

Capítulo 1

Biologia celular e ultraestrutura

Helene Santos Barbosa

Suzana Côrte-Real

1. Histórico

Citologia, ou biologia celular, é a ciência que estuda os vários sistemas celulares, a maneira como as células são reguladas e a compreensão do funcionamento de suas estruturas. A construção dos microscópios ópticos foi um passo decisivo para a descoberta das células, e acredita-se que o primeiro tenha sido inventado em 1592, por Jeinier da Cruz e seu pai, Zacharias Jansen, dois holandeses fabricantes de óculos. Tudo indica, porém, que o primeiro a fazer observações microscópicas de materiais biológicos foi o holandês Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). O microscópio simples com apenas uma lente, construído por Leeuwenhoek, foi aprimorado por Robert Hooke em 1665, ganhando mais uma lente.

A partir dos estudos de Hooke em biologia, publicados em um livro intitulado *Micrographia* (1665), que analisou cortes finos de cortiça obtidos da casca do sobreiro, verificou que estes eram constituídos por pequenas cavidades poliédricas (no latim, *cella*), as quais foram denominadas células. Estes compartimentos representavam as paredes das células vegetais mortas. Em

1838, o botânico alemão Matthias Schleiden descreveu que a célula era a unidade básica de todas as plantas e, mais tarde, em 1839, o zoólogo alemão Theodor Schwann chegou à mesma conclusão para os animais. Com base nestes conhecimentos, elaborou-se a teoria celular que foi proposta por Schleiden e Schwann. Posteriormente, a associação de técnicas de coloração e de citoquímica foi capaz de revelar as estruturas e a fisiologia das células.

O grande avanço no conhecimento da biologia celular, sem dúvida, foi a invenção dos microscópios eletrônicos em 1931, por dois engenheiros alemães – Ernst Ruska e Max Knoll –, o que possibilitou a visualização das organelas celulares em grande detalhe.

A célula é uma unidade funcional que estabelece interação entre seus componentes, sob o aspecto fisiológico, biossintético e reprodutivo. A dinâmica celular para a manutenção da vida é regida por um processo de automanutenção, que compreende a modificação de estruturas, a substituição de componentes, de tal forma articulada que garanta a sua organização estrutural e funcional.

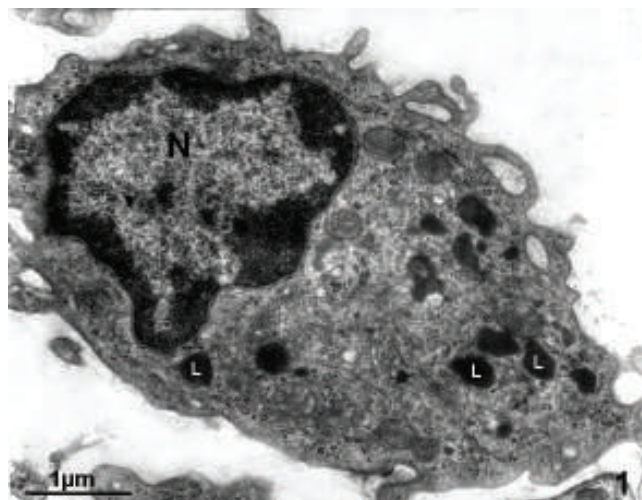
2. Células procarióticas e eucarióticas

A divergência entre procariontes e eucariontes deve ter ocorrido após serem estabelecidos os mecanismos de replicação e transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), a tradução, o sistema de códons e os metabolismos energéticos e biossintéticos. O principal critério de distinção entre estes grupos é a sua organização celular. As células procarióticas (do latim *pro*-primeiro e *cario*-núcleo) são relativamente simples e se caracterizam por não apresentarem membrana, segmentando os ácidos nucleicos DNA) e ribonucleicos (ARN) do citoplasma. Além disso, algumas destas células apresentam uma membrana plasmática circundada externamente pela parede celular. As células eucarióticas (do latim *eu*-verdadeiro e *cario*-núcleo) constituem o tipo celular da constituição dos fungos, protozoários, animais e plantas. Estruturalmente, são células mais complexas, ricas em membranas que formam compartimentos,

ou seja, uma divisão de funções metabólicas entre as organelas citoplasmáticas e o núcleo, circundado pelo envoltório nuclear, onde está contido todo seu material genético. Para os eucariontes, a compartimentalização de atividades celulares em organelas circundadas por membranas fosfolipídicas foi decisiva para a homeostase celular.

Os componentes das células eucarióticas (Figura 1) compreendem: a membrana citoplasmática, o citoplasma, o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias, os peroxissomos, as inclusões lipídicas, o glicogênio, o citoesqueleto, os centríolos, o centrosomo, os cloroplastos (encontrados em vegetais) e a parede celular, sendo esta última encontrada em fungos e vegetais. As características morfológicas e fisiológicas das principais estruturas encontradas nas células eucarióticas serão apresentadas a seguir.

Figura 1. Célula eucariótica mostrando membrana plasmática, núcleo (N) e organelas.



2.1. Membrana celular

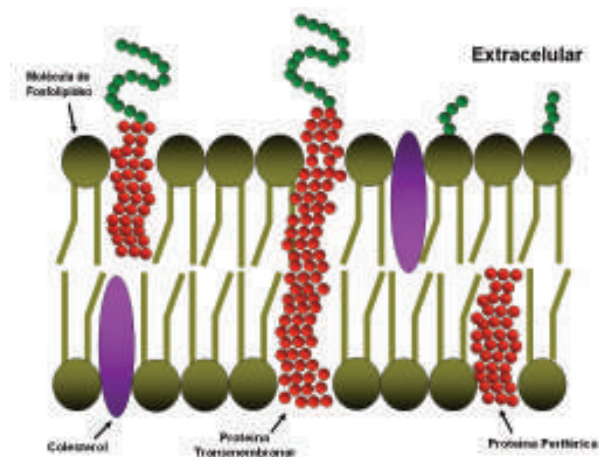
A membrana plasmática ou celular atua na manutenção de microambientes, formando uma barreira que impede o conteúdo celular de escapar e se misturar com o meio circundante. Esta membrana confere individualidade a cada célula,

definindo os meios intra e extracelulares. Além desta função, a membrana plasmática é o primeiro contato entre esses meios, traduzindo informações para o interior da célula e permitindo que ela responda a estímulos externos que podem influenciar nas suas funções biológicas, participando decisivamente das interações célula – célula e célula – matriz extracelular.

A membrana plasmática e a membrana das diferentes organelas celulares medem cerca de 7 a 10 μm de espessura e são visíveis somente ao microscópio eletrônico. Trata-se de uma estrutura trilaminar constituída de duas camadas eletrondensas (escuras) e uma camada eletrólúcida (clara) central. Molecularmente são formadas por uma bicamada fluída de fosfolipídios (fosfoglicerídeos e esfingolipídios) e colesterol, onde estão inseridas moléculas de proteínas. A membrana plasmática não é uma estrutura estática, os lipídios movem-se proporcionando fluidez à membrana.

Esquema mostrando a bicamada da membrana plasmática:

Figura 2. A membrana plasmática é formada por moléculas de lipídeos (fosfoglicerídeos e esfingolipídeos), colesterol, proteínas periféricas (localizadas somente em uma das camadas dos fosfolipídeos) e as transmembranares (localizadas nas duas camadas dos fosfolipídeos, ligando o meio extracelular ao citoplasma). A cadeia de pequenas moléculas verdes representa os carboidratos localizados somente no lado externo da membrana plasmática.



Os carboidratos presentes nesta estrutura, como, por exemplo, glicose, manose, fucose e galactose, estão ligados às proteínas, formando as glicoproteínas; ou aos lipídios, resultando nos glicolípídios e nos glicosfingolípídios. Estes carboidratos estão presentes apenas na face externa da membrana e fornecem identidade à célula.

A membrana apresenta uma propriedade imprescindível para manutenção da viabilidade celular, que é a permeabilidade seletiva, controlando a entrada e a saída de substâncias da célula. A passagem de moléculas polares maiores e os íons requer canais, formados por proteínas transmembranares.

○ transporte de moléculas para o interior das células pode ser:

a) transporte passivo – por difusão ou por osmose, quando não envolve o consumo de energia do sistema, sendo utilizada apenas a energia cinética das moléculas. Sendo assim, a movimentação dos íons e moléculas dá-se a favor do gradiente de concentração (do meio hipertônico para o meio hipotônico). A difusão pode ser auxiliada por enzimas (difusão facilitada) ou pode não ter participação de nenhuma delas (difusão simples). A difusão simples ocorre quando moléculas hidrofóbicas pequenas e polares, como O_2 , CO_2 , N_2 e C_6H_6 , passam pela membrana sem serem bloqueadas;

b) transporte ativo – é quando o transporte das moléculas envolve a utilização de energia pelo sistema, na forma de adenosina trifosfato (ATP). A movimentação das substâncias se dá contra o gradiente de concentração, ou seja, do meio hipotônico para o hipertônico, como, por exemplo, a bomba de sódio e potássio, que tem função de manter o potencial eletroquímico das células.

Entretanto, partículas maiores não conseguem atravessar a membrana, mas podem ser incorporadas à célula pela própria estrutura da membrana celular, ocorrendo, assim, a formação de vesículas. A este processo, no qual a membrana celular envolve partículas ou fluido do exterior, dá-se o nome de **endocitose**. Ele ocorre por dois mecanismos:

a) fagocitose – quando ocorre a captação de moléculas maiores, partículas ou microrganismos. Neste processo, a partícula a ser ingerida toca na membrana celular, formando projeções chamadas de filopódios;

b) pinocitose – processo utilizado pela célula para englobar porções de fluidos extracelulares e pequenas moléculas. Neste caso, a membrana sofre um processo de invaginação, ocorrendo a formação de pequenas vesículas. Estas são direcionadas para o citoplasma para que ocorra a absorção dos nutrientes. Por outro lado, para eliminar substâncias residuais, a célula utiliza o processo de **exocitose**, no qual uma vesícula, vinda do citoplasma contendo material que deve ser eliminado, se funde à membrana plasmática, lançando o seu conteúdo no meio extracelular.

2.1.1. Especializações da membrana plasmática

A comunicação e a coesão entre as células são estabelecidas por meio das membranas, formando três classes funcionais de junções celulares:

a) junção ancorante ou aderente – célula-célula ou célula-matriz, às quais a força de estresse é transmitida ao citoesqueleto. Existem vários tipos desta junção; destacamos, dentre eles, os desmossomas, os hemidesmossomas e junções que circundam completamente as células, atuando como uma barreira de permeabilidade e tensão;

b) junção apertada ou oclusiva (*tight junctions*) – é um tipo de junção que liga duas células vizinhas, selando os espaços entre elas e tornando essa região impermeável, não permitindo, assim, a passagem de pequenas moléculas ou íons;

c) junção mediada por canais proteicos – são as junções comunicantes (*gap junctions*) que permitem a passagem de moléculas e de íons entre duas células adjacentes.

2.2. Citoplasma

O citoplasma, ou citossol das células eucariotas, é formado por uma solução coloidal, viscosa e de aspecto relativamente uniforme, que contém água (80%), íons diversos, aminoácidos e proteínas. No citoplasma estão localizados o núcleo e as organelas celulares, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias, os peroxissomos e, ainda, as inclusões lipídicas, os grânulos de glicogênio e os ribossomos. Estas estruturas são responsáveis pelas funções celulares, como digestão, respiração, secreção, síntese e transporte de proteínas. No citoplasma estão também os elementos do citoesqueleto, responsáveis por várias atividades dinâmicas das células, e os centríolos, estruturas geradoras dos microtúbulos.

2.3. Núcleo

Estrutura extremamente importante para as células eucarióticas, pois nele estão contidos os ácidos nucleicos (código genético), protegidos pelo envoltório nuclear. É no seu interior que ocorre a duplicação do DNA e a transcrição dos ARNs.

O núcleo tem sua localização geralmente no centro da célula e a sua forma pode estar relacionada ao tipo celular. O envoltório nuclear é composto por duas membranas, uma externa e outra interna, com composições proteicas distintas, que delimitam um espaço variável que oscila entre 40 e 70 μm . A membrana interna deste envoltório se encontra associada à lâmina nuclear, que, por sua vez, está ligada fortemente à cromatina. A membrana externa do envoltório circunda a membrana interna e é contínua com a membrana do retículo endoplasmático (RE). Este fato faz com que o espaço existente entre as membranas do envoltório seja também contínuo à luz do RE. Assim como a membrana do RE, a membrana externa do envoltório — face citoplasmática — apresenta ribossomos aderidos que estão envolvidos ativamente na síntese proteica. O envoltório nuclear é interrompido regularmente, formando os poros nucleares.

Eles têm número e densidade bastante variáveis, dependendo do tipo celular e estado metabólico da célula. Pelos poros, ocorre o transporte bidirecional seletivo de proteínas e ARNs entre o citossol e o núcleo.

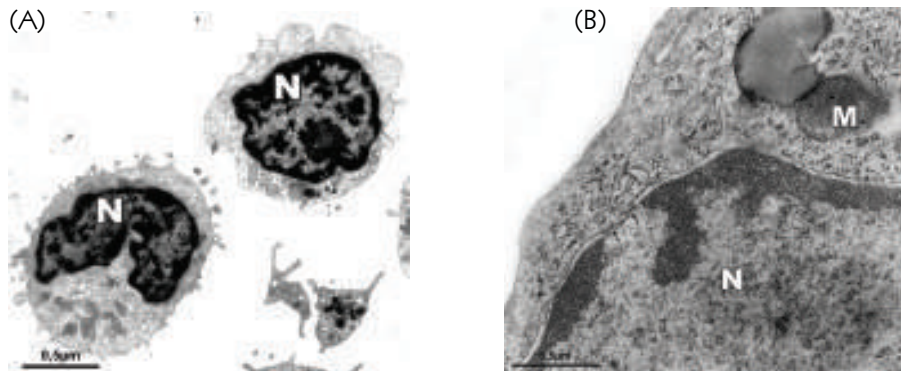
No núcleo (Figura 3) de células em intérfase encontra-se a cromatina — compactada (heterocromatina) ou frouxa (eucromatina) — composta de moléculas de DNA, proteínas histônicas e não histônicas. As histonas, proteínas básicas encontradas nos eucariotos, são importantes componentes da estrutura da cromatina, participando não somente como repressoras, mas também como ativadoras na transcrição do DNA. Por outro lado, as proteínas não histônicas desempenham papel estrutural e enzimático, participando da atividade gênica.

No núcleo interfásico também estão os nucléolos, cuja função é sintetizar ARNs e enviá-los para o citoplasma. Os nucléolos podem ter estrutura reticular ou compacta e o tamanho e a forma dependem do estado funcional da célula, variando conforme o tipo celular. Durante o ciclo celular, geralmente os nucléolos desaparecem a partir do final da prófase, reaparecendo no final da telófase.

A lâmina nuclear está presente no núcleo, tendo papel importante na reorganização nuclear após o término da divisão celular. Ela está ancorada às proteínas integrais da membrana interna do envoltório nuclear e ligada fortemente à cromatina. É constituída por proteínas filamentosas intermediárias do tipos A e B que se polimerizam em uma rede bidimensional.

Da estrutura do núcleo faz parte a matriz nuclear, que forma uma rede proteica fibrogranular alicerçando o núcleo. Ela está associada ao DNA durante os processos de duplicação e regula a transcrição nos eucariotos, juntamente com as histonas.

Figura 3. (A) Monócitos mostrando o núcleo ocupando grande extensão do citoplasma da célula; (B) célula eucariótica, apresentando núcleo com poros (setas) e mitocôndrias (M).



2.4. Retículo endoplasmático

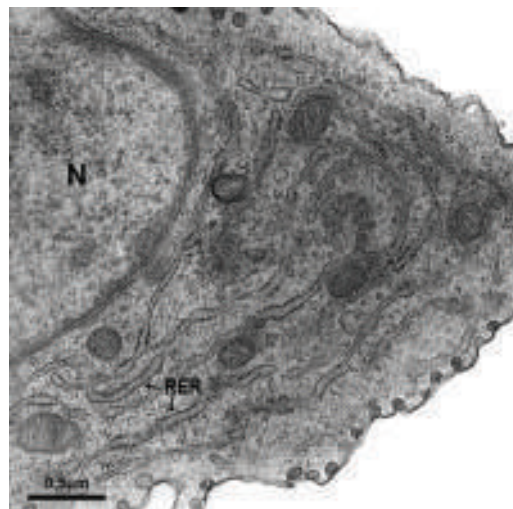
O retículo endoplasmático (RE) é encontrado na maioria das células, ocupando cerca de 10% do volume celular. É formado por uma rede de membranas interconectadas na forma de tubos ou cisternas. Dois tipos de retículo endoplasmático são observados: liso (ou agranular) e rugoso (ou granular), os quais apresentam características morfológicas e funcionais distintas.

O retículo endoplasmático liso, ou agranular, é caracterizado pela ausência de ribossomos aderidos à sua membrana e apresenta-se como uma rede de delgados túbulos que se anastomosam entre si. As funções desse retículo são muito variadas, dentre elas a síntese de hormônios e de lipídios, a desintoxicação celular – com a conversão de substâncias nocivas lipossolúveis ou insolúveis em compostos hidrossolúveis – e o armazenamento de cálcio.

O retículo endoplasmático rugoso (Figura 4), ou granular, é caracterizado pela presença de polirribossomos (ribossomos e ARNm) aderidos ao lado externo da membrana. Esta organela apresenta formas variadas, frequentemente em forma de túbulos achatados e longos ou bem dilatados, podendo estar

localizada em vários pontos da célula ou concentrada em determinadas áreas do citoplasma. O RE rugoso, em parceria com os polirribossomos, tem um importante papel na síntese e exportação de proteínas. As proteínas são capturadas pelo RE, por receptores presentes na sua membrana, assim que começam a ser sintetizadas pelo complexo de ribossomos e ARNm. As proteínas sintetizadas podem ter dois destinos: como proteínas transmembranares ou proteínas hidrossolúveis. As proteínas transmembranares podem permanecer na membrana do retículo ou serem destinadas à membrana plasmática e à membrana de outras organelas. Por outro lado, proteínas hidrossolúveis, quando sintetizadas, podem ser direcionadas para o complexo de Golgi ou encaminhadas ao *lúmen* de alguma organela e secretadas no meio extracelular.

Figura 4. Retículo endoplasmático rugoso (RE) dilatado de fibroblasto, apresentando ribossomos aderidos à membrana.

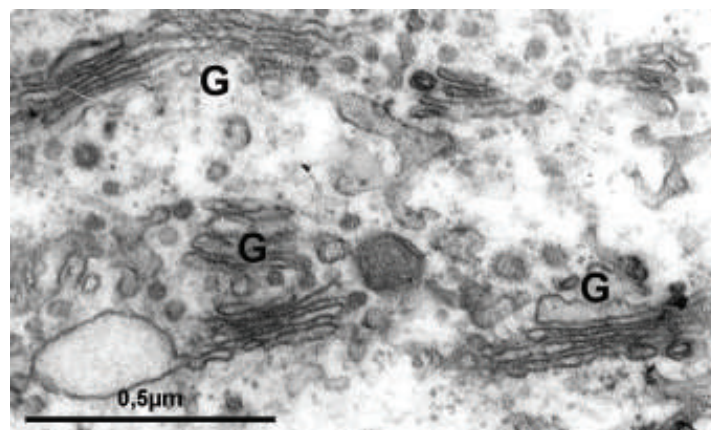


2.5. Complexo de Golgi

O complexo de Golgi, aparelho de Golgi ou simplesmente Golgi (Figura 5) foi descrito em 1898 pelo biólogo italiano Camilo Golgi e é formado por vesículas e túbulos achatados empilhados e organizados, chama-

dos de cisternas (cerca de 4 a 8 cisternas). As cisternas voltadas para o retículo endoplasmático são convexas (*cisternas cis*). As centrais são denominadas cisternas medianas, e as mais próximas ao sítio de secreção são côncavas (*cisternas trans*). O complexo de Golgi apresenta como principais funções o processamento de lipídeos e proteínas (denominados de glicosilação, sulfatação e fosforilação) e a separação e o endereçamento de moléculas sintetizadas fazendo parte da via biossintética secretora (RE – síntese; Golgi – processamento e seleção; vesículas – transporte). As vias secretoras compreendem o transporte de lipídeos, proteínas e polissacarídeos aos destinos finais e o empacotamento das macromoléculas em diferentes vesículas de transporte. Essas vesículas transportadoras direcionam proteínas/lipídeos/hormônios do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (face *cis*); o transporte de proteínas/lipídeos (modificados) do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático (face *cis*) e para a superfície celular (face *trans*) e, ainda, o transporte das moléculas que originam os lisossomos (face *trans*).

Figura 5. Citoplasma de célula eucariótica apresentando complexo de Golgi (G) com suas cisternas empilhadas, vesículas e mitocôndrias.



2.6. Lisossomos

Os lisossomos são estruturas geralmente esféricas, delimitados por uma membrana, que apresentam uma grande variação no seu tamanho. Eles são formados no complexo de Golgi, e em seu interior se encontram acumuladas cerca de quarenta enzimas hidrolíticas com propriedade de digerir uma grande gama de substratos, incluindo nucleases, proteases, glicosidases, lipases, fosfolipases e sulfatases. Estas hidrolases têm um pH ótimo entre 3 e 6, e, assim, o interior dos lisossomos é ácido. A acidificação é realizada por bombas de H^+ , que usam ATP. As suas enzimas são glicoproteínas provenientes do Golgi, que saem da sua face trans em vesículas específicas. A compartimentalização destas enzimas impede a lise indiscriminada dos conteúdos celulares. A principal função do lisossomo é a digestão intracelular, permitindo, assim, que a célula seja capaz de degradar partículas, macromoléculas, microrganismos ou outras células provenientes da endocitose. Além disso, os lisossomos agem na eliminação de organelas ou partes danificadas da própria célula, por um processo denominado **autofagia**. A formação dos autolisossomos se inicia quando uma porção de RE envolve uma organela que deve ser destruída, formando uma vesícula em seu redor. Esta vesícula é posteriormente acidificada e funde-se com um lisossomo primário, que inicia a degradação. Na heterofagia, os lisossomos fundem-se com endossomos (provenientes da endocitose) ou fagossomos (provenientes da fagocitose).

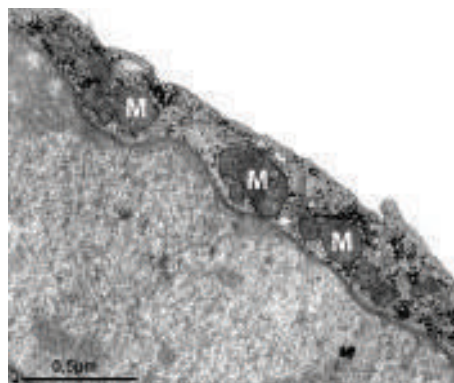
2.7. Mitocôndrias

As mitocôndrias (Figura 6) estão presentes no citoplasma das células eucarióticas, sendo caracterizadas por uma série de propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais. Geralmente, são estruturas cilíndricas, podendo ser esféricas, ovoides e alongadas, com aproximadamente 0,5 μm de diâmetro e vários micrômetros de comprimento. Possuem grande mobilidade, localizando-se em sítios intracelulares onde há maior necessidade de energia, pois sua função principal é a produção de ATP. Uma célula hepática normal pode

conter de 1.000 a 1.600 mitocôndrias, enquanto alguns ovócitos podem conter até 300 mil. Possuem organização estrutural e composição lipoproteica características, e contêm um grande número de enzimas e coenzimas que participam das reações de transformação da energia celular. Esta organela é caracterizada pela presença de um envoltório formado por duas membranas estrutural e funcionalmente distintas, as quais delimitam dois espaços. Existe um espaço intermembranar separando as membranas interna e externa, e um segundo gerado pela membrana interna, delimitando a matriz mitocondrial. A membrana interna apresenta uma série de invaginações para o interior da mitocôndria, gerando as cristas mitocondriais, onde estão presentes os componentes da cadeia respiratória responsáveis pela síntese de ATP. As mitocôndrias apresentam uma molécula de DNA circular, semelhante àquelas encontradas nas bactérias. Além disso, contêm todo mecanismo necessário para replicação e transcrição do DNA e tradução de proteínas. Entretanto, apenas uma pequena quantidade de proteínas é codificada pelo DNA mitocondrial. Com base nessas evidências, surge a teoria endossimbiótica.

A mitocôndria é considerada a usina da célula, uma vez que esta é capaz de processar oxigênio e glicose e convertê-los em energia na forma de ATP, por meio do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória.

Figura 6. Fibroblasto: mitocôndrias apresentando a matriz mitocondrial eletrodensa, cristas mitocondriais e a dupla membrana.



2.8. Peroxissomos

Os peroxissomos (Figura 7) são organelas envolvidas por apenas uma membrana e não contêm DNA e nem ribossomos; todas as suas proteínas devem ser importadas do citosol. Apresentam em seu interior um conteúdo granuloso fino e são geralmente arredondadas, medindo cerca de 0,5 μm de diâmetro. No seu interior, é comum se observar a presença de uma porção fortemente eletrodensa, o nucleoide. Dentre as enzimas encontradas nos peroxissomos destacam-se a catalase, a urato oxidase, a D-aminoácido oxidase e as enzimas responsáveis pela beta oxidação dos ácidos graxos. Os peroxissomos assemelham-se ao retículo endoplasmático porque se autorreplicam sem possuir genomas próprios. Nas células animais, os peroxissomos participam da biossíntese de precursores de glicerolípídeos, do colesterol e do dolicol. O número relativo de peroxissomos na célula pode variar rapidamente em resposta às mudanças ambientais e às condições fisiológicas. Os processos de sequestro e degradação dos peroxissomos são denominados macroautofagia e microautofagia.

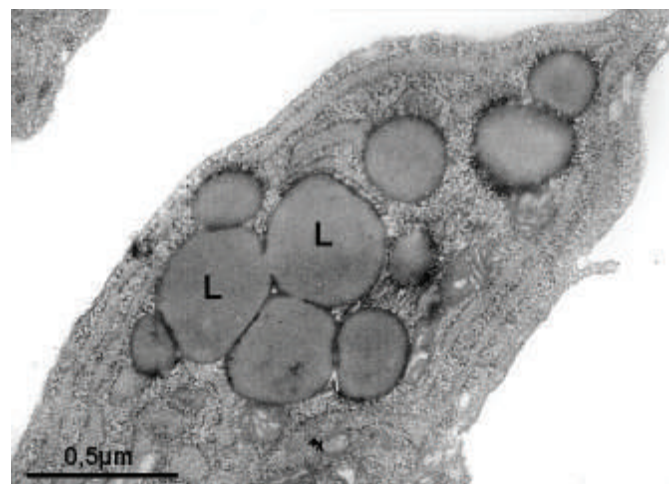
2.9. Inclusões lipídicas

Inclusões lipídicas (também chamadas de corpos lipídicos, gotas lipídicas ou adipossomas) são organelas ricas em lipídios presentes em todos os organismos, incluindo fungos, procariotos e eucariontes. Elas variam de tamanho, têm aspecto circular e estão distribuídas por todo o citoplasma das células.

Os corpos lipídicos são circundados não pela clássica bicamada de membrana, mas por uma monocamada de fosfolipídios, a qual, no mínimo em algumas células, deve ter uma única composição de ácidos graxos. O núcleo interno dos corpos lipídicos é rico em lipídios neutros, mas estudos com leucócitos têm demonstrado que os corpos lipídicos não são simples sacos de lipídios neutros. Considera-se atualmente que sejam organelas funcionalmente ativas, altamente reguladas e dinâmicas. Pelo uso de técnicas para identificação

subcelular de frações enriquecidas de corpos lipídicos, combinado com imunodeteção de proteínas por microscopia eletrônica e de luz, tem sido demonstrado que corpos lipídicos compartimentalizam enzimas envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios, caveolina e de proteínas envolvidas no transporte vesicular. A formação regulada de corpos lipídicos, seus conteúdos proteico e lipídico, e sua associação com outras organelas intracelulares, em algumas células especializadas, atuam na sinalização e ativação celulares, regulação do metabolismo de lipídios, tráfego de membrana e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios.

Figura 7. Inclusões lipídicas.

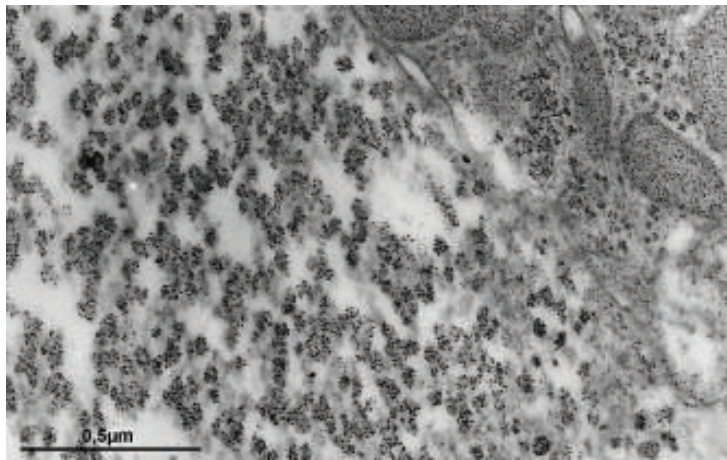


2.10. Glicogênio

O glicogênio (Figura 8) é um polissacarídeo constituído por subunidades de glicose com uma ramificação a cada oito ou dez unidades. Ocorre internamente, na forma de grandes agregados ou grânulos no citoplasma. É o meio de armazenamento mais importante nas células animais, servindo de reservatório de glicose. Os hepatócitos são responsáveis pela manutenção da glicemia, ao

mesmo tempo em que fornecem glicogênio para outras células do organismo. Principal fonte de energia no cérebro, os glicogênios produzidos pelos astrócitos são mobilizados para atividade neuronal.

Figura 8. Glicogênio distribuído no citoplasma de célula eucariótica.



2.11. Citoesqueleto

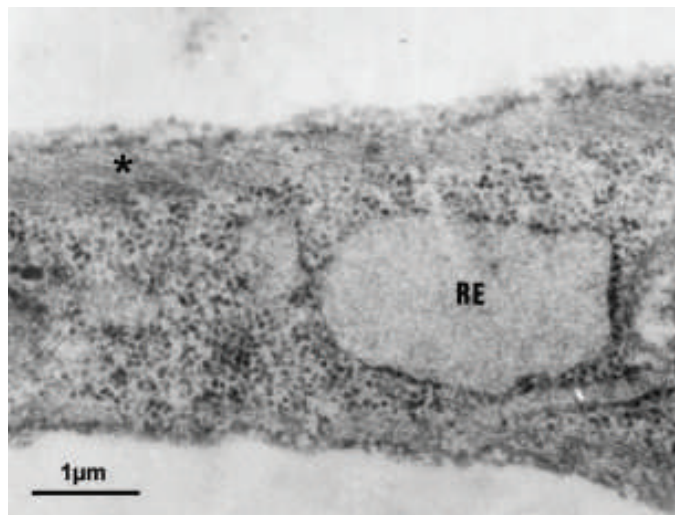
O citoesqueleto confere às células eucarióticas a manutenção da diversidade de formas, a realização de movimentos coordenados e direcionados e sua estruturação interna. Esse citoesqueleto depende de uma complexa rede de filamentos de proteínas que se estende por todo o citoplasma, sendo constituído por três principais tipos de estruturas: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os filamentos de actina.

Os microtúbulos são formados por subunidades: β -tubulina e α -tubulina, as quais se associam uma às outras, conferindo-lhe assim uma forma cilíndrica, com o diâmetro de 25 μm . Os microtúbulos direcionam o deslocamento de vesículas, participam da divisão celular com a formação do fuso mitótico para o deslocamento dos cromossomos e estão presentes na manutenção da estrutura celular e na morfologia dos cílios e flagelos.

Os filamentos intermediários recebem esta denominação por apresentarem um diâmetro intermediário entre filamentos de actina e microtúbulos (10 μm de diâmetro). Sua composição é proteica, formando uma rede estrutural por toda a célula.

Os filamentos de actina (Figura 9) estão distribuídos por todo o citoplasma das células eucarióticas e apresentam diâmetro de 5 μm . Eles são formados por uma proteína globular, a actina, que apresenta as isoformas: α , β e γ . Estes filamentos, nas células epiteliais, estão concentrados nos prolongamentos citoplasmáticos, participando, juntamente com os desmossomos, do contato com outras células e com a membrana basal, mantendo, assim, a integridade organizacional do epitélio. Nos miofibroblastos, importantes células do tecido muscular, os filamentos de actina estão organizados paralelamente à membrana plasmática, mantendo estas células tensionadas ao substrato e são, então, denominados fibras de estresse.

Figura 9. Fibra estresse (asterisco) localizada abaixo da membrana, formada por microfilamentos de actina.



2.12. Centrossomo

O centrossomo, principal centro organizador de microtúbulos, está localizado próximo ao núcleo da célula em intérfase e contém um par de formações cilíndricas e curtas dispostas perpendicularmente entre si e envolvidas por material pericentriolar, denominadas **centríolos**. Estas estruturas são formadas por nove triplex de microtúbulos, semelhantes aos corpos basais de flagelos e cílios. Estão presentes na maioria das células animais, porém ausentes nas células vegetais.

3. Técnicas para visualização das organelas celulares

3.1. Protocolos para revelação do núcleo

O núcleo pode ser visualizado tanto por microscopia de campo claro, com a utilização do corante Giemsa, quanto por microscopia de fluorescência, utilizando o corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole). Por ME, ele pode ser visualizado quando se utiliza acetato de uranila, que torna a cromatina eletrodensa.

3.1.1. Marcação nuclear com DAPI

- 1- Fixar com 4% de PFA por 20 minutos a 4°C;
- 2- Lavar duas vezes com PBS;
- 3- Lavar duas vezes com solução de BSA 1% diluída em PBS por 10 minutos cada;
- 4- Incubar com DAPI 1:10.000 em 0,85% NaCl por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 5- Lavar três vezes com solução de BSA 1% diluída em PBS por 10 minutos cada;
- 6- Montar com DABCO;
- 7- Selar com esmalte.

3.1.2. Coloração com Giemsa

- 1- Fixar com Bouin por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 2- Lavar três vezes com álcool etílico a 70%;
- 3- Lavar uma vez com água destilada;
- 4- Corar com Giemsa (6 gotas de corante para cada 1 mL de tampão fosfato 0,2M – solução de uso – filtrado), por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 5- Lavar duas vezes em água destilada. Para clarificação, passar em série de acetona / xilol (acetona 100% duas vezes, acetona 70% / xilol 30%, acetona 50% / xilol 50%, acetona 30% / xilol 70%, xilol 100% duas vezes);
- 6- Montar com Permount.

Preparação do tampão fosfato 0,2M:

Solução A:

NaH₂PO₄ . 1 H₂O (fosfato de sódio monobásico) 27,6 g
 Água tridestilada..... 1 L

Solução B:

Na₂HPO₄ (fosfato de sódio bibásico)..... 39,4 g
 Água tridestilada..... 1L

Solução estoque do tampão:

Solução A.....28 mL
 Solução B.....72 mL

Solução de uso:

Diluir 1:10 (solução estoque: água tridestilada).

3.2. Protocolo de marcação do retículo endoplasmático

O RE pode ser observado por microscopia de fluorescência pela utilização de marcador fluorescente específico, o ER-Tracker. E, por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se citoquímica ultraestrutural, revelando a enzima glicose-6-fosfato.

3.2.1. ER-Tracker

• Preparação de reagentes

O ER-Tracker Green é fornecido liofilizado em 100 µg. Preparar uma solução estoque de 1 mM. Para isso, deve-se diluir todo o conteúdo do frasco liofilizado em 128 µL de DMSO. É recomendado que esta solução seja separada em alíquotas e estocada em *freezer* com dessecante.

Preparo da solução de marcação

- Diluir a solução estoque de ER-Tracker a 1 µM para a concentração recomendada de 500 µM em meio simples;
- Para células aderidas, remover o meio da cultura, lavar três vezes com meio simples e adicionar a solução de marcação pré-aquecida. Incubar as células por 30 minutos a 37 °C. Substituir a solução de marcação por meio de cultura e visualizar as células, utilizando microscópio de fluorescência. Se as células a serem marcadas precisarem ser fixadas, consultar as etapas de marcação a seguir.

Fixação das células ER-Tracker Green

Lavar as células em meio simples por três vezes. Fixar com PFA 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavar três vezes com PBS, montar entre lâmina e lamínula com DABCO.

3.3. Protocolo para marcadores seletivos de mitocôndria

Mitocôndrias podem ser reveladas com marcadores fluorescentes específicos, como MitoTracker e Rhodamine 123, os quais são visualizados por microscopia de fluorescência. Graças à sua morfologia típica, são facilmente identificadas durante as análises por microscopia eletrônica.

3.3.1. Mito-Tracker

- **Preparando a solução estoque**

Dissolver o produto liofilizado em DMSO de alta qualidade para uma concentração final de 1 μM ; o peso molecular é indicado no rótulo do produto. Soluções em que se utilizam derivados di-hidro devem ser preparadas no dia do uso. A solução estoque pode ser armazenada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegida da luz.

- **Preparando solução de marcação**

A concentração para uma boa marcação varia de acordo com a sua aplicação. As condições sugeridas aqui podem necessitar de modificações baseadas nos tipos celulares utilizados ou em outros fatores, tais como permeabilidade das células ou dos tecidos a serem marcados. Diluir a solução estoque de MitoTracker a 1 μM para uma solução de uso com meio de crescimento *Dulbecco's modified Eagle medium* (D-MEM), sem soro, ou de acordo com o meio em que as células estão crescendo. Para marcação em células vivas, usar uma concentração de 100 μM .

- **Marcando células aderidas**

Crescer as células em lamínulas dentro de uma placa de Petri coberta pelo meio de cultura apropriado. Quando as células alcançarem a confluência desejada, remover o meio da placa, lavar três vezes em meio simples e adicionar o meio pré-aquecido ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) contendo MitoTracker. Incubar as células por 30 minutos sob condições de crescimento apro-

priadas para cada tipo celular. Substituir o meio com marcador por meio pré-aquecido e observar as células em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro adequado. Para fixar as células, deve-se retirar o meio com marcador e lavá-las com meio simples. Fixar com PFA 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, lavar três vezes com PBS e montar entre lâmina e lamínula com DBCO.

3.4. Protocolo de marcação de grânulos de glicogênio

Para caracterizar a expressão de polissacarídeos – grânulos de glicogênio –, utilizamos métodos citoquímicos ultraestruturais, empregando a técnica de Thiéry. O material deve ser processado de acordo com o protocolo de microscopia eletrônica de transmissão, sendo as amostras incluídas em resina Epon. Os cortes ultrafinos são obtidos e recolhidos em grades de ouro e submetidos ao seguinte protocolo:

3.4.1. Thiéry

- 1- As células são oxidadas por 20 minutos com 1% de ácido periódico;
- 2- Lavadas rapidamente por duas vezes em água destilada;
- 3- Incubadas por 30 minutos, 24, 48 ou 72 horas, em câmara úmida, com 2% de tiocarbohidrazida diluída em 20% (v/v) de ácido acético;
- 4- Lavadas sucessivamente em concentrações decrescentes de ácido acético (10%, 5%, 3% e 1%) por 1 minuto cada;
- 5- Reveladas com 1% de proteinato de prata diluído em solução aquosa por 30 minutos. OBS: metodologia alternativa, após as etapas descritas anteriormente, a revelação será realizada pelo vapor de tetróxido de ósmio por 1 minuto;

6- Lavadas com água (uma vez rapidamente), seguidas de uma lavagem por 10 minutos, trocando a água sucessivas vezes;

7- Ao final, os cortes serão examinados diretamente ao microscópio eletrônico EM10C da Zeiss, sem prévia contrastação.

Os controles da reação serão feitos por:

- a) Omissão de tiocarbohidrazida;
- b) Omissão da oxidação com ácido periódico;
- c) Omissão dos agentes reveladores.

3.5. Protocolo para marcação de compartimentos intracelulares ácidos

A marcação de compartimentos intracelulares ácidos — lisossomos — pode ser feita utilizando os marcadores laranja de acridina e Lysotraker:

- 1- Diluir a solução estoque a 1 mM para uma solução de uso a uma concentração de 75 nM. A diluição deve ser feita em meio de cultura simples;
- 2- Remover o meio da placa, lavá-la com meio simples três vezes e adicionar o meio pré-aquecido (37 °C) contendo o marcador;
- 3- Incubar as células com laranja de acridina ou Lysotraker diluída em meio utilizado para o cultivo celular na concentração de 10µg/ml e 75 nM, respectivamente, por 30 minutos a 37 °C, sob condições apropriadas para crescimento de cada tipo celular;
- 4- Após incubação, lavar duas vezes em salina tamponada com fosfato (PBS) e observar as células em microscópio de fluorescência com o filtro adequado;
- 5- Fixar com 2% paraformaldeído durante 20 minutos a 4 °C e, em seguida, lavar três vezes com PBS;

- 6- Em seguida, incubar com 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para visualização do núcleo por cinco minutos à temperatura ambiente;
- 7- Lavar com PBS;
- 8- Montar a lâmina com *antifading* 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO).

Referências bibliográficas

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. *A Célula*. São Paulo: Manole, 2001.
- GIEMSA, G. Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie, I, Abteilung Originale*, v. 32, p. 307-313, 1904.
- THIÉRY, J. P.; RAMBOURG, A. Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscopie*, v. 21, p. 279-282, 1974.