

J. F. DAVID-FERREIRA

ALGUNS  
CONCEITOS FUNDAMENTAIS  
DE  
ULTRASTRUTURA CELULAR

*Conferência realizada no Instituto Rocha Cabral  
em Abril-Maio de 1968*

LISBOA  
1 9 6 9

ALGUNS CONCEITOS FUNDAMENTAIS  
DE ULTRAESTRUTURA CELULAR

J. F. DAVID-FERREIRA

ALGUNS  
CONCEITOS FUNDAMENTAIS  
DE  
ULTRASTRUTURA CELULAR

*Conferência realizada no Instituto Rocha Cabral  
em Abril-Maio de 1968)*

LISBOA  
1 9 6 9

Faz parte das minhas recordações do tempo de estudante uma pequena biblioteca que existiu na Associação da Faculdade de Medicina de Lisboa. Era formada por uma colecção heterogénea de livros que o entusiasmo de alguns e a simpatia de outros haviam reunido em três grandes e sólidos armários. Entre muitos volumes figurava aí uma colecção de separatas das conferências do Instituto Bento Rocha Cabral; a sua leitura foi o primeiro contacto que tomei com esta Instituição.

Mais tarde, quando comecei a frequentar o Instituto de Histologia, foi a leitura de muitas das conferências de divulgação aqui realizadas que me serviu de introdução a vários capítulos da histologia e da embriologia.

Compreende-se porque não duvido da utilidade destas palestras e porque me senti honrado pelo convite do Professor Mirabeau Cruz para aqui vir falar.

Ao dar o título a esta palestra houve uma certa precipitação da minha parte. Este título figurava numa lista que todos temos na gaveta



dos sonhos. Era relativo ao projecto de um curso que há algum tempo ambiciono fazer mas que por várias razões, umas de ordem pessoal outras de ordem profissional, ainda não pus em prática.

Um curso são várias lições teóricas e práticas, uma conferência de divulgação é uma hora de luta com a atenção da audiência.

O título oficial saiu e só com dificuldade amoldei o tema ao tempo de que disponho. Pude também ainda introduzir uma pequena modificação de última hora. Onde se lia: Conceitos fundamentais de ultraestrutura celular, passou a ler-se: Alguns conceitos fundamentais de ultraestrutura celular.

## I — INTRODUÇÃO

A Biologia assenta em três grandes pilares: a teoria da evolução, a teoria genética da hereditariedade e a teoria celular. A teoria celular é a coroa de glória das ciências morfológicas. O seu início e o seu desenvolvimento processaram-se quase exclusivamente graças a esse maravilhoso instrumento que é o microscópio.

Na verdade aquilo a que hoje chamamos célula, corresponde a um conceito altamente elaborado cujas origens se podem recuar ao século XVII quando um dos primeiros microscopistas, o inglês Hooke, ao observar um fragmento

de cortiça, verificou ser este constituído pela reunião de pequenas cavidades a que muito propriamente deu o nome de células.

Foi este o modesto início de um termo que serve hoje para definir o edifício central de toda a Biologia. Progressivamente as cavidades ou células de Hooke transformaram-se nas «vesículas» de Grew e nos «utrículos» de Malpighi. A noção de que todos os seres vivos dos mais simples aos mais complexos eram formados por unidades — as células — estabeleceu-se e a análise da anatomia celular começou. Nos fins do século XIX havia já a noção da existência de toda uma organização intracelular em aparelhos ou organitos, isto é, de porções morfológicamente distintas a que correspondiam funções determinadas.

A análise dos componentes celulares começou a esbarrar a partir de um certo momento com os limites próprios aos aparelhos e técnicas utilizados. Não se podia ir mais longe porque não se via ou porque, à falta de meios de controle, se duvidava daquilo que se via.

Só métodos que permitissem ultrapassar os limites do poder resolutivo do microscópio óptico tornariam possível uma análise inframicroscópica ou ultraestrutural. Esses métodos e instrumentos surgiram com a microscopia de polarização, a técnica da difracção dos raios X e a microscopia electrónica.

Referir-me-ei nesta palestra unicamente à microscopia electrónica que, além de ser o método mais utilizado de investigação ultraestrutural, é o único que permite uma visualização directa das células e dos seus componentes. Além disso é também o único em que tenho alguma experiência.

Para tornar possível a aplicação da microscopia electrónica ao estudo das células e tecidos houve que resolver um certo número de problemas técnicos ligados com a natureza dos seres vivos e às características do instrumento utilizado. Não vou descrever detalhadamente a evolução das soluções encontradas. Mas é necessário, para compreensão do que se segue, fazer referência aos métodos fundamentais utilizados quando se pretende ver células ou partículas subcelulares.

Dado o fraco poder de penetração do feixe electrónico, as preparações ou materiais estudados no microscópio têm que ser muito finas para que alguma coisa se possa observar. Fundamentalmente utilizam-se hoje três técnicas gerais de preparação de material biológico para observação ao microscópio electrónico:

- a) *Técnica dos cortes* — para sua aplicação é necessário fixar e incluir o material a observar. Os meios utilizados na inclusão (Epon e Araldite) dão às estruturas du-

reza suficiente para serem reduzidos em micrótomos especiais (ultra-micrótomos) a cortes da ordem dos 500 Å de espessura.

- b) *Técnica do contraste negativo* — consiste em misturar as preparações a estudar (fracções celulares, vírus) com substâncias (ácido fosfotungstico, acetato de uranilo) que formam camadas opacas aos electrões. A mistura forma uma camada muito fina nas grelhas usadas como suporte e a substância utilizada como contrastante imbebe as estruturas que são visíveis devido ao contraste. Se na superfície das estruturas estudadas existem anfractuosidades, o contrastante penetrando nos espaços livres torna-as também evidentes.
- c) *Técnica de metalização* — nesta técnica bombardeiam-se as estruturas a observar (moléculas de ácido nucleico, vírus) com certos metais (Platina — Irídio) em aparelhos especiais — os metalizadores. As formações assim tratadas, que por serem extremamente pequenas não seriam visíveis, ficam cobertas com o metal tornando-se aparentes.

Como veremos não foi sempre assim e alguns dos conceitos a que me referirei começaram a



desenvolver-se numa época em que não existiam ainda técnicas tão refinadas.

## II — OS MICROSOMAS DE CLAUDE E O RETICULO ENDOPLÁSMICO DE PORTER E PALADE

A primeira história que vou contar começa em 1938 e tem por cenário o Instituto Rockefeller em Nova Iorque. São dessa época os primeiros trabalhos de Claude que, tendo por objectivo a investigação do sarcoma de Rous, o levaram à descoberta dos *microsomas*.

Com a finalidade de estudar o vírus do sarcoma de Rous, Claude aplicou o método da ultracentrifugação fraccionada a células deste tumor. Isolou assim um produto altamente activo constituído por partículas de 700 Å que se caracterizava por um elevado teor em ácido ribonucleico (RNA). Ao aplicar, para verificação destas experiências, o mesmo método a células normais, concluiu que podia também, a partir destas células, isolar partículas das mesmas dimensões e que, embora não sendo patogénicas, se caracterizavam igualmente por uma extraordinária riqueza em RNA. Concluiu que as partículas que isolara inicialmente representavam um constituinte normal do citoplasma e deu-lhes o nome de microsomas.

Podia, apesar de tudo, admitir-se que os microsomas eram um produto da técnica de isolamento e não uma formação existente nos elementos celulares a partir dos quais se fizera a sua preparação. Para excluir esta hipótese Claude submeteu fragmentos de fígado à ultracentrifugação. O estudo ao microscópio óptico destes fragmentos, depois de fixados, cortados e corados, pôs em evidência que os diferentes constituintes celulares se encontravam separados no interior das células e que a camada dos microsomas correspondia a uma zona basófila do citoplasma.

Esta experiência foi interpretada como demonstrando que os microsomas eram constituintes normais das células e o substracto morfológico da sua basofilia.

Ainda no intuito de esclarecer se os microsomas isolados pela técnica da ultracentrifugação constituíam uma entidade morfológica, decidiram observar ao microscópio electrónico, que então dava os seus primeiros passos nos estudos citológicos, células de cultura de tecidos.

Não existiam ainda as técnicas refinadas que hoje possuímos. Não era possível reduzir uma célula a cortes suficientemente finos para se observarem ao microscópio electrónico. Claude e colaboradores utilizaram, para ultrapassar esta dificuldade, o artifício que é a técnica do esten-

dimento. Esta técnica baseia-se no facto que células cultivadas sobre uma película de plástico se estendem naturalmente, havendo uma zona do seu citoplasma que nestas circunstâncias é suficientemente fina para ser vista ao microscópio electrónico.

O exame de células assim preparadas revelou a existência, no citoplasma, de umas vesículas de 1000 a 1500 Å dispostos em rosário e que no conjunto têm uma disposição reticular. Estas vesículas foram identificadas com os microsomas. Ulteriormente constataram que as vesículas deste retículo se acumulavam sobretudo na porção interna do citoplasma das células estendidas (endoplasma) e que eram raras na zona periférica (exoplasma). Atendendo à sua disposição reticular e à localização, o conjunto recebeu a designação de *retículo endoplásmico*. Quando a técnica dos cortes finos pôs em evidência, no citoplasma das células de vários tecidos, formações vesiculares de revestimento membranoso, estas formações foram interpretadas como secções do retículo endoplásmico observado nas células estudadas com o método do estendimento.

Mais tarde Palade verificou, com a técnica dos cortes (fig. 1), que algumas das cisternas e vesículas eram revestidas por grânulos densos. O termo retículo endoplásmico começou a ser utilizado para designar sistemas de membranas revestidos por grânulos densos (equivalente ao

ergastoplasma) e sistemas de membranas sem grânulos (correspondentes ao Aparelho de Golgi, membrana nuclear). Surgiu assim o conceito de retículo-endoplásmico numa tentativa de interpretação unitária dos sistemas de membranas intracelulares.

Conforme foi definido por Porter e Palade, o *retículo endoplásmico* é, pois, um sistema de cavidades limitadas por membranas e que se estende desde a membrana celular até ao núcleo. Existiriam na rede formada por este sistema contínuo diferenciações locais adaptadas a determinadas funções.

Logo de início foram definidas duas porções essenciais do retículo, uma porção lisa ou *agranular* e uma porção rugosa ou *granular* em que a superfície exterior das membranas estava coberta de grânulos densos (os então chamados grãos de Palade) que também se observavam livres, dispersos na substância fundamental do citoplasma.

Os grânulos densos de 150 Å descritos livres ou associados às membranas do retículo, começaram entretanto a ser interpretados como substracto da basofilia citoplásmica e, uma vez determinada a sua riqueza em RNA (63 %-50%), foram baptizados com o nome de *ribosomas*. Adquiriram assim o estatuto de primeiro organelo celular na nova escala ultraestrutural.



Desde a descoberta dos grânulos de Palade (ribosomas), argumentos de vária ordem levavam a pensar ser neles que se localizava a maior parte do RNA do citoplasma.

Já a comparação de vários tipos celulares permitia concluir que as células de basofilia mais intensa ao microscópio óptico eram aquelas em que o componente granular predominava. A associação da ultracentrifugação diferencial com o estudo bioquímico e a técnica dos cortes, permitiram a Palade e Siekevitz precisar a sua natureza. Estes autores, depois de colherem de um órgão um pequeno fragmento para observação ao microscópio, homogeneizavam a parte restante isolando, por ultracentrifugação, a fracção microsomal. Desta fracção colhiavam uma amostra que, depois de fixada, incluída e cortada, era observada e analisavam com métodos bioquímicos a parte restante.

O estudo ao microscópio electrónico da *fracção microsomal* revelou ser esta formada por numerosas vesículas de 80-300 m $\mu$  que eram limitadas por uma membrana revestida exteriormente por grânulos de 150 Å.

Separando a porção membranosa da granular por destruição das membranas com o desoxicolato, puderam concluir que o RNA se encontrava associado aos grânulos sendo as membranas formadas por proteínas, fosfolípidos e vários enzimas.

A observação de células intactas e da fracção microsomal (figs. 1 e 2), combinada com a aná-



FIG. 1

Esquema de uma célula glandular. Na parte central o núcleo (N) rodeado pela membrana nuclear (n-nucleolo). No citoplasma: mitocôndrias (m), cisternas do ergastoplasma (Er) e aparelho de Golgi (AG) com grãos de secreção na sua vizinhança

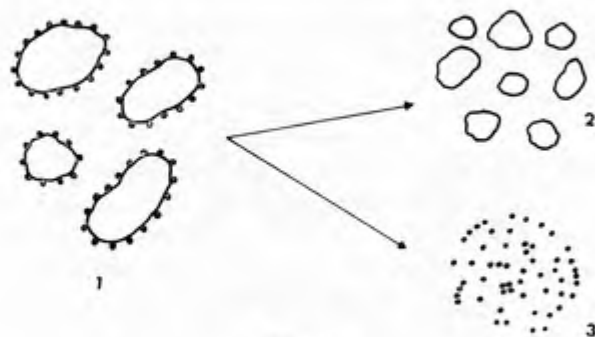


FIG. 2

Esquema da fracção microsomal e dos elementos resultantes do seu fraccionamento. (1 — microsomas, 2 — membranas, 3 — ribossomos)

lise bioquímica, pôs pois em evidência que os microsomas de Claude são o resultado da fragmentação do ergastoplasma (retículo endoplásmico granular) e que é nos grânulos (ribossomos) que se localiza, pelo menos na sua maior parte, o RNA.

O conceito de microsoma, conforme inicialmente enunciado, perdeu pois o seu significado como entidade morfológica ou organito celular, mas continua a poder usar-se a expressão «fracção microsomial».

*Microsomas* são pequenos grânulos ou vesículas de 10-300 m $\mu$  de diâmetro obtidos artificialmente por ultracentrifugação e que não cor-

respondem a organitos citoplásmicos pré-existent. Resultam da fragmentação do retículo endoplásmico.

Os *ribossomos* (fig. 3) são partículas aproximadamente esféricas densas de 150 a 200 Å de diâmetro existentes em todas as células e que, como dissemos, se podem encontrar livres ou associados às membranas do retículo. Constituem geralmente grupos de 5 a várias dezenas de elementos a que se dá o nome de *polisomas*.

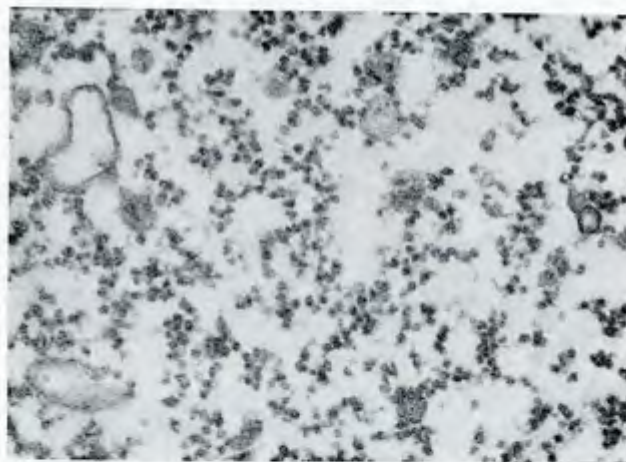
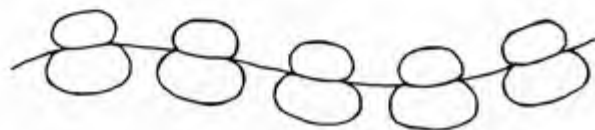


FIG. 3

Fotografia ao microscópio electrónico de um corte da fracção dos ribossomos obtida por ultracentrifugação diferencial a partir de células embrionárias ( $\times 52.500$ )



A técnica do contraste negativo permitiu pôr em evidência que nos polisomas os ribossomos estão unidos por um filamento de aproximadamente 15 Å de espessura que hoje se sabe corresponder ao RNA-mensageiro. Ainda a observação com a técnica do contraste negativo de ribossomos isolados por ultracentrifugação revelou que são formados por duas subunidades (fig. 4).



POLISSOMA

FIG. 4

Esquema representativo de um polisoma. Os ribossomos estão ligados entre si por um fino filamento (RNA-mensageiro). Cada ribossoma é constituído por duas subunidades

Essas partículas que se podem ver directamente foram caracterizadas em ultracentrifugas analíticas pelos seus coeficientes de sedimentação e costumam referir-se em unidades Svedberg.

Assim nas bactérias o ribossoma intacto é representada por uma partícula de 70s as duas subunidades são as partículas 30s e 50s.

É possível em certas condições (trabalhando com fracas concentrações de Mg) dissociar os ribossomos nas suas 2 subunidades.

A análise química dos ribossomos revelou serem constituídos por 63 %-50 % de RNA, e 27-50 % de proteínas. São portanto essencialmente formados por RNA e proteínas. Certas observações indirectas levam alguns autores a admitir que o RNA se encontra à superfície e as proteínas na porção central.

Podemos pois considerar os ribossomos como organitos celulares à escala ultraestrutural — claramente relacionados com a síntese proteica. Têm sido comparados a máquinas de leitura do RNA mensageiro sendo junto deles que se montam os ácidos aminados nas cadeias proteicas. Sabe-se ainda que só funcionam intactos i.e. com as duas subunidades ligadas.

O exame sistemático da substância fundamental do citoplasma com outras técnicas — como por exemplo fixação com permanganato de potássio — e a coloração das preparações com sais de chumbo — demonstrou a existência de outros grânulos densos na substância fundamental — os grãos de glicogéneo (glicosomas). Os glicosomas podem apresentar-se ou sob a forma de grânulos de 150 Å a 300 Å de diâmetro semelhantes aos ribossomos, ou como agregados de grânulos com aspecto de roseta. Estes agregados podem atingir um diâmetro de 0,1 µ.



No que se refere ao conceito de retículo endoplasmico, conforme inicialmente definido, perdeu um pouco o sentido, mas a designação, apesar de imprópria, porque não há nada que se chame endoplasma e muitas vezes não há nenhum retículo, ficou.

A designação retículo granular equivale pois à designação ergastoplasma da citologia clássica. A designação retículo liso refere-se ou ao Aparelho de Golgi ou a sistemas canaliculares observados no fígado, músculo (retículo sarcoplásmico), testículo, etc.

As funções das diferentes porções representantes do retículo são muito diversas. O retículo granular representado em certos tipos celulares em grande abundância (células do pâncreas, plasmócitos) elabora proteínas para exportação. O retículo agranular do músculo desempenha funções de distribuição de substâncias na célula. O retículo agranular tem ainda grande desenvolvimento em órgãos em que a partir do colesterol são elaboradas hormonas esteróides (células intersticiais do testículo, células do corpo amarelo do ovário, células do córtex do suprarenal). No Hamster, cujas células do córtex suprarenal não utilizam colesterol para a síntese de hormonas corticóides, o retículo agranular tem escasso desenvolvimento.

Nas células hepáticas o retículo agranular existe lado a lado com o chamado retículo gra-

nular. Além da existência ou não de ribosomas na superfície das membranas que o formam, existem outras diferenças de ordem morfológica. O retículo agranular não forma cisternas. Tridimensionalmente, é constituído por uma rede plexiforme de túbulos varicosos, de conteúdo mais denso que a matriz citoplásmica. Experimentalmente pode provocar-se a hipertrofia do retículo agranular das células hepáticas. A administração de certas drogas lipossolúveis pertencentes à categoria dos chamados indutores enzimáticos, como o fenobarbital, é seguida de um aumento significativo do retículo agranular nestas células.

Recentemente tivemos ocasião de observar, em preparações de fígado de animais que o Dr. Peres-Gomes tratou com a Visnadina, um aumento significativo do retículo agranular. Esta observação é um complemento doutros dados obtidos no laboratório do Dr. Peres-Gomes que o levaram a admitir pertencer a Visnadina ao grupo dos indutores enzimáticos. A presença no fígado do retículo agranular, deve estar associada com actividades desempenhadas por este órgão em relação com degradação enzimática, eliminação de drogas lipossolúveis e metabolismo do colesterol. Ele seria para alguns o substracto morfológico das chamadas funções de detoxicação exercidas pela célula hepática.

### III — MEMBRANA CELULAR, MEMBRANAS INTRACELULARES, UNIDADE DE MEMBRANA DE ROBERTSON

A propósito dos conceitos de microsoma e retículo endoplásmico já falei de um certo número de organitos celulares há muito conhecidos como o ergastoplasma, aparelho de Golgi e de outros, como o retículo agranular e ribosomas, postos em evidência pela microscopia electrónica.

Não disse ainda uma palavra sobre a membrana celular, seria por aí que naturalmente devia ter começado. É a membrana que separa a célula do exterior, é através dela que se processam as suas trocas com o meio.

Pode dizer-se que um dos pontos fundamentais sobre os quais os métodos de investigação ultrastrutural mais vieram focar a atenção, foi sobre a disposição em membranas dos vários sistemas e órgãos intracelulares.

Quando hoje se fala de membranas, a referência já não é só relativa à membrana celular e à membrana nuclear mas, entendem-se, na referência, todos os sistemas que limitam o retículo granular e agranular e mesmo alguns organitos como as mitocôndrias e os cloroplastos em cuja organização interna foi posta em evidência todo um complexo sistema de membranas. Segundo os cálculos de alguns autores, 90 % do peso seco da massa celular é constituído por membranas.

Antes da aplicação da microscopia electrónica não havia provas directas da existência da membrana celular. Faltava a evidência morfológica. Hoje sabemos que todas as células são revestidas por uma membrana contínua de 75 Å de espessura que, nos cortes de elementos fixados pelo ácido ósmico ou pelo permanganato de potássio se apresenta constituída por três folhetos ou lamelas de densidades diferentes. Um folheto médio pouco denso de 30 Å de espessura rodeado por dois folhetos densos de 25 Å cada.

Além deste tipo de membrana limitante, que também se designa por *membrana plasmática*, observam-se em certos tipos celulares membranas mais complexas que podem adquirir, como acontece nas plantas com a membrana celulósica, uma evidência muito especial. Reservam-se para estas camadas extracelulares a designação de *parede celular*.

Mas voltando à membrana citoplasmática. Deve-se a Robertson o ter chamado a atenção para a sua organização trilaminar e ter tentado interpretar esta disposição em termos de organização molecular. Um outro facto para que Robertson chamou a atenção e sobre o qual veio a edificar toda uma teoria, foi o de que a disposição em três folhetos não era exclusiva da membrana plasmática mas que podia igualmente pôr-se em evidência nos sistemas membranosos intracelulares. A esta disposição



trilaminar deu Robertson a designação de *unit membrane*, isto é, unidade de membrana.

Quando a microscopia electrónica se começou a aplicar ao estudo das membranas celulares, havia já uma grande soma de conhecimentos sobre as suas propriedades e constituição química. A membrana celular foi mesmo o primeiro constituinte da célula para o qual foi proposto um modelo molecular. Esse modelo largamente divulgado de Davson e Danielli (1936) baseava-se no estudo das propriedades físicas e constituição química das membranas e nas célebres experiências de Gorton e Grendel de 1925.

Como veremos foi este o modelo que, com algumas modificações, foi aplicado na interpretação da unidade de membrana. Um dos factos em que Robertson se baseou foi no dado conhecido (difracção, Schmidt Bear & Palmer, 1941) de que quando se hidrata um sistema de lípidos (cefalina de ovos) estes formam camadas bimotoleculares em que os grupos polares ficam dirigidos para fora.

Feita a experiência *in vitro* e fixando (ácido ósmico ou permanganato) e cortando para observação no microscópio electrónico, aquilo que obteve foi uma imagem constituída por duas lamelas densas separadas por uma lamela pouco densa.

Sabia-se, por outro lado, que proteínas fixadas e tratadas do mesmo modo (colagénio, mio-

fibrilhas) produzem uma imagem densa e homogénea.

A interpretação de Robertson veio a ser apoiada nas experiências realizadas por Stoeckenius que obteve, a partir de membranas de fosfolípidos (extraídos de cérebro humano) preparadas «*in vitro*», imagens em que estas membranas se mostravam formadas por duas lamelas densas de 8 Å separadas por uma lamela menos densa de 25 Å (total = 40 Å). Acrescentando às membranas assim preparadas proteínas (globina) obtinha membranas com 75 Å de espessura e morfológicamente semelhantes às da «unidade de membrana».

O modelo proposto por Robertson (fig. 5), e que é muito semelhante ao de Danielli, parece

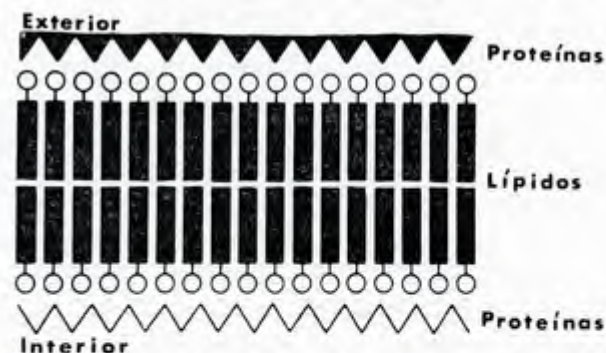


FIG. 5

Esquema representativo da constituição molecular da unidade de membrana de Robertson



pois aceitável à luz do que hoje sabemos. Não se pode porém ainda afirmar uma unanimidade absoluta entre os autores que têm estudado a morfologia das membranas.

Uma outra contribuição importante dada pela microscopia electrónica ao estudo da membrana plasmática, foi a demonstração de que a mielina que envolve os nervos não é simplesmente um produto da membrana celular como se supunha, mas corresponde à sobreposição do próprio material das membranas plasmáticas. Este dado foi da maior importância pois a mielina tem sido largamente utilizada em estudos de difracção dos raios X tornando-se assim possível a aplicação dos resultados obtidos no estudo da mielina à interpretação da arquitectura molecular da membrana celular.

A chamada teoria da unidade de membrana não é simplesmente uma interpretação da disposição das proteínas e lípidos na membrana celular. Segundo Robertson, não só a membrana plasmática mas todas ou a maior parte das formações membranosas observadas na célula obedecem à estrutura básica definida como unidade de membrana. Este conceito unitário sobre a organização ultrastrutural das membranas foi ponto de partida para um esquema geral sobre as relações dos vários elementos celulares e para a interpretação da origem e formação de alguns organitos citoplásmicos. Segundo o esquema

apresentado por Robertson, todas as estruturas membranosas da célula formariam um contínuo. Além disso este autor admitiu que certos organitos celulares, como por exemplo as mitocôndrias, se formariam por pregueamento e invaginação da unidade de membrana da membrana plasmática. Esta última hipótese, não tendo a

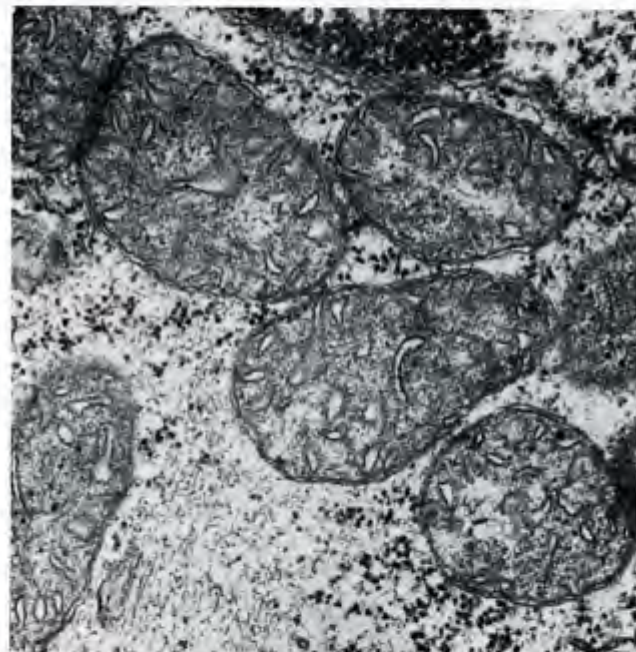


FIG. 6

Mitocôndrias de uma célula vegetal observadas ao microscópio electrónico em material tratado pela técnica dos cortes ( $\times 37.500$ )

suportá-la dados de observação convincentes, não teve aceitação. O que hoje se sabe sobre as mitocôndrias não está de acordo com esta hipótese tão simples sobre a sua formação.

O que são mitocôndrias? As mitocôndrias (figs. 1 e 6) são pequenos bastonetes de 0,3 a 0,7  $\mu$  de diâmetro e 1 a 4  $\mu$  de comprimento que se encontram em todos os eucariócitos. As observações realizadas com o microscópio eletrônico puseram em evidência que as mitocôndrias (fig. 7) são constituídas pelos seguintes

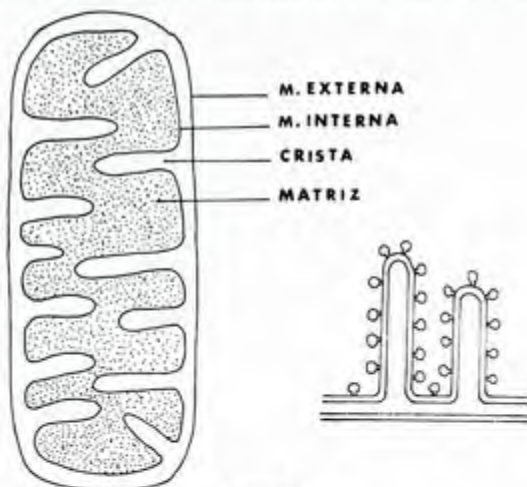


FIG. 7

Mitochondria. À esquerda esquema representativo de uma mitocôndria. À direita esquema das mitocôndrias com a membrana interna coberta pelas partículas elementares

elementos: uma membrana externa que as separa do meio celular, uma membrana interna cujas pregas constituem as cristas mitocondriais e a matriz mitocondrial mais densa que a substância fundamental e na qual se banham as cristas. Sabe-se hoje que as mitocôndrias são organitos celulares dotados de uma certa autonomia. Dividem-se, o que foi demonstrado pelas elegantes experiências de David Luck. Contêm ácidos nucleicos (DNA e RNA) qualitativamente diferentes dos ácidos nucleicos da célula a que pertencem. Têm capacidade, ainda que limitada, para a realização de sínteses proteicas. Estes e outros dados levam a que se comece a aceitar a hipótese segundo a qual as mitocôndrias teriam tido, em termos evolutivos, uma origem independente das células de que hoje fazem parte. Segundo essas ideias elas foram, em determinado momento da evolução, um organismo independente (procarioto) que progressivamente entrou em simbiose com os precursores dos actuais eucariócitos.

Em conclusão: A hipótese de Robertson sobre a formação das mitocôndrias que não tinha a apoiá-la dados indiscutíveis, não se enquadra muito bem no que hoje sabemos sobre estes organitos celulares.



IV — AS PARTICULAS ELEMENTARES  
DE FERNANDEZ-MORAN E OS QUANTASOMAS  
DE THOMAS E PARK

Em 1962 Fernandez-Moran aplicando ao estudo de mitocôndrias isoladas a técnica do contraste negativo, verificou que a membrana interna das mitocôndrias se encontrava coberta do lado da matriz por numerosas partículas em forma de pêndulo de relógio (figs. 7 e 8). Estas for-

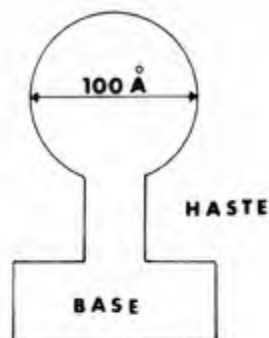


FIG. 8  
Partícula elementar

mações, a que foi dado o nome de *partículas elementares*, são formadas por uma porção esférica saliente de 100 Å de diâmetro e outra, a haste, com 50 Å de comprimento e 35 Å de largura. Veio ainda a considerar-se na sua cons-

tituição uma base, esta já fazendo parte das cristas a que as partículas estão ligadas. As partículas elementares cobrem toda a superfície interna das mitocôndrias, estando situadas a distâncias regulares. Podemos acrescentar que em certos materiais, como por exemplo o músculo cardíaco do Hamster, se podem observar partículas elementares mesmo utilizando a técnica dos cortes.

Muito embora ainda existam dúvidas sobre a existência real das partículas elementares, a sua descoberta tem sido muito estimulante nos estudos em que se procura esclarecer o funcionamento das mitocôndrias correlacionando os dados bioquímicos e ultraestruturais. Pouco depois da descoberta das partículas elementares, foi sugerido que era nelas que se localizavam todas as enzimas da cadeia respiratória. Uma crítica cuidadosa desta hipótese revelou porém que estas formações eram muito pequenas para conterem todas estas enzimas. Contudo, como os cálculos a que me refiro se baseavam unicamente nas dimensões da sua porção esférica, ainda foi sugerido que, considerando também a haste e a base, isto é, a porção da crista correspondente a cada partícula, já o peso calculado era compatível com a hipótese da localização



nas partículas elementares das enzimas da cadeia respiratória. Foram entretanto descobertos outros factos contrários a esta hipótese. Demonstrou-se (Chance e colaboradores) a presença de citocromios em fracções mitocondriais desprovidas das membranas internas, pôs-se em evidência que fracções submitocondriais, ricas em succinoxidase e citocromios, não possuíam partículas elementares e ainda que fracções submitocondriais de fraca actividade respiratória apresentavam numerosas «partículas elementares». Ulteriormente foi sugerido que nas partículas elementares se localizava um factor (F1 coupling factor) que se demonstrou estar presente em partículas de 90 Å de diâmetro. A este propósito são muito interessantes os trabalhos de Racker que, conjugando métodos bioquímicos e ultrastruturais, tem realizado um trabalho que consiste essencialmente em montar e desmontar «in vitro» os diferentes componentes enzimáticos e morfológicos das fracções submitocondriais e verificar a sua função em condições variadas.

Dentro do tema desta palestra parece-me importante fazer ainda uma referência breve ao conceito de *quantasoma* que também surgiu em virtude da aplicação da microscopia electrónica ao estudo dos elementos celulares.

Os cloroplastos são um dos componentes mais característicos da célula vegetal (figs. 9 e 10). Podem descrever-se como formações lenticulares de 4 a 10  $\mu$  de diâmetro e 1 a 2  $\mu$  de espessura. O seu número varia com o tipo celular podendo



FIG. 9

Célula vegetal. Fotografia ao microscópio electrónico de um corte fino. N — núcleo; V — vacuolo; Cl — cloroplasto; m — mitocôndria; pc — parede celular ( $\times 12.500$ )

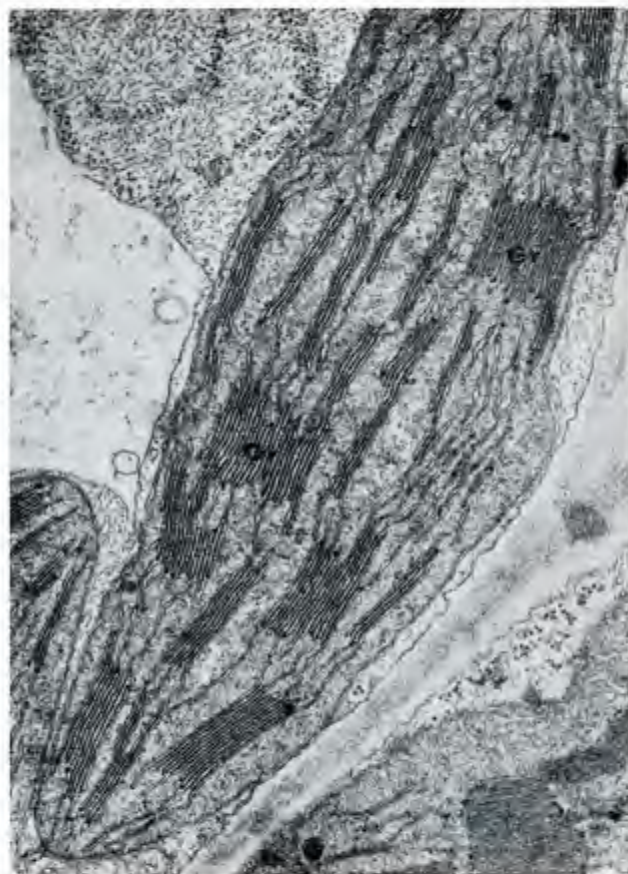


FIG. 10

Cloroplasto. Fotografia ao microscópio electrónico de um corte fino. Gr. — conjuntos das lamelas que formam os grana ( $\times 19.500$ )

ir de 1 a 50 por célula. Observam-se facilmente com o microscópio óptico em virtude de serem corados naturalmente. A sua observação ao microscópio electrónico permitiu demonstrar que são limitados por uma membrana externa de  $75 \text{ \AA}$  constituída por três folhetos de aspecto e dimensões semelhantes aos da unidade de membrana. Paralela a esta membrana e separada dela por um estreito espaço, existe do lado interno do cloroplasto uma membrana idêntica. A porção do cloroplasto, limitada pela membrana interna, é ocupada por uma matriz densa (estroma) na qual se observam gotas lipídicas, grãos de amido e ainda todo o sistema de membranas que formam as lamelas do cloroplasto. As lamelas são paralelas umas às outras podendo distinguir-se umas que atravessam o cloroplasto em todo o seu comprimento — as lamelas do estroma — e outras mais pequenas que formam pilhas situadas entre as lamelas maiores — as lamelas dos grana. Desconhece-se se existe alguma diferença significativa entre as lamelas do estroma e as lamelas dos grana.

A observação de lamelas de cloroplastos isolados com a técnica do contraste negativo e da metalização, pôs em evidência que a superfície das lamelas é coberta por partículas de  $150 \text{ \AA}$  de diâmetro e  $75 \text{ \AA}$  de espessura a que foi dado o nome de quantasomas. Segundo a interpretação dos autores que estudaram este problema,



cada lamela é formada por duas camadas de quantasomas separadas por um espaço de 60 Å. Parece ser ao nível dos quantasomas que se localizam os pigmentos (clorofila) e se processam as reacções da fotossíntese. Segundo esta hipótese os quantasomas são pois as partículas mais pequenas capazes de realizar a fotossíntese.

#### CONCLUSÃO

Tendo presente que estas palestras se destinam a um público não especializado apresentei, de forma resumida, alguns conceitos criados e refundidos durante a evolução dos nossos conhecimentos de ultraestrutura celular. É evidente, do que fica dito, que estamos já muito longe da época em que se interpretavam as unidades funcionantes da vida, isto é, as células, como pequenos sacos cheios de uma coisa a que se chamava matéria viva. Sabe-se agora que a fascinante complexidade bioquímica corresponde uma sofisticada organização de estrutura. Este avanço foi possível porque, simultaneamente com os progressos dos meios de visualização directa, se processaram grandes inovações na técnica de ultracentrifugação e noutros métodos de análise do domínio da bioquímica. O grande êxito da biologia moderna tem sido exactamente o ter acabado com as barreiras entre disciplinas igual-

mente importantes na investigação dos processos celulares.

Julgo ter ficado suficientemente clara a importância da conjugação dos dados morfológicos com os dados bioquímicos. Tem sido esta conjugação que tem permitido prosseguir na grande finalidade da morfologia que é de *analisar a forma para melhor compreender a função*.

#### ALGUMAS LEITURAS ACONSELHADAS SOBRE ASSUNTOS TRATADOS NESTA PALESTRA:

- DE ROBERTIS, E., NOWINSKI, W., SAEZ, F. — *Biologia Celular* (7.<sup>a</sup> edição). El Ateneo (1968).  
 FAWCETT, D. W. — *The Cell*, Saunders (1966).  
 FINEAN, J. B., ENGSTRÖM — *Finean Biological Ultrastructure* (2.<sup>a</sup> edição). A. Press (1967).  
 LOEWY, A. G., SIEKEVITZ, P. — *Cell Structure and Function* (Modern Biology Series). Holt, Rinehart and Wilson, N. York (1963).  
 RABINOWITCH, E. I., GOVINDJEE — *The role of chlorophyll in photosynthesis*, «Scientific American» (Julho 1965).  
 RACKER, E. — *The membrane of mitochondria*, «Scientific American» (Fevereiro 1968).  
 ROBERTSON, J. D. — *The membrane of living cell*, «Scientific American» (Abril 1962).  
 RICH, A. — *Polyribosomes*, «Scientific American» (Dezembro 1963).  
 WOLSTENHOLME, G. E. W. (ed.) — *Principles of biomolecular organization*, J. & A. Churchill Ltd., London (1966).



Composto e impresso nas Oficinas Gráficas de  
RAMOS, AFONSO & MOITA, LDA.  
R. de "A Voz do Operário" (S. Vicente de Fora)  
LISBOA-2