que formam a triple hélice. Cada cadeia α apresenta uma massa molecular de aproximadamente 100.000 mol/g e para cada caso o colágeno tipo I, a cadeia α-1 contém 1056 resíduos de aa e a cadeia α-2 1038 resíduos, dando origem a uma tripla hélice (SILVA, 2005). O colágeno tipo I é constituido por três cadeias polipeptídicas do tipo α_1 (I) α_1 (I)'e α_2 (I). Nos tecidos, é encontrado na forma de fibras com diâmetros ente 80 e 160 nm, formando a estrutura do sistema vascular, tendões,

tecido ósseo e muscular (HAY, 1992). O colágeno tipo I é abundantemente encontrado no tecido cutâneo e também nos tendões, ossos e córnea.

O colágeno tipo I é formado por três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição de um triplete Gly-X-Y onde o X é geralmente uma Prolina (Pro) e Y é uma Hidroxiprolina (Hip). As posições X e Y, além da Prolina ou Hidroxiprolina, podem ser ocupadas por outos aminoácidos naturais. Esta estrutura corresponde à sua unidade monomérica e recebe o nome de Tropocolágeno (SILVA, 2005).

Analisando a composição química, os aminoácidos mais significativos no colágeno tipo I consistem em: 33% de Glicina, 12% Prolina e 11% Hidroxiprolina, 0,7% de de Hidroxilisina, não possui Triptofano (Trp) e os resíduos de Tirosina encontram-se exclusivamente na região dos telopeptídeos, que correspondem às regiões não helicoidais do tropocolágeno. Os aminoácidos polares correspondem a quase 40% da molécula, 11% são básicos e 9% ácidos, os demais 17% correspondem a aminoácidos hidroxilados. Aproximadamente 4% dos resíduos correspondem a amidas de Aspartato e Glutâmico (Glu). Uma característica que diferencia o colágeno de outras proteínas é a presença de alta concentração de glicina seguida de prolina e hidroxiprolina. O prolina e o hidroxiprolina se originam da hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina após o processo de tradução (GOISSIS, 2008).

Quadro 1 - Aminoácidos do colágeno tipo I e seus resíduos nas cadeias α eβ

Classificação	Aminoácidos	Cadeia α1	Cadeia α2
Estruturais	Glicina	345	346
Estruturais	Hidroxiprolina	114	99
Estruturais	Prolina	127	108
Hidrofóbico	Leucina	9	18
Hidrofóbico	Isoleucina	22	33
Hidrofóbico	Metionina	7	4
Hidrofóbico	Fenilalanina	13	15
Hidrofóbico	Tirosina	5	4
Hidrofóbico	Valina	17	34
Básico	Lisina	34	21
Básico	Arginina	53	56
Básico	Histidina	3	8
Básico	Hidroxilisina	4	9
Ácido/ Amida	ácido aspártico	33	24
Ácido/ Amida	Asparagina	13	23
Ácido/ Amida	ácido glutâmico	52	46
Ácido/ Amida	Glutamina	27	24
Outros	Alanina	124	111
Outros	Treonina	17	20
Outros	Serina	37	35

Fonte: GOISSIS, 2008.

Um estudo, partindo da informação que o colágeno tipo I representa 90% do total de colágeno existente, estimou superficialmente que o número de monômeros de colágeno tipo I (tropocolágeno), no homem adulto é cerca de 10^{21} unidades. Sendo assim, o colágeno tipo I, é a molécula biológica com maior número de domínios funcionais existente no reino animal (GOISSIS, 2008).

São encontrados na natureza mais de 27 tipos de colágenos, sendo o colágeno tipo I o mais importante. O colágeno tipo I é responsável não somente pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos, devido suas propriedades mecânicas (GOISSIS, 2008), mas também por agir nas funcionalidades teciduais em função de sua interação com as células presentes na MEC (HAY, 1992). Estudos têm

mostrado que o colágeno tipo I apresenta uma unidade física conhecida como “período D”, a qual tem participação no controle de eventos biológicos que dependem da adesão celular sobre a MEC para desencadear a expressão da atividade (DI LULLO et al., 2002). Este “período D” é caracterizado por apresentar uma distribuição ordenada de aminoácidos que tem origem na interação particular das moléculas de tropocolágeno para a formação das estruturas fibrilares que compõem a tripla hélice (CHAPMAN et al., 1990). Estas interações são dependentes das alterações bioquímicas, assim como da ação mecânica sobre os tecidos (HYNES, 2002). Estes processos são afetados pela simples presença da seqüência de aminoácidos arginina, glicina e aspartato na estrutura primária do colágeno tipo I, ou em outra proteína da MEC como a fibronectina. Esta seqüência de aminoácidos arginina, glicina e aspartato é um dos determinantes mais importantes para adesão celular na MEC (HYNES, 2002; BHADRIRAJ e LINDA, 2000) apesar de existirem outras (KNIGHT et al., 1998; GOISSIS, 2008).

O colágeno e a elastina formam uma rede tri-dimensional constituindo a arquitetura basal da derme, na qual dispersam outras substâncias e células. Os colágenos fibrilares são responsáveis pelas propriedades mecânicas e pela integridade estrutural dos tecidos. A elastina é caracterizada pela sua alta força química e física e especialmente por sua característica elástica (FREI et al., 1998; GARDNER et al., 1999).

A função do colágeno é manter íntegra a estrutura fibrilar, ao mesmo tempo em que esconde os sítios potenciais que dão origem a eventos celulares (KEENE et al., 2000). O sítio de ligação da decorina ao colágeno conforme estudo demonstra parece ser o mesmo, onde deformações estruturais ocorrem induzidas por ações mecânicas (BARENBERG et al., 1978).

A alteração da estrutura do colágeno do tipo I pela oxidação (VARANI et al., 2006) ou pela degradação proteolítica (VARANI et al., 2001) modifica sua atividade de crescimento e indução da proliferação celular.

1.4.1 Colágeno e colágeno hidrolisado

O colágeno é o maior constituinte do tecido conectivo dos animais. A gelatina, forma desnaturada do colágeno é preparada em escala industrial a partir de matéria-prima animal (OHGUCHI et al., 2006; OHARA et al., 2007). A gelatina é uma mistura heterogênea de polipeptídeos, os quais são produzidos por hidrólise do colágeno. Após degradação enzimática este colágeno passa a ser um colágeno hidrolisado, uma

gelatina hidrolisada, a qual contém peptídeos com uma massa molecular médio de 3 a 6 kDa (OESSER et al., 1999).

Do ponto de vista nutricional, a gelatina é considerada uma proteína não completa (OESSER et al., 1999), devido a ausência do aminoácido triptofano, além da baixa concentração de outros aminoácidos essenciais. A gelatina, além de seu emprego como alimento, também é muito usada na medicina popular para melhorar a circulação sanguínea (RAVELOJAONA et al., 2007; IWAI et al., 2005), e melhorar problemas articulares (MORGANTI e RANDAZZO, 1984; OHARA et al., 2007) Muitos outros usos terapêuticos vem sendo aplicados e estudados. Estudos mostram positivos efeitos da ingestão de gelatina hidrolisada no crescimento de cabelos e unhas (MORGANTI e RANDAZZO, 1984). Outros estudos têm identificado no sangue (OHARA et al., 2007; IWAI et al., 2005), ou no tecido cartilaginoso (OESSER et al., 1999) a presença de peptídeos de colágeno, após ingestão de gelatina hidrolisada, esclarecendo o processo de absorção desta proteína. Castro, 2007 avaliou os efeitos anti-ulcerativo e antitumoral de colágeno hidrolisado bovino e suíno em ratos e camundongos respectivamente, onde o hidrolisado suíno apresentou em torno de 60% de inibição das lesões ulcerativas quando administrado em dose única e os hidrolisados bovinos no experimento de dose dupla, a porcentagem de inibição das lesões ulcerativas gástricas foi maior que 70%, e no tratamento antitumoral os hidrolisados bovino diminuíram a capacidade proliferativa celular. Oesser e Seifert, 2003 provaram a estimulação de biossíntese e secreção de colágeno tipo II em cultura de condrócitos bovino em presença de colágeno hidrolisado tipo I e fração e colágeno hidrolisado tipo II. Estudos demonstram que a ingestão de peptídeos de colágeno induz o aumento da densidade dos fibroblastos e aumenta a formação das fibras de colágeno da pele porcos (MATSUDA et al., 2006), e a ingestão de gelatina e peptídeos de colágeno, induzem em índices diferentes a síntese de colágeno em pele de ratos, Shin'ichiro et al., 2002, sugerem que está menor indução da síntese de colágeno pela amostra de gelatina deve ser causada por sua massa molecular aumentada em relação aos peptídeos, sendo assim uma menor massa molecular é importante para a síntese de colágeno da pele.

1.5 Integrinas

As integrinas são moléculas heterodiméricas responsáveis pela adesão celular a vários substratos e, conseqüentemente, respondem pela migração, proliferação e diferenciação. São formadas por associação entre si de 16 subunidades α e β. A combinação de uma subunidade α e β caracteriza a especificidade de um receptor.

Existem vários tipos de integrinas, sendo que, a integrina $\alpha_1\beta_2$ é específica da adesão celular sobre o colágeno.

1.6 Interação célula – MEC

Uma das funções da MEC é interagir com as células promovendo ou regulando funções como migração, adesão, proliferação, diferenciação e morfogênese. Todas estas funções são exercidas e controladas por meio da interação entre os múltiplos sítios que formam a MEC. Estes sítios interagem com as células através de receptores de membrana, que são proteínas de membrana, que incluem as integrinas e não integrinas.

A interação das células com o meio externo por meio destas proteínas de membrana ocorre devido às funcionalidades receptoras. Estas proteínas participam da transdução de informações originadas na MEC para o interior celular, sinalizando uma regulação ou modificação de uma atividade celular.

Neste estudo foram investigados os efeitos biológicos da adição de super colágeno hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina em cultura de fibroblasto humano normal. Os fibroblastos humanos normais foram tratados com diferentes concentrações dos colágenos e frações hidrolisadas. Após os tratamentos foram avaliadas as seguintes propriedades biológicas: adesão celular, citotoxicidade, capacidade de aumentar a síntese de colágeno e modificações nas fases do ciclo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudo dos efeitos proliferativos na síntese de colágeno e síntese celular, em cultura de fibroblastos humanos de pele normal tratados com colágeno bovino e derivados.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de cultura primária de fibroblastos de pele humana normal
- Análise da adesão e afinidade celular
- Análise da viabilidade e citotoxicidade celular pelo método colorimétrico de MTT
- Análise da síntese de colágeno pelo ensaio colorimétrico de Picrosirius
- Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de colágenos

Todas as amostras foram produzidas e cedidas gentilmente, pela companhia Gelita South America (Cotia, SP, Brasil):

- Colágeno super hidrolisado lote 21866 06
- Colágeno hidrolisado lote LF21638 05
- Gelatina lote M7293

Preparação e obtenção do colágeno hidrolisado:

O tecido conectivo da pele bovina foi pré-tratada com NaOH e H_2O_2. Após lavagem e neutralização com ácido, as proteínas foram desnaturadas por aquecimento e posteriormente digeridas com proteases. A atividade enzimática foi inibida por inativação térmica. Após estes procedimentos a solução foi concentrada e seca em *spray dryer*.

Para a obtenção de derivados de colágeno hidrolisado com menores massas moleculares, diferentes proteases foram empregadas.

A amostra de gelatina foi obtida pelo mesmo processo, porém sem a utilização de digestão enzimática, a secagem ocorre em túnel de resfriamento e o processo é finalizado após a moagem.

3.2 Preparo das soluções das amostras protéicas

As amostras protéicas foram avaliadas nos ensaios de adesão celular, MTT e Picrosirius em 10 diferentes concentrações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,5; 3,0; 6,0; 12; 25 e 50 mg/mL. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q como solvente. O ensaio de citometria de fluxo foi realizado apenas na concentração de 50 mg/mL. Para a amostra de gelatina, utilizou-se um banho-maria a 37 °C para dissolução da amostra.

3.3 Preparo do meio de cultura

Na capela de fluxo laminar previamente esterilizada o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, Alemanha) em pó foi preparado. Foram medidos aproximadamente 90% do volume a ser preparado de água Milli-Q (Millipore Corporation, EUA) (15 - 20 °C). Adicionou-se lentamente o pó sob agitação constante. Após dissolução total do pó,

acrescentou-se por litro 2,0 g de bicarbonato de sódio 5,6% e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e antibiótico, gentamicina (100 U/mL; Roche, Alemanha). Completou-se o volume com água Milli-Q e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, GP Express Plus (Stericup, Millipore Corporation, EUA). O meio de cultura preparado foi designado como meio RPMI-1640 completo e armazenado de forma estéril em geladeira (± 5 °C). Todos os ensaios realizados neste projeto foram desenvolvidos na capela de fluxo laminar previamente esterilizada.

3.4 Preparo da cultura primária

Os fragmentos de pele (1 cm^2) foram obtidos de pacientes submetidos a procedimentos de cirurgia dermatológica normal de blefaroplastia, os quais fizeram parte do projeto em colaboração (Protocolo de pesquisa 921/06), atendidos pelo Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo da FMUSP. As amostras utilizadas neste trabalho foram adquiridas de mulheres na faixa etária de quarenta anos, previamente selecionadas, coletadas de forma asséptica e imediatamente colocadas em tubo cônico estéril contendo meio de cultura RPMI-1640 completo. O fragmento foi transferido para uma placa de Petri P-35 mm contendo meio de cultura, e lavado para retirar o excesso de sangue, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura foram retirados os tecidos excedentes de gordura e tecido degenerado. O fragmento já “limpo” foi cortado em fragmentos diminutos, os quais foram distribuídos em três frascos de cultura (Nunc, Brand Products, Germany) (± 15 pedaços em cada) com meio de cultura. As placas foram transferidas para uma estufa umidificada de cultura com temperatura de 37 °C e 5% CO_2 e examinadas ao microscópio invertido, três vezes por semana, momento onde foi trocado o meio de cultura. Todas as células cresceram em meio RPMI 1640 completo, em frascos de culturas (Nunc) com superfície ventilada de 75 cm^2. Ao atingirem a subconfluência, as células foram tripsinizadas (0,05% tripsina, Gibco, EUA) e plaqueadas em garrafas de 25 cm^2 para a detecção da expressão de marcadores específicos da linhagem de fibroblastos, por citometria de fluxo e alíquotas desta suspensão celular, congeladas em nitrogênio líquido. Os fibroblastos utilizados foram obtidos de 1°, 2° e 3° passagens. Em todos os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços ou subcultivadas em placas de Petri. Para cada experimento, de quatro a seis culturas paralelas, em média foram utilizadas.

3.5 Ensaio de adesão celular – Violeta cristal

Foram adicionados em placa de 96 orifícios fundo chato (Corning Inc, Nova Iorque, EUA) 100µL/poço das soluções de proteínas e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período a placa foi lavada com solução tampão fosfato, pH 7,2 (PBS) e adicionado a cada poço 100 µL da suspensão de fibroblasto ($5x10^5$ células/mL). O grupo controle foi composto somente pela suspensão de fibroblastos na mesma concentração, num volume final de 200 µL/poço. Na seqüência, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido, as placas lavadas 3 vezes com solução tampão PBS, e fixadas com 50 µL de paraformaldeído 0,2%, e incubadas em estufa de CO_2 a 37 °C por 1 hora. Depois da incubação as placas foram lavadas com a solução tampão PBS, secas à temperatura ambiente, por 24 horas. As placas foram coradas com 100 µL/poço do corante violeta cristal (solução em ácido acético 5%), por 10 minutos e lavadas com solução tampão PBS e secas a temperatura ambiente. As células fixadas, aderidas e coradas pelo cristal violeta foram eluídas pela adição de 50 µL de metanol 50% e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Os resultados foram capturados em espectrofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 550 nm. Todas as concentrações foram testadas em octoplicatas.

3.6 Análise da capacidade proliferativa e citotoxicidade - MTT

Para a análise da capacidade proliferativa e citotoxicidade dos fibroblastos humanos normais incubados com diferentes amostras, empregou-se o método de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) brometo 2,5-difeniltetrazólio), descrito por Mosmann (1983). Este método avalia a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, capazes de reduzir o MTT por desidrogenases mitocondriais a cristais de formazan pelas células vivas. Alíquotas de 100 µL/poço da suspensão de fibroblastos foram cultivadas em placas de 96 orifícios fundo chato na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas por 18 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após este período de incubação foram adicionados 100 µL/poço das soluções de proteínas nas diferentes concentrações, exceto no grupo controle, que recebeu somente 200 µL/poço da suspensão de fibroblastos, na mesma concentração celular. Após o tratamento as placas foram incubadas por 24 horas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO_2. Após a incubação foi adicionado em cada poço 100 µL de MTT (solução 5 mg/mL), e incubadas por 3 horas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO_2. Após

este período, o sobrenadante foi removido e acrescentou-se 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a 10% para a dissolução dos cristais de formazan, que se formaram e se apresentaram como precipitado.

Os resultados foram adquiridos em espectrofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados expressam a porcentagem média de células viáveis. O valor da densidade óptica do grupo controle não tratado foi considerado como 100% de viabilidade celular e os resultados das demais células tratadas foram comparadas a este valor. Foram expressos também os valores de IC_{50} (IC_{50} - concentração de uma determinada substância necessária para inibir 50% de um processo biológico) e o R^2 (coeficiente de correlação) para as células tratadas. Todas as concentrações foram realizadas em octoplicatas.

3.7 Análise das fases do ciclo celular e morte celular – Citometria de fluxo

Foi adicionado em placas de Petri de 2 cm^2 (Nunc, Brand Products, Germany) 1 mL da suspensão de fibroblastos na concentração de $1x10^6$ células/mL e incubadas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO_2, overnight. Os fibroblastos atingiram, após este período a confluência de 70%, quando foram adicionados 500 µL das soluções de colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina na concentração de 50 mg/mL de proteína, exceto no grupo controle, que recebeu somente 1,5 mL da suspensão de fibroblastos, na mesma concentração celular. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e após o período de incubação de 24, ou 48, ou 72 ou 96 horas, as suspensões celulares aderidas foram removidas pelo tratamento com 30 mg/mL de solução de tripsina por 10 minutos a temperatura ambiente e inativada em seguida com 5 g/L do inibidor de tripsina e 0,1 g/L de ribonuclease – A. As células foram incubadas com solução de iodeto de propídio (2 mg/mL, Sigma), para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular. A distribuição das fases do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados obtidos pelo programa de aquisição Cell-Quest adquirido no citômetro foram analisados pelo software WinMDI 2.8 FACS. A aquisição da população celular, em média de 10.000 eventos foi realizada pelo programa “Cell Quest” (BD) e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência (FL2). Os resultados foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: apoptose (sub-diplóide), G0/G1, S e G2/M. O teste foi realizado em oito réplicas para cada proteína.

3.8 Análise da Biossíntese de colágeno – Picrosírius (Sirius red)

Foram adicionados em placas de 96 orifícios 100µL/poço da suspensão de fibroblastos na concentração de $5x10^4$ células/mL e incubadas por 18 horas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após este período de incubação foram adicionados 100 µL/poço das soluções de proteínas nas diferentes concentrações, o grupo controle não tratado recebeu somente a suspensão de fibroblastos na mesma concentração, num volume final de 200 µL/poço. As células foram incubadas por 24 ou 48 horas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO_2.

Na seqüência as células foram lavadas duas vezes com solução tampão PBS, fixadas por 1 hora com 200 µL/poço de solução Bouin à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com água destilada e secadas a temperatura ambiente por 2 horas. Após secagem as placas foram coradas com 200 µL/poço de solução vermelho Sírius (0,5 g vermelho Sirius F3B Gurr BDH, 500 mL solução aquosa saturada de ácido pícrico e ácido pícrico sólido, para aumentar a saturação) por 1 hora, sob leve movimento à temperatura ambiente, protegido da luz. Após coloração o sobrenadante foi removido por aspiração em bomba de vácuo, as placas foram lavadas com 250 µL/poço de HCl 0,01 mol/L para a remoção do corante não fixado. Os colágenos corados no interior das células e os secretados para o meio foram solubilizadas pela adição de 150 µL de NaOH 0,1 mol/L por 1 hora sob agitação.

Os resultados foram adquiridos em espectrofotômetro (Thermo Plate – TR-Reader) para a obtenção da densidade óptica determinada a uma absorbância no comprimento de onda de 550 nm. Os resultados expressam a porcentagem média de síntese de colágeno. O valor da densidade óptica do grupo controle não tratado foi considerado como 100% de síntese de colágeno e os resultados das demais células tratadas foram comparadas a este valor para obtenção da taxa de biossíntese dos demais grupos. Cada concentração foi analisada em octuplicata. Os resultados foram comparados com a curva de padrão do colágeno tipo I da Sigma (Sigma, Alemanha).

3.9 Análise das imagens pelo programa Image J 1.40

As contagens de células das micrografias foram realizadas com o auxílio do *software* analisador de imagens ImageJ 1.40. Foram realizadas 9 capturas de cada condição de tratamento dos fibroblastos em placas de 96 orifícios, utilizando-se o sistema de câmara digital Sony-CCD, com 5,0 mega pixel de resolução, e zoom óptico de 6,0 vezes, acoplada ao microscópio invertido Zeiss. A imagem inicialmente capturada em microscopia de luz polarizada foi convertida para escala de cinza (8-

bits). A partir dessa imagem foi obtida a imagem binária (conversão para preto e branco). Essa imagem foi então submetida à ferramenta de "*threshold"* do programa para separação do tom preto da célula do tom branco do "*background*", dando origem a imagem que foi analisada pela ferramenta de contagem automática de partículas, no caso células. No programa, os pixels com valores de brilho maior ou igual do que o menor "*threshold"* e menor ou igual ao maior threshold são mostrados em vermelho. A ferramenta de contagem automática de partículas faz uma varredura na imagem, contanto os objetos marcados pelo threshold, realizado anteriormente.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi obtida pelo método de Variância – ANOVA com teste comparativo múltiplo de Tukey. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, de cada experimento. Os valores significantes foram considerados com $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização as amostras de colágeno e derivados

As análises físico-químicas das amostras de colágeno e os perfis cromatográficos das amostras utilizadas neste trabalho estão apresentados nos Anexo A a D.

4.2 Ensaio de adesão celular

Um dos objetivos propostos neste trabalho foi à avaliação do grau de afinidade que o modelo celular empregado apresentaria, após os tratamentos propostos, através da análise de adesão celular. As propriedades adesivas do colágeno hidrolisado, assim como da gelatina em fibroblastos de pele, vêm sendo amplamente estudadas nas áreas da bioengenharia e no desenvolvimento de matrizes (MAA et al., 2003; DAIA et al., 2005; DUTTA et al., 1995; LIU et al., 2007), bandagens, biofilmes, enxertos, como recurso para tratamentos de recuperação de tecido cutâneo, feridas, úlceras e queimaduras. Li e colaboradores, 2005 em um estudo comparativo entre colágeno, colágeno hidrolisado e gelatina em queratinócitos mostraram que estas proteínas têm efeito sobre as células testadas, sendo um dos efeitos pesquisados a adesão celular.

Nos gráficos a seguir foi demonstrado, que os fibroblastos de pele humana normal aderem às proteínas do colágeno e frações de maneira significativa.

4.2.1 Análise do ensaio de adesão celular

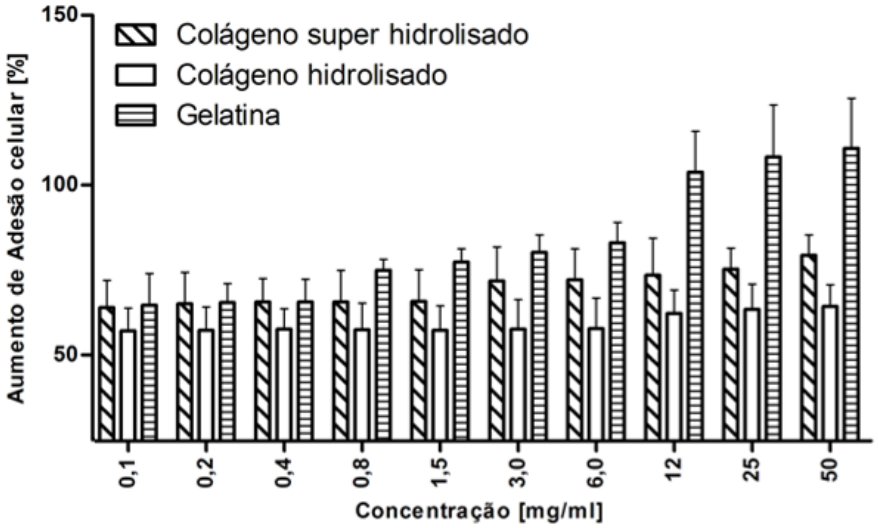


Figura 5: Análise da adesão celular dos fibroblastos normais tratados por 24 horas, com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina.

A figura 5 mostra o gráfico do ensaio de adesão celular para as três amostras testadas durante 24 horas de cultura. As células tratadas com as três amostras de colágeno apresentaram altas taxas de adesão, superiores ao controle. Este resultado de certa maneira já era esperado, devido ao fato de que estas proteínas são conhecidas pelas suas propriedades adesivas (LI et al., 2005). No entanto, esta análise entre as três amostras de colágenos de perfis moleculares diferentes em culturas de fibroblastos normais foi algo inovador proposto neste trabalho e provou que, independente do tamanho da molécula de colágeno, há adesão em relevantes índices.

O aumento da taxa de adesão para as células tratadas com a amostra de colágeno super hidrolisado em comparação ao controle foi de 1,7 vezes maior na concentração de 0,1 mg/mL e 1,9 vezes na concentração de 50 mg/mL (Figura 5). Os valores de adesão nas concentrações de 0,1 mg/mL até 12 mg/mL não diferem estatisticamente, enquanto que a concentração de 25 mg/mL difere estatísticamente, apenas da concentração 0,1 mg/mL. Já a concentração de 50 mg/mL difere significantemente de todas as concentrações analisadas.

As células tratadas com a amostra de colágeno hidrolisado também apresentou altos índices de adesão celular em comparação ao controle (Figura 5). Em todas as concentrações testadas, os resultados foram estatisticamente iguais, e o aumento de adesão para esta amostra de colágeno hidrolisado foi 1,7 vezes maior que o controle.

O perfil de adesão celular encontrado na análise das células tratadas com a amostra de gelatina foi o que apresentou maiores índices de adesão celular entre as três as amostras testadas (Figura 5). O ponto inicial de tratamento 0,1 mg/mL promoveu um aumento de 1,7 vezes adesão e de 2,3 vezes na concentração de 50 mg/mL.

Os resultados sugerem que independente da concentração e da amostra protéica, os fibroblastos aumentaram suas capacidades adesivas frente ao tratamentos protéicos, sendo que as maiores taxas de adesão foram obtidas pela amostra de gelatina, seguida de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado.

As análises estatísticas comparativa entre os diferentes grupos tratados versus o controle encontram-se nos Anexos E a N.

4.3 Citotoxicidade celular e capacidade proliferativa – ensaio de MTT

O ensaio de MTT é amplamente utilizado para quantificar a proliferação e citotoxicidade celular. Este teste proporciona analisar a funcionalidade mitocondrial e consequentemente a viabilidade celular. O ensaio de MTT consiste na medida da atividade da succinato desidrogenase das células.

4.3.1 Citotoxicidade e viabilidade celular – Colágeno super hidrolisado

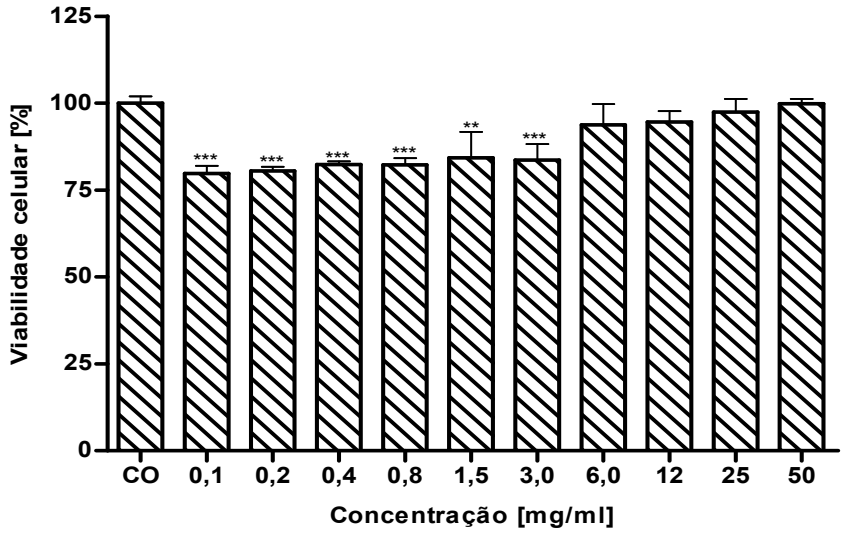


Figura 6: Histograma do experimento de citotoxicidade e viabilidade celular pelo método do MTT em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com colágeno super hidrolisado. Os valores das médias foram expressos em % de viabilidade celular ± desvio padrão e o grau de significância obtido pelo teste de Variância de ANOVA comparado ao controle.

Analisando os resultados obtidos no gráfico da figura 6 pode-se observar que nas menores concentrações 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,5 e 3,0 mg/mL todas as células diminuíram os índices de viabilidade de maneira significante, quando comparado ao controle, porém não mostrando atividade tóxica maior que 30% em média. A partir da concentração 6,0 mg/mL até a concentração final de 50 mg/mL, todos os resultados foram estatisticamente iguais ao controle.

Os resultados sugerem que as células tratadas com colágeno super hidrolisado em todas as concentrações testadas não apresentaram efeito tóxico, mantendo a viabilidade celular, porém sem efeito proliferativo. Os valores de IC_{50} e R^2 das células tratadas com colágeno super hidrolisado foram 17 mg/mL e 0,92 respectivamente. Quando analisamos os valores da IC50% e o índice de correlação (R^2) desta amostra, estes resultados sugerem que estas células apresentam correlação entre a concentração e a sua especificidade.

4.3.2 Citotoxicidade e viabilidade celular – Colágeno hidrolisado

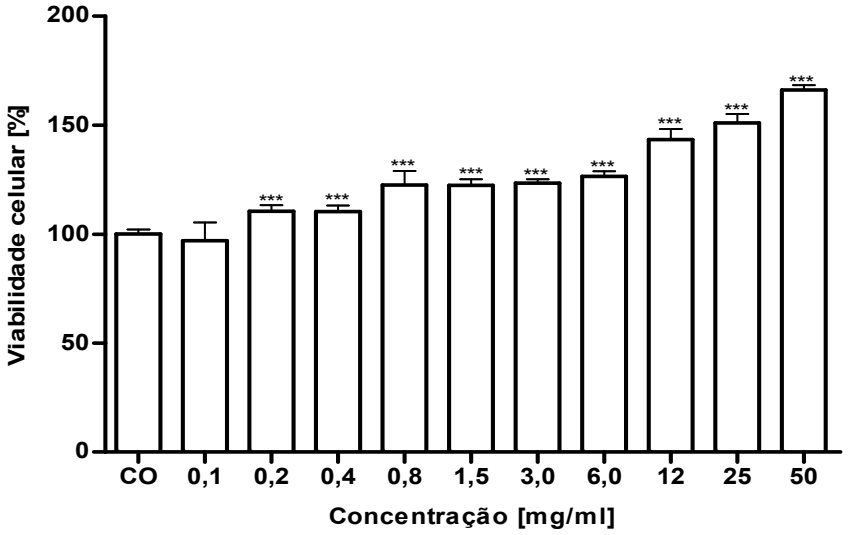


Figura 7: Histograma do experimento de citotoxicidade e viabilidade celular pelo método do MTT em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com colágeno hidrolisado. Os valores das médias foram expressos em % de viabilidade celular ± desvio padrão e o grau de significância obtido pelo teste de Variância de ANOVA comparado ao controle.

As células tratadas com a amostra de colágeno hidrolisado apresentaram os maiores índices de viabilidade celular, quando comparada ao controle (Figura 7). A viabilidade celular seguiu uma curva do tipo dose-resposta. A concentração de 0,1 mg/mL foi estatisticamente igual ao controle, e a partir da concentração de 0,2 mg/mL, houve aumento da viabilidade e indução da proliferação celular, comparado ao controle.

No gráfico apresentado na figura 7, o perfil de dose/resposta, nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL mostrou um aumento de cerca de 1,1 vezes mais que o controle. Nas concentrações 0,8 até 6,0 mg/mL o aumento médio foi de 1,3 vezes, e no intervalo de 12 a 50 mg/mL o aumento foi cerca de 1,6 vezes, que o controle não tratado.

Nenhuma das concentrações apresentaram efeitos tóxicos significativos, a partir da concentração 0,2 mg/mL há uma aumento da resposta proliferativa. Os valores de IC_{50} e R^2 das células tratadas com colágeno hidrolisado foram 8 mg/mL e 0,90 respectivamente. Considerando o IC50%, para estas células foi menor que a amostra anterior, e o seu coeficiente de correlação (R^2), mostrou especificidade na indução da resposta proliferativa.

4.3.3 Citotoxicidade e viabilidade celular – Gelatina

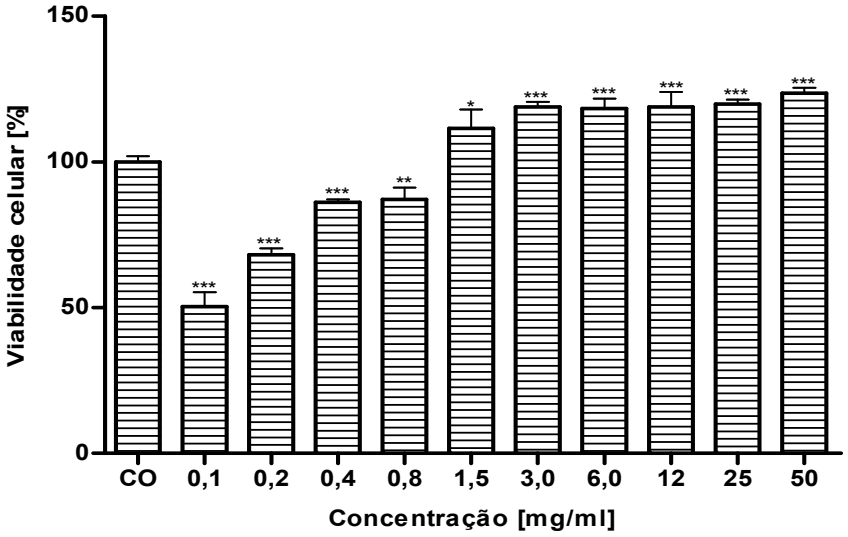


Figura 8: Histograma do experimento de citotoxicidade e viabilidade celular pelo método do MTT em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com com gelatina. Os valores das médias foram expressos em % de viabilidade celular ± desvio padrão e o grau de significância obtido pelo teste de Variância de ANOVA comparado ao controle.

Considerando as médias de viabilidade celular obtidas nesse experimento (Figura 8), pode-se observar os menores valores de viabilidade celular nas duas concentrações iniciais de gelatina, 0,1 a 0,4 mg/mL. Nas concentrações de 0,1 mg/mL até 0,8 mg/mL os valores médios obtidos de viabilidade e proliferação celular foram inferiores ao controle, demonstrando que este composto não apresenta efeitos tóxicos significativos.

A partir da concentração de 1,5 a 50 mg/mL, os resultados demonstraram de modo significante, aumento de viabilidade celular e da resposta proliferativa em relação ao controle. Os valores de IC_{50} e R^2 das células tratadas com gelatina foram 18 mg/mL e 0,80 respectivamente. A IC50% calculada e o coeficiente de correlação (R^2) demonstraram que as células tratadas com gelatina não apresentaram efeito dose-resposta significativa em comparação as demais amostras com baixa especificidade de resposta.

4.3.4 Análise comparativa das amostras dos colágenos nos experimentos de citotoxicidade e viabilidade celular

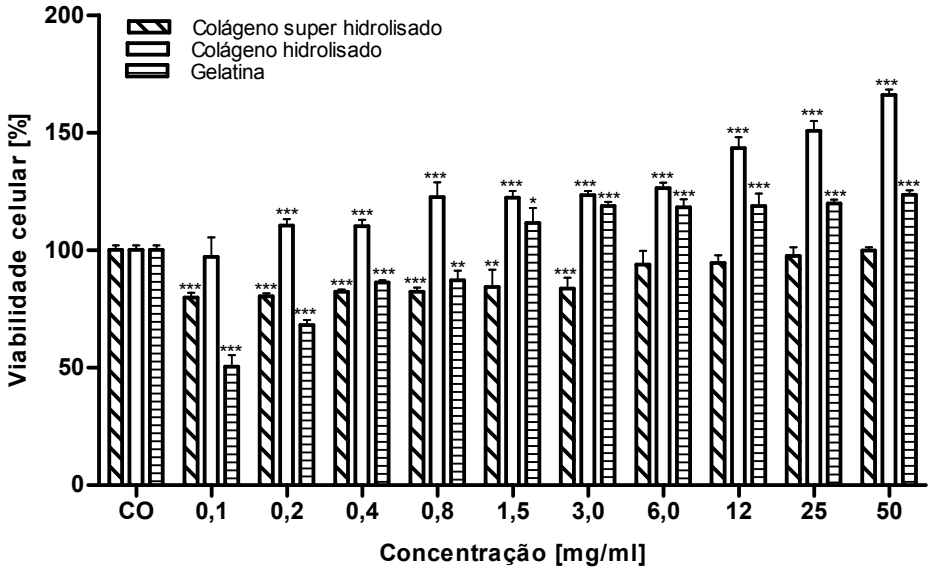


Figura 9: Histogramas das médias da citotoxicidade e da viabilidade celular em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina. Os valores das médias foram expressos em % de viabilidade celular ± desvio padrão e o grau de significância obtido pelo teste de Variância de ANOVA comparado ao controle.

As células tratadas com as amostras de colágeno testadas não apresentaram efeitos tóxicos sobre os fibroblastos normais, mantendo a viabilidade celular, porém sem efeito proliferativo, exceto a amostra de colágeno hidrolisado, onde os resultados sugerem indução da proliferação celular, apresentando efeito dose/resposta.

Destaca-se também que os efeitos das células tratadas com as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado foram específicos, enquanto a amostra de gelatina não apresentou especificidade nas respostas de proliferação e viabilidade celular. As análises estatísticas realizadas entre os diferentes grupos tratados versus o controle encontram-se nos Anexos O a X.

4.4 Biossíntese de Colágeno – ensaio de Picrosirius-red

A técnica de Picrosirius estima quantitativamente o colágeno recém sintetizado e o colágeno total acumulado, durante o período de cultura. Este parâmetro é fisiologicamente mais significante do que a taxa de incorporação de ^{3}H-prolina, pois o colágeno neosintetizado pode ser degradado antes da deposição na MEC. O vermelho de Picrosirius tem a capacidade de detectar as finas fibras, como também as fibras, que foram depositas na MEC de maneira quantitativa.

As moléculas de colágeno apresentam uma birrefringência clássica, característica desta proteína. São ricas em aminoácidos básicos, que reagem fortemente com o corante ácido. Sirius red é um corante ácido forte, que reage com o colágeno e promove o aumento da birrefringência. O aumento da birrefringência promovida pela metodologia de Picrosirius é específica para colágeno, específica para detecção de colágeno em tecidos (JUNQUEIRA, 1979; MONTES, 1996). O colágeno tipo I na técnica de Picrosirius aparece sob luz polarizada, como espessas fibras, com forte birrefringência, corada de vermelho ou amarelo, enquanto o colágeno tipo III aparece como finas fibras com fraca birrefringência, coradas de verde. A cor da birrefringência do colágeno é determinada pelo diâmetro da fibra e não pelo tipo genético de colágeno (JUNQUEIRA e MONTES, 1983). Este ensaio foi realizado em dois tempos de tratamentos, 24 e 48 horas, com o objetivo de avaliar o tempo de tratamento necessário para induzir de forma expressiva a biossíntese de colágeno, após os diferentes tratamentos dos fibroblastos normais.

4.4.1 Biossíntese de colágeno – ensaio de Picrosirius 24 horas

4.4.1.1 Biossíntese de colágeno 24 horas – Colágeno super hidrolisado

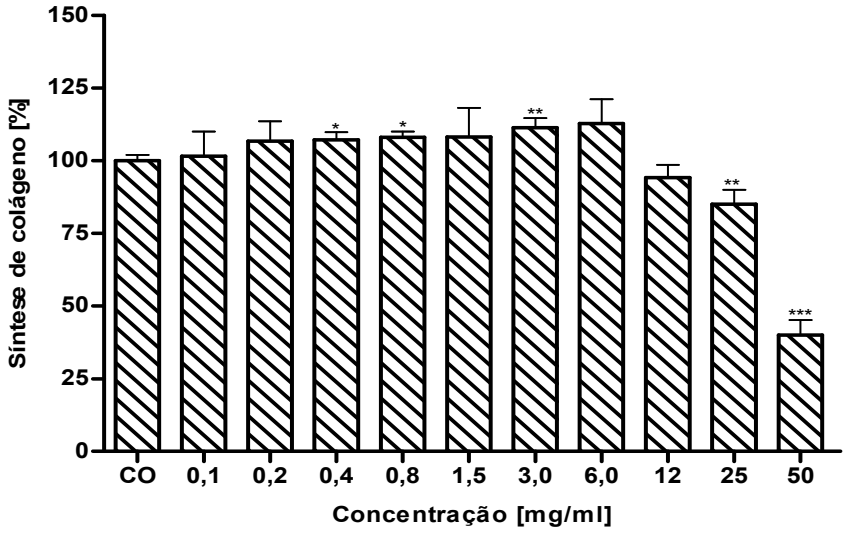


Figura 10: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com colágeno super hidrolisado, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

O gráfico representado na figura 10 mostra a biossíntese de colágeno em resposta à adição de colágeno super hidrolisado. Quando analisamos as diferenças estatísticas das células tratadas com colágeno super hidrolisado em relação ao grupo controle no ensaio de Picrosirius mantidas por 24 horas de cultura, pode-se observar um discreto aumento significante, na biossíntese de colágeno, nas concentrações de 0,4, 0,8 e 3,0 mg/mL, sendo que, nas demais concentrações os resultados são iguais ao controle, exceto para as concentrações de 25 e 50 mg/mL, que apresentaram menores taxas de indução de síntese.

Ao observar os resultados, assim como as diferenças e semelhanças estatísticas, os resultados sugerem nas concentrações de 0,4, 0,8 e 3,0 mg/mL, um aumento cerca de 1,1 vezes na biossíntese de colágeno.

4.4.1.2 Biossíntese de colágeno 24 horas – Colágeno hidrolisado

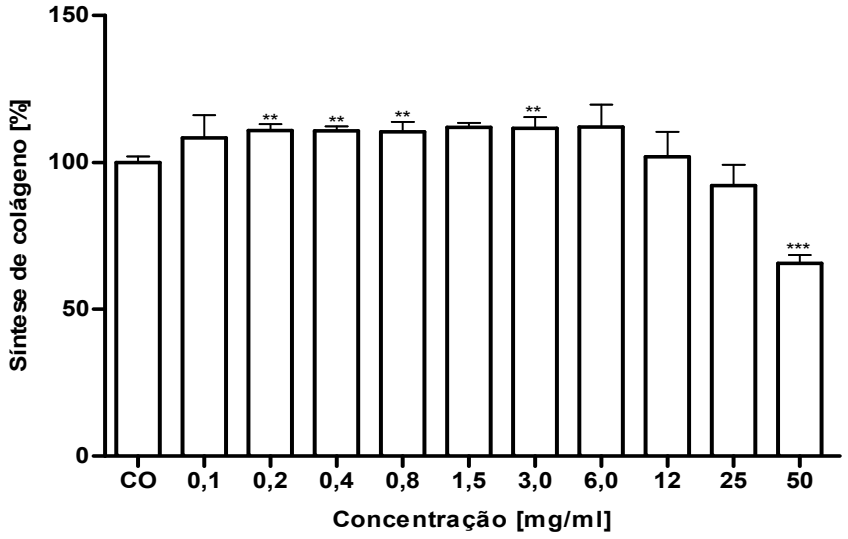


Figura 11: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com colágeno hidrolisado, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

Como apresentado na figura 11, as células tratadas com a amostra de colágeno hidrolisado induziu de maneira significativa a biossíntese de colágeno, a partir da concentração de 0,2 mg/mL, seguida de 0,4, 0,8 e 3,0 mg/m. O índice de biossíntese de colágeno destas células tratadas com esta amostra variou discretamente em relação ao grupo controle, com aumento em média 1,1 vezes. A concentração de 50 mg/mL difere de forma significante do controle, porém para menores índices de biossíntese de colágeno.

Os resultados obtidos para as células tratadas com colágeno hidrolisado foram semelhantes com os apresentados pelas células tratadas com a amostra de colágeno super hidrolisado. O índice médio de aumento de biossíntese de colágeno foi o mesmo, cerca de 1,1 vezes em relação ao grupo controle, nas mesmas concentrações.

4.4.1.3 Biossíntese de colágeno 24 horas – Gelatina

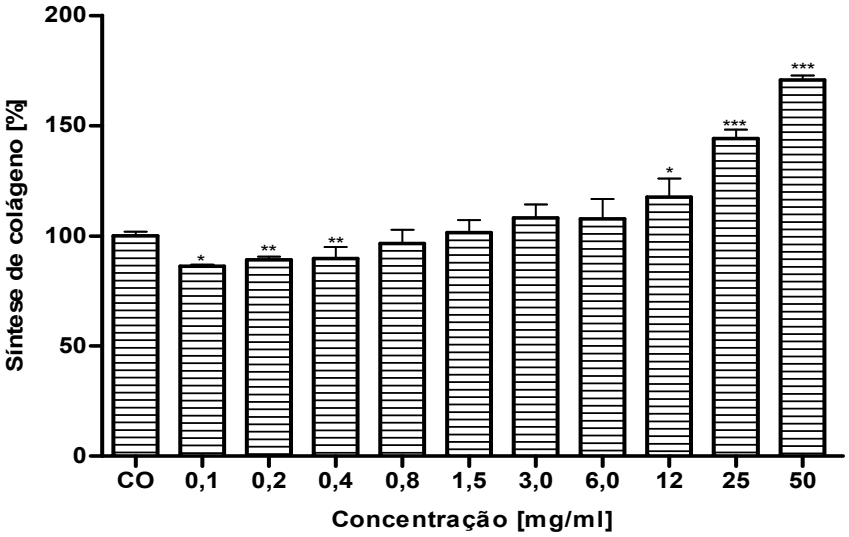


Figura 12: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratadas por 24 horas, com gelatina, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

As análises das médias de biossíntese apresentado no gráfico da figura 12 existem dois grupos de concentrações com efeitos distintos. O primeiro grupo é composto pelas concentrações de 0,1 até 6,0 mg/mL, onde os resultados não apresentaram diferenças, quando comparados ao controle. O outro grupo, que corresponde às concentrações de 12, 25 e 50 mg/mL, difere estatisticamente do controle, com maiores índices de biossíntese de colágeno. O aumento de biossíntese de colágeno para estas concentrações foi de 1,2, 1,5 e 1,7 vezes mais que o grupo controle respectivamente.

4.4.1.4 Análise comparativa da biossíntese de colágeno após 24 horas de tratamento.

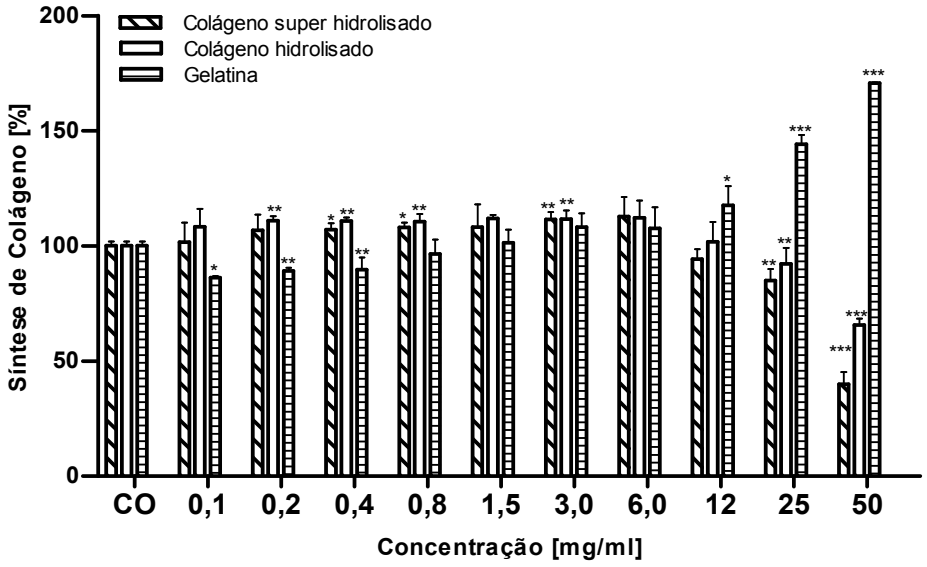


Figura 13: Análise comparativa da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais, após 24 horas com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina pela técnica de Picrosirius. Os valores das médias foram expressos em % de colágeno sintetizado ± desvio padrão e o grau de significância obtido pelo teste de Variância de ANOVA comparado ao controle.

Os resultados apresentados na figura 13 mostraram, que as células tratadas com as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado, induziram nas mesmas concentrações a biossíntese de colágeno. O aumento observado de síntese foi mantido até a concentração de 6,0 mg/mL e a partir desta concentração houve queda acentuada e altamente significativa em relação ao grupo controle, não tratado. Já o perfil desempenhado pela a amostra de gelatina mostrou-se distinto das outras proteínas analisadas. A gelatina induziu aumento na síntese de colágeno a partir da concentração de 12 mg/mL.

Sendo interessante destacar que, para as três amostras avaliadas, a concentração de 6,0 mg/mL foi o ponto divisório entre o aumento ou descréscimo de biossíntese de colágeno e, além deste fato, é importante observar que as células tratadas com colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado geraram perfis semelhantes entre si e distinto da gelatina. Isso pode ser explicado pela similaridade estrutural das amostras.

As análises estatísticas comparativa entre os diferentes grupos tratados versus o controle encontram-se nos Anexos Y a HH.

4.4.2 Biossíntese de colágeno – ensaio de Picrosirius 48 horas

4.4.2.1 Biossíntese de colágeno 48 horas – Colágeno super hidrolisado

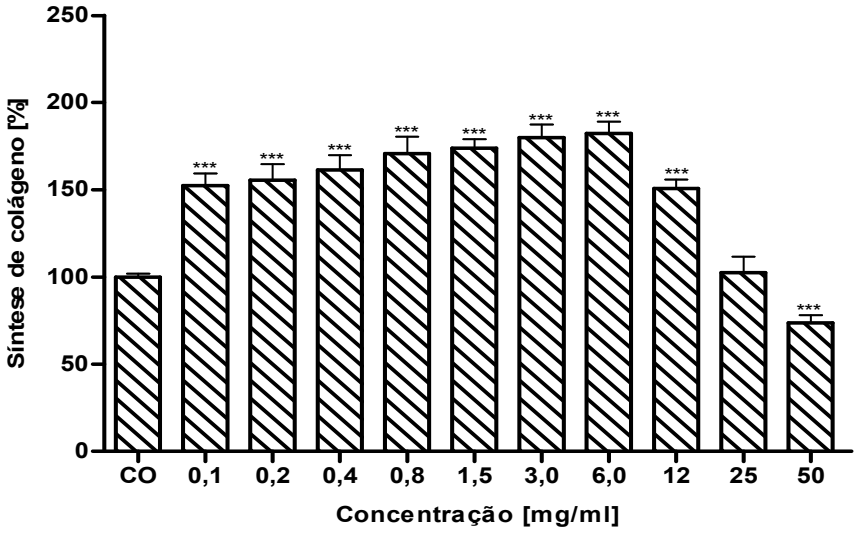


Figura 14: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratados por 48 horas, com colágeno super hidrolisado, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

A análise dos resultados da biossíntese de colágeno, após 48 horas de tratamento com colágeno super hidrolisado (Figura 14) sugere que, exceto nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, houve um aumento altamente significativo de biossíntese de colágeno, comparado ao grupo controle. Nas concentrações de 0,1 mg/mL até 0,8 mg/mL o aumento da biossíntese de colágeno foi cerca de 1,5 vezes maior que o controle, enquanto que nas concentrações de 1,5 mg/mL até 6,0 mg/mL o aumento foi cerca de 1,8 vezes. O perfil dos resultados obtidos no ensaio de Picrosirius de 48 horas para estas células tratadas com esta amostra foram semelhantes aos obtidos nos experimentos de 24 horas, entretanto ocorreu um aumento em média de 1,6 vezes.

4.4.2.2 Biossíntese de colágeno 48 horas – Colágeno hidrolisado

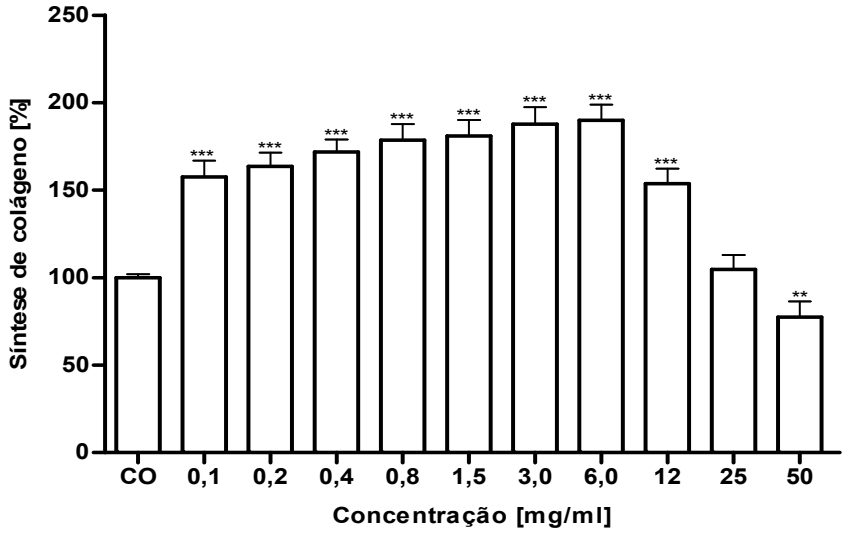


Figura 15: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratados por 48 horas, com colágeno hidrolisado, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

Os resultados encontrados no ensaio de biossíntese de colágeno no tratamento com colágeno hidrolisado por 48 horas (Figura 15) apresentaram um perfil semelhante com os resultados da amostra de colágeno super hidrolisado. A biossíntese de colágeno aumentou até a concentração de 6,0 mg/mL de colágeno hidrolisado e a partir da concentração de 12 mg/mL houve queda.

O aumento de síntese obtido nas concentrações de 0,1 mg/mL até 0,4 mg/mL foi cerca de 1,6 vezes maior em relação ao controle e nas concentrações de 0,8 mg/mL até 6,0 mg/mL foi cerca de 1,8 vezes.

Os resultados obtidos após 48 horas para as células tratadas com a esta amostra reproduziu o mesmo perfil que as culturas de 24 horas, porém este aumento nos experimentos de 48 horas foi altamente significativo.

4.4.2.3 Biossíntese de colágeno 48 horas – Gelatina

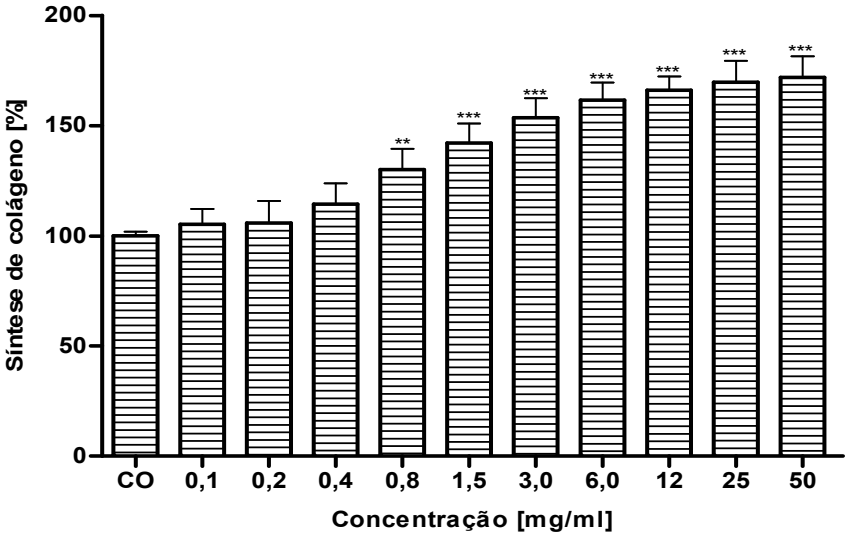


Figura 16: Análise da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais tratados por 48 horas, com gelatina, pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

O perfil de biossíntese de colágeno em resposta a amostra de gelatina (Figura 16) diferiu das amostras anteriores analisadas nos experimentos de 48 horas. As taxas de biossíntese de colágeno foram aumentadas em resposta às maiores concentrações, sendo que até a concentração de 0,4 mg/mL os resultados não diferiram significativamente em relação ao controle, a partir da concentração de 0,8 mg/mL ocorreu aumento na biossíntese, até a concentração final de 50 mg/mL. Nas concentrações de 0,8 mg/mL e 3,0 mg/mL houve aumento médio de 1,4 vezes, quando comparado ao controle, e a partir da concentração de 6,0 mg/mL até 50 mg/mL o aumento foi em média de 1,6 vezes maior.

O perfil de síntese de colágeno obtido no tempo de tratamento de 48 horas para as células tratadas com a amostra de gelatina reproduziu o obtido no tempo de 24 horas. Nas concentrações iniciais os resultados não diferiram do controle, e nas maiores concentrações houve aumento altamente significativo, com índices semelhantes ao observados após 24 horas.

4.4.2.4 Análise comparativa da biossíntese de colágeno no período de 48 horas de tratamento.

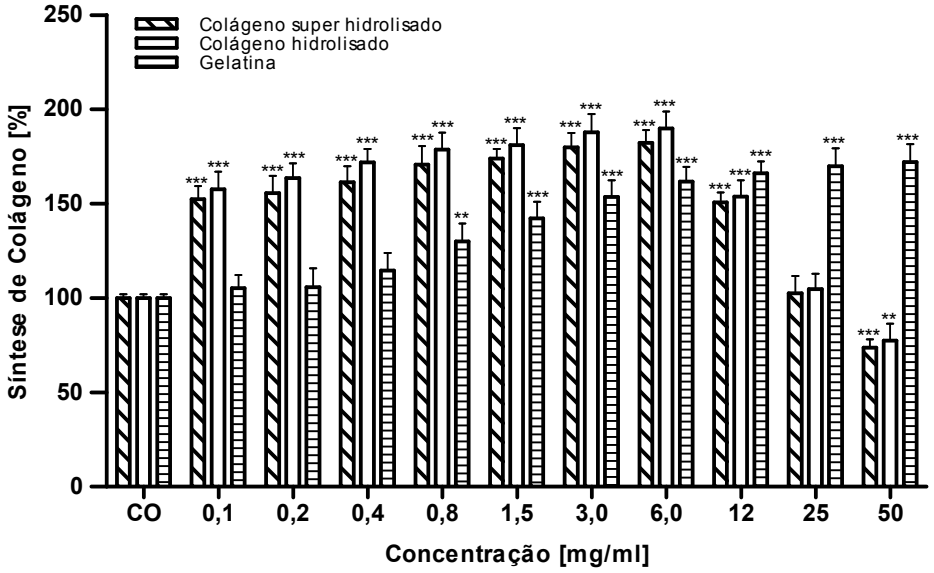


Figura 17: Análise comparativa da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais por 48 horas, com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina pela técnica de Picrosirius. Os valores foram expressos em % de síntese de colágeno ± desvio padrão, e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

As amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado apresentaram perfis semelhantes e com maiores índices de biossíntese de colágeno até a concentração de 6 mg/mL, quando comparadas aos fibroblastos tratados com a amostra de gelatina e o grupo controle, após 48 horas de cultura.

O aumento de biossíntese de colágeno induzido pelas amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado foi observada até a concentração de 6,0 mg/mL, e a partir da concentração 12 mg/mL houve decréscimo. A amostra de gelatina, o perfil de biossíntese de colágeno obtido foi crescente com o aumento da concentração.

As análises estatísticas comparativa entre os diferentes grupos tratados versus o controle encontram-se nos Anexos II a RR.

4.4.2.5 Análise comparativas biossíntese de colágeno nos periodos de 24 e 48 horas de tratamento

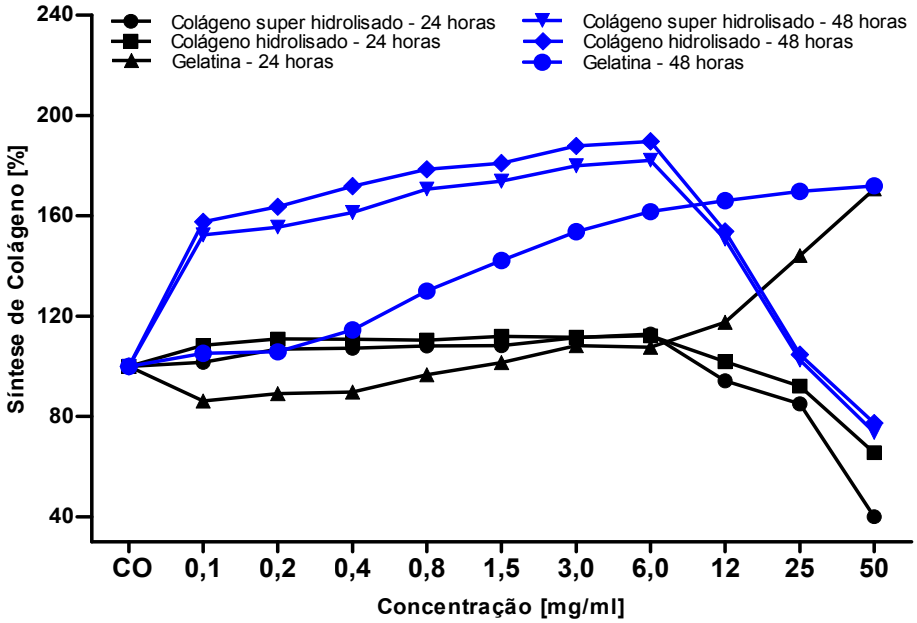


Figura 18: Análise comparativa da biossíntese de colágeno em cultura de fibroblastos normais por 24 e 48 horas com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina pela técnica de Picrosirius.

Os experimentos de Picrosirius realizados após 24 e 48 horas de tratamento foram plotados em conjunto e apresentadas na figura 18.

Os resultados mostraram que após 48 horas de tratamento, todas as amostras na maioria das concentradas testadas, estimularam a biossíntese de colágeno pelos fibroblastos normais.

O aumento foi significativo em relação ao controle em comparação as células tratadas com o colágeno super hidrolisado após 24 horas, em média de 1,1 vezes. Enquanto, que após 48 horas a biossíntese de colágeno foi estimulada significativamente e em média de 1,7 vezes.

A análise comparativa das células tratadas com a amostra de colágeno hidrolisado mostrou índices médios de aumento de biossíntese de 1,1 e de 1,7 vezes, nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente. Por outro lado, as células tratadas com a amostra de gelatina mostraram índices de aumento de 1,5 vezes, em ambos os períodos de tratamento.

Em resumo, nos ensaios de Picrosirius de 48 horas, todas as células tratadas estimularam em índices significantes a biossíntese de colágeno, em relação ao tratamento de 24 horas.

4.4.3 Análise do número de fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas no ensaio de Picrosirius pelo programa Image J

As contagens de células das fotomicrografias foram realizadas com o auxílio do programa de análise de imagens Image J 1.40. Foram realizadas 9 capturas de cada condição de tratamento dos fibroblastos em placas de 96 orifícios, utilizando-se o sistema de câmara digital Sony-CCD, com 5,0 mega pixel de resolução, e zoom óptico de 6,0 vezes, acoplada ao microscópio invertido Zeiss, aumento final de 240X, (Figuras 19 a 22).

4.4.3.1 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas - Colágeno super hidrolisado

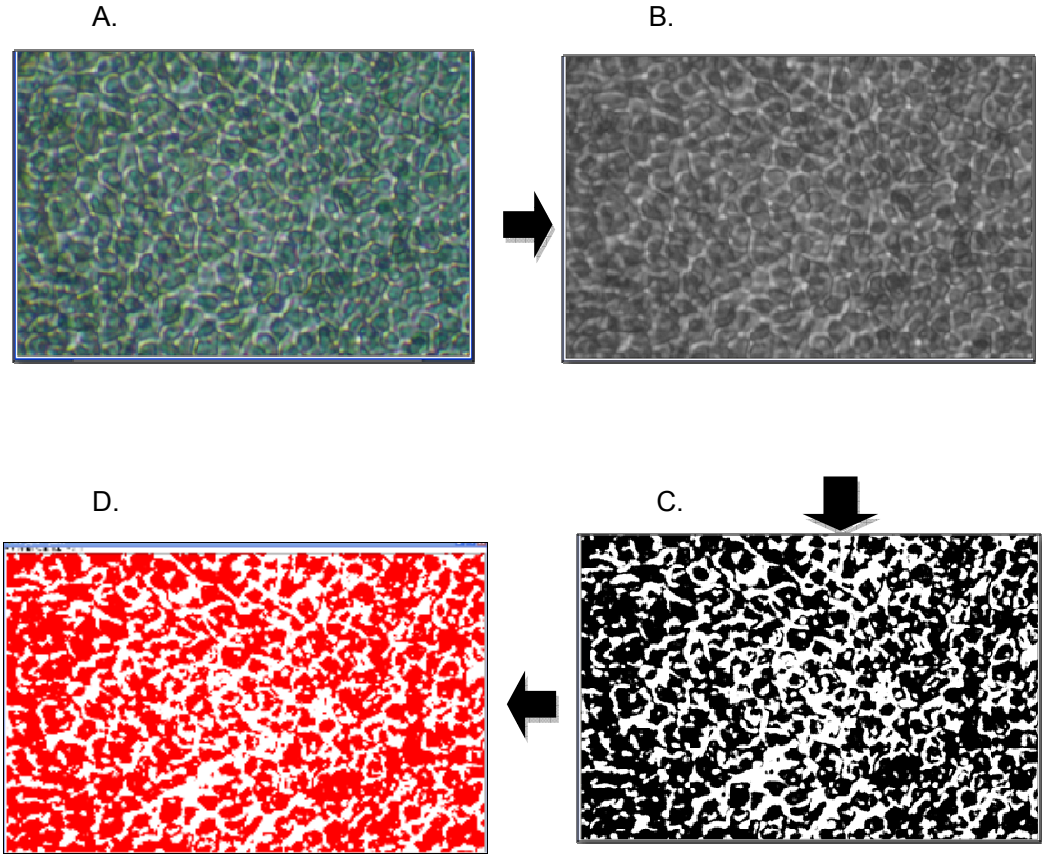


Figura 19: Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas e tratados com a amostra de colágeno super hidrolisado – 6 mg/mL. (A) Imagem capturada pelo sistema de captura Sony- CCD. (B) Imagem convertida para a escala de cinza com 8-bits de resolução. (C) Imagem binária. (D) Aplicação do "*Threshold"* do programa Image J.

4.4.3.2 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas - Colágeno hidrolisado

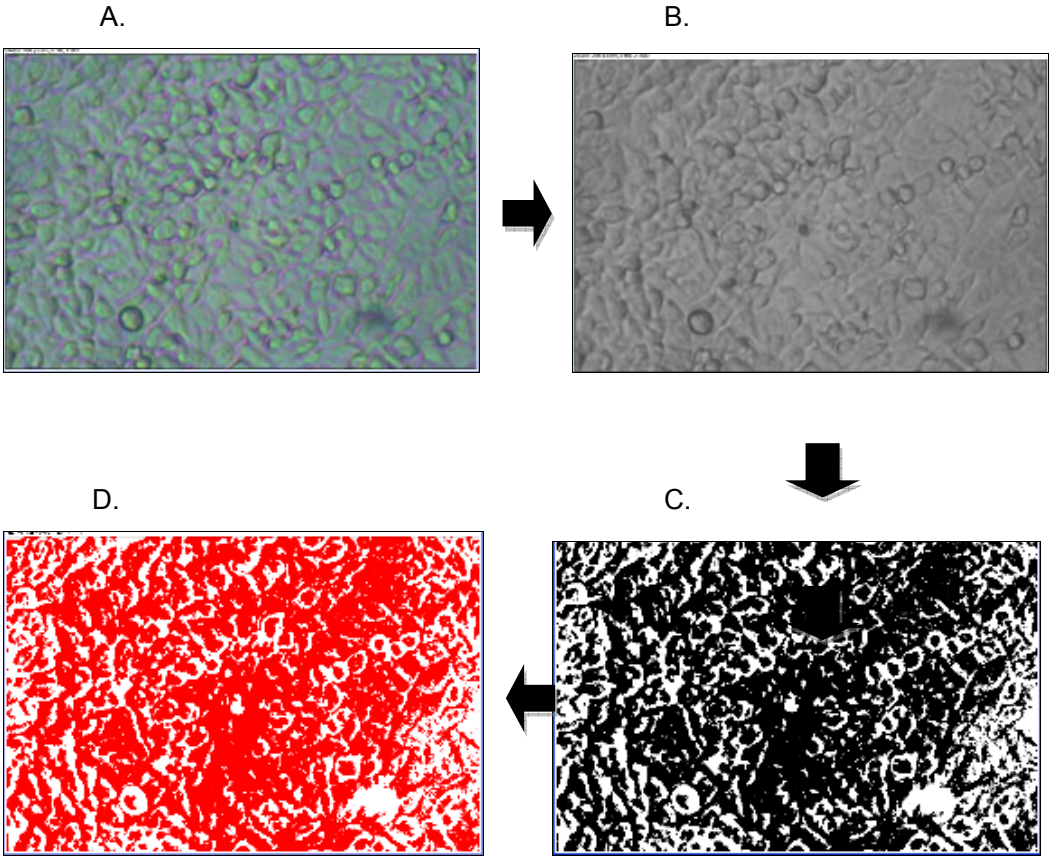


Figura 20: Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas e tratados com a amostra de colágeno hidrolisado – 6 mg/mL. (A) Imagem capturada pelo sistema de captura Sony- CCD. (B) Imagem convertida para a escala de cinza com 8-bits de resolução. (C) Imagem binária. (D) Aplicação do "*Threshold"* do programa Image J.

4.4.3.3 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Gelatina

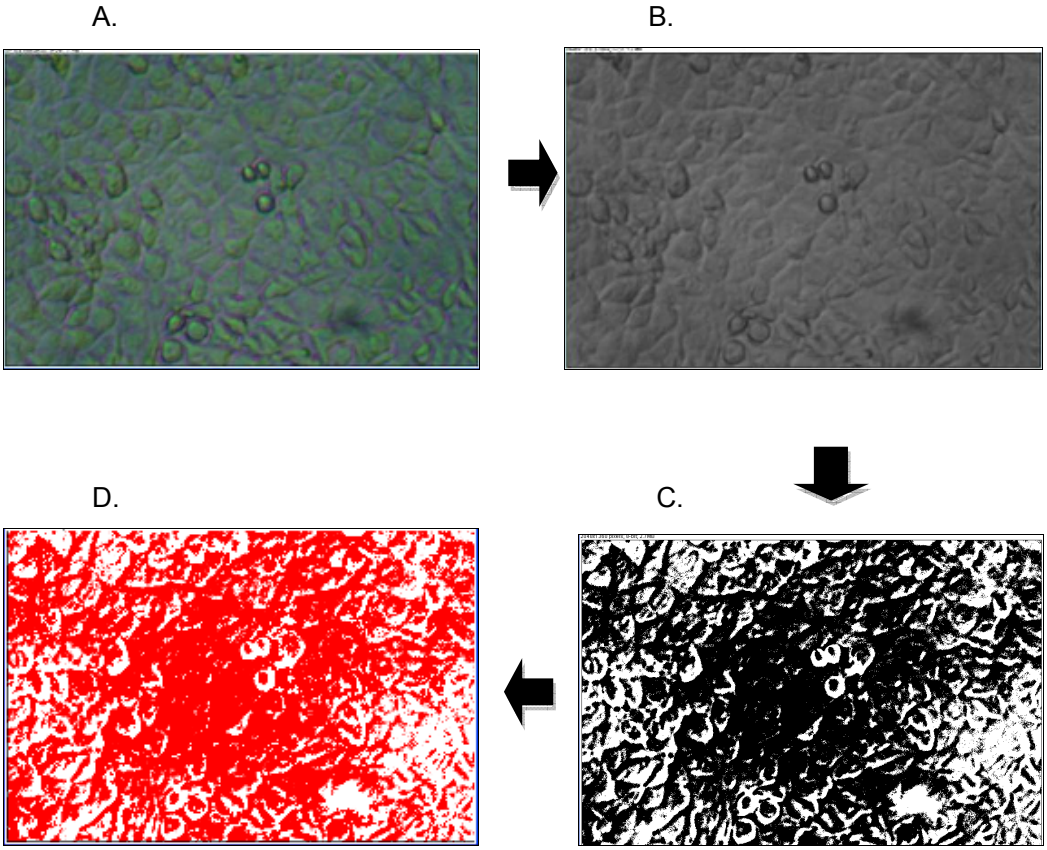
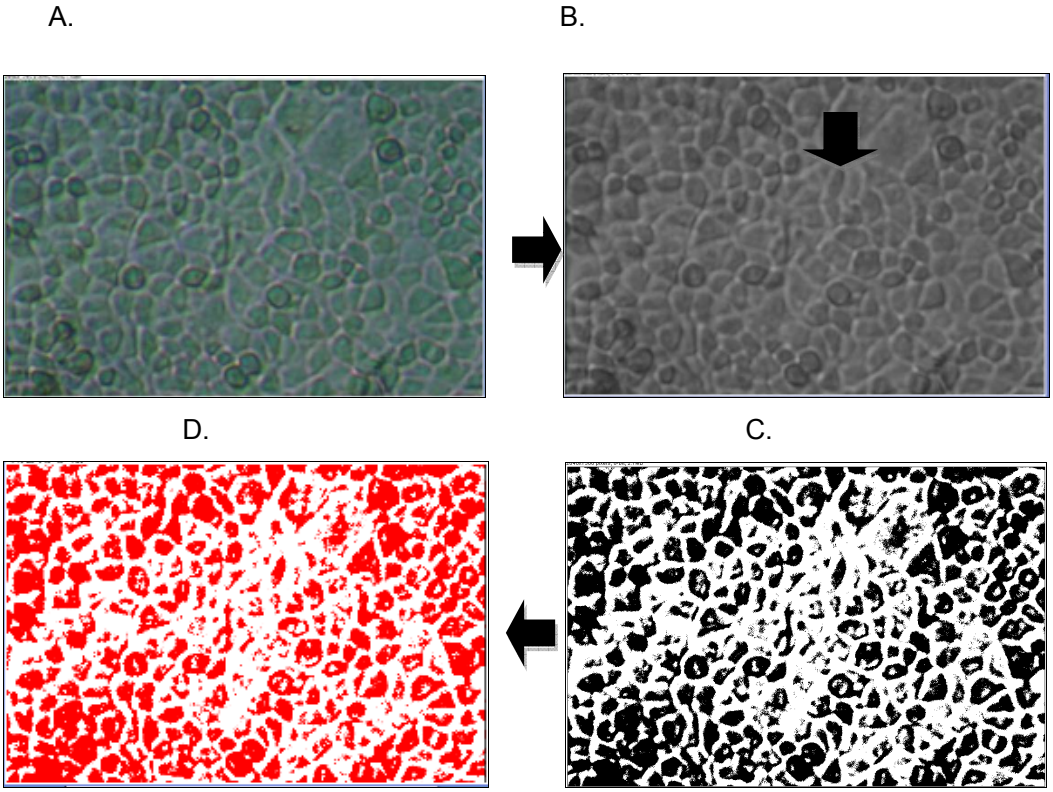


Figura 21: Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas e tratados com a amostra de gelatina – 6 mg/mL. (A) Imagem capturada pelo sistema de captura Sony- CCD. (B) Imagem convertida para a escala de cinza com 8-bits de resolução. (C) Imagem binária. (D) Aplicação do "*Threshold"* do programa Image J.

4.4.3.4 Fotomicrografia dos fibroblastos normais mantidos em cultura por 48 horas – Grupo Controle - não tratado.



4

Figura 22: Fotomicrografia dos fibroblastos normais não tratados mantidos em cultura por 48 horas - grupo controle. (A) Imagem capturada pelo sistema de captura Sony- CCD. (B) Imagem convertida para a escala de cinza com 8-bits de resolução. (C) Imagem binária. (D) Aplicação do "*Threshold"* do programa Image J.

O valor médio do número de células encontradas para a amostra de colágeno super hidrolisado (Figura 19) foi de 300 ± 9,6 células por área analisada em cada fotomicrografia. Para a amostra de colágeno hidrolisado (Figura 20) o número médio de células foi de 310 ± 8,7. A amostra de gelatina (Figura 21) apresentou em média 270 ± 9,4 células por área analisada. O grupo de células não tratadas – grupo controle apresentou em média de 180 ± 7,6 células (Figura 22).

As fotomicrografias das células tratadas com as amostras de proteínas no ensaio de Picrosirius – 48 horas na concentração de 6 mg/ml, representaram número de células um perfil semelhante do obtido pelo ensaio de Picrosirius, sendo que as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado apresentaram números similares e uma discreta diferença da amostra de gelatina. Entretanto isso não

significa necessariamente que houve aumento do número de células, pois a metodologia empregada de Picrosirius avalia a síntese de colágeno e não celular.

4.5 Análise das fases do ciclo celular - ensaio de citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite avaliações qualitativa e quantitativa das células e de seus constituintes, como também analisar o conteúdo de DNA e RNA, cromossomos, ploidia das células tumorais. Os experimentos de citometria de fluxo utilizado para a avaliação e a distribuição das fases do ciclo celular foram avaliados após 24, 48, 72 ou 96 horas de tratamento com as diferentes amostras de proteínas colagênicas na concentração de 50 mg/mL de proteína.

4.5.1 Análise das fases do ciclo celular

Os fibroblastos normais cultivados por 24 horas com as amostras de colágeno super hidrolisado apresentaram modificações quantitativas na distribuição da população de células quiescentes G0/G1, em relação ao grupo controle (Tabela 1 e Figura 23). A porcentagem de células distribuídas na fase G0/G1 após o tratamento com a amostra de colágeno super hidrolisado foi de 46%. Quando comparadas as demais fases do ciclo celular S, G2/M e apoptose, a amostra de colágeno super hidrolisado e o grupo controle, não apresentaram diferenças significantes. Não foram observadas diferenças entre as amostras de colágeno hidrolisado e gelatina, quando comparadas ao grupo controle.

A população de células que apresentaram DNA fragmentado ou apoptótica, após 24 horas de tratamento só foi encontrada no tratamento com a amostra de gelatina.

Analisando os resultados dos fibroblastos tratados com as proteínas colagênicas no tempo de tratamento de 48 horas, pode-se observar diferença estatística em relação ao controle, nos resultados das células tratadas com colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado na fase S do ciclo celular e na fase de morte celular apoptótica. As células tratadas com colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado apresentaram 32,2% e 28,5% de células na fase S, respectivamente, e de 18,9% de células no grupo controle não tratado (Tabela 2). Na fase de morte celular as porcentagens de células encontradas no tempo de tratamento de 48 horas foram de 7,8% para os grupos tratados com colágeno super hidrolisado, 8,2% para o grupo tratado com colágeno hidrolisado que diferiram também de modo significante do grupo

controle não tratado 22,4% (Tabela 2). As células tratadas com gelatina não diferiram significativamente do grupo controle.

As células tratadas com colágeno e derivados após 72 horas (Tabela 3) e 96 horas (Tabela 4), em nenhuma das fases do ciclo celular apresentaram diferenças significativas, quando comparadas ao grupo controle.

Os valores obtidos após 24, 48, 72 e 96 horas demonstraram que ao longo ao tratamento houve aumento de células mortas em todos os grupos tratados e aumento de células na fase S para as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado, durante 48 horas. Na fase quiescente G0/G1 as células se mantiveram em torno de 40% em todos os tempos de tratamentos. Na fase G2/M houve decréscimo, após 24 horas, 48 horas e se mantendo até 96 horas.

As análises estatísticas entre os diferentes grupos tratados versus o controle encontram-se nos anexos SS a HHH.

4.5.1.1 Análise das fases do ciclo celular – 24 horas de tratamento

TABELA 1: Porcentagem de fibroblastos normais distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular, após 24 horas de tratamento com as amostras de colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina.

Fases do ciclo celular	Controle	Colágeno super hidrolisado	Colágeno hidrolisado	Gelatina
Apoptose	4,9 ± 0,5	2,3 ± 1,0	2,9 ± 1,5	7,0 ± 2,0
GO/G1	36,6 ± 4,0	45,5 ± 4,0*	40,5 ±1,5	38,5 ± 3,0
S	18,2 ± 3,0	16,9 ± 1,0	17,3 ± 4,0	18,1 ± 1,0
G2/M	29,7 ± 5,0	29,6 ± 1,0	30,2 ± 4,0	28,8 ± 3,0

Os valores foram expressos em porcentagem (%) de células ± desvio padrão e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

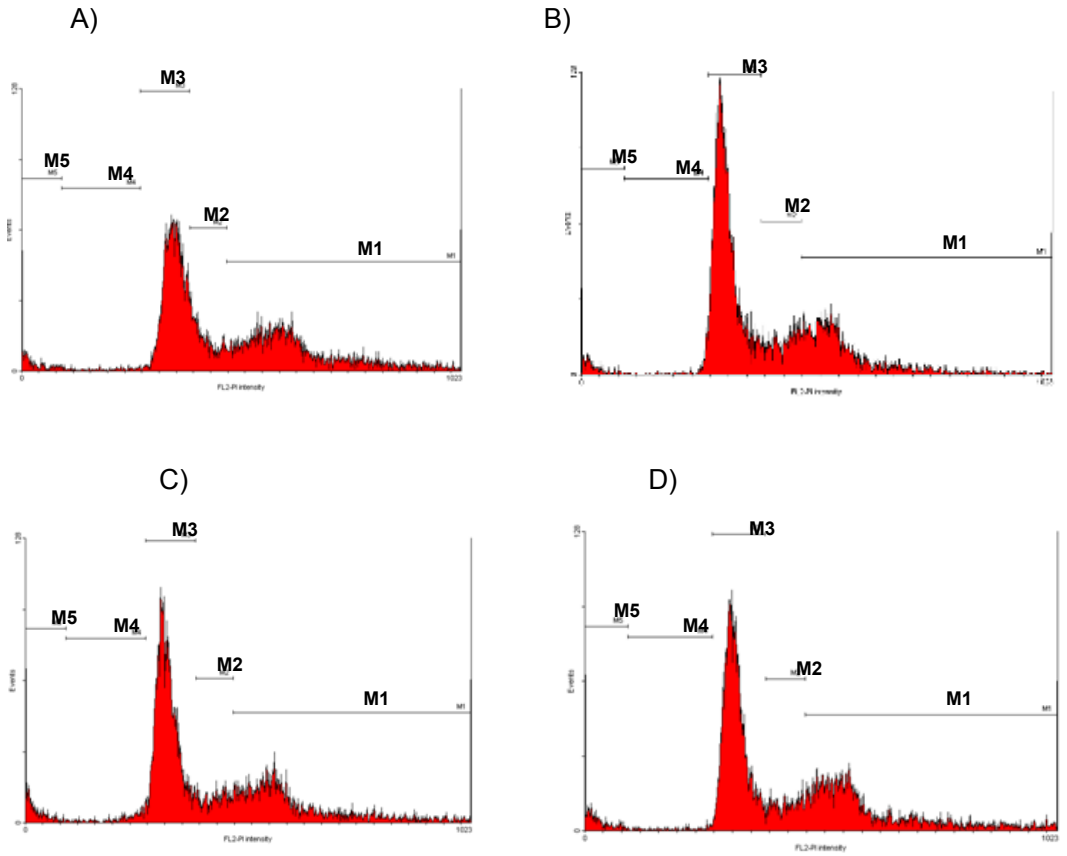


FIGURA 23: Histograma das imagens das fases do ciclo celular, após 24 horas de tratamento. Análise das fases do ciclo celular no ensaio de citometria de fluxo 24 horas de tratamento e analisadas pelo programa e WinMDI 2.8 FACS. A) controle, B) colágeno super hidrolisado, C) colágeno hidrolisado e D) gelatina. A área identificada como M3 representa a população na fase G0/G1, a área M2 a população na fase S, a área M1 a população em proliferação/divisão fase G2/M, a área M4 – DNA fragmentado/ apoptótico e M5 – restos celulares/ necrose.

4.5.1.2 Análise das fases do ciclo celular – 48 horas de tratamento

TABELA 2: Porcentagem de fibroblastos normais distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular, após 48 horas de tratamento com as amostras de colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina.

Fases do ciclo celular	Controle	Colágeno super hidrolisado	Colágeno hidrolisado	Gelatina
Apoptose	22,4 ± 3,0	7,8 ± 3,0**	8,2 ± 4,0**	17,6 ± 4,0
GO/G1	43,7 ± 1,0	44,3 ± 2,0	47,2 ± 3,0	44,4 ± 2,0
S	18,9 ± 2,0	32,2 ± 3,0***	28,5 ± 4,0**	22,3 ± 2,0
G2/M	14,9 ± 1,0	15,6 ± 2,0	16,2 ± 2,0	15,8 ± 2,0

Os valores foram expressos em porcentagem (%) de células ± desvio. e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

4.5.1.3 Análise das fases do ciclo celular – 72 horas de tratamento

TABELA 3: Porcentagem de fibroblastos normais distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular, após 72 horas de tratamento com as amostras de colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina.

Fases do ciclo celular	Controle	Colágeno super hidrolisado	Colágeno hidrolisado	Gelatina
Apoptose	27,9 ± 4	22,6 ± 5	26,5 ± 2	32,8 ± 2
GO/G1	43,4 ± 3	43,7 ± 2	42,8 ± 2	43,1 ± 3
S	13,8 ± 2	17,2 ± 2	12,0 ± 4	9,2 ± 2*
G2/M	14,9 ± 1	16,5 ± 3	18,7 ± 2	14,9 ± 3

Os valores foram expressos em porcentagem (%) de células ± desvio e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

4.5.1.4 Análise das fases do ciclo celular – 96 horas de tratamento

TABELA 4: Porcentagem de fibroblastos normais distribuídos nas diferentes fases do ciclo celular, após 96 horas de tratamento com as amostras de colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina.

Fases do ciclo celular	Controle	Colágeno super hidrolisado	Colágeno hidrolisado	Gelatina
Apoptose	24,8 ± 4	30,0 ± 7	30,2 ± 3	24,3 ± 4
GO/G1	43,8 ± 2	35,9 ± 7	35,1 ± 3	45,2 ± 1
S	15,5 ± 2	14,5± 1	15,6 ± 4	14,6 ± 3
G2/M	15,9± 2	19,5 ± 4	16,9 ± 2	15,9 ± 2

Os valores foram expressos em porcentagem (%) de células ± desvio e os valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA comparado ao controle.

5 DISCUSSÃO

O envelhecimento da pele humana é caracterizado pela progressiva perda de tecido cutâneo. Acredita-se que o mecanismo envolvido nesta perda tecidual idade-dependente, pode ser devido a um aumento da degradação da MEC, pela diminuição da síntese ou pelo aumento dos processos catabólicos (OHGUCHI et al., 2006; RAVELOJAONA et al., 2007). No envelhecimento cutâneo o primeiro relato é a redução no nível de colágeno tipo I, o principal componente da derme (JUNG et al., 2007). Com a destruição do colágeno que ocorre durante as décadas iniciam-se os sinais aparentes de alteração na pele, os quais são resultados do efeito crônico a exposição solar e do próprio envelhecimento natural (YAMAMOTO et al., 2006). A introdução de um agente eficaz para a manutenção da pele durante o envelhecimento é importante, possibilitando a redução destes efeitos, por exemplo, na formação das rugas (LEE et al., 2007).

Neste projeto foram avaliados os efeitos proliferativos e de biossíntese de colágeno, em fibroblastos humanos de derme normal tratados com colágeno bovino e derivados de diferentes perfis moleculares, colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina, em diferentes ensaios, adesão, viabilidade celular, síntese de colágeno e modificações nas fases do ciclo celular.

Os resultados do ensaio de adesão celular em culturas de fibroblastos de pele humana normal, tratadas com colágenos bovino e derivados sugerem que, independente do tamanho da molécula de colágeno, houve aumento significativo dos índices de adesão celular (Figura 5). Independente da concentração e da amostra, os fibroblastos apresentaram afinidade pelas proteínas analisadas, sendo que as maiores taxas de adesão foram obtidas pela amostra de gelatina, seguida de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado.

A adesão celular é um parâmetro importante para definir o grau de afinidade do modelo celular empregado neste estudo. Varani, 2004, e colaboradores demonstram que as interações celulares com colágeno são mediadas por múltiplos membros da família das integrinas β1, formando heterodímeros com as cadeias α1, α2 e α3. Apesar de um grande número de subunidades diferentes mediarem à adesão celular para o colágeno, outras funções incluindo síntese de colágeno, elaboração de enzimas que degradam a matriz e contração do colágeno, são mediadas especificamente pelas subunidades α.

Quando ocorre a interação do receptor ao seu ligante específico, as alterações conformacionais iniciam uma série de reações em cascata intermediada por enzimas,

resultando na amplificação deste sinal. Esta cadeia de eventos é denominada de transdução de sinal (LAUFENBURGER e LINDERMAN, 1993).

A transdução de sinal modula a resposta dos genes controlando, portanto, funções celulares que incluem a sobrevivência, a proliferação, a migração e a diferenciação. Um dos componentes celulares mais importantes na transdução de sinais são as integrinas.

Estudos realizados por Gardner, 1999 e Varani, 2004 têm mostrado, por exemplo, que além das interações com colágeno que ocorrem por receptores com domínio discoidina expressos em fibroblastos; que fibroblastos cultivados em matrizes de colágeno tri-dimensional resultam em fixação celular ao substrato, através de receptores de integrinas de superfície celular específica.

A adesão celular através das integrinas é seguida pela ativação da proteína quinase (quinase de adesão focal- FAK e quinase integrina-associada) no sítio de adesão. A fosforilação das proteínas por estas quinases permite que as proteínas sejam incorporadas no formato de adesão focal, e isto proporciona um sítio de ancoragem para a actina citosólica, a qual polimeriza para formar o citoesqueleto de actina.

Contrações das células baseadas no citoesqueleto actina-miosina promovida pelo rígido suporte proporcionado pela estrutura de colágeno geram um stress mecânico sobre a célula ocasionando mudanças na forma, o que induz a amplificação do efeito indutor de síntese de colágeno. Sob condições de stress mecânico, sinais gerados da interação de fatores solúveis com seus receptores de superfície (sinais gerados pelos próprios receptores de adesão) são efetivamente traduzidos para o núcleo por vias proteína quinase mitógena-ativada e da via TGF-b. Genes para o colágeno intersticial, entre outros, são transcritos quando genes para MMP são reprimidos (GARDNER et al., 1999). Sob condições na qual a tensão mecânica sobre as células é reduzida, contatos de adesão focal dissolvem os filamentos de actina, e estas despolimerizam. Neste estado de “relaxamento mecânico”, a transcrição gênica é alterada, conseqüentemente, a síntese de colágeno é diminuída e a produção de MMPs é aumentada.

Os tratamentos dos fibroblastos humanos normais com colágeno super hidrolisado, colágeno hidrolisado e gelatina sugerem que estas proteínas colagênicas induziram aumento no índice de adesão celular, possivelmente pelo aumento da força mecânica na superfície do fibroblasto e da própria MEC de modo geral. O efeito mais específico para as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado, menores massas moleculares, pela afinidade ou avidez da ligação ao receptor específico e a geração de um segundo sinal para a sinalização celular e, para a

amostra de gelatina, a adesão promovida por efeitos de simulação da matriz conformacional da cultura e pelo aumento da força mecânica no meio.

A avaliação da viabilidade e citotoxicidade celular pelo ensaio de MTT mostram que as células tratadas com as amostras de colágeno super hidrolisado, hidrolisado e gelatina em todas as concentrações testadas não foi tóxico e não foi capaz de induzir efeito proliferativo significativo (Figura 9).

Considerando o guia da indústria, preparado pelo Centro para avaliação de droga e pesquisa (CDER) e pelo Centro de avaliação biológica e pesquisa (CBER) (1995) embasado nas regulamentações do FDA (Administração de alimentos e drogas), pode-se considerar que apesar dos resultados de viabilidade celular das células tratadas com colágeno super hidrolisado e gelatina em baixas concentrações, tenham sido inferiores ao do controle, não consideramos estas amostras tóxicas.

Esta afirmação pode ser confirmada pelo fato destas amostras serem produtos de registro alimentício, de uso já comercial, com seus devidos registros atualizados, garantindo a integridade e segurança do produto para o consumo.

A descrição do processo de manufatura é outro ponto que pode garantir ainda mais a qualidade do produto e segurança para o usuário, demonstrando pelas diversas etapas, que qualquer componente que poderia ser de risco é totalmente neutralizado ou eliminado no decorrer do processo de obtenção do produto. Outra garantia que pode ser aplicada para mais uma segurança do produto, ausência de citotoxicidade, são os laudos e certificados do controle de qualidade, que através de vários limites, garantem a qualidade e pureza do produto.

Podemos assim, levando em consideração estes fatos, sugerir que os baixos índices de viabilidade celular encontrado para os fibroblastos tratados com a amostra de gelatina e colágeno super hidrolisado em determinadas concentrações não representam risco de toxicidade para a célula.

Nos ensaios de biossíntese de colágeno, as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado, apresentaram perfis similares nos ensaios de biossíntese de colágeno, após 24 e 48 horas de tratamento (Figura 18).

É interessante destacar que, para as três amostras avaliadas, a concentração de 6,0 mg/mL foi o ponto divisório entre aumento ou descréscimo de biossíntese de colágeno e, além deste fato, é importante observar que as células tratadas com as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado obtiveram perfis semelhantes entre si e distintos das células tratadas com gelatina. Isso se explica devido as semelhanças estruturais, grau de hidrólise e cadeias polipeptídicas similares (OHARA et al., 2007; OESSER e SEIFERT, 2003). As amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado possuem menor massa molecular do que a amostra

de gelatina. Em seus processos de fabricação, para obtenção dos colágenos super hidrolisados e hidrolisados, são necessárias enzimas que gera cadeias polipeptídicas menores, não utilizadas no processo de obtenção da gelatina. Esta ação enzimática promove a clivagem destas cadeias polipeptídicas em diferentes sítios, produzindo possivelmente domínios e radicais específicos, gerando uma proteína com estrutura e características diferentes.

Oesser e Seifert, 2003 utilizando colágeno hidrolisado tipo I, uma fração de colágeno hidrolisado tipo I e colágeno hidrolisado tipo II em condrócitos bovinos mostraram que os colágenos hidrolisados estimularam a secreção de colágeno nos condrócitos, sugerindo que o colágeno hidrolisado tem uma importância nutricional para o tecido cartilaginoso o que contribui para reduzir alterações degenerativas na MEC. Os condrócitos em cultura têm forte tendência em diferenciar-se em fibroblastos, o que contribui para a importância nutricional e de prevenção degenerativa dos fibroblastos.

Neste mesmo estudo Oesser e Seifert, 2003 mostraram um perfil de síntese de colágeno muito semelhante com o obtido neste projeto. O aumento de secreção de colágeno nos condrócitos bovinos até a concentração de 5 mg/mL de colágeno hidrolisado. A partir da concentração de 10 mg/mL houve queda, perfil muito semelhante ao obtido neste projeto com fibroblastos de pele humana normal. As células tratadas com as amostras de super colágeno hidrolisado e colágeno hidrolisado, estimularam a síntese de colágeno celular até a concentração de 6 mg/mL de proteína, a partir da concentração de 12 mg/mL houve decréscimo na síntese celular de colágeno. Os diferentes tipos de colágenos exerceram efeito estimulatório sobre os condrócitos bovinos (OESSER e SEIFERT, 2003), o que foi explicado devido às pequenas diferenças entre suas composições fibrilares, e muito provavelmente ao produto obtido pela hidrólise. Esta hipótese poderá ser aplicada nas amostras de colágeno, hidrolisado e super hidrolisado, sobre os fibroblastos humanos de pele normal, avaliadas neste projeto. Os perfis moleculares demonstrado nos resultados de GPC comprovam estas similaridades (Anexos B a D).

Uma análise comparativa entre os resultados de biossíntese de colágeno obtida nos experimentos de Picrosirius, após 24 e 48 horas de tratamento, sugere que com o aumento da função do tempo, todas as células tratadas com as amostras de proteína são capazes de estimular a biossíntese de colágeno.

A técnica de Picrosirius avalia a biossíntese de colágeno pelo índice de birrefringência das moléculas de colágeno e permite a diferenciação das fibras de colágeno tipo I e colágeno tipo III, através de distintas colorações (MONTES, 1996; JUNQUEIRA e MONTES, 1983), devido a características diferentes entre as fibras. O

colágeno tipo I forma espessas e brilhantes fibras de colágeno, que desenvolvem uma coloração amarela ou vermelha. Por outro lado, o colágeno tipo III apresenta finas fibras de pouca birrefringência, que se expressam através da coloração verde na técnica de Picrosirius (JUNQUEIRA e MONTES, 1983). A pele é rica em colágeno tipo I, 85%, e menor concentração do tipo III, cerca de 15%. As análises das fotomicrografias pelo programa Image – J, em culturas de fibroblastos normais mostraram fibras espessas de coloração avermelhada, pela técnica de Picrosirius-Red.

A ingestão de peptídeos de colágeno melhora a função da epiderme e da derme, aumentando o diâmetro e a densidade das fibras de colágeno na derme, pela melhoria da força mecânica da pele (MATSUDA et al., 2006). A força mecânica exercida sobre o fibroblasto desenvolve efeitos estimulatórios sobre a síntese de colágeno celular (VARANI et al., 2004; MATSUDA et al., 2006). Os resultados de biossíntese de colágeno após 48 horas mostram aumento da síntese de colágeno (Figura 17).

VARANI et al., 2002 utilizando fibroblastos dermais cultivados em sistema de cultura reticulado expostos a MMP-1 relatou que, existe uma correlação entre a presença de fragmentos de colágeno de alta massa molecular no reticulado, contração de colágeno na presença de fibroblastos dermais e diminuição da síntese de procolágeno tipo I. Este estudo demonstrou que a síntese de procolágeno tipo I é reduzida in vitro na presença de fragmentos de colágeno tipo I de alta massa molecular. Quando os fragmentos gerados pela ação de MMPs colagenolíticas, são degradados pela exposição a MMPs com atividade gelatinolítica geram pequenos fragmentos de colágeno, reaturando desta forma a produção de procolágeno.

Oesser e Seifert, 2003 sugerem que o colágeno hidrolisado estimula a biossíntese de colágeno em condrócitos por um possível mecanismo de turnover de colágeno. O aumento de fragmentos de colágeno na MEC, leva a um processo de degradação do colágeno fibrilar, induz a síntese e secreção de colágeno. Estes pequenos fragmentos peptídicos menores que 10 KDa podem influenciar a síntese. Os resultados de GPC das amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado apresentados nos anexos B a D, demonstram perfil molecular inferior a 10 kDa.

Lavker, 1995 e Varani et al., 2001 demostraram em fibroblastos velhos a redução da capacidade de síntese de colágeno, simultaneamente a perda da estimulação mecânica, resultante do decréscimo de fibras de colágeno intacta. Colágeno danificado não suporta um nível de tensão mecânica no fibroblasto residente, necessária para uma eficiente síntese de colágeno. Isso explica o efeito da gelatina, que em altas concentrações induz a síntese de colágeno, não por efeito

sinalizador em fibroblastos, mas sim por simular a força mecânica, que uma matriz exerce, proporcionando a tensão necessária para desencadear a síntese de colágeno.

A ingestão de colágeno hidrolisado de peixe mostrou que a suplementação com colágeno hidrolisado melhorou as propriedades da pele. O colágeno hidrolisado promove a síntese de colágeno na pele através de uma transmissão de sinal de ativação para os fibroblastos deste tecido (MATSUMOTO et al., 2006).

Existem vários estudos comprovando a absorção de colágeno hidrolisado. Ohara e colaboradores, 2007 comprovaram a presença de peptídeos de colágeno no sangue de pacientes que ingeriram colágeno hidrolisado. Oesser e colaboradores, 1999 comprovaram a presença de peptídeos de colágeno na pele, na cartilagem e no plasma de camundongos, que ingeriram a gelatina hidrolisada marcada. Iwai e colaboradores, 2005 comprovaram a presença de colágeno no sangue de pacientes que ingeriram colágeno hidrolisado. Ohara e colaboradores, 2007 e Matsuda e colaboradores, 2006, entre outros autores, sugerem que os efeitos causados pela ingestão de peptídeos de colágeno são proteína- específico e não dependem apenas do aumento da ingestão de aminoácidos. Os efeitos destes peptídeos de colágeno são tecidos dependentes e ocorrem em tecidos ricos em colágeno.

Analisando os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo, as fases do ciclo celular após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento (Tabelas 1 a 4), pode-se observar que com aumento do tempo de tratamento, houve aumento de células mortas para todos os grupos tratados e aumento de células na fase S para as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado no tempo de tratamento de 48 horas. Enquanto na fase G0/G1 as células se mantiveram em torno de 40% em todos os tempos de tratamentos e na fase G2/M houve decréscimo após 24 e 48 horas e mantendo-se nesta fase até 96 horas.

O aumento de células na fase S das amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado sugere capacidade estimulatória de síntese celular, que foram comprovados pelos resultados dos experimentos de Picrosírius.

Os melhores resultados de síntese celular e biossíntese de colágeno foram obtidos após 48 horas de tratamento para as amostras de colágeno com menores massas moleculares. Shin'ichiro et al., 2002 demonstraram em um estudo comparativo da ingestão de gelatina e peptídeos de colágeno, com perfis moleculares muito semelhantes as amostras deste projeto, 100000 e 5000 Da respectivamente, que os peptídeos de colágeno com menores massas moleculares, induziram de forma relevante a síntese de colágeno em pele de ratos do que a amostra de gelatina, sugerindo que a massa molecular é importante para a síntese de colágeno da pele.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados dos diferentes ensaios avaliados neste projeto sugerem que as amostras de colágeno bovino e derivados estimulam a adesão dos fibroblastos.
- O ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular sugerem que as amostras testadas não apresentam efeitos tóxicos, mantêm a viabilidade, sendo que a amostra de colágeno hidrolisado induz a proliferação celular.
- Os ensaios de Picrosirius de 24 e 48 horas de cultura sugerem aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos.
- As fases do ciclo celular mostraram que a amostra de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado, após 48 horas de tratamento induzem aumento de síntese celular. Nos tempos superiores não foram observados efeitos de

Em resumo os resultados deste projeto sugerem que o colágeno bovino e derivados aumentam as propriedades adesivas de fibroblastos humanos normais, não desencadeiam efeitos citotóxicos e induzem a biossíntese de colágeno. Os resultados de síntese de colágeno indicam que concentrações menores de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado podem ser utilizadas em relação à amostra de gelatina. Comparando os resultados após 48 horas de cultura na síntese de colágeno e nas modificações na fase S do ciclo celular as amostras de colágeno super hidrolisado e colágeno hidrolisado induziram aumentos significativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADACHI, E.; HAYASHI, T.; HASHIMOTO, P.H. Immuno-electron microscopical evidence that type V collagen is a fibrillar collage: importance for an aggregatin capability of the preparation for reconstituting banding fibrils. **Matrix**, v. 9, p. 232-237, 1999.

BAILEY, A. J.; PAUL, R.G.; KNOT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development,** Shanon, v. 106, n. 12, p. 1-56, 1998.

BARENBERG, S.A.; FILISKO, F.E.; GEIL, P.H. Ultrastructural deformation of collagen. **Connective Tissue Research**, Philadelphia, v. 6, n.1, p. 25-35, 1978.

BHADRIRAJ, K.; LINDA, K. Hansen hepatocyte adhesion, growth and differentiated functionon RGD-containing proteins. **Biomaterials,** Liverpool, v. 21, n. 3, p. 267-272, 2000.

BIRK, D.E.; FITCH, J.M.; BABIARZ, J.; DOANE, K.J.; LINSENMAYER, T.F. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types Iand V collagen regulates fibril diameter. **Journal of Cell Science,** v. 95, p. 649-657, 1990.

CASTRO, G. A. **Efeitos de derivados de colágeno e de um isolado protéico de soro de leite bovino na inibição de lesões ulcerativas gástricas e tumorigênese, in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos e Nutrição) - Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN), Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

CHAMPION, R.H.; BURTON, J.L.; EBLING, F.J.G. **Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology**. 5th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992.

CHAPMAN, J.A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K.M. The collagen fibril: a model system for studing the staining and fixation of a protein. **Electron Microscope Review**, Oxford, v. 3, n.1, p. 143-182, 1990.

CHOI, M.S; YOO, M.S.; SON, D.J.; JUNG, H.Y.; LEE, S.H.; JUNG, J.K.; LEE, B.C.; YUN, Y.P.; PYO, H.B.; HONG, J.T. Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF-b signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, 127-137, 2007.

CHUNG, J.H.; SEO, J.Y.; CHOI, H.R.; LEE, M.K.; YOUN, C.S.; RHIE, G.; CHO, K.H.; KIM, K.H.; PARK, K.C.; EUN, H.C. Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin *In Vivo*. **The journal of investigative dermatology**, v. 117, n. 5, 2001.

DAIA, M.R.; WILLIAMSONA, N.; KHAMMOC, E.F.; ADAMSA, A.G.A. Coombes Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. **Biomaterials,** v. 25, p. 4263-4271, 2005.

---

* **De acordo com:**
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DI LULLO, G.A.; SWEENEY, S.M.; KÖRKKÖ, J.; ALA-KOKKO, L.; SAN ANTONIO, J.D. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 277, n.6, p. 4223-4231, 2002.

DUTTA, A.K.; PANDA, A.K.; MUKHOPADHYAY, A. Porous gelatin matrix for tissue engineering: micro-structuremimicry of collagen based extra cellular matrix. **Engineering in Medicine and Biology Society,** New Delhi, v. 4, p. 78-79, 1995.

FREI, V.; PERRIER, E; ORLY, I.; HUC, A. Activation of fibroblast metabolism in a dermal and skin equivalent model: a screening test for activity of peptides. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 20, 159-173, 1998.

GARDNER, H.; BROBERG, A.; POZZI, A.; LAATO, M.; HEINO, J. Absence of integrin a1b1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. **Journal of Cell Science**, v. 112, 263-272, 1999.

GOISSIS, A.P.A. **Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutural:** atividade biológica. 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos**,** 2008.

GUIDANCE for Industry Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products. S.l.: Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1995.

HARALSON, M.A.; HASSEL, J.R. **The extracellular matrix-an overview. *In*: Extracellular Matrix. A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 1-30.

HAY, E. **Cell biology of extracellular matrix**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1992.

HOSHI, K.; KEMMOTSU, S.; TAKEUCHI, Y.; AMIZUKA, N.; OZAWA, H. The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. **Journal of Bone and Mineral Research,** Duhram, v. 14, n. 2, p. 273-280, 1999.

HUAXU LIU, M.D.; DANG, Y.; WANG, Z.; CHAI, X.; REN, Q. Laser Induced Collagen Remodeling: A Comparative Study In Vivo on Mouse Model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, 13-19, 2008.

HYNES, R.O. Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.

IMAYAMA, S.; BRAVERMAN, I. A Hypothetical Explanation for the Aging of Skin Chronologic Alteration of the Three-Dimensional Arrangement of Collagen and Elastic Fibers in Connective Tissue**. American Journal of Pathology,** v. 5, n.134, 1989.

IWAI, K.; HASEGAWA, T.; TAGUCHI, Y.; MORIMATSU, F.; SATO, K.; NAKAMURA, Y.; HIGASHI, A.; KIDO, Y.; Y NAKABO, Y.; OHTSUKI, K. Identification of Food-Derived Collagen Peptides in Human Blood after Oral Ingestion of Gelatin Hydrolysates **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, p. 6531-6536, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; J. CARNEIRO. **Histologia Básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974.

JUNQUEIRA, L.C.U.; Bignolas, G.; Brentani, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections**. Histochemical Journal,** v. 11, 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; MONTES, G.S. Biology of Collagen – Proteoglycan Interaction. **Archivum histologicum japonicum**, v. 46, n. 5, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U. Colágeno: A molécula de múltiplas funções. **Ciência Hoje,** v. 15, n. 87, Jan.- Fev. 1993.

JUNG, E.; LEE, J.; BAEKB, J.; JUNG, K.; LEE, J.; HUHA, S.; KIMA, S.; KOH, J.; PARK, D. Effect of *Camellia japonica* oil on human type I procollagen production and skin barrier function. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, 127-131, 2007.

KEENE, D.R.; SAN ANTONIO, J.D.; MAYNE, R.; MCQUILLAN, D.J.; SARRIS, G.; SANTORO, S.A.; IOZZO, R.V. Decorin Binds Near the C Terminus of Type I Collagen. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 29, p. 21801-21804, 2000.

KNIGHT, C.G.; MORTON, L.F.; ONLEY, D.J.; PEACHEY, A.R.; MESSENT, A.J.; SMETHURST, P.A.; TUCKWELL, D.S.; FARNDALE, R.W.; BARNES, M.J. Identification in collagen type I of an Ingetrin a2b-1 binding site containing an essential GER sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 50, p. 33287-33294, 1998.

LAUFENBURGER, D.A.; LINDERMAN, J.L. Receptors: models for binding, tracking, and signaling. New York: Oxford University Press, 1993.

LAVKER, R.M. Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: GILCHREST, B.A. (Ed.). **Photodamage**. Cambridge, New York: Blackwell Science, 1995. p. 123–135.

LEE, J.; JUNG, E.; LEE, J.; HUHA, S.; KIMA, J.; PARK, M.; SOA, J.; HAMA, Y.; JUNG, K.; HYUNA, C.; KIMB, Y.S.; PARK, D.. Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, 29-34, 2007.

LI, G.Y.; FUKUNAGA, S.; TAKENOUCHI, K.; NAKAMURA, F. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 27, n. 2, p. 101-106, 2005.

LIU, H.; YIN, Y.; YAO, K. Construction of Chitosan— Gelatin—Hyaluronic Acid Artificial Skin *In Vitro*. **Journal of Biomaterials Applications,** v. 21, p. 413-430, 2007.

MAA, L.; GAOA, C.; MAOA, Z.; ZHOUA, J.; SHENA, J.; HUB, X.; HANB, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials,** v. 24, p. 4833–4841, 2003.

MATSUDA, N.; KOYAMA, Y.; HOSAKA, Y.; UEDA, H.; WATANABE, T.; ARAYA, T.; IRIE, S.; TAKEHANA, K. Effects of Ingestion of Collagen Peptide on Collagen Fibrils and Glycosaminoglycans in the Dermis. **Journal of Nutritional Science Vitaminology,** v. 52, p. 211-215, 2006.

MILLER, E.J. Biochemical characteristic and biological significance of the genetically distinct collagens. **Molecular Cell Biochemistry**, v.13, p. 165-192, 1976.

MATSUMOTO, H.; OHARA, H.; ITO, K.; NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, S. Clinical Effects of Fish Type I Collagen Hydrolysate on Skin Properties. **ITE Battery Letters on Batteries, New Technologies & Medicine**, v. *7,* n. 4, 386-390, 2006.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

MORGANTI, P.; RANDAZZO, S. D. Nurtition and hair. **Journal of Applied Cosmetology**. v. 2, p. 41–49, 1984.

MORISCOT, A.S.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P.A. **Histologia para Fisioterapia e outras áreas da reabilitação.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

OESSER, S; ADAM, M.; BABEL, W.; SEIFERT, J. Oral Administration of 14C Labeled Gelatin Hydrolysate Leads to an Accumulation of Radioactivity in Cartilage of Mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1891-1895, 1999.

OESSER, S.; SEIFERT, J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. **Cell Tissue Research,** v. 311, p.393–399, 2003.

OHARA, H.; MATSUMOTO, H.; ITO, K IWAI, K; SATO, K. Comparison of Quantity and Structures of Hydroxyproline-Containing Peptides in Human Blood after Oral Ingestion of Gelatin Hydrolysates from Different Sources**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1532-1535, 2007.

OHGUCHI, K.; BANNO, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Involvement of phospholipase D1 in collagen type I production of human dermal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 348, p. 1398–1402, 2006.

PARRY, D.A.; CRAIG, A.S.; BARNES, G.R. Tendon and ligament from the horse: an ultrastructural study of collagen fibrils and elastic fibers as a function of age. **Biological Science,** v. 203, p. 293-303, 1978.

PIERAGGI, M.T.; JULIAN, M.; BOUISSOU, H. Fibroblast changes in cutaneous aging. **Virchows Archives. Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 402, 275-287, 1984.

PROCKOP, D.J.; FERTALA, A. Inhibition of the self-assembly of collagen into fibrils with synthetic peptides. Demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 25, p. 15598-15604, 1998.

RAVELOJAONA, V.; ROBERT, L.; ROBERT, A.M. Effect of cellular aging on collagen biosynthesis II. Collagen synthesis and deposition by a human skin fibroblast strain over 25 passages. **Archives of Gerontology and Geriatrics,** 2007.

REINERT H, JUNDT G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β2 and ascorbic acid 2-phosphate. **Histochemistry Cell Biology**, v. 112, 271–276, 1999.

REISER, K.M.; AMIGABLE, M.A.; LAST, J.A. Nonenzymatic glycation of type I collagen: the effects of aging on preferential glycation sites. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 34, p. 24207-24216, 1992.

REKHTER, M.D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. **Cardiovascular Research,** Giessem, v. 41. n. 2, p. 376-384, 1999.

SHIN, M.H.; RHIE, G.; PARK, C.; KIM, K.H.; CHO, K.H.; EUN, H.C.; CHUNG, J.H. Modulation of Collagen Metabolism by the Topical Application of Dehydroepiandrosterone to Human Skin. **Journal Investigative Dermatology**, v. 124, p. 315 –323, 2005.

SHIN'ICHIRO, N.; NOZOMI, H.; RYOICHI, S.; KAZUYUKI, S.; RYUJI, A. Effect of Oral Administration of Gelatin and Collagen Peptides on the Hydroxyproline Content of Rats Skin. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 199-202, 2002.

SILVA, S.V. **Mineralização biomimédica in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico:** modelo de biomineralização. 115 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Histologia**. São Paulo: Editora Manole, 1995.

TASKIRAN, D.; TASKIRAN, E.; YERCAN, H.; KUTAY, F.Z. Quantification of Total Collagen in Rabbit Tendon by the Sirius Red Method. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 29, p. 7-9, 1999.

VARANI, J.; SPEARMAN, D.; PERONE, P.; FLIGIEL, S.E.G.; DATTA, S.C.; WANG, Z.Q.; SHAO, Y.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Inhibition of Type I Procollagen Synthesis by Damaged Collagen in Photoaged Skin and by Collagenase-Degraded Collagen *in Vitro.* **American Journal of Pathology**, v. 158, p. 932-941, 2001.

VARANI, J.; PERONE, P.; FLIGIEL, S.E.G.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Inhibition of Type I Procollagen Production in Photodamage: Correlation Between Presence of High Molecular Weight Collagen Fragments and Reduced Procollagen Synthesis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, 2002.

VARANI, J.; SCHUGER, L.; DAME, M.K.; LEONARD, C.; FLIGIEL, S.E.G.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Reduced Fibroblast Interaction with Intact Collagen as a Mechanism for Depressed Collagen Synthesis in Photodamaged Skin. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 122, p. 1471-1479, 2004.

VARANI, J; DAME, M.K.; RITTIE, L.; FLIGIEL, S.E.G.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin - Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. **American Journal of Pathology**, v. 168, p. 6, 2006.

YAMAMOTO, Y; OBAYASHI, K; OKANO, Y; SATOH, Y; MASAKI, H; FUNASAKA, Y. Efficacy of thermal stimulation on wrinkle removal via the enhancement of collagen synthesis. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, p. S39-S49, 2006.

ZAGRIS, N. Extracelluar matrix in development of the early embryo. **Micron,** v. 32, p. 427-438, 2001.

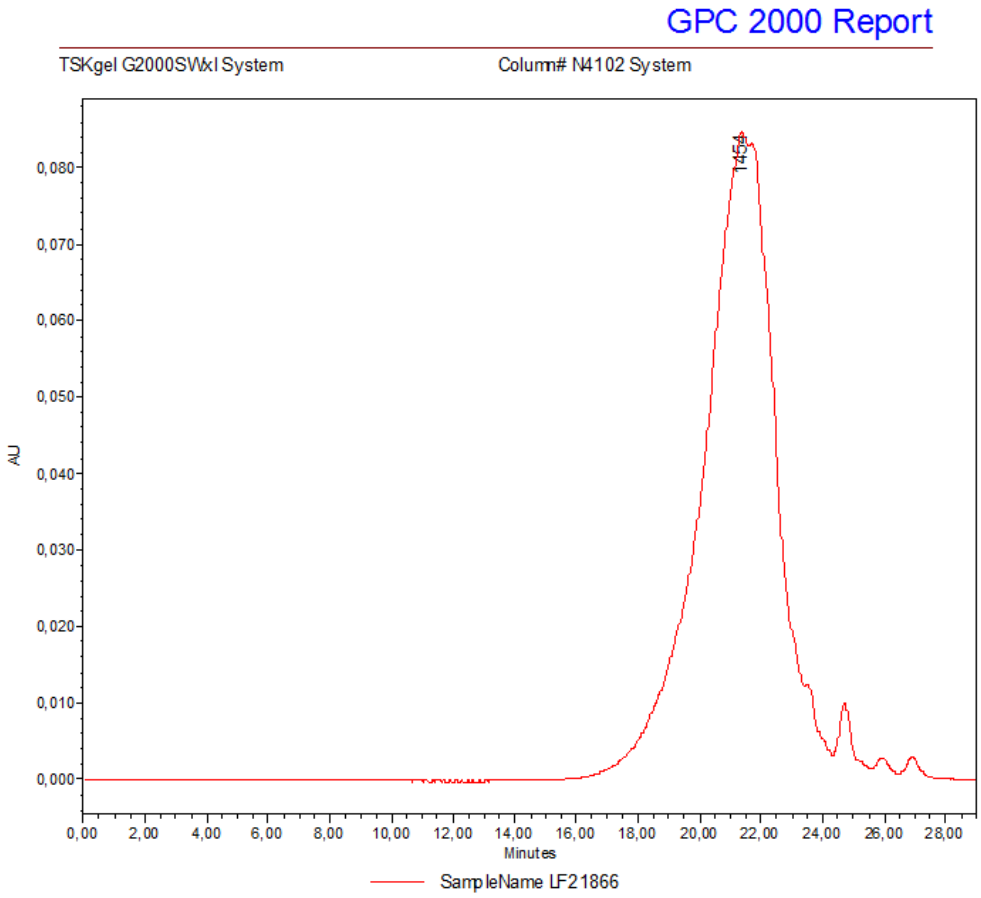
ANEXOS

ANEXO A - Análises físico-químicas das amostras de colágeno

Característica físico-química	Colágeno super hidrolisado	Colágeno hidrolisado	Gelatina
Cinzas (%)	1,8	0,7	1,3
Proteínas (%)	89	91	85
Gordura (%)	0	0	0
Umidade (%)	7	7	5
pH	5,7	5,5	6,1
Peso molecular médio (Da)	1728	2789	104442
Proteína colagênica (%)	100	100	100

Fonte: Gelita South America.

ANEXO B - Cromatografia de permeação em gel (GPC) – Colágeno super hidrolisado

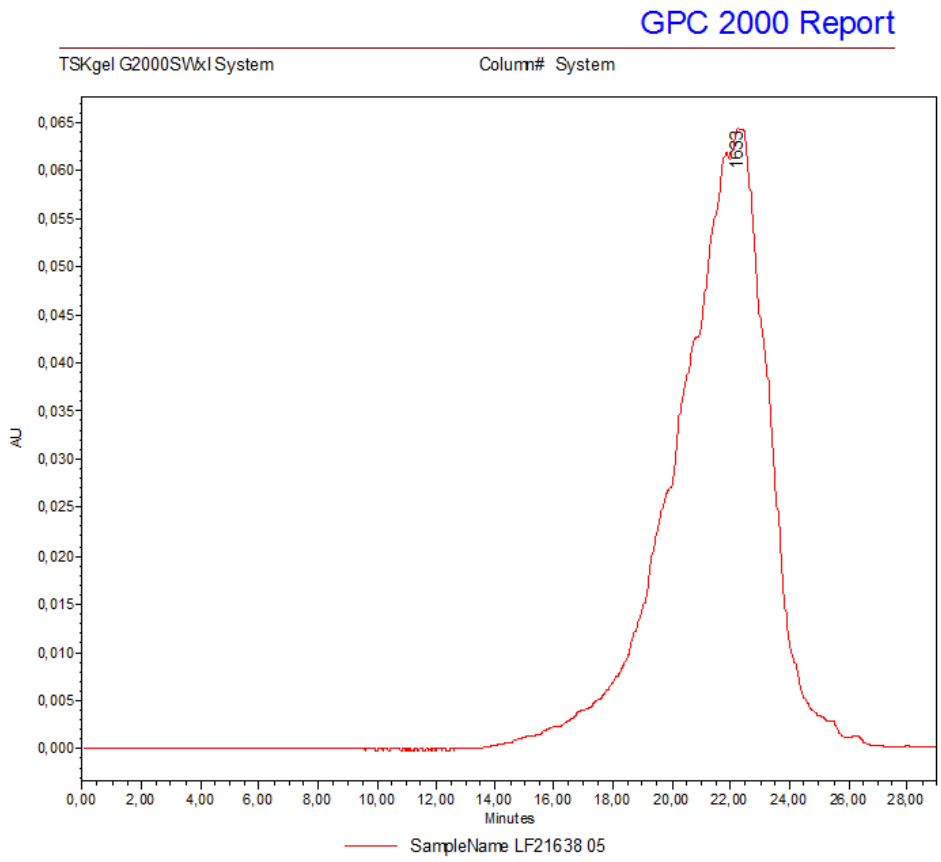


GPC Results

	SampleName	Mn	Mw	Polydispersity	MW Marker 4	%Poly < MWM4	MW Marker 1	%Poly > MWM1
1	LF21866	1220	1728	1,415845	1000	17,766	3000	9,134

Fonte: Gelita South America.

ANEXO C - Cromatografia de permeação em gel (GPC) – Colágeno hidrolisado

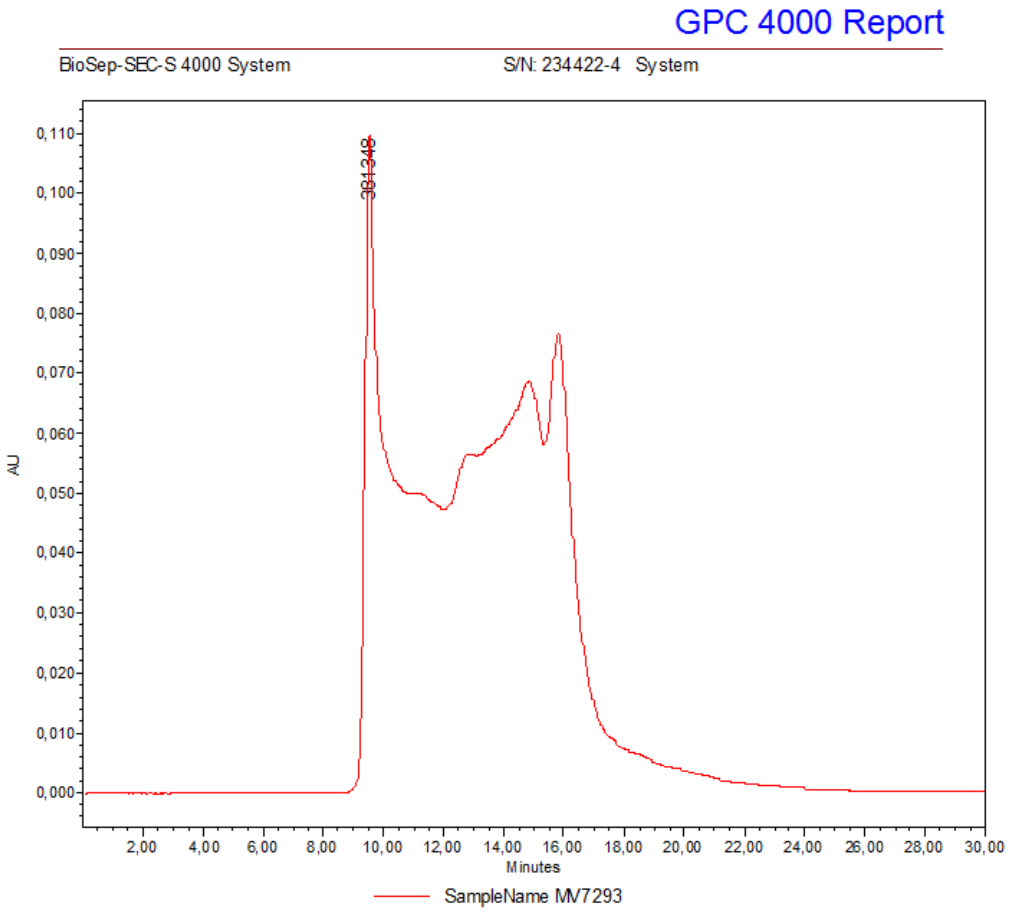


GPC Results

	SampleName	Mn	Mw	Polydispersity	MW Marker 4	%Poly < MWM4	MW Marker 1	%Poly > MWM1
1	LF21638 05	1817	2789	1,535034	1000	6,427	3000	25,914

Fonte: Gelita South America.

ANEXO D - Cromatografia de permeação em gel (GPC) – Gelatina



GPC Results

	SampleName	Mn	Mw	Polydispersity	MW Marker 4	%Poly < MWM4	MW Marker 1	%Poly > MWM1
1	MV7293	10968	104442	9,522041	100000	66,173	300000	11,690

Fonte: Gelita South America.

ANEXO E - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 0.1 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 0.1 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-72.000	38.147	***	P<0.001
CO vs CH	-64.000	33.908	***	P<0.001
CO vs GL	-72.000	38.147	***	P<0.001
CSH vs CH	8.000	4.239	*	P<0.05
CSH vs GL	0.000	0.000	ns	P>0.05
CH vs GL	-8.000	4.239	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-72.000	-79.293	-64.707
CO - CH	-64.000	-71.293	-56.707
CO - GL	-72.000	-79.293	-64.707
CSH - CH	8.000	0.7075	15.293
CSH - GL	0.000	-7.293	7.293
CH - GL	-8.000	-15.293	-0.7075

Anexo F - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 0.2 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 0.2 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-73.000	33.717	***	P<0.001
CO vs CH	-63.000	29.098	***	P<0.001
CO vs GL	-73.000	33.717	***	P<0.001
CSH vs CH	10.000	4.619	*	P<0.05
CSH vs GL	0.000	0.000	ns	P>0.05
CH vs GL	-10.000	4.619	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-73.000	-81.365	-64.635
CO - CH	-63.000	-71.365	-54.635
CO - GL	-73.000	-81.365	-64.635
CSH - CH	10.000	1.635	18.365
CSH - GL	0.000	-8.365	8.365
CH - GL	-10.000	-18.365	-1.635

Anexo G - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 0.4 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 0.4 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-73.000	32.148	***	P<0.001
CO vs CH	-63.000	27.744	***	P<0.001
CO vs GL	-73.000	32.148	***	P<0.001
CSH vs CH	10.000	4.404	*	P<0.05
CSH vs GL	0.000	0.000	ns	P>0.05
CH vs GL	-10.000	4.404	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-73.000	-81.773	-64.227
CO - CH	-63.000	-71.773	-54.227
CO - GL	-73.000	-81.773	-64.227
CSH - CH	10.000	1.227	18.773
CSH - GL	0.000	-8.773	8.773
CH - GL	-10.000	-18.773	-1.227

Anexo H - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 0.8 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 0.8 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-73.000	33.944	*** P<0.001
CO vs CH	-64.000	29.759	*** P<0.001
CO vs GL	-86.000	39.989	*** P<0.001
CSH vs CH	9.000	4.185	* P<0.05
CSH vs GL	-13.000	6.045	** P<0.01
CH vs GL	-22.000	10.230	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-73.000	-81.309	-64.691
CO - CH	-64.000	-72.309	-55.691
CO - GL	-86.000	-94.309	-77.691
CSH - CH	9.000	0.6909	17.309
CSH - GL	-13.000	-21.309	-4.691
CH - GL	-22.000	-30.309	-13.691

Anexo I - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 1.5 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 1.5 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-73.000	30.610	*** P<0.001
CO vs CH	-64.000	26.836	*** P<0.001
CO vs GL	-88.000	36.900	*** P<0.001
CSH vs CH	9.000	3.774	ns P>0.05
CSH vs GL	-15.000	6.290	*** P<0.001
CH vs GL	-24.000	10.064	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-73.000	-82.214	-63.786
CO - CH	-64.000	-73.214	-54.786
CO - GL	-88.000	-97.214	-78.786
CSH - CH	9.000	-0.2143	18.214
CSH - GL	-15.000	-24.214	-5.786
CH - GL	-24.000	-33.214	-14.786

Anexo J - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 3.0 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 3.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-80.000	39.241	*** P<0.001
CO vs CH	-63.000	30.902	*** P<0.001
CO vs GL	-91.000	44.637	*** P<0.001
CSH vs CH	17.000	8.339	*** P<0.001
CSH vs GL	-11.000	5.396	** P<0.01
CH vs GL	-28.000	13.734	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-80.000	-87.877	-72.123
CO - CH	-63.000	-70.877	-55.123
CO - GL	-91.000	-98.877	-83.123
CSH - CH	17.000	9.123	24.877
CSH - GL	-11.000	-18.877	-3.123
CH - GL	-28.000	-35.877	-20.123

Anexo K - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 6.0 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 6.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-82.000	42.702	*** P<0.001
CO vs CH	-63.000	32.808	*** P<0.001
CO vs GL	-95.000	49.472	*** P<0.001
CSH vs CH	19.000	9.894	*** P<0.001
CSH vs GL	-13.000	6.770	*** P<0.001
CH vs GL	-32.000	16.664	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-82.000	-89.419	-74.581
CO - CH	-63.000	-70.419	-55.581
CO - GL	-95.000	-102.42	-87.581
CSH - CH	19.000	11.581	26.419
CSH - GL	-13.000	-20.419	-5.581
CH - GL	-32.000	-39.419	-24.581

Anexo L - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 12.0 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 12.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-82.000	38.129	*** P<0.001
CO vs CH	-69.000	32.084	*** P<0.001
CO vs GL	-121.00	56.264	*** P<0.001
CSH vs CH	13.000	6.045	** P<0.01
CSH vs GL	-39.000	18.135	*** P<0.001
CH vs GL	-52.000	24.180	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-82.000	-90.309	-73.691
CO - CH	-69.000	-77.309	-60.691
CO - GL	-121.00	-129.31	-112.69
CSH - CH	13.000	4.691	21.309
CSH - GL	-39.000	-47.309	-30.691
CH - GL	-52.000	-60.309	-43.691

Anexo M - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 25.0 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 25.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-85.000	40.351	*** P<0.001
CO vs CH	-72.000	34.179	*** P<0.001
CO vs GL	-125.00	59.339	*** P<0.001
CSH vs CH	13.000	6.171	*** P<0.001
CSH vs GL	-40.000	18.989	*** P<0.001
CH vs GL	-53.000	25.160	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-85.000	-93.139	-76.861
CO - CH	-72.000	-80.139	-63.861
CO - GL	-125.00	-133.14	-116.86
CSH - CH	13.000	4.861	21.139
CSH - GL	-40.000	-48.139	-31.861
CH - GL	-53.000	-61.139	-44.861

Anexo N - Análise estatística do ensaio de adesão celular – 50.0 mg/ml

Análise estatística - Adesão - 24h - 50.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-90.000	41.160	*** P<0.001
CO vs CH	-72.000	32.928	*** P<0.001
CO vs GL	-129.00	58.996	*** P<0.001
CSH vs CH	18.000	8.232	*** P<0.001
CSH vs GL	-39.000	17.836	*** P<0.001
CH vs GL	-57.000	26.068	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-90.000	-98.448	-81.552
CO - CH	-72.000	-80.448	-63.552
CO - GL	-129.00	-137.45	-120.55
CSH - CH	18.000	9.552	26.448
CSH - GL	-39.000	-47.448	-30.552
CH - GL	-57.000	-65.448	-48.552

Anexo O - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 0.1 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 0.1 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	20.210	7.949	***	P<0.001
CO vs CH	2.980	1.172	ns	P>0.05
CO vs GL	49.640	19.525	***	P<0.001
CSH vs CH	-17.230	6.777	**	P<0.01
CSH vs GL	29.430	11.576	***	P<0.001
CH vs GL	46.660	18.353	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interva From	To
CO - CSH	20.210	9.535	30.885
CO - CH	2.980	-7.695	13.655
CO - GL	49.640	38.965	60.315
CSH - CH	-17.230	-27.905	-6.555
CSH - GL	29.430	18.755	40.105
CH - GL	46.660	35.985	57.335

Anexo P - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 0.2 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 0.2 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	19.550	18.653	*** P<0.001
CO vs CH	-10.500	10.018	*** P<0.001
CO vs GL	31.840	30.379	*** P<0.001
CSH vs CH	-30.050	28.671	*** P<0.001
CSH vs GL	12.290	11.726	*** P<0.001
CH vs GL	42.340	40.398	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	19.550	15.149	23.951
CO - CH	-10.500	-14.901	-6.099
CO - GL	31.840	27.439	36.241
CSH - CH	-30.050	-34.451	-25.649
CSH - GL	12.290	7.889	16.691
CH - GL	42.340	37.939	46.741

Anexo Q - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 0.4 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 0.4 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	17.680	19.248	*** P<0.001
CO vs CH	-10.220	11.126	*** P<0.001
CO vs GL	13.830	15.057	*** P<0.001
CSH vs CH	-27.900	30.374	*** P<0.001
CSH vs GL	-3.850	4.191	ns P>0.05
CH vs GL	24.050	26.183	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	17.680	13.823	21.537
CO - CH	-10.220	-14.077	-6.363
CO - GL	13.830	9.973	17.687
CSH - CH	-27.900	-31.757	-24.043
CSH - GL	-3.850	-7.707	0.006942
CH - GL	24.050	20.193	27.907

Anexo R - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 0.8 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 0.8 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	17.770	8.854	*** P<0.001
CO vs CH	-22.530	11.226	*** P<0.001
CO vs GL	12.850	6.403	** P<0.01
CSH vs CH	-40.300	20.080	*** P<0.001
CSH vs GL	-4.920	2.451	ns P>0.05
CH vs GL	35.380	17.629	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	17.770	9.343	26.197
CO - CH	-22.530	-30.957	-14.103
CO - GL	12.850	4.423	21.277
CSH - CH	-40.300	-48.727	-31.873
CSH - GL	-4.920	-13.347	3.507
CH - GL	35.380	26.953	43.807

Anexo S - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 1.5 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 1.5 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	15.710	6.039	**	P<0.01
CO vs CH	-22.380	8.604	***	P<0.001
CO vs GL	-11.550	4.440	*	P<0.05
CSH vs CH	-38.090	14.643	***	P<0.001
CSH vs GL	-27.260	10.480	***	P<0.001
CH vs GL	10.830	4.163	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	15.710	4.787	26.633
CO - CH	-22.380	-33.303	-11.457
CO - GL	-11.550	-22.473	-0.6275
CSH - CH	-38.090	-49.013	-27.167
CSH - GL	-27.260	-38.183	-16.337
CH - GL	10.830	-0.09251	21.753

Anexo T - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 3.0 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 3.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	16.370	10.343	*** P<0.001
CO vs CH	-23.370	14.765	*** P<0.001
CO vs GL	-18.300	11.562	*** P<0.001
CSH vs CH	-39.740	25.108	*** P<0.001
CSH vs GL	-34.670	21.905	*** P<0.001
CH vs GL	5.070	3.203	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	16.370	9.724	23.016
CO - CH	-23.370	-30.016	-16.724
CO - GL	-18.300	-24.946	-11.654
CSH - CH	-39.740	-46.386	-33.094
CSH - GL	-34.670	-41.316	-28.024
CH - GL	5.070	-1.576	11.716

Anexo U - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 6.0 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 6.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	6.190	2.928	ns	P>0.05
CO vs CH	-26.400	12.490	***	P<0.001
CO vs GL	-18.800	8.894	***	P<0.001
CSH vs CH	-32.590	15.418	***	P<0.001
CSH vs GL	-24.990	11.823	***	P<0.001
CH vs GL	7.600	3.595	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	6.190	-2.686	15.066
CO - CH	-26.400	-35.276	-17.524
CO - GL	-18.800	-27.676	-9.924
CSH - CH	-32.590	-41.466	-23.714
CSH - GL	-24.990	-33.866	-16.114
CH - GL	7.600	-1.276	16.476

Anexo V - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 12 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 12.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	5.460	2.733	ns	P>0.05
CO vs CH	-43.300	21.673	***	P<0.001
CO vs GL	-18.800	9.410	***	P<0.001
CSH vs CH	-48.760	24.406	***	P<0.001
CSH vs GL	-24.260	12.143	***	P<0.001
CH vs GL	24.500	12.263	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	5.460	-2.929	13.849
CO - CH	-43.300	-51.689	-34.911
CO - GL	-18.800	-27.189	-10.411
CSH - CH	-48.760	-57.149	-40.371
CSH - GL	-24.260	-32.649	-15.871
CH - GL	24.500	16.111	32.889

Anexo W - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 25 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 25.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	2.570	1.674	ns	P>0.05
CO vs CH	-50.870	33.129	***	P<0.001
CO vs GL	-19.860	12.934	***	P<0.001
CSH vs CH	-53.440	34.803	***	P<0.001
CSH vs GL	-22.430	14.608	***	P<0.001
CH vs GL	31.010	20.196	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	2.570	-3.878	9.018
CO - CH	-50.870	-57.318	-44.422
CO - GL	-19.860	-26.308	-13.412
CSH - CH	-53.440	-59.888	-46.992
CSH - GL	-22.430	-28.878	-15.982
CH - GL	31.010	24.562	37.458

Anexo X - Análise estatística do ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular – 50 mg/ml

Análise estatística - MTT - 24h - 50.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	0.2000	0.2094	ns	P>0.05
CO vs CH	-66.000	69.094	***	P<0.001
CO vs GL	-23.600	24.706	***	P<0.001
CSH vs CH	-66.200	69.303	***	P<0.001
CSH vs GL	-23.800	24.916	***	P<0.001
CH vs GL	42.400	44.388	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	0.2000	-3.811	4.211
CO - CH	-66.000	-70.011	-61.989
CO - GL	-23.600	-27.611	-19.589
CSH - CH	-66.200	-70.211	-62.189
CSH - GL	-23.800	-27.811	-19.789
CH - GL	42.400	38.389	46.411

Anexo Y - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 0.1 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 0.1 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0032, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-1.640	0.5023	ns	P>0.05
CO vs CH	-8.340	2.554	ns	P>0.05
CO vs GL	13.830	4.236	*	P<0.05
CSH vs CH	-6.700	2.052	ns	P>0.05
CSH vs GL	15.470	4.738	*	P<0.05
CH vs GL	22.170	6.790	**	P<0.01

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-1.640	-15.350	12.070
CO - CH	-8.340	-22.050	5.370
CO - GL	13.830	0.1200	27.540
CSH - CH	-6.700	-20.410	7.010
CSH - GL	15.470	1.760	29.180
CH - GL	22.170	8.460	35.880

Anexo Z - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 0.2 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 0.2 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-6.820	3.614	ns	P>0.05
CO vs CH	-10.890	5.771	**	P<0.01
CO vs GL	10.890	5.771	**	P<0.01
CSH vs CH	-4.070	2.157	ns	P>0.05
CSH vs GL	17.710	9.385	***	P<0.001
CH vs GL	21.780	11.541	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-6.820	-14.744	1.104
CO - CH	-10.890	-18.814	-2.966
CO - GL	10.890	2.966	18.814
CSH - CH	-4.070	-11.994	3.854
CSH - GL	17.710	9.786	25.634
CH - GL	21.780	13.856	29.704

Anexo AA - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 0.4 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 0.4 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-7.180	4.562	*	P<0.05
CO vs CH	-10.720	6.811	**	P<0.01
CO vs GL	10.200	6.481	**	P<0.01
CSH vs CH	-3.540	2.249	ns	P>0.05
CSH vs GL	17.380	11.043	***	P<0.001
CH vs GL	20.920	13.292	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interva From	To
CO - CSH	-7.180	-13.789	-0.5711
CO - CH	-10.720	-17.329	-4.111
CO - GL	10.200	3.591	16.809
CSH - CH	-3.540	-10.149	3.069
CSH - GL	17.380	10.771	23.989
CH - GL	20.920	14.311	27.529

Anexo BB - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 0.8 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 0.8 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0007, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-8.040	4.233	*	P<0.05
CO vs CH	-10.460	5.507	**	P<0.01
CO vs GL	3.400	1.790	ns	P>0.05
CSH vs CH	-2.420	1.274	ns	P>0.05
CSH vs GL	11.440	6.023	**	P<0.01
CH vs GL	13.860	7.297	**	P<0.01

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interva From	To
CO - CSH	-8.040	-16.016	-0.06435
CO - CH	-10.460	-18.436	-2.484
CO - GL	3.400	-4.576	11.376
CSH - CH	-2.420	-10.396	5.556
CSH - GL	11.440	3.464	19.416
CH - GL	13.860	5.884	21.836

Anexo CC - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 1.5 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 1.5 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0434, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-8.180	2.788	ns P>0.05
CO vs CH	-11.920	4.063	ns P>0.05
CO vs GL	-1.440	0.4908	ns P>0.05
CSH vs CH	-3.740	1.275	ns P>0.05
CSH vs GL	6.740	2.297	ns P>0.05
CH vs GL	10.480	3.572	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-8.180	-20.500	4.140
CO - CH	-11.920	-24.240	0.3995
CO - GL	-1.440	-13.760	10.880
CSH - CH	-3.740	-16.060	8.580
CSH - GL	6.740	-5.580	19.060
CH - GL	10.480	-1.840	22.800

Anexo DD - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 3.0 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 3.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0047, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-11.430	5.702	**	P<0.01
CO vs CH	-11.610	5.792	**	P<0.01
CO vs GL	-8.230	4.105	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.1800	0.08979	ns	P>0.05
CSH vs GL	3.200	1.596	ns	P>0.05
CH vs GL	3.380	1.686	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-11.430	-19.847	-3.013
CO - CH	-11.610	-20.027	-3.193
CO - GL	-8.230	-16.647	0.1875
CSH - CH	-0.1800	-8.597	8.237
CSH - GL	3.200	-5.217	11.617
CH - GL	3.380	-5.037	11.797

Anexo EE - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 6.0 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 6.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0905, considered not quite significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-12.830	3.504	ns	P>0.05
CO vs CH	-12.760	3.485	ns	P>0.05
CO vs GL	-7.680	2.098	ns	P>0.05
CSH vs CH	0.07000	0.01912	ns	P>0.05
CSH vs GL	5.150	1.407	ns	P>0.05
CH vs GL	5.080	1.388	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-12.830	-28.203	2.543
CO - CH	-12.760	-28.133	2.613
CO - GL	-7.680	-23.053	7.693
CSH - CH	0.07000	-15.303	15.443
CSH - GL	5.150	-10.223	20.523
CH - GL	5.080	-10.293	20.453

Anexo FF - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 12 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 12.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0016, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	5.830	1.810	ns	P>0.05
CO vs CH	-1.890	0.5867	ns	P>0.05
CO vs GL	-17.620	5.470	*	P<0.05
CSH vs CH	-7.720	2.397	ns	P>0.05
CSH vs GL	-23.450	7.280	**	P<0.01
CH vs GL	-15.730	4.883	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	5.830	-7.696	19.356
CO - CH	-1.890	-15.416	11.636
CO - GL	-17.620	-31.146	-4.094
CSH - CH	-7.720	-21.246	5.806
CSH - GL	-23.450	-36.976	-9.924
CH - GL	-15.730	-29.256	-2.204

Anexo GG - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 25 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 25.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	15.010	6.145	**	P<0.01
CO vs CH	7.860	3.218	ns	P>0.05
CO vs GL	-44.130	18.067	***	P<0.001
CSH vs CH	-7.150	2.927	ns	P>0.05
CSH vs GL	-59.140	24.213	***	P<0.001
CH vs GL	-51.990	21.285	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	15.010	4.754	25.266
CO - CH	7.860	-2.396	18.116
CO - GL	-44.130	-54.386	-33.874
CSH - CH	-7.150	-17.406	3.106
CSH - GL	-59.140	-69.396	-48.884
CH - GL	-51.990	-62.246	-41.734

Anexo HH - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 24 horas – 50 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 24h - 50.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	59.980	37.723	*** P<0.001
CO vs CH	34.450	21.667	*** P<0.001
CO vs GL	-70.730	44.484	*** P<0.001
CSH vs CH	-25.530	16.057	*** P<0.001
CSH vs GL	-130.71	82.207	*** P<0.001
CH vs GL	-105.18	66.151	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	59.980	53.304	66.656
CO - CH	34.450	27.774	41.126
CO - GL	-70.730	-77.406	-64.054
CSH - CH	-25.530	-32.206	-18.854
CSH - GL	-130.71	-137.39	-124.03
CH - GL	-105.18	-111.86	-98.504

Anexo II - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 0.1 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 0.1 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-52.340	15.177	*** P<0.001
CO vs CH	-57.630	16.711	*** P<0.001
CO vs GL	-5.210	1.511	ns P>0.05
CSH vs CH	-5.290	1.534	ns P>0.05
CSH vs GL	47.130	13.667	*** P<0.001
CH vs GL	52.420	15.201	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-52.340	-66.820	-37.860
CO - CH	-57.630	-72.110	-43.150
CO - GL	-5.210	-19.690	9.270
CSH - CH	-5.290	-19.770	9.190
CSH - GL	47.130	32.650	61.610
CH - GL	52.420	37.940	66.900

Anexo JJ - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 0.2 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 0.2 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-55.530	14.017	***	P<0.001
CO vs CH	-63.600	16.054	***	P<0.001
CO vs GL	-5.800	1.464	ns	P>0.05
CSH vs CH	-8.070	2.037	ns	P>0.05
CSH vs GL	49.730	12.553	***	P<0.001
CH vs GL	57.800	14.590	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-55.530	-72.165	-38.895
CO - CH	-63.600	-80.235	-46.965
CO - GL	-5.800	-22.435	10.835
CSH - CH	-8.070	-24.705	8.565
CSH - GL	49.730	33.095	66.365
CH - GL	57.800	41.165	74.435

Anexo KK - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 0.4 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 0.4 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-61.350	16.818	*** P<0.001
CO vs CH	-71.850	19.697	*** P<0.001
CO vs GL	-14.500	3.975	ns P>0.05
CSH vs CH	-10.500	2.878	ns P>0.05
CSH vs GL	46.850	12.843	*** P<0.001
CH vs GL	57.350	15.722	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-61.350	-76.667	-46.033
CO - CH	-71.850	-87.167	-56.533
CO - GL	-14.500	-29.817	0.8172
CSH - CH	-10.500	-25.817	4.817
CSH - GL	46.850	31.533	62.167
CH - GL	57.350	42.033	72.667

Anexo LL - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 0.8 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 0.8 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-70.660	17.017	***	P<0.001
CO vs CH	-78.600	18.929	***	P<0.001
CO vs GL	-30.040	7.235	**	P<0.01
CSH vs CH	-7.940	1.912	ns	P>0.05
CSH vs GL	40.620	9.783	***	P<0.001
CH vs GL	48.560	11.695	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-70.660	-88.095	-53.225
CO - CH	-78.600	-96.035	-61.165
CO - GL	-30.040	-47.475	-12.605
CSH - CH	-7.940	-25.375	9.495
CSH - GL	40.620	23.185	58.055
CH - GL	48.560	31.125	65.995

Anexo MM - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 1.5 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 1.5 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-73.900	21.460	*** P<0.001
CO vs CH	-81.050	23.537	*** P<0.001
CO vs GL	-42.160	12.243	*** P<0.001
CSH vs CH	-7.150	2.076	ns P>0.05
CSH vs GL	31.740	9.217	*** P<0.001
CH vs GL	38.890	11.293	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-73.900	-88.360	-59.440
CO - CH	-81.050	-95.510	-66.590
CO - GL	-42.160	-56.620	-27.700
CSH - CH	-7.150	-21.610	7.310
CSH - GL	31.740	17.280	46.200
CH - GL	38.890	24.430	53.350

Anexo NN - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 3 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 3.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-79.950	21.072	*** P<0.001
CO vs CH	-87.890	23.165	*** P<0.001
CO vs GL	-53.660	14.143	*** P<0.001
CSH vs CH	-7.940	2.093	ns P>0.05
CSH vs GL	26.290	6.929	** P<0.01
CH vs GL	34.230	9.022	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-79.950	-95.882	-64.018
CO - CH	-87.890	-103.82	-71.958
CO - GL	-53.660	-69.592	-37.728
CSH - CH	-7.940	-23.872	7.992
CSH - GL	26.290	10.358	42.222
CH - GL	34.230	18.298	50.162

Anexo OO - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 6 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 6.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-82.160	23.540	***	P<0.001
CO vs CH	-89.790	25.726	***	P<0.001
CO vs GL	-61.660	17.667	***	P<0.001
CSH vs CH	-7.630	2.186	ns	P>0.05
CSH vs GL	20.500	5.874	**	P<0.01
CH vs GL	28.130	8.060	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-82.160	-96.815	-67.505
CO - CH	-89.790	-104.45	-75.135
CO - GL	-61.660	-76.315	-47.005
CSH - CH	-7.630	-22.285	7.025
CSH - GL	20.500	5.845	35.155
CH - GL	28.130	13.475	42.785

Anexo PP - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 12 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 12.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-50.720	16.855	***	P<0.001
CO vs CH	-53.740	17.859	***	P<0.001
CO vs GL	-66.110	21.969	***	P<0.001
CSH vs CH	-3.020	1.004	ns	P>0.05
CSH vs GL	-15.390	5.114	*	P<0.05
CH vs GL	-12.370	4.111	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-50.720	-63.356	-38.084
CO - CH	-53.740	-66.376	-41.104
CO - GL	-66.110	-78.746	-53.474
CSH - CH	-3.020	-15.656	9.616
CSH - GL	-15.390	-28.026	-2.754
CH - GL	-12.370	-25.006	0.2656

Anexo QQ - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 25 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 25.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-2.550	0.6507	ns	P>0.05
CO vs CH	-4.650	1.187	ns	P>0.05
CO vs GL	-69.830	17.819	***	P<0.001
CSH vs CH	-2.100	0.5359	ns	P>0.05
CSH vs GL	-67.280	17.168	***	P<0.001
CH vs GL	-65.180	16.632	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-2.550	-19.006	13.906
CO - CH	-4.650	-21.106	11.806
CO - GL	-69.830	-86.286	-53.374
CSH - CH	-2.100	-18.556	14.356
CSH - GL	-67.280	-83.736	-50.824
CH - GL	-65.180	-81.636	-48.724

Anexo RR - Análise estatística do ensaio de biossíntese de colágeno 48 horas – 50 mg/ml

Análise estatística - Picrosirius - 48h - 50.0 mg/ml

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	26.290	7.573	***	P<0.001
CO vs CH	22.640	6.521	**	P<0.01
CO vs GL	-72.030	20.748	***	P<0.001
CSH vs CH	-3.650	1.051	ns	P>0.05
CSH vs GL	-98.320	28.320	***	P<0.001
CH vs GL	-94.670	27.269	***	P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	26.290	11.712	40.868
CO - CH	22.640	8.062	37.218
CO - GL	-72.030	-86.608	-57.452
CSH - CH	-3.650	-18.228	10.928
CSH - GL	-98.320	-112.90	-83.742
CH - GL	-94.670	-109.25	-80.092

Anexo SS - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 24 horas – Fase de Apoptose

Análise estatística - Ciclo Celular - 0.05mg/ml - APO

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0389, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.529 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	2.570	2.584	ns	P>0.05
CO vs CH	1.920	1.930	ns	P>0.05
CO vs GL	-2.130	2.142	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.6500	0.6535	ns	P>0.05
CSH vs GL	-4.700	4.726	*	P<0.05
CH vs GL	-4.050	4.072	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	2.570	-1.934	7.074
CO - CH	1.920	-2.584	6.424
CO - GL	-2.130	-6.634	2.374
CSH - CH	-0.6500	-5.154	3.854
CSH - GL	-4.700	-9.204	-0.1956
CH - GL	-4.050	-8.554	0.4544

Anexo TT - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 24 horas – Fase G0/G1

Análise estatística - Ciclo Celular - 0.05mg/ml - G0/G1

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0320, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.529 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-8.900	5.159	*	P<0.05
CO vs CH	-3.990	2.313	ns	P>0.05
CO vs GL	-1.970	1.142	ns	P>0.05
CSH vs CH	4.910	2.846	ns	P>0.05
CSH vs GL	6.930	4.017	ns	P>0.05
CH vs GL	2.020	1.171	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-8.900	-16.713	-1.087
CO - CH	-3.990	-11.803	3.823
CO - GL	-1.970	-9.783	5.843
CSH - CH	4.910	-2.903	12.723
CSH - GL	6.930	-0.8825	14.743
CH - GL	2.020	-5.793	9.833

Anexo UU - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 24 horas – Fase S

Análise estatística - Ciclo Celular - 0.05mg/ml - S

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9274, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.529 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	1.250	0.7910	ns	P>0.05
CO vs CH	0.9000	0.5695	ns	P>0.05
CO vs GL	0.10000	0.06328	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.3500	0.2215	ns	P>0.05
CSH vs GL	-1.150	0.7277	ns	P>0.05
CH vs GL	-0.8000	0.5063	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	1.250	-5.907	8.407
CO - CH	0.9000	-6.257	8.057
CO - GL	0.10000	-7.057	7.257
CSH - CH	-0.3500	-7.507	6.807
CSH - GL	-1.150	-8.307	6.007
CH - GL	-0.8000	-7.957	6.357

Anexo VV - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 24 horas – Fase G2/M

Análise estatística - Ciclo Celular - 0.05mg/ml - G2

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9714, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.529 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	0.1000	0.04707	ns	P>0.05
CO vs CH	-0.4500	0.2118	ns	P>0.05
CO vs GL	0.9500	0.4472	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.5500	0.2589	ns	P>0.05
CSH vs GL	0.8500	0.4001	ns	P>0.05
CH vs GL	1.400	0.6590	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	0.1000	-9.522	9.722
CO - CH	-0.4500	-10.072	9.172
CO - GL	0.9500	-8.672	10.572
CSH - CH	-0.5500	-10.172	9.072
CSH - GL	0.8500	-8.772	10.472
CH - GL	1.400	-8.222	11.022

Anexo WW - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 48 horas – Fase Apoptose

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - APO - 48H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0005, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	14.600	7.438	**	P<0.01
CO vs CH	14.240	7.255	**	P<0.01
CO vs G	4.840	2.466	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.3600	0.1981	ns	P>0.05
CSH vs G	-9.760	5.371	*	P<0.05
CH vs G	-9.400	5.173	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	14.600	6.246	22.954
CO - CH	14.240	5.886	22.594
CO - G	4.840	-3.514	13.194
CSH - CH	-0.3600	-8.094	7.374
CSH - G	-9.760	-17.494	-2.026

Anexo XX - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 48 horas – Fase G0/G1

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G0/G1 - 48H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1058, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-0.5300	0.5198	ns	P>0.05
CO vs CH	-3.460	3.394	ns	P>0.05
CO vs G	-0.6600	0.6473	ns	P>0.05
CSH vs CH	-2.930	3.104	ns	P>0.05
CSH vs G	-0.1300	0.1377	ns	P>0.05
CH vs G	2.800	2.966	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-0.5300	-4.869	3.809
CO - CH	-3.460	-7.799	0.8792
CO - G	-0.6600	-4.999	3.679
CSH - CH	-2.930	-6.947	1.087
CSH - G	-0.1300	-4.147	3.887

Anexo YY - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 48 horas – Fase S

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - S - 48H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0002, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-13.350	8.806	***	P<0.001
CO vs CH	-9.600	6.333	**	P<0.01
CO vs G	-3.370	2.223	ns	P>0.05
CSH vs CH	3.750	2.672	ns	P>0.05
CSH vs G	9.980	7.111	**	P<0.01
CH vs G	6.230	4.439	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-13.350	-19.802	-6.898
CO - CH	-9.600	-16.052	-3.148
CO - G	-3.370	-9.822	3.082
CSH - CH	3.750	-2.223	9.723
CSH - G	9.980	4.007	15.953

Anexo ZZ - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 48 horas – Fase G2/M

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G2/M - 48H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.8396, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-0.6300	0.6761	ns	P>0.05
CO vs CH	-1.190	1.277	ns	P>0.05
CO vs G	-0.8000	0.8585	ns	P>0.05
CSH vs CH	-0.5600	0.6491	ns	P>0.05
CSH vs G	-0.1700	0.1970	ns	P>0.05
CH vs G	0.3900	0.4520	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-0.6300	-4.596	3.336
CO - CH	-1.190	-5.156	2.776
CO - G	-0.8000	-4.766	3.166
CSH - CH	-0.5600	-4.232	3.112
CSH - G	-0.1700	-3.842	3.502

Anexo AAA - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 72 horas – Fase Apoptose

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - APO - 72H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0115, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	5.260	2.818	ns	P>0.05
CO vs CH	1.370	0.7341	ns	P>0.05
CO vs G	-4.960	2.658	ns	P>0.05
CSH vs CH	-3.890	2.251	ns	P>0.05
CSH vs G	-10.220	5.915	**	P<0.01
CH vs G	-6.330	3.663	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	5.260	-2.683	13.203
CO - CH	1.370	-6.573	9.313
CO - G	-4.960	-12.903	2.983
CSH - CH	-3.890	-11.244	3.464
CSH - G	-10.220	-17.574	-2.866

Anexo BBB - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 72 horas – Fase G0/G1

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G0/G1 - 72H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9608, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-0.2400	0.1883	ns	P>0.05
CO vs CH	0.6100	0.4785	ns	P>0.05
CO vs G	0.3000	0.2353	ns	P>0.05
CSH vs CH	0.8500	0.7202	ns	P>0.05
CSH vs G	0.5400	0.4575	ns	P>0.05
CH vs G	-0.3100	0.2627	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-0.2400	-5.666	5.186
CO - CH	0.6100	-4.816	6.036
CO - G	0.3000	-5.126	5.726
CSH - CH	0.8500	-4.173	5.873
CSH - G	0.5400	-4.483	5.563

Anexo CCC - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 72 horas – Fase S

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - S - 72H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0011, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-3.390	3.139	ns	P>0.05
CO vs CH	1.810	1.676	ns	P>0.05
CO vs G	4.610	4.268	*	P<0.05
CSH vs CH	5.200	5.200	*	P<0.05
CSH vs G	8.000	8.000	***	P<0.001
CH vs G	2.800	2.800	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-3.390	-7.987	1.207
CO - CH	1.810	-2.787	6.407
CO - G	4.610	0.01299	9.207
CSH - CH	5.200	0.9440	9.456
CSH - G	8.000	3.744	12.256

Anexo DDD - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 72 horas – Fase G2/M

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G2/M - 72H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.2243, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-1.600	1.102	ns	P>0.05
CO vs CH	-3.800	2.616	ns	P>0.05
CO vs G	0.000	0.000	ns	P>0.05
CSH vs CH	-2.200	1.636	ns	P>0.05
CSH vs G	1.600	1.190	ns	P>0.05
CH vs G	3.800	2.826	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-1.600	-7.781	4.581
CO - CH	-3.800	-9.981	2.381
CO - G	0.000	-6.181	6.181
CSH - CH	-2.200	-7.923	3.523
CSH - G	1.600	-4.123	7.323

Anexo EEE - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 96 horas – Fase Apoptose

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - APO - 96H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1106, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
CO vs CSH	-5.170	1.985	ns P>0.05
CO vs CH	-7.570	2.907	ns P>0.05
CO vs G	0.4800	0.1843	ns P>0.05
CSH vs CH	-2.400	0.9954	ns P>0.05
CSH vs G	5.650	2.343	ns P>0.05
CH vs G	8.050	3.339	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-5.170	-16.253	5.913
CO - CH	-7.570	-18.653	3.513
CO - G	0.4800	-10.603	11.563
CSH - CH	-2.400	-12.661	7.861
CSH - G	5.650	-4.611	15.911

Anexo FFF - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 96 horas – Fase G0/G1

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G0/G1 - 96H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0125, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	7.900	3.446	ns	P>0.05
CO vs CH	8.700	3.795	ns	P>0.05
CO vs G	-1.400	0.6107	ns	P>0.05
CSH vs CH	0.8000	0.3769	ns	P>0.05
CSH vs G	-9.300	4.382	*	P<0.05
CH vs G	-10.100	4.758	*	P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	7.900	-1.857	17.657
CO - CH	8.700	-1.057	18.457
CO - G	-1.400	-11.157	8.357
CSH - CH	0.8000	-8.234	9.834
CSH - G	-9.300	-18.334	-0.2664

Anexo GGG - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 96 horas – Fase S

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - S - 96H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9511, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test
If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	1.000	0.6301	ns	P>0.05
CO vs CH	-0.1000	0.06301	ns	P>0.05
CO vs G	0.2000	0.1260	ns	P>0.05
CSH vs CH	-1.100	0.7486	ns	P>0.05
CSH vs G	-0.8000	0.5444	ns	P>0.05
CH vs G	0.3000	0.2042	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	1.000	-5.755	7.755
CO - CH	-0.1000	-6.855	6.655
CO - G	0.2000	-6.555	6.955
CSH - CH	-1.100	-7.354	5.154
CSH - G	-0.8000	-7.054	5.454

Anexo HHH - Análise estatística do ensaio de citometria de fluxo – 96 horas – Fase G2/M

Análise estatística - Ciclo celular - 0,05 mg/mL - G2/M - 96H

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.3070, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.256 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q		P value
CO vs CSH	-3.600	2.331	ns	P>0.05
CO vs CH	-1.000	0.6474	ns	P>0.05
CO vs G	0.000	0.000	ns	P>0.05
CSH vs CH	2.600	1.818	ns	P>0.05
CSH vs G	3.600	2.517	ns	P>0.05
CH vs G	1.000	0.6992	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
CO - CSH	-3.600	-10.174	2.974
CO - CH	-1.000	-7.574	5.574
CO - G	0.000	-6.574	6.574
CSH - CH	2.600	-3.487	8.687
CSH - G	3.600	-2.487	9.687