



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Física Gleb Wataghin

Microscópio Confocal

Aluno: Hugo Leonardo Metz

Orientador: Prof. Dr. Kléber Franchin – Clínica Médica – FCM – Unicamp

F 530 – Instrumentação

Índice:

Resumo	03
Introdução	04
Fundamentos Teóricos	04
Fluorescência	04
Microscópio de Fluorescência	04
Atividades	07
Resultados	09
Conclusão	10
Apêndice A	11
Apêndice B	19

Resumo

O microscópio óptico - conhecido desde o século XVII, mas só utilizado para fins científicos de modo mais sistemático a partir do século XIX - revolucionou decisivamente a pesquisa em biologia, trazendo inúmeras revelações e fundamentando novas teorias e disciplinas. Já no final do século XIX, o aperfeiçoamento desse instrumento garantiu a visualização de organismos minúsculos e mesmo células antes indistinguíveis a olho nu, por seu tamanho reduzido. Décadas mais tarde o avanço da microscopia permitiu aumentar em mais de 2000 vezes o diâmetro da amostra observada. Nesse ponto, quando o instrumento parecia ter chegado a um limite, surgiram novas técnicas, em especial a microscopia digital, possibilitando aos pesquisadores o estudo detalhado de criaturas e coisas que a microscopia convencional não era capaz de definir.

Um passo relativamente recente e importante nessa trajetória foi a introdução da microscopia digital de alta resolução, que inclui o microscópio confocal por varredura laser que, associada ao emprego de compostos químicos denominados fluoróforos, que levou a grandes avanços na pesquisa de organismos vivos. Essa combinação de princípios da óptica e da físico-química tornou finalmente possível “olhar de perto” variados tipos de células vivas e medir fenômenos biológicos em tempo e espaço reais. Com a nova técnica ampliou-se rapidamente, em áreas diferentes da biologia, como biofísica, bioquímica, biologia celular, microbiologia, fisiologia, farmacologia e outras, o conhecimento de elementos e organismos fundamentais.

Introdução

Não se sabe ao certo quando as lentes foram inventadas. Já em 721 a.C, há relato de um cristal de rocha recortado com propriedades de ampliação. Contudo, as lentes passaram a ser realmente conhecidas e utilizadas por volta do ano 1280, na Itália, com a invenção dos óculos. Com sua rápida popularização, logo começaram as primeiras experiências de combinação de lentes para aplicação em instrumentos de ampliação de imagens, resultando na criação do primeiro microscópio composto (duas ou mais lentes).

O crédito pela invenção do microscópio é dado ao holandês Zacharias Jansen, por volta do ano 1595. Como era muito jovem na época, é provável que o primeiro microscópio, com duas lentes, tenha sido desenvolvido pelo seu pai, Hans Jansen. Contudo, era Zacharias quem montava os microscópios, distribuídos para realza europeia.

Ainda no final do século XVII, o cientista alemão Antoni Van Leeuwenhoek fez descobertas significativas, usando um simples microscópio com apenas uma lente. Empregando técnicas revolucionárias na época para a construção de lentes, Leeuwenhoek produziu instrumentos com magnificação entre 50 e 200 vezes. Com o grande sucesso, os microscópios simples conquistaram um lugar ao lado dos modelos compostos de várias lentes. Na verdade, até o início do século XIX, alguns dos melhores microscópios podiam ser usados como simples ou compostos.

No século XIX, os fabricantes de microscópios desenvolveram novas técnicas para fabricação de lentes. Passaram, também, a utilizar espelhos curvos para melhorar a capacidade de foco desses instrumentos. Finalmente, por volta de 1880, os chamados microscópios ópticos atingiram a resolução de 0,2 micrômetros, limite que permanece até os dias de hoje. No nosso caso objetos da ordem de 0,2 micrômetros podem ser resolvidos, ediferenças de altura de menos de 0,1 micrômetro torna-se visível mesmo sem o uso de métodos de interferência.

Atualmente, os microscópios e as técnicas de observação estão bastante avançados. Os modelos ópticos confocais possibilitam regulagens extremamente precisas no foco e na capacidade de ampliação. Novos microscópios eletrônicos estão levando a observação a um limite que os cientistas do século XVI jamais imaginariam: o nível atômico. No século XX, o microscópio conquistou seu espaço em campos tão diversos quanto a medicina e a engenharia.

A técnica que utilizamos é a técnica de microscopia confocal por varredura laser, que utiliza uma combinação de recursos de microscopia óptica aliadas à princípios de mecânica quântica, físico-química e computação para a aquisição e processamento de imagens. Devido à quantidade de recursos que o equipamento oferece, não é tarefa simples para o usuário esporádico obter o máximo em desempenho, ficando o equipamento, na maioria das vezes, subutilizado. Por este motivo torna-se necessário que os usuários estejam acompanhados de alguém que conheça profundamente os recursos do equipamento e que conheça também os princípios da Física que governam o funcionamento do sistema como um todo.

Fundamentos Teóricos

Fluorescência

O microscópio confocal de fluorescência por varredura laser, doravante referido apenas como confocal, utiliza a fluorescência para a aquisição das imagens. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que um corpo absorve luz e após um curto intervalo de tempo re-emite essa luz. Dependendo da fonte de energia, a luminescência pode ser do tipo eletroluminescência, radioluminescência, quimioluminescência ou fotoluminescência, onde a última ocorre quando a fonte de energia são fótons.

Esse é o princípio da microscopia de fluorescência, na qual compostos químicos chamados fluoróforos são usados para produzir a fluorescência do material em estudo. O uso dos fluoróforos em biologia, por exemplo, acontece quando se quer localizar uma área específica da amostra (como uma proteína, por exemplo) ou para responder a um estímulo específico.

A fluorescência acontece por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons com energia $h\nu$ provindos de uma fonte (uma lâmpada ou um feixe laser) e passam de um estado fundamental (estado de mais baixa energia) para um estado excitado (de mais alta energia). Neste estado o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada e o elétron passa para um estado de menor energia, não necessariamente o estado fundamental. A diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia é emitida em forma de um fóton. A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem.

No caso de moléculas em solução, as energias de excitação e de emissão são distintas e formam um espectro de excitação e emissão, respectivamente. Essa diferença se dá justamente por causa das perdas durante o tempo de vida de excitação. Existem diferenças também nos espectros de fluoróforos distintos, o que permite o uso de diferentes fluoróforos, de acordo com o que se quer observar, na mesma aplicação.

Microscópio de Fluorescência

O sistema conhecido como microscopia confocal utiliza uma fonte de laser para promover a excitação dos fluoróforos. Através de um conjunto de lentes o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal (mantida a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto.

Ao retornar pelo mesmo caminho óptico, a luz devida á fluorescência é separada utilizando-se um conjunto de espelhos chamados *divisor de luz*. Em seguida a luz separada

passa por um pequeno orifício, chamado *pinhole*, capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Com isso só a luz dos pontos em foco é registrada, com a ajuda de tubos fotomultiplicadores. Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bidimensionais extremamente precisas podem ser construídas. Um esquema desse dispositivo é apresentado no apêndice B.

A obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra possibilita construir imagens tridimensionais e imagens tridimensionais em movimento. O inconveniente desta técnica é a degradação dos fluoróforos, o que leva à utilização do confocal para o estudo de fenômenos mais rápidos, no caso de espécimes vivos, ou para estudar detalhes internos das células em espécimes vivos ou fixados.

Atividades

As atividades realizadas foram principalmente a aquisição de imagens para os pesquisadores e seus alunos e eventualmente demos instruções sobre técnicas e recursos do confocal para alguns usuários. Além disso houve a dedicação de várias horas frente ao microscópio dedicadas ao treino e aperfeiçoamento de novas técnicas e recursos.

As atividades foram desenvolvidas utilizando-se o microscópio invertido *LSM 510 Axiocvert 200 M*, fabricado pela Carl Zeiss, equipado com os seguintes canhões de laser:

Argon/2 458/477/488/514 nm
HeNe1 543 nm
HeNe2 633 nm

Durante o primeiro semestre a principal atividade foi a aquisição de imagens para os alunos de pós-graduação do prof. dr. Kléber Gomes Franchini, chefe do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp.

Como parte complementar das atividades, prestamos serviços em colaboração com o trabalho de outro grupo da FCM, chefiado pelo prof. Dr. Lício Augusto Velloso, para grupos de pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp e para pesquisadores Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), campus Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - USP.

A tabela 1 apresenta o nome do orientador responsável por cada grupo, o departamento ao qual fazem parte, a instituição de origem e o nome e nível (mestrado, doutorado ou pós-doutorado) de cada aluno.

Tabela 1 - Relação de alunos e orientadores

Orientador	Departamento	Instituição de origem	Nome	Nível
Kléber G. Franchini	Clínica Médica - FCM	Unicamp	Daniella Crosara	Pós-Doutorado
			Marcos Corat	Doutorado
			Rosana Yuri Inoue	Doutorado
Lício Augusto Velloso	Clínica Médica - FCM	Unicamp	Vivian Cristine	Doutorado
Eduardo Melani Rocha	Clínica Médica - FCM	Unicamp	Mônica de Cássia Alves	Mestrado
Luis Eduardo Soares Netto	Departamento de Bioquímica - Instituto	USP		

	de Biociências			
Co-orientador: Gonçalo A. Guimarães Pereira	Genética - IB	Unicamp	Ana Paula Dias Demasi	Pós-Doutorado
Maria Júlia Marques	Anatomia - IB	Unicamp	Adriana Pertille	Doutorado
Victor Alexandre Vitorello	Laboratório de Biologia Celular e Molecular/ CENA	USP	Clóvis Arruda de Souza	Doutorado
			Flávia Regina Capaldi	Doutorado

A tabela 2 apresenta o nome de cada aluno e o título do projeto. No apêndice A é apresentado um resumo desses trabalhos. Não aparecem os nomes de todos os alunos relacionados na tabela 1 pois alguns deles não o enviaram.

Tabela 2 - Projetos

Nome do Aluno	Título do Projeto
Daniella Crosara	Efeito do Tratamento com Inibidores de Tirosina Quinases no Crescimento Hipertrófico de Miócitos Cardíacos de Ratos Adultos Submetidos a Estiramento <i>In Vitro</i>
Vivian Cristine	Mecanismos Moleculares Envolvidos na Associação Funcional entre o Receptor de Insulina (IR) e os Receptores de Angiotensina (AT1 e AT2), JAK2, STATs e SOCS3
Mônica de Cássia Alves	Avaliação da relação entre produtos finais de glicosilação (AGEs) em glândulas lacrimais e superfície ocular e olho seco em modelos animais de diabetes e envelhecimento
Ana Paula Dias Demasi	Caracterização da participação de tioredoxina peroxidase citoplasmática I na defesa antioxidante de células de levedura com distúrbios respiratórios.
Adriana Pertille	Papel das Proteínas Ligadas ao Cálcio no Mecanismo de Proteção à Mionecrose na Distrofia Muscular de Duchenne
Clóvis Arruda de Souza	Alterações celulares relacionadas com a sensibilidade ao alumínio em <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. BY-2
Flávia Regina Capaldi	Papel da membrana plasmática na avaliação da sensibilidade de células de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) cv. BY-2 ao alumínio

Resultados

Os resultados obtidos durante este semestre estão relacionados á melhoria das imagens adquiridas com relação às imagens mais antigas. Conseguimos aumentar consideravelmente a resolução das imagens através do estudo e aplicação dos recursos oferecidos pelo confocal. Este feito resultou em diminuição de gastos financeiros com reagentes e fluoróforos, uma vez que cada reação pode ser explorada com mais profundidade.

Também houve avanços na questão de novos projetos, pois, para cada resultado bem-sucedido houve a possibilidade de se preparar novas reações e estudar novos efeitos utilizando o confocal.

Com relação à parte técnica, implementamos o uso de recursos importantes para a preservação da fluorescência, evitando assim o fotodesbotamento dos fluoróforos e permitindo um melhor aproveitamento de cada amostra.

Alguns desses recursos implementados foram os seguintes:

- Utilização do recurso de ganho do detector. Isso permitiu que fosse possível utilizar o laser com até 30% menos intensidade com relação ao que era utilizado antes. Assim, a amostra resistia mais ao efeito de fotodesbotamento;
- Utilização adequada dos espelhos e refletores dicrônicos, permitindo uma melhoria na captação do sinal emitido pela fluorescência e evitando a sobreposição dos espectros de emissão. Isso permitiu que as imagens obtidas fossem mais confiáveis;
- Utilização do recurso *Multi Track* para a varredura das amostras. Este recurso permite um melhor controle sobre a excitação dos fluoróforos, pois, neste modo, cada laser é passado separado do outro, evitando problemas de superposição de espectros de emissão;
- Implementação da técnica de multi-cortes, que permite que a amostra seja varrida plano a plano e após a aquisição das imagens é possível fazer a montagem em 3 dimensões da amostra. Este recurso permite uma verificação espacial da localização dos objetos de interesse no interior da amostra.
- Implementação da utilização do canal de luz DIC para a formação de imagem. Este canal forma uma imagem não por fluorescência, mas por transmissão. Assim é possível obter uma imagem do relevo da amostra. Este recurso é especialmente útil em casos de marcação simples, pois permite ao pesquisador ter um panorama da localização do objeto de interesse na amostra;

No mês de novembro a aluna Daniella Crosara teve um artigo aceito por uma importante revista. Este artigo conta com vários testes, incluindo o confocal, onde participei fazendo a

aquisição das imagens, das quais duas foram aproveitadas. O apêndice B contém a versão do artigo que está sendo corrigida para ser publicada.

Conclusão

Como visto, o microscópio é uma ferramenta extremamente importante na vida de um laboratório que lida com biologia. O microscópio confocal é especialmente útil por permitir a visualização de estruturas de interesse de cada pesquisador com alta resolução, graças à utilização do laser para a excitação dos fluoróforos.

É importante também notar que o preparo e dedicação na operação do equipamento resulta num aumento da eficiência no aproveitamento dos recursos disponíveis e conseqüente aumento na qualidade da imagem final, contribuindo desta forma para uma melhor avaliação dos dados obtidos.

Apêndice A - Resumos

Vivian Cristine - Mecanismos Moleculares Envolvidos na Associação Funcional entre o Receptor de Insulina (IR) e os Receptores de Angiotensina (AT1 e AT2), JAK2, STATs e SOCS3

Resumo: Interações existentes entre diferentes vias de sinalização intracelular podem agir como mecanismos moduladores dos sinais gerados por cada uma das vias independentemente. A relação física existente entre o receptor de insulina e a via de sinalização da angiotensina não é completamente compreendida. Sabe-se que o receptor de insulina é uma tirosina quinase enquanto o receptor de angiotensina pertence à família dos receptores de sete segmentos transmembrana acoplados à proteína G. Recentes estudos têm demonstrado que o tratamento de tecidos com angiotensina II leva a fosforilação de elementos intracelulares pertencentes à via de sinalização da insulina. Um dos possíveis mediadores desta interação é a quinase citosólica JAK2, e também a proteína inibitória da sinalização SOCS3, ambas participantes da via de sinalização JAK/STAT.

No presente projeto, será realizada uma investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na associação funcional entre o receptor de insulina (IR), os receptores de angiotensina (AT1 e AT2), JAK2, STATs e SOCS3 utilizando-se para isso, corações de ratos Wistar adultos infundidos com insulina ou AII, e tratados ou não com bloqueadores do IR, AT1, AT2, JAK2 e SOCS3. Técnicas de biologia molecular, como *Western blot* e RT-PCR serão realizados, além de testes imunohistoquímicos. Os animais também serão tratados com oligonucleotídeos modificados fosfotiolatos específicos para a proteína SOCS3 a fim de se verificar a sua expressão e a de *early inducible genes*, após estímulo com insulina e AII.

O conhecimento dos elementos envolvidos nas vias de sinalização intracelular da insulina e da angiotensina II, e suas inter-relações, é de fundamental importância para que se possa avançar no conhecimento da causa da freqüente associação clínica entre diabetes mellitus e hipertensão arterial.

Mônica de Cássia Alves - Avaliação da relação entre produtos finais de glicosilação (AGEs) em glândulas lacrimais e superfície ocular e olho seco em modelos animais de diabetes e envelhecimento

Resumo: Objetivo: em estudos prévios observamos que a sinalização insulínica está prejudicada em glândulas lacrimais (GL) de ratos diabéticos e identificamos insulina na lágrima de ratos além de receptores de insulina em tecidos da superfície ocular (SO). Esses dados sugerem que as alterações na ação da insulina podem estar localmente envolvidas nas disfunções oculares relacionadas ao Diabetes Mellitus (DM). O Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) é uma proteína intracelular que atua na transcrição gênica e sua atividade está associada a complicações relacionadas do DM, através do aumento de fatores pró-inflamatórios como a interleucina-1 β (IL-1 β). Para conhecer a influência do DM na SO, esse estudo avalia: (1) a presença do NF- κ B na córnea, conjuntiva e GL, e de IL-1 β na GL, e (2) a função lacrimal de ratos diabéticos comparado a controles. Métodos: a expressão de proteínas NF- κ B e IL-1 β nos tecidos estudados foi avaliada em ratos Wistar por *Western blot*, e a localização de NF- κ B por imunohistoquímica com microscopia confocal. O DM foi induzido com estreptozotocina. As amostras de sangue e lágrimas dos ratos diabéticos e controles (n=5/grupo) foram analisadas por espectrofotometria para determinação dos níveis de glicose plasmática e proteína total na lágrima. Resultados: NF- κ B foi encontrado em córnea, conjuntiva e GL. Na GL a sua expressão foi significativamente maior em ratos diabéticos do que em controles. O volume de lágrimas foi de $2,38 \pm 1,01$ ul no grupo controle e $1,40 \pm 0,51$ ul no grupo de diabéticos ($P=0,06$) e a concentração de proteínas foi de $3,12 \pm 0,88$ ug/ul no grupo controle e $1,84 \pm 0,24$ ug/ul no grupo de diabéticos ($P=0,02$). Conclusões: o DM produz alterações significativas na secreção lacrimal de ratos. A maior expressão da proteína NF- κ B na GL dos ratos diabéticos sugere que esses fatores possam estar envolvidos nas alterações de SO do DM. Esse conhecimento permite estudar terapêuticas específicas para olho seco e alterações de SO relacionadas ao DM.

Ana Paula Dias Demasi - Caracterização da participação de tiorredoxina peroxidase citoplasmática I na defesa antioxidante de células de levedura com distúrbios respiratórios.

Resumo: Tiorredoxina peroxidase citosólica I (cTPxI) pertence à família das peroxirredoxinas, enzimas antioxidantes conservadas desde bactérias até humanos capazes de reduzir hidroperóxidos às custas de um substrato doador de elétrons contendo tiol. Recentemente, demonstramos que cTPxI é essencial para a defesa antioxidante de células com deficiências respiratórias (FEBS Letters, 2001, 509:430-434). Além disso, demonstramos também que EROs derivadas a partir de mitocôndrias funcionalmente comprometidas exercem papel determinante na sensibilidade de células deficientes em cTPxI ao peróxido de hidrogênio. Portanto, cTPxI parece ser especialmente importante na proteção de células expostas simultaneamente a fontes de EROs endógenas e exógenas.

Danos oxidativos ao DNA mitocondrial podem causar mutações, levando ao bloqueio do transporte de elétrons, aumento da produção de EROs e deficiência respiratória. Estas alterações são frequentemente associadas ao processo de envelhecimento, doenças neurodegenerativas e câncer em células humanas e podem estar relacionadas à sua maior sensibilidade ao estresse oxidativo. De acordo com nossos resultados, cTPxI poderia exercer papel decisivo no destino (sobrevivência/morte) de células afetadas por estas desordens

Pretendemos com este projeto caracterizar a resposta antioxidante de células de levedura com distúrbios respiratórios, na presença e na ausência de cTPxI, utilizando membranas de “microarray”, contendo os 6200 genes de levedura. Após análise dos resultados obtidos com as membranas comerciais, esperamos obter evidências que possam nos indicar possíveis mensageiros e vias de sinalização envolvidos nesta resposta, para um maior entendimento da interação cTPxI/mitocôndria. Também pretendemos estudar o possível papel de cTPxI e da atividade mitocondrial em envelhecimento. Vários marcadores de envelhecimento existentes em levedura poderão ser analisados. Estes estudos podem originar importantes contribuições às pesquisas nas áreas de diagnóstico, prevenção e de tratamento das mais variadas desordens humanas provocadas por mutações no DNA mitocondrial.

Adriana Pertille - Papel das Proteínas Ligadas ao Cálcio no Mecanismo de Proteção à Mionecrose na Distrofia Muscular de Duchenne.

Resumo: Os músculos extra-oculares respondem de forma única a falta da distrofina. Nos camundongos mdx, os músculos retos e oblíquos não apresentam sinal de degeneração muscular. Já os músculos acessórios apresentam sinais de regeneração confirmados pela localização central dos núcleos. A atividade das proteínas ligadas ao Ca^{2+} pode ser um dos mecanismos envolvidos para explicar tal proteção e, dentre essas proteínas, destacamos a calmodulina, considerada sensor universal de cálcio. Para verificar se os níveis da proteína calmodulina podem ser co-relacionados à ausência de mionecrose encontrada nos músculos extra-oculares foi realizada análise quantitativa da proteína através da técnica de imunoblotting. O padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina desses músculos também foi avaliado. Nos resultados parciais observou-se diminuição dos níveis de calmodulina no animal mdx comparado ao controle, sendo 23,5% menor nos músculos da pata, 52% nos músculos extra-oculares e 67% no músculo esternomastóide. Como os músculos da pata têm predomínio de fibras rápidas, o músculo esternomastóide fibras rápidas e lentas e os músculos extra-oculares apresentam um tipo especial, sugere-se que o tipo de fibra muscular possa estar relacionado ao nível de calmodulina. Entretanto, não é possível até o momento afirmar se a calmodulina está ou não relacionada à proteção dos músculos extra-oculares. Em relação às junções observadas nos músculos distróficos, 77% apresentaram o mesmo padrão de distribuição dos receptores encontrado nos músculos controle. As demais junções foram observadas no músculo retrator do bulbo (parcialmente afetado pela distrofia) que apresentou distribuição dos receptores em placa. Nossos resultados sugerem que a distrofina ou o complexo distrofina-glicoproteínas não está envolvido na organização dos receptores nesses músculos.

Clóvis Arruda de Souza - Alterações celulares relacionadas com a sensibilidade ao alumínio em *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2

Resumo: A sensibilidade celular ao alumínio (Al) depende do estado fisiológico ou de desenvolvimento das células. Em plantas, as células da zona de transição distal da raiz são particularmente sensíveis ao Al. Nesta região, as células encontram-se em uma fase preparatória para a rápida expansão celular. Assim como, os pêlos radiculares em expansão que também são sensíveis ao Al, mas não as células epidérmicas vizinhas. Em suspensão celular, as células que se encontram na fase logarítmica de crescimento da cultura são sensíveis e acumulam Al, enquanto que as células na fase estacionária de crescimento são tolerantes e acumulam muito pouco Al. Estas mesmas células em crescimento perdem sua sensibilidade ao Al quando induzidas a um estado de repouso pela retirada temporária de nutrientes do meio (< 3h).

Os objetivos deste trabalho foram: (A) otimizar a condução de uma cultura de células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 (TBY2), quanto à comutação entre modos de crescimento celular: (a1) pela manipulação composição do meio de crescimento celular; (a2) pela alteração do regime de subcultivo da suspensão celular (frequência do subcultivo e quantidade de inóculo celular) e (a3) por sincronização do ciclo celular; (B) verificar a existência de diferenças na capacidade celular de acúmulo de Al nas células que tiveram crescimento / desenvolvimento celular alterado; (C) verificar se as alterações capacidade celular de acúmulo de Al (sensibilidade celular) foram moduladas pelo ciclo celular e explorar a(s) fase(s) do ciclo celular em que a capacidade celular de acúmulo de Al mudou de patamar e (D) verificar se as diferenças na capacidade celular de acúmulo de Al foram dependentes do processo de exocitose celular inibido por cafeína.

Obteve-se mudanças no padrão de desenvolvimento celular, através de (i) uso de reguladores de crescimento vegetal (auxinas e citoquininas) conseguiu-se células sob predominante processo de divisão celular com pouca expansão e também células com predominante alongação celular com pouca divisão celular; (ii) pela retirada temporária de componentes do meio de crescimento celular (ou fósforo, ou sacarose ou 2,4D) e (iii) principalmente pela sincronização do ciclo celular.

Houve diferenças na capacidade celular de acúmulo de Al nas células que apresentaram alterações do desenvolvimento celular. Durante o crescimento da cultura observaram-se as diferentes fases de crescimento (lag, logarítmica e estacionária) o maior acúmulo de Al foi verificado no início da fase logarítmica de crescimento. No início da fase logarítmica de crescimento observou-se a maior taxa relativa de crescimento celular da cultura. Quando as células foram induzidas a predominância de divisão ou de alongação celular, a maior capacidade celular de acúmulo de Al foi verificada sob processo predominante de divisão celular. As células completamente expandidas tinham baixa capacidade celular de acúmulo de

Al. Quando estas células foram induzidas a re-entrarem em processo de divisão celular também recuperaram a capacidade celular de acúmulo de Al.

Em culturas com dois dias de idade, as células se encontram no início da fase logarítmica de crescimento e apresentam o pico máximo de acúmulo de Al. Este pico de acúmulo de Al na suspensão celular crescida em meio de cultura (completo) foi considerado como acúmulo relativo de Al = 100%. Estas células quando foram previamente tratadas / lavadas com meio de cultura incompleto perderam rapidamente a capacidade celular de acúmulo de Al (<3h). Já as células de uma cultura na fase estacionária que foram inoculadas em meio de crescimento celular incompleto, tal como restrição de sacarose por até três dias consecutivos apresentaram acentuada alteração na capacidade celular de acúmulo de Al. Durante os primeiros três dias este acúmulo de Al foi muito pequeno, após a re-adição de sacarose às culturas, estas rapidamente recuperaram a capacidade de crescimento celular e o acúmulo de Al nestas condições foi quase que o dobro do pico de acúmulo de Al apresentado pela cultura crescida em meio de cultura (completo). Culturas crescidas por até três dias em meio de cultura modificado 2 (ausência de 2,4D) entraram num processo de expansão celular e a capacidade celular de acúmulo de Al foi menor do que a verificada na cultura mantida sob meio de crescimento completo. O retorno da cultura ao meio de cultura (completo) contendo auxina, promoveu a re-entrada em processo de divisão celular e também, observou-se recuperação da capacidade celular de acúmulo de Al a níveis próximos ao da cultura que foi mantida em meio de cultura (completo).

Como o processo de divisão celular definitivamente determinou a uma maior capacidade celular de acúmulo de Al das células realizaram-se experimentos de sincronização celular com alta eficiência usando afidicolina e sucessivamente propizamida. Obtiveram-se aproximadamente 90% de células mitóticas no primeiro pico de sincronização celular. Nestas células sincronizadas alíquotas de suspensão celular foram coletadas e submetidas ao ensaio padrão de acúmulo de Al. Em todas as fases do ciclo celular foi observado acúmulo de Al, mas na transição entre a fase M e G1 observou-se um rápido e acentuado aumento (2X) na capacidade de acumular Al. Entre as fases M / G1 ocorre a citocinese celular. As análises por microscopia de epifluorescência ou microscopia confocal de varredura a laser permitiram observar células com acúmulo de Al acentuado na região celular correspondente a placa de divisão celular entre duas células. Nos estudos usando o inibidor da formação de placa de divisão celular (caféina) as células não progrediram no processo de formação da nova parede celular e também o acúmulo de Al não mudou de patamar, como o ocorrido com as células não tratadas com caféina. Conclui-se que os processos de secreção de membranas e paredes celulares novas (exocitose) constituem-se nos potenciais alvos da ação tóxica do Al e determina o local celular inicial de maior capacidade de acumular de Al.

Flávia Regina Capaldi - Papel da membrana plasmática na avaliação da sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2 ao alumínio

Resumo: A toxicidade por Al é um fator limitante ao crescimento das plantas em solos ácidos, constituindo-se num sério problema em muitos países. O primeiro efeito atribuído à toxicidade por Al nas plantas é a inibição da elongação radicular. Ao nível celular, o Al afeta o citoesqueleto e a estrutura e o funcionamento da membrana plasmática, mas a toxicidade por Al também tem sido relacionada à ocorrência de estresse oxidativo nas células, causando, por exemplo, a peroxidação de lipídios, seja pela formação de espécies reativas de oxigênio ou pela supressão do sistema antioxidante da célula, ou ainda, por alterações na susceptibilidade da membrana plasmática à peroxidação. Contudo, os mecanismos de toxicidade ao Al ainda são pouco conhecidos, sobretudo aos níveis genético e molecular.

A sensibilidade das células ao Al é relativa à fase de crescimento e desenvolvimento em que se encontram, além de também estar relacionada ao seu genótipo. Em raízes, grupos de células localizados entre o meristema e a zona de elongação (transição distal) são considerados sensíveis ao Al, assim como os pelos radiculares em crescimento.

Quando cultivadas em suspensões, as células apresentam sensibilidade na fase log de crescimento e tolerância na fase estacionária ou quando estão crescendo apenas por elongação. As células sensíveis apresentam elevado acúmulo de Al quando expostas a este metal, enquanto que, as células resistentes acumulam muito pouco. Não se conhecem os motivos destas diferenças, mas estes não devem ocorrer apenas por mecanismos de exclusão conhecidos, envolvendo a secreção de ácidos orgânicos ou elevação do pH extracelular, pois lavagens destas células antes da exposição a Al não afetam as diferenças encontradas (as lavagens retiram os ácidos orgânicos que poderiam estar complexando o Al). Assim, os mecanismos provavelmente envolvem a membrana plasmática, considerada como barreira primária à entrada de compostos orgânicos, íons e outras substâncias na célula. É possível que modificações na composição lipídica e protéica possam conferir as características de maior ou menor acúmulo de Al pelas células. Estudos conduzidos com células cultivadas de um mesmo genótipo, as quais podem sofrer alterações no grau de sensibilidade ao Al, apresentam bom potencial para a elucidação de mecanismos envolvendo a toxicidade por este metal.

O trabalho proposto está inserido em uma das principais linhas de pesquisa do laboratório e também em Auxílio à Pesquisa da FAPESP (00/10109-0) que visa utilizar-se deste tipo de abordagem em uma cultura de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2, linhagem modelo extensamente utilizada em estudos de biologia celular vegetal.

Especificamente, este trabalho propõe, em uma primeira etapa, dar continuidade a trabalhos em andamento, que visam encontrar e otimizar diferentes maneiras de se gerar alterações na sensibilidade destas células ao Al (continuidade do desenvolvimento do sistema modelo). A partir daí o trabalho investigará possíveis motivos do acúmulo diferencial de Al, tendo os seguintes objetivos: *a*) examinar se há diferenças na peroxidação da membrana plasmática entre células sensíveis e resistentes e se esta peroxidação afeta o

acúmulo de Al, **b**) em caso afirmativo, examinar se o sistema antioxidante da célula pode ser responsável por estas diferenças na peroxidação da membrana plasmática, e **c**) examinar diferenças na composição lipídica e protéica da membrana plasmática entre células sensíveis e resistentes, visando explicar as diferenças de acúmulo de Al.

HIPÓTESES

Baseados nos objetivos deste estudo e em informações disponíveis na literatura específica, algumas hipóteses foram determinadas:

- Diferenças no acúmulo de Al podem ser um resultado de diferenças na peroxidação de lipídios da membrana plasmática e/ou na composição lipídica ou protéica.

- No caso de diferenciação na peroxidação da membrana, pode haver ocorrência de ação do sistema antioxidante celular, na tentativa de desintoxicar a célula.

- A expressão diferencial de proteínas da membrana plasmática (síntese, deleção, fosforilação/desfosforilação) pode ser uma das razões que acarretam na sensibilidade e/ou resistência das células à presença de Al.

OBJETIVOS

- Promover mudanças no grau de sensibilidade das células de tabaco cv BY-2 ao alumínio, procurando induzir transições rápidas entre condições de sensibilidade e tolerância das células ao Al,

- Estudar a razão da ocorrência destas diferenças na sensibilidade ao Al entre células em diferentes estágios de desenvolvimento:

- a) Verificar se há diferenças na peroxidação da MP entre células que acumulam Al (sensíveis, fase log) e células que não acumulam Al (resistentes, fase estacionária)

- b) Observar se as diferenças na peroxidação da MP entre células sensíveis e resistentes estão relacionadas à atividade do sistema antioxidante celular, ou à composição lipídica e protéica da MP, considerando a MP como barreira inicial à entrada de Al na célula.

Apêndice B

Princípio da Imagem Confocal

