

Marla Piumbini Rocha

Edison Zefa

Rosangela Ferreira Rodrigues

João Paulo Teló Timm

Marcelo Silva Barcellos

ATIVIDADES PRÁTICAS EM *Biologia Celular*





Reitoria

Reitor: *Pedro Rodrigues Curi Hallal*

Vice-Reitor: *Luis Isaias Centeno do Amaral*

Chefe de Gabinete: *Tais Ulrich Fonseca*

Pró-Reitor de Graduação: *Maria de Fátima Cássio*

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação: *Flávio Fernando Demarco*

Pró-Reitor de Extensão e Cultura: *Francisca Ferreira Michelin*

Pró-Reitor de Planejamento e Desenvolvimento: *Otávio Martins Peres*

Pró-Reitor Administrativo: *Ricardo Hartlebem Peter*

Pró-Reitor de Infra-estrutura: *Julio Carlos Balzano de Mattos*

Pró-Reitor de Assuntos Estudantis: *Mário Renato de Azevedo Jr.*

Pró-Reitor de Gestão Pessoas: *Sérgio Batista Christino*

Conselho Editorial

Presidente do Conselho Editorial: *João Luis Pereira Ourique*

Representantes das Ciências Agronômicas: *Guilherme Albuquerque de Oliveira Cavalcanti* (TITULAR), *Cesar Valmor Rombaldi* e *Fabício de Vargas Arigony Braga*

Representantes da Área das Ciências Exatas e da Terra: *Adelir José Strieder* (TITULAR), *Juliana Pertille da Silva* e *Daniela Buske*

Representantes da Área das Ciências Biológicas: *Marla Piumbini Rocha* (TITULAR), *Rosangela Ferreira Rodrigues* e *Raquel Ludke*

Representantes da Área das Engenharias e Computação: *Darci Alberto Gatto* (TITULAR) e *Rafael Beltrame*

Representantes da Área das Ciências da Saúde: *Claiton Leoneti Lencina* (TITULAR) e *Giovanni Felipe Ernst Frizzo*

Representantes da Área das Ciências Sociais Aplicadas: *Célia Helena Castro Gonsales* (TITULAR) e *Sylvio Arnaldo Dick Jantzen*

Representante da Área das Ciências Humanas: *Charles Pereira Pennaforte* (TITULAR), *Edgar Gandra* e *Guilherme Camargo Massau*

Representantes da Área das Linguagens e Artes: *Josias Pereira da Silva* (TITULAR) e *Maristani Polidori Zamperetti*

ATIVIDADES PRÁTICAS EM
Biologia Celular





**Editora
UFPel**

Filiada à A.B.E.U.

Rua Benjamin Constant, 1071 - Porto
Pelotas, RS - Brasil
Fone +55 (53)3227 8411
editora.ufpel@gmail.com

Direção

João Luis Pereira Ourique
Editor-Chefe

Seção de Pré-Produção

Isabel Cochrane
Administrativo

Seção de Produção

Gustavo Andrade
Administrativo
Anelise Heidrich
Revisão
Ingrid Fabiola Gonçalves
(Bolsista/Estagiário)
Criação/Edição

Seção de Pós-Produção

Morgana Riva
Assessoria
Madelon Schimmelpfennig Lopes
Administrativo

Capa e Projeto Editorial

Rosendo Caetano

Revisão

Anelise Heidrich

Catálogo na Publicação:
Bibliotecária Kênia Bernini – CRB-10/920

A872 Atividades práticas em biologia celular [recurso eletrônico] /
Marla Piumbini Rocha ...[et al.]. Pelotas : Ed. UFPel , 2018.
148 p. : il.

15,4 KB ; PDF

Disponível em : <http://quaiaca.ufpel.edu.br/handle/prefix/4154>

ISBN: 978-85-517-0020-4

1. Biologia celular. 2. Ensino. 3. Material didático.
I. Rocha, Marla Piumbini

CDD 574.87

ATIVIDADES PRÁTICAS EM
Biologia Celular

Marla Piumbini Rocha

Edison Zefa

Rosangela Ferreira Rodrigues

João Paulo Teló Timm

Marcelo Silva Barcellos

Pelotas, 2018



Sumário

APRESENTAÇÃO	11
CAPÍTULO 1	13
CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CÉLULAS	
Histórico	13
Tipos de células	14
As células eucariotas	16
Formas, tamanho e cor	20
Vida e morte da célula	22
Origem e evolução das células	22
CAPÍTULO 2	27
TÉCNICAS DE MICROSCOPIAS PARA ESTUDO DAS CÉLULAS	
Microscopia de luz ou óptica	27
Funcionamento básico do microscópio óptico	28
Microscopia de contraste de fase	29
Microscopia de fluorescência	30
Microscopia eletrônica de transmissão	30
Microscopia eletrônica de varredura	32
CAPÍTULO 3	37
METODOLOGIAS PARA ESTUDO DAS CÉLULAS	
Lâmina permanente com microtomia	37
Lâmina temporária sem microtomia	40
Espalhamento	40
Esfregaço	40
Distensão	41
Esmagamento	41
Preparo a fresco	41
CAPÍTULO 4	49
BIOMACROMOLÉCULAS E CITOQUÍMICA	
Água	49
Açúcares	50

Lipídios	50
Proteínas	51
Ácidos nucléicos	52
Evidenciação das biomacromoléculas - citoquímica	53

CAPÍTULO 5 61

BIOMEMBRANAS

Constituição química	61
Junções celulares	64
Especializações de membrana	65

CAPÍTULO 6 71

TRANSPORTE VIA BIOMEMBRANAS

Transporte em pequena quantidade	72
Transporte em grande quantidade	73
Osmose	74

CAPÍTULO 7 83

CITOPLASMA

Inclusões e vesículas	83
Citoesqueleto	84
Microfilamentos de actina	85
Filamentos Intermediários	86
Microtúbulos	87

CAPÍTULO 8 95

SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS

Retículo endoplasmático	95
Complexo de Golgi	97
Lisossomos	99
Características gerais do processo de tradução	100

CAPÍTULO 9 105

ASPECTOS GERAIS DO NÚCLEO

Número, forma e localização do núcleo	105
Constituição	107
Envoltório Nuclear	107
Nucléolo	109
Material genético da célula	110
Cromossomos metafásicos	112
Cromossomos gigantes	114

CAPÍTULO 10	119
CICLO CELULAR MITÓTICO E MEIOSE	
Intérfase	119
Mitose	120
Meiose	122
CAPÍTULO 11	131
ORGANELAS E O METABOLISMO ENERGÉTICO DA CÉLULA	
Mitocôndria	131
Cloroplastos	133
Peroxissomo	135
Produção de energia na mitocôndria	136
Respiração Aeróbica	137
Ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos)	138
Fosforilação oxidativa	138
Produção de energia no cloroplasto	139
Fase clara ou fotoquímica - reações fotodependentes	140
Reações fotoindependentes (química ou fase escura ou ciclo de Calvin-Benson)	141
Resumo da fotossíntese	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
ÍNDICE REMISSIVO	145
CRÉDITOS DAS FIGURAS	147

Quero agradecer a todos os professores que se fizeram presentes na minha vida, desde a professora Vera, do Jardim da Infância em Guarapari, até minha orientadora de doutorado, Silvia Pompolo. Também agradeço a todos os alunos que me ajudaram nessa feliz caminhada da docência e me inspiraram para a realização desse livro.

Marla Piumbini Rocha

APRESENTAÇÃO

Esse material didático apresenta roteiros de atividades práticas em biologia celular. Ele surgiu em resposta às necessidades de professores e discentes da disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Em 2010 Rocha e Silveira fizeram um estudo sobre o ensino desse conteúdo para os cursos de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da UFPEL, os autores discutiram que devido à dificuldade no aprendizado de biologia celular seria necessário desenvolver um processo ensino/aprendizagem dinâmico e interativo. As aulas práticas vêm ao encontro dessa necessidade, pois possibilitam a oportunidade dos discentes exercitarem novos conhecimentos e entenderem teorias que somente em aulas expositivas se distanciam de sua realidade. Reginaldo e colaboradores (2012) discutem que, a realização de experimentos representa uma excelente ferramenta para que o discente faça a experimentação do conteúdo e, possa estabelecer a dinâmica e indissociável relação entre teoria e prática. Larrosa (2002) afirma que “aprender não significa adquirir e processar informação, é necessário experimentar para conhecer”.

As atividades práticas bem trabalhadas possibilitam exercitar a capacidade dos alunos de analisarem problemas, levantarem hipóteses e comprovarem suas hipóteses rejeitando-as ou aceitando-as. Enquanto ao docente, ao invés de levar somente a transmissão de informação tradicional, possibilita levar conhecimento científico propiciando aos alunos testarem e aprimorarem seus conhecimentos, pois “o trabalho do professor é o trabalho do professor com os alunos e não do professor consigo mesmo”

(FREIRE, 2008).

O primeiro capítulo faz uma abordagem geral sobre as células, os demais capítulos trazem uma breve revisão teórica do conteúdo seguida por propostas de atividades práticas. Essas propostas foram baseadas em diferentes livros de biologia celular, cadernos de exercícios de Universidades brasileiras, livros do ensino médio e pela experiência vivenciada na área. O principal foco desse roteiro é a atividade prática e não o conteúdo teórico em si, por essa razão é imprescindível a leitura de livros de biologia celular.

Outra forma para tornar o processo ensino/aprendizagem dinâmico é o uso de imagens, pois elas transmitem o conhecimento com uma velocidade maior que a linguagem escrita e são mais facilmente lembradas (MARTINS et al, 2005; PIOVESANI, 2012). No roteiro são apresentadas fotomicrografias obtidas a partir do laminário de Histologia e Biologia Celular da UFPEL, imagens de microscopia eletrônica obtidas na UFV (Universidade Federal de Viçosa) e esquemas elaborados sobre modelos esboçados por discente da UFPEL. As imagens também permitem que os estudantes continuem seus estudos mesmo fora do Laboratório de aulas práticas.

O modelo de célula mais utilizado nesse roteiro foi a animal, tanto nas imagens quanto nos exercícios. Isso se deve ao fato que geralmente as células vegetais e as procariontas são tratadas com mais detalhes em outras disciplinas.

Esperamos que esse livro desperte ainda mais o interesse de nossos discentes por essa área tão complexa e fascinante.

Capítulo 1

Características gerais das células

Todos os seres vivos são compostos por células, que são as unidades funcionais dos seres vivos. Portanto, para compreender as funções básicas da vida, como a respiração, nutrição, crescimento, reprodução é fundamental conhecer as células.

Esse estudo não pode ser feito considerando a célula como uma unidade independente, é importante considerar todas as relações existentes. Como por exemplo, as células formando os tecidos, estes formando os órgãos, que formam os sistemas, que formam os organismos e ainda deve-se considerar a relação dos organismos com o ambiente que os cerca.

Histórico

O termo célula foi utilizado pela primeira vez em 1665 por Robert Hooke para designar 'pequenas caixas' observadas em cortes de uma árvore, a corticeira (*Erythrina* sp.) (Figura 1).

Hooke deu este nome porque elas pareciam com as celas habitadas por monges nos mosteiros. Na verdade, o material observado não apresentava células vivas, apenas espaços rodeados por parede celular.

Do século XVII até o XX, o avanço tecnológico permitiu um aprimoramento dos equipamentos ópticos e das metodologias de estudos das células. Devido a esse progresso, Schleiden em 1838, um advogado que se tornou botânico (Alemão), e Schwann em 1839, um zoólogo (Alemão), desenvolveram a Teoria Celular. Esta teoria inferiu que todos os seres vivos são compostos de uma ou mais células e que ela é a unidade estrutural da vida. Contudo essa teoria apresentou uma 'falha', pois os autores consideraram que as células poderiam ser geradas a partir de materiais não celulares. Virchow, médico, antropólogo e político polonês, em 1855 postulou o terceiro princípio da teoria celular, que as células originam-se exclusivamente por divisão de uma célula pré-existente: ele escreveu: 'A célula é a última e irreduzível forma de todo elemento vivo, e..... dela emanam todas as atividades da vida, tanto na saúde como na doença'. Virchow também iniciou a histologia, desenvolvendo

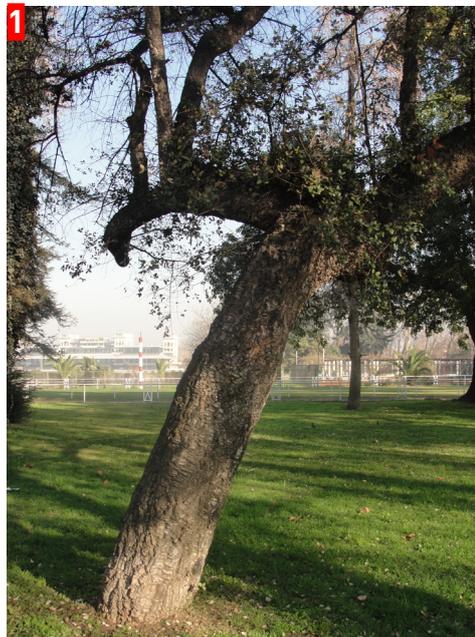


Figura 1 – Árvore corticeira

a classificação básica para os tecidos animais. Em 1860, Louis Pasteur confirmou a afirmação de Virchow, comprovando que organismos vivos não surgem espontaneamente.

Tipos de células

Existem dois grandes grupos de células: procariota e eucariota. Uma diferença entre elas se refere à complexidade estrutural. Enquanto nas células procariotas existe apenas uma membrana que envolve o citoplasma (Figura 2), nas células eucariotas existe um sistema de endomembranas que forma as organelas (Figura 3).

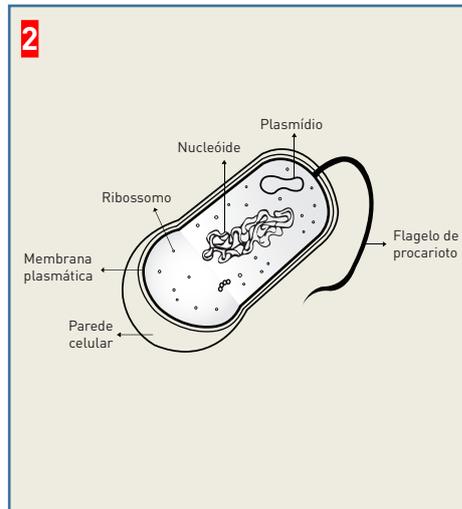


Figura 2 – Célula procariota.

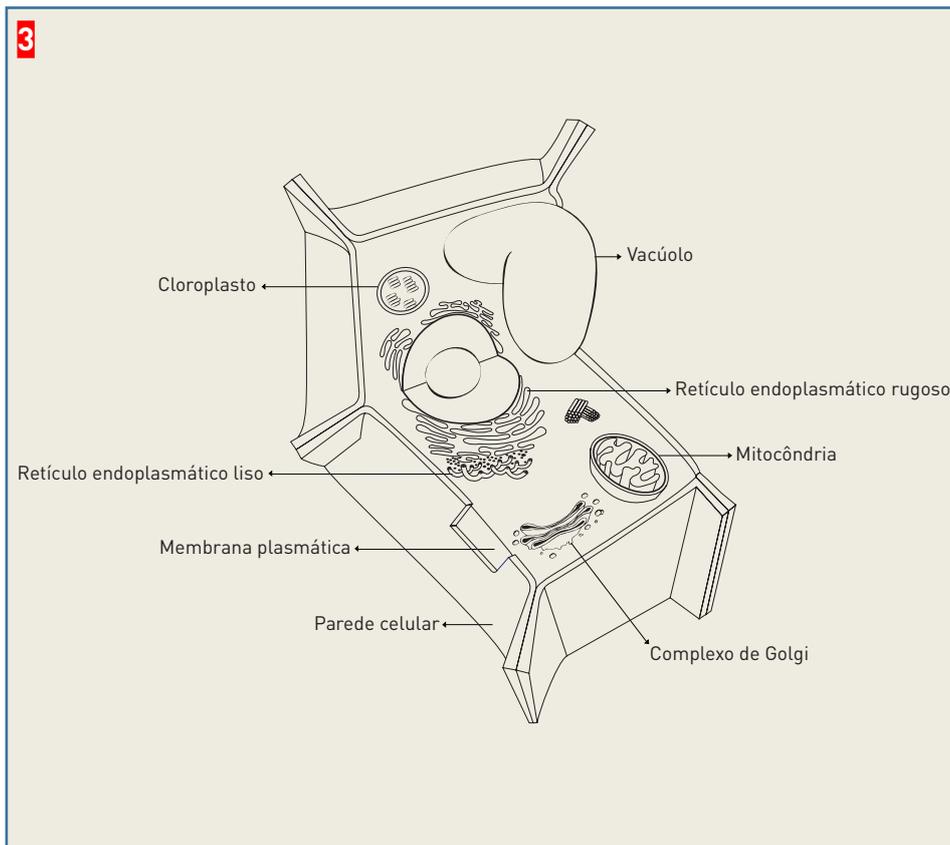


Figura 3 – Célula eucariota vegetal.

As principais diferenças entre procariotos e eucariotos estão apresentadas na Tabela 1.

CARACTERÍSTICAS	PROCARIOTOS	EUCARIOTOS
Ocorrência	Reino Monera – Bactérias, incluindo as cianofíceas	Reino Protista – unicelulares de vida livre ou coloniais Reino Fungi – todos os fungos Reino Plantae – algas clorofíceas e vegetais superiores Reino Animalia – animais
DNA	Menor quantidade Ausência de histonas Geralmente circular Não compartimentalizado Denominado de nucleóide	Maior quantidade Associado a histonas, Geralmente linear Compartimentalizado (envoltório nuclear) Localizado no núcleo
Membranas	Só existe a membrana externa (membrana plasmática)	Riqueza de membranas (sistema de endomembranas)
Parede Celular	Presente na maioria	Presente em alguns organismos (Plantae)
Divisão	Por fissão	Pelos processos de mitose e meiose
Fuso mitótico	Ausente	Presente
Endocitose	Não realizam	Realizam
Citoesqueleto	Ausente	Presente
Complexos cílios e flagelos	Ausentes	Alguns possuem
Ribossomos	Livres no citoplasma	Livres no citoplasma e/ou aderidos ao Retículo Endoplasmático e à membrana externa do envoltório nuclear

Tabela 1 – Comparação entre eucariotos e procariotos

Os organismos procariotos são unicelulares, podendo fazer fotossíntese (autotróficos) ou não (heterotróficos). Da mesma forma, os eucariotos podem ser autotróficos ou heterotróficos. Porém diferentemente dos procariotos, os eucariotos podem ser unicelulares ou multicelulares podendo organizar tecidos ou não (Figura 4). Considera-se tecido um conjunto de células que interagem

e são interdependentes, atuando de modo harmônico na execução de determinadas funções. Para formar um tecido é necessário que as células se apresentem ligadas entre si por uma matriz extracelular, por adesões entre as suas membranas ou por pontes citoplasmáticas.

Para exemplificar essa diversidade é apresentado o diagrama a seguir.

4

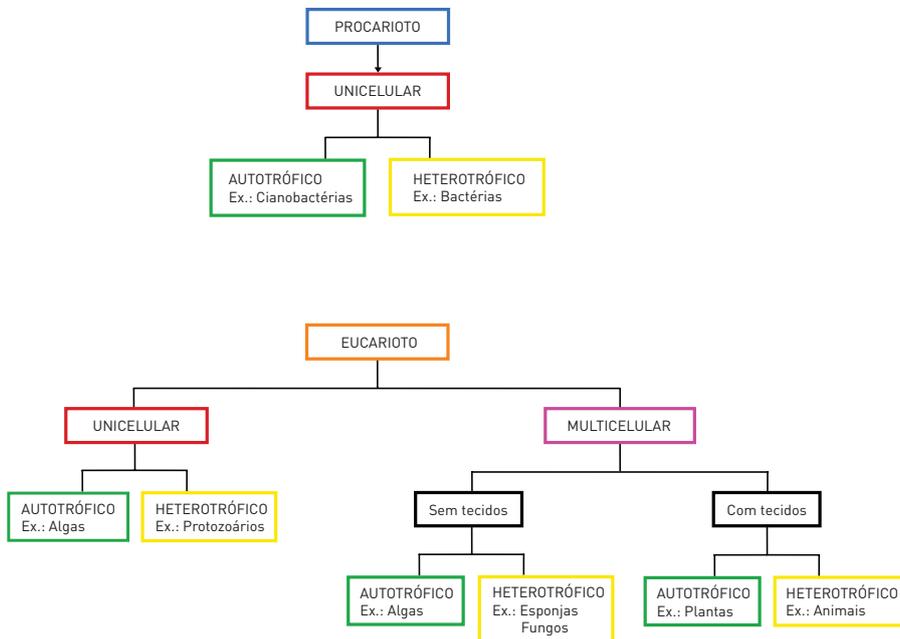


Figura 4 – Diagrama da diversidade de seres vivos conforme as características celulares.

As células eucariotas

Organelas e citosol

As células eucariotas apresentam diversas organelas, sendo que cada uma exerce funções específicas, gerando um produto que poderá ser utilizado por uma segunda organela e assim sucessivamente. Vamos começar pela maior organela da célula animal, o núcleo.

O núcleo é facilmente visto no microscópio óptico, por exemplo, na figura 5 pode-se observar o núcleo de um monócito (seta) com formato de rim (reniforme). No esquema da figura 6 observa-se que esta organela é delimitada pelo envoltório nuclear, composto por duas membranas e apresenta poros nucleares por toda a sua extensão. No interior do núcleo se encontra o nucléolo, a cromatina e o nucleoplasma.

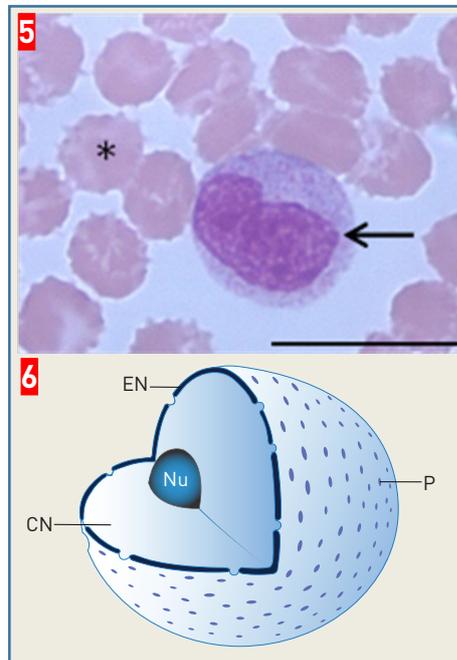


Figura 5 – Esfregaço sanguíneo mostrando um monócito (seta) e hemácias (asterisco). Escala: 5µm

Figura 6 – Núcleo-envoltório nuclear (EN), poros nucleares (seta), nucléolo (Nu), nucleoplasma (CN) com a cromatina dispersa.

É importante ressaltar que nem todas as células animais adultas têm núcleo; por exemplo, a hemácia humana é anucleada (Figura 5, asterisco). Por outro lado, algumas células possuem centenas de núcleos (exemplo: célula muscular estriada esquelética).

Existe uma organela que é contínua com a membrana externa do envoltório nuclear, o retículo endoplasmático. Ele é o mais extenso sistema de membranas das células, formado por uma rede de vesículas achatadas e interconectadas, podendo ser de dois tipos, o rugoso (RER), quando associado a ribossomos e o liso (REL), quando não está associado a ribossomos (Figura 7).

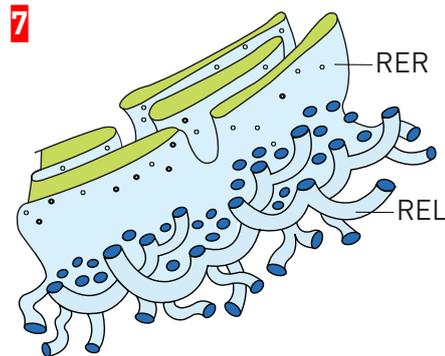


Figura 7 – Retículo endoplasmático rugoso (RER) e retículo endoplasmático liso (REL).

Ambos os retículos se distinguem química e funcionalmente, além disso, o RER possui ribossomos aderidos a sua face externa. O retículo endoplasmático rugoso é responsável por parte do processo de tradução e do processamento de proteínas. Enquanto o retículo endoplasmático liso tem como função a metabolização e desintoxicação de compostos químicos; a síntese de lipídios, além de ser um reservatório de cálcio. As proteínas produzidas no retículo endoplasmático são encaminhadas ao complexo de Golgi, para finalizar sua construção, assim como os lipídios.

No corpo do neurônio, é possível identificar pontos escuros dentro do seu citoplasma que correspondem ao acúmulo de RER e ribossomos, denominado de corpúsculos de Nissl (Figura 8).

O complexo de Golgi é formado por vesículas achatadas (cisternas) e esféricas. As cisternas estão dispostas de maneira organizada: cisterna cis (voltada para o RER), cisternas médias, cisternas trans (voltadas para a membrana plasmática) (Figura 9).

Uma das suas funções é o processamento e encaminhamento das proteínas e lipídios vindos do retículo endoplasmático. Dentre os processamentos estão a glicosila-

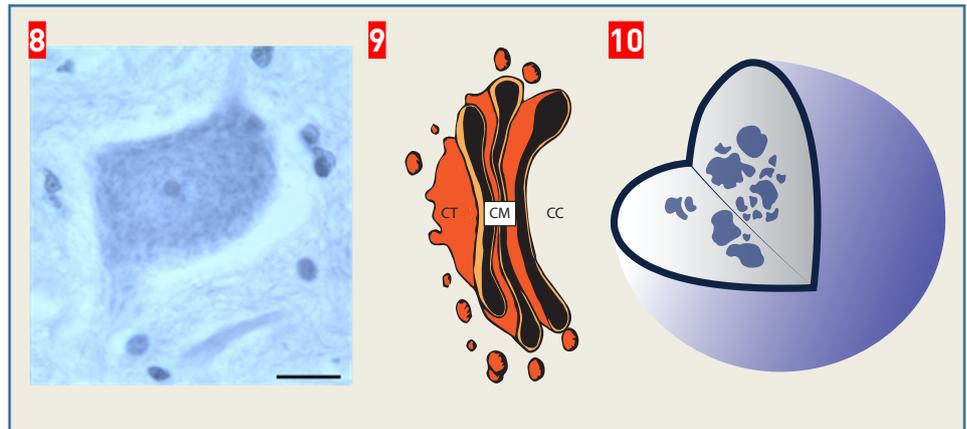


Figura 8 – Neurônio com corpúsculo de Nissl. Escala: 5µm

Figura 9 – Complexo de Golgi – Cisterna Cis (CC), Cisterna Média (CM) e Cisterna Trans (CT).

Figura 10 – Lisossomo.

ção, sulfatação e fosforilação. No complexo de Golgi também ocorre a síntese de polisacarídeos (hemicelulose, pectina, glicosaminoglicana).

Os lisossomos (Figura 10) são sacos membranosos que contêm no seu interior diferentes tipos de enzimas (proteases, nucleases, lipases) que quebram compostos grandes em pequenas moléculas.

Os lisossomos também são responsáveis pela reciclagem de organelas velhas e digestão de microrganismos. Outra característica dessa organela é o seu pH, que é menor que o pH do citoplasma, essa condição é importante para as enzimas realizarem suas atividades.

Para que as organelas exerçam suas funções é fundamental a presença de energia, a principal molécula de energia da célula é o ATP (Adenosina Trifosfato). Parte da produção de energia nos eucariotos ocorre nas mitocôndrias. Elas podem ser alongadas ou esféricas, são envoltas por duas membranas (externa e interna) e possuem no seu interior DNA circular, ribossomos e uma matriz (Figura 11).

Nas células vegetais, além das organelas citadas existem os cloroplastos. Eles são responsáveis pela formação de compostos orgânicos, convertendo energia luminosa em energia química, graças à presença de

pigmentos, como a clorofila. Estas organelas são facilmente observadas ao microscópio óptico devido ao seu tamanho e por apresentarem pigmentos (Figura 12).

Assim como as mitocôndrias, os cloroplastos são formados por duas membranas (externa e interna), possuem DNA circular e estroma. Porém no seu interior, mergulhado no estroma, encontra-se um sistema de membranas, os tilacóides. Além dos cloroplastos, existem outros tipos de plastos, com outras funções (Figura 13).

Os peroxissomos são formados por vesículas esféricas ou alongadas, possuem uma membrana e na sua matriz estão as enzimas necessárias para sua atividade. Atuam em conjunto com as mitocôndrias, quebrando cadeias longas de ácidos graxos em cadeias curtas, que podem ser fornecidas para as mitocôndrias produzirem energia, ou serem excretadas, ou servir como intermediários na síntese de lipídios. Também fazem a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Tanto os metabólitos vindos do exterior da célula quanto os produtos das reações celulares e as próprias organelas seguem rotas dentro da célula. Para esses processos ocorrerem é necessária uma organização estrutural da célula, que é proporcionada pelo citoesqueleto. Este oferece vias

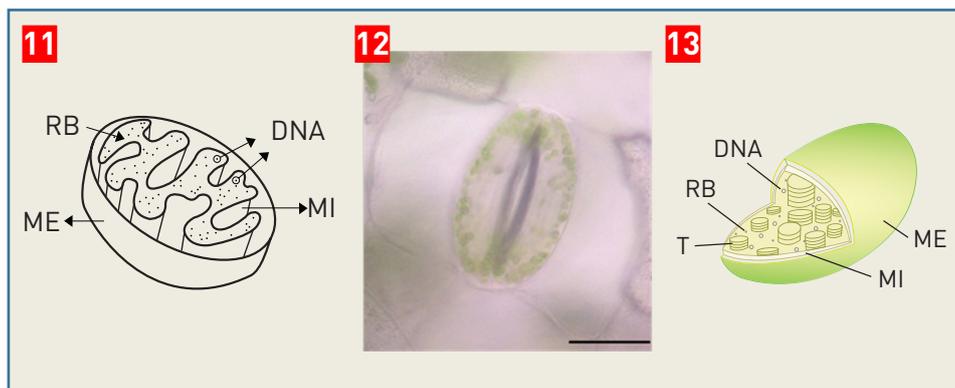


Figura 11 – Mitocôndria – membrana externa (ME), membrana interna (MI), DNA e ribossomos (RB).

Figura 12 – Célula vegetal sem coloração evidenciando os cloroplastos. Escala: 10µm

Figura 13 – Cloroplasto – Membrana externa (ME), Membrana Interna (MI), Tilacóides (T), DNA e Ribossomos (RB).

para os movimentos das organelas e para o direcionamento do tráfego de vesículas entre elas. Também é importante para a divi-

são celular, com a participação do centríolo (Figura 14).

O citoesqueleto é formado por vários elementos, entre eles os microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos de actina.

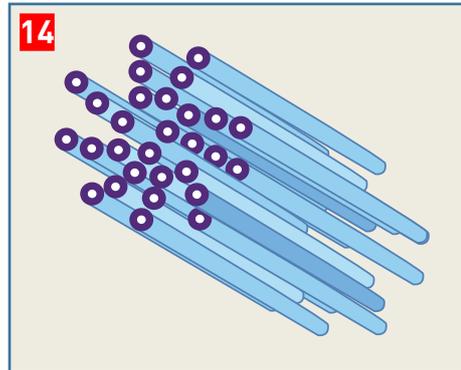


Figura 14 – Centríolo.

Diferenças entre células animais e vegetais

As células eucariotas podem variar em relação aos tipos de organelas e estruturas que apresentam. Como exemplo, veremos no quadro abaixo diferenças entre as células vegetais e animais (Tabela 2).

CARACTERÍSTICAS	VEGETAIS	ANIMAIS
Matriz extracelular	Tipo especializado (parede celular), rígida	Presente, não rígida
Parede celular	Presente	Ausente
Plastos	Leucoplastos (amiloplastos, oleoplastos, proteoplastos) e Cromoplastos (cloroplastos)	Ausente
Vacúolos	Grandes (5 a 95% do volume celular) Armazenam nutrientes, metabólitos, catabólitos, ou substâncias específicas Turgência celular	Pequenos
Centríolos	Ausentes	Presentes
Microtúbulos	Orientam a direção das fibrilas de celulose	Várias funções (vide citoesqueleto)
Polissacarídeos de reserva	Amido	Glicogênio
Conexões intercelulares	Plasmodesmas	Junções comunicantes
Fotossíntese	Realizam	Não realizam
Transporte intracitoplasmático	Ciclose (corrente citoplasmática produzida pela actina e miosina)	Realizado pelo citoesqueleto e proteínas motoras
Desdiferenciação	Presente	Baixa
Citocinese	Formação do fragmoplasto (vesículas do Golgi)	Estrangulamento do citoplasma pelo citoesqueleto

Tabela 2 – Comparação entre células animais e vegetais

A quantidade de citoplasma e de organelas também varia entre os tipos celulares, pois depende da função da célula. Por exemplo, comparando proporcionalmente o tamanho da célula e a quantidade de citoplasma, veremos que um linfócito apresenta menor quantidade de citoplasma comparado a um plasmócito (Figura 15).

No nosso corpo existe um tipo celular que não apresenta organelas, as células do cristalino (Figura 16). Quando essas células são jovens, elas possuem organelas, contudo, estas são destruídas no início do desenvolvimento. O que permanece no citoplasma são as proteínas cristalinas, que se apresentam organizadas regularmente. A ausência de organelas é vantajosa para as células do cristalino, pois a sua presença dispersaria a luz para a formação da imagem. Por outro lado, a desvantagem é que essas células não conseguem se regenerar quando ocorre algum problema.

Formas, tamanho e cor

As células eucariotas podem apresentar diversas formas, que dependem principalmente da organização do seu citoesqueleto. Outros fatores são importantes como a tensão superficial, a viscosidade do protoplasma, a ação mecânica que exercem células contíguas e a rigidez da membrana plasmática. É importante observar que ge-

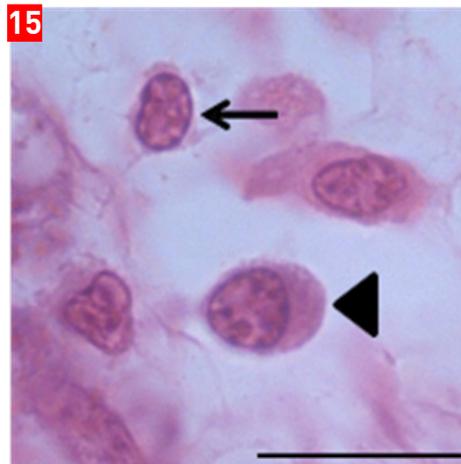


Figura 15 – Comparação entre quantidade de citoplasma do linfócito (seta) e o plasmócito (cabeça de seta). Escala: 5 μ m

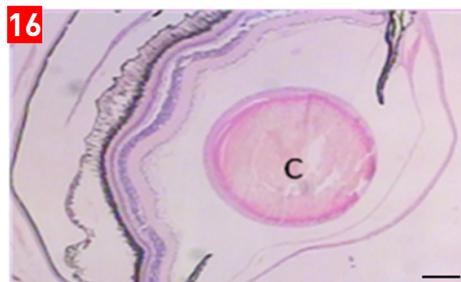


Figura 16 – Olho, C indica o cristalino. Escala: 100 μ m

ralmente a forma da célula está relacionada com a sua função, por exemplo, um neurônio apresenta longos prolongamentos, pois sua função é transmitir informação a longa distância.

A maioria das células animais apresenta forma fixa, sendo que para algumas a sua forma é regular, como por exemplo, a célula

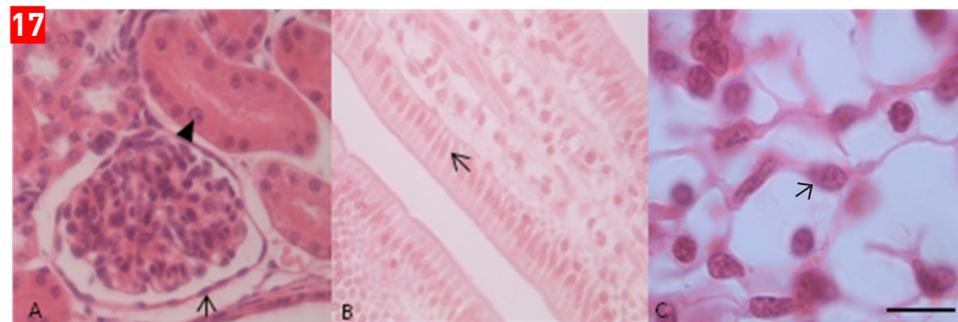


Figura 17 – Comparação entre as formas das células: A) célula cúbica (cabeça de seta) e célula pavimentosa (seta) do rim; B) Célula prismática da vesícula biliar (seta); C) Célula com formato irregular do linfonodo (seta). Escala: 10 μ m

cúbica (Figura 17 A), a pavimentosa (Figura 17A) presentes no rim e a célula cilíndrica da vesícula biliar (Figura 17 B). No entanto, outras células apresentam forma irregular, como a célula reticular que é rica em prolongamentos citoplasmáticos (Figura 17 C).

Algumas células modificam seu formato durante o seu tempo de vida, como por exemplo, as células epiteliais do esôfago. Na camada basal as células são altas, à medida que elas vão se diferenciando, tornam-se achatadas ou pavimentosas (Figura 18).

Algumas células não apresentam um formato permanente pelo fato de exercerem movimentos, como por exemplo, os monócitos e outras células de defesa. Eles são produzidos na medula óssea, transportados pela circulação sanguínea, atravessam por diapedese os vasos e alcançam os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos (Figura 19).

É importante ressaltar que, apesar das células dos organismos sexuais serem tão diferentes entre si, todas têm origem a partir de uma única célula, o zigoto. Isso significa que possuem o mesmo material genético em seu núcleo. As diferenças estruturais e funcionais ocorrem devido à expressão gênica diferenciada entre as células.

Outra característica das células é quanto ao seu tamanho, a maioria das células não é visível a olho nu, a menor dimensão possível de ser enxergada com vista desarmada é de 200 μm e as células têm cerca de 5 a 20 μm . Contudo, algumas células alcançam dimensões maiores, como por exemplo, alguns óvulos de aves e de anfíbios (1 mm).

Além da questão do tamanho, outro fator que dificulta a visualização das células é a cor. É difícil diferenciar a célula do meio que a contém, pois a maioria não possui pigmentos e os componentes celulares apresentam índices de refração próximos entre si (Figura 20).

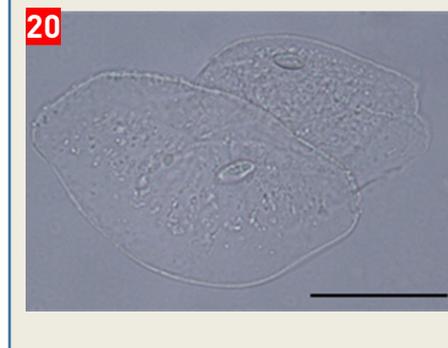
Figura 18 – Epitélio do esôfago evidenciando as diferentes formas das células conforme o estágio de diferenciação. Escala: 10 μm



Figura 19 – Macrófago. Escala: 5 μm



Figura 20 – Célula da mucosa oral sem corar e analisada em microscopia óptica. Escala: 5 μm



Vida e morte da célula

Tanto os seres unicelulares quanto os multicelulares realizam processos de multiplicação celular. Nos unicelulares a divisão celular permite a multiplicação dos organismos, já para alguns multicelulares, pode haver dois tipos de divisão, a meiose que ocorre exclusivamente nas células gaméticas dos organismos sexuais (Figura 21 A) e a mitose que ocorre com as células somáticas (Figura 21 B), bem como na ovogônia e espermatogônia.

Quando o ovócito é fecundado ocorre a formação do zigoto e se inicia um processo de multiplicação celular por divisões mitóticas. Após algumas divisões é formado o blastocisto, nessa fase, todas as células são totipotentes e denominadas de 'células tronco embrionárias'. Essas células têm capacidade de formar qualquer outro tipo celular, inclusive células dos anexos embrionários.

À medida que essas células vão se diferenciando, formam as células pluripotentes, que também têm capacidade de formar todos os tipos celulares, exceto em células dos anexos embrionários. Conforme segue o processo de diferenciação são geradas as células adultas especializadas e com isso diminuindo a capacidade de sofrer mitose.

O tempo de vida de uma célula pode variar de horas a anos, dependendo do tipo celular. Por exemplo, as células do sangue como as hemácias têm um tempo de vida em média de 120 dias, enquanto um neurônio pode durar o tempo de vida da pessoa, 90 anos, por exemplo.

Cerca de 90% das moléculas que constituem nosso corpo são substituídas em torno de seis meses. Contudo, com o passar dos anos, essa capacidade diminui e as células podem morrer. A morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos, a necrose ou a

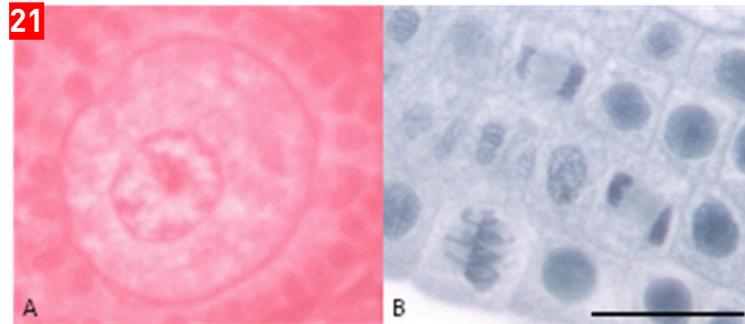


Figura 21 – Células que apresentam diferentes tipos de divisão: Ovócito (A) e células da raiz da cebola (*Allium cepa*) (B). Escala: 10µm

apoptose, sendo esta última também chamada de morte celular programada.

No processo de apoptose, o DNA é destruído, as mitocôndrias param de funcionar e são formados corpos apoptóticos, que são pequenas vesículas que se formam como parte do citoplasma da célula. Já na necrose as membranas celulares perdem sua integridade, ocorrendo extravasamento de substâncias contidas nas células.

Origem e evolução das células

A vida no planeta Terra teve origem há aproximadamente 4 bilhões de anos. Segundo a Hipótese da evolução gradual dos sistemas químicos - Hipótese de Oparin e Haldane, há 4 bilhões de anos atrás a superfície era coberta por grande quantidade de água e era rica em vapor de água, dióxido de carbono, metano, amônia e hidrogênio. A temperatura era bem mais alta que a atual, havia muitos raios ultravioletas e descargas elétricas, além da ausência de oxigênio. As descargas elétricas e as radiações forneceram energia para que algumas moléculas se unissem formando as primeiras moléculas orgânicas e a chuva levava essas moléculas da atmosfera para os mares primitivos. Esse evento é chamado de síntese pré-biótica.

Um passo muito importante na origem

da vida foi a formação de moléculas com capacidade de criar cópias de si mesma, provavelmente moléculas semelhantes ao RNA (replicadores). Porém a replicação desse tipo de molécula nem sempre era fiel, o que levou a evolução das moléculas e consequentemente a variabilidade. Acredita-se que a molécula de DNA surgiu a partir da polimerização de nucleotídeos sobre um molde de RNA. Esse DNA, assim como o RNA determinavam a estrutura das proteínas, assim como ocorre atualmente.

As condições na Terra não favoreciam a perpetuação dos replicadores e eles só conseguiram se manter nesse ambiente inóspito porque houve o desenvolvimento de um revestimento protetor, a membrana plasmática. Atualmente poderíamos considerar o RNA como os replicadores e a membrana como a sua máquina de sobrevivência. Considera-se que nesse ponto ori-

ginaram-se as primeiras células vivas, que foram semelhantes aos atuais procariontes heterotróficos anaeróbicos.

A partir do aparecimento de pigmentos semelhantes à clorofila, que são capazes de transformar energia solar em energia química, surgiram as células autotróficas. Desse evento dependeu a manutenção da vida na terra, pois o estoque de compostos de carbonos, utilizados pelas células ancestrais como alimento, era limitado. O oxigênio liberado formou a camada de ozônio que protegeu a terra da radiação ultravioleta e permitiu a evolução de células aeróbicas. Os seres anaeróbicos ficaram então restritos aos ambientes sem oxigênio.

Os eucariotes evoluíram de procariontes a partir de invaginações da membrana plasmática, formando algumas organelas, como o núcleo, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi (Figura 22).

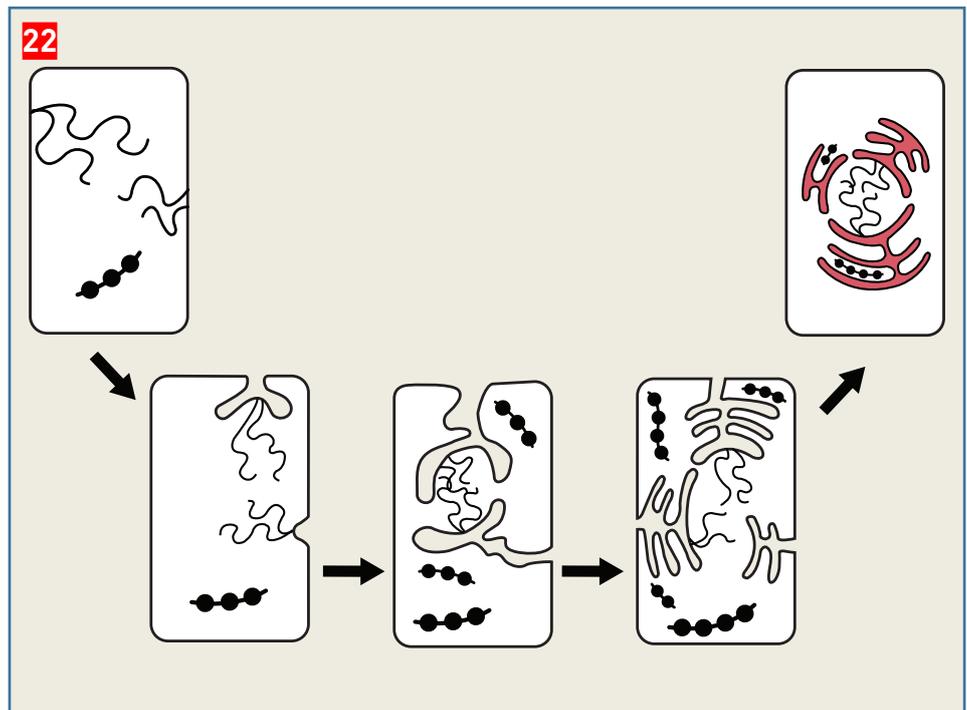
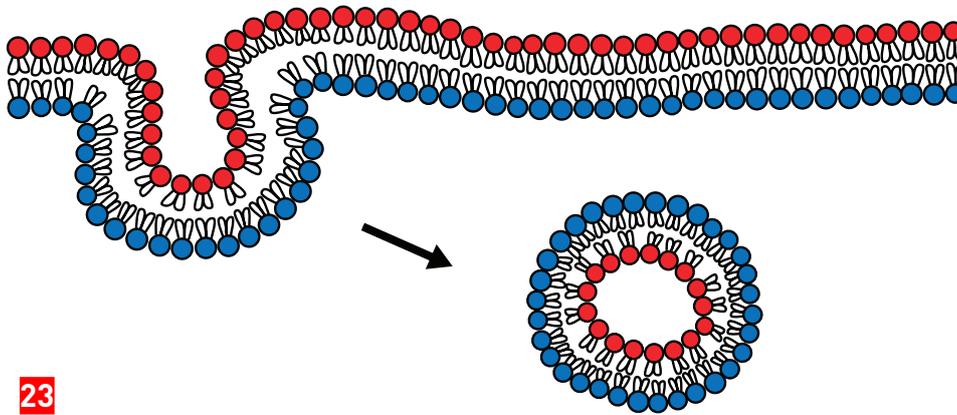


Figura 22 – Origem das células eucariotas por invaginação da membrana plasmática.



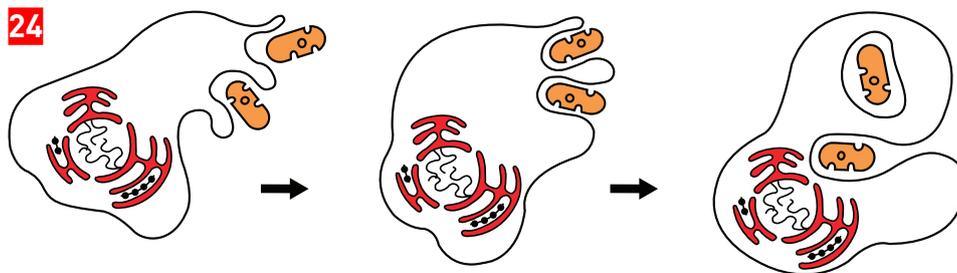
23

Figura 23 – Localização das faces da membrana plasmática durante a invaginação.

Uma das evidências desse processo é que a face externa da membrana das organelas, que está em contato com o citosol, é semelhante à face interna da membrana plasmática e a face interna da membrana das organelas é semelhante à parte externa da membrana plasmática (Figura 23).

A origem da mitocôndria e cloroplasto foi proposta por Lynn Margulis (1960). Segundo a hipótese simbiótica, a mitocôndria e cloroplasto surgiram a partir de um processo chamado de endossimbiose, no

qual algumas bactérias foram fagocitadas por células pré-eucariotas e estabeleceram um relacionamento mutuamente benéfico e irreversível. A mitocôndria foi originada a partir da simbiose de um organismo procarionto heterotrófico aeróbico com um pré-eucarioto, enquanto o cloroplasto originou a partir de procarionto autotrófico com um pré-eucarioto. Em ambos os casos posteriormente ocorreu uma dependência mútua (Figura 24).



24

Figura 24 – Origem da mitocôndria.

Essa hipótese tem embasamento em algumas evidências, como por exemplo, o DNA da mitocôndria e do cloroplasto é circular, semelhante ao bacteriano e diferente do DNA nuclear, que é linear. Outra evidência está na composição das membranas, a interna é semelhante à membrana plasmá-

tica bacteriana e a membrana externa é semelhante à membrana plasmática de eucarioto. Além disso, essas organelas possuem ribossomos próprios, que são semelhantes aos ribossomos das bactérias e diferentes dos ribossomos do citoplasma da célula eucariota.

As explicações acima se referem à origem do primeiro ser vivo, que era unicelular. A partir dos seres unicelulares ocorreu a evolução até a formação dos multicelulares. É importante ressaltar que os organismos unicelulares exercem todas as funções vitais para a sua sobrevivência e perpetuação, já nos organismos multicelulares existe a diferenciação estrutural e funcional entre suas células.

Existem também aqueles organismos intermediários, que são unicelulares, mas vivem em colônias. Como é o caso das algas unicelulares *Chlamydomonas*, as células ficam ligadas apenas por filamentos citoplasmáticos. Nas algas do gênero *Pandorina*, várias células ficam envoltas numa massa coloidal e a colônia de *Volvox* chega a apresentar mais de 1000 células biflageladas, que apresentam divisão de trabalho - célu-

las somáticas e reprodutoras.

Existe também o exemplo de um protozoário unicelular, o *Dictyostelium discoideum*. Quando há presença de nutrientes no ambiente, esses organismos apresentam-se isolados. Contudo na ausência de nutrientes, cerca de 100.000 protozoários se unem e as células podem exercer diferentes funções. Com essa estratégia, esses organismos são capazes de sobreviver por dezenas de anos sem nutrientes.

A diferença básica entre os organismos unicelulares que vivem em colônia e os multicelulares é que estes são ligados entre si por uma matriz extracelular e adesões entre membranas. Provavelmente este foi o caminho evolutivo: seres unicelulares se reuniram em colônias e originaram os pluricelulares.



Capítulo 2

Técnicas de microscopias para estudo das células

Algumas células são vistas a olho nu, como por exemplo, a *Acetabularia*, uma alga unicelular marinha que pode chegar até 12 cm de comprimento, porém a maioria das células é de tamanho muito reduzido (5 a 20 μm). O tamanho mínimo, que pode ser observado a olho nu, é de 200 μm e o olho humano só consegue discriminar dois pontos separados por mais de 100 μm , por isso, para observar as células e suas estruturas internas é necessário utilizar um equipamento que forneça aumento e ao mesmo tempo nitidez da imagem.

O microscópio, do grego *mikro* (pequeno) e *skopein* (ver) foi construído no fim do século XVI. O primeiro microscópio a ser desenvolvido foi o microscópio óptico, atualmente existem diversos tipos e com diferentes funções, mas todos têm como objetivo o aumento e nitidez de imagem. Com o avanço das tecnologias e o aprimoramento dos microscópios foi possível conhecer novos detalhes da estrutura celular.

Microscopia de luz ou óptica

O microscópio óptico é o mais utilizado nas técnicas rotineiras de laboratório. A maioria dos microscópios ópticos fornece um aumento máximo de 1.000 vezes e através dele é possível observar estruturas de até 100 nm. As medidas mais utilizadas na microscopia é o micrômetro (μm) que corresponde a 1 mm/1000 e o nanômetro (nm), que corresponde a 1 μm /1000.

É importante ressaltar que para uma

boa imagem, além do aumento é necessária a nitidez da imagem, ou seja, a capacidade de observar estruturas muito pequenas e individualizadas. A olho nu é possível observar estruturas individualizadas se elas tiverem no mínimo 100 μm de distância e no microscópio de luz a 0,2 μm .

Tanto o aumento de imagem quanto a nitidez são fornecidos pelo conjunto de lentes, a ocular, objetiva e condensador. Além da parte óptica, o microscópio possui vários componentes responsáveis pelo suporte mecânico e iluminação. Os principais constituintes dos microscópios são:

- Pé ou base – sustenta todas as demais peças;
- Braço – liga a base à parte superior do microscópio;
- Platina ou Mesa – recebe o material (lâmina) para a análise. Ela possui o *charriot*, que permite o deslocamento da lâmina, e uma pinça, que serve para prender a lâmina;
- Cabeçote – suporta os tubos onde se localizam as oculares, escala de ajuste de dioptrias e da distância interpupilar;
- Revólver – suporta as lentes objetivas;
- Macrométrico – permite grandes avanços ou recuos da platina em relação às objetivas;
- Micrométrico – permite pequenos avanços ou recuos da platina em relação às objetivas;
- Oculares – lentes que fornecem aumen-

to;

- Objetivas - lentes que fornecem aumento e resolução da imagem estão presas no revólver. Geralmente os microscópios ópticos apresentam objetivas com aumentos de 4X, 10X, 20X, 40X e 100X;
- Condensador - lentes que concentram e tornam paralelo o feixe luminoso;
- Diafragma - controla a entrada de luz para o condensador;
- Filtro - converte a luz de halogênio em luz branca;
- Fonte de luz - lâmpada halógena;
- Seletor de intensidade luminosa - regula a intensidade da luz;

com o aumento de 400X, o campo será de 375 μm e com o aumento de 1000X o campo será de 150 μm . Por isso, antes de iniciar a análise da lâmina é necessário centralizar o material no campo de observação.

O poder de resolução de um microscópio é a capacidade deste em fornecer imagens nítidas. Ele é inferido de uma forma indireta, tendo como base o limite de resolução. Quanto menor o limite de resolução de um microscópio, maior o seu poder de resolução. O limite de resolução corresponde à menor distância que deve existir entre dois pontos, de modo que ainda apareçam individualizados na imagem formada pelo sistema de lentes. Ele é calculado pela seguinte fórmula:

Explicação dos dados de uma objetiva de 100X:

- 100 (aumento de 100 vezes)
- 1.25 (abertura numérica)
- 0.17 (espessura máxima da lamínula - que pode ser utilizada)
- oil (deve utilizar óleo de imersão).

Funcionamento básico do microscópio óptico

A imagem formada pelo microscópio óptico é maior e invertida em relação ao objeto. O aumento final da imagem é resultado do produto dos aumentos da objetiva e da ocular. Geralmente a ocular tem um aumento de 10X e o aumento das objetivas varia. Podendo ser de 4X, 10X, 40X e 100X, proporcionando aumentos de 40X, 100X, 400X e 1.000X, respectivamente.

Quanto maior o aumento, menor será a abrangência da área observada na lâmina (Figura 1), por exemplo: com o aumento de 100X o campo observado será de 1.500 μm ,

$$LR = K \cdot \lambda / AN$$

$$K = 0,61 \text{ (constante)}$$

λ = comprimento de onda (luz ou feixe de elétrons)

luz branca = 550 nm ou 0,55 μm

AN = $n \cdot \text{sen} \alpha$ (abertura numérica da objetiva). Este valor está na objetiva.

n = índice de refração do material que está entre a lamínula e a objetiva

Ar : 1, óleo de imersão: 1,52

α = metade do ângulo de abertura da objetiva

O valor da AN depende do índice de refração do material que está entre a lâmina e a objetiva. Para todas a objetiva o material é o ar, apenas para a objetiva de 100X o material deve ser o óleo de imersão. O fato do valor do índice de refração do óleo (1,52) ser maior que do ar (1,0), permite uma maior nitidez do material na objetiva de 100X, pois quanto maior o índice de refração, maior a AN, menor o limite de resolução e quanto menor o limite de resolução, menor pode ser a distância entre dois pontos para que eles apareçam individualizados.

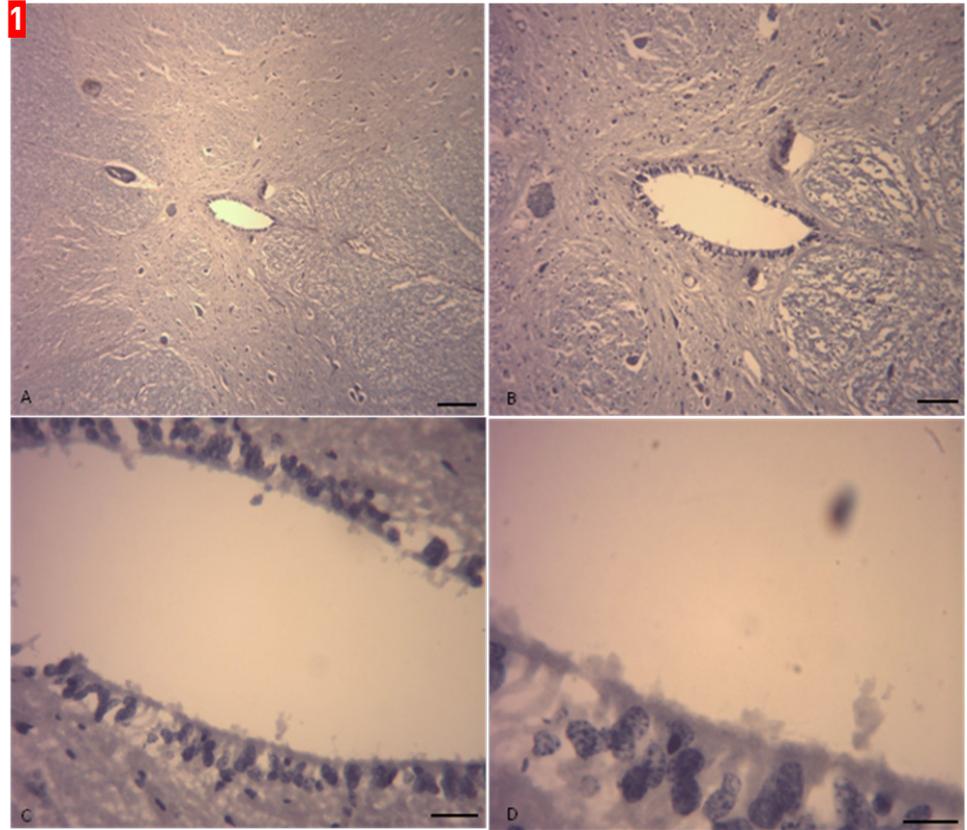


Figura 1 – Imagens da medula espinhal com diferentes aumentos. A) Objetiva de 4X, Escala: 100 μm ; B) Objetiva de 10X, Escala: 50 μm ; C) Objetiva de 40X, Escala: 10 μm e D) Objetiva de 100X. Escala: 5 μm

Microscopia de contraste de fase

Para estudar mais facilmente as células e os tecidos é necessário que haja um contraste de cor entre elas e o meio que as envolve. Esse contraste é gerado pela absorção ou refração dos raios de luz ao interagirem com as células, contudo elas são formadas por átomos de baixo peso molecular, que não oferecem grandes contrastes. Para obter esse contraste é necessário corar as células. Contudo existe um tipo de microscópio, microscópio de contraste de fase, que permite observar as células e tecidos sem coloração e até mesmo observar as células vivas.

O microscópio de contraste de fase pos-

sui um sistema de anéis metálicos, colocados no condensador e nas objetivas, esse sistema produz imagens visíveis de objetos transparentes. O sistema de anéis modifica a velocidade que a luz atravessa o material e essa diferença de velocidade é utilizada para fazer com que as estruturas pareçam mais claras ou mais escuras, pois quanto maior a densidade da estrutura, menor a velocidade da luz ao atravessar e consequentemente menor a refração.

Essa microscopia é utilizada para observação de células em cultura, esfregaços vaginais, sangue, bactérias, algas, protozoários, conteúdo estomacal de animais, materiais cerâmicos e outros produtos sintéticos.

Microscopia de fluorescência

A fluorescência é a capacidade de algumas substâncias em emitir luz visível ao ser irradiada por luz invisível ao olho humano. Alguns componentes celulares são naturalmente fluorescentes como a clorofila, lignina, elastina, colágeno, entre outros. Porém, outros componentes que não sejam fluorescentes podem se ligar a corantes fluorescentes (fluorocromos) e assim serem detectados na microscopia de fluorescência.

O microscópio de fluorescência possui lâmpada de mercúrio que transmite luz de comprimentos pequenos. Também possui dois filtros: um de excitação e um de barragem. O de excitação seleciona os fótons de comprimento determinado, esses atingem o objeto, que emite uma luz fluorescente. Tanto os fótons, quanto a fluorescência são transmitidos para a objetiva, porém o filtro de barragem permite apenas a passagem da luz da fluorescência, que têm comprimento maior. A imagem visualizada fluoresce contra um fundo escuro.

O microscópio de fluorescência permite identificar as substâncias natural e artificialmente fluorescentes. É muito utilizada na imunocitoquímica, como por exemplo, na técnica de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) (Figura 2).

Microscopia eletrônica de transmissão

O microscópio óptico aumenta a imagem até 1000 vezes, contudo não é possível observar com detalhes as estruturas e organelas intracelulares. Apenas o núcleo e cloroplastos são facilmente observados.

Para analisar estruturas menores que 200 nm é imprescindível o uso do microscópio eletrônico. Esse equipamento permite aumento de 120.000 vezes e, além do

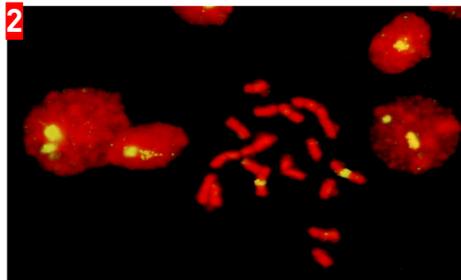


Figura 2 – FISH com sonda para rDNA em cromossomos de abelha *Melipona bicolor*. Escala: 5 μ m

maior aumento, este microscópio tem melhor definição de imagem que o microscópio óptico, pois apresenta um menor limite de resolução por utilizar feixes de elétrons (λ : 0,005mm) no lugar de feixes de luz da microscopia óptica (λ : 0,55 mm). O limite de resolução a olho nu é de 100 μ m, do microscópio óptico é de 0,2 μ m e do microscópio eletrônico é de 0,002 μ m.

Veja a comparação entre o que se pode observar com microscópio óptico e eletrônico (Figura 3).

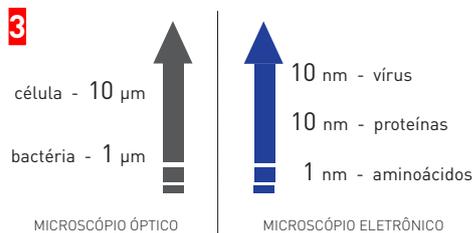


Figura 3 – Comparação entre a capacidade de aumento do microscópio óptico e eletrônico de transmissão.

A fonte envia os elétrons que passam por um condensador, atravessam o material a ser estudado, interagem ou não com esse material e são projetados sobre uma tela, filme fotográfico ou monitor.

A dispersão dos elétrons depende da espessura e densidade molecular do material e em especial do número atômico dos átomos que entram na composição do material. Como os átomos que compõem as células (CHON) possuem número atômico baixo, o material precisa ser impregnado

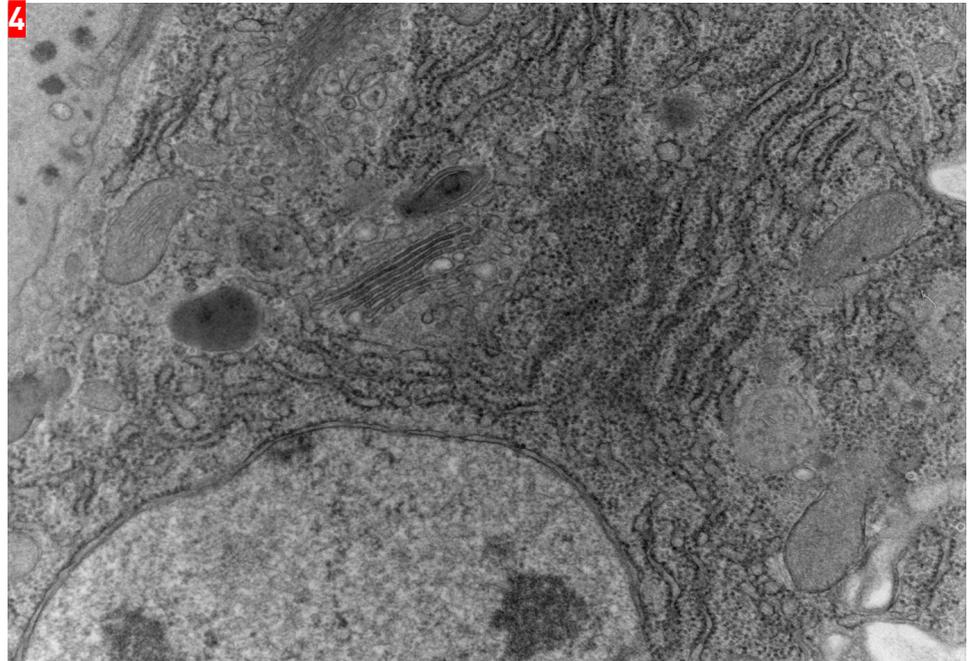


Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão de células da vesícula seminal de inseto *Diaphorina citri* (Hemiptera).

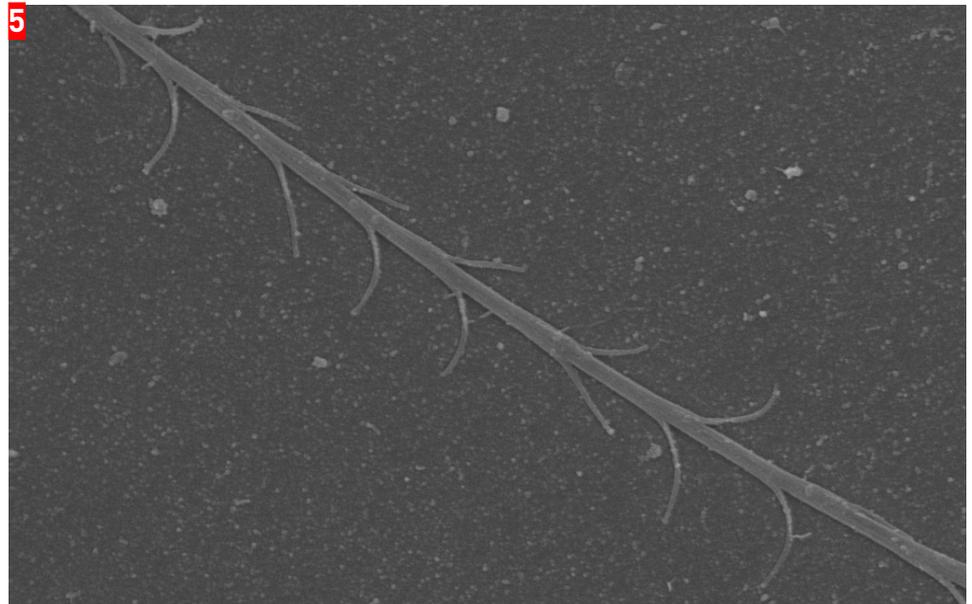


Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura de espermatozoide de inseto *Diaphorina citri* (Hemiptera).

com metais, estes se combinam seletivamente com determinadas estruturas celulares. Portanto os elétrons que interagem com regiões impregnadas por metais, formarão uma imagem escura (eletrodensa) e os elétrons que passam livremente pelo material formam uma imagem eletrolúcida (Figura 4).

O preparo do material é feito de forma diferente da microscopia óptica. Os cortes precisam ser bem mais finos, para isso a navalha utilizada é de vidro ou diamante. Não são utilizadas lâminas de vidro e sim grades de metal para suportar o material.

Microscopia eletrônica de varredura

É semelhante à microscopia eletrônica de transmissão, exceto pela sua função, pois revela as feições topográficas de uma superfície, portanto fornece imagens tridimensionais.

A amostra é vaporizada com ouro, os elétrons varrem o material, são refletidos pelos átomos de ouro e são capturados formando uma imagem tridimensional (Figura 5).

Existem outros tipos de microscopias que não serão tratadas nesse roteiro. ■

ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE TÉCNICAS DE MICROSCOPIAS PARA ESTUDO DAS CÉLULAS

◆ Atividade 1

Objetivo - Aprender a utilizar o microscópio óptico.

Procedimentos:

- 1 - Verificar se a objetiva de menor aumento (4x) está encaixada, se necessário utilizar o revólver para encaixá-la;
 - 2 - Verificar se a platina está abaixada, se necessário utilizar o macrométrico para abaixar;
 - 3 - Verificar se o condensador está na posição mais elevada,
 - 4 - Verificar se o diafragma está aberto;
 - 5 - Pegar uma lâmina histológica do laminário indicada pela professora;
 - 6 - Colocar a lâmina entre as presilhas da platina, verificar se a lamínula está voltada da cima;
 - 7 - Centralizar o material da lâmina no foco de luz;
 - 8 - Levantar a platina até visualizar o material e utilizar o micrométrico para pequenos ajustes no foco;
 - 9 - Caso necessário observar em aumento maior, utilize o revólver para mudar a objetiva e o micrométrico para fazer ajuste de foco;
 - 10 - Para utilizar a objetiva de 100X é necessário o uso de óleo de imersão. Após a focalização correta nas objetivas menores, deve-se adicionar uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e encaixar para a objetiva de 100X;
 - 11 - No final do uso do microscópio, deve-se encaixar a objetiva de menor aumento, abaixar a platina e desligar o microscópio. Caso tenha utilizado o óleo, a objetiva de 100X deve ser limpa com algodão e solução especial para limpeza.
- Inicialmente deve fazer os procedimentos de focalização considerando apenas para o olho direito, depois deve ajustar o foco para o olho esquerdo, girando a própria ocular esquerda. Cada pessoa tem uma distância entre os olhos, portanto deve-se ajustar a distância para uma melhor visualização distanciando ou aproximando as oculares.

◆ Atividade 2

Objetivo - Verificar a formação da imagem pelo microscópio óptico.

Procedimentos:

- 1 - Utilizar uma lâmina com uma letra colada (decalque);
- 2 - Colocar a lâmina na platina com a letra para cima conforme é lida;
- 3 - Observar no microscópio a imagem da letra com aumento de 40X.

Responda:

- A) Fazer um desenho esquemático da imagem vista no microscópio.

◆ **Atividade 3**

Objetivo – Verificar a orientação da imagem em relação ao objeto no microscópio óptico.

Procedimentos:

1 - Colocar uma lâmina histológica na platina e observar o que acontece com a orientação da imagem em relação ao objeto.

Responda:

A) O que acontece com a orientação da imagem em relação ao objeto quando movimentamos a lâmina para:

a esquerda? _____

a direita? _____

frente? _____

trás? _____

◆ **Atividade 4**

Objetivo - Verificar a relação entre aumento da imagem e área observada no microscópio óptico.

Procedimentos:

1 - Utilizar uma lâmina histológica e analisar com diferentes aumentos.

Responda:

A) Esquematizar a imagem formada com os aumentos de 40X, 100X e 400X.

Aumento de 40X

Aumento de 100X

Aumento de 400X

B - O que acontece com o campo de observação?

◆ **Atividade 5**

Objetivo - Conhecer os valores presentes no microscópio.

Procedimentos:

1 – Analisar os valores presentes nas oculares e objetivas do microscópio óptico

Responda:

Completar a tabela 1.

Dados: $k=0,61$, λ = comprimento de onda da luz branca= 0,55 mm. A abertura numérica e o aumento da ocular estão no próprio microscópio.

$$LR= K.\lambda / AN$$

Tabela 1 – Valores na microscopia óptica

Aumento da Ocular	Aumento da objetiva	Abertura numérica	Aumento total	Limite de resolução

B) Qual objetiva apresenta maior poder de resolução?

C) Qual objetiva apresenta maior limite de resolução?

D) Qual objetiva apresenta maior capacidade de fornecer nitidez?

E) Qual organela foi possível observar com esse microscópio?

◆ Atividade 6

Objetivo - Discutir as diferenças entre as imagens formadas por algumas microscopias.

Procedimentos:

1 - Observar as fotos obtidas por diferentes microscópios: óptico, contraste de fase, de fluorescência, eletrônico de transmissão e eletrônico de varredura.

Responda:

Qual o principal objetivo das seguintes microscopias?

1 - Contraste de fase:

2 - Fluorescência:

3 - Eletrônica de transmissão:

4 - Eletrônica de varredura:

Capítulo 3

Metodologias para estudo das células

Para uma análise detalhada é importante preparar adequadamente o material a ser estudado, que podem ser células isoladas, tecidos ou órgãos. Dependendo do objetivo, o material pode sofrer cortes (microtomia) (Figura 1A) ou não (Figura 1B, C, D, E, F), ser permanente, podendo durar anos (Figura 1A) ou ser descartado logo após a análise (Figura 1B, C, D, E).

Lâmina permanente com microtomia

Nas áreas de biologia celular e histologia é comum o uso de lâminas histológicas permanentes (Figura 1A). Quando o material de interesse (órgãos ou tecidos) não é fino, ele deve passar por um processo de microtomia.

Para a confecção dessas lâminas o material após ser coletado deve ser fragmentado em pequenos pedaços e imersos imediatamente em solução fixadora. A fixação evita o processo de degradação, seja por microrganismos ou pela própria célula (autólise). Ela permite manter a mesma organização estrutural apresentada *in vivo* e minimiza o aparecimento de detalhes que não sejam da estrutura normal do tecido (artefatos de técnicas). Os principais fixadores utilizados são o formol a 10% ou misturas fixadoras como o Bouin (formaldeído, ácido acético e ácido pícrico). Também existe a fixação por congelamento (criofixação) e por perfusão intravascular, em que os fixadores são injetados pelos vasos sanguíneos e assim alcançam os diferentes órgãos internos do

animal.

Outra questão relevante é quanto à espessura do material em estudo, pois para formar a imagem na microscopia óptica é necessário que a luz atravesse o material. Isso somente é possível se ele tiver uma fina espessura, portanto, é necessário que o órgão passe por um processo de microtomia.

É difícil fazer cortes finos diretamente nos órgãos, por isso coloca-se o órgão em solução que lhe proporcione consistência rígida, porém, que mantenha todas as suas características originais. Para microscopia óptica, um dos meios de inclusão mais utilizado é a parafina. Contudo, pelo fato da parafina não ser miscível com a água presente nos tecidos, o material passa por uma desidratação, que é realizada por banhos crescentes de etanol. A desidratação também tem como consequência o endurecimento do tecido.

Nesse estágio da técnica o material não tem mais água e o etanol passa a ocupar os espaços deixados pela água. Contudo a parafina ainda não é miscível com etanol, por isso é necessário fazer a diafanização, ou seja, usa-se um composto intermediário (xilol), que é miscível tanto com o álcool quanto com a parafina. Essa etapa também torna o fragmento transparente e por esse motivo é denominado de clarificação.

Após passar pelo xilol, o material é incluído em parafina, utilizando alta temperatura (58-60°C). O solvente (xilol) evapora e o seu lugar é ocupado pela parafina. No final do processo o material é incluído em

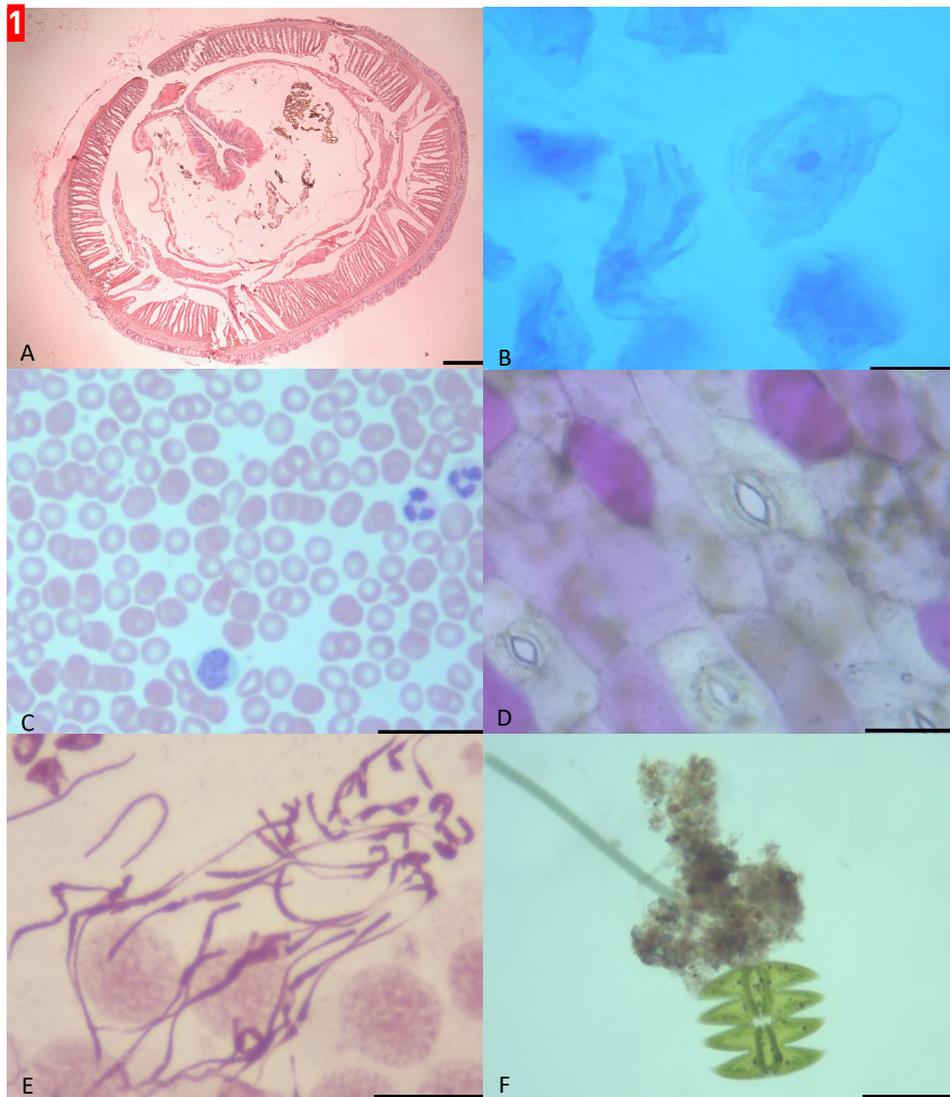


Figura 1 – A) Lâmina permanente com microtomia, corte transversal da minhoca *Eisenia andrei* – Escala: 100 μ m; B) Espalhamento da mucosa bucal humana corado com azul de metileno – Escala: 5 μ m; C) Esfregaço sanguíneo humano – Escala: 10 μ m; D); Distensão a fresco da epiderme vegetal de *Tradescantia* sp. – Escala: 50 μ m; E) Esmagamento da vesícula seminal de minhoca *Eisenia andrei* corado com orceína acética – Escala: 5 μ m; F) Preparo a fresco da água de lago com organismos microscópicos – Escala: 50 μ m

um molde contendo a parafina em estado líquido, que ao solidificar forma um bloco (emblocamento).

O material incluído em parafina passa pelo processo de microtomia, no qual é utilizada lâmina de aço ou vidro que produz cortes de 1 a 10 μ m. Após a microtomia, o material, ainda envolvido pela parafina, é

colocado sobre a superfície de água com álcool para distender, depois é transferido para solução de gelatina aquecida onde se mergulha uma lâmina por baixo do material, para que ele fique aderido na lâmina. O material é colocado em estufa para que ocorra a secagem e sua total adesão à lâmina.

Nesse estágio do processo o material ainda não está pronto para ser observado, pois os constituintes das células possuem baixo peso molecular e por isso o contraste entre eles é imperceptível via microscopia óptica. Para promover um contraste utilizam-se diversos métodos de citoquímica, geralmente usa-se um corante que rea-

ge com o substrato celular de carga iônica oposta. Por exemplo, um corante aniônico (eosina) que combina com substância catiônica (proteína) e corantes catiônicos (hematoxilina) combinam com substâncias aniônicas (DNA, RNA). Como a maioria dos corantes não é miscível em parafina é necessário retirá-la do material. Para isso a

Fase	Objetivo	Procedimentos
Obtenção do material	Coletar material de interesse (animal ou vegetal).	Isolar o órgão e manter em solução fisiológica (mesmo pH do órgão), geralmente é utilizado o cloreto de sódio 0,9%
Fixação	Impedir a autólise ou a destruição por microrganismos, estabilizar as estruturas celulares e extracelulares, endurecer os tecidos.	Imergir o órgão imediatamente após a sua retirada em fixadores ou proceder a técnica de congelamento (criofixação) ou realizar a perfusão do animal. Nesse ponto são feitos cortes no órgão para que a fixação seja mais eficiente.
Desidratação	Retirar água para o solvente penetrar e fazer a interface com a parafina.	Banhos com concentrações crescentes de etanol.
Diafanização ou clarificação	Impregnar o tecido com um solvente da parafina	Imergir o tecido em solvente (xilol)
Inclusão	Facilitar a obtenção de cortes finos	Imergir o órgão em solução de parafina
Emblocamento	Colocar em um molde	Colocar em moldes, preencher com parafina e esperar endurecer.
Microtomia	Fazer cortes finos (5 a 12 μm)	Fazer os cortes utilizando o micrótomo
Distensão do corte	Distender o corte em solução de água/álcool e/ou gelatina e "pescar" em uma lâmina histológica	Distender o corte para melhor visualização da topografia do órgão
Secagem	Secagem do material em estufa	Ajuda a aderir o corte na lâmina (por desnaturação das proteínas da gelatina) e elimina a água
Coloração	Aumentar artificialmente o contraste entre as estruturas celulares	Imergir as lâminas em solução de coloração. Porém antes disso deve-se eliminar a parafina com banhos de xilol e fazer uma reidratação
Montagem	Preservar o material corado	Cobrir o corte com uma lamínula, utilizando uma resina de montagem. Porém antes desse passo deve-se desidratar e diafanizar

Tabela 1 – Resumo dos principais passos para obtenção de lâmina permanente por microtomia

lâmina com o material é mergulhado em xilol, posteriormente reidratado e então corado.

Para proteger o material na lâmina é necessário colocar uma lamínula de vidro. Para tal, o material na lâmina tem que ser desidratado e passar pelo xilol, pois o meio de montagem não é miscível com a água presente no material. Geralmente usa-se o Bálsamo do Canadá ou Entelan para fazer a montagem da lâmina e lamínula.

Outra forma de preparo do material é por fixação física, nessa metodologia o órgão é rapidamente congelado com o nitrogênio líquido após ser retirado do animal. O micrótomo para fazer os cortes histológicos é especial (criostato) e todos os materiais utilizados também devem estar em baixa temperatura. As vantagens dessa fixação é que evita vários passos, por isso é mais rápida, podendo ser utilizada durante procedimentos cirúrgicos para análise histopatológica. Ele também preserva as enzimas e lipídios.

Resumidamente o preparo das lâminas de tecidos animais espessos pode seguir os passos descritos na Tabela 1.

Além da microtomia existe a ultramicrotomia, que é utilizada no preparo de material para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Os produtos utilizados são diferentes, como por exemplo, os fixadores que podem ser soluções contendo glutaraldeído e tetróxio de ósmio. A desidratação pode ser realizada com acetona ou óxido de propileno. A inclusão é feita em resina epoxi. Os cortes para microscopia eletrônica são de 250 a 400 nm, utilizando-se navalha de diamante, os cortes são coletados sobre tela de cobre. Para a contrastação, geralmente são utilizados metais pesados para acentuar as diferenças de densidade das estruturas, gerando imagens elétron-densas ou elétron-lúcidas.

Lâmina temporária sem microtomia

Como foi citado a microtomia nem sempre é necessária. É possível fazer preparações em que o material biológico recentemente obtido é preparado de forma mais simples e rápida. Quando não há cortes é possível observar células inteiras e medir o conteúdo da mesma. Porém, inter-relações das células do tecido não são respeitadas. A seguir alguns exemplos dessas técnicas.

Espalhamento

Inicia-se com a raspagem de mucosas, como a bucal (Figura 1B), anal ou uterina com auxílio de uma espátula. Depois se espalha o material coletado sobre a lâmina, ele é fixado e corado. Nessa técnica nem sempre a forma da célula é preservada, contudo é possível medir o volume celular e a quantidade de certas moléculas, como por exemplo, o DNA. Uma técnica de espalhamento muito utilizada é o Papanicolau realizado como prevenção ao câncer do colo do útero. Devido à forma de se obter o material nessa técnica, muitas vezes ela é erroneamente chamada de esfregaço.

Esfregaço

Essa técnica é aplicada para estudar células presentes em fluidos como sangue (Figura 1C), sêmen ou linfa. A técnica se resume em esfregar o material coletado sobre uma lâmina com auxílio de outra lâmina. É importante que se forme uma fina camada, caso contrário ficará célula sobre célula dificultando a análise. Depois o material é fixado e corado.

Distensão

Também conhecida como montagem total, essa técnica é utilizada para estudar material fino ou transparente, como membranas fetais, órgãos de insetos, mesentério ou epiderme vegetal. A técnica se resume em distender o material coletado sobre a lâmina, fixar e corar. No caso de epiderme vegetal não é necessário fazer a coloração quando as próprias células já apresentam pigmentos (Figura 1D).

Esmagamento

O esmagamento é uma técnica utilizada para estudo de tecidos com alta taxa de divisões celulares e tecidos mais 'moles' como raiz de planta, testículo ou glândulas de invertebrados (Figura 1E). A técnica consiste

em esmagar o material entre a lâmina e lamínula. A coloração pode ser concomitante ao esmagamento ou posterior, neste caso a lamínula pode ser retirada com o auxílio de nitrogênio líquido.

Preparo a fresco

Essa técnica é metodologicamente simples e não exige nenhum tipo de reagente. Basta pingar uma gota do material em estudo (água de lagos, lagoas, rios, ou até mesmo, organismos em culturas) na lâmina e cobrir com lamínula (Figura 1F, 2).

Ela é uma das técnicas que mais atrai os estudantes, devido à diversidade e beleza dos organismos que podem ser observados. Utilizando essa técnica é possível fazer análise comparativa da diversidade de organismos encontrados em diferentes habitats. ■

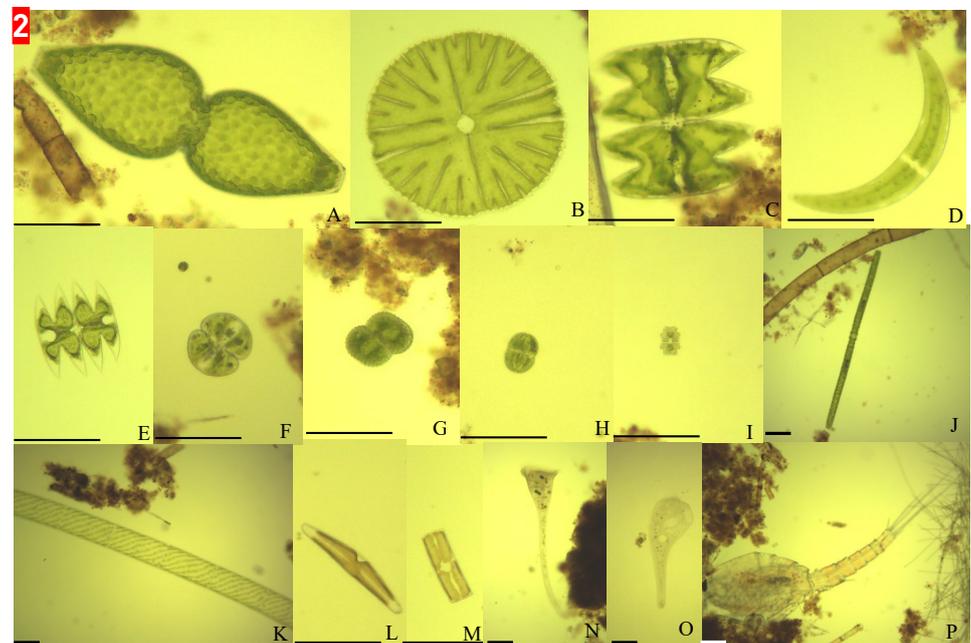


Figura 2 - Organismos presentes na água de um lago de Pelotas/RS. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e K são microalgas, L e M são diatomáceas, N e O são protozoários e P é um microcrustáceo. Escala maior: 50 µm e Escala menor: 10 µm

- 2 - Fazer uma suave raspagem na mucosa bucal, com um palito de fósforo;
- 3 - Colocar o material colhido primeiramente sobre a gota de solução salina, fazer uma nova raspagem e colocar o material sobre a gota do corante;
- 4 - Cobrir cada gota com uma lamínula, sem deixar encostar uma lamínula na outra;
- 5 - Observar com objetivas de 10X e 40X. Regular o diafragma e o condensador para analisar material não corado.

Responda:

A) Esquematizar as células epiteliais.

B) A visualização das células foi mais fácil com ou sem a coloração? Qual a importância da coloração?

C) Por que se utilizou solução salina 0.9%?

D) Analisar a lâmina L1 e comparar o mesmo tipo celular visto na lâmina de espalhamento. Esquematizar células epiteliais de revestimento da mucosa bucal.

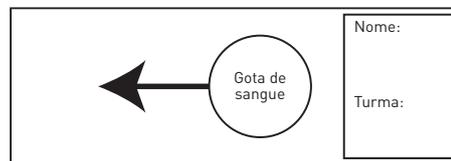
E) Qual o tipo de informação que é possível obter a partir do espalhamento que não é possível através da lâmina permanente L1?

◆ Atividade 3

Objetivos: Aprender a técnica de esfregaço; Observar diferentes formas de núcleos; caracterizar diferentes tipos celulares do sangue; aprender utilizar a objetiva de Imersão (100X).

Procedimentos

- 1 - Identificar uma lâmina com seu nome (escrever na parte fosca);
- 2 - Desinfetar o dedo com algodão embebido em álcool 70%;
- 3 - Fazer uma punção digital, ou seja, perfurar o dedo anelar com uma microlanceta;
- 4 - Colocar uma gota de sangue a aproximadamente 1 cm da extremidade da lâmina;
- 5 - Colocar outra lâmina em ângulo de 45° sobre a lâmina, de modo que fique na frente da gota de sangue, aproximá-la até encostar-se à gota, permitindo que esta se espalhe;



- 6 - Deslizar a lâmina superior de forma que o sangue se espalhe uniformemente sobre a lâmina inferior;
- 7 - Secar o esfregaço rapidamente, agitando a lâmina no ar;
- 8 - Corar com 20 gotas de Corante Wright por 3 minutos;
- 9 - Pingar aproximadamente 20 gotas de tampão e aguardar por 5 minutos;
- 10 - Escorrer o corante e lavar rapidamente a lâmina com água;
- 11 - Secar a lâmina ao ar;
- 12 - Observar na objetiva de 4X, 10X e 100X (uso do óleo de imersão). Para utilizar a objetiva de 100X, após a focalização correta nas objetivas de 4X e 10X, deve-se pingar uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina, mudar para a objetiva de 100X e utilizar apenas o micrométrico para a focalização. Jamais passar a objetiva de 40X pelo óleo de imersão.

COLORAÇÃO PANÓPTICA DE WRIGHT

Corante Wright em pó	0,3g
Glicerina	3ml
Álcool metílico	97ml

TAMPÃO PARA WRIGHT pH 6,4

Fosfato de potássio primário	6,63g
Fosfato de sódio secundário	3,20g
Água destilada	1.000ml

◆ Atividade 4

Objetivos - Identificar diferentes eucariotos; fazer uma preparação 'a fresco' da água do lago; estimular a curiosidade, despertando o espírito científico dos alunos através de análise de diversos microrganismos da água de lago.

Procedimentos:

- 1 - Colocar uma gota de água de lago sobre a lâmina;
- 2 - Colocar a lamínula sobre o material. Retirar o excesso de água se for preciso;
- 3 - Focalizar com as objetivas de 4X, 10X e 40X. Caso necessário, feche o diafragma;
- 4 - Identificar e esquematizar os organismos encontrados segundo a morfologia, tamanho, a riqueza de membranas (procarioto ou eucarioto), quanto ao número de células (unicelular, unicelular formador de colônia, multicelular sem tecido verdadeiro, multicelular com tecido verdadeiro) e quanto à produção de compostos orgânicos (autotrófico ou heterotrófico).

Materiais Necessários

Água de lago
Lâmina
Lamínula
Pipeta Pasteur
Papel de filtro

Responda:

A) Qual a principal diferença entre células eucariotas e procariotas?

B) Os procariotos são menos 'eficientes' e menos 'evoluídos' que os eucariotos? Justifique sua resposta.

C) Quais os tipos de seres vivos que foram encontrados com maior frequência? Por que você acha que isso aconteceu?

◆ **Atividade 5**

Objetivos – Desenvolver a capacidade de abstração.

Procedimentos:

1 – Observar a apresentação lúdica e fazer a análise histológica.

Responda:

A) Esquematizar os cortes de um ovo cozido seccionado em diferentes planos.

B) Esquematizar o corpo do neurônio cortado em diferentes regiões, onde no corte seja possível ver o núcleo (A) e outro que o corte tenha sido fora da área do núcleo (B) (Lâmina G2 – Medula)

A

B

C) Esquematizar os cortes de uma cenoura seccionada em diferentes planos.

D) Esquematizar os cortes transversais e longitudinais de tecido muscular estriado esquelético. Indicar os núcleos – Lâmina L5 – Língua (HE)

Transversal

Longitudinal

E) Esquematizar os cortes de uma laranja seccionada em diferentes planos.

F) Esquematizar a forma de uma célula secretora e de um ácino na glândula salivar – Lâmina L9 (HE)

Célula

Ácino

G) Esquematizar uma glândula tubulosa simples do intestino grosso cortada longitudinalmente e transversalmente - Lâmina K5 (HE)

Transversal

Longitudinal

H) Esquematizar um corte da glândula tubulosa simples enovelada (glândula sudorípara) – Lâmina S2 – Pele espessa (HE)

Capítulo 4

Biomacromoléculas e citoquímica

Tanto os seres vivos quanto os elementos abióticos são compostos pelas mesmas unidades básicas, os átomos. Existem 92 tipos de átomos, sendo que os seres vivos são formados principalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio.

Os átomos são formados por um núcleo e órbitas. No núcleo localizam os prótons e nêutrons e nas órbitas, os elétrons. Cada órbita do átomo comporta um número determinado de elétrons, por exemplo: a primeira órbita comporta dois elétrons, a segunda e terceira, oito elétrons, a quarta e quinta, dezoito elétrons. Contudo muitos átomos possuem a última camada incompleta e para completá-la eles devem ganhar, perder ou compartilhar elétrons.

Na ligação iônica, o átomo ganha ou perde elétrons e se transforma em íon. Quando perde elétrons torna-se positivo,

denominado de cátion e quando ganha torna-se negativo, denominado de ânion.

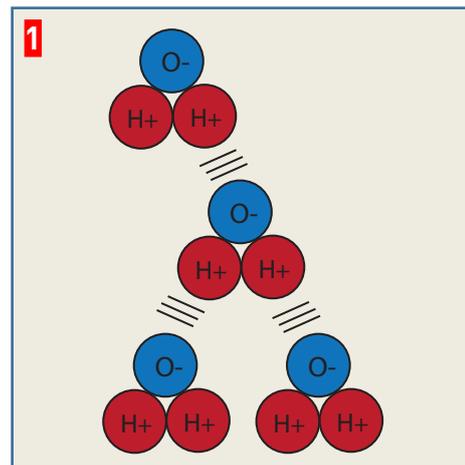
Nas ligações covalentes ocorre o compartilhamento de elétrons, que pode ser de forma desigual (polar) ou igual (apolar). Portanto na ligação polar a carga positiva está concentrada em uma extremidade e a negativa em outra; na apolar os elétrons são atraídos equitativamente para ambos os átomos. As ligações covalentes podem ser simples, quando cada átomo compartilha apenas um elétron com outro átomo diferente e a ligação dupla, em que há o compartilhamento de dois elétrons entre dois átomos.

Outro tipo de ligação muito comum é a ponte de hidrogênio. Esta ocorre entre um hidrogênio com um oxigênio ou nitrogênio. Na figura 1 é exemplificada uma ponte de hidrogênio entre moléculas de água. O hidrogênio está ligado ao oxigênio por uma ligação iônica, por isso, apresenta carga positiva e conseqüentemente o oxigênio apresenta carga negativa. A ponte de Hidrogênio é realizada entre um átomo de hidrogênio e o oxigênio de outra molécula de água (Figura 1).

Água

A vida surgiu na água e todos os seres vivos dependem dela para sobreviver. A água representa cerca de 80% das substâncias que compõem o corpo dos seres vivos. A quantidade de água nas células varia conforme o tipo celular, podendo alcançar 83%

Figura 1 – Pontes de Hidrogênio entre moléculas de água.



nos músculos e 25% nos ossos.

A água é composta por dois átomos de hidrogênio (H) e um de oxigênio (O). A disposição dos átomos não é linear, eles formam um ângulo. A ligação entre os átomos de H e O é do tipo covalente polar, onde o oxigênio atrai mais fortemente os elétrons, com uma zona positiva e outra negativa formando um dipolo (Figura 1).

Pelo fato da água ser tão importante, outras moléculas são classificadas conforme a sua afinidade com ela:

Moléculas hidrofílicas – possuem ligações polares, têm carga e formam pontes de Hidrogênio com a água;

Moléculas hidrofóbicas – possuem ligações apolares, não têm carga e não formam pontes de Hidrogênio com a água;

Moléculas anfipáticas – possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas

Açúcares

São hidratos de carbono (C:H:O = 1:2:1), possuem dois hidrogênios para cada carbono. Pode ocorrer ligação entre as diferentes moléculas de açúcar, essa ligação ocorre entre suas hidroxilas. Como existem várias hidroxilas livres, podem-se formar vários tipos de ligações, conseqüentemente existem

inúmeros tipos de carboidratos.

Dependendo da quantidade de moléculas interligadas são denominadas: monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos. Essas moléculas podem ser solúveis em água e utilizadas imediatamente como fonte de energia (monossacarídeos e dissacarídeos) ou serem insolúveis em água e por isso atuarem na composição estrutural das células ou no armazenamento de energia (polissacarídeos) (Tabela 1).

Lipídios

Os lipídios apresentam estruturas e funções muito divergentes entre si, mas compartilham uma característica, a baixa solubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos como o éter e o álcool.

Os lipídios mais encontrados nas células são os ácidos graxos, que são formados por uma molécula de ácido carboxílico (hidrofílico), associada a cadeias hidrocarbonadas (hidrofóbica). As cadeias podem ser saturadas (somente ligação simples) ou insaturadas (com duplas ligações) (Figura 2).

As duplas ligações determinam um dobramento das moléculas, que interferem na sua capacidade de compactação. A margarina é um exemplo de gordura saturada e o

NOME	TIPO	EXEMPLO DE LOCALIZAÇÃO	EXEMPLO DE FUNÇÃO
Ribose e desoxirribose	Monossacarídeo	RNA e DNA	Compõem o material genético que comanda as atividades celulares
Lactose	Dissacarídeo	Leite	Fonte de energia
Glicogênio	Polissacarídeo	Células animais	
Amido		Células vegetais	
Celulose	Polissacarídeo	Parede celular vegetal	Estrutural e proteção
Quitina		Parede celular dos fungos e exoesqueleto dos artrópodes	

Tabela 1 – Tipo e função de carboidratos celulares

(glicoproteína), metais (metaloproteína), ácidos nucléicos (nucleoproteínas) e pigmentos (cromoproteínas). As proteínas se diferenciam em número, na sequência de aminoácidos e grupamento prostético.

A estrutura funcional das proteínas é dada pelo seu dobramento ou níveis de organização. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos, a estrutura secundária é o resultado do dobramento e enrolamento do peptídeo, mantida por pontes de hidrogênio. Pode ser de dois tipos: cilíndrica (α hélice) ou folha dobrada (β pregueada). Já a estrutura terciária é resultado do dobramento da secundária. A estrutura quaternária ocorre quando várias estruturas terciárias se juntam.

A configuração nativa das proteínas (forma tridimensional das proteínas ativas) é mantida pelas seguintes forças de estabilização: ligações covalentes (ligação dissulfeto e peptídica), interação hidrofóbica e pontes de H.

As proteínas são de extrema importância para todos os seres vivos, elas apresentam várias funções como exemplificado na Tabela 2:

Ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos armazenam as informações hereditárias das células (DNA, RNA), depositam e transferem energia (ATP) ou atuam como enzimas (RNA-Ribozima, transcriptase reversa).

Estruturalmente os ácidos nucléicos são polímeros de nucleotídeos, que por sua vez são formados por uma base, um açúcar e um grupo fosfato (Tabela 3).

As bases dos ácidos nucléicos podem ser púricas (Adenina, Guanina) ou pirimídicas (Timina, Uracila, Citosina), o fosfato é originado de um ácido fosfórico e o açúcar é uma pentose. A numeração dos carbonos

Tipo	Função
Fibras	Estrutural
Enzimas	Catalisadoras
Hemoglobina	Transportadoras
Caseína	Nutritiva
Ferritina	Armazenamento
Actina	Contrácteis
Microtúbulos	Mobilidade
Anticorpos	Defesa
Hormônios	Reguladoras

Tabela 2 – Função das proteínas

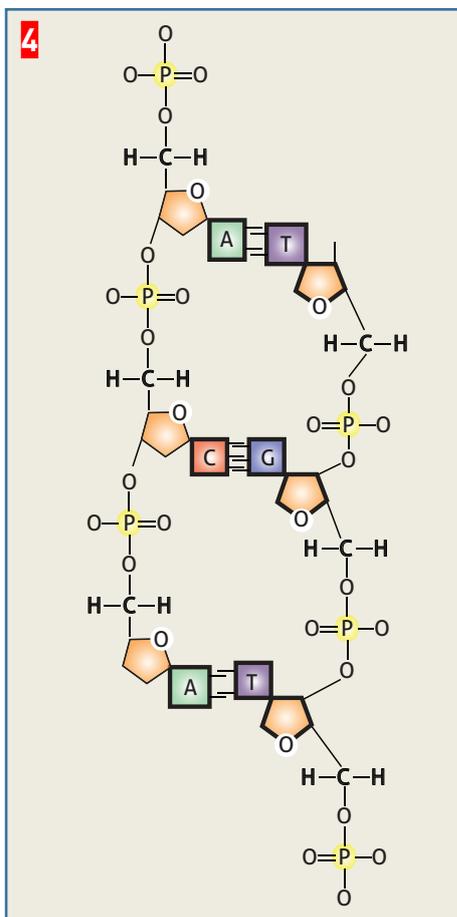


Figura 4 – Estrutura do DNA.

Tabela 3 – Esquemas dos constituintes do DNA

	Fosfato	Açúcar	Purina		Pirimidina		
			Guanina	Adenina	Citosina	Timina	Uracila
DNA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}-\text{P}=\text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}_5-\text{H} \\ \\ \text{C}_4 \quad \text{O} \quad \text{C}_1 \\ \quad \quad \\ \text{C}_3-\text{C}_2 \end{array}$					
RNA		$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}_5-\text{H} \\ \\ \text{C}_4 \quad \text{O} \quad \text{C}_1 \\ \quad \quad \\ \text{C}_3-\text{C}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$					

do açúcar é muito importante para entender a estrutura do DNA, ela inicia pelo carbono que faz uma dupla ligação com o oxigênio.

O DNA é uma dupla hélice, onde as fitas são antiparalelas e pareadas através das bases. O pareamento é devido às pontes de Hidrogênio entre os grupos ceto e amino e de amino e amino. Entre Adenina e Uracila existe uma ligação ceto e uma amino; entre Timina e Adenina são duas ligações amino; Entre Citosina e Guanina existem uma ceto e duas amino (Figura 4).

A base nitrogenada é ligada ao Carbono 1 da pentose e o fosfato é ligado ao Carbono 5 da pentose. Os nucleotídeos adjacentes são unidos por ligações entre fosfatos ligados ao C5 de uma pentose e ao grupo OH do C3 de uma pentose adjacente (Figura 4).

Os efeitos hidrofóbicos estabilizam o pareamento. As bases são forçadas pela água para o interior da dupla hélice, mas os sítios hidrofílicos ficam expostos nas cavidades. As forças de Van Der Waals fazem a manutenção da dupla hélice, devido ao empilhamento das bases.

O DNA pode apresentar forma circular, nos plasmídeos, alguns vírus, bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, ou linear, presente nos eucariotos.

Os principais tipos de RNA são:

Mensageiro – contém a informação genética que determina o tipo de polipeptídeo que será traduzido. É um intermediário entre o DNA e a proteína;

Ribossômico – juntamente com proteínas compõe os ribossomos, que serve de apoio para a síntese proteica;

Transportador – identificam e transportam os aminoácidos até os ribossomos.

Evidenciação das biomacromoléculas - citoquímica

As biomacromoléculas das células podem ser detectadas através de técnicas especiais de coloração (citoquímica), nelas ocorrem reações específicas entre certos tipos de substâncias e os componentes celulares, o que resulta em produtos detectáveis ao microscópio.

A citoquímica estuda os elementos celulares: ácidos nucléicos, proteínas, lipídios, açúcares e íons. O produto da reação citoquímica sempre apresentará uma determinada cor ou formará a partir de um precipitado insolúvel no local da reação. Para tal é necessário que haja uma reação específica entre o corante e os elementos a seres estu-

dados (substrato). As reações ocorrem por meio de ligações eletrostáticas, covalentes ou interações hidrofóbicas.

Um exemplo de ligação eletrostática é a basofilia e acidofilia, onde um substrato e corantes de cargas opostas se ligam por ligações eletrostáticas. O *Fast Green* e a Eosina são exemplos de corantes aniônicos que se ligam geralmente ao grupo amino das proteínas. O Azul de toluidina, Azul de metileno e Hematoxilina são exemplos de corantes catiônicos, e se ligam no grupo fosfato (PO_4^-) dos ácidos nucléicos, nos grupos SO_4^- e SO_3^- das glicosaminoglicanas presentes na matriz e no grupo COO^-

das proteínas.

A principal coloração utilizada na microscopia óptica é a Hematoxilina e Eosina (HE), na qual os ácidos nucléicos são corados pela Hematoxilina (roxo) e as proteínas básicas do citoplasma são coradas pela eosina (rosa) (Figura 5A).

Entre as técnicas que se baseiam em ligações covalentes está o teste de Ácido Periódico-Schiff (PAS). O reativo de Schiff utilizado nessa técnica se liga à hidroxila dos açúcares, evidenciando glicogênio, amido, celulose e glicoproteínas. Na figura 5B (seta) as células caliciformes estão bem coradas, devido à riqueza de glicoproteínas.

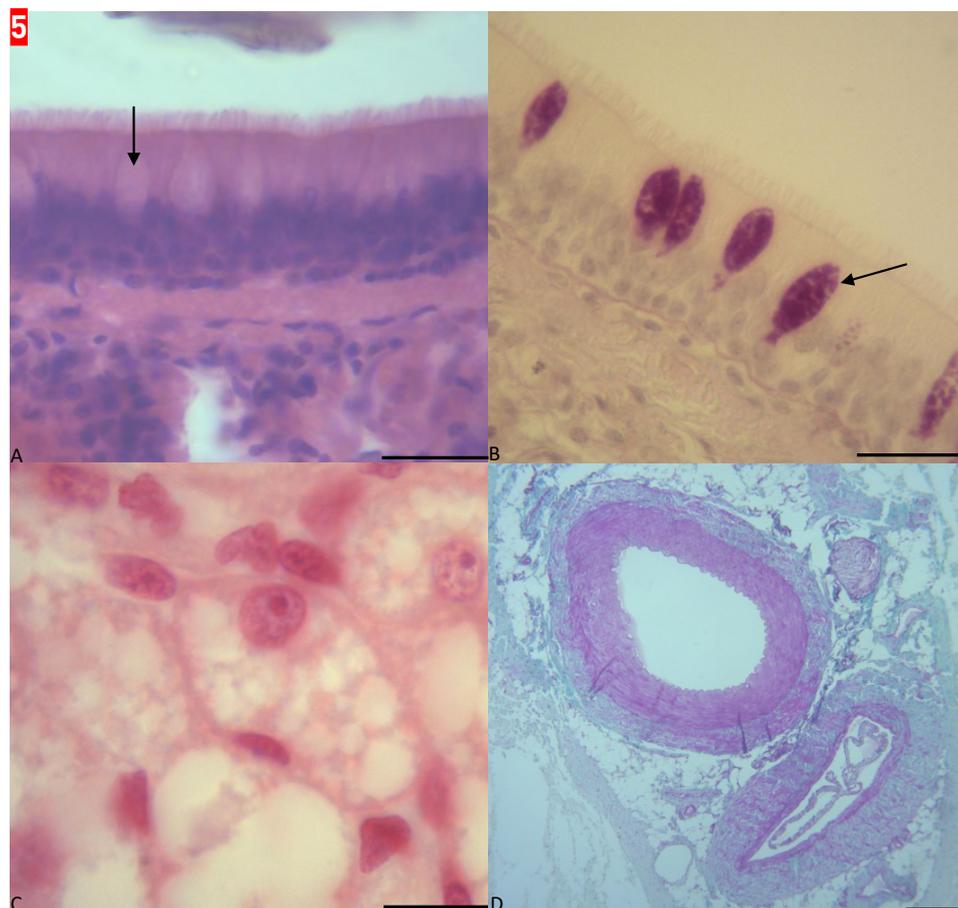


Figura 5 – Traqueia corada com A) Hematoxilina e Eosina e B) pela técnica de PAS (seta indica a célula caliciforme); C) Adipócitos multiloculares corados com Hematoxilina e Eosina e D) Artéria e veia de médio calibre corado pelo Tricrômico de Masson. A, B e C Escala: 10 μm ; D Escala: 100 μm

Enquanto que na figura 1A, coloração com HE, a mesma célula apresenta citoplasma fracamente corado, pois esta técnica não evidencia o produto de secreção da célula, a glicoproteína.

Para localizar lipídios apolares, o material não pode ser incluído em parafina e usar corantes que interagem com lipídios por interações hidrofóbicas. Como por exemplo, o *Sudan black* e azul de Nilo. Quando o material sofre o processamento descrito acima para preparo de lâmina permanente,

os lipídios presentes nas células são 'perdidos' durante a técnica e após a coloração com Hematoxilina e Eosina apenas espaços vazios são observados (Figura 2C).

As colorações tricômicas, como as de Masson (Figura 2D), Mallory e Gömori também se baseiam em ligações covalentes. Elas demonstram diferencialmente os tecidos conjuntivos (em azul) dos demais.

Existem outras técnicas utilizadas para o estudo das células e tecidos que não estão descritas nesse livro.



ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE BIOMACROMOLÉCULAS E CITOQUÍMICA

♦ Atividade 1

Objetivos - Comparar células caliciformes da traqueia submetidas a duas técnicas citoquímica diferentes (HE e PAS) e analisar vesículas ou grânulos; Reconhecer a estrutura de uma célula secretora.

Procedimentos:

1 - Analisar as laminas C1 e C4.

Responda:

A) Esquematizar o tecido epitelial e indicar o núcleo. Nas células caliciformes indicar o local das vesículas de secreção ou vesículas de mucina.

Lâmina C1 (HE)

Lâmina C4 (PAS)

B) Qual a natureza da secreção das células caliciformes?

C) As vesículas da célula caliciforme ficaram mais evidentes em qual técnica? Por quê?

◆ **Atividade 2**

Objetivos - Observar células do pâncreas submetidas a duas técnicas citoquímica diferentes (HE e Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory) e analisar as vesículas ou grânulos de zimogênio; Reconhecer a estrutura de uma célula secretora.

Procedimentos:

1 - Analisar as laminas K7 e A4.

Responda:

A) Esquematizar o tecido, indicar o núcleo e o local das vesículas de secreção e a região de retículo endoplasmático rugoso.

Lâmina K7 – Pâncreas (HE)

Lâmina A4 - Pâncreas (Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory)

B) Qual a cor do núcleo? Ele foi corado, principalmente por qual corante?

C) Qual a cor dos grânulos de zimogênio? Ele foi corado, principalmente por qual corante?

D) Qual a cor do retículo endoplasmático rugoso? Ele foi corado, principalmente por qual corante? Por quê?

◆ **Atividade 3**

Objetivos - Compreender o comportamento químico da gordura diante as técnicas citoquímicas; Identificar inclusões de gordura nos adipócitos multilocular - Lâmina I5- Periferia do Timo (HE) e unilocular B7 - Gordura (HE)

Procedimento:

1 - Analisar as lâminas I5 E B7

Responda:

A) Esquematizar os adipócitos e indicar os núcleos e as inclusões.

Laminas I5 (Periferia do timo - HE)

Laminas B7 (Gordura - HE)

B) As inclusões foram coradas? Por quê?

C) Quais são os procedimentos adequados para identificar gordura?

◆ **Atividade 4**

Objetivo - Diferenciar os grânulos das células sanguíneas conforme sua afinidade pela coloração Wright.

Procedimentos:

1 – Analisar a lâmina de esfregaço.

Responda:

A) Quais as cores dos grânulos dos:

Eosinófilos: _____

Basófilos: _____

Neutrófilos: _____

◆ **Atividade 5**

Objetivo - Identificar a queratina

Procedimentos:

1 – Analisar a lâmina S2 da pele espessa (HE)

Responda:

A) Em qual tecido foi mais fácil identificar a queratina? Justifique sua resposta.

Capítulo 5

Biomembranas

As biomembranas são encontradas em todos os seres vivos, sendo que os procariontos apresentam apenas uma membrana, que é a membrana plasmática. Os eucariotos além da membrana plasmática, apresentam um rico sistema de endomembranas.

O fato de estar presente em todos os seres vivos demonstra a sua grande importância, como por exemplo, ser o primeiro local de contato da célula com o seu meio externo. Por isso, ela é importante para manter a homeostasia, selecionando a entrada e saída das moléculas. Sem essa troca, a célula não sobrevive, pois ela precisa receber nutrientes, gases, sais, sinalizadores químicos e eliminar os produtos residuais de seu metabolismo. A membrana também é importante para detectar alterações elétricas e a presença de moléculas sinalizadoras em suas imediações, como fatores de crescimento celular, hormônios e nutrientes.

Além disso, nos organismos unicelulares a membrana plasmática é fundamental na percepção dos predadores, localização de nutrientes, entre outras. Já para os multicelulares, a membrana plasmática exerce papel fundamental nos processos de reconhecimento, adesão e comunicação celular. Em outro nível, ela é importante na absorção de nutrientes no sistema digestório, para trocas gasosas no respiratório e percepção dos sentidos como olfato e tato. Um bom exemplo ocorre pela ingestão de medicamentos, cujo efeito no organismo só ocorre após sua entrada na célula passando

do pela membrana plasmática e às vezes ultrapassando a membrana das organelas para agir no interior das mesmas.

A membrana plasmática, assim como a membrana das organelas, é muito delgada e a sua espessura (5 a 10nm) está abaixo do limite de resolução do microscópio óptico (até 200nm), nesse tipo de microscopia é possível determinar apenas o local onde a membrana plasmática se encontra por isso o termo mais correto utilizado é 'limite celular'. É mais fácil determinar os limites celulares nas células vegetais, devido à presença da parede celular que fica adjacente à membrana plasmática (Figura 1A). Enquanto que nas células animais nem sempre os limites são perceptíveis devido à similaridade de cor entre o citoplasma e a matriz extracelular ou ao fato das células estarem muito próximas (Figura 1B). A membrana plasmática pode ser observada por microscopia eletrônica, que apresenta maior poder de resolução (Figura 1C).

Constituição química

As membranas são formadas por uma bicamada lipídica e por proteínas, sendo que existe normalmente cerca de 50 moléculas de lipídios para cada proteína. Contudo a quantidade e qualidade de proteínas e lipídios de uma membrana variam conforme o tipo celular ou até mesmo, entre as organelas, o que reflete diretamente na função daquela membrana específica. Por exemplo, a bainha de mielina que envolve os axônios, é

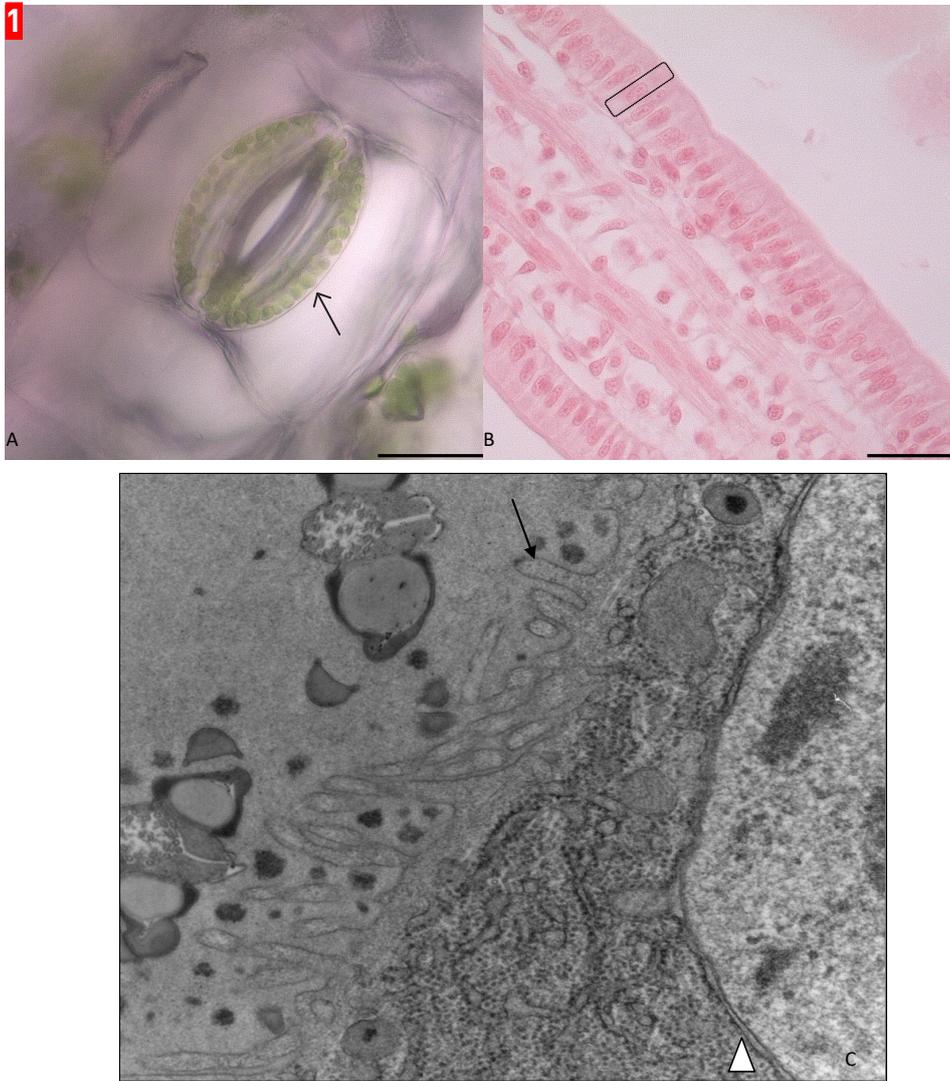


Figura 1 – A) Estômato com duas células-guarda que apresentam cloroplastos discóides (seta indica a parede celular); B) célula animal corada com Hematoxilina eosina (linhas indicam os limites celulares de enterócito - Escala: 10 μm); C) Células da vesícula seminal de inseto *Diaphorina citri* (Hemiptera) [seta indica a membrana plasmática e cabeça de seta indica envoltório nuclear].

formada por aproximadamente 75% de lipídios.

Dependendo da técnica utilizada, quando se prepara uma lâmina de um nervo ou da substância branca do sistema nervoso central, observa-se um 'espaço branco' ao redor do axônio (Figura 2, asterisco). Esse 'espaço' corresponde aos lipídios da mem-

brana plasmática das células que formam a bainha de mielina. Durante o preparo da lâmina ocorre perda desses lipídios, pelo fato de se utilizar solventes orgânicos e calor.

Os lipídios são formados por moléculas muito diferentes, mas todas são insolúveis na água e solúveis em solventes orgânicos. Os lipídios de membrana mais abundantes

Figura 2 – Substância branca evidenciando o local da bainha de mielina (asterisco). Escala:5µm

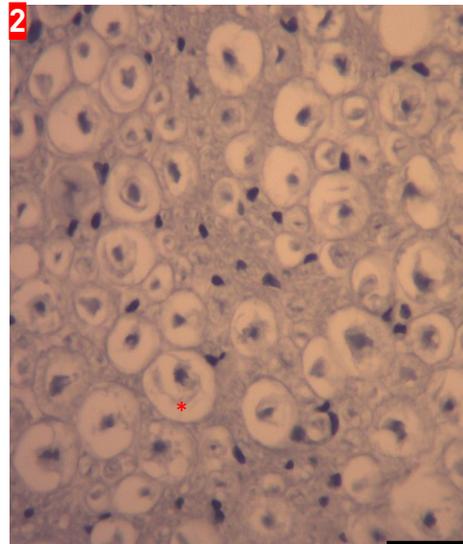


Figura 3 – Esquema dos lipídios anfipáticos de membrana.

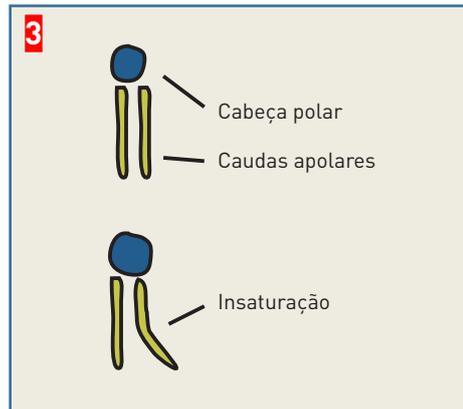
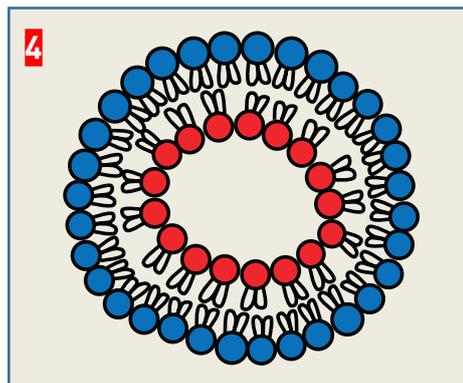


Figura 4 – Interações dos lipídios de membrana.



são os fosfolipídios, que são anfipáticos, ou seja, formados por uma cabeça polar e duas caudas apolares, podendo ou não apresentar insaturações (Figura 3).

Não existem ligações fortes entre os lipídios da membrana, as moléculas de lipídios são comprimidas umas contra as outras devido à repulsão que sofrem pela água presente no meio que as envolve, esse fenômeno é denominado de interação hidrofóbica. Quando os lipídios anfipáticos estão em ambiente aquoso, o arranjo energeticamente mais favorável é a formação de bicamadas sem bordas livres (círculos), para evitar o contato da porção hidrofóbica com a água (Figura 4).

Por não haver ligações químicas fortes entre os lipídios da membrana, pode ocorrer a movimentação dos componentes da membrana, como as proteínas e lipídios. Outro fator que influencia o movimento e que facilita o transporte é o número de insaturações presentes entre os lipídios (Figura 3). Quanto mais insaturações presentes nos lipídios da membrana, maior a sua fluidez e mais facilmente vai ocorrer o movimento das moléculas. A fluidez da membrana permite que ela cresça, mude de forma e, quando é perfurada, as partes separadas rapidamente voltem a se ligar.

Interagindo com a bicamada lipídica estão as proteínas, que podem ser de diferentes tipos. Geralmente as diferenças nas proteínas das membranas das organelas são responsáveis por fazer com que as organelas sejam diferentes entre si. As proteínas apresentam várias funções como a função estrutural, de transporte e também podem atuar como receptores de membrana.

Conforme sua interação com os lipídios as proteínas podem ser classificadas como proteínas extrínsecas (ou periférica) ou proteínas intrínsecas (ou transmembrana). As proteínas intrínsecas atravessam a

bicamada lipídica, uma vez (unipasso) ou várias vezes (multipasso). Este tipo de proteína possui porções hidrofóbicas, formadas por aminoácidos hidrofóbicos, que ficam em contato com o interior hidrofóbico da bicamada lipídica. Contudo, as proteínas intrínsecas não se limitam apenas ao interior da bicamada lipídica, parte delas atravessa a bicamada lipídica, ficando em contato com o citoplasma ou a matriz extracelular. As proteínas extrínsecas não interagem com a região hidrofóbica da bicamada lipídica, apenas com as partes hidrofílicas das proteínas intrínsecas ou dos lipídios e a outras proteínas extrínsecas (Figura 5).

Outro componente químico muito importante nas biomembranas é o carboidrato, que corresponde à porção glicídica dos glicolipídios e das glicoproteínas (oligosacarídeos) e proteoglicanas (polissacarídeos). Geralmente essas moléculas se encontram na face não citoplasmática das células e estão ligadas externamente a outras glicoproteínas e proteoglicanas secretadas pelas próprias células, formando uma estrutura conhecida como glicocálice (Figura 5). Essa estrutura tem como funções o reconhecimento celular; a adesão celular e a determinação do grupo sanguíneo, entre outras.

Junções celulares

Nos organismos multicelulares é fundamental a comunicação e união entre as células e dessas com o meio extracelular. Uma das estruturas que permite que a célula exerça essas funções é a junção de oclusão, ou oclusiva. Ela é formada por proteínas integrais (occludinas e claudina) de células adjacentes que se dispõem lado a lado formando 'cordões' de vedação e internamente está ligada ao citoesqueleto de microfilamentos de actina.

A espessura da membrana onde existem as zônulas de oclusão é menor que a espessura total das duas membranas separadas, o que leva a concluir que as proteínas de membrana dessa região formam uma estrutura semelhante a um 'zíper'. Essa junção pode formar um 'cinturão' ao redor das células epiteliais, sendo contínuo (zônula) ou descontínuo (faixas).

A junção de oclusão tem como funções: limitar a difusão passiva de íons e pequenas moléculas entre as células e manter a polaridade celular. Está presente nos epitélios de revestimento.

Outra estrutura que permite a adesão é a junção aderente, ela também é formada

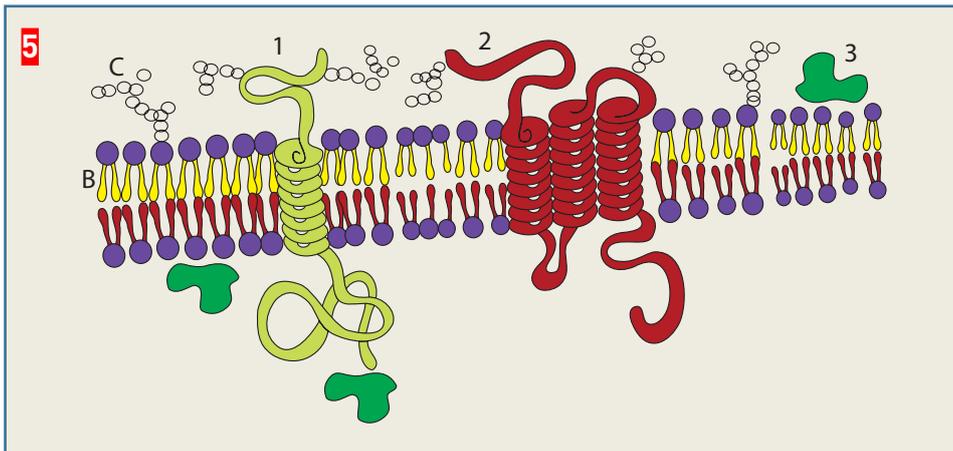


Figura 5 – Esquema de uma membrana biológica, mostrando a B) bicamada lipídica; C) carboidratos e proteínas 1) intrínseca unipasso; e 2) intrínseca multipasso; 3) extrínseca.

por proteínas integrais da membrana plasmática de células adjacentes. Essas proteínas são da família das caderinas e se ligam por pontes de cálcio. A sua porção citoplasmática também se liga indiretamente ao citoesqueleto de microfilamentos de actina. A junção de adesão forma um cinturão contínuo e/ou descontínuo abaixo da junção de oclusão das células epiteliais. Além da função de adesão, ela também é responsável por manter a polaridade celular e tem papel fundamental no reconhecimento celular, uma vez que as caderinas só interagem entre si homotipicamente.

Os desmossomos também têm como função a adesão intercelular, eles possuem estrutura semelhante à junção aderente, mas diferenciam-se nos tipos de proteínas que o formam e por estarem ligados internamente aos filamentos intermediários. Eles formam estruturas descontínuas, como 'botões' em torno das células e estão presentes em todos tecidos que sofrem atrito. É muito abundante na camada espinhosa da derme, que recebeu esse nome devido à presença de grande número de desmossomos observados na microscopia eletrônica.

Existem mais dois tipos de estruturas de adesão, a de adesão focal e o hemidesmossomo, ambas formadas por proteínas transmembranas do tipo integrina que se ligam internamente ao citoesqueleto e externamente à matriz. Sendo que a adesão focal está ligada internamente aos microfilamentos de actina e os hemidesmossomos aos filamentos intermediários. Além da função de adesão, são responsáveis por mediar à transdução de sinais da matriz para o interior da célula, que são importantes no processo de diferenciação celular, crescimento, apoptose, entre outros.

Diferentemente das estruturas citadas acima, as quais apresentavam funções de adesão e oclusão, a junção comunicante

tem como função a livre passagem de íons e moléculas pequenas como aminoácidos, nucleotídeos, monossacarídeos e alguns mensageiros químicos entre células adjacentes. Estão presentes em praticamente todos os tipos celulares, exceto células do sangue e espermatozoide.

A junção comunicante é formada por dois hemicanais, que por sua vez são formados por seis proteínas transmembranas (conexinas). Os hemicanais podem estar presentes na membrana plasmática de dois tipos celulares iguais (homocelulares), entre tipos celulares diferentes (heterocelulares), entre dobras e prolongamentos da mesma membrana plasmática (autocelulares) e entre organelas da mesma célula.

Essas junções são muito importantes na nutrição de células pouco vascularizadas, como o cristalino do olho.

Nas células que formam a bainha de mielina dos neurônios (as células de Schwann e os Oligodendrócitos) as junções comunicantes têm um papel fundamental na manutenção da estabilidade da bainha de mielina, pois servem como via interna para fluxo de íons, nutrientes e moléculas sinalizadoras, conectando os compartimentos citoplasmáticos periaxonal e perinuclear, diminuindo em torno de 1000 vezes a distância percorrida.

Outra função das junções comunicantes é a propagação de sinais químicos e elétricos, que ocorrem nos neurônios e células cardíacas. Neste caso, permitem que grupos celulares funcionem de modo coordenado e harmônico, formando um conjunto funcional.

Especializações de membrana

Algumas células podem apresentar especializações, que são expansões do citoplasma recobertas por membrana plas-

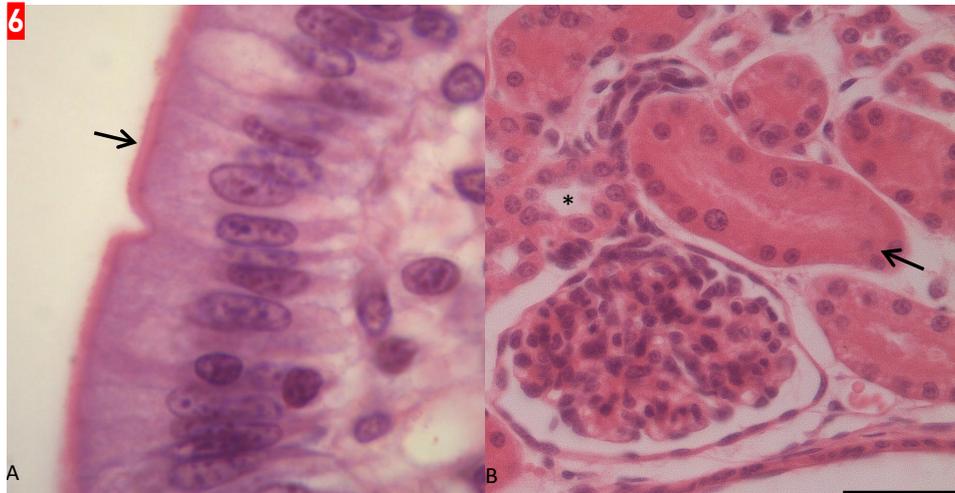


Figura 6 – A) intestino corado com HE, seta indica a região das microvilosidades; B) Rim corado com HE mostrando túbulo contorcido proximal (seta) e distal (asterisco). Escala:5 μ m

mática e contendo no interior algum tipo de citoesqueleto. Como por exemplo, as microvilosidades, os estereocílios, os cílios e os flagelos. As microvilosidades e os estereocílios contêm actina no interior e não apresentam movimento. Os cílios e flagelo contêm microtúbulos internamente e apresentam movimentos.

As microvilosidades têm como função aumentar a área de absorção e estão presentes nas células do intestino e rim, por exemplo, e as suas dimensões (2 μ m/0,1 μ m) não permitem que sejam observadas em microscopia óptica. Contudo é possível observar que a região apical das células do intestino se apresenta mais corada devido à presença dessas especializações (Figura 6A). Também é possível observar a diferença entre células do rim que possuem microvilosidades maiores [células do túbulo contorcido proximal] e células onde elas são menores [túbulo contorcido distal] (Figura 6B). No túbulo contorcido proximal não é possível ver a luz do túbulo, pois as microvilosidades estão ocupando esse espaço, já no distal é possível distinguir essa luz.

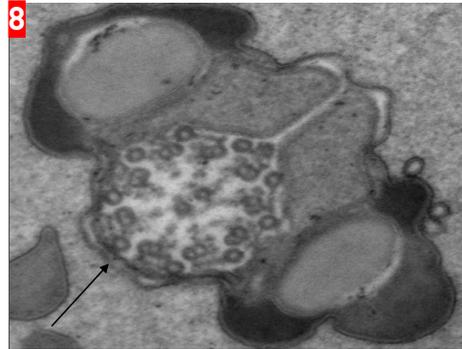
Os estereocílios são muito semelhantes às microvilosidades, porém são maio-

res e mais finos, alcançam até 10 μ m e por isso são mais perceptivos em microscopia óptica (Figura 7). São encontrados no ducto deferente e no epidídimo onde estão envolvidos com a modificação da composição do líquido em que ficam os espermatozoides durante a sua maturação. Eles também são encontrados nas células pilosas do ouvido externo, onde são importantes para geração de um sinal elétrico que é transmitido ao sistema nervoso central.



Figura 7 – Epidídimo corado com HE, seta indica os estereocílios. Escala:5 μ m

Figura 8 – Espermatozoide de inseto *Diaphorina citri* (Hemiptera) em corte transversal mostrando o axonema (seta).



Nos cílios e flagelos um feixe de microtúbulos se projeta do citoplasma a partir do corpúsculo basal (cinetossomo), que é uma estrutura igual ao centríolo. Os cílios e flagelos possuem internamente o axonema, que geralmente é formado por nove duplas periféricas de dois microtúbulos e uma dupla central (Figura 8).

A diferença básica entre cílios e flagelos é o tamanho e número por células. Os cílios variam de 0,2 a 10 μm e podem ocorrer até 250 unidades por células. O flagelo é bem maior, chegando a 200 μm de comprimento, e em menor número que os cílios, geralmente apenas um.

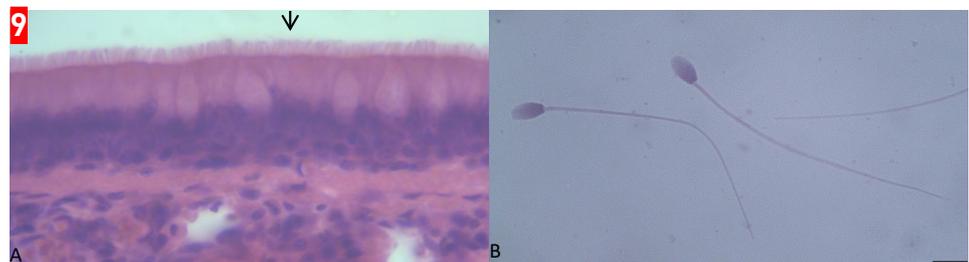
Os cílios são encontrados nos seres multicelulares e unicelulares (protistas). Nestes tem como função o deslocamento dos organismos e coleta de partículas alimentares. Nos multicelulares os cílios têm a função de movimentar muco ou fluidos sobre a superfície celular, como na traqueia (Figura 9A) e trompa uterina. Os flagelos

também têm função de locomoção para vários protozoários e também para os espermatozoides (Figura 9B).

Outra especialização de membrana é a bainha de mielina, que ao contrário das demais citadas não apresenta riqueza de citoesqueleto no seu interior. A bainha de mielina é formada por expansões da membrana plasmática das células de Schwann (no sistema nervoso periférico) ou oligodendrócitos (no sistema nervoso central). Essas expansões se enrolam nos axônios e como foi dito anteriormente, é composta por aproximadamente 75% de lipídios, o que colabora na função de isolamento elétrico e consequentemente aumenta a velocidade da transmissão do impulso nervoso pelos axônios.

Também existem os processos celulares, que são projeções citoplasmáticas recobertas por membrana plasmática presentes nas células de Sertoli (ou nutridora) e nos macrófagos. No primeiro caso os processos permitem maior área de interações da célula de Sertoli com as células germinativas, o que é muito importante no processo espermato gênico. No entanto, em relação aos macrófagos os processos celulares são formados durante a fagocitose e na movimentação da célula. Estes processos só podem ser visualizados em microscopia eletrônica.

Figura 9 – A) Traqueia corada com HE (seta indica a região dos cílios; B) Espermatozoide com flagelo. Escala: 5 μm



ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE BIOMEMBRANAS

♦ Atividade 1

Objetivo - Analisar a membrana plasmática de forma indireta.

Procedimento:

1 - Analisar a o epitélio da bexiga (lâmina A5-HE) e as células musculares (Lâmina L5 - Língua HE).

Responda:

A) Esquematizar as células epiteliais da bexiga e indicar a localização da membrana plasmática.

B) Em qual tecido (epitelial ou muscular) foi mais fácil perceber os limites celulares? Por quê?

♦ **Atividade 2**

Objetivo - Identificar e compreender as especializações de membrana plasmática em cinco tipos celulares.

Procedimentos:

1 – Analisar as especializações da membrana plasmática nas células epiteliais do Epidídimo, Intestino, Traqueia e os Espermatozoides.

Responda:

A) Esquematizar as especializações dessas células e sua correspondência em microscopia eletrônica de transmissão.

B) Complete os dados:

Lâmina 06 – Epidídimo (HE)

Tipo de especialização: _____

Tipo de citoesqueleto presente: _____

Local da célula onde a especialização é encontrada: _____

Relação da especialização com a função da célula: _____

Lâmina k17 – Intestino (HE)

Tipo de especialização: _____

Tipo de citoesqueleto presente: _____

Local da célula onde a especialização é encontrada: _____

Relação da especialização com a função da célula: _____

Lâmina C4 – Traqueia (PAS)

Tipo de especialização: _____

Tipo de citoesqueleto presente: _____

Local da célula onde a especialização é encontrada: _____

Relação da especialização com a função da célula: _____

Lâmina U1 – Esperma

Tipo de especialização: _____

Tipo de citoesqueleto presente: _____

Local da célula onde a especialização é encontrada: _____

Relação da especialização com a função da célula: _____

C) Coloque em ordem decrescente as especializações que foram mais facilmente observadas em microscopia óptica?

1ª - _____

2ª - _____

3ª - _____

4ª - _____

D) Esquematize uma fibra nervosa da medula espinhal (Lâmina G2) em corte transversal, indicando o axônio e a região da bainha de mielina.

E) Por que a região da bainha de mielina não aparece corada na lâmina?

F) Relacione a modificação da membrana plasmática da bainha de mielina do oligodendrócito com a sua função para o sistema nervoso.

Capítulo 6

Transporte via biomembranas

As células são formadas por membranas, os procariotos apresentam apenas a membrana que envolve o citosol enquanto os eucariotos possuem um sistema de endomembranas, que formam as organelas. Todas essas membranas apresentam permeabilidade seletiva, ou seja, permitem a passagem de certas substâncias e impedem a passagem de outras. Esse controle é fundamental para que as células mantenham sua homeostasia e exerçam suas funções adequadamente.

A função seletiva das membranas é exercida pelos seus componentes químicos. Os lipídios permitem a livre passagem de algumas moléculas, como por exemplo, a água, alguns gases, pequenas moléculas apolares. Por outro lado, as moléculas polares, apolares grandes e íons não conseguem atravessar via camada lipídica e por isso seu transporte é realizado pelas proteínas (Figura 1).

As proteínas que fazem o transporte de moléculas podem ser de dois tipos: proteínas formadoras de canais e as proteínas permeases ou carreadoras. Quando o transporte ocorre via proteínas formadoras de canais não há ligação entre as moléculas que estão sendo transportadas com as proteínas dos canais. A velocidade de transporte é proporcional a concentração das moléculas a serem transportadas (Figura 2A).

Já as permeases interagem com a molécula que está sendo transportada, existindo permeases específicas para cada tipo de molécula que é transportada. Ao se ligar ao soluto a permease muda sua conformação e realiza o processo de transporte. A velocidade também é proporcional à concentração do soluto, porém existe um ponto de saturação, quando todas as proteínas já estão ocupadas no processo de transporte (Figura 2B).

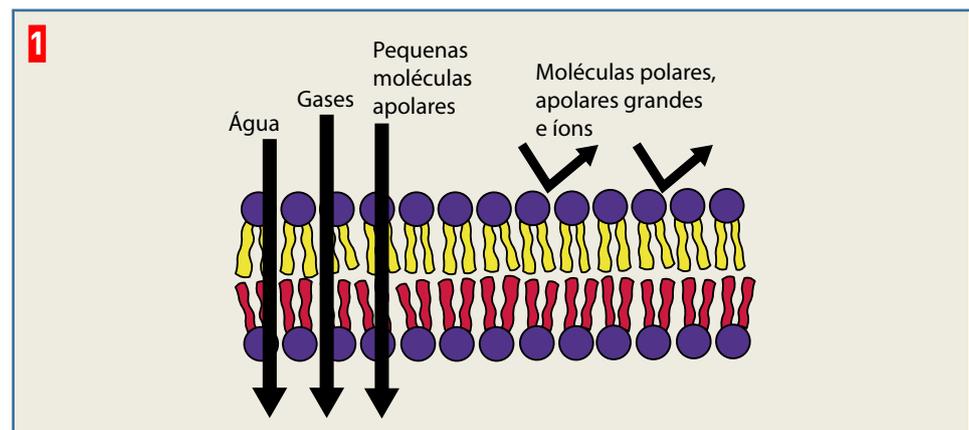


Figura 1 – Permeabilidade seletiva via bicamada lipídica.

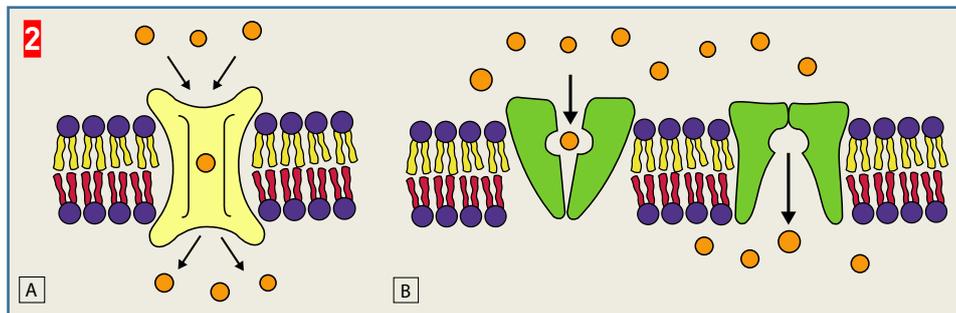


Figura 2 – A) proteínas formadoras de canais e B) permeases.

As proteínas carreadoras podem realizar três tipos de transportes: (1) uniporte quando uma molécula é transportada em uma direção ou co-transporte que pode ser (2) simporte quando duas moléculas são transportadas juntamente em uma única direção ou (3) antiporte, onde duas moléculas são transportadas em direções opostas (Figura 3).

Transporte em pequena quantidade

Os mecanismos de transportes podem ser de dois tipos: passivo e ativo. O passivo ocorre a favor de um gradiente eletroquímico e sem gasto de energia. No transporte ativo há gasto de energia e é contra o gradiente eletroquímico. O transporte passivo pode ser por difusão simples via lipídios (água, gases e moléculas apolares pequenas), através de proteínas canais (água e íons) ou por difusão facilitada, que é inter-

mediada por proteínas permeases (carboidratos e aminoácidos) (Figura 3).

O transporte ativo é realizado sempre por proteínas carreadoras que tem uma zona ATPásica. É importante ressaltar que grande parte do ATP das células é gasto no transporte ativo. Este tipo de transporte ocorre principalmente quando a concentração de certos íons ou moléculas de um lado da célula é maior que do outro lado ou quando as moléculas são muito grandes.

O transporte ativo pode ser uniporte, simporte ou antiporte. Exemplos de transporte ativo: bomba de sódio e potássio-ATPase, bomba de cálcio (no retículo sarcoplasmático) e bomba de hidrogênio (no lisossoma). Também existe o transporte ativo indireto ou secundário no qual a energia provém do co-transporte de um íon ou molécula que atravessa a favor de um gradiente, como por exemplo, o simporte de Glicose- Na^+ (Figura 3).

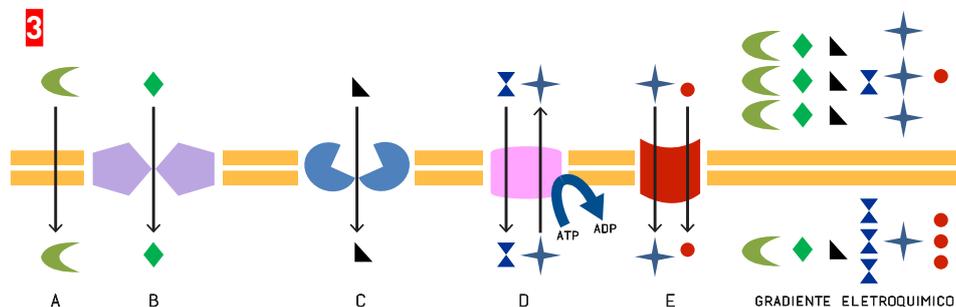


Figura 3 –Tipos de transporte quanto ao gasto de energia – A) Passivo por difusão simples; B) Passivo por difusão por proteínas canais; C) Passivo por difusão facilitada; D) Ativo primário do tipo antiporte; E) Ativo secundário do tipo simporte.

Figura 4 – Folha vegetal
 - A) antes e B) após a
 submissão ao frio.



Uma mesma molécula pode ser transportada por diferentes tipos de transportes e transportadores, conforme o gradiente eletroquímico atual e a região da célula onde se encontram os transportadores [apical ou basal].

Tudo o que afeta os componentes das membranas também afeta a sua permeabilidade seletiva, como por exemplo, o calor, o frio e solventes orgânicos. O calor desnatura as proteínas fazendo com que modifiquem a sua forma. O aumento da temperatura também diminui a interação hidrofóbica dos lipídios. Em ambos os casos ocorre o 'afastamento' dos componentes da membrana abrindo 'espaços' por onde passam moléculas e íons sem a devida seleção. Os solventes orgânicos diminuem a interação hidrofóbica dos lipídios das membranas, fazendo com que a membrana perca a seletividade. O frio, dependendo da sua intensidade, além de aumentar o volume celular, forma cristais de gelo que são 'cortantes' e abrem espaços nas células levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüentemente a morte celular. Esse efeito pode ser observado em vegetais expostos ao frio, como na Figura 4 com a mesma folha de alface em temperatura ambiente (A) e após a submissão ao frio (B).

Transporte em grande quantidade

Os tipos de transportes vistos se referem às pequenas quantidades de moléculas, contudo para o metabolismo normal da célula e sua própria defesa, em alguns momentos é necessário o transporte de substâncias em grande quantidade ou até mesmo a captura de microrganismos. Esse processo se chama endocitose, consome energia e pode ser de dois tipos: pinocitose e fagocitose.

Uma das diferenças entre os dois processos é quanto à forma de interiorizar o material, na pinocitose a membrana sofre uma invaginação e na fagocitose ela forma pseudópodos ao redor do material a ser endocitado. Outra diferença é quanto ao tamanho das partículas endocitadas, a pinocitose envolve partículas menores que na fagocitose.

A pinocitose pode ser seletiva ou não, enquanto a fagocitose é apenas seletiva. Enquanto a pinocitose pode ser realizada por todos os tipos celulares, a fagocitose é realizada por células especializadas na defesa (neutrófilos e células do sistema monocítico-macrofágico) e é bastante difundida nos protozoários (Figura 5).

Na endocitose o material introduzido na célula é compartimentalizado em vesículas,

que são chamadas de endossomos. Essas vesículas recebem enzimas digestivas provenientes dos lisossomos. Após processamento do material pelas enzimas, pode haver o aproveitamento desse material pela própria célula, ou a excreção ou o armazenamento como corpos residuais (Figura 5).

O processo inverso da endocitose é a exocitose, ou seja, o transporte 'para fora' da célula. Esse transporte permite eliminar secreções como hormônios, muco, enzimas digestivas e proteínas para a matriz extracelular, assim como a excreção de resíduos metabólicos. Também pode ocorrer a exocitose de vesícula para que sejam devolvidas

proteínas de membrana utilizadas na endocitose (Figura 5).

Osmose

A origem dos seres vivos foi a partir da água e por isso carregamos 'impressa' em nossas células essa origem. Isso pode ser visto, por exemplo, no que se refere ao transporte da água que pode ocorrer de diferentes formas através da membrana. Quando há um desequilíbrio de concentração de soluto entre a célula e o meio externo, a água é transportada para dentro ou para fora da célula até que ocorra o equilíbrio entre os

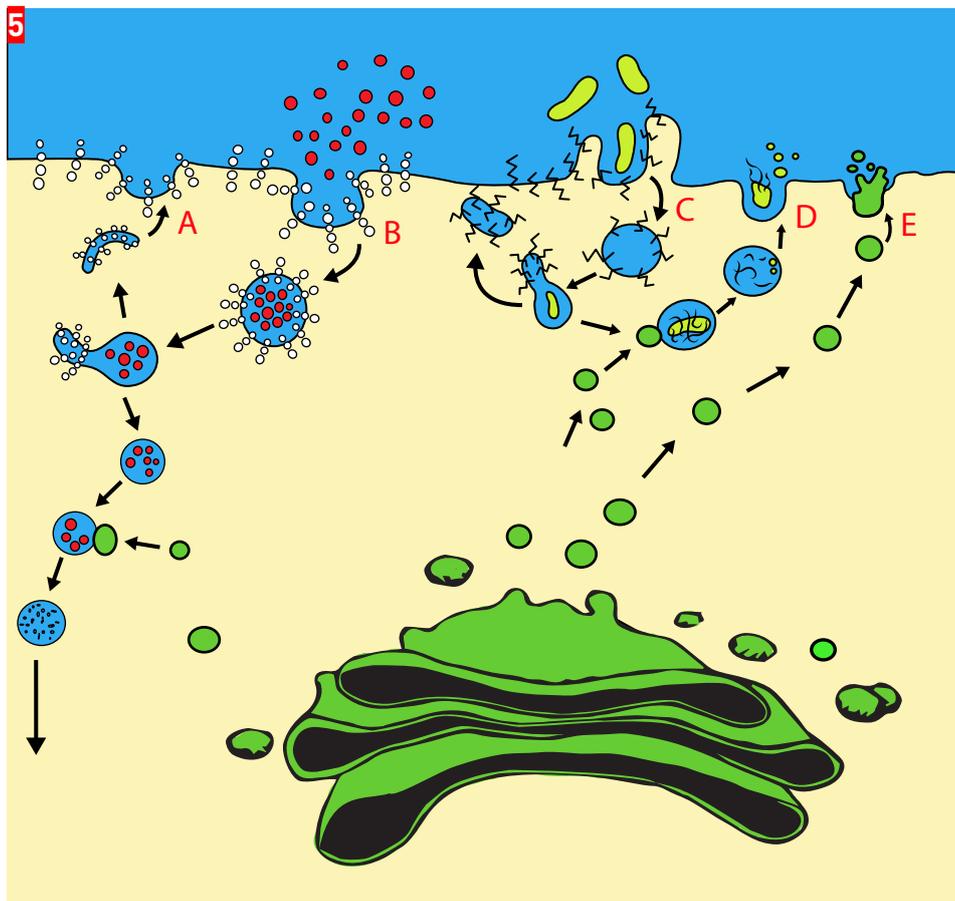


Figura 5 – Transporte em grande quantidade – A) Reaproveitamento de proteínas de membrana plasmática; B) Pinocitose seletiva; C) Fagocitose de bactéria; D) exocitose de resíduo e E) exocitose de secreção.

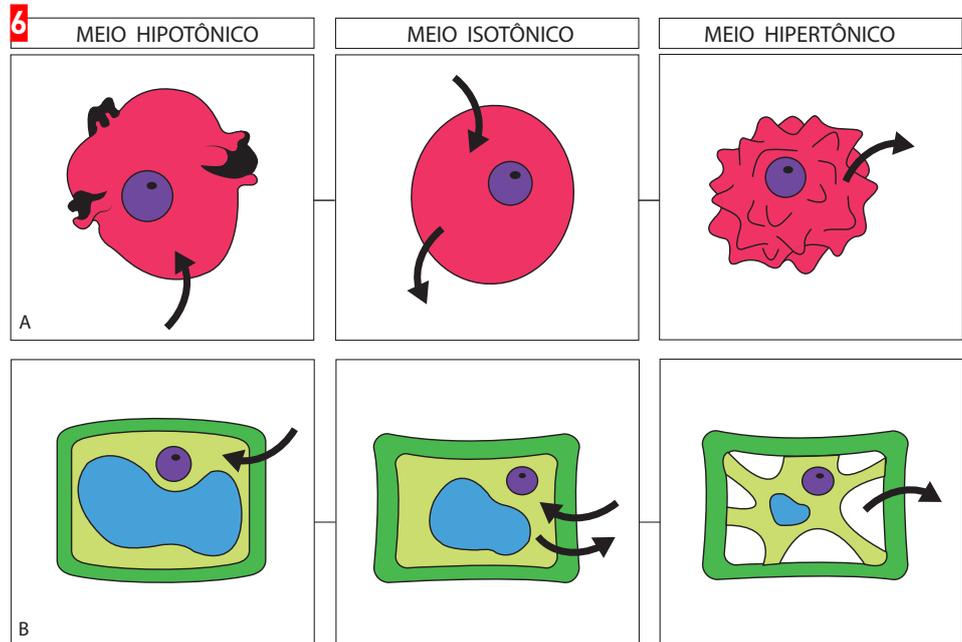


Figura 6 – Processo de osmose em A) célula animal e B) vegetal.

meios. Esse processo de transporte da água do meio com menos concentração de sais para um meio com maior concentração, sem gasto de energia denomina-se osmose.

Quando o meio está isotônico (mesma concentração salina) a célula não modifica sua forma, porém quando o meio está hipotônico, a célula transporta água para seu interior até atingir o equilíbrio, ou até que sua membrana não suporte mais a grande quantidade de água e se rompa. Nas células vegetais o rompimento é evitado pela ação mecânica da parede celular, que regula a entrada excessiva de água. Mesmo assim a célula vegetal aumenta o volume, esse fenômeno é denominado de turgescência.

Quando o meio está com alta concen-

tração salina (hipertônico) a célula transporta água para o exterior e também modifica sua forma, pois diminui de volume, esse fenômeno é chamado de plasmólise. Isso é mais perceptível na célula animal do que na vegetal, pois na vegetal a parede celular não se modifica abruptamente, apenas o citoplasma se reduz em proporção. Quando a célula vegetal possui pigmentos é possível observar que a intensidade da cor aumenta devido à saída da água e conseqüentemente, a concentração dos pigmentos (Figura 6). Quando as condições do meio externo se modificam a célula pode voltar ao seu volume original em um processo denominado deplasmólise.



◆ **Atividade 2**

Objetivo - Verificar o efeito da temperatura sobre a permeabilidade seletiva da membrana plasmática em fungo.

Procedimentos:

- 1 - Enumerar dois tubos de ensaio e fazer as adições descritas na tabela seguinte, na sequência indicada:

Tabela 2 – Experimento sobre efeito da temperatura sobre a membrana plasmática de fungo

TUBOS	SUSPENSÃO DE LÊVEDO	VERMELHO CONGO 0,2%	CONDIÇÕES
1	2 mL	3 mL	Temperatura ambiente
2	2mL	3 mL	banho-maria a 100°C por 10 minutos

- 2 - Analisar o lêvedo em microscopia óptica.

Responda:

A) Qual a cor do lêvedo dos tubos 1 e 2? Explique os resultados.

◆ **Atividade 3**

Objetivos - Verificar o processo de osmose em células epiteliais vegetais; aprender a técnica de distensão; conhecer células vegetais; diferenciar o núcleo, cristais, plastos; diferenciar células animais e vegetais; discutir a diferença entre a membrana plasmática das células animais e a parede celular das células vegetais e diferenciar as células de guarda dos estômatos.

Procedimentos:

- 1 - Colocar uma gota de solução isotônica sobre a lâmina;
- 2 - Retirar alguns fragmentos da epiderme inferior, região abaxial, de uma folha de *Tradescantia* sp. com auxílio de uma pinça ou lâmina de barbear;
- 3 - Colocar o fragmento sobre a gota e cobrir com lamínula;
- 4 - Observar no microscópio com objetiva de 10X;
- 5 - Colocar algumas gotas de solução hipertônica (Solução salina - NaCl 3%) em uma das extremidades da lamínula e na extremidade oposta um papel filtro. Desta forma a solução isotônica que está

entre a lâmina e lamínula será substituída pela solução salina. Caso demore muito, pode retirar a lamínula e com o papel-filtro absorver o excesso da solução isotônica que está em volta da epiderme e depois pingar uma gota de solução hipertônica.

6 - Observar em microscópio óptico.

7 - Substituir a solução hipertônica por hipotônica. Caso não observe modificações, repita esse passo com células plasmolisadas recentemente.

Responda:

A) Esquematizar as células colocadas em solução isotônica e hipertônica. Explique os resultados.

Solução hipotônica

Solução hipertônica

B) O que aconteceu quando substituiu a solução isotônica pela solução hipertônica? Qual o nome desse evento?

C) O que aconteceu quando substituiu a solução hipertônica pela solução hipotônica? Qual o nome desse evento?

◆ **Atividade 4**

Objetivos - Discutir o processo de osmose em células animais (células da mucosa bucal) e discutir a diferença dos resultados da osmose em células animais e vegetais.

Procedimentos:

- 1 - Colocar uma gota de solução isotônica sobre a lâmina;
- 2 - Fazer uma raspagem da mucosa bucal com auxílio de um palito de fósforo;
- 3 - Colocar o material sobre a gota e cobrir com lamínula;
- 4 - Observar no microscópio com objetiva de 10X;
- 5 - Colocar algumas gotas de solução hipertônica (Solução salina - NaCl 3%) em uma das extremidades da lamínula e na extremidade oposta um papel filtro. Desta forma a solução isotônica que está entre a lâmina e lamínula será substituída pela solução salina.
- 6 - Observar o efeito ao microscópio.
- 7 - Substituir a solução hipertônica por hipotônica.

Responda:

A) Esquematizar as células colocadas em solução isotônica, hipertônica e na hipotônica.

Solução isotônica

Solução hipertônica

Solução hipotônica

B) O que acontece com a forma das células na solução hipotônica e na solução hipertônica? Por que aconteceram esses eventos?

C) Quais as principais diferenças entre a osmose vegetal e animal?

◆ **Atividade 7**

Objetivo: Estimular a análise crítica do discente

Procedimentos:

1 – Analise as figuras abaixo:



Figura 1a - Flor- estrela (Família Apocynaceae) A) logo após a abertura e B) alguns dias depois.

Responda:

Explique o que aconteceu com a flor dessa planta.

Capítulo 7

Citoplasma

As células procarióticas são mais simples estruturalmente que as eucarióticas, pois não apresentam organelas: núcleo, retículo endoplasmático, complexo de golgi, lisossomo, mitocôndria e peroxissomo. O citoplasma das células procariotas é formado apenas pelo citosol, que é rico em íons, moléculas e estruturas celulares como os ribossomos. Em algumas bactérias a membrana plasmática invagina no citoplasma formando uma estrutura chamada mesossomo. Nas cianobactérias essas invaginações citoplasmáticas contêm pigmentos fotossintéticos.

Nas células eucarióticas 55% do volume celular são representados pelo citosol ou matriz citoplasmática, composto por água, íons e aminoácidos, precursores dos ácidos nucleicos, bem como enzimas e elementos do citoesqueleto, como as microfibrilas de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.

Inclusões e vesículas

No citosol estão presentes inclusões, que servem como local de depósito de substâncias. As mais comuns são acúmulos de glicogênio que se apresentam na forma de grânulos esféricos, podendo ser chamados de glicossomos, que são armazenados como suprimento energético, principalmente pelos hepatócitos, miócitos, neutrófilos e certos epitélios.

Inclusões comumente encontradas no citosol são as gotículas de lipídios, princi-

palmente os triglicerídeos. Elas estão presentes em diferentes tipos celulares, são mais facilmente visíveis nos adipócitos, servindo de reserva concentrada de nutrientes para todo o organismo (Figura 1A). Nas células musculares, essa reserva é para o consumo próprio do tecido. Os hepatócitos também apresentam grande quantidade de inclusões, uma vez que o fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo lipídico. As células de algumas glândulas também apresentam inclusões lipídicas, mas nesse caso é representado pelo seu próprio material de secreção.

Os pigmentos também se acumulam na forma de inclusões como, por exemplo, a melanina, encontrada nas células da epiderme (Figura 1B). Outro pigmento encontrado na forma de inclusão é a lipofuscina, que se acumula em algumas células de vida longa, como os neurônios e células musculares estriadas cardíacas.

Além das inclusões no citosol das células eucarióticas, ocorrem vesículas que podem ser de endocitose, exocitose ou de secreção. As vesículas de secreção são formadas no complexo de Golgi, geralmente repletas de proteínas que serão secretadas para fora da célula. Um exemplo típico é o grânulo de zimogênio do pâncreas (Figura 1C) e as vesículas de mucina das glândulas caliciformes.

Existem as inclusões cristalinas, que geralmente são compostas por proteínas, mas podem ser formadas por urato, ferritina, entre outros. Suas funções ainda não

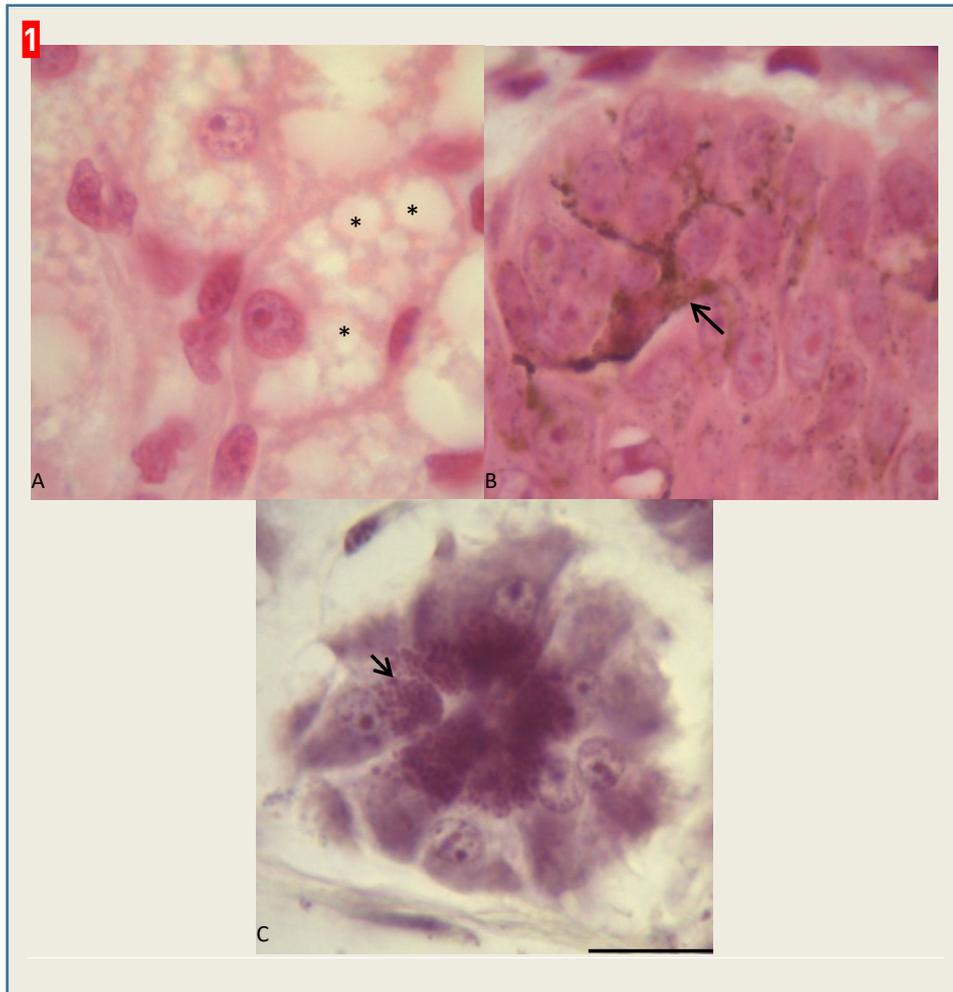


Figura 1 – A) inclusões lipídicas do adipócito multilocular (*); B) inclusões de melanina da epiderme (seta); C) vesícula de secreção com grânulo de zimogênio do pâncreas (seta). Escala: 5µm

são bem conhecidas.

As vesículas de endocitose formam um compartimento endossomal, que se expande desde a membrana plasmática até as proximidades do núcleo. Esse compartimento é responsável pela separação e endereçamento do material que penetra no citoplasma pelas vesículas de pinocitose. O material presente no endossoma pode ter três destinos diferentes: passar para o citosol, voltar para superfície celular ou unir-se aos lisossomos.

Citoesqueleto

O citoesqueleto é constituído por filamentos proteicos, sendo que os principais tipos são os microtúbulos, microfilamentos de actina e filamentos intermediários. Os microfilamentos de actina são assim denominados por possuírem o menor diâmetro entre os três filamentos do citoesqueleto, que é de 6 a 8 nm. O filamento intermediário apresenta valor intermediário de 8 a 10 nm e o microtúbulo é o que apresenta o maior

diâmetro, de 22 a 24 nm.

O citoesqueleto faz com que o citosol se comporte como um gel aquoso, fazendo com que a sua consistência se modifique. Isso é possível porque a actina e os microtúbulos polimerizam e despolimerizam de modo reversível e dinâmico. Quando despolimerizam, conferem ao citosol maior fluidez e quando polimerizam apresenta consistência de gel.

O citoesqueleto ocorre somente nos eucariotos, sendo que a quantidade, distribuição e combinação dos filamentos variam entre os diferentes tipos celulares. Esses filamentos combinados com outras proteínas exercem várias funções nas células, tais como organização estrutural, manutenção da forma e movimentos celulares.

Os três filamentos do citoesqueleto estão distribuídos por todo citoplasma de forma organizada. Os microtúbulos partem do centróssomo, os filamentos intermediários circundam o núcleo externa e internamente, formando a lâmina nuclear e actina encontra-se principalmente abaixo da membrana plasmática, participando do córtex celular, microvilosidades, junção de oclusão, adesão e adesão focal (Figura 2).

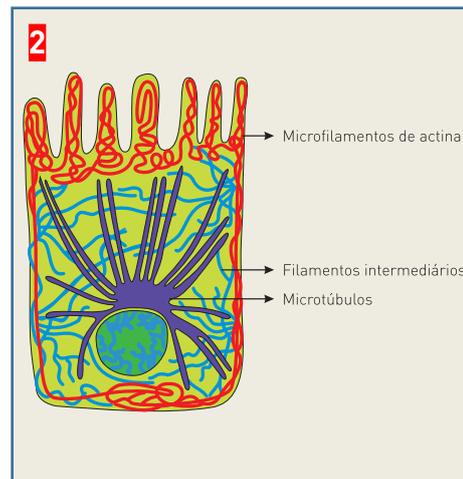


Figura 2 – Distribuição preferencial do citoesqueleto.

Microfilamentos de actina

Os microfilamentos de actina estão presentes em todas as células eucarióticas, sendo formadas por proteínas globulares denominadas actina G, que podem se juntar em filamentos helicoidais denominados actina F. Esses filamentos de actina F podem formar redes ou feixes como nas microvilosidades, junções celulares, sarcômeros (células musculares) e córtex celular.

Os monômeros que formam os microfilamentos de actina são estruturas instáveis que podem ser removidos ou adicionados. Por essa razão os microfilamentos de actina podem sofrer a ação de algumas drogas como, por exemplo, a citocalasina que impede a polimerização e a faloidina que estabiliza o microfilamento de actina impedindo a despolimerização.

Por outro lado algumas estruturas formadas por actina são estáveis, os sarcômeros das células musculares. Essa estabilidade é conferida pela associação do microfilamento com proteínas estabilizadoras, que recobrem os microfilamentos impedindo a ação de proteínas de clivagem e impedindo a remoção de actinas G.

Como visto no exemplo acima, existem proteínas que atuam conjuntamente com a actina, como por exemplo, as proteínas fragmentadoras de actina, as proteínas sequestradoras que se ligam aos monômeros livres, modulando sua afinidade com o microfilamento de actina, as proteínas de ligação que fazem a ligação entre microfilamentos de actina a outras proteínas, as proteínas de ancoragem que ancoram os microfilamentos à membrana plasmática e as proteínas motoras que utilizam os microfilamentos como 'trilhos' para locomoção de vesículas, organelas e/ou macromoléculas.

Os microfilamentos de actina apresentam diversas funções, como por exemplo,

ser responsável pelo suporte mecânico da célula, por isso esses microfilamentos se localizam na periferia celular, formando o córtex celular. Essa actina presente na periferia da célula também atua nos processos de endocitose e exocitose, além de participar da adesão celular nas junções de oclusão, de adesão e adesão focal.

Pelo fato da actina estar na periferia ela também é importante para determinar e manter a forma dos diferentes tipos celulares e formar as microvilosidades e estereocílios (Figura 3).

Os microfilamentos de actina são responsáveis pela ciclose, que é uma corrente citoplasmática capaz de deslocar núcleo e outras organelas. Sendo por isso importante na distribuição dos nutrientes dentro da célula. Ela ocorre tanto nas células animais quanto nas vegetais, porém é mais perceptível nas vegetais, pois o citoplasma está restrito a periferia da célula devido ao grande volume do vacúolo. A ciclose pode ser observada ao microscópio de luz pela movimentação dos cloroplastos, uma vez que os demais constituintes celulares são incolores.

Outro movimento realizado pelos microfilamentos de actina é o movimento amebóide realizado por organismos unicelulares (ameba) e células de multicelulares (leucócitos e macrófagos). Os microfilamen-

tos de actina promovem a movimentação do citoplasma o que altera a forma da célula, criando "falsos pés" (pseudópodes).

Eles também promovem o transporte de vesículas de secreção e macromoléculas no citoplasma, participam da mudança de consistência do citosol, da contração muscular e da citocinese.

Filamentos Intermediários

Esse tipo de citoesqueleto está presente apenas nos organismos multicelulares. Estando presente na maioria das células animais, exceto nas células de embriões jovens e oligodendrócitos.

Os filamentos intermediários são formados por proteínas fibrosas em que três cadeias polipeptídicas se enrolam em hélice. Eles são formados por proteínas de diversas classes e conforme o tipo celular existe um filamento intermediário específico. Por exemplo, na epiderme, o citoesqueleto intermediário é a citoqueratina, no tecido conjuntivo é a vimentina, nos neurônios são os neurofilamentos, nas células musculares é a desmina. Devido a essa distribuição específica, a sua identificação nas células do câncer facilita o diagnóstico sobre a origem do câncer no caso de metástase.

Os filamentos intermediários são elementos estruturais e por isso não partici-

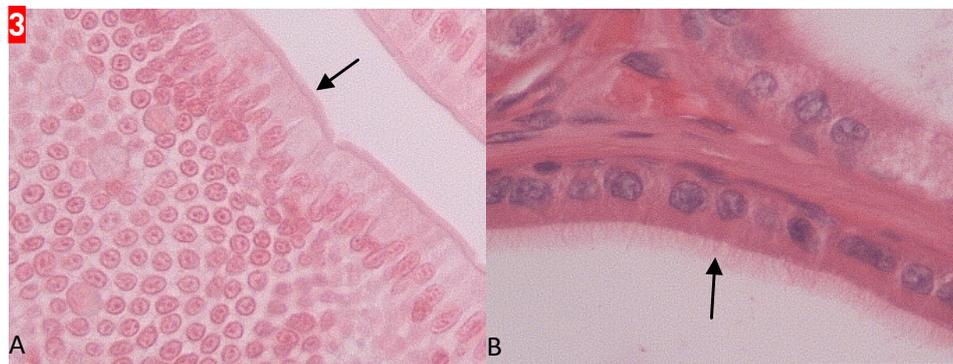


Figura 3 – Especializações da membrana plasmática sustentadas pela actina. A) Microvilosidades (seta) do intestino delgado) e B) Estereocílios (seta) do epidídimo. Escala: 10 μ m.

pam diretamente dos movimentos celulares. Quase não apresentam polimerização, portanto, são estáveis. Contudo, eles podem ser rearranjados para responder as necessidades celulares, como por exemplo, durante as divisões celulares.

Os filamentos intermediários são responsáveis pela resistência mecânica, por isso estão presentes em células que sofrem muitos atritos como as células da epiderme. Essas células são ricas em estruturas que conferem adesão celular, como os desmossomo e hemidesmossomo. Por meio dos desmossomos as células adjacentes se conectam, atuando de maneira integrada. Por essa razão o estresse mecânico sofrido no tecido é distribuído uniformemente pelas células adjacentes. Os anexos epidérmicos (cabelo, unha, chifre, casco) são ricos em filamentos intermediários, o que demonstra sua função de resistência mecânica.

No núcleo, os filamentos intermediários, denominados de lâmina nuclear, fazem a ancoragem da cromatina no envoltório nuclear e participam dos processos de desintegração e reestruturação do envoltório nuclear durante a mitose e a meiose.

Nos neurônios existe um tipo específico de filamento intermediário, os neurofilamentos, que mantém a forma do axônio dos neurônios e contribuem no posicionamento das organelas dentro da célula.

Assim como a actina, os filamentos intermediários também dependem de proteínas acessórias. Elas influenciam na sua polimerização e estabelecimento do arranjo tridimensional. Por exemplo, elas interligam os filamentos intermediários a outros componentes do citoesqueleto, formando assim uma malha dinâmica e flexível.

Microtúbulos

Os microtúbulos estão distribuídos por toda a célula, mas geralmente partem do centróssomo, que é o principal centro organizador de microtúbulos na maioria das células animais. O centróssomo fica localizado perto do núcleo, onde na maioria das células está situado um par de centríolos.

Os microtúbulos são formados por proteínas tubulinas dos tipos α e β que se organizam formando filamentos. Treze desses filamentos se juntam de forma linear e paralela formando o microtúbulo, portanto, ele é uma estrutura oca.

Os monômeros que formam os microtúbulos podem ser removidos ou adicionados, ou seja, os microtúbulos não são estruturas estáveis. Dependendo da célula, os filamentos apresentam maior ou menor estabilidade. Nos cílios, centríolos e flagelos os microtúbulos são estáveis.

Considerando que os microtúbulos polimerizam e despolimerizam, eles podem sofrer a ação de algumas drogas nesse processo, como por exemplo, a colchicina que se liga às tubulinas do citoplasma, impedindo que se associem as extremidades dos microtúbulos, portanto, impedindo a polimerização. Outra droga, o taxol, acelera a polimerização do microtúbulo e depois o estabiliza, impedindo a sua despolimerização. O taxol é utilizado no tratamento de câncer devido à sua ação antimitótica.

Assim como a actina, os microtúbulos trabalham com outras proteínas acessórias, como por exemplo, as proteínas motoras dineína e cinesina. Ambas estão envolvidas na função de transporte e locomoção dentro da célula. Esse citoesqueleto também é influenciado pelas proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Elas podem se ligar aos microtúbulos e impedir que sejam despolarizados, tornando-os estáveis. Também

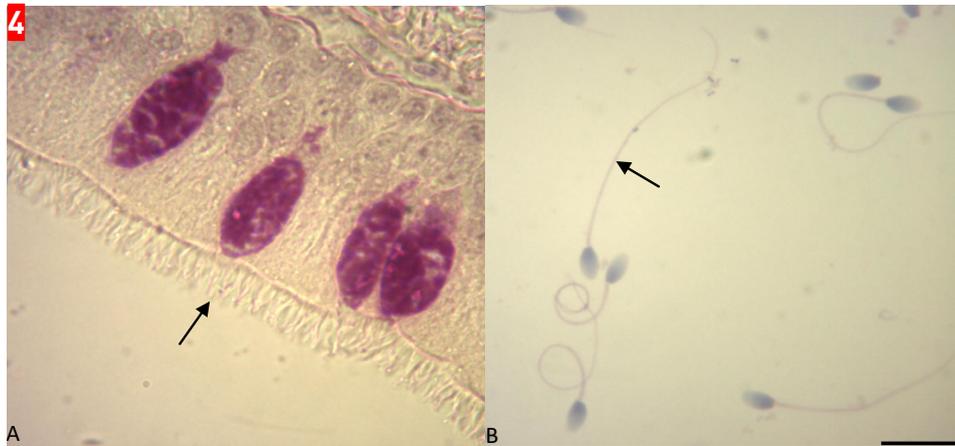


Figura 4 – Especializações da membrana plasmática sustentadas por microtúbulos. A) Cílios (seta) da traqueia e B) Flagelos (seta) do espermatozoide de equino. Escala: 5 μ m.

fazem a ligação dos microtúbulos com outros elementos do citoesqueleto.

Além da função de movimento, como deslocamento intracelular de vesículas e organelas, processo de exocitose, os microtúbulos estão envolvidos no estabelecimento e manutenção da forma da célula, na organização das organelas no citoplasma, formação dos cílios e flagelos (Figura 4). No

processo de divisão celular os microtúbulos formam os centríolos e o fuso mitótico/meiótico.

Nas células vegetais os microtúbulos têm função de direcionar as vesículas para a formação da nova parede após a divisão celular, bem como orientar as fibras de celulose na formação da parede celular.



ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE CITOPLASMA

◆ Atividade 1

Objetivo - Analisar grânulos (vesículas) e inclusões citoplasmáticas em células animais.

Procedimentos:

1 – Analisar as células do pâncreas (Lâmina A4, Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory), as células caliciformes da traqueia (Lâmina C4, PAS), células da pele delgada (Lâmina L1, HE) e os adipócitos presentes na periferia do Timo (Lâmina I5).

Responda:

A) Esquematizar um ácino do pâncreas e indicar a região basal e a apical das células.

B) Em qual região as vesículas (grânulos de zimogênio) estão presentes? Qual a cor dessa região?

C) Esquematizar uma célula caliciforme da traqueia como é vista na de luz e na microscopia eletrônica (ultraestrutura)

Microscopia de luz

Microscopia eletrônica

D) Identificar os grânulos de melanina e de querato-hialina na pele delgada.

E) Esquematizar um adipócito com uma única inclusão (adipócito unilocular) e outro adipócito com várias inclusões (adipócito multilocular) na periferia do timo.

Adipócito Unilocular

Adipócito multilocular

◆ **Atividade 2**

Objetivo - Sistematizar os conhecimentos sobre citoesqueleto

Responda:

A – Complete a tabela com as características do citoesqueleto:

Característica	Microfilamentos de Actina	Filamentos Intermediários	Microtúbulos
Espessura			
Unidade Básica			
Local de distribuição preferencial			
Nível de estabilidade			
Presente em quais especializações da membrana plasmática			
Presente em quais estruturas de adesão intercelular			
Funções relacionadas ao movimento			
Outras funções			

◆ **Atividade 3**

Objetivo - Identificar as estruturas que apresentam citoesqueleto

Procedimento:

1 – Analisar as células de revestimento do jejuno (Lâmina K17 – HE), epidídimo (Lâmina O6 – HE), traqueia (Lâmina C1 ou C4 – HE ou PAS), as células musculares estriadas esqueléticas da língua em corte longitudinais (Lâmina F3 – HE) e os flagelos dos espermatozoides (Lâmina U1 – HE).

Responda:

A) Esquematizar as células que contém:

Microvilosidades	Estereocílios	Cílios
Estrias	Flagelos	

(As estrias devem ser observadas com o condensador abaixado e o diafragma fechado)

◆ **Atividade 4**

Objetivo - Observar os movimentos dos procariontos promovidos pelo citoesqueleto.

Procedimentos:

- 1 - Colocar sobre a lâmina uma gota de água do lago e cobrir com a lamínula;
- 2 - Observar com objetivas de 10 e 40X (regulando o diafragma e condensador);

Responda:

A) Discutir a provável estrutura de locomoção dos organismos encontrados.

◆ **Atividade 5**

Objetivo - Analisar a ciclose.

Procedimentos:

- 1 - Colocar uma gota de água sobre a lâmina;
- 2 - Colocar uma folha de *Elodea* sp. sobre a gota;
- 3 - Colocar uma lamínula sobre a folha e observar.

Responda:

A) O que é possível observar?

Capítulo 8

Sistema de endomembranas

Provavelmente as primeiras células eucarióticas surgiram a partir de células procarióticas por um processo de invaginação da membrana plasmática, originando assim um sistema de endomembranas, formado pelo núcleo, retículo endoplasmático, complexo de golgi e lisossomo. O núcleo será tratado em um capítulo à parte, a seguir serão apresentadas características do retículo endoplasmático, complexo de golgi, lisossomos e do processo de tradução.

Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma rede de membranas que delimitam cavidades (lúmen ou luz) que se intercomunicam. Cerca de 50 a 60% do total de membranas da célula fazem parte do retículo, por isso juntamente com o citoesqueleto, ele fornece o suporte mecânico ao citosol. Apesar da sua grande quantidade, o retículo endoplasmático não é visível diretamente ao microscópio de luz.

O retículo endoplasmático pode ser de dois tipos: granular ou rugoso; agranular ou liso. O retículo endoplasmático rugoso também é conhecido como ergastoplasma. Esses dois tipos de retículos podem ser contínuos entre si e com a membrana do núcleo, o envoltório nuclear. Os dois tipos de retículos apresentam diferenças estruturais, funcionais e químicas entre si.

O retículo endoplasmático liso é formado por vesículas globulares ou túbulos contorcidos, semelhantes a potes de mel de abelhas nativas (Figura 1)

Essa organela é bem desenvolvida em células de certos órgãos, por exemplo, em órgãos que produzem hormônios esteroides, como gônadas e glândulas suprarrenais.

Além da produção de hormônios esteroides, o retículo endoplasmático liso também sintetiza lipídios que compõem as membranas e formam os triglicerídeos a partir de ácidos graxos e glicerol. Nas células do fígado é responsável pela metabolização do glicogênio ou glicogenólise.

Uma função muito importante do retículo endoplasmático liso é a desintoxicação. Essa organela possui enzimas que tornam os compostos tóxicos mais solúveis em água e assim eles podem ser eliminados. Quando as drogas são ingeridas em excesso, ocorre a proliferação do retículo endoplasmático liso e das suas enzimas. Com isso aumenta a tolerância do organismo às drogas, sendo necessárias doses mais altas da droga para se obter o mesmo efeito, ou



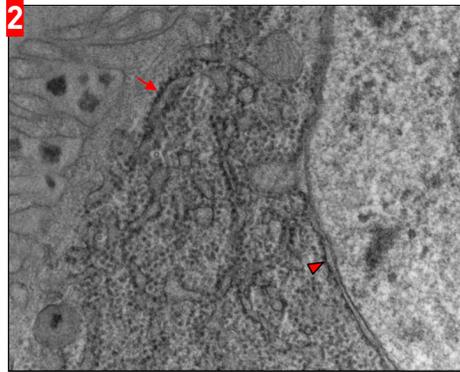
Figura 1 – Potes de mel de abelha nativa (*Melipona*)

seja, o organismo desenvolve 'tolerância' a certos medicamentos.

O retículo endoplasmático liso também é importante na regulação e reservatório do Ca^{+} intracelular. Esse íon atua no processo de contração muscular e por essa razão as células musculares são ricas nessa organela, onde são denominadas de retículo sarcoplasmático.

O retículo endoplasmático rugoso é formado por lâminas achatadas e paralelas. Uma das suas diferenças em relação ao retículo endoplasmático liso é a presença de polirribossomos aderidos à face da membrana do retículo voltada para o citosol (face citosólica) (Figura 2). Essa adesão só é possível porque na membrana do retículo endoplasmático rugoso existem proteínas receptoras de ribossomos. É importante ressaltar que os ribossomos presentes no retículo endoplasmático rugoso são idênticos aos ribossomos livres no citosol e que os mesmos são liberados no citosol assim que a tradução termina.

Outra diferença quanto à composição química entre o retículo endoplasmático liso e o rugoso é a presença de proteínas envolvidas na translocação e interiorização das cadeias polipeptídicas, uma vez que a



principal função do retículo endoplasmático rugoso é a síntese proteica.

O retículo endoplasmático rugoso encontra-se disperso no citoplasma, mas está localizado preferencialmente perto do núcleo. Devido a sua função ele é mais abundante nas células secretoras, nas quais pode ocupar mais da metade da área da célula. Nessas células ele fica no polo basal (Figura 3A) e o produto de sua secreção fica no polo apical (Figura 3B).

Essa organela não pode ser vista por microscopia de luz, contudo é possível verificar a região onde está localizado devido a sua basofilia. O retículo endoplasmático rugoso é rico em ribossomos que por sua vez é rico em RNA ribossômico, que é um

Figura 2 - Ribossomos aderidos ao retículo endoplasmático (seta) e à membrana externa do envoltório nuclear (cabeça de seta).

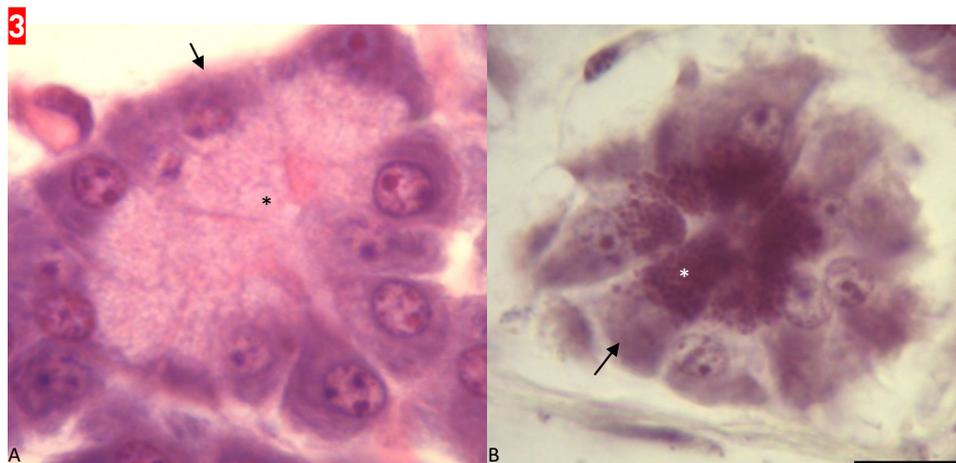


Figura 3 - Ácinos pancreáticos corados com A) Hematoxilina Eosina e B) Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (* indica polo apical e seta indica o polo basal). Escala: 10 μ m.

ácido e por isso se cora com corantes basófilos, como a hematoxilina. Na figura 3A é possível observar a basofilia na região basal da célula do pâncreas, indicando sua localização.

Nos neurônios (Figura 4) existe um acúmulo de retículo endoplasmático rugoso e polirribossomos livres no citosol da célula, formando os corpúsculos de Nissl que são visíveis à microscopia de luz.

Nas células existem dois locais de produção de proteínas: no citosol, pelos polirribossomos livres e no retículo endoplasmático rugoso. O destino das proteínas sintetizadas nesses dois locais é diferente. As proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso vão para o retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de golgi, lisossomos, a membrana plasmática ou são secretadas. Enquanto que as proteínas sintetizadas pelos polirribossomos livres ficam no próprio citoplasma ou vão para o núcleo, mitocôndria, cloroplasto e peroxissomos.

As proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso passam por várias modificações. Durante o processo da tra-

dução, ocorre adição de açúcares e dobramentos do peptídeo nascente. As enzimas chaperonas se ligam ao peptídeo e o auxiliam na aquisição da conformação terciária e quaternária das proteínas com a realização de dobramentos e reunião de várias cadeias. As chaperonas também fazem o 'controle de qualidade', permitindo que apenas as proteínas normais continuem o processo, ou seja, vão para o complexo de Golgi para atingir a configuração final. As proteínas 'defeituosas' são degradadas na luz do retículo endoplasmático rugoso ou no citosol para onde são transportadas. Concomitante a esse processo, a dissulfeto isomerase favorece a formação correta de pontes dissulfeto das proteínas nascentes.

Após sua síntese, as proteínas são enviadas para o complexo de golgi onde serão processadas e encaminhadas para seus destinos finais. O transporte se dá através de brotamento e fusão de vesículas. Quando a direção é do interior da célula para à membrana plasmática, o transporte é denominado de anterógrado e quando os componentes voltam o transporte é chamado de retrógrado. Só realizam o transporte retrógrado as proteínas residentes do retículo endoplasmático que ficam no lúmen ou na membrana dessa organela. Essas proteínas possuem uma sequência sinal que as identificam como sendo do retículo endoplasmático.

Complexo de Golgi

As proteínas e os lipídios produzidos no retículo endoplasmático são enviados para o complexo de golgi onde sofrem importantes modificações estruturais. Essa organela localiza-se geralmente próximo ao retículo endoplasmático e é formada por vesículas achatadas (cisternas) e esféricas (que brotam das achatadas). Diferentemente do retí-

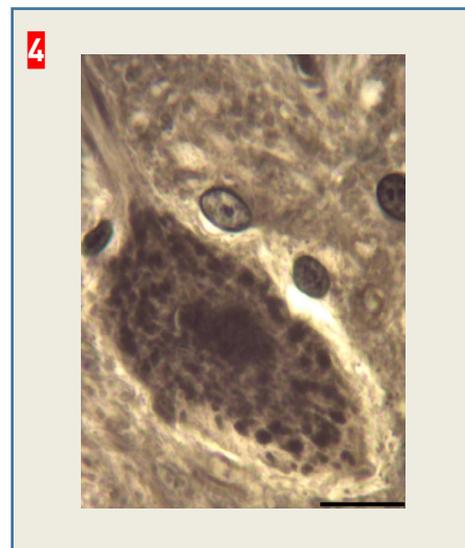


Figura 4 – Neurônio, pontos indicam corpúsculo de Nissl. Escala: 5 μ m

culo endoplasmático em que as vesículas se interconectam, no complexo de golgi as vesículas são separadas entre si e sua comunicação se dá por meio de vesículas esféricas que brotam das vesículas achatadas e se unem as próximas. Nas células animais, as cisternas estão dispostas de maneira organizada: cisterna cis (voltada para o retículo endoplasmático), cisternas médias e cisternas trans (voltadas para a membrana plasmática) (Figura 5).

As células secretoras apresentam grande quantidade de complexo de golgi, pois ele está envolvido no processamento das proteínas oriundas do retículo endoplasmático, esse processamento pode ser a glicosilação que é realizado pelas proteínas de membranas (glicosiltransferases) através de reações em cascata. Na cisterna cis e média ocorre à remoção de manose, na média é adicionado a N-acetilglicosamina e na trans é adicionado à galactose, ácido siá-

lico e de diferentes açúcares ao aminoácido serina ou treonina, sendo a adição realizada em cascata, ou seja, um a um. A adição de açúcar dificulta a ação de proteases e confere carga negativa, fundamental para a estrutura quaternária da proteína.

Outro processamento é a sulfatação, que é a adição de sulfato à tirosina a partir de um doador de sulfato (trans). Esse processo confere carga negativa às proteínas. A fosforilação é a adição de fosfato (face cis) a resíduos de manose pelas N-acetilglicosaminas fosfotransferase e fosfodiesterase, sendo importante para as enzimas lisossomais.

Além desses processamentos no complexo de golgi, as proteínas são separadas conforme o tipo e 'empacotadas' ou seja, elas são concentradas dentro de vesículas e depois seguem caminhos diferentes. Algumas proteínas são enviadas para a membrana plasmática na qual se incorporam e passam a fazer parte da mesma.

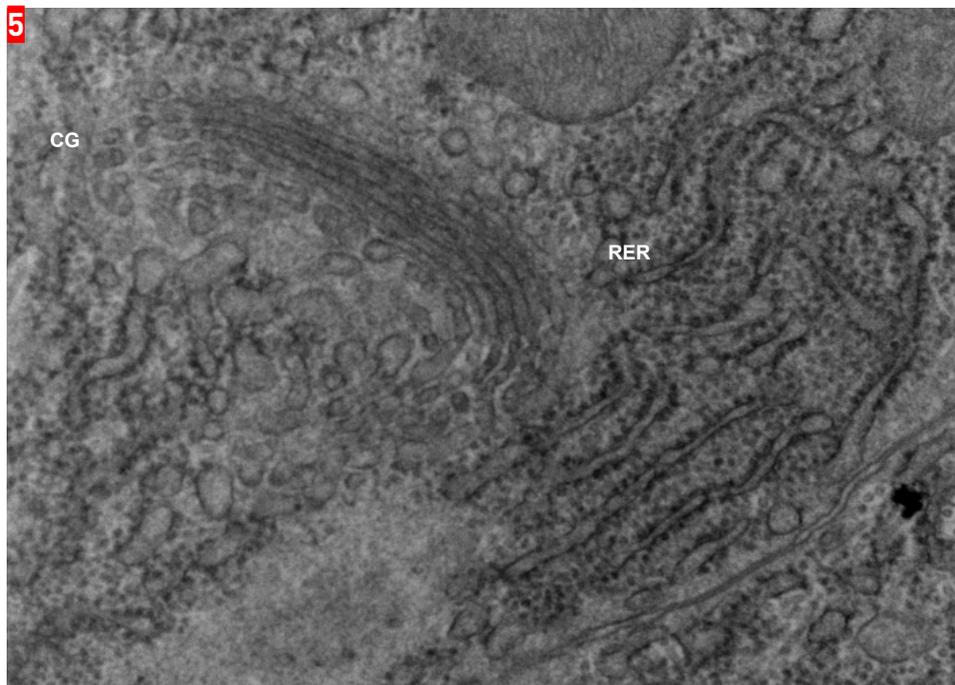


Figura 5 - Complexo de Golgi (CG) e retículo endoplasmático rugoso (RER).

Algumas proteínas da membrana plasmática também são produzidas no citosol pelos polirribossomos livres. Outros tipos de proteínas também migram para a membrana plasmática, contudo elas estão dentro de vesículas, e quando essas se fundem à membrana plasmática o seu conteúdo é liberado para o meio externo, em um processo denominado de exocitose. Outras proteínas permanecem dentro de vesículas no próprio citosol, e atuam no processo de digestão intracelular, fazendo parte dos lisossomos.

Além da função de processamento, o complexo de golgi é responsável pela síntese de alguns carboidratos (hemicelulose, pectina da parede celular) e formação do acrossomo do espermatozoide.

Lisossomos

Algumas proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e processadas no complexo de golgi fazem parte dos lisossomos. Essas organelas estão presentes nas células animais, vegetais e nos protozoários. Geralmente são esféricas e com dimensões variáveis. A membrana lisossômica é revestida internamente por carboidratos, evitando assim a digestão causada pelas suas próprias enzimas. O pH interno do lisossomo é ácido, em torno de 5,0. Esse pH é mantido por bombas de hidrogênio e de cloro que transportam ativamente íons H^+ e Cl^- do citosol para o interior do lisossomo. Esses íons combinam e formam o ácido clorídrico (HCl) responsável pela acidez do lisossomo. As enzimas digestivas dos lisossomos variam de acordo com o tipo celular e são ativas somente em pH ácido. Por essa razão, caso haja um rompimento do lisossomo, as enzimas não atuam no citoplasma ou na matriz extracelular, pois o pH desses locais é próximo a 7,0.

Uma das funções dos lisossomos é a digestão, que pode ser intracelular ou extracelular. Na digestão intracelular o material digerido pode ser obtido por endocitose, nesse caso ela é conhecida como digestão heterofágica, pois o material é proveniente de fora da célula. Conforme a dimensão do material endocitado, o processo denomina-se de pinocitose (partículas menores) ou fagocitose (partículas maiores, geralmente bactérias). O material endocitado fica dentro de vesículas (fagossomo ou pinossomo) nas quais os lisossomos se fundem e liberam seu conteúdo para que ocorra a digestão. Alguns autores consideram o lisossomo primário aquele que só apresenta as enzimas digestivas e lisossomo secundário aquele que se funde ao fagossomo ou pinossomo.

A outra forma de digestão intracelular é a autofagia, ou seja, digestão de partes da própria célula. Esse processo pode ocorrer para eliminação de organelas envelhecidas, danificadas ou em quantidade excessiva. Também serve como mecanismo de nutrição da célula durante a escassez de alimento do organismo ou nutrição do recém-nascido no pós-parto. Outra função da autofagia é a transformação de um tipo celular, como ocorre no processo de formação das hemácias humanas. Essas células são originadas dos eritroblastos, ocorre à eliminação do núcleo e os lisossomos digerem as outras organelas por autofagia.

Outra função dos lisossomos está relacionada a apoptose, que é a morte programada da célula. Esse processo pode ocorrer para que as células sejam eliminadas durante a embriogênese, ou para que ocorra a eliminação do excesso de células do útero após o parto, ou durante a metamorfose dos anfíbios, no processo de eliminação da cauda.

O material digerido pelas enzimas lisossomais pode ser transferido para o cito-

plasma (alguns lipídios, aminoácidos, monossacarídeos), sofrer exocitose (produtos não digeridos) ou acumular dentro da célula, nesse caso a vesícula com o material acumulado denomina-se de corpo residual.

Outra forma de digestão é a extracelular, em que ocorre a fusão do lisossomo com a membrana plasmática e liberação de enzimas. Porém as enzimas não conseguiriam exercer sua função digestiva devido ao pH, por isso ocorre à acidificação do meio extracelular e só então é possível à digestão. Esse tipo de digestão é realizado por algumas células específicas, como o osteoclasto durante a digestão da matriz óssea e pelo espermatozoide durante o processo de fecundação.

Características gerais do processo de tradução

A compreensão da tradução exige entendimento de processos moleculares, por isso a seguir serão apresentados apenas alguns pontos importantes para o entendimento desse processo em nível celular. A tradução é a produção de uma cadeia de aminoácidos (polipeptídica) tendo como molde uma cadeia de nucleotídeos, conhecida como RNA mensageiro (RNAm). Nesse processo outros ácidos ribonucleicos (RNA) são necessários, como o RNA transportador (RNAt) e RNA ribossômico (RNAr).

O RNAm é uma molécula linear que contém uma sequência de nucleotídeos que

1a. Base	2a. Base				3a. Base
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	A
	Leu	Ser	STOP	STOP	C
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	A
	Ile	Thr	Lys	Arg	C
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Tabela 1 – Tabela do código genético

determina o tipo de proteína que será produzida. A sequência de três nucleotídeos no RNAm é chamada de códon, uma molécula de RNAm apresenta vários códons.

RNAt é uma molécula que apresenta duas regiões importantes, uma denominada anti-códon, que também é constituída por 3 nucleotídeos e outra onde o aminoácido se liga. Existe uma regra para a ligação dos aminoácidos aos RNAt, conforme o anti-códon que o RNAt apresenta, apenas um tipo de aminoácido pode se ligar ao RNAt.

O RNAr juntamente com proteínas forma o ribossomo, que é o local apropriado para ocorrer a tradução. O ribossomo apresenta os sítios A, P e E. Esses sítios são importantes para a correta ligação do códon ao anti-códon e dos aminoácidos entre si.

A tradução é a decodificação da mensagem contida no RNAm para a formação de uma sequência de aminoácidos. Para que ocorra essa decodificação, um código deve ser seguido, o código genético (Tabela 1). Esse código rege que para cada três nucleotídeos do RNAm haja o acréscimo de um aminoácido na cadeia polipeptídica que está sendo construída.

O processo de tradução pode ser dividido em 3 partes: iniciação, elongação e terminação. Na iniciação a subunidade menor do ribossomo, com fatores para a tradução, além de um RNAt carregado com o aminoácido f-metionina ligam-se ao RNAm, sendo que o RNAt ocupa o sítio P do ribossomo. Depois disso a subunidade maior do ribossomo liga-se ao complexo.

Na elongação, o segundo RNAt chega carregando um aminoácido, e ocupa o sítio A. Ocorre uma ligação peptídica entre os aminoácidos que estão no sítio A e P. O ribossomo se desloca ao longo da molécula de RNAm e traduz suas informações, ou seja, para cada três nucleotídeos (códon) é adicionado um aminoácido na cadeia po-

lipeptídica nascente. Para cada novo RNAt que chega entra no sítio A, o RNAt que estava no A se desloca para o sítio P e depois, para o E de onde se desprende para o citosol.

Na etapa de terminação, o ribossomo encontra um códon de parada que pode ser UAA, UAG ou UGA. Para esses códons não existe RNAt correspondente, por isso proteínas (fatores de liberação) ocupam o sítio A e ativam a peptidil-transferase, que é uma enzima que corta a ligação do polipeptídeo com o último RNAt, liberando assim a cadeia polipeptídica.

O processo de tradução que ocorre no retículo endoplasmático rugoso apresenta algumas especificidades. O início do processo ocorre no citoplasma, como descrito acima. A diferença é que a primeira sequência de aminoácidos sintetizada é uma sequência sinal com cerca de 20 aminoácidos, esse sequência é conhecida como peptídeo sinal. Esse peptídeo sinal é reconhecido por uma partícula reconhecidora de sinal (PRS), que é formado por RNA e polipeptídeos. Quando o peptídeo sinal se liga a PRS a tradução é bloqueada. A PRS e os ribossomos são reconhecidos por receptores do retículo endoplasmático rugoso. Em seguida a PRS é liberada e a tradução continua. À medida que o polipeptídeo é sintetizado, ele é translocado para o interior do retículo endoplasmático rugoso através de canais aquosos. Quando o ribossomo chega ao códon de parada, a peptidase sinal cliva a sequência sinal e o polipeptídeo é liberado para dentro do retículo endoplasmático rugoso, conseqüentemente o complexo se desfaz. Algumas proteínas não são liberadas no interior do retículo endoplasmático rugoso, são as proteínas transmembranas que permanecem na membrana do próprio retículo endoplasmático rugoso.

ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE SISTEMA DE ENDOMEMBRANAS

◆ Atividade 1

Objetivo – reconhecer a organização interna de uma célula secretora.

Procedimento:

1 – Analisar as células do pâncreas coradas com dois corantes diferentes, Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (Lâmina A4) e Hematoxilina Eosina (Lâmina K7).

Responda:

A) Esquematizar a célula do pâncreas indicando a região de retículo endoplasmático rugoso e a região das vesículas secretoras

B) Em qual região da célula encontra-se o retículo endoplasmático rugoso? Justifique sua resposta com base na análise das lâminas.

◆ **Atividade 2**

Objetivo - Reconhecer os corpúsculos de Nissl.

Procedimento:

1. - Analisar a lâmina da medula espinhal (Lâmina G2, Hematoxilina Férrica).

Responda:

A) O que são corpúsculos de Nissl?

B) É possível na microscopia óptica visualizar o retículo endoplasmático, ou o complexo de Golgi, individualmente? Justifique sua resposta.

Capítulo 9

Aspectos gerais do núcleo

Nas células eucariotas, geralmente o núcleo é a organela mais evidente.

A presença do núcleo é fundamental para sobrevivência das células eucarióticas. Se uma célula for dividida artificialmente, a parte que não contiver o núcleo sofrerá degeneração (Figura 1).

Número, forma e localização do núcleo

No nosso corpo, as células anucleadas, como as hemácias (Figura 2A), possuem um curto tempo de vida e não se multiplicam, uma vez que o núcleo coordena todas as funções vitais da célula. Elas sobrevivem apenas por um determinado tempo, cerca de 120 dias. As hemácias inicialmente apre-

sentam núcleo e à medida que amadurecem, elas perdem o núcleo. Outro exemplo de célula anucleada são as que formam o cristalino. Por ser uma lente, a presença do núcleo e demais organelas poderia desviar os feixes de luz durante a formação da imagem, por isso um dos passos da maturação desse tecido é a perda gradual das suas organelas.

Na maioria das células, o núcleo é único, porém algumas podem ter dois (binucleada) e até vários núcleos (multinucleada). Essa característica pode ser resultado da duplicação nuclear sem a divisão do citoplasma. Esse processo é comum nos hepatócitos (Figura 2B). Também pode ser o resultado da fusão de várias células, como acontece na formação dos osteoclastos (Figura 2C) e das células musculares estriadas esqueléticas.

A célula também pode ser poliploide, ou seja, ela apresenta apenas um núcleo, porém com o material genético multiplicado. Nesse caso ocorre a replicação do DNA, sem haver a divisão do núcleo. Um exemplo dessa célula no nosso corpo são os megacariócitos, que formam as plaquetas (Figura 3).

O núcleo pode apresentar diversas formas, mas geralmente é constante para cada tipo celular. A forma da célula normalmente acompanha a forma do núcleo (Figura 3).

Existem algumas células que não seguem essa regra, como por exemplo, alguns leucócitos, que são células cúbicas e apresentam núcleo polimórfico, com lóbulos ligados entre si por finas pontes cromáticas

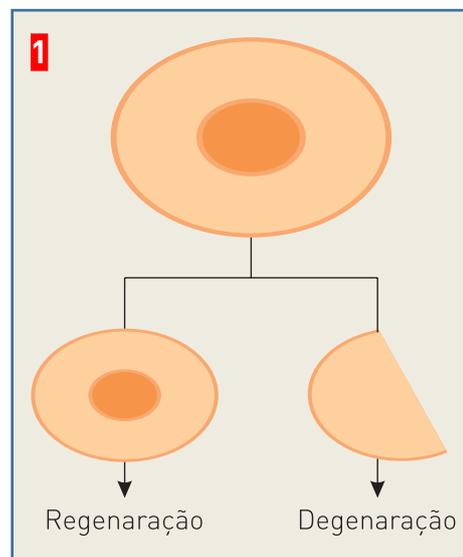
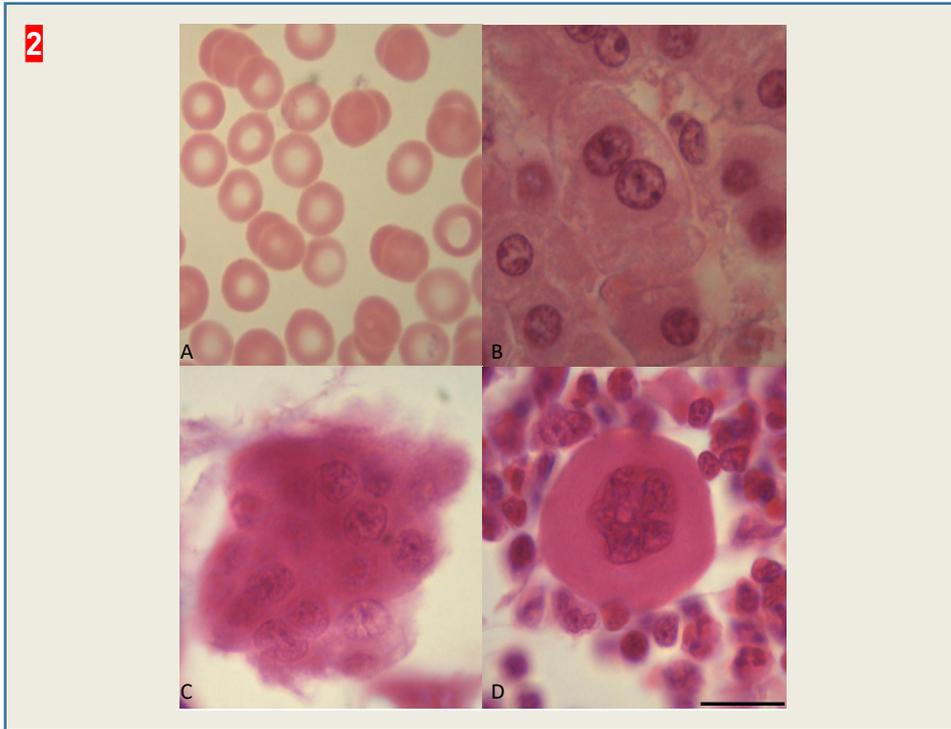


Figura 1 – Importância do núcleo para a sobrevivência da célula



2D).
Figura 2 - A) Hemácia anucleada; B) Hepatócito com dois núcleos; C) Osteoclasto com vários núcleos e D) Megacariócito com núcleo poliploide. Escala: 5 μm

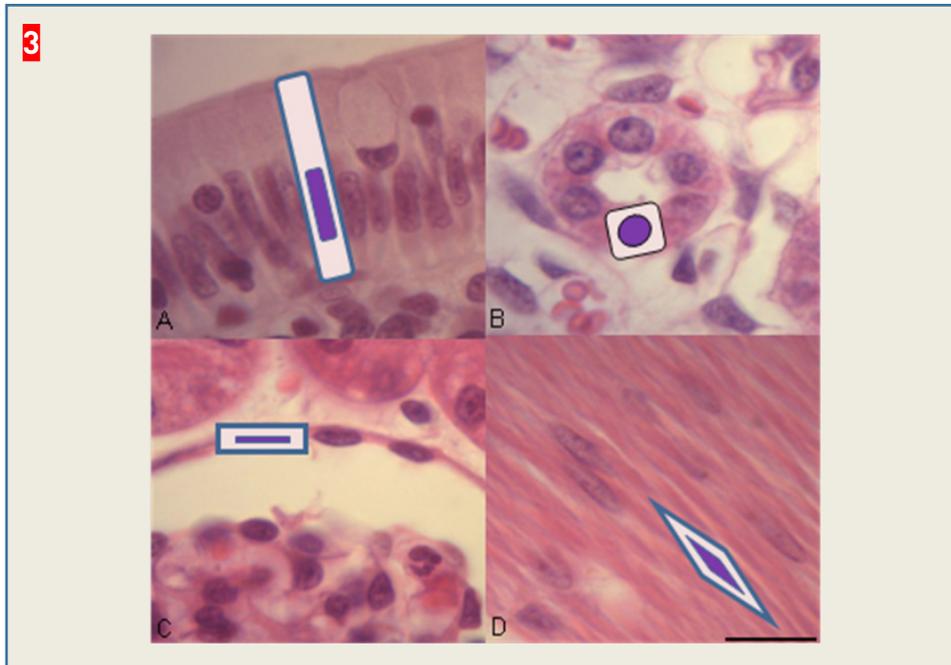
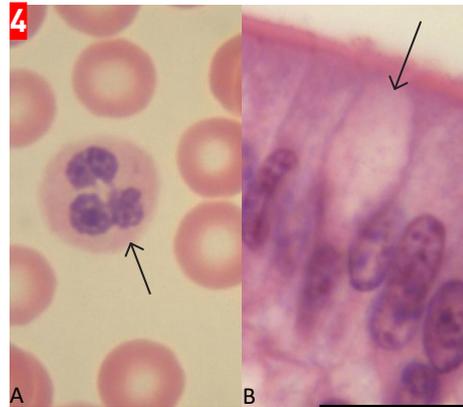


Figura 3 - A) células colunares ou cilíndricas, núcleos colunares ou cilíndricos B) células cúbicas, núcleos arredondados; C) células pavimentosas, núcleos achatados e D) células fusiformes, núcleos fusiformes. Escala: 5 μm

Figura 4 - A) Neutrófilo (seta) e B) Célula caliciforme (seta). Escala: 5 μ m



(Figura 4A). As células caliciformes têm forma de cálice, no entanto o núcleo é colunar (Figura 4B).

Geralmente o núcleo está localizado no centro da célula, porém ele pode ser deslocado para a periferia como ocorre nas células secretoras devido ao acúmulo de secreção no citoplasma (Figura 4B); nas células adiposas uniloculares pelo acúmulo de lipídios na forma de uma grande gota e nas células vegetais, pela presença de um grande vacúolo.

Constituição

O núcleo sofre várias mudanças durante a divisão celular, por isso sua caracteri-

zação geral é feita considerando o estado de interfase. Ele é constituído por um envoltório nuclear, nucléolo, cromatina (eucromatina e heterocromatina) e nucleoplasma. (Figura 5).

O nucleoplasma é uma solução aquosa composta por água, metabólitos, íons, proteínas, além da maior parte do material genético da célula e de diferentes tipos de RNAs e enzimas.

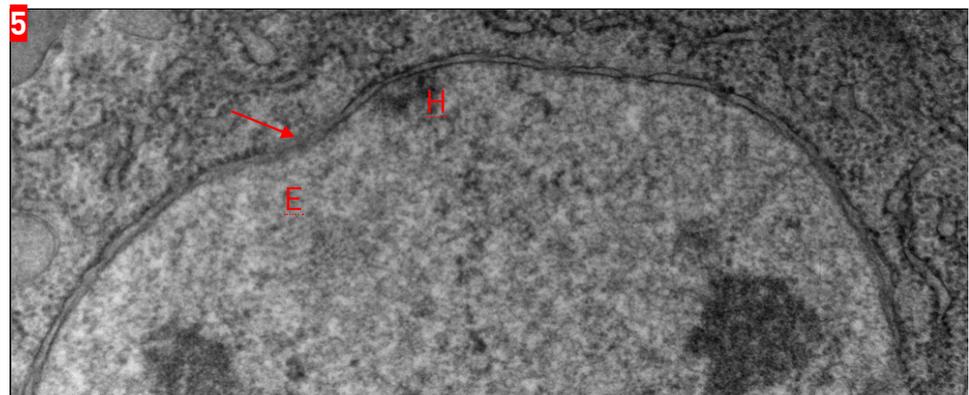
Envoltório Nuclear

O envoltório ou envelope nuclear tem como função separar o material nuclear do restante do citoplasma e fazer a seleção do material que é transportado entre o núcleo e o citoplasma. Essa função de transporte está representada pela quantidade de proteínas que é formado o envoltório, cerca de 70%, uma vez que essas moléculas são responsáveis pela maior parte do transporte.

Não é possível definir o envoltório nuclear na microscopia de luz, pois ele está abaixo do limite de resolução desse tipo de microscopia, porém é possível distinguir do núcleo seu contorno devido à coloração diferencial em relação ao citoplasma (Figura 1, 2 e 3).

Na microscopia eletrônica é possível distinguir que o envoltório é formado por

Figura 5 – Núcleo evidenciando o envoltório nuclear (seta), eucromatina (E) e heterocromatina (H).



duas membranas e um espaço intermembranas ou perinuclear. A membrana externa é contínua com o retículo endoplasmático rugoso e também possui ribossomos aderidos. O espaço perinuclear contém as mesmas proteínas presentes nas cisternas do retículo endoplasmático, portanto, pode-se considerar que a membrana externa é uma porção especializada do retículo endoplasmático (Figura 5).

A membrana interna fica associada à cromatina, a qual geralmente apresenta-se mais compactada e por isso aparece mais fortemente corada (heterocromatina). Além da cromatina a membrana interna do envoltório está associada à lâmina nuclear, que é uma estrutura equivalente ao citoesqueleto do citoplasma. Os seus componentes mais conhecidos são as proteínas laminas A e B, essas proteínas formam redes e estão ausentes na região dos poros, onde ocorre transporte de moléculas grandes.

A lâmina nuclear participa da organização espacial dos componentes nucleares, proporcionando suporte mecânico ao envelope nuclear, ligando a cromatina ao envoltório e o reconstituindo o núcleo após a divisão celular. No início do processo de divisão celular a lamina A é fosforilada, com isso as interações entre as laminas A e B são enfraquecidas e conseqüentemente a lamina nuclear é desfeita. Dessa forma, a membrana nuclear é desestruturada em pequenas vesículas que permanecem ligadas à lamina B. Quando a divisão alcança a fase de anáfase, uma fosfatase retira o fosfato da lâmina A e esta se reassocia com os cromossomos e com a lamina B, que está ligada as vesículas do envoltório nuclear. Dessa forma o envoltório é reconstituído novamente em torno dos cromossomos.

A membrana externa apresenta menor seletividade em relação à interna quanto ao transporte de moléculas. Contudo, parte

do transporte é realizado através dos poros nucleares, que são aberturas formadas a partir da união da membrana externa com a interna. Nesses locais existe um complexo de proteínas que formam os complexos dos poros. Esse complexo é constituído por cerca de 100 proteínas, sendo 30 tipos diferentes, conhecidas como nucleoporinas.

Os complexos do poro permitem a passagem de diversas moléculas para dentro e para fora do núcleo, sendo que algumas moléculas são transportadas de forma passiva e outras de forma ativa (macromoléculas). Pelo diâmetro do complexo do poro não seria possível a passagem de moléculas com mais de 60.000 Dalton, porém o núcleo necessita importar do citoplasma proteínas com peso molecular elevado, como por exemplo: proteínas polimerases do DNA e RNA (100.000 a 200.000 Dalton). A entrada desses tipos de moléculas só é possível pelo fato do complexo do poro ser suficientemente flexível para acomodar sua passagem. Estudos com vários tamanhos de partículas de ouro indicaram que a abertura do poro pode ser dilatada até cerca de 26nm de diâmetro durante o transporte.

Esse transporte é ativo e se dá em resposta a presença de seqüências sinais, conhecidas como NLS (Sinais de Localização Nuclear). São seqüências de 4 a 8 aminoácidos, geralmente com carga positiva (lisina e arginina). As proteínas com a NLS ligam-se às importinas que são reconhecidas pelo complexo do poro e assim o transporte é realizado.

Os RNAs transcritos no núcleo são complexados às proteínas que possuem uma seqüência de exportação nuclear (NES) e depois se ligam às exportinas, que são reconhecidas pelo complexo do poro e assim o transporte para o citoplasma é realizado. Tanto as importinas quanto as exportinas se desligam das proteínas e do RNA depois do

transporte e são reutilizadas pela célula.

Nucléolo

O nucléolo é uma estrutura nuclear esférica não delimitada por membrana, constituído pela região organizadora do nucléolo (RON ou NOR) e uma região da cromatina - rDNA - que contém os principais genes do RNA ribossômico (rRNA). Além do DNA (até 17%), o nucléolo é constituído por RNA (até 10%) e proteínas (85%). Esses componentes estão distribuídos de maneira a formar três áreas dentro do nucléolo, que são identificadas apenas ao microscópio eletrônico.

A transcrição do rDNA e os primeiros passos da biogênese dos ribossomos ocorrem no nucléolo, contudo as subunidades, maior e menor, somente se associam no momento da síntese proteica no citosol (Figura 6).

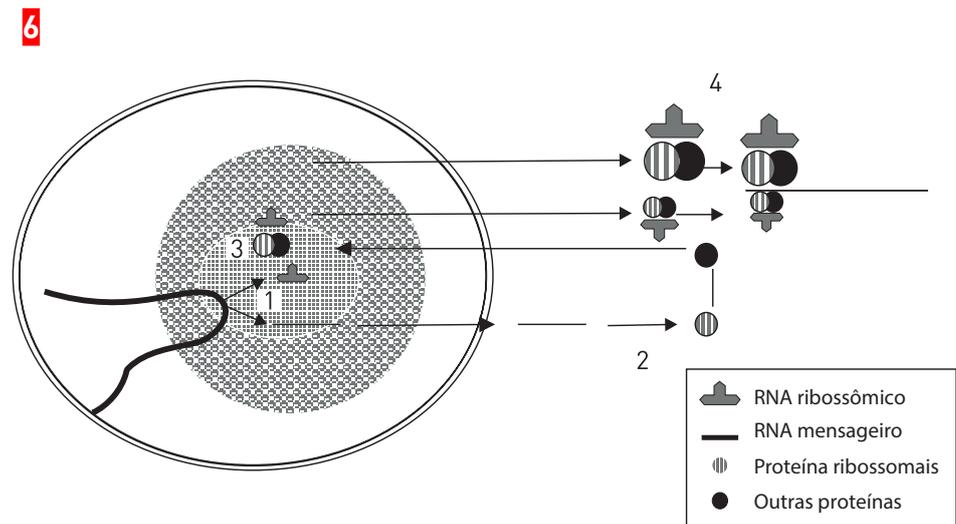
O número de nucléolos varia entre espécies, entre células de um mesmo organismo e até mesmo entre estágios da divisão celular. O número máximo que uma célula pode ter de nucléolos é o mesmo número que ela tem de regiões organizadoras

de nucléolos (RON ou NOR). Porém quando a atividade da célula é intensa e a interfase é longa, pode ocorrer uma associação das RONs e por esta razão o número de nucléolos diminui. Por exemplo, em mamíferos, existem cinco cromossomos com genes para rRNA, no final da mitose são formados dez pequenos nucléolos, porém eles logo se fundem formando apenas um.

Verificou-se também que o tamanho varia conforme o estado funcional da célula, quanto maior a síntese proteica, maior o tamanho do nucléolo. O neurônio é uma célula com alta taxa de produção de proteínas, por isso o seu nucléolo é facilmente observado em microscopia de luz (Figura 7).

O estudo da RON tem várias aplicações, entre elas a determinação da atividade de transcrição do rDNA e o estudo da atividade nuclear durante a gametogênese. A análise dos rearranjos envolvendo esta região tem sido utilizada para o entendimento da evolução cromossômica e nos estudos filogenéticos em diferentes grupos de organismos. Também tem sido utilizada no estudo da determinação sexual, pois em alguns organismos ela apresenta localização preferencial

Figura 6 – Esquema do nucléolo e da Síntese do ribossomo: (1) O rDNA sintetiza RNA ribossômico e RNA mensageiro. No citoplasma da célula (2) o RNAm traduz proteínas ribossomais. Essas proteínas, juntamente com outras proteínas sintetizadas a partir de outros RNA mensageiros, voltam para o nucléolo e (3) se associam ao RNA ribossômico para formar as subunidades ribossômicas maiores e menores (4). As subunidades migram para o citoplasma, onde a menor se liga ao RNAm e depois esse complexo se liga a subunidade maior e inicia o processo de tradução.



nos mesmos cromossomos que carregam os genes que determinam o sexo.

A RON pode ser evidenciada por diferentes técnicas citogenéticas, como a impregnação pela prata (Banda NOR) (Figura 8A) e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA (Figura 8B).

Material genético da célula

O material genético das células é constituído pelos ácidos nucleicos (DNA e RNA), estes se encontram associados a proteínas específicas, as histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas não-histônicas. A estrutura do DNA associado a proteínas é denominada de cromatina. A ligação do DNA às proteínas deve-se ao fato delas possuírem aminoácidos básicos (lisina e arginina) que se ligam aos radicais fosfatos do DNA. Contudo, nem todos radicais fosfatos são neutralizados pelas histonas, o que confere à cromatina um caráter ácido, consequentemente ele se liga a corantes básicos (basofilia).

A cromatina pode estar organizada em diferentes níveis de compactação. Quando ela alcança seu maior nível de compactação, é chamada de cromossomo. Esse nível de compactação ocorre em células em divisão, na fase de metáfase.

A cromatina pode ser classificada em eucromatina e heterocromatina. A heterocromatina é formada por DNA altamente repetitivo, ou seja, quando uma mesma sequência de pares de base se repete por mais de 100.000 vezes. Quando a repetição da sequência é menor que 1000.000 vezes o DNA é considerado moderadamente repetitivo e quando não se repete ou repete poucas vezes o DNA é considerado de sequência única, em ambos os casos essas regiões são chamadas de eucromatina.

A maior parte da cromatina (90%) é constituída pelo DNA moderadamente repe-



Figura 7 - Corpo de neurônio com núcleo interfásico apresentando nucléolo evidente (seta). Escala: 5 μ m

titivo ou de sequência única e é a partir do DNA sequência única que os todos RNAm são sintetizados, com exceção dos genes para histonas que se encontram no DNA moderadamente repetitivo. Devido a grande repetibilidade de bases da heterocromatina, geralmente ela não possui genes.

A heterocromatina representa pouco no genoma das espécies (em média 10%), contudo existem espécies de abelhas nativas em que ela chega a 70% do conteúdo. Algumas espécies também apresentam cromossomos inteiros praticamente heterocromáticos, geralmente isso ocorre para os cromossomos Bs.

A heterocromatina possui distribuição preferencial nas regiões teloméricas, centroméricas e/ou nas regiões organizadoras de nucléolo. Geralmente apresenta-se em blocos e aparece em ambos os homólogos, na mesma posição e com o mesmo tamanho. Ela permanece condensada em todas as células e durante todo o ciclo, por isso a heterocromatina apresenta-se mais corada

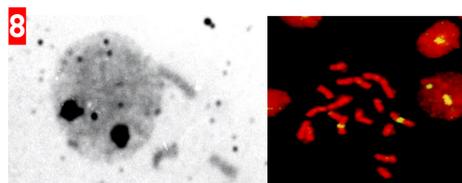


Figura 8 – Esquerda: Núcleo de *Melipona* após a técnica de Banda NOR e direita: cromossomos e núcleos de *Melipona* após a FISH - RON evidenciado em amarelo.

Figura 9 – Cariótipo de *Melipona* após a técnica de Banda C. Traços indicam a heterocromatina na região pericentromérica e B indica cromossomos B heterocromáticos.



nas técnicas rotineiras. Ela inicia a replicação no final da fase S, após a eucromatina e por isso termina depois (Figura 9).

Além da heterocromatina, existem outras regiões que podem permanecer condensadas na célula, porém essas regiões não são formadas por DNA altamente repetitivo. Elas foram classificadas erroneamente como heterocromatina facultativa e heterocromatina tecido-específica. Essas regiões, ora se comportam como eucromatina, ora como heterocromatina. Por exemplo, a facultativa está presente em apenas em um dos homólogos, não se concentra em blocos e tem genes estruturais, por outro lado está reprimida devido à condensação interfásica. Isso pode ser verificado para os cromossomos X de fêmea, um deles permanece condensado dentro das células. Outro exemplo ocorre em homópteros (pulgões e cochonilhas), nos machos o grupo cromossômico paterno se condensa. A heterocromatina tecido-específica, como o próprio nome diz, são regiões que possuem genes, mas que dependendo do tecido, permanecem condensadas, pois não têm genes específicos para aquele tecido. O termo "heterocromatina" refere-se apenas à heterocromatina constitutiva.

Devido ao fato de ter sido considerada geneticamente inativa, ou seja, não possuir genes, a heterocromatina foi pouco estudada durante muito tempo. Contudo já existem diversos estudos que atribuem a ela vários efeitos e funções. Um exemplo é o efeito de posição no padrão de variação, isto é, ocorre repressão da expressão de genes presentes em regiões eucromáticas, por terem sido translocados para uma posição

adjacente à heterocromatina.

A heterocromatina também apresenta um importante papel na determinação da estrutura tridimensional do núcleo interfásico, e sabe-se que o arranjo ordenado dos cromossomos no núcleo interfásico pode ser um meio pelo qual a atividade genética é coordenada dentro do genoma. Sendo assim, ela pode afetar a expressão gênica.

Em células germinativas, a heterocromatina afeta, basicamente, o pareamento, a recombinação e a segregação dos cromossomos.

Uma provável função da heterocromatina seria a de recuperar a estabilidade telomérica após eventos de fissão, ou seja, após a fissão, ocorreria adição de heterocromatina na região quebrada, que corresponde à região telomérica, recuperando assim a estabilidade que era proporcionada pelo telômero. Uma evidência que reforça esta hipótese é o acúmulo de heterocromatina encontrado preferencialmente em um dos braços dos cromossomos, em diversas formas que apresentam elevado número de cromossomos. O mesmo também foi verificado em vespas e abelhas.

No que se refere à função da heterocromatina, também se propõe que esta teria importante papel na proteção da eucromatina contra ataques de vírus, agentes mutagênicos e clastogênicos, agindo como um "guarda-costas". Essa função se deve à posição da heterocromatina no núcleo, formando uma camada dispersa na face periférica deste, protegendo a eucromatina que fica no interior (Figura 10).

Cromossomos metafásicos

Durante a metáfase, os cromossomos são mais facilmente analisados devido sua maior compactação, o que permite sua individualização. Nesta fase eles se encontram alinhados em um plano mediano da célula, formando a placa metafásica. Para aumentar o número de células nesta fase, aplicam-se substâncias antimitóticas às células em divisão. Essas substâncias ligam-se às proteínas que formam as fibras do fuso acromático, denominadas tubulinas, impedindo sua polimerização e consequentemente suprimindo a formação das fibras, ou ainda inativando os fusos já formados.

Os cromossomos metafásicos foram classificados conforme a posição do centrômero: telocêntrico, acrocêntrico, submetacêntrico e metacêntrico (Figura 11).

Os cromossomos metafásicos são formados por duas subunidades paralelas chamadas de cromátides irmãs. Durante a intérfase a cromatina replica-se e origina outra idêntica, elas permanecem ligadas pela região do centrômero e vão se condensando até metáfase. Nesse estágio o conjunto das duas cromatinas é chamado de cromossomo e cada cromatina é denominada de cromátide. As cromátides encontram-se presas entre si pelo centrômero, o qual representa uma constrição que divide a cromátide em dois segmentos, os braços cromossômicos, que dependendo do tipo de cromossomo podem ser diferenciados em braço menor e maior (Figura 12).

O centrômero é uma região com DNA especializado e proteínas específicas, os cinetócoros, que são complexos proteicos, onde os microtúbulos do fuso se ligam. Portanto sua função é permitir a ligação do microtúbulo no cromossomo e garantir assim que cada cromátide migre para o polo

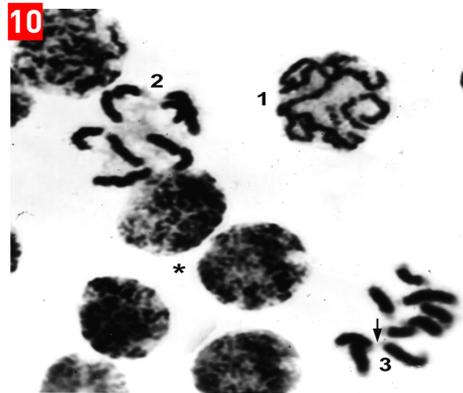


Figura 10 – Células mitóticas de *Melipona seminigra fuscopilosa* em estágios sucessivos de divisão. (1, 2, 3). * núcleo interfásico. Técnica de Banda C.

oposto durante a anáfase. Pode ocorrer em alguns casos outra constrição, chamada de secundária.

Outra região dos cromossomos são os telômeros que são as extremidades de qualquer braço cromossômico. Geralmente possui uma sequência de DNA específica e tem como função impedir associações indevidas das cromatinas (Figura 12).

A descrição das características do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo. A representação deste pode ser feita na forma de cariógrama ou de idiograma. O cariógrama é construído a partir de uma fotografia ou de um desenho detalhado de uma metáfase, os cromossomos são recortados e os homólogos são emparelhados e enumerados dentro de uma determinada ordem (Figura 13). O idio-

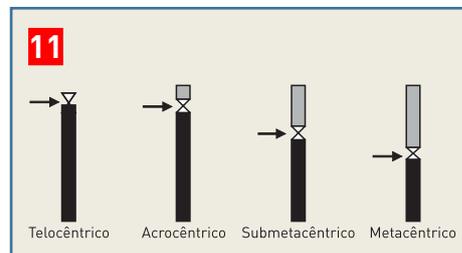
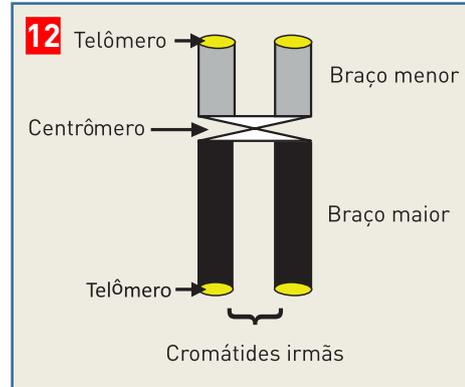


Figura 11 – Tipos morfológicos dos cromossomos. Setas indicam a posição dos centrômeros.

Figura 12 – Esquema do cromossomo metafásico.



grama é uma representação esquemática do cariótipo, utilizando valores médios da posição do centrômero e tamanho de cada cromossomo do conjunto haplóide (Figura 14).

Algumas alterações no genótipo podem levar a mudanças no fenótipo. Algumas dessas alterações genotípicas podem ser detectadas pela citogenética, como por exemplo, as aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, que em humanos pode levar a abortos espontâneos (42%) ou anomalias do desenvolvimento físico e/ou mental do recém-nascido (10%).

As aberrações numéricas podem ser do tipo aneuploidia, quando um dos cromossomos homólogos multiplica ou diminui, ou do tipo euploidia, quando ocorre aumento ou diminuição de todo um conjunto cromossô-

mico.

As síndromes causadas por aneuploidia mais encontradas são as trissomias: Síndrome de Down ou mongolismo (cromossomo 21), Síndrome de Edwards (cromossomo 18), Síndrome de Patau (cromossomo 13). Também ocorrem trissomia envolvendo os cromossomos sexuais: Síndrome de Klinefelter (XXY), e trissomias que não causam síndromes como o XXX e XYY, entre outras. Também pode ocorrer falta de um dos cromossomos sexuais, como no caso da Síndrome de Turner (X0)

Indivíduos com euploidia, geralmente não sobrevivem. Existem casos de indivíduos adultos com quimerismo diploide-triploide, ou seja, células com um conjunto de cromossomos normais (2n) e células triplóides (3n).

As aberrações estruturais podem ser causadas por radiações, infecções, produtos químicos, entre outros. Um tipo é a deleção, onde ocorrem duas quebras em um mesmo braço cromossômico, o que leva à perda de um segmento. Um exemplo típico de deleção é a perda de um segmento do cromossomo 5 (Síndrome de cri-du-chat ou miado de gato). Pode também haver perda total de um dos braços cromossômicos, isso é mais comum para os cromossomos sexuais.

Pode também acontecer inversões, ou seja, após o cromossomo sofrer duas que-

Figura 13 – Cariograma de *Melipona* (abelha nativa)

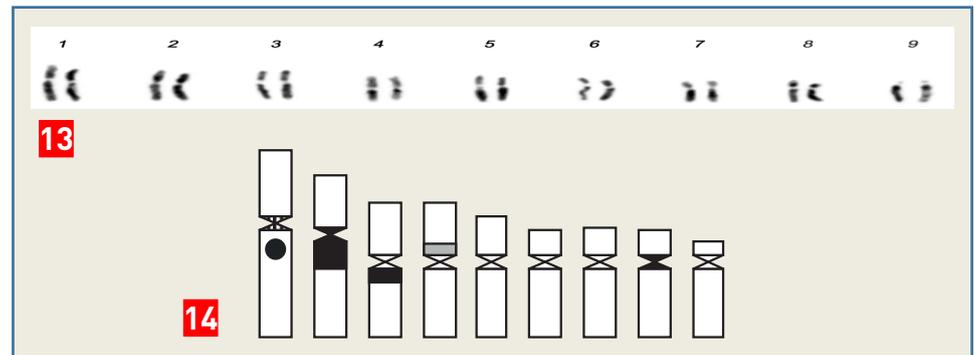


Figura 14 – Idiograma de *Melipona* (abelha nativa).

bras, o fragmento é ligado novamente, porém de forma invertida. Ou ainda, após dois cromossomos não-homólogos sofrerem quebras e seus segmentos são ligados nos cromossomos do outro, esse evento é chamado de translocação. Um exemplo é a leucemia mielocítica crônica, em que uma parte do cromossomo 22 foi translocado para outro cromossomo. O linfoma de Burkitt, é um exemplo de translocação do cromossomo 14.

Cromossomos gigantes

Em alguns organismos a cromatina pode-se comportar de maneira fisiologicamente diferente durante o ciclo celular, formando os 'cromossomos gigantes', que podem ser de dois tipos: politênicos e plumosos. Os cromossomos politênicos foram descobertos em 1881, nas glândulas salivares do díptero *Chironomus* (Figura 15).

Os cromossomos politênicos são produzidos pela replicação da molécula de DNA por dez vezes sem que ocorra a separação das cromátides. Cada cromossomo contém, então, 210 ou 1.024 moléculas de DNA, as quais estão associadas em uma série lateral. São encontrados apenas na fase larval

dos dípteros, em praticamente todos os seus órgãos, porém nas glândulas salivares os politênicos se apresentam mais desenvolvidos. Em *Drosophila* eles medem cerca de 1.800 a 2.000 μm de comprimento, enquanto seus cromossomos metafásicos têm cerca de 7 μm . Essa diferença de tamanho se deve ao fato de que nos núcleos politênicos os cromossomos se encontram praticamente desespiralizados.

Em determinadas condições, os cromômeros (corpúsculos) de todos os cromonemas (fio de DNA + histonas) de uma determinada faixa podem se descondensar dando origem a uma estrutura de aspecto inchada e menos densa, chamada "pufe". Em algumas espécies, principalmente no gênero *Chironomus*, formam-se pufes excepcionalmente grandes, denominados anéis de Balbiani (Figura 16, P).

Os cromossomos politênicos apresentam uma constante sinapse somática, porém se um membro do seu par homólogo é alterado ocorre uma irregularidade no pareamento. Essas irregularidades são observáveis, o que torna possível o reconhecimento de modificações cromossômicas e a sua localização.

Outro tipo de cromossomo gigante é o

15

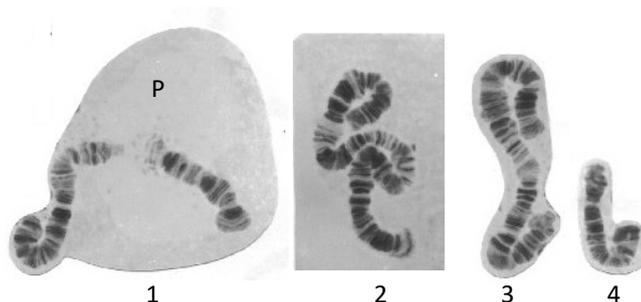


Figura 15 – Cromossomos politênicos de glândulas salivares de larva de Chironomidae, corados com orceína acética. P (pufe), $2n = 4$ cromossomos (1, 2, 3, 4 em ordem decrescente de tamanho).

cromossomo plumoso. Assim como o politênico, o plumoso só ocorre em alguns organismos e em certas fases. Veja as comparações na Tabela 1. ■

CARACTERÍSTICAS	PLUMOSOS	POLITÊNICOS
DIMENSÕES	Até 800 μm de comprimento	De 150 a 250 μm de comprimento. Podendo chegar até 1.500 μm em células infectadas por vírus ou microsporídeos
ORGANISMOS	Ovócitos de vários peixes, anfíbios, répteis e aves, oócitos de tubarão, algumas células vegetais e no espermatócito de <i>Drosophila</i>	Células somáticas (glândulas salivares, tubos de Malpighi, trato digestivo, músculos, corpo gorduroso, célula de nutrição) de larvas de insetos (dípteros, Colembólídeos) e protozoários ciliados
FASE	Prófase meiótica (diplóteno)	Intérfase
FUNÇÃO	Síntese intensa de RNA	Síntese intensa de RNA
ESTRUTURA	Os homólogos ficam unidos e apresentam cromômeros ao longo dos cromossomos, que aparecem como regiões granulosas, com maior espiralização dos nucleofilamentos, que não transcrevem. Os cromômeros desespiralizam, o que leva a formação de alças finas, distribuídas aos pares, simétricas e com características morfológicas próprias e constantes. Essas alças são ricas principalmente em RNA e proteínas (99%)	Ocorrem vários ciclos de replicação sem a separação das cromátides (endomitose) e então ocorre o pareamento ponto por ponto dos cromossomos. Apresentam cromômeros, que são regiões de maior espiralização e regiões intercromoméricas, que possui menor concentração de DNA e proteínas. Os cromômeros ficam justapostos, originando estrias transversais (bandas) Algumas regiões dos cromômeros se desespiralizam, processo reversível. Essas regiões são chamadas de pufes ou anel de Balbiane ou bulbos. Os anéis de Balbiane são pufes que ocorrem em <i>Chironomus</i> . Bulbos são pequenos pufes de RNA que ocorrem em sciarídeos

Tabela 1 – Comparações entre cromossomos plumosos e politênicos

ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE ASPECTOS GERAIS DO NÚCLEO

♦ Atividade 1

Objetivos - Analisar diferentes tipos celulares e comparar a forma do núcleo com a forma da célula, Verificar a posição do núcleo e o número de nucléolo por célula.

Procedimentos:

1. - Analisar diferentes células em microscopia óptica

Responda:

A) Esquematizar as células e indicar o(s) núcleo(s) e o (s) nucléolo(s).

Lâmina A3 – Vesícula Biliar (HE) – células epiteliais	Lâmina B6 – Polpa dental (HE) – células epiteliais	Lâmina Q1 – Rim (HE) – região dos tubos coletores
Lâmina L5 – Língua (HE) – células musculares estriadas esqueléticas	Lâmina K17 – Intestino (HE) – células musculares lisas	Lâmina I5 – Timo (HE) – adipócitos uniloculares e multiloculares
Lâmina K6 – Fígado (HE) – hepatócitos	Lâmina G4 – Cerebelo (Método Bielschowsky) – células de Purkinje	Lâmina Esfregaço sanguíneo (Wright) – hemácia e neutrófilo

B) Preencha a tabela:

Lâmina	Posição do núcleo	Nº de núcleos	Nº de nucléolos
A3			
B6			
Q1			
L5			
K17			
I5			
K6			
G4			
Esfregaço			

C) Existe relação entre a forma do núcleo e a forma da célula?

D) Qual o número de núcleo mais encontrado?

E) Qual o número de nucléolos mais encontrado?

◆ **Atividade 2**

Objetivos - Analisar células poliploides e multinucleadas. Discutir a origem desses tipos de células em relação aos núcleos.

Procedimentos:

1. - Analisar diferentes células em microscopia óptica

Responda:

A) Esquematizar um osteoclasto e um megacariócito e indicar se eles são poliplóides ou multinucleados.

Lâmina D4 – Osso Longo (HE)

Osteoclasto – Tipo _____ Megacariócito - Tipo _____

B) Explique como ocorre a poliploidização e a multinuclearidade.

C) Cite outro exemplo de célula multinucleada.

Capítulo 10

Ciclo celular mitótico e Meiose

Em algum momento fomos seres unicelulares, quando o ovócito da nossa mãe foi fecundado pelo espermatozoide do nosso pai. A partir desse momento começa o processo de desenvolvimento, para isso o ovo sofre várias multiplicações celulares, formando várias células, as quais se diferenciam e formam os órgãos do nosso corpo. À medida que o tempo passa, esses órgãos se desenvolvem e para isso também são requeridas muitas multiplicações celulares. Mesmo quando o indivíduo já é adulto, várias células do nosso corpo ainda são formadas, para repor células que normalmente são perdidas, como por exemplo, as células epiteliais que constantemente sofrem perda natural, as espermatogônias que originam os espermatozoides e as células-tronco hematopoiéticas.

A perda celular também pode ser decorrente de uma lesão, e dependendo da extensão da lesão no órgão ou tecido, esse pode sofrer regeneração ou cicatrização. Em ambos os casos também ocorre a multi-

plicação celular. Para os seres unicelulares a multiplicação celular é a própria geração de nova vida.

Nem todas as células do nosso organismo possuem a capacidade de se multiplicar, pois algumas células são altamente especializadas, como por exemplo, os neurônios e as hemácias. Outras células só entram em mitose quando recebem um estímulo apropriado, como os hepatócitos após a remoção de parte do fígado.

Intérfase

Para as células se multiplicarem, elas passam por um processo chamado de ciclo celular. Este compreende a intérfase e um processo de divisão celular, a mitose. A intérfase é uma fase em que ocorre a duplicação de todo material nuclear e citoplasmático da célula, sendo dividida nas subfases G1, S, G2. A fase S, que é a mais extensa, é caracterizada pela replicação do DNA e das histonas, nas fases G1 e G2 ocorre a transcrição dos RNA e tradução das proteínas.

Na fase S, quando o DNA é replicado, as duas fitas de DNA permanecem unidas ligadas por proteínas (coesinas) na região do centrômero. Devido à replicação do DNA o seu conteúdo dobra de 2C para 4C, porém o número cromossômico permanece igual (2N).

Grande parte das nossas células está em intérfase, sendo que algumas estão no período G0, um período que antecede a fase S, onde as células apresentam-se temporá-

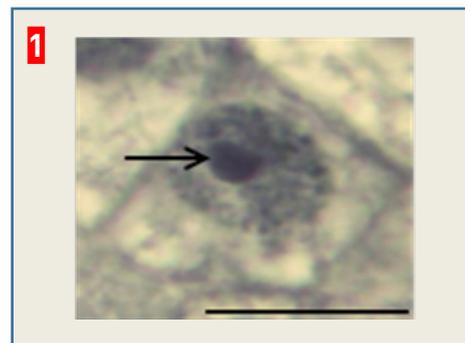


Figura 1 – Célula de cebola em intérfase com nucléolo evidente (seta) corada com Hematoxilina férrica. Escala: 5 μm

ria ou permanentemente inalteradas.

O ciclo celular é altamente regulado, os eventos ocorrem em uma sequência determinada e a ordem deve ser mantida mesmo se um estágio estender-se mais do que o normal. Existe um sistema controle, que não desencadeia o próximo passo antes do término do estágio precedente. Esse controle é realizado por fatores citoplasmáticos, que são proteínas (ciclínas) que regulam enzimas (quinases) que desencadeiam os processos de multiplicação ou divisão.

Durante a divisão celular, a lâmina nuclear é desintegrada e o envoltório nuclear é dissociado em pequenas vesículas e sua reestruturação inicia-se na telófase. Para a reconstituição, várias vesículas do envoltório se fundem umas às outras em volta dos cromossomos. Sabe-se que as proteínas da lâmina nuclear apresentam um papel fundamental nessa reconstituição, influenciando na associação das vesículas em volta dos cromossomos (como visto no capítulo sobre núcleo).

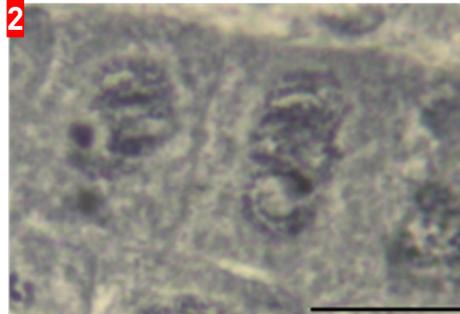


Figura 2 – Célula de cebola em prófase corada com Hematoxilina férrica. Escala: 5 μm

Mitose

Considerando os objetivos de crescer, desenvolver ou repor é necessário um processo que permita a formação de células idênticas a partir de células pré-existentes. Para isso a célula passa por um processo de divisão denominada mitose. Esse processo é dividido em fases, denominadas prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Na prófase inicia o processo de condensação gradual do DNA, isso só é possível

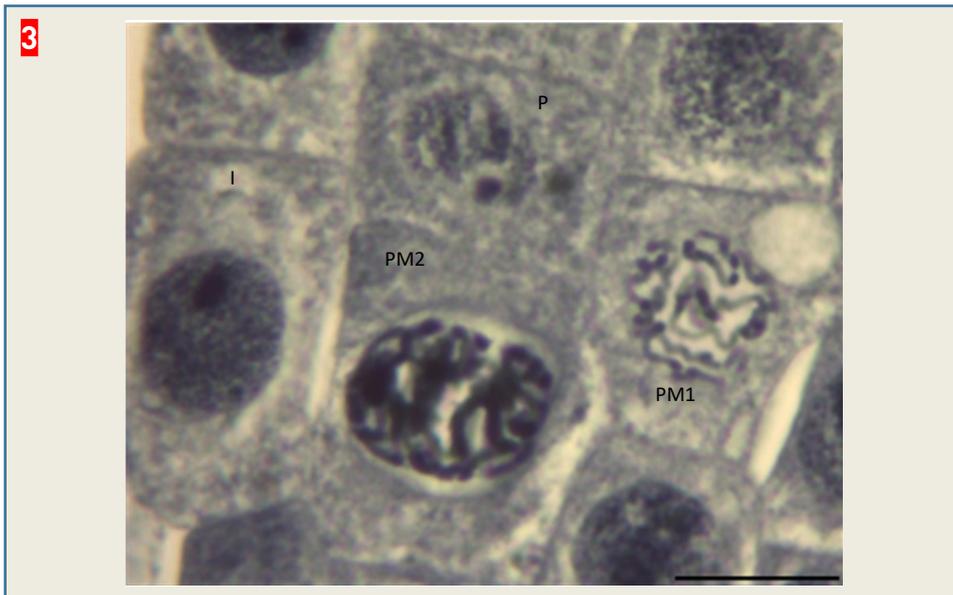


Figura 3 – Célula de cebola em intérfase (I), prófase (P) e estágios crescentes da prometáfase (PM1 e PM2) corada com Hematoxilina férrica. Escala: 5 μm

Figura 4 – Célula de cebola em metáfase corada com Hematoxilina férrica. Setas indicam fusos. Escala: 5 μm



graças a proteínas específicas da cromatina. O nucléolo se desorganiza e deixa de produzir o rRNA, a produção de subunidades ribossômicas é finalizada ou os precursores das subunidades acompanham os cromossomos. Nessa fase os centríolos duplicam e os centrossomos migram para os polos opostos da célula, iniciando a formação do fuso a partir do centrossomos (Figura 2).

A maioria das células animais possui centríolo, contudo as células vegetais não os possuem. Portanto a formação do fuso ocorre a partir do centrossomo, este possuindo ou não os centríolos.

Na pró-metáfase a cromatina continua condensando, o envoltório se desorganiza, sendo que a membrana do núcleo se rompe em vários pontos, formando vesículas. Os complexos do poro se dissociam e a lâmina nuclear se despolimeriza. Nessa fase os centrossomos alcançam os polos e as fibras dos fusos alcançam os cinetócoros, que são proteínas localizadas nos centrômeros dos cromossomos (Figura 3).

Na metáfase a cromatina alcança o máximo da sua condensação. Nessa fase os fusos mitóticos alinham os cromossomos na placa metafásica (Figura 4).

Na anáfase ocorre a separação e migração das cromátides para os polos opostos. Para isso as fibras do fuso encurtam (perda de tubulinas nas extremidades) e aumenta a distância entre os polos (adição de tubulinas). Nessa fase ocorre o início da citocinese (Figura 5).

Na telófase as cromátides alcançam os polos opostos, inicia o processo de descondensação e ocorre a reconstituição do envoltório nuclear entorno delas. A actina forma o anel contrátil, normalmente no meio da célula, fazendo então a divisão do citoplasma (citocinese). O nucléolo é reorganizado e ocorre a importação de proteínas nucleares (Figura 5).

A citocinese em célula animal inicia com a formação de um 'anel contrátil', que é formado onde existem os microtúbulos remanescentes do fuso mitótico. Esse anel é composto principalmente de actina e miosina. O anel inicia sua montagem formando plano perpendicular à célula, exatamente abaixo da membrana plasmática. À medida que o anel se contrai, puxa a membrana para dentro dividindo a célula em duas. A força é gerada pelo deslizamento dos filamentos de actina contra os filamentos de miosina.

Na célula vegetal, a citocinese tem início pela formação de uma nova parede celular dentro da célula. Esse processo é conduzido pelo fragmoplasto, que é formado por vestígios de microtúbulos na região equatorial do fuso mitótico velho. A nova parede celular em crescimento é envolvida por uma membrana que se alarga para dividir o citoplasma em dois, que começa a se formar no citoplasma entre dois conjuntos de cromossomos que se agregam no início da telófase. A parede começa a ser formada quando vesículas do complexo de Golgi, preenchidas com polissacarídeos e glicoproteínas da matriz da parede celular dirigem-se ao

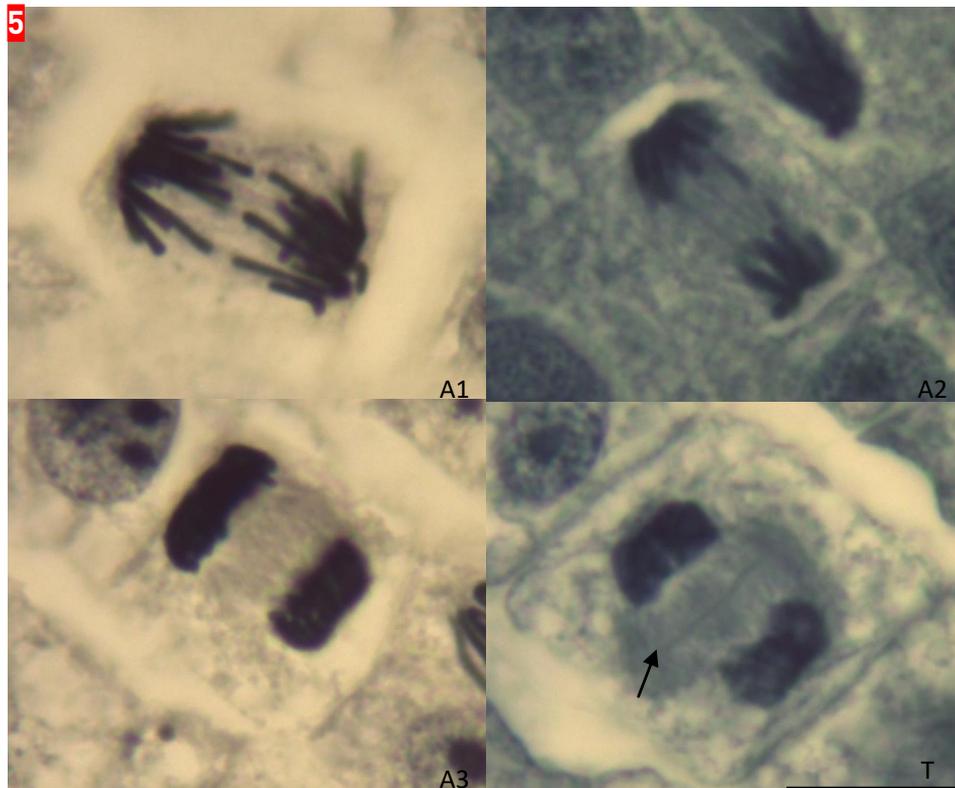


Figura 5 – Células de cebola em estágios sucessivos da anáfase (A1, A2, A3) e na telófase (T) coradas com Hematoxilina férrica. Seta indica fragmoplasto. Escala: 5 μm

fragmoplasto. Elas se fundem e se expandem para fora até a membrana plasmática e a parede celular, dividindo assim a célula em duas. A construção final da nova parede celular ocorre pela adição de microfibras de celulose dentro da matriz.

De acordo com a figura 6, a cromatina tende aumento crescente de compactação desde a intérfase até a metáfase, e após essa fase ela tende a desespiralizar. A cromatina é duplicada na fase S da intérfase e forma duas cromátides irmãs, quando essas cromátides atingem o maior grau de condensação, durante a metáfase, são chamadas de cromossomo. As cromátides são separadas na anáfase mitótica.

Durante o ciclo celular a cromatina sofre algumas mudanças como já foi mencio-

nado acima e para entender melhor essas mudanças, segue o esquema abaixo (Figura 7).

De acordo com a figura 6, a cromatina tende aumento crescente de compactação desde a intérfase até a metáfase, e após essa fase ela tende a desespiralizar. A cromatina é duplicada na fase S da intérfase e forma duas cromátides irmãs, quando essas cromátides atingem o maior grau de condensação, durante a metáfase, são chamadas de cromossomo. As cromátides são separadas na anáfase mitótica.

Meiose

Como já foi visto, a mitose é um processo de divisão celular, que conserva as

características genéticas das células somáticas. Existe outro tipo de divisão celular que não ocorre nas células somáticas e sim em células denominadas germinativas, essa divisão é conhecida como meiose.

A meiose permite que o número diplóide ($2n$) de cromossomos de uma espécie seja reduzido a um número haplóide, isso acontece porque a célula passa por duas divisões citoplasmáticas e apenas uma duplicação do material genético. Graças à meiose é possível a reprodução sexuada, em que células gaméticas masculinas e femininas se fundem reconstituindo o número cromossômico da espécie.

A meiose também garante a variabilidade genética, que é muito importante para a adaptação das espécies às novas condições ambientais. Essa variabilidade é gerada através da segregação ao acaso dos cromossomos na anáfase e a permuta gênica, ou seja, troca de segmentos homólogos que

leva ao surgimento de cromátides com combinações gênicas novas. Este evento ocorre quando há quebra simultâneas de duas cromátides dos cromossomos bivalentes, ambas quebram exatamente na mesma posição e em seguida ocorre a fusão cruzada das cromátides. Este ponto de permuta é o quiasma.

A intérfase da meiose é igual a intérfase da mitose, o que diferencia são os eventos que ocorrem nas fases subsequentes.

A meiose apresenta as mesmas fases que a mitose, contudo ocorrem duas divisões (meiose I e II), sendo que a meiose I é reducional e a meiose II é equacional. Entre as duas meioses não há uma intérfase, mas uma fase chamada intercinese, em que não há replicação do DNA. A seguir os eventos chaves que ocorrem em cada fase.

A prófase I é 200 vezes mais longa que a da mitose. Nas mulheres ela dura desde a fase embrionária até a puberdade, e nos

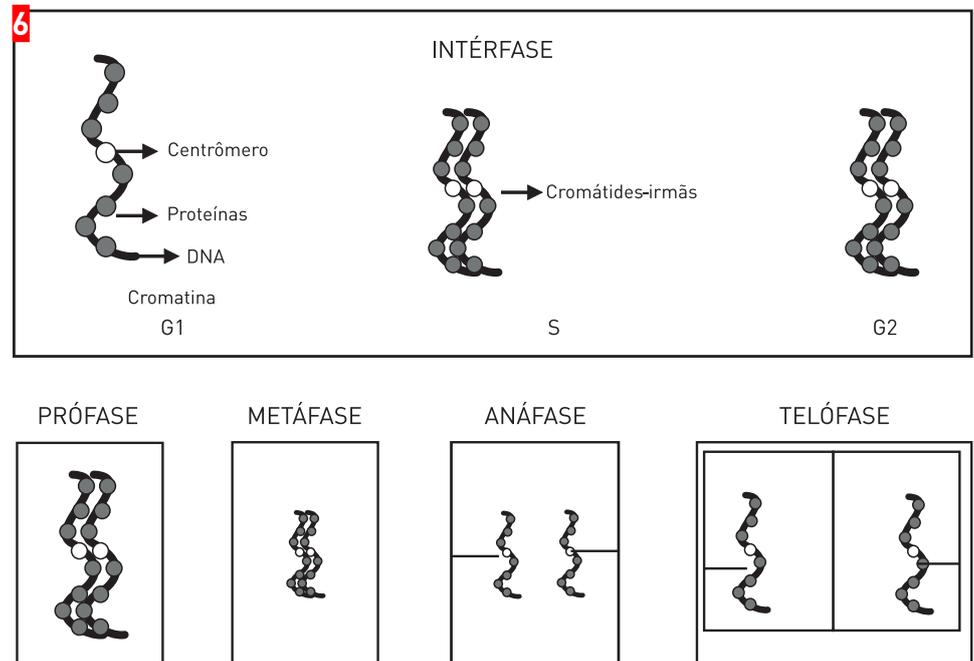


Figura 6 -
Comportamento da cromatina durante o ciclo celular.

homens só acontece na puberdade e dura aproximadamente 14 dias. Ela é subdividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (Figura 7). As imagens das fases da meiose na Figura 7 pertencem a diferentes gêneros de gafanhotos, como *Caruaruacris*, *Orphulella*, *Amblytropidia* e *Vilerna*. Algumas fases da meiose não são encontradas em gafanhotos.

No leptóteno inicia a condensação da cromatina e a aproximação dos homólogos. Entre os cromossomos homólogos inicia a formação dos elementos laterais do complexo sinaptonêmico. Esse complexo é formado por diversas proteínas e permite o emparelhamento dos pares dos cromossomos homólogos (sinapse) (Figura 7A).

Em zigóteno termina a formação do complexo sinaptonêmico, o que permite a associação dos homólogos. Essa associação é um evento chave no processo de meiose, pois garante a disjunção dos homólogos na anáfase I, além de permitir a recombinação. Como os cromossomos homólogos estão pareados, eles são chamados de tétrades ou bivalentes. Na imagem pode perceber que os cromossomos se tornam mais condensados em zigóteno (Figura 7B).

Em paquíteno forma-se o nódulo de

recombinação, que é um complexo multienzimático que permite a ocorrência do processo molecular da recombinação genética ou permuta ou *crossing-over*. No paquíteno ocorre a permuta, porém é observada citologicamente somente nas próximas fases (Figura 7C).

Em diplóteno inicia a desorganização do complexo sinaptonêmico, consequentemente a separação dos homólogos. Nessa fase é possível observar os quiasmas, que são locais onde ocorreram as permutas. É uma fase que pode durar muito tempo, nas mulheres é chamada de dictióteno e ocorre nos ovócitos ainda na vida intrauterina e permanece a ovulação. Em alguns organismos, como peixes, aves e répteis, podem ser formados os cromossomos plumosos nessa fase (Figura 7D, 7E).

Na diacinese ocorre o aumento da repulsão entre os homólogos, consequentemente ocorre o deslocamento dos quiasmas para as extremidades. Nessa fase são observados eventos descritos na mitose que são: desorganização do envoltório nuclear, ligação dos cromossomos às fibras do fuso e movimento dos cromossomos para a placa equatorial. No final da diacinese observam-se os cromossomos mais condensados

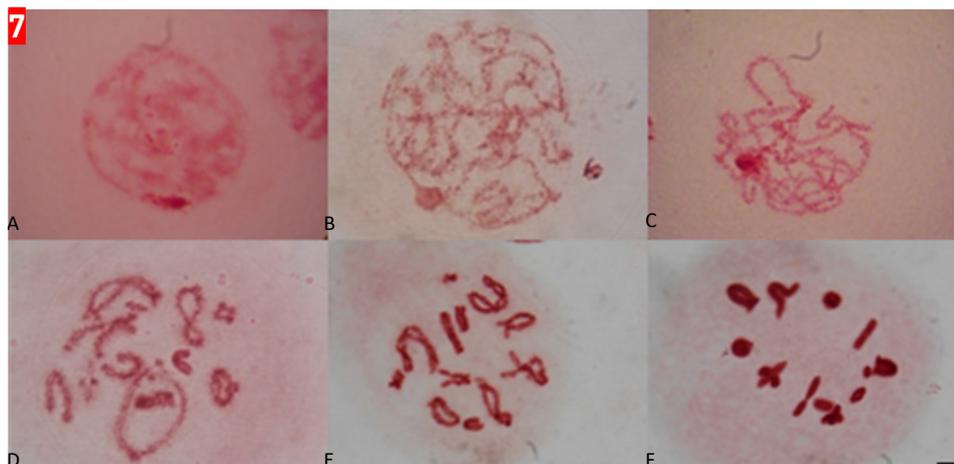


Figura 7 – Subfases da Prófase I de gafanhotos: A) Leptóteno, B) Zigóteno, C) Paquíteno, D) Início do diplóteno, E) Fim do diplóteno e F) Diacinese. Escala: 5 µm

que nas fases anteriores. O cromossomo X esteve sempre mais condensado que os demais e não fez permuta gênica (Figura 7F).

Na Metáfase I os cromossomos homólogos continuam juntos pelos quiasmas e localizam-se na placa equatorial, ficando lado a lado. Diferentemente da mitose, cada cromossomo homólogo se dispõe com seus dois cinetócoros voltados para o mesmo polo (Figura 8A).

Na anáfase I ocorre a separação dos cromossomos homólogos e por isso o número cromossômico é reduzido de $2n$ para n . O conteúdo de DNA também é reduzido, passa de $4C$ para $2C$ (Figura 8B, 8C, 8D)

Na telófase I os cromossomos com duas cromátides alcançam os polos opostos e iniciam a descondensação. O envoltório nuclear é reconstituído, ocorre a citocinese e são formadas duas células n .

Após a intercinese vem a Prófase II onde os cromossomos reiniciam a condensação, o envoltório é desorganizado e o fuso é montado novamente.

Na Metáfase II os cromossomos estão localizados na região equatorial e os cinetócoros das cromátides-irmãs orientados para polos opostos (Figura 8E).

Na Anáfase II as cromátides irmãs migram para os polos opostos (Figura 8F, 8G, 8H).

Finalmente na Telófase II os cromossomos descondensam, o envoltório é reconstituído, o nucléolo reaparece, ocorre a citocinese e são formadas 4 células N, C (Figura 8I).

A gametogênese humana feminina inicia ainda na vida intrauterina. Do 3º ao 7º mês, as ovogônias entram em mitose e originam os ovócitos I. Estes entram em meio-

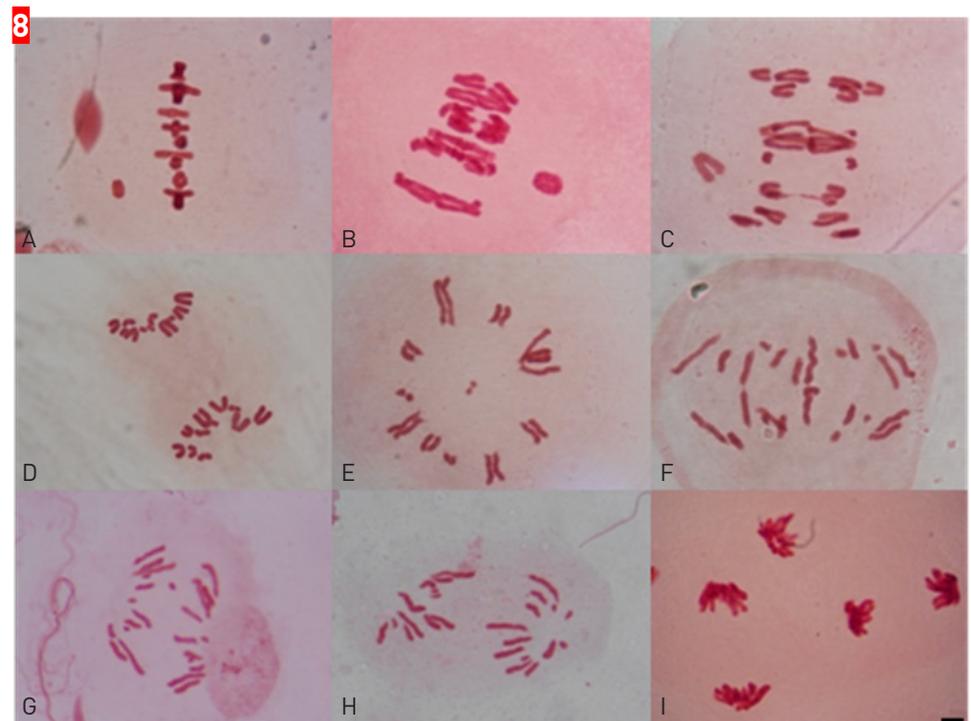


Figura 8 – Meiose de gafanhoto. A) Metáfase I, B) Início de Anáfase, C) Anáfase mais avançada, D) Anáfase final, E) Metáfase II com vista polar, F) Início da Anáfase II, G) Anáfase II, H) Fim da anáfase II e I) Telófase II. Escala: 5 μ m

se I e param em diplóteno. Quando a menina entra na puberdade e começa a ovular o ovócito I termina a meiose I, produz um ovócito II e um corpúsculo primário, que fica aderido ao ovócito II e depois é expulso. O ovócito II entra na meiose II e fica estacionado em metáfase II. Esse ovócito só terminará

a meiose II quando for fecundado, formando um óvulo e um corpúsculo secundário.

Nos homens as espermatogônias sofrem mitose até a infância. Na puberdade são formados os espermatozoides por meio da meiose. Cada espermatogônia origina quatro espermatozoides. ■

ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE CICLO CELULAR MITÓTICO E MEIOSE

◆ Atividade 1

Objetivo - Reconhecer as fases do ciclo celular mitótico em células vegetais - raiz de cebola (*Allium cepa*), $2n = 8$ cromossomos e realizar a técnica de esmagamento.

Procedimentos:

- 1 - Obter as raízes de cebola:
 - 1.1 - Retirar os catafilos secos e as raízes velhas da cebola;
 - 1.2 - Colocar a parte inferior da cebola mergulhada em um frasco escuro com água;
 - 1.3 - Deixar por aproximadamente três dias. As raízes novas devem ficar sempre em contato com a água, caso necessário colocar mais água durante os três dias;
 - 1.4 - Retirar as raízes
 - 2 - Fixar as raízes em Carnoy por 2 a 3 horas. Caso as raízes não sejam utilizadas após esse tempo, elas deverão ser mantidas em geladeira no álcool 70%;
 - 3 - Mergulhar as raízes em solução para hidrólise ácida por 10 minutos em temperatura ambiente ou 5 minutos a 60°C;
 - 4 - Interromper a hidrólise, para isso mergulhar as raízes em Carnoy por 10 minutos;
 - 5 - Sobre a lâmina, retirar o excesso de raiz com um estilete, deixando somente a região terminal (coifa);
 - 6 - Pingar 3 gotas de Orceína sobre a raiz e deixar agir por 6 minutos;
 - 7 - Cobrir com uma lamínula e fazer o esmagamento. Colocar um pedaço de papel de filtro sobre a lamínula e com o polegar, ou a extremidade de um lápis, esmagar a raiz com firmeza. Cuidado para não deslocar ou quebrar a lamínula;
 - 8 - Caso a lâmina for analisada posteriormente, deve vedar as bordas da lamínula com esmalte de unha para evitar o ressecamento. Caso queira observar após alguns dias, deve-se guardar em recipiente bem vedado na geladeira.
- OBS.: O horário em que as raízes apresentam maior número de divisões mitóticas é entre: 10 e 11 horas, horário em que as mesmas devem ser coletadas e fixadas. Porém, dependendo da região do país e da época do ano, esse horário pode ser diferente.

Receitas

1 - Solução fixadora de Carnoy

Álcool etílico	75 ml
Ácido acético glacial	25 ml

- Misturar os reagentes somente na hora do uso.

2 - Solução para hidrólise ácida

Álcool etílico	50 ml
HCl 1 N	50 ml

- Misturar os reagentes somente na hora do uso.

3 - Orceína lácto-acética

Orceína	1 g
Ácido acético glacial	25 ml
Ácido láctico 70%	25 ml

- Deixar no agitador por uma hora ou mais;

- Guardar na geladeira, em frasco escuro;

- Filtrar na hora do uso.

Responda:

A) Descrever os principais eventos de cada fase do ciclo celular mitótico

◆ **Atividade 2**

Objetivo: Identificar as fases do ciclo celular mitótico.

Procedimentos:

1 – Analisar a Figura 1a.

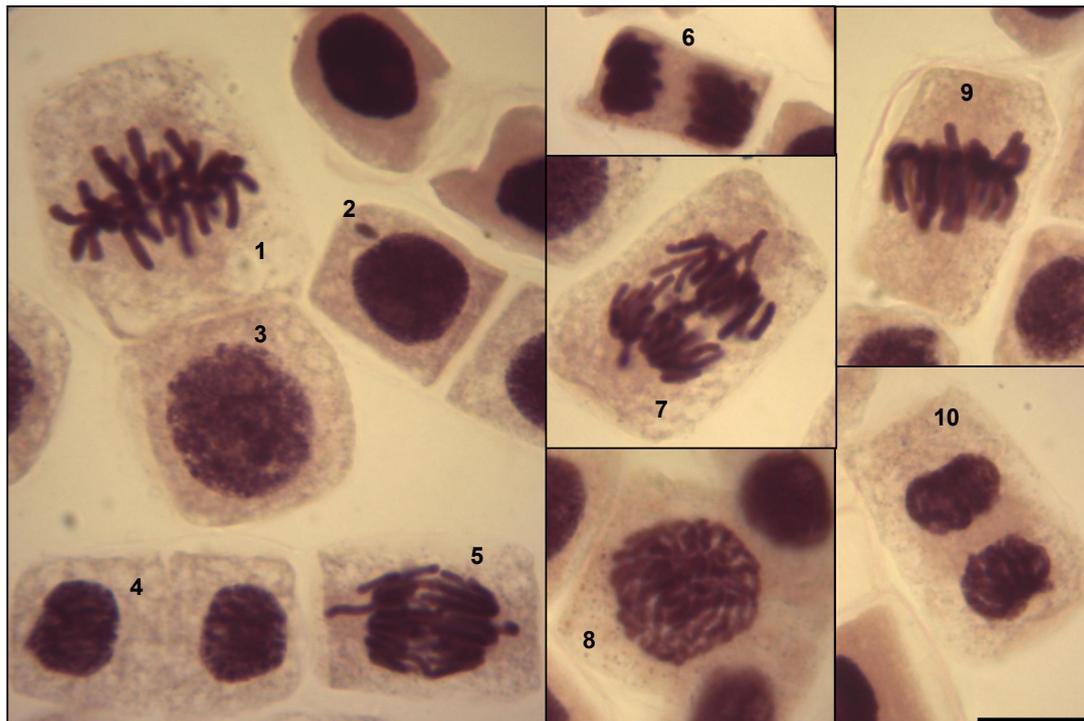


Figura 1a – Ciclo celular mitótico. Escala: 5 μm

Responda:

A) Preencher a tabela abaixo indicando a qual fase pertence cada célula indicada pelos números:

Célula	Fase
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

◆ **Atividade 3**

Objetivo – Reconhecer as fases da mitose em lâmina permanente.

Procedimento:

Analisar a lâmina permanente de mitose em raiz de cebola (Lâmina A2 - Hematoxilina férrica)

Responda:

A) Identificar as fases da mitose e esquematizar

Prófase

Pró-metáfase

Metáfase

Início da Anáfase

Final da anáfase

Telófase

◆ **Atividade 4**

Objetivo – Reconhecer as fases meiose.

Procedimento:

1. - Analisar a figura abaixo:

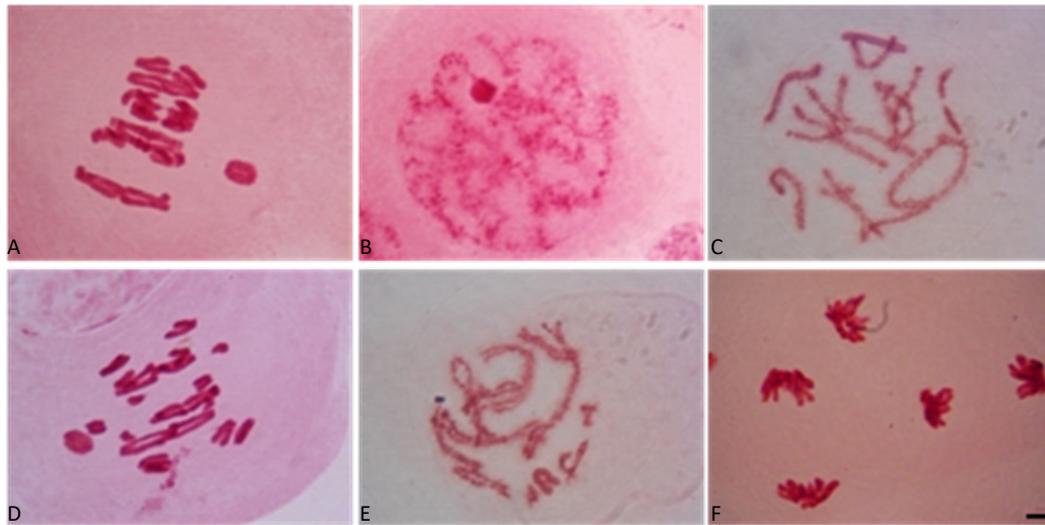


Figura 2a – Fases da meiose. Escala: 5 μ m

Responda:

Identificar pela foto as seguintes fases da meiose de gafanhoto:

- A) _____
- B) _____
- C) _____
- D) _____
- E) _____
- F) _____

Capítulo 11

Organelas e o metabolismo energético da célula

Existem seres vivos capazes de produzir sua própria energia (autotróficos) e outros que buscam a energia nos alimentos (heterotróficos). As principais fontes de energia utilizadas pelos animais são os compostos orgânicos como os carboidratos, gorduras, e em menor escala, as proteínas.

O processo para a obtenção de energia chama-se respiração e é realizada pelos os animais, vegetais, protistas, fungos e alguns procariotos. No processo de respiração pode haver a participação do oxigênio (aeróbica) ou não (anaeróbica). Algumas bactérias, fungos e células animais que são aeróbicos, podem realizar a respiração anaeróbica na falta de oxigênio, por essa razão são conhecidos como anaeróbicos facultativos.

No processo de respiração ocorre a produção de um composto intermediário, a adenosina-trifosfato (ATP). Essa é a molécula utilizada pela célula na maior parte de suas reações, ou seja, que faz a célula funcionar. O ATP é uma molécula com duas ligações ricas em energia, que fica entre os átomos de fósforo (P).

Tanto os seres autotróficos quanto os heterotróficos produzem ATP, entretanto nos procariotos a produção de ATP ocorre em nível de membrana plasmática e nos eucariotos ocorre dentro de organelas específicas.

Na respiração ocorre a quebra de moléculas orgânicas para gerar energia, enquanto que na fotossíntese ocorre a produção de moléculas orgânicas a partir de uma fonte primária de energia, a luz do sol. A

fotossíntese é realizada pelos seres autotróficos (plantas) que possuem uma organela específica para tal função, o cloroplasto, mas a fotossíntese também pode ser realizada por organismos procariotos, como as cianofíceas, nesses organismos a fotossíntese ocorre na membrana plasmática.

Mitocôndria

A mitocôndria ocorre em todas as células eucarióticas aeróbicas, sendo geralmente alongadas ou mesmo esféricas. Seu comprimento varia de 2 a 8 μm , portanto é visível em microscopia óptica. O número de mitocôndrias em cada célula também varia, certas algas verdes possuem apenas uma unidade por célula, enquanto um ovócito pode apresentar 300.000.

A distribuição das mitocôndrias nas células geralmente ocorre ao acaso, podendo haver uma concentração onde a demanda energética é maior. Por exemplo, nas células musculares, as mitocôndrias ficam próximas aos sarcômeros, nos espermatozoides, localizam na peça intermediária, o que promove o movimento da cauda. As mitocôndrias geralmente ficam associadas a gotículas lipídicas contendo ácidos graxos a partir das quais elas derivam produtos brutos que serão oxidados. Essas organelas podem mudar de localização dentro da célula através da ação do citoesqueleto. Em algumas células verificou-se que as mitocôndrias não ficam separadas, mas permanecem juntas formando redes.

Novas mitocôndrias são formadas a partir de mitocôndrias pré-existentes. Para isso é necessário que ela replique o seu DNA, o que acontece independente da replicação do DNA nuclear. As mitocôndrias também fazem a transcrição dos RNAs e a tradução de suas proteínas. Contudo, nem todas as proteínas necessárias para a mitocôndria sobreviver são traduzidas localmente, sendo necessário importar algumas do citoplasma.

A sua biogênese se dá por fissão, após atingir certo tamanho, a mitocôndria sofre uma divisão (fissão), que resulta em duas novas mitocôndrias, semelhante ao que ocorre na multiplicação dos procaríotos.

A herança das mitocôndrias é materna, pois para a maioria dos organismos eucariotos que se reproduzem sexualmente, durante a fecundação as mitocôndrias paternas presentes nos espermatozoides são prontamente degradadas ao entrarem no óvulo. Dessa forma, o futuro embrião herdará somente as mitocôndrias maternas, ou

seja, aquelas contidas nos óvulos.

Como discutido no primeiro capítulo, a origem da mitocôndria provavelmente foi por endossimbiose, ou seja, bactérias aeróbias foram fagocitadas por células eucariotas anaeróbias e escaparam do mecanismo de destruição da mesma. Criou-se uma relação de endossimbiose, em que o procaríoto era protegido do ambiente inóspito por estar no interior dos eucariotos, em contrapartida, o procaríoto fazia o suprimento de ATP necessário ao eucarioto.

Algumas provas dessa origem são: (1) o DNA da mitocôndria é circular, como o DNA das bactérias; (2) a composição química da membrana interna da mitocôndria é semelhante à membrana da bactéria e a externa é semelhante à membrana plasmática dos eucariotos e (3) os ribossomos mitocondriais são semelhantes aos bacterianos, com o mesmo coeficiente de sedimentação, 70S.

Estruturalmente as mitocôndrias possuem duas membranas, a externa e a inter-

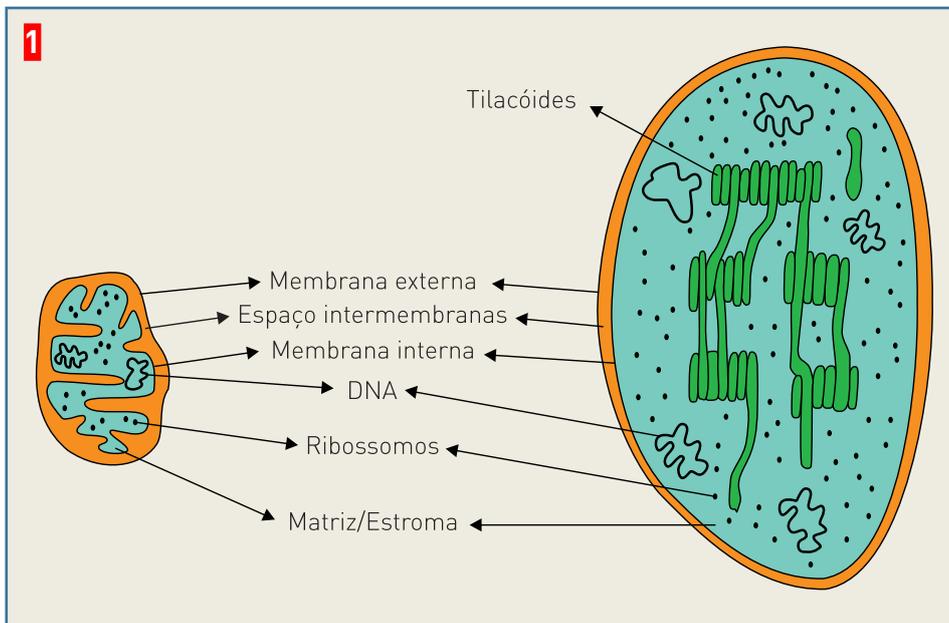


Figura 1 - Comparação entre mitocôndria e cloroplasto.

na, que forma várias cristas. As membranas são estrutural e quimicamente diferentes entre si, a interna possui 80% de proteínas enquanto a externa apenas 50%. Devido às diferenças químicas, essas membranas também apresentam diferentes graus de seletividade. A membrana externa é mais permeável devido principalmente a um tipo especial de proteína, a porina, que forma canais na membrana. A membrana interna é mais seletiva, nela estão presentes várias enzimas envolvidas na respiração celular, como por exemplo, a ATP-sintetase, que participa da síntese de ATP, a NADH desidrogenase, que libera um par de elétrons para a cadeia respiratória e proteínas que fazem o transporte de metabólitos para dentro da matriz mitocondrial. A membrana interna, contrariamente da externa, possui muitas invaginações (cristas), por isso pode ser considerado um sistema de membranas. Quanto maior o número de cristas na mitocôndria, maior é a área disponível para hospedar a maquinaria necessária para o processo de respiração e consequentemente, maior a atividade da mitocôndria (Figura 1).

Devido à presença de duas membranas, podem-se distinguir dois espaços: o intermembranas e a matriz mitocondrial. A matriz mitocondrial tem uma consistência semelhante a gel, devido à alta concentração de proteínas solúveis em água; além disso contém íons, mitoribossomos, enzimas, DNA e os vários tipos de RNAs (Figura 1). O DNA representa apenas 1% do DNA contido no núcleo e pode existir mais de uma molécula por mitocôndria. Ele é circular, formado somente por éxons, e em humanos codifica apenas 13 proteínas, 2 RNAs ribossomais e 22 tRNA que são utilizados dentro da própria mitocôndria.

Cloroplastos

A sobrevivência dos seres heterotróficos no planeta Terra dependeu da origem dos seres autotróficos, pois o estoque de compostos orgânicos do planeta era finito. Os organismos autotróficos surgiram com o aparecimento de pigmentos capazes de transformar energia luminosa em energia química.

Os pigmentos fotossintetizantes são moléculas lipídicas com capacidade de absorver certos comprimentos de luz e refletir outros, portanto, a cor do pigmento é dada pela cor que ele não absorve, ou seja, a luz refletida. Os principais pigmentos são: clorofila (verde), carotenos e xantofilas (amarelos), ficocianina (azul) e ficoeritrina (vermelho).

A clorofila é o pigmento mais eficiente no processo de fotossíntese, pois é capaz de absorver com mais eficiência os comprimentos de onda azul e vermelha, nos quais a fotossíntese é mais intensa. A clorofila apresenta pequenas diferenças em suas moléculas, podendo ser classificada como clorofila a, b, c ou d.

Esses pigmentos ocorrem tanto nos procariotos quanto nos eucariotos, sendo que nos procariotos autotróficos esses pigmentos estão associados à membrana plasmática ou em lamelas presentes no citoplasma. Já nos eucariotos vegetais, os pigmentos estão presentes nos cloroplastos das células eucarióticas aeróbicas autotróficas, desde algas até angiospermas.

Os cloroplastos são organelas citoplasmáticas relativamente grandes, possuindo de 5 a 10 μm de comprimento e de 2 a 4 μm de largura. Lembrando que o menor tamanho visto no microscópio de luz é de 100nm.

Os cloroplastos podem apresentar diferentes formas: espiralada (alga *Spyrogira*),

estrelada (*Zygnema*) ou esférica (angiosperma) (Figura 2).

O número de cloroplasto por célula varia em função da espécie e no mesmo organismo varia conforme o tecido vegetal.

Os cloroplastos podem ter duas formas de herança: materna e mista (paterna e materna), pois para algumas espécies de vegetais, os seus pólenes não contêm cloroplastos.

Segundo a teoria da endossimbiose, os cloroplastos foram originados após a instalação de procariotos autotróficos (cianobactérias) em células eucariotas heterotróficas semelhante ao processo de origem das mitocôndrias. Posteriormente criou-se dependência mútua e parte do genoma do procarioto autotrófico foi transferida para o núcleo do eucarioto tornando-o dependente das produzidas pelo eucarioto. Por outro lado o organismo eucarioto, e este passou a depender dos compostos orgânicos produzidos pelos autotróficos.

Assim como as mitocôndrias, a biogênese dos cloroplastos se dá por fissão após atingir certo tamanho, devido ao aumento ocasionado pela própria síntese de lipídios, bem como de algumas proteínas e importação de outras.

Os cloroplastos, assim como os demais cromoplastos e leucoplastos se desenvolvem a partir de precursores, os protoplastídeos. Dependendo do tipo de pigmento armazenado haverá a produção de um tipo diferente de cromoplastos e, se não houver pigmentos, forma-se um leucoplasto, que geralmente serve como reserva nutritiva, como por exemplo, o amiloplasto, oleoplasto e proteoplasto.

Essas organelas têm capacidade de se duplicar independente da célula, como a mitocôndria. Para isso eles multiplicam seu conteúdo interno, sintetizando alguns aminoácidos, proteínas, ácidos graxos e lipídios.

Entre os lipídios, estão os próprios pigmentos: clorofila e carotenóides. Os cloroplastos também não sintetizam todas as proteínas necessárias, parte delas são importadas do citoplasma.

Os cloroplastos possuem duas membranas e entre as duas existe um espaço intermembrana. A membrana externa é mais permeável que a interna e também contém as porinas, que são proteínas semelhantes às existentes na mitocôndria e na membrana das bactérias. A membrana interna é seletiva, as moléculas só podem atravessar por canais específicos, por exemplo, a glicose possui um transportador específico na membrana, enquanto o ATP e ADP não possuem transportadores e por isso não atravessam a membrana do cloroplasto para o citoplasma da célula. Portanto, o ATP produzido pelos cloroplastos não pode ser utilizado para suprir as necessidades energéticas da própria célula que o produziu. Essa energia, assim como nas células animais, tem que ser obtida a partir da quebra de compostos orgânicos (Figura 1)

Nos cloroplastos jovens, a membrana interna sofre invaginações, liberando para dentro vesículas membranosas que se transformam em discos achatados; os tilacóides, que delimitam um espaço interno (luz). Os pigmentos, inclusive a clorofila, es-



Figura 2 – Estômato de angiosperma com cloroplastos nas células-guarda. Escala: 10 μm

tão presentes nas membranas dos tilacóides e formam os complexos antenas.

Nos tilacóides também estão presentes as enzimas ATP sintetase, semelhante às encontradas na mitocôndria. Nos cloroplastos maduros os tilacóides se organizam em granum, semelhante a pilhas de moedas. O conjunto de granum recebe o nome de grana. Geralmente encontra-se 10 tilacóides por granum e cerca de 30 a 40 por grana. Pode ocorrer intercomunicação entre essas estruturas.

No estroma do cloroplasto corresponde à região que fica entre a membrana interna e os tilacóides. Assim como na mitocôndria, está presente o DNA circular, que é maior que o DNA da mitocôndria e em maior número de cópias. Também estão presentes todos os tipos de RNAs, ribossomos, proteínas, água, íons, enzimas e compostos orgânicos (amido) (Figura 2).

Peroxisomo

Outra organela importante para a produção de energia é o peroxissomo, pois ele realiza a quebra de moléculas de ácidos graxos, em um processo é conhecido como β -Oxidação.

Os peroxissomos ocorrem em praticamente todos os eucariotos, e geralmente é uma organela esférica, podendo apresentar-se alongada. É menor que a mitocôndria, 0,2 a 1 μm , geralmente é a menor organela da célula. Varia em quantidade e tipo celular, por exemplo, os hepatócitos apresentam maior número de peroxissomos que os neurônios.

Possui uma matriz envolvida por uma membrana única, e nessa matriz encontra-se a maioria das enzimas responsáveis pelas suas funções. Também é possível encontrar inclusões cristalinas.

Todas as proteínas peroxissomais são

sintetizadas por polissomos livres no citoplasma, elas possuem uma sequência específica de aminoácidos (PTS) que é fundamental para seu endereçamento. Elas podem ser transportadas por outras proteínas até o peroxissomo ou se ligarem a receptores específicos da membrana.

Os peroxissomos pré-existentes se dividem por fissão para dessa forma repor organelas velhas, para se preparar para a divisão celular ou mesmo em resposta a estímulos externos, como drogas. Para ocorrer a fissão é necessário que haja um crescimento da organela, que se dá pela importação de proteínas do citoplasma e transferência de lipídios do retículo endoplasmático.

As funções dos peroxissomos são diversas, dependendo do conjunto de enzimas presentes. Por isso, diferentes tipos celulares podem possuir diferentes tipos de peroxissomos. Porém, todos peroxissomos sempre apresentarão dois tipos de enzimas: as oxidases e as catalases. As oxidases oxidam substratos a partir de oxigênio molecular e com isso produzem peróxido de hidrogênio e as catalases decompõem essa molécula.

Os peroxissomos têm um papel muito importante na produção de energia pela célula. Eles realizam a β -oxidação, ou seja, a quebra de moléculas de ácido graxo. Nos fungos e leveduras os peroxissomos degradam todos os ácidos graxos, nos vegetais eles degradam a maior parte dos ácidos graxos e nos animais dividem essa função com as mitocôndrias.

Os peroxissomos são inativos perante cadeias de ácidos graxos de tamanhos médios e pequenos, eles fazem a degradação apenas de cadeias longas e muito longas. Portanto, os peroxissomos agem como sistema de encurtamento das cadeias de ácidos graxos. Quando estas cadeias chegam ao tamanho médio, elas são excretadas, ou servem como intermediários na síntese de

alguns lipídios, ou ainda migram para as mitocôndrias para serem oxidados em moléculas de acetil-CoA, podendo então ser oxidadas a CO₂ no ciclo de Krebs.

A energia produzida pela β-Oxidação peroxissomal é armazenada na forma de NADH e parte é dissipada na forma de calor, enquanto a β-Oxidação mitocondrial, por estar acoplada a cadeia transportadora de elétrons, produz no final ATP. Durante a β-Oxidação são produzidas moléculas de H₂O₂, que são decompostas pela catalase.

Os peroxissomo também participam de etapas da formação de fosfolipídios de membrana, como o colesterol e dolicol. Outra função dos peroxissomos é a degradação de ácido úrico em alantoína, pela enzima urato oxidase. A alantoína posteriormente é transformada em alantoato, uréia e amônia. Os primatas hominídeos, aves e alguns répteis não possuem a enzima urato oxidase e por isso o ácido úrico é excretado sem sofrer degradação.

Alguns peroxissomos estão presentes apenas em células vegetais de sementes que contém lipídios como reserva. Esses peroxissomos receberam um nome especial: glioxissomo. Eles realizam um ciclo de reações semelhante ao ciclo de Krebs, com isso é possível converter lipídios em carboidratos, que é fundamental na germinação das sementes. Esse processo de conversão é chamado de neoglicogênese.

Os peroxissomos também participam do processo de fotorrespiração nas folhas, juntamente com as mitocôndrias e cloroplastos. Eles realizam uma via, dentro da fotorrespiração, que recupera carbonos que seriam 'perdidos' devido ao excesso de O₂.

Essa organela também é muito importante na desintoxicação, pois grande parte do álcool etílico consumido por uma pessoa é degradada nos peroxissomos, principalmente os peroxissomos presentes no fígado

e rins. Outra parte do álcool é degradada pelo retículo endoplasmático liso.

Uma função dessa organela, como já mencionado, é a quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. A enzima responsável por essa função é a catalase e está presente na matriz do peroxissomo em maior quantidade (40%) comparada ao restante do citoplasma. O peróxido de hidrogênio é produzido durante o catabolismo peroxissomal, mas é tóxico para as células por oxidar os aminoácidos e outros compostos, desnaturando-os. Quando se coloca água oxigenada sobre feridas, a catalase quebra o peróxido de hidrogênio e o oxigênio liberado forma 'bolhas' que são visíveis.

A ação da catalase (figura 3):



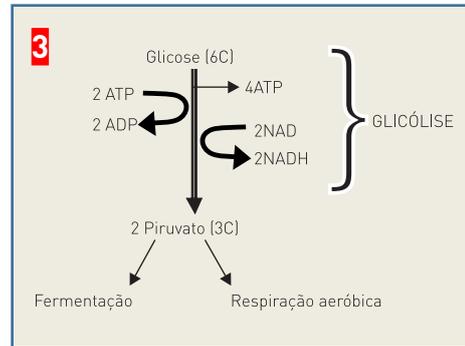
Produção de energia na mitocôndria

A respiração é um dos processos para a produção de energia, mas existem outras formas como a fermentação, em que a quebra de compostos orgânicos ocorre na ausência de oxigênio. Ela ocorre no citoplasma das células e pode ocorrer de várias formas, dependendo da substância que será originada após a quebra do composto orgânico. Exemplo: a fermentação láctica produz o ácido láctico; a alcoólica, o álcool etílico e a acética, o ácido acético.

A fermentação láctica é realizada por algumas bactérias, fungos e células musculares. Esse processo ocorre no músculo quando há falta de oxigênio para desenvolver a respiração aeróbica, o acúmulo de ácido láctico pode levar à fadiga muscular (cãibra).

A fermentação alcoólica ocorre em bactérias e leveduras, sendo muito importante na produção de bebidas e pães. Já a

Figura 3 – Produção de energia



fermentação acética é realizada por acetobactérias e é importante na fabricação de vinagre, mas provoca o azedamento de vinho e sucos.

A glicose é uma molécula utilizada na produção de energia. A sua quebra (glicólise) ocorre em várias etapas no citoplasma da célula, até a formação de duas moléculas de piruvato ou ácido pirúvico (3C). Nesse processo são gastas duas moléculas de ATP e produzidas quatro, portanto rende duas moléculas de ATP. Também são liberados hidrogênios durante a glicólise, que são captados pela NAD, tornando-se NADH (Figura 3).

Esse rendimento é muito pequeno, e no curso da evolução foi desenvolvida uma nova via metabólica de maior rendimento energético onde piruvato é transformado em água e gás carbônico. Essa via é a fos-

forilação oxidativa, ocorre a participação do oxigênio e por isso é denominado de respiração aeróbica.

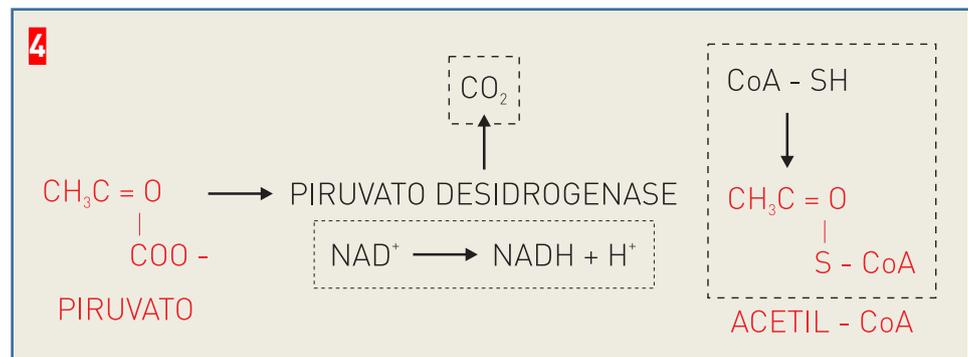
Respiração Aeróbica

A respiração aeróbica é o processo de produção de energia [ATP] com a participação do oxigênio. Ela é realizada por procarionotos, protistas, fungos, plantas e animais. Dentro do processo de respiração aeróbica, ocorre uma etapa em que não é necessário o oxigênio, a glicólise, ou a quebra da glicose.

Nos seres aeróbicos eucariotos, a glicólise ocorre no citoplasma. Após a quebra dessa molécula são formadas duas moléculas de piruvato (3C) que atravessam as duas membranas da mitocôndria e na matriz dessa organela sofrem descarboxilação pelo complexo piruvato desidrogenase. O resultado desse processo é a formação de uma molécula de CO_2 e uma molécula de acetil-CoA, além da redução do NAD em $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Figura 4).

Os ácidos graxos e os aminoácidos também podem ser utilizados na produção de ATP, para isso eles passam por várias modificações e são transformados em acetil-CoA. Após a produção da molécula de Acetil CoA, esta participa de várias etapas sendo oxidada a CO_2 e H_2O , o que é central

Figura 4 – Descarboxilação do piruvato.



para o metabolismo de organismos aeróbicos. A primeira etapa é o ciclo de Krebs. Em procariotos o ciclo ocorre no citoplasma, já nos eucariotos, essa fase ocorre dentro da mitocôndria.

Ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos)

O acetil CoA se junta a um ácido oxalacético (4C) e resulta em ácido cítrico. Este passa por um ciclo de reações na matriz mitocondrial e acaba produzindo novamente uma nova molécula de ácido oxalacético que inicia um novo ciclo. Durante esse ciclo, o ácido cítrico sofre desidrogenação, ou seja, são liberados quatro pares de átomos de hidrogênio, sendo que três reduzem moléculas de NAD, e um hidrogênio reduz uma molécula de FAD, tornando-se NADH e $FADH_2$, respectivamente. Também ocorre

a produção de energia ATP (via GTP) e a produção de CO_2 (Figura 5).

Os átomos de oxigênio utilizados para obter o CO_2 a partir dos grupos acetil que entram no ciclo são fornecidos pela água e não pelo oxigênio molecular. Portanto, nesse ciclo não é utilizado o oxigênio molecular, mas ele é imprescindível para a próxima etapa, a cadeia transportadora de elétrons.

Fosforilação oxidativa

Esse evento ocorre na cadeia transportadora de elétrons (CTE) que está presente, em várias cópias, na membrana interna das mitocôndrias, e também na membrana plasmática dos procariotos. Ela é constituída por diferentes proteínas e moléculasceptoras e doadoras de elétrons. Essas proteínas estão agrupadas em três grandes complexos enzimáticos: a NADH desidrogenase, o ci-

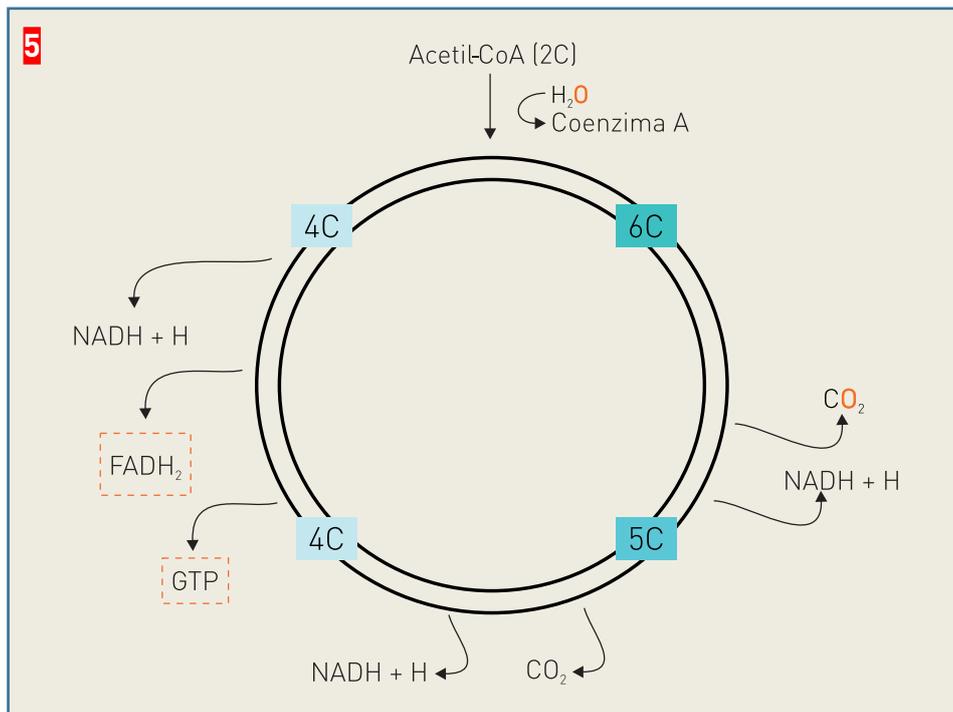


Figura 5 – Ciclo de Krebs.

tocromo b-c1 e a citocromo-oxidase (Figura 6). Os complexos possuem íons metálicos e outros grupamentos que formam rota para a passagem dos elétrons.

Os NADH e FADH_2 produzidos no ciclo de krebs sofrem a remoção de um íon hidreto (H) que é convertido em um próton (H^+) e dois elétrons de alta energia ($2e^-$). Essa reação é catalisada pela NADH-desidrogenase que também inicia o transporte dos elétrons na CTE. Esse transporte é possível graças à diferença nas tendências dos componentes da cadeia em perder elétrons. Contudo, no complexo citocromo-oxidase, o elétron é recebido pelo oxigênio gasoso (O_2) que se difundiu para dentro da mitocôndria e simultaneamente combinou-se com prótons (H^+) da solução circundante para formar a água (Figura 6).

Os elétrons, ao serem transportados pela CTE vão perdendo energia, que é utilizada para a ejeção dos prótons da água ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$) da matriz para o espaço

intermembranar. Esse evento ocorre nos três complexos proteicos. A ejeção de prótons cria uma diferença de pH e de potencial elétrico. Essa diferença de pH e potencial de membrana força os H^+ a retornarem à matriz via ATP-sintetase. À medida que os prótons fazem sua passagem por meio da ATP-sintetase, eles são utilizados para dirigir a reação energeticamente desfavorável entre o ATP e o Pi para produzir ATP (Figura 6).

Existem moléculas presentes na membrana que servem de canais por onde os prótons podem retornar à matriz mitocondrial sem produzir energia, são os desacopladores (Figura 6).

Produção de energia no cloroplasto

Os eventos metabólicos que ocorrem nos cloroplastos são muito semelhantes aos que ocorrem nas mitocôndrias, porém com objetivo inverso. Os cloroplastos utilizam a energia solar para produzir ATP, depois uti-

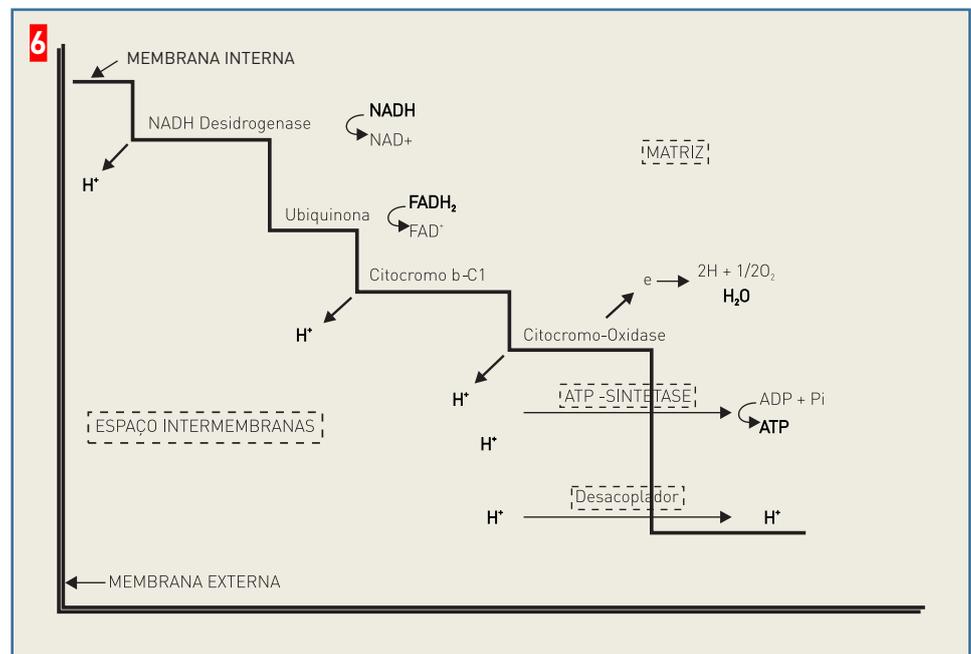
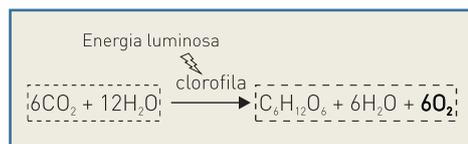


Figura 6 – Cadeia transportadora de elétrons.

lizam esse ATP para juntar moléculas de carbono, oriundas do CO_2 , para formar os compostos orgânicos. Durante o processo ocorre liberação de oxigênio a partir da água. Na mitocôndria os compostos orgânicos são quebrados, utiliza-se oxigênio, sendo liberado CO_2 e energia na forma de ATP.

A estrutura dessas organelas também é muito semelhante, porém no cloroplasto, além das duas membranas (interna e externa) tem um terceiro sistema de membranas, os tilacóides, onde ocorre a cadeia transportadora de elétrons.

Os processos envolvidos na produção dos compostos orgânicos nos cloroplastos recebem o nome de fotossíntese, que apresenta a seguinte equação:



Conforme a dependência da presença de luz, as reações são classificadas em dois tipos: fotodependente e fotoindependente. A primeira fase ocorre nos tilacóides e nessa fase a energia luminosa é convertida em energia química (ATP) a partir de ADP, também é produzido NADPH e a água é oxidada, resultando na liberação de O_2 . A segunda fase, fotoindependente, ocorre no estroma e utiliza o ATP e NADPH produzidos na fase anterior para converter CO_2 em compostos orgânicos.

Fase clara ou fotoquímica - reações fotodependentes

A fase clara envolve dois processos: a fotofosforilação e a fotólise da água. Como o próprio nome diz, fotofosforilação é um processo que ocorre na presença de luz (fóton) no qual ocorre a adição de fosfato (fosfori-

lação) a uma molécula, no caso é adição de um Pi no ADP, que se transforma em ATP.

A fotofosforilação ocorre com a participação de dois fotossistemas: I e II. Esses fotossistemas são formados por pigmentos, substânciasceptoras de elétrons e diversas enzimas. A organização dos pigmentos lembra uma antena parabólica, por isso é conhecido como 'complexo antena'. No centro desse complexo estão as clorofilas P700 e P680, cujos valores significam o comprimento de onda da luz que é absorvido com maior eficiência pelas clorofilas.

No fotossistema I a energia solar ativa os elétrons presentes nas várias clorofilas que constituem a porção antena do complexo, a energia de um elétron excitado é transmitida de uma clorofila para outra até alcançar um centro de reação. Esse centro é formado por várias proteínas transmembranas e pigmentos, entre eles a clorofila P700. Esta clorofila após receber os elétrons e ser excitada, libera os elétrons que são recepcionados pela ferredoxina, que por sua vez os transfere para uma cadeia transportadora de elétrons (CTE). Nessa cadeia, assim como na mitocôndria, é sintetizado ATP pela liberação gradual de energia dos elétrons. No final, os elétrons voltam para o centro de reação do complexo antena. Os elétrons também podem seguir outro caminho em vez de passar pela cadeia. Na ferredoxina, os elétrons são transferidos para o NADP^+ e este é reduzido a NADPH. Nesse segundo caso os elétrons não retornaram ao centro de reação, contudo eles têm que ser repostos para a fosforilação continuar. Essa reposição conta com a participação do Fotossistema II (Figura 8).

No Fotossistema II, assim como no I, os processos são os mesmos: depois que o par da clorofila P680 é excitado, os elétrons são transferidos para um aceptor, a plastoquinona, que segue passando esses elétrons por

uma cadeia (CTE). A energia perdida durante a transferência é utilizada para a síntese de ATP. No final os elétrons do Fotossistema II migram para as clorofilas do Fotossistema I, e as clorofilas do Fotossistema II ficam sem elétrons (Figura 7).

Os elétrons do Fotossistema II são repostos pelo processo da fotólise da água (oxidação da água). A luz causa a quebra da água que está presente no espaço intratilacóide, essa quebra é catalisada por uma enzima que fica na membrana do tilacóides. Com a cisão da água, são liberados prótons e moléculas de oxigênio para o espaço intratilacóide. Os elétrons liberados são capturados pelas clorofilas do Fotossistema II, os prótons ao passar pela ATP-sintetase formam ATP e o O_2 é liberado (Figura 7).

Reações fotoindependentes (química ou fase escura ou ciclo de Calvin-Benson)

Essas reações ocorrem no estroma, o ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para formar os hidratos de carbono a partir do CO_2 .

O CO_2 une-se a uma pentose (Ribulose-1,5-bifosfato) e forma uma molécula de seis carbonos que é imediatamente quebrada em duas moléculas de três carbonos, o 3-fosfoglicerato. Essa molécula recebe fosfato do ATP e é reduzida pelo NADPH e por isso é transformada em 3-fosfogliceraldeído. Algumas dessas moléculas são utilizadas no ciclo para recuperar a Ribulose-1,5bifosfato com gasto de energia, e a outra parte é utilizada para a formação de substâncias orgânicas (Figura 8).

Dentro do cloroplasto, o fosfogliceraldeído é utilizado para a formação da glicose, mas a maior parte entra na formação da sacarose e amido. No citoplasma ele pode entrar diretamente no ciclo da glicólise e assim produzir o piruvato, que vai participar da respiração celular. Ou ainda, o gliceraldeído pode ser transformado em outros polissacarídeos e ser armazenado na forma de sacarose ou amido (Figura 8).

Resumo da fotossíntese

A energia proveniente do sol (1) é utilizada nos tilacóides (2) para a produção de ATP (3) e fotólise da água (4), que produz o oxigênio e reduz o NAD. O NADPH e o ATP produzidos na fase clara são utilizados no estroma para a produção de compostos orgânicos (5) a partir do gás carbônico. Portanto, a fotossíntese é a transformação da energia luminosa em energia elétrica e finalmente em energia química, contida nas ligações dos compostos orgânicos, princi-

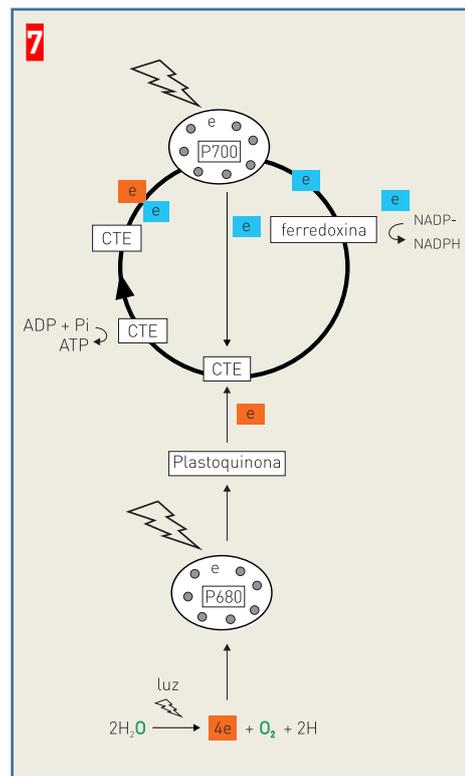


Figura 7 - Fotofosforilação e fotólise da água.

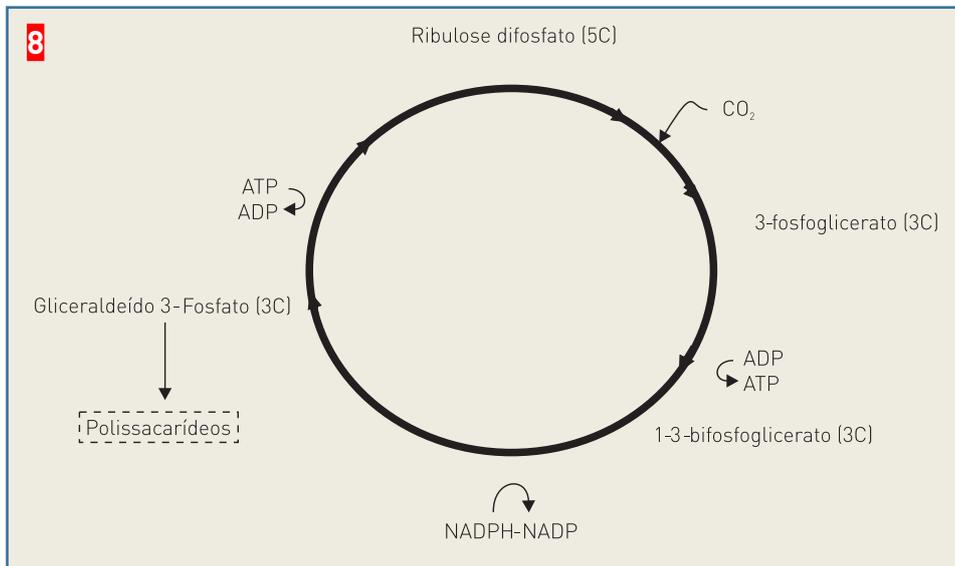


Figura 8 - Ciclo de Calvin-Benson.

palmente a glicose (Figura 9).

Nas bactérias, a fotossíntese pode ser muito semelhante (cianobactérias) ou diferente (bactérias verdes e púrpuras) da fotossíntese dos eucariotos. Elas diferem

principalmente nos tipos de pigmentos (bacterioclorofila) e doador de H (H_2 , H_2S). Por não ser a água a doadora de hidrogênio, o oxigênio não é produzido.

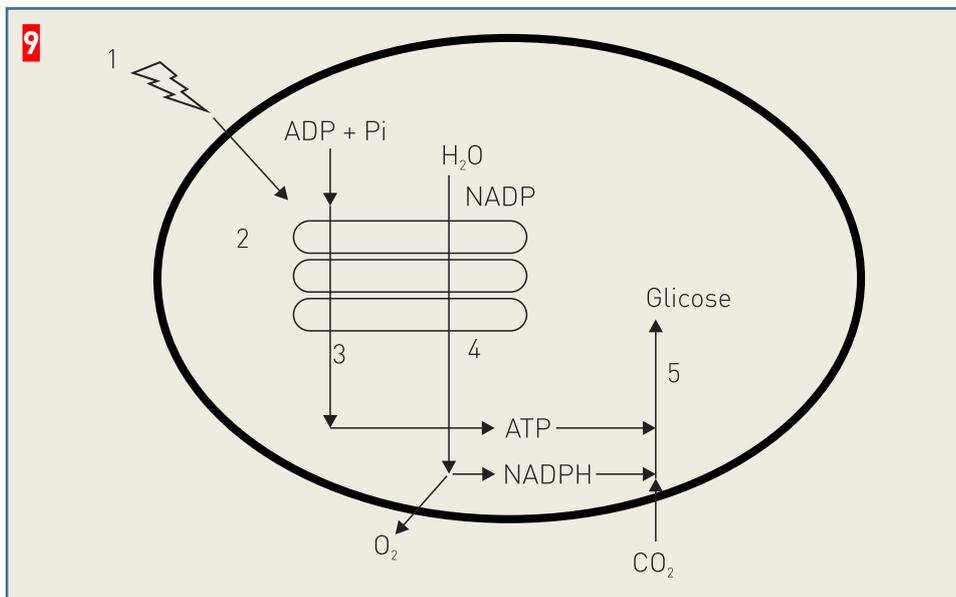


Figura 9 - Resumo da fotossíntese.

ATIVIDADES PRÁTICAS SOBRE ORGANELAS E O METABOLISMO ENERGÉTICO DA CÉLULA

◆ Atividade 1

Objetivo - Evidenciar a catalase.

Procedimentos:

- 1 - Cortar duas fatias finas de tubérculo de batata;
- 2 - Ferver uma delas por 5 minutos;
- 3 - Colocar em placas de Petri separadas e cobri-las com peróxido de hidrogênio;

Responda:

A) De que forma foi evidenciada a presença da catalase na batata crua?

B) Por que a catalase não atuou na batata cozida?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular – uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999, 757p.
- AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. Biologia das Células. Vol. 1. 2ª Ed. São Paulo: Moderna, 2004, 464p.
- AVERSI-FERREIRA, T.A. Biologia celular e molecular. Campinas: Átomo, 2008, 205p.
- BOLSOVER, S.R.; HYAMS, J.S.; SHEPHARD, E.A.; WHITE, H.A.; WIEDEMANN, C.G. Biologia Celular. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 325p.
- BRANCALHÃO, R. M. C.; SOARES, M. A. C., Microtécnicas em biologia celular. Cascavel: EDUNIOESTE, 2004, 125p.
- CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. A célula. 3ª Ed. Barueri: Manole, 2013, 590p.
- DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J.; PONZIO, R. De Robertis. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 413p.
- FREIRE, Paulo. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. 37. Ed., São Paulo: Paz e Terra, 2008. 148p
- GUERRA, M. 1988. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 142p.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia Celular e molecular. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 332p.
- KARP, G. Biologia Celular e Molecular: conceitos e experimentos, 3ª Ed. Barueri: Manole, 2005, 786p.
- LARROSA, B. J. Notas sobre a experiência e o saber de experiência. Revista Brasileira de Educação, Jan/Fev/Mar/Abr, nº 19, 2002.
- LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F.; Biologia Hoje. Vol 1. 15ª Ed. São Paulo: Ática, 2009, 432p.
- LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; Biologia Celular e Molecular. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 1054p.
- LOPES, S.G.B.C. BIO, Introdução à biologia e origem da vida, citologia, reprodução e embriologia, histologia. Vol. 1, 1ª Ed. São Paulo: Saraiva, 2002, 430p.
- LORETO, E.L.S.; SEPEL, L.M.N. Atividades experimentais e didáticas de biologia molecular e celular. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2002, 71p.
- MARTINS, I.; GOUVEA, G. e PICCININI, C. Aprendendo com imagens. Cienc. Cult. [online]. 2005, vol.57, n.4, pp. 38-40.
- MELO, R.C.N. Células & Microscopia princípios básicos e práticas. Juiz de Fora: UFJF, 2002, 144p.
- PIOVESANI, L. I. P. Arte-educação: uso de imagens no desenvolvimento do saber. Rev. Conteúdo. Capivari, vol.3, n.1, pp. 41-48, 2012.
- POLIZELI, M.L.T.M. Manual prático de biologia celular. Série Manuais práticos em biologia 2. Ed. Holos, 1999, 72 p.
- POLLARD, T.D.; EARNSHAE, W.C. Biologia Celular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 799p.
- REGINALDO, C.C., SHEID, N.J., GÜLLICH, R.I.C. O ensino de ciências e a experimentação. IX ANPED SUL. Seminário de pesquisa em educação da região Sul, 2012. pp. 1-13
- ROCHA, M. P., SILVEIRA, D. O que eles sabem sobre a célula? Revista da SBEnBio, nº 3, Outubro, 2010.
- VALLE, F.C. Práticas de citologia e genética. Rio de Janeiro: MEDSI Médica e Científica Ltda, 2001, 185.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Aberrações estruturais 109
 Acetil-CoA 133
 Acidofilia 50
 Ácido Periódico-Schiff (PAS) 50
 Ácidos nucleicos 48, 106
 Actina 81
 Açúcares 46
 Adesão focal 61
 Aeróbica 127
 Água 45, 70
 Anaeróbica 127
 Anáfase 116
 Aneuploidia 109
 Anfípáticos 59
 Anti-códon 97
 Antiporte 68
 Apoptose 18, 95
 Ativo 68
 ATP-sintetase 129, 135
 Autofagia 95
 Autotróficos 127

B

Bainha de mielina 63
 Basofilia 50
 Beta-Oxidação 132
 Biomembranas 57

C

Cadeia transportadora de elétrons 134
 Cariograma 108
 Cariótipo 108
 Carreadoras 67
 Catalase 132
 Célula anucleada 101
 Célula binucleada 101
 Célula multinucleada 101
 Células 9
 Células pluripotentes 18
 Células totipotentes 18
 Centríolo 117
 Centrômero 108, 115
 Centrômeros 117

Centrossomo 117
 Chaperonas 93
 Ciclo celular 115, 116
 Ciclo de Calvin-Benson 137
 Ciclo de Krebs 134
 Ciclose 82
 Cílios 62, 63, 84
 Cinetócoros 117
 Citocinese 117
 Citoesqueleto 14, 80, 127
 Citogenética 109
 Citoquímica 35, 49
 Citosol 79
 Claudina 60
 Clorofila 129
 Cloroplastos 14, 129, 130
 Código genético 96, 97
 Códon 97
 Colchicina 83
 Colorações tricômicas 51
 Complexo de golgi 93
 Complexo de Golgi 13, 117
 Complexos dos poros 104
 Corpo residual 96
 Corpos residuais 70
 Corpúsculo primário 122
 Corpúsculos de Nissl 93
 Corpúsculo secundário 122
 Cristas 129
 Cromátides irmãs 118
 Cromatina 106, 118
 Cromossomo 106, 118
 Cromossomos 117
 Cromossomos gigantes 110
 Cromossomos politênicos 110
 Crossing-over 120

D

Deplasmólise 71
 Desacopladores 135
 Desintoxicação 91
 Desmossomo 83
 Desmossomos 61
 Diacinese 120
 Diafanização 33
 Digestão extracelular 96

Digestão intracelular 95
 Distensão 37

E

Endocitose 69, 82
 Endosimbiose 128, 130
 Endossomos 70
 Envelope nuclear 103
 Envoltório 103
 Enzimas digestivas 70
 Esmagamento 37
 Espalhamento 36
 Estereocílios 62, 82
 Estroma 131
 Eucariotos 11
 Eucromatina 106
 Euploidia 109
 Excitose 70, 82

F

FADH2 135
 Fagocitose 69
 Fase clara 136
 Fenótipo 109
 Fermentação 132
 Filamentos intermediários 80, 81, 82
 Fissão 128, 130
 Fixação 33
 Flagelos 62, 63, 84
 Fosfolípidios 59
 Fosforilação oxidativa 133
 Fotofosforilação 136
 Fotossíntese 127
 Fragmoplasto 117

G

Gametogênese 121
 Genes 106
 Genótipo 109
 Glicocálice 60
 Glicose 133

H

Hemidesmossomo 61, 83

- Heterocromatina 106, 107
 Heterotróficos 127
 Hipertônico 71
 Hipótese da evolução gradual dos sistemas químicos 18
 Hipótese simbiótica 20
 Histonas 106
 Homeostasia 67
 Hormônios 91
- I**
- Idiograma 108
 Inclusões 79
 Interação hidrofóbica 59, 69
 Intercinese 119
 Intérfase 115
 Inversões 109
- J**
- Junção aderente 60
 Junção comunicante 61
 Junção de oclusão 60
 Junção oclusiva 60
 Junções de adesão 82
 Junções de adesão focal 82
 Junções de oclusão 82
- L**
- Lâmina nuclear 83, 104, 116
 Leptóteno 120
 Ligação iônica 45
 Ligações covalentes 45
 Lipídios 46, 67
 Lisossomos 14, 95
- M**
- Meio 71
 Meio hipotônico 71
 Meio isotônico 71
 Meiose 18, 118, 119
 Membrana plasmática 57
 Metáfase 108, 116
 Microfilamentos 80
 Microfilamentos de actina 80, 81
 Microscopia eletrônica de transmissão 26
 Microscopia eletrônica de varredura 28
 Microscópio 23
 Microscópio de contraste de fase 25
 Microscópio de fluorescência 26
 Microscópio óptico 23
- Microtomia 34
 Microtúbulos 80, 81, 83
 Microvilosidades 62, 82
 Mitocôndria 127
 Mitocôndrias 14
 Mitose 18, 116
 Morte celular 69
 Movimento amebóide 82
- N**
- NAD 133
 NADH 133
 NADH desidrogenase 129
 Necrose 18
 Núcleo 12, 101
 Nucléolo 105
 Núcleo polimórfico 101
- O**
- Ocludinas 60
 Osmose 70
- P**
- Paquíteno 120
 Parede celular 71, 84, 117
 Passivo 68
 Peptídeo sinal 97
 Permeabilidade seletiva 69
 Permeases 67
 Permuta 120
 Permuta gênica 119
 Peroxissomo 131
 Peroxissomos 14
 Pigmentos 129
 Pinocitose 69
 Plasmólise 71
 Poliploide 101
 Polirribossomos 92
 Ponte de hidrogênio 45
 Porina 129
 Porinas 130
 Preparo a fresco 37
 Procariotos 11
 Prófase 116
 Pró-metáfase 116
 Proteínas 47, 59, 67, 69
 Proteínas carreadoras 68
 Proteínas extrínsecas 59
 Proteínas formadoras de canais 67
 Proteínas integrais 60
 Proteínas intrínsecas 59
 Proteínas transmembranas 97
- Protoplastídeos 130
 Pseudópodes 82
- Q**
- Quiasma 119
- R**
- Recombinação genética 120
 Regiões organizadoras de nucléolos 105
 Respiração 127
 Respiração anaeróbica 127
 Reticulo endoplasmático liso 13, 91, 92
 Reticulo endoplasmático rugoso 13, 91, 92, 97
 Reticulo sarcoplasmático 92
 Ribossomos 92
 Ribulose 137
 RNA mensageiro 96
 RNA ribossômico 96
 RNA transportador 96
- S**
- Sarcômeros 81, 127
 Simporte 68
 Solventes orgânicos 69
- T**
- Telófase 116
 Telômeros 108
 Teoria Celular 9
 Tilacóides 130
 Tradução 96, 97
 Translocação 110
 Transporte anterógrado 93
 Transporte ativo 68
 Transporte ativo indireto 68
 Transporte ativo secundário 68
 Transporte passivo 68
 Transporte retrógrado 93
 Transportes 68
 Turgescência 71
- U**
- Ultramicrotomia 36
 Uniporte 68
- V**
- Vesículas 79
- Z**
- Zigóteno 120

Créditos das figuras

Capítulo 1 - Características gerais das células

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 3 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 4 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 6 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 7 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 8 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 9 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 10 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 11 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 12 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 13 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 14 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 15 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 16 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 17 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 18 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 19 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 20 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 21 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 22 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 23 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 24 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm

Capítulo 2 - Técnicas de microscopias para estudo das células

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marcelo Silva Barcellos
- Fig. 5 Marcelo Silva Barcellos

Capítulo 3 - Metodologias para estudo das células

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 1a Marla Piumbini Rocha

Capítulo 4 - Biomacromoléculas e citoquímica

- Fig. 1 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Marla Piumbini Rocha

Capítulo 5 - Biomembranas

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha (sup.), Marcelo Silva Barcellos (inf.)
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 4 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 5 Leonardo Siqueira, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 6 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 7 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 8 Marcelo Silva Barcellos
- Fig. 9 Marla Piumbini Rocha

Capítulo 6 - Transporte via biomembranas

- Fig. 1 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 2 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 3 Ana Cristina Maurente, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 6 Ana Cristina Maurente, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 1a Marla Piumbini Rocha

Capítulo 7 - Citoplasma

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Leonardo Siqueira, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 3 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marla Piumbini Rocha

Capítulo 8 - Sistema de endomembranas

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Marcelo Silva Barcellos
- Fig. 3 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Marcelo Silva Barcellos

Capítulo 9 - Aspectos gerais do núcleo

- Fig. 1 Leonardo Siqueira, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Marcelo Silva Barcellos
- Fig. 6 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 7 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 8 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 9 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 10 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 11 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 12 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 13 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 14 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 15 Marla Piumbini Rocha

Capítulo 10 - Ciclo celular mitótico e Meiose

- Fig. 1 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 6 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 7 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 8 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 1a Marla Piumbini Rocha
- Fig. 2a Marla Piumbini Rocha

Capítulo 11 - Organelas e o metabolismo energético da célula

- Fig. 1 Leonardo Siqueira, baseado em João Paulo Teló Timm
- Fig. 2 Marla Piumbini Rocha
- Fig. 3 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 4 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 5 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 6 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 7 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 8 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha
- Fig. 9 Leonardo Siqueira, baseado em Marla Piumbini Rocha

O presente material didático apresenta roteiros de atividades práticas em biologia celular. Essas atividades, possibilitam exercitar a capacidade dos mesmos de analisar problemas, levantar hipóteses e comprová-las, rejeitando-as ou aceitando-as.

Todas as propostas foram baseadas em diferentes livros sobre biologia celular, cadernos de exercícios de universidades brasileiras, livros de ensino médio e pela experiência vivenciada na área durante vários anos.

