

4

A Ultra-Estrutura do Condrioma
e da zona de Golgi

por

J. David Ferreira

SEPARATA DA REVISTA
A MEDICINA CONTEMPORÂNEA

Ano LXXIV — N.º 11 — 1956, Novembro

A Ultra-Estrutura do Condrioma e da zona de Golgi ⁽¹⁾

por

J. David Ferreira

Assistente da Faculdade de Medicina de Lisboa
Bolsheiro do Instituto de Alta Cultura

Durante um primeiro período, a evolução dos estudos citológicos caracterizou-se pela grande importância assumida pelo núcleo, em todas as investigações. A facilidade com que era posto em evidência pelos métodos de fixação e coloração correntes, a sua existência em todos os elementos estudados, a sua importância nos fenómenos de hereditariedade e sexualidade, tornaram-no fulcro de muitos trabalhos e fizeram com que ao citoplasma fossem inicialmente atribuídas unicamente funções secundárias. Como *Fauré-Frémiet* comenta, o citoplasma foi tido e tratado como uma espécie de «cozinha» nuclear.

Foi a introdução de novos métodos de fixação e coloração, a par dos progressos alcançados na construção das lentes, que fizeram com que, a pouco e pouco, se fosse revelando a sua complexa estrutura. O caminho inicial foi bastante difícil, posto que os primeiros conceitos eram lançados numa época em que a técnica citológica era sujeita a críticas muito severas. A existência real das formações que revelava era posta em dúvida, interpretando-se como

(¹) Conferência pronunciada no I Ciclo de Conferências sobre Citologia e Histologia Electrónicas, organizadas pelo Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, Realizada nesse Instituto a 15 de Março de 1956.

sendo devidas a artefactos as observações de muitos investigadores.

Mas à medida que os métodos vão sendo seleccionados e que as observações de vários autores, em material diverso, seguindo técnicas diferentes, demonstram a existência de formações comuns, os resultados começam cuidadosamente a ser sujeitos a estudo. Da análise, passa-se a um trabalho de síntese proveitoso, donde surgem os conceitos dos organitos celulares de que nos vamos ocupar.

A par das dificuldades técnicas enfrentadas para a sua demonstração, e com as dúvidas levantadas pelas críticas, o estabelecimento desses conceitos encontraram um outro obstáculo. Na fase inicial, as observações de cada autor afastam-se em pormenores de descrição e interpretação, que tornam difícil uniformizar a sua nomenclatura. Torna-se necessário muitas vezes deixar acumular mais observações, para que um generalizador mais feliz, numa designação nova, os defina e divulgue.

Condrioma

Podem considerar-se como correspondendo às primeiras observações do condrioma os trabalhos de Flemming em 1882, posto que os factos em que este autor se baseou, para o estabelecimento da sua teoria filar do protoplasma, nada mais são do que o resultado da observação deste organito, em vários tipos de células. Foi porém Altmann, em 1890, que, utilizando fixadores sem ácido acético, estudou o condrioma, que individualizou e de que deu uma descrição morfológica. A sua semelhança com as bactérias leva este autor a interpretar estas formações como unidades elementares da vida, que designa por «bioblastos». Embora Altmann usasse métodos que punham em evidência não só o condrioma (bioblastos), mas também as granulações de secreção das células estudadas, teve o mérito de o individualizar, de descrever vários aspectos morfológicos com que se apresenta (granulações, filamentos), e ainda, depois de um certo número de experiências, lançar uma hipótese sobre o seu significado funcional. É dos primeiros a admitir a sua transformação em produtos de secreção, doutrina que, como veremos, é ainda defendida na actualidade.

Em 1898, Benda introduz uma técnica de coloração mais electiva que a de Altmann e cria para o designar o termo de mitocôndria, que, inspirado unicamente na sua morfologia, tem a vantagem

de não estabelecer compromisso com qualquer interpretação funcional.

A aplicação dos métodos destes Autores, e das modificações que posteriormente lhe foram introduzidas, aos mais diferentes materiais, demonstrando a existência de mitocôndrias em todos os tipos de células estudados, levou a concluir que são formações importantes na organização celular. Por outro lado, os trabalhos que põem o condrioma em evidência em tecidos embrionários, e a sua repartição durante a divisão celular, levantando a hipótese que poderia o condrioma representar um elemento importante nos processos de diferenciação, e estar ligado aos fenómenos de hereditariedade, fazem com que os citologistas o estudem, não só sob o ângulo morfológico, mas tentem interpretar a sua fisiologia.

De toda a nomenclatura surgida no período que se segue à sua descoberta, a designação dada por *Benda* foi muito divulgada e serviu de base para a classificação mais aceite. De uma forma geral chamava-se condrioma ao conteúdo em condriosomas do citoplasma, servindo o termo condriosoma de designação genérica deste organelo celular, que podia ser formado de granulações (mitocôndrias), de filamentos (condriocontos) e de rosários de granulações (condríomitos). A possibilidade de transformação das formações de um tipo nas de outro faz com que esta classificação não possa ser encarada de forma rígida. Actualmente estes termos adquiriram um sentido que é utilizado de forma diferente pelas várias escolas. De uma maneira geral, pode dizer-se que o termo que adquiriu sentido genérico foi para os anglo-saxónicos o de mitocôndria, enquanto que, para os latinos, foi o de condrioma.

Uma vez individualizado, e depois que se estabeleceu que era uma formação geral, o que levava a pressupor para ele uma função também geral, vejamos os aspectos mais importantes que o problema tomou.

No capítulo das técnicas, a introdução de métodos mais simples e mais rápidos, como por exemplo o de *Regaud*, que embora não sendo específico dava preparações permanentes, ao contrário das técnicas de *Altmann* e *Benda*, tornou mais fácil a sua individualização, entre as inclusões citoplásmicas. Uma vez que a sua descrição «in vivo» foi feita por várias escolas, as dúvidas sobre a sua existência real deixaram de pesar. Os estudos sobre a sua morfologia começaram a visar objectivos fisiológicos, seguindo o caminho já traçado por *Altmann* nas suas observações e experiências.

A descoberta por um discípulo de *Erlich*, *Michaelis* (1900), da coloração vital do condrioma pelo verde de Janus, trouxe um novo argumento contra os que ainda na época sustentavam que poderia tratar-se de uma alteração surgida em virtude dos processos de fixação.

De facto, a sua observação em células vivas e após o emprego de colorações supravitais teve grande importância na evolução do problema. Foram dois argumentos que diminuíram o número dos que ainda tinham dúvidas sobre a sua existência real. Foi também a demonstração do condrioma em células vivas que deu ao estudo deste organito directrizes diferentes das que tiveram os do ergastoplasma e aparelho de *Golgi*.

A convicção sobre a sua existência é tal que o seu desaparecimento pelo uso de certos fixadores, enquanto que estruturas como o ergastoplasma se continuavam a observar, foi tido como prova de que este último não passava de um artefacto de fixação e mesmo o resultado da transformação do condrioma, devido à acção dos fixadores.

A sua coloração supravital pelo verde Janus, descrita por *Michaelis*, cujo mecanismo de acção ainda hoje se discute, teve grande papel nesta primeira fase, não só por ser uma coloração vital, como por ser das mais específicas.

A par dos estudos empreendidos no sentido de descobrir o seu significado na fisiologia celular, aparecem nesta época as primeiras tentativas para estabelecer a sua composição química. *Regaud* (1908), *Fauré-Frémiet* (1910), *Lowschin* (1913), tentam deduzi-la pelo estudo do seu comportamento em presença de certos reagentes, concluindo que os fosfolípidos e as proteínas eram altamente representados.

Sobre a função desempenhada pelo condrioma, a ideia cujos alicerces *Altmann* lançara, da sua relação com os produtos de secreção, tomou extraordinário incremento.

Segundo alguns autores, como *Schultze*, *Hoven*, *Chaves*, *Morrelle* e *Laguesse*, haveria uma transformação directa nesses produtos, o que se traduzia pelas variações numéricas apresentadas pelo condrioma, durante as fases de elaboração e secreção. Para outros, como *Regaud*, *Nageotte*, *Athias*, *Noël*, *Dubreuil*, ele teria o papel de catalizador que originaria a transformação dos materiais absorvidos em produtos de secreção. Finalmente para o terceiro grupo, em que se contam muitos dos autores que fizeram o seu estudo

«in vivo», como *Michaelis*, *Levi*, *Cowdry* e *Lewis*, o condrioma não participaria nos processos de secreção.

Como teremos ocasião de ver, muito embora o muito que hoje se sabe sobre a sua fisiologia e morfologia, é ainda um problema com actualidade.

Depois de um período em que os conhecimentos sobre este organito unicamente avançaram em extensão, pois os mesmos métodos se foram aplicando a diferentes materiais de experiência, surge um trabalho que marca uma nova época. *Bensley* e *Hoerr* descrevem em 1934 uma técnica que permite, por lavagem e centrifugação, isolar o condrioma dos outros componentes celulares, em quantidade suficiente para permitir a sua análise química. Descobriram estes autores que as mitocôndrias de fígado de Cobaia e Coelho são insolúveis numa solução salina a 0,85 %, sendo assim possível a partir de uma emulsão de fígado obter, por centrifugação e lavagens sucessivas, substância mitocondrial praticamente pura. As análises efectuadas por *Bensley*, na fracção mitocondrial obtida por este processo, revelaram a existência de: 65 % de proteínas, 29 % de glicéridos, 4 % de lecitina e defalina e 2 % de colesterol.

Os processos de isolamento por ultracentrifugação diferencial foram desenvolvidos por *Claude* e *Hogeboom* (1941), que com os seus trabalhos de fraccionamento tiveram o mérito de chamar a atenção dos bioquímicos para o condrioma. As suas técnicas foram melhoradas posteriormente por *Hogeboom*, *Schneider* e *Palade*, que em 1948 descobrem que os homogenatos em solutos de sacarosa (0,88-M) permitem obter mitocôndrias praticamente íntegras. *Schneider* e *Hogeboom* melhoram ainda ulteriormente esta técnica por modificação da concentração da sacarose (0,25-M).

Estas descobertas impulsionaram o estudo pormenorizado do equipamento enzimático do condrioma. Em 1946, *Hogeboom* e colaboradores, a quem se devem importantes contribuições para o estudo do problema, verificaram que se encontravam representados exclusivamente no condrioma a succinoxidase e citocromo-oxidase. Em 1949, independentemente, *Schneider* e *Potter* e *Lehninger* e *Kennedy* demonstram, no condrioma separado por fraccionamento, a existência de toda a série de enzimas que intervêm na oxidação dos ácidos gordos e no ciclo de *Krebs*. É assim localizada no condrioma uma série de enzimas, que *Green* interpreta não como o resultado de uma mistura de acaso, mas como elementos de um complexo que se comporta como uma unidade. Este autor propõe que se designe por sistema cicloforase-mitocondrial esse complexo

de enzimas, anteriormente designado simplesmente por sistema cicloforase.

Estas descobertas, assim como a demonstração da existência de outros enzimas (uricase, ribonuclease, desoxiribonuclease, fosfatase, adenosino-trifosfatase), demonstraram a intensa actividade metabólica do condrioma, que pode tomar parte em processos de oxidação, reacções do ciclo tricarboxílico, processos de fosforilação aeróbica e reacções de síntese. A prova da sua intervenção nos mecanismos de respiração celular, de que *Kingsbury* suspeitara pela primeira vez em 1912, e que teve bastante voga entre os citologistas, encontrara-se finalmente. Identificavam-se as partículas citoplásmicas isoladas por *Warburg* (1913) e em que este autor observara actividade respiratória.

A demonstração das funções fundamentais que o condrioma desempenha no metabolismo celular surgem assim como consequência da descoberta, no condrioma isolado, e por intermédio de técnicas bioquímicas, de importantes funções enzimáticas. Como diz *David Green*, «o condrioma facilitou o casamento entre a química enzimática e a citologia». Mas os inúmeros descobrimentos proporcionados pelos métodos bioquímicos, não encontravam no campo da morfologia um substrato em que assentassem. Entre a imagem que o microscópio óptico nos fornecia deste organito e a lista de enzimas e funções estudadas, em consequência do progresso dos métodos do seu isolamento, escavava-se um fosso que os métodos clássicos não permitiam transpor. Recorde-se, por exemplo, que ainda em 1949 havia opiniões divergentes sobre a existência ou não de uma membrana mitocondrial. Em oposição aos que, como *Dalton* e *Duве*, descreviam uma mitocôndria limitada por uma membrana, em cujo interior se encontrariam os enzimas responsáveis pela sua actividade metabólica, outros supunham-na constituída por uma macromolécula, de forma semelhante ao que acontece nos vírus. Esta falência da morfologia foi, porém, notavelmente ultrapassada, quando foi possível aplicar ao seu estudo as ampliações e o poder separador do microscópio electrónico.

■ A primeira intervenção da microscopia electrónica na revisão deste problema deve-se às observações de *Porter, Claude e Fullam*, que, em 1945, estudaram o condrioma em células de culturas de tecidos pela técnica do estendimento. Estes autores observaram nas mitocôndrias inclusões de tamanho variado, mas não descrevem qualquer membrana mitocondrial. *Martin e Tomlin*, que em 1950 observaram um material semelhante, interpretam aquelas

inclusões como sendo devidas a estruturas citoplasmáticas situadas noutro plano e que, por sobreposição com as mitocôndrias, originavam uma imagem heterogênea destas estruturas.

Claude e Fullam (1945) estudam também o condrioma ao microscópio electrónico, fixado depois do seu isolamento por centrifugação diferencial. Com esta técnica o condrioma revela-se constituído por corpos esféricos, que nalguns casos apresentam uma membrana. Ainda Claude e Fulam, um ano mais tarde (1946), o estudam em cortes do fígado, mas a espessura dos cortes não permite visualizar qualquer estrutura interna.

Dalton e colaboradores (1949), em condrioma de fígado de Rato isolado por centrifugação diferencial em solutos de concentrações diferentes, observam que as mitocôndrias são envolvidas por uma membrana e que o seu corpo é constituído por uma substância granulosa. Este trabalho confirma as investigações realizadas por Zollinger com o microscópio de contraste de fase, em mitocôndrias suspensas em líquidos de pressão osmótica diferente.

Em 1950, Pease e Baker, em cortes de rim, descrevem o condrioma como uma estrutura apresentando bandas transversais ou vacúolos. Dalton critica estes resultados, pois as suas observações, feitas no mesmo material, não revelam a estrutura vacuolar que aqueles autores tinham atribuído como sendo devidas a um estado funcional particular. Em 1952, Orstein e Pollister descrevem uma estrutura granulosa interna em mitocôndrias de *Paramécia* observadas em corte, mas é em 1952 que Palade, utilizando os progressos alcançados pela ultramicrotomia, publica um trabalho sobre o condrioma de várias células, em que nos revela, pela primeira vez, de forma clara e completa, a organização heterogênea de uma mitocôndria. Este trabalho constitui a resposta ao problema da homogeneidade do condrioma já formulado por alguns dos pioneiros da citologia. Aqui não queremos deixar de exprimir num parêntesis a nossa admiração pela agudeza das observações desses primeiros investigadores, que souberam tirar dos recursos que possuíam um rendimento cuja apreciação não pode deixar de nos provocar admiração. Num trabalho publicado por Fauré-Frémiet, em 1910, sobre o condrioma dos protozoários e das células sexuais, referindo-se a este problema diz o seguinte: «Parece-nos que em certos casos uma mitocôndria é constituída por uma massa homogênea, enquanto que noutros é como que um pequeno vacúolo de conteúdo fluido e com uma camada periférica mais densa».

Nas microfotografias electrónicas, as mitocôndrias apresentam-se geralmente ovais, o que resulta da maior frequência dos cortes segundo um plano que determina este aspecto. As suas dimensões médias são de 1 a 4 μ no sentido do comprimento por 0,3 a 0,7 μ no sentido da largura. As variações observadas parecem não só depender de certos pormenores de ordem técnica, como ainda estar em relação com o tipo celular a que pertencem. Segundo *Palade*, as mitocôndrias de dimensões mais pequenas observam-se nas células endoteliais e as maiores nas fibras musculares cardíacas.

Segundo as descrições iniciais de *Palade*, pode considerar-se uma mitocôndria esquematicamente constituída por uma membrana que limita um espaço preenchido por uma substância, a *matriz mitocondrial*, no interior da qual se observam formações filamentosas que este autor, de acordo com as suas observações, designou por cristas mitocondriais (Figs. 1 e 2).

A membrana mitocondrial, que *Palade* descreveu no seu primeiro trabalho como homogénea, de dimensões compreendidas entre 7 e 25 m μ , foi descrita no trabalho fundamental de *Sjöstrand*, publicado em 1953, como constituída por uma dupla membrana, observação que foi confirmada por *Palade* no mesmo ano. A distância entre essas duplas membranas elementares é constante, sendo em média, segundo as condições de *SJÖSTRAND*, de cerca de 70 Å. Como, segundo este autor, cada uma das membranas elementares tem uma espessura média de 35 Å, a espessura média total da membrana mitocondrial é de cerca de 140 Å.

O espaço limitado pela membrana mitocondrial é, como vimos, preenchido por uma substância a que foi dado o nome de matriz. Esta substância, embora seja, na maioria das células, mais densa às radiações electrónicas do que a substância fundamental do citoplasma, apresenta variações em relação com o tipo celular a que pertence, e ainda com o soluto fixador usado e o tempo de fixação. Como tivemos ocasião de estudar, durante a autólise, esta substância começa por apresentar diminuição da sua densidade, seguidamente perde o seu aspecto relativamente homogéneo, observando-se zonas claras em contraste com outras mais escuras que se vão tornando progressivamente mais reduzidas (Fig. 3). Numa fase avançada de autólise, a matriz mitocondrial desaparece quase completamente, podendo dizer-se que as mitocôndrias, «electrónicamente vazias», estão reduzidas à membrana (Fig. 4). No seio da matriz



Fig. 1 — Mitocôndrias de pâncreas exócrino de embrião de Rato, 72.000 X.
(N — núcleo; E — lamelas ergastoplásmicas)

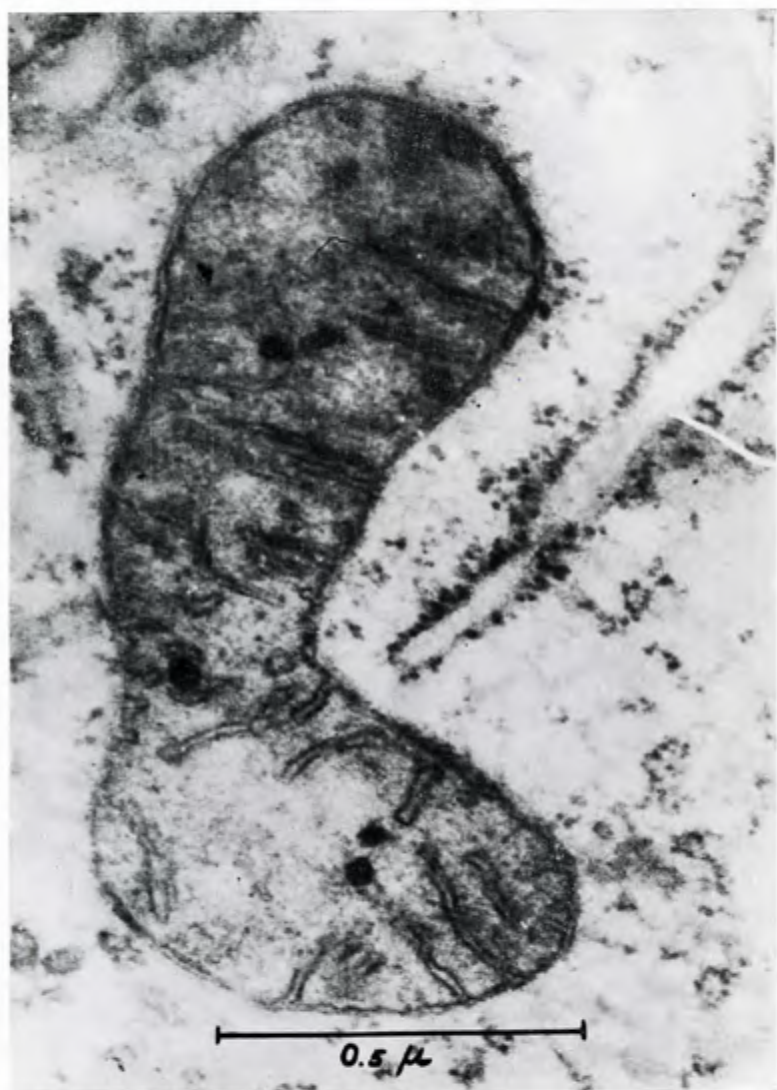


Fig. 2 — Mitocôndria. Pâncreas exócrino de embrião de Rato. 96.000 X.

mitocondrial observam-se, por vezes, o que acontece com mais frequência no epitélio intestinal e no rim, nas células do tubo contornado de I ordem, uns grânulos fortemente contrastados de 20 a 30 μ X de diâmetro (Fig.4). Durante algum tempo se pensou que estas formações nada mais eram que artefactos; porém, em face da sua frequência e regularidade, cedo se lhes atribuiu individualidade morfológica (*Rhodin*), permanecendo porém o seu significado sem explicação. Recentemente *Jules Weiss*, partindo das observações de *Stanbury* e *Mudge* (1953), que verificaram que mitocôndrias isoladas são capazes de manter altas concentrações de potássio quando em solutos pobres deste elemento, e de *Bertley* e *Davies* (1954), que demonstraram que mitocôndrias isoladas podem captar cátions de uma solução ambiente, estudou ao microscópio electrónico as modificações sofridas pelas células do epitélio intestinal (duodeno) de animais previamente submetidos a dietas com grande quantidade de potássio e sódio. Observando que o número das granulações contrastadas da matriz aumentavam, este autor lançou a hipótese de que estes grânulos representem cátions isolados dentro da mitocôndria. As observações de *Weiss*, se forem confirmadas, revestem extraordinária importância.

As cristas mitocondriais apresentam-se na maior parte dos cortes como lamelas, ligadas à membrana mitocondrial por uma extremidade, e fazendo saliência no interior da mitocôndria onde se banham na matriz (Fig. 1). O aspecto com que estas lamelas se apresentam está em relação com a orientação do plano de corte, sendo o estabelecimento da sua posição num modelo a três dimensões muito difícil, dada a sua espessura extremamente reduzida. Só o exame de mitocôndrias em muitos cortes permitiu estabelecer o plano geral da sua orientação. *Palade*, comparando os exames de microfotografias electrónicas de mitocôndrias cortadas em várias direcções, com um esquema em que representou a possibilidade de essas lamelas serem verdadeiros septos ou simplesmente cristas, concluiu tratar-se de cristas que partem da membrana para o interior da mitocôndria. Todas as suas observações foram aplicadas na construção dum modelo de parafina em que nos dá a imagem duma mitocôndria a três dimensões. Neste modelo é também possível estudar as imagens obtidas segundo os diferentes planos de corte (Fig. 5).

O número das cristas mitocondriais, cujo eixo é, como vimos, geralmente perpendicular ao maior eixo da mitocôndria, assim como a sua regularidade, apresenta variações segundo o tipo celu-

lar. É nas mitocôndrias das fibras musculares cardíacas que se observa o maior número de cristas mitocondriais, e, ao passo que não se observa qualquer disposição regular nas células hepáticas, nas células do tubo contornado de I ordem têm uma disposição regularmente perpendicular ao maior eixo da mitocôndria.

As cristas apresentam uma espessura média constante de 18-22 m μ *Sjöstrand*, que, nos seus trabalhos sobre o condrioma, estudou particularmente as células do pâncreas, rim e bastonetes da retina, encontrou diferenças características nos comprimentos das cristas mitocondriais destes três tipos de células. Assim, enquanto que nas células renais as cristas (que este autor, de acordo com a sua interpretação, denomina lamelas) atravessam quase toda a largura da mitocôndria, no pâncreas adulto unicamente 40 % se estendem a mais de 3/4 do diâmetro da mitocôndria, e nos bastonetes da retina são ainda mais curtas.

O trabalho inicial de *Palade* deu-nos ainda, no que diz respeito às cristas mitocondriais, mais alguns pormenores sobre a sua estrutura. Descreveu-as constituídas por três camadas, uma central mais clara e duas periféricas mais densas (Fig. 1). No que diz respeito às relações entre as cristas e a membrana mitocondrial existem divergências entre as descrições de *Palade* e *Sjöstrand*. O primeiro autor, como está implícito na designação que lhes deu, considera as cristas como o resultado do pregueamento da membrana mitocondrial. As cristas seriam como que pequenas vilosidades mergulhadas na matriz, continuando-se a camada central mais clara das cristas, com a zona mais clara situada entre as duas membranas elementares que constituem a membrana mitocondrial. Para *Sjöstrand*, que critica as observações de *Palade*, as cristas seriam: «estruturas bem individualizadas simplesmente com relações topográficas com a membrana exterior», não sendo portanto correcto denominá-las cristas mitocondriais (Fig. 6).

Quando começámos a estudar as transformações observadas durante a autólise, pensámos ser-nos possível, em virtude das modificações sofridas pelas mitocôndrias, contribuir para o esclarecimento do problema das relações das cristas com a membrana mitocondrial. Numa mitocôndria que se autolisa, ao mesmo tempo que se dá o desaparecimento progressivo da matriz, observa-se um aumento de volume donde resulta uma distensão da membrana mitocondrial. As microfotografias que obtivemos, embora permitam afirmar que este fenómeno em nada modifica as relações das cristas, que se tornam aparentemente mais curtas, com a membrana, não

são ainda suficientemente demonstrativas sobre a forma como essa relação se faz. De qualquer maneira podemos concluir desde já que existe uma relação íntima entre ambas as estruturas, observação portanto favorável ao ponto de vista de *Palade*.

Os números apresentados por *Palade* e *Sjöstrand*, sobre a espessura das cristas ou membranas internas das mitocôndrias, e das camadas que as constituem, são muito próximos. Assim, para *Palade* a camada central teria 80 Å (8 m μ) e as camadas periféricas 50 Å (5 m μ) e, segundo *Sjöstrand*, a central teria 90 Å (9 m μ) e as periféricas 40 Å (4 m μ). Enquanto *Palade* assinala que a espessura das camadas mais densas (periféricas) corresponde à espessura duma camada monomolecular de proteínas ou bimolecular de fosfolípidos, *Sjöstrand* e *Rhodin* admitem que a camada central menos densa é lipídica, enquanto que as mais densas periféricas são proteicas.

Em face de todas estas observações os citologistas têm hoje possibilidade de compreender os numerosos dados obtidos pela bioquímica. De acordo com outros estudos, entre os quais a verificação, em suspensões de mitocôndrias desintegradas, de partículas com as mesmas dimensões do que as cristas, contendo a maioria dos enzimas do sistema succinoxidase, é-se levado a localizar nas cristas um certo número de cadeias enzimáticas. Por outro lado, podendo, segundo *Palade*, concluir-se que «in vivo» a matriz é fluída e está cheia de um líquido contendo proteínas solúveis, entre as quais alguns enzimas, ela representará para as cristas uma câmara de difusão na qual se banham. A existência das cristas corresponde, segundo a sua interpretação, a um aumento notável da superfície reactiva dentro dessa câmara de difusão central. A existência, entre as duas membranas elementares, de uma câmara periférica, pode, segundo este autor, ter um significado particular, numa máquina enzimática onde há a considerar a inibição pelos produtos de reacção.

Pode também compreender-se como os dados fornecidos pelo estudo da ultra-estrutura do condrioma têm inspirado numerosos trabalhos no campo da Anatomia Patológica. Começa a assistir-se ao nascimento duma Patologia da ultra-estrutura celular, que, sem dúvida, esclarecerá muitos fenómenos que até hoje têm permanecido para além da nossa compreensão.

Toda a evolução do problema do condrioma mostra bem a verdade do comentário feito por *Zollinger* a propósito do micros-

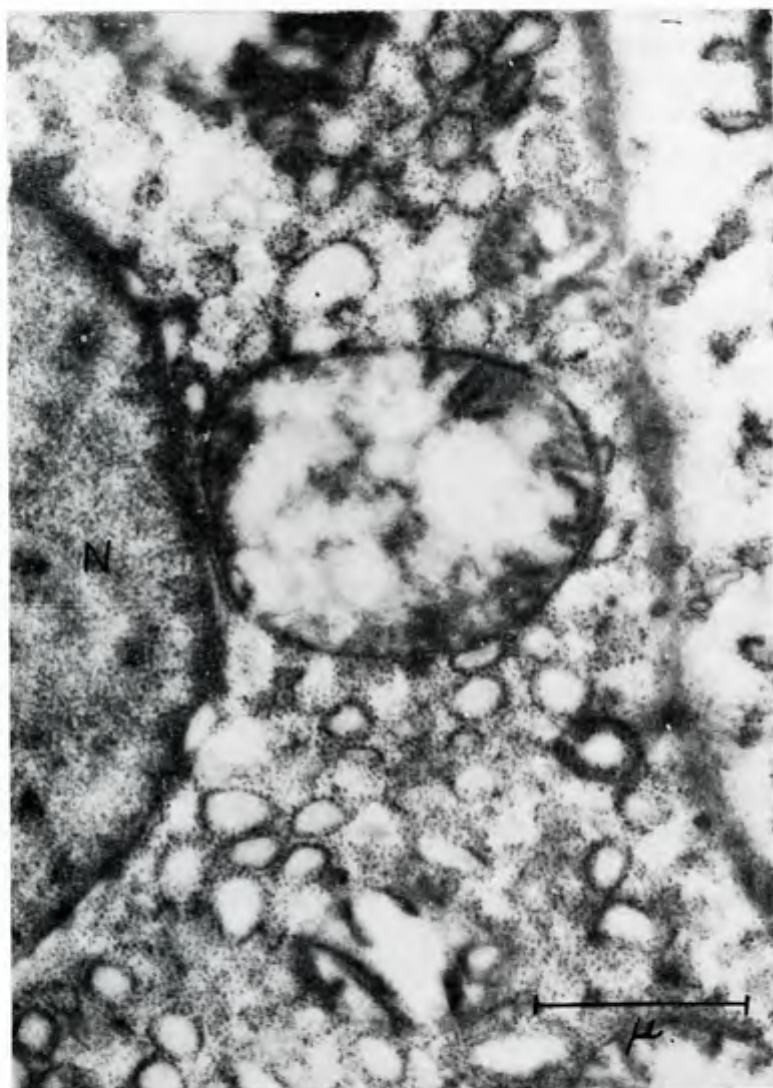


Fig. 3 — Mitocôndria. Pâncreas exócrino de Rato fixado uma hora depois da colheita. 27.200 X.

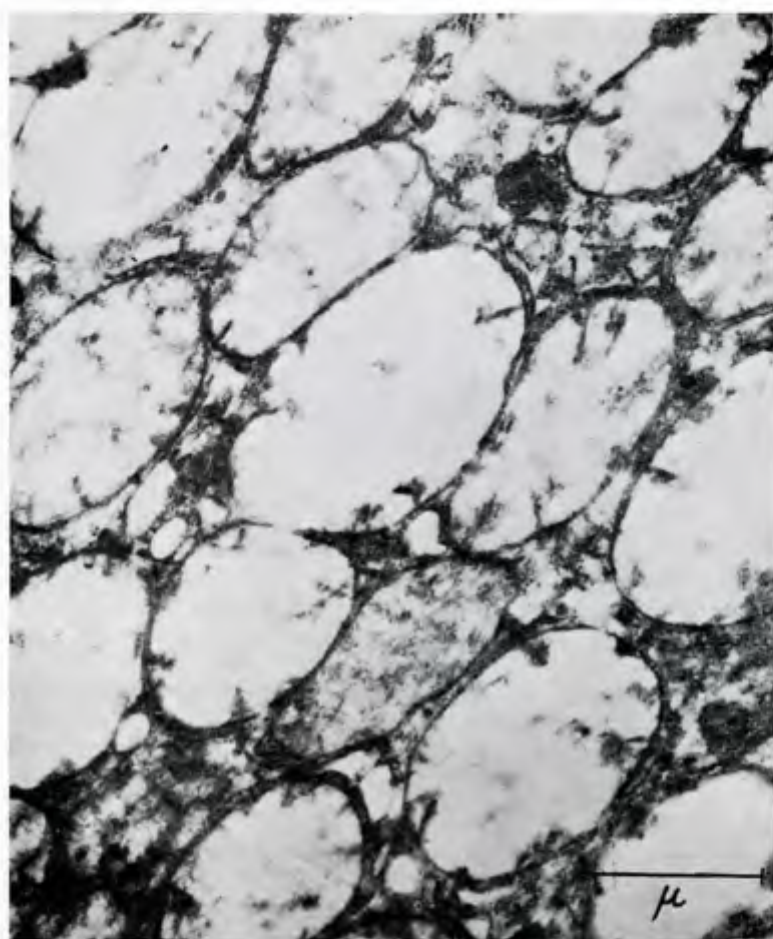


Fig. 4 — Mitocôndrias, Fígado de Rato fixado quatro horas depois da colheita, 24.000 X.

cópio de contraste de fase, e que nunca se deverá esquecer em Microscopia Electrónica; «os diferentes métodos de citologia — colorações, microscopia, cultura de tecidos, microscopia electrónica, microscopia de contraste de fase — tomados separadamente só permitem descobrir certos aspectos da organização celular, sendo a integração dos resultados particulares que nos permite alargar a extensão dos nossos conhecimentos». Foi a integração desses resultados que tornou possível percorrer a longa distância que separa as mitocôndrias de *Benda* das mitocôndrias de *Palade*.

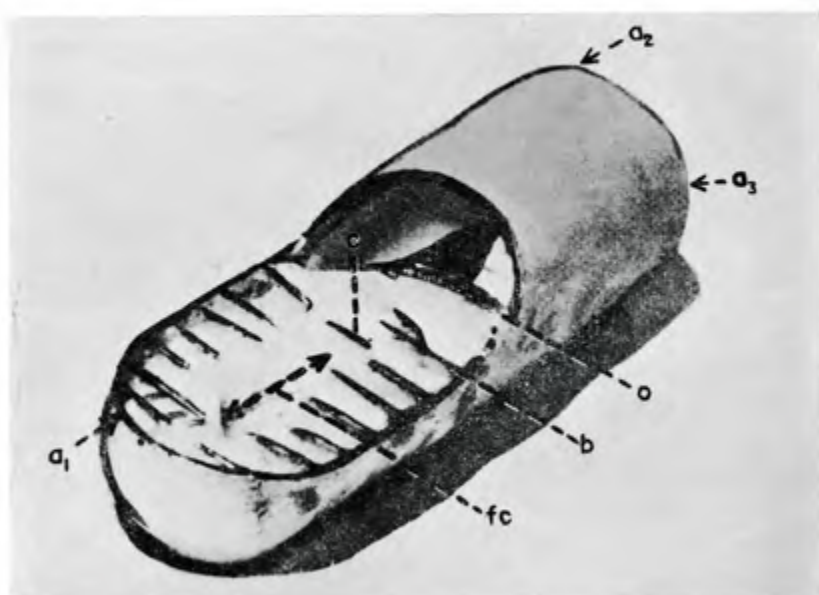


Fig. 5 — Modelo a três dimensões de uma mitocôndria. Observar como a espessura aparente das cristas está relacionada com o ângulo de corte. A crista marcada com *O* parece mais espessa que a crista *C* porque a primeira foi cortada obliquamente, enquanto que a segunda foi cortada normalmente. Em *b* vê-se uma crista que se ramifica, e em *C* uma crista aparentemente livre no meio da mitocôndria, pois a sua ligação é feita abaixo, na membrana mitocondrial. (*G. E. Palade*)

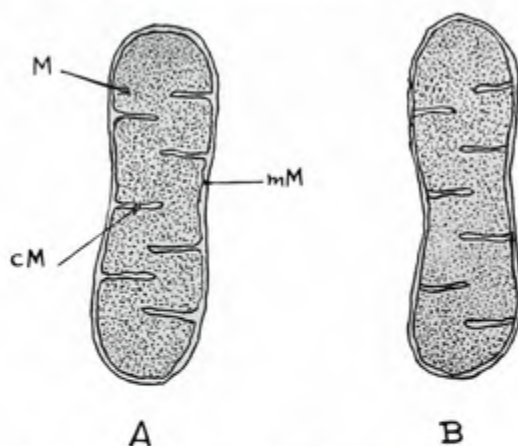


Fig. 6 — Mitocôndrias em esquema: A — segundo *Palade*; B — segundo *Sjöstrand*. mM — membrana mitocondrial; cM — crista mitocondrial; M — matriz

Zona de Golgi

Quando em 1898 Camillo Golgi, com o seu método de impregnação pela prata, pôs em evidência nas células de Purkinje do cerebello e nas células dos gânglios espinais uma estrutura reticulada, que denominou aparelho reticular interno, deu origem a um dos problemas mais debatidos de toda a citologia. Nenhum outro organito celular originou polémicas tão vivas, que se prolongassem durante tanto tempo e por vezes de forma tão dura, entre os citologistas das escolas mais eminentes.

A extensa literatura publicada desde então tem a caracterizá-la os aspectos de controvérsia que inspira a maioria dos trabalhos. Algumas vezes, torna-se mesmo difícil seguir o problema, pois a nomenclatura complica-se e certos debates encaram pormenores de significado bastante limitado.

Embora esteja fora do nosso objectivo fazer uma revisão completa deste assunto, não podemos deixar de traçar, em esquema, algumas das fases mais importantes dessa discussão, para que possamos compreender qual a posição que ocupava, quando foi aplicado ao seu estudo o microscópio electrónico.

Pouco tempo depois da descoberta de Golgi, Holmgren (1902) descreveu em várias células um sistema de canais, que denomina trofospôncio, cuja origem situa nas células vizinhas e cuja função relaciona com a entrada de substâncias nutritivas. Cajal, interpretando o aparelho reticular interno como a imagem negativa desse sistema canalicular, origina um problema que veio a ser muito debatido.

Em 1924, o problema complica-se de novo, quando Parat e Painlevé lançam uma teoria segundo a qual os elementos fundamentais do citoplasma são o condrioma e o vacuoma e estabelecem que o aparelho reticular interno e o trofospôncio representam artefactos devido à precipitação da prata ou do ósmio à superfície dos vacúolos reveláveis «in vivo» pelo vermelho neutro. Mais tarde Parat considera a existência de certas formações corpusculares, os lepidosomas, que representariam mitocôndrias modificadas ao nível do vacuoma (condrioma activo).

A teoria do vacuoma encontra adeptos, entre os quais Walker e Allen (1928), que conseguem, com a aplicação das técnicas clássicas para pôr em evidência o aparelho de Golgi, reproduzir em modelos formados por esfregaços de gelatina, lecitina e

albumina, imagens reticulares semelhantes às observadas nas células, quando se aplicam esses métodos.

Toda a evolução do problema do aparelho de *Golgi* será marcada no futuro pela teoria do vacuoma, sendo as investigações conduzidas no sentido de demonstrar as relações existentes entre estas duas estruturas celulares. Os dados obtidos são durante muito tempo contraditórios e as observações dos vários investigadores perdem com frequência todo o seu significado, pois por vezes quase simultaneamente alcançam conclusões opostas.

Em 1930, *Beams* demonstra simultaneamente o vacuoma e o aparelho de *Golgi* em células do pâncreas. No mesmo ano *O'Leary*, usando um método que permite estudar o pâncreas endócrino «in vivo», revela a existência de um aparelho canalicular que identifica com o aparelho de *Golgi*. *Gatenby*, em 1931, demonstra nas células do pâncreas a independência do aparelho de *Golgi* e dos grânulos que se coram pelo vermelho neutro. Mas a ideia de que o retículo clássico nada mais é que o resultado dos artefactos produzidos pelos fixadores vem a ter apoio em muitas outras investigações que correspondem a um renascimento da teoria do vacuoma.

Worley (1943) descreve, em células vivas de vertebrados e invertebrados, corpúsculos que seriam os constituintes do aparelho de *Golgi*. *Baker* (1944), com o seu teste do formol-cálcio-negro sudan, descreve-o constituído por vacúolos, que se podem pôr em evidência pelo vermelho neutro, por uma substância lipóide figurada e outra difusa, e ainda por um «produto golgiano» por vezes observável dentro dos vacúolos. O retículo dos autores clássicos seria o resultado da acção dos fixadores sobre estas estruturas.

Em 1949 *Baker*, resumindo as suas observações, descreve-o constituído por corpúsculos, alguns dos quais com um ou mais vacúolos. Os corpúsculos simples, coráveis inteiramente pelo Negro Sudan, enquanto que os vacuolares de periferia também corável por este corante, tomam no seu interior o vermelho neutro.

Ainda em 1949, *Palade e Claude*, estudando a acção do álcool e de alguns solutos fixadores, observam em vários tipos de células somáticas de vertebrados a formação de figuras mielinicas, cuja morfologia e topografia se mostram idênticas às descritas habitualmente para o aparelho de *Golgi*. Estes autores, em cujo trabalho se podem apreciar figuras altamente sugestivas, concluem que o aparelho de *Golgi* é uma figura mielinica formada durante as manipulações técnicas à custa das inclusões lipídicas pré-existentes.

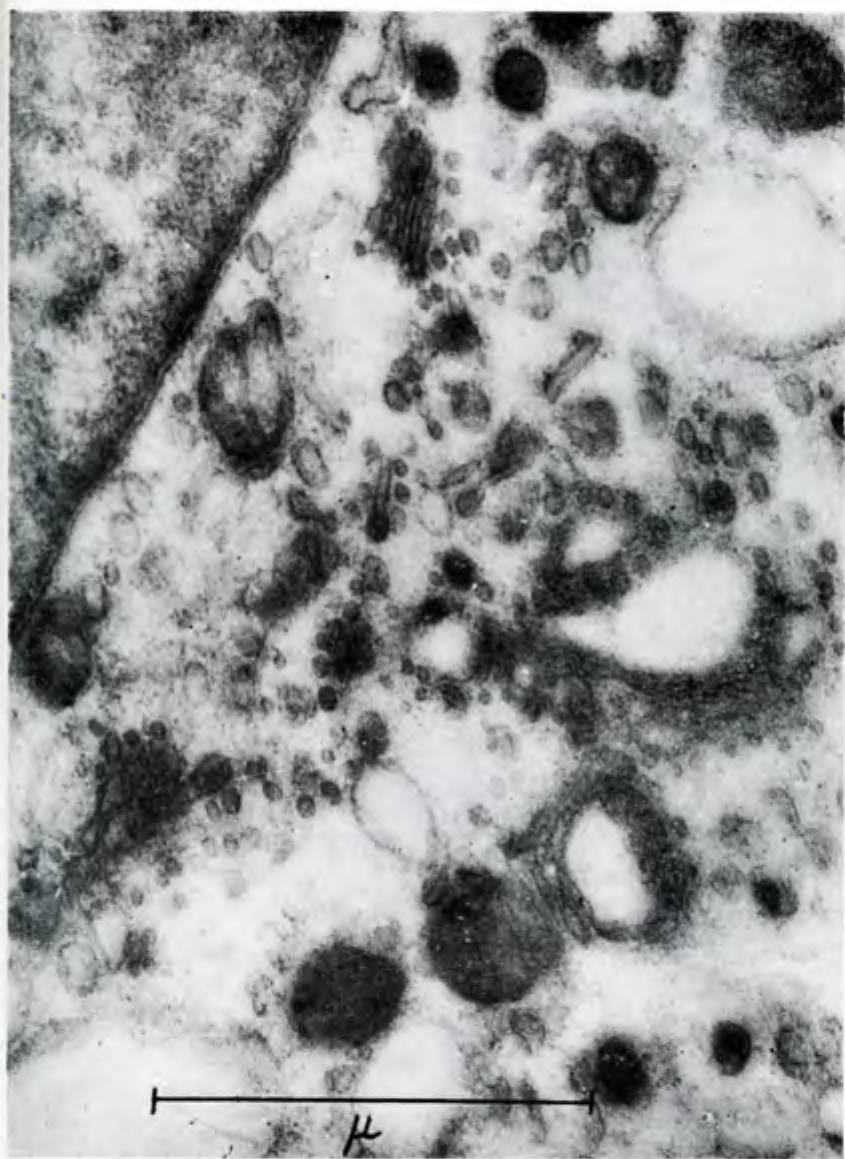


Fig. 7 — Zona de Golgi. Pâncreas endócrino de embrião de Rato, 58.400 X.

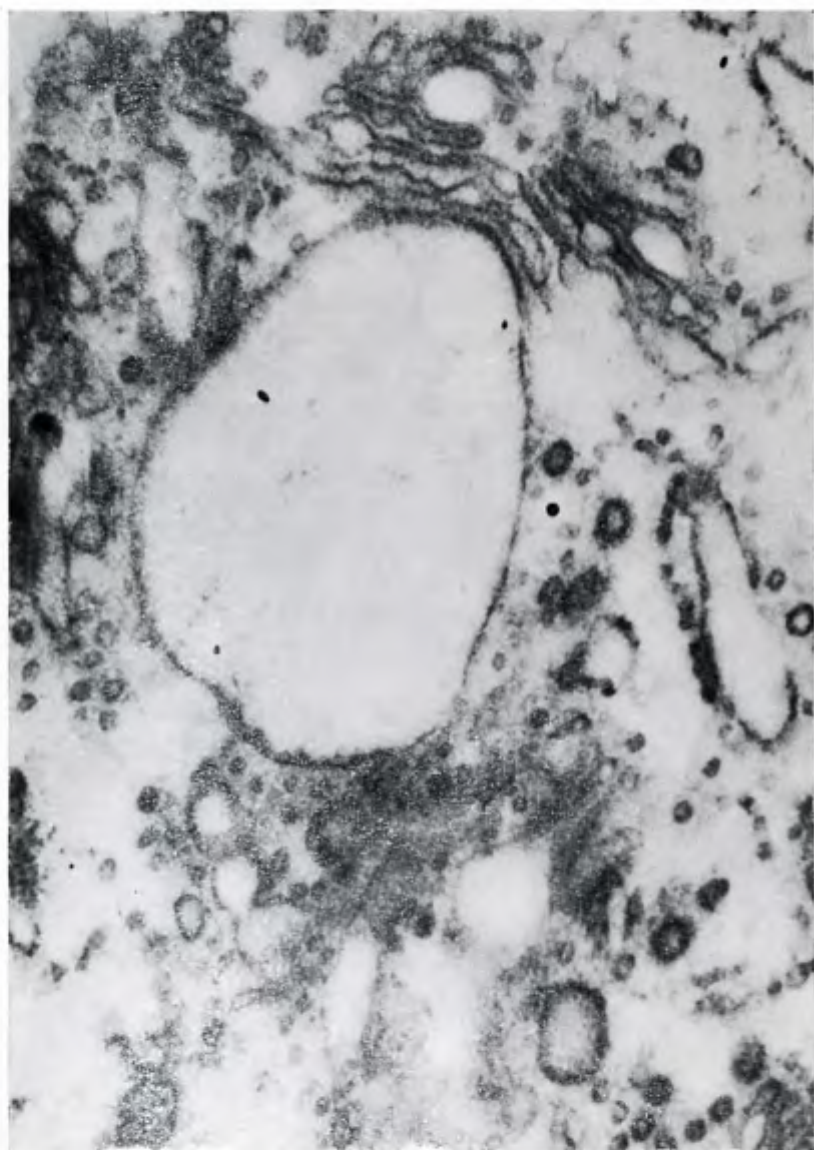


Fig. 8 — Zona de Golgi. Pâncreas exócrino de embrião de Rato. 72.000 X.

Worley, que, em 1951, isola a fracção *Golgi* de homogenatos de fígado de ratinho em que provoca com sulfato de azul de Nilo a formação de redes artificiais, juntamente com Spater, que, em 1952, não observa em células de sarcoma «in vivo» este retículo, admitem tratar-se de um artefacto. Entretanto, de 1951 a 1954, utilizando o microscópio de contraste de fase, que permite a sua visualização sem o emprego de substâncias químicas, uma série de investigadores observam em células vivas imagens canaliculares correspondentes ao aparelho de *Golgi*. Walgren, em 1951, descreve-o nas células sanguíneas, Beams e Tahmisian, em 1953, em células ganglionares do ratinho, e Dalton e Felix nas células epididimárias. Finalmente, em 1954, Lacy observa-o nas células pancreáticas.

A imagem do aparelho de *Golgi* encontra-se entre as aquisições mais recentes da microscopia electrónica. A sua revelação foi feita a primeira vez em 1951 por Dalton, que, com Felix, publica, em 1953 e 1954, trabalhos, em que com o emprego não só do microscópio electrónico, mas também do microscópio óptico e de contraste de fase, revê o problema, concluindo que existe «in vivo» o retículo descrito depois do emprego das técnicas clássicas e que os grânulos coráveis pelo vermelho neutro existem mas são independentes do aparelho de *Golgi*. Criou também este autor, por modificação dos métodos existentes para o revelar, técnicas que permitem observar ao microscópio electrónico as suas imagens de impregnação. Estas técnicas tiveram grande importância no estudo do problema posto porque deram a certeza de que a imagem observada ao microscópio electrónico corresponde ao aparelho de *Golgi* dos autores clássicos.

Sobre a sua ultra-estrutura, os autores americanos observam que é complexa e formada essencialmente pelo arranjo de quatro componentes: canais, vacúolos, grânulos e lamelas. Todos estes elementos foram encontrados pelos autores, que seguidamente o observaram noutros tipos celulares ao microscópio electrónico. Rinehart e Farquhar, em 1953, descrevem-no no lobo anterior da hipófise, Haguenau e Lacour, em 1954, em tumores hipofisários experimentais, e Sjöstrand e Manson, em 1954, nas células do pâncreas exócrino de Ratinho.

Em 1955, Haguenau e Bernhard publicam um trabalho em que apresentam o seu estudo em vários tipos de células normais (gânglio linfático, células hepáticas, células tímica e células do tubo contornado) e em células tumorais (hepatoma experimental, tumor hipofisário experimental, fibroma de Shope, mixoma do

coelho, cancro do seio, linfossarcoma, cancro do recto e adamantinoma). Estes autores, que apoiam as descrições iniciais de *Dalton* e *Felix*, descrevem-no constituído por vacúolos, estruturas membranosas e grânulos ou microvesículas (Figs. 7 e 8).

Os vacúolos, a maioria das vezes ópticamente vazios, são limitados por uma membrana simples. Apresentam-se geralmente em grupos de dois a três, variando as suas dimensões entre 200 a 600 m μ . Por vezes são alongados, tomando o aspecto de canais sinuosos com vários estrangulamentos do lume.

As membranas, cuja característica fundamental é não apresentarem ao seu nível os grãos de *Palade*, presentes nas estruturas basófilas (ergastoplasma), constituem, ordenados aos pares, feixes rectilíneos ou sinuosos (Fig. 8). *Sjöstrand* calculou a espessura média destes pares de membranas em 180 Å, a distância entre os centros de cada um dos constituintes em 130 Å e a espessura de cada uma das membranas, em cerca de 60 Å. Este autor observou também que o espaço que separa os pares de membranas se apresenta geralmente mais opaco que aquele que divide as membranas simples, observando-se em certos cortes que esse espaço é encerrado pela ligação entre as membranas que o limitam.

Os grânulos e microvesículas de dimensões compreendidas entre 20 e 50 m μ são limitados por uma membrana nítida, apresentando no seu interior uma substância de opacidade variável. Segundo *Haguenau* e *Bernhard* devem existir relações entre os vacúolos e as microvesículas. Por outro lado é frequente observarem-se extremidades dos canais interlamelares dilatados e estrangulados, o que sugere a possibilidade de as pequenas vesículas e grânulos se originarem desta forma, a partir do sistema lamelar. *Sjöstrand*, que fez os seus estudos sobre o aparelho de *Golgi* do pâncreas exócrino, observou que estes grânulos, que descreve com o nome de grânulos de *Golgi*, apresentam geralmente uma zona central mais transparente e que a zona superficial opaca tem umas vezes os limites mal definidos, outras é constituída por uma camada periférica muito fina semelhante à que se observa nos grãos de zimogénio. Também a opacidade destes grânulos é, de forma geral, intermédia entre a da substância fundamental da zona de *Golgi* e a dos grãos de zimogénio.

As estruturas fundamentais que descrevemos têm um arranjo extraordinariamente variável (pode mesmo dizer-se que a principal característica que apresenta o seu agrupamento é a sua

extrema variabilidade) e encontram-se geralmente situadas numa região justanuclear, no seio de uma substância homogênea mais contrastada que o citoplasma que a rodeia. *Sjöstrand*, que sistematiza os elementos da zona de *Golgi* de forma um pouco diferente, chama a esta substância — a substância fundamental de *Golgi*.

Referiu-se esta conferência a dois problemas citológicos, em que a intervenção da microscopia electrónica tomou aspectos diferentes, em virtude da posição também diferente que esses problemas ocupavam, quando lhes foi aplicado o novo método.

No caso do condrioma, ela permitiu compreender todos os conhecimentos alcançados pela bioquímica, ao dar-nos uma imagem mais de acordo com a composição química e as funções fisiológicas que a complexidade desses dados permitia prever. Essa imagem trouxe-nos ainda a possibilidade de lançar hipóteses sobre a forma íntima como essas funções se realizam no âmbito celular onde se situam.

No caso do aparelho de *Golgi*, ela constitui mais um argumento sobre a sua existência e esclareceu dúvidas e problemas que se debateram durante muitos anos. As provas que trouxe surgiram ainda numa época em que a divisão de opiniões era viva, pois se baseava em técnicas que pouco permitiam acrescentar. Além destas contribuições, abriu para o futuro possibilidades novas, pois os problemas do condrioma e do aparelho de *Golgi*, esclarecidos e renovados, são já motivo de novos debates, mesmo, como vimos, no campo da morfologia. As investigações fundamentais, no que se refere à sua fisiologia e patologia, desenvolver-se-ão no futuro, mas no plano da sua ultra-estrutura.

Bibliografia

- BEAMS, H. W. — Golgi apparatus, vacuome and mitochondria in the islets of Langerhans of the albino Rat. — «Anat. Rec.», 46, 305, 1930.
- BENSLEY, R. R. e N. L. HOERR — Studies on the cell structure by the freezing-drying method. V. The chemical basis of the organization of the cell. — «Anat. Rec.», 60, 251, 1934.
- BENSLEY, R. R. e N. L. HOERR — Studies on the cell structure by the freezing-drying method. VI. The preparation and properties of mitochondria. — «Anat. Rec.», 60, 449, 1934.
- BOURNE, G. — Cytology and Cell Physiology. — London, 1951.
- CAJAL, S. R. — Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de Golgi. — «Trab. Lab. Inv. Biol.», 12, 127, 1914.

- DALTON, A. J. e M. D. FELIX — Studies on the Golgi substance of the epithelial cells of the epididymis and duodenum of the mouse. — «Am. J. Anat.», 92, 277, 1953.
- DALTON, A. J. e M. D. FELIX — Cytologic and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of epididymis — in situ — in homogenates and after isolation. — «Am. J. Anat.», 94, 171, 1954.
- DAVIDSON, J. N. — The Biochemistry of the Nucleic Acids. — London Methuen & Co. Lda., 2.^a ed., 1953.
- ELFTMANN, H. — The structure of the Golgi apparatus. — «Anat. Rec.», 118, 147, 1954.
- FAURE-FREMIET — Étude sur les mitochondries des Protozoaires et des cellules sexuelles. — «Arch. d'Anat. Micros.», 11, 457, 1910.
- GATENBY, J. B., A. J. DALTON e M. D. FELIX — The contractile vacuole of Parazoa and Protozoa and the Golgi apparatus. — «Nature», 176 (301), 1955.
- GLIMSTEDT, G. e S. LAGERSTEDT — Observations on the ultrastructure of isolated mitochondria from normal rat liver. — Lunds Universitets Årsskrift N. F..
- GLIMSTEDT, G., S. LAGERSTEDT e K. S. LUDWIG — The visualization of the granulated mitochondrial innerbody through treatment of isolated mitochondria with xylene. — «Experientia», X-11 (462), 1954.
- HAGUENAU, F. — L'appareil de Golgi vu au microscope électronique. — «Bull. Micr. Appl.», 5, 18, 1955.
- HAGUENAU, F. e W. BERNHARD — L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancéreuses de vertébrés. — «Arch. d'Anat. Micr. et Morph. Exp.», 44, 27, 1955.
- HOGEBOM, G. H. e W. C. SCHNEIDER — Physical state of certain respiratory enzymes in mitochondria. — «J. Biol. Chem.», 194, 513, 1952.
- KIRKMAN, H. e A. E. SEVERINGHAUS — I-A review of the Golgi apparatus. — «Anat. Rec.», 70, 413, 1938.
- KIRKMAN, H. e A. E. SEVERINGHAUS — II-A review of the Golgi apparatus. — «Anat. Rec.», 70, 557, 1938.
- PALADE, G. E. e A. CLAUDE — The nature of the Golgi apparatus. I. Parallelism between Golgi apparatus and intracellular myelin figures. — «J. Morphol.», 85, 35, 1949.
- PALADE, G. E. e A. CLAUDE — The nature of the Golgi apparatus. II. Identification of the Golgi apparatus with a complex of myelin figures. — «J. Morphol.», 85, 1, 1949.
- PALADE, G. E. — The fine structure of mitochondria. — «Anat. Rec.», 114, 427, 1952.
- PALADE, G. E. — The fine structure of mitochondria. An electron microscopy study. — «Journ. Histochem. Cytochem.», 1, 188, 1953.

- RHODIN, J.* — Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. — These-Stockolm, 1954.
- ROUILLER, CH. e H. GANSLER* — Contribution a la pathologie des mitochondries. «Bull. Micr. Appl.», 5, 17, 1955.
- ROBERTIS, E. de, W. W. NOWINSKI e F. A. SAEZ* — General Cytology. — 2.^a ed. — Saunders, Philadelphia, 1955.
- SJÖSTRAND, F. S. e V. HANSON* — Membrane structures of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. — «Exp. Cell. Res.», 7, 393, 1954.
- SJÖSTRAND, F. S. e V. HANSON* — Ultrastructure of Golgi apparatus of exocrine cells of mouse pancreas. — «Exp. Cell. Res.», 7, 415, 1954.
- SJÖSTRAND, F. S.* — Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. — «Nature», 171, 30, 1953.
- SCHNEIDER, W. C.* — The biochemical constitution of isolated mitochondria. «Journ. Histochem. Cytochem.», 1, 212, 1953.
- WEISS, J. M.* — Mitochondrial changes induced by potassium and sodium in the duodenal absorptive cell as studied with the electron microscope. — «J. Exp. Med.», 102, 1955.
- ZOLLINGER, H. U.* — Les mitochondries. Leur étude à l'aide du microscope de contraste de phase. — «Rev. Hematol.», 5, 696, 1950.