

Citologia: ciência que estuda a estrutura e a função da célula; permitiu a evolução do conhecimento da célula

Teoria celular: a célula é a unidade estrutural e funcional, de reprodução e hereditariedade de todos os organismos, e é da atividade interdependente das células que resultam todos os processos que ocorrem no organismo. As novas células formam-se a partir de células pré-existentes.

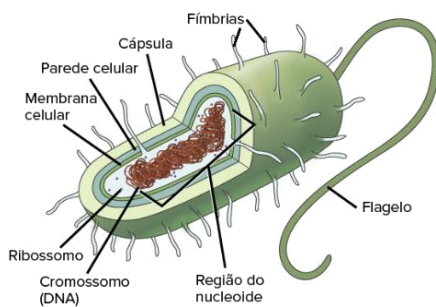
- O conceito de “**vivo**” e de **morto**” não podem ser vistos como opostos. O que não está vivo, pode também estar “**inerte**”, o verdadeiro antônimo de “vivo”. A natureza dos vírus levantam muitas questões, pois não estão vivos, nem mortos, nem inertes.

CÉLULAS

Células procarióticas (pro – antes + karion – núcleo)

Células com estruturas mais simples e menores dimensões. Não têm núcleo individualizado nem perfeitamente organizado. Não apresentam organelos membranares.

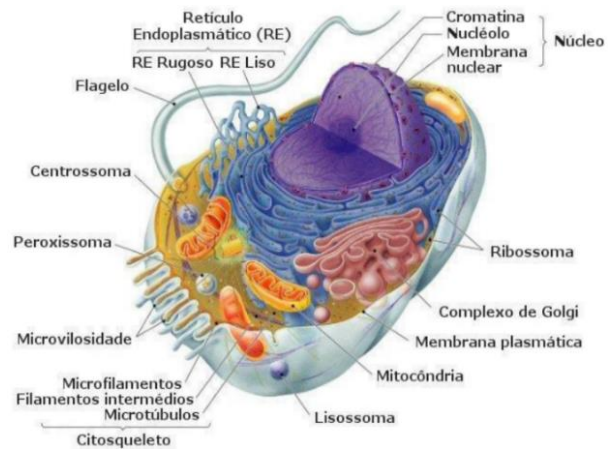
- Constituintes opcionais: Plasmídeos/ Flagelo/ Cápsula
- Constituintes obrigatórios: Cromossoma/ Ribossomas/ Parede Celular/ Membrana Plasmática / Citoplasma



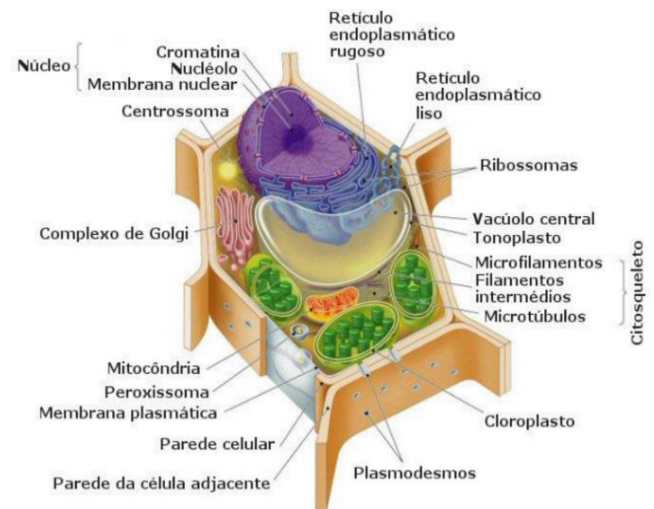
Células Eucarióticas (eu – verdadeiro + karion – núcleo)

Apresentam uma organização mais complexa e maiores dimensões. Têm o núcleo perfeitamente organizado e delimitado por um invólucro nuclear. Têm organelos membranares. Têm histonas associadas ao DNA.

Célula Eucariótica Animal



Célula Eucariótica vegetal



Constituintes celulares

• Organelos Membranares

Mitocôndrias: respiração celular e produção de energia;

Vacúolos: reserva energética e armazenamento de substâncias;

Núcleo: estrutura esférica bem organizada, delimitada por uma membrana dupla com poros revestidos por proteínas (membrana/ invólucro nuclear). É constituído por um nucléolo, nucleoplasma, cromatina (**euromatina:** menos condensada ou **heterocromatina:** mais condensada), que forma os cromossomas

Núcleolo: coordena os processos de reprodução celular através da síntese de proteínas;

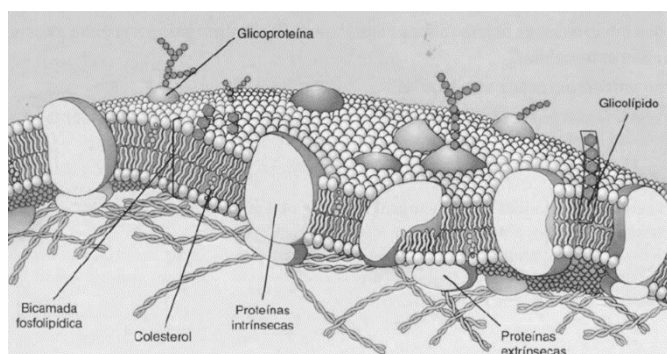
Cloroplastos: apresentam pigmentos fotossintéticos – clorofila, intervenientes na fotossíntese (conversão da matéria inorgânica em orgânica);

Retículo Endoplasmático Liso e Rugoso: transporte de proteínas e síntese de moléculas orgânicas;

Complexo de Golgi: armazena, modifica e liberta substâncias. Exporta proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e origina os lisossomas;

Lisossomas: digestão celular;

Membrana plasmática: delimita a célula e permite a interação entre os meios intra e extracelulares, sem que estes se igualem; protege as estruturas celulares internas. É constituída por uma bicamada de fosfolípidos que seguem o modelo do mosaico fluido.



• Estruturas não membranares

Citoplasma: região mais volumosa, onde se encontram os constituintes celulares

Ribossomas: estruturas responsáveis pela produção de proteínas, compostas por RNA e proteínas

Cápsula: reveste a célula externamente;

Nucleoide: material genético disperso no citoplasma constituído por DNA, que está envolvido por proteínas que o envolvem e protegem;

Flagelo: possibilita a locomoção da célula;

Citoesqueleto: redes de fibras inter cruzadas, existente no citoplasma; mantém a estrutura da célula; estrutura dinâmica;

Ribossomas: produção e síntese de proteínas;

Centríolos: auxilia na divisão celular (mitose e meiose);

Cápsula: é composta maioritariamente por (lipo)polissacáridos; é semi-rígida. Quando estes polissacáridos se espalham no ambiente circundante formam uma camada espessa. Dentro das bactérias, é mais comum em bactérias GRAM -. As bactérias que têm cápsula são as mais resistentes.

Parede celular: confere forma e proteção à célula, protegendo-a das agressões do meio externo e concedendo suporte estrutural.

• **Plantas:** lamela entre células + parede celular + membrana plasmática

A parede celular é constituída por n-acetilglucosamina (NAG), ácido n-acetilmurâmico (NAM), pectina (constituída por ácido galacturónico), hemicelulose (glucose, galactose, xilose, ent.) e microfibras de celulose (glucoses)

• **Leveduras:** parede celular + membrana plasmática

A parede celular é constituída por quitina (polissacarídeo muito rígido), glucano (polissacarídeo), manoproteínas (glicoproteínas ligadas a cadeias de manose, glícidos)

• **Bactérias:**

• **GRAM +:** Membrana fina + parede celular bem espessa

Têm uma coloração azul escura. O corante cristal violeta consegue aderir aos peptidoglicanos da parede externa. São sensíveis à penicilina.

• **GRAM -:** Membrana + parede celular fina + membrana (com proteínas e açúcares)

Têm uma coloração cor de rosa. Não são coloradas com cristal violeta, mas absorvem safranina. São resistentes à penicilina

• **Mistas (GRAM+ e GRAM-)**

Ciclo Celular

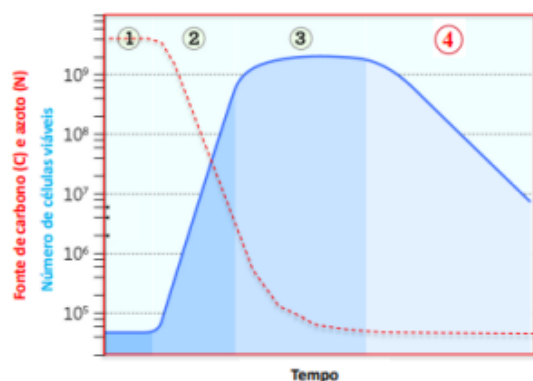
• **Fase de latência:** as células preparam a sua maquinaria bioquímica para a replicação. Há sensores internos que determinam se a célula está ou não pronta para entrar em divisão.

• **Fase de crescimento exponencial – LOG PHASE:** as células reproduzem-se à máxima velocidade possível

• **Fase estacionária:** as células param de se replicar e alteram o metabolismo para se manterem viáveis – normalmente ativam sistemas de resposta a stress – fome

• **Fase de morte celular:** as células senescentes começam a morrer exponencialmente e os constituintes básicos das células mortas são reaproveitados para construir novas

células (**Senescência**: processo natural de envelhecimento ao nível celular. Ocorre devido ao encurtamento dos cromossomas.)



1. Apoptose – Morte Celular Programada (PCD): formam-se vesículas que vão destruir e degradar a célula por várias razões. Nomeadamente quando se tratam de células supérfluas ou defeituosas; ou, quando, no desenvolvimento embrionário, há a necessidade de ter um vazio, após a mórula.

2. Necrose – Morte Celular Não Programada: o metabolismo celular para e as células degradam-se de forma descontrolada e desregulada. Verifica-se a disrupção da membrana plasmática e dos organelos. O envelope nuclear ainda se encontra preservado.

1. Interfase: fase mais longa do ciclo. Preparação para a mitose.

- **Fase G1:** formação de organelos e crescimento celular
- **Fase S:** replicação do DNA. Duplicação do número de cromátídeos
- **Fase G2 – Pré-Mitótica:** crescimento celular. Formação de organelos, membranas e estruturas necessárias para a divisão celular

PROCESSO DE MITOSE

2. Fase Mitótica: individualização das duas células-filhas

- **Prófase:** início da condensação dos cromossomas; migração dos cromossomas para os polos; desaparecimento do nucléolo; rutura da membrana nuclear
- **Metáfase:** cromossomas dispõem-se com os centrómeros alinhados no plano equatorial com um cromátídeo voltado para cada um dos lados

- **Anáfase:** clivagem dos centrómeros; ascensão polar – a migração dos cromossomas dá-se através de uma enzima situada no centrómero do cromossoma que faz e refaz os microtúbulos – fibras do citoesqueleto que formam o fuso acromático

- **Telófase:** organizam-se dois núcleos

PROCESSO DE MEIOSE

Divisão I ou reducional

- **Prófase I:** condensação dos cromossomas; desorganização da membrana nuclear; formação do fuso acromático; sinapse (emparelhamento dos cromossomas homólogos); crossing-over (troca de porções de genes entre cromátídeos dos bivalentes nos pontos quiasma)
- **Metáfase I:** cromossomas dispõem-se com os quiasmata na placa equatorial
- **Anáfase I:** separação aleatória dos cromossomas homólogos
- **Telófase I:** descondensação dos cromossomas; desorganização do fuso acromático

Divisão II ou equacional

- **Prófase II:** condensação dos cromossomas; formação do fuso acromático
- **Metáfase II:** disposição dos cromossomas na placa equatorial com os centrómeros
- **Anáfase II:** ascensão polar (um cromátídeo para cada polo)
- **Telófase II:** descondensação dos cromossomas

COMPOSTOS ORGÂNICOS

Monómeros: moléculas mais simples; unidade que se vai repetir na cadeia

Polímeros: moléculas complexas; resultantes da ligação química entre monómeros

Polimerização / Reações de síntese ou de condensação:

passagem de monómeros para polímeros; a molécula vai crescendo progressivamente. Em cada reação de polimerização é removida uma molécula de água.

Despolimerização / Reações de hidrólise: passagem de polímeros para monómeros; desfazer as grandes moléculas.

Em cada reação de hidrólise é necessário a adição de moléculas de água.

PRÓTIDOS

Compostos azotados quaternários; constituídos por elementos químicos como carbono, hidrogénio e azoto (também podem conter enxofre, fósforo, magnésio, ferro ou cobre). **Ligação:** ligação peptídica entre o grupo carboxilo de um aminoácido e o grupo amina do outro

Monómero - aminoácidos/ holoproteínas: têm um grupo amina, um grupo carboxilo e um átomo de hidrogénio ligado a um carbono

Polímeros

Péptidos: Dipéptidos (2 monómeros), Tripéptidos (3 monómeros), Oligopéptidos (2 a 20 monómeros), Polipéptidos (+20 monómeros)

Proteínas: uma ou mais cadeias polipeptídicas, podendo adotar diferentes estruturas, com interações fracas

- **Proteínas conjugadas/ Heteroproteínas:** As proteínas podem conter uma parte não proteica (grupo prostético)
- **Desnaturação:** quando expostas a calor, agitação, sais ou ácidos, as proteínas perdem a estrutura tridimensional, perdendo desta forma a sua função

GLÍCIDOS/ HIDRATOS DE CARBONO

Compostos orgânicos ternários formados por carbono, hidrogénio e oxigénio. **Ligação:** ligação glicosídica

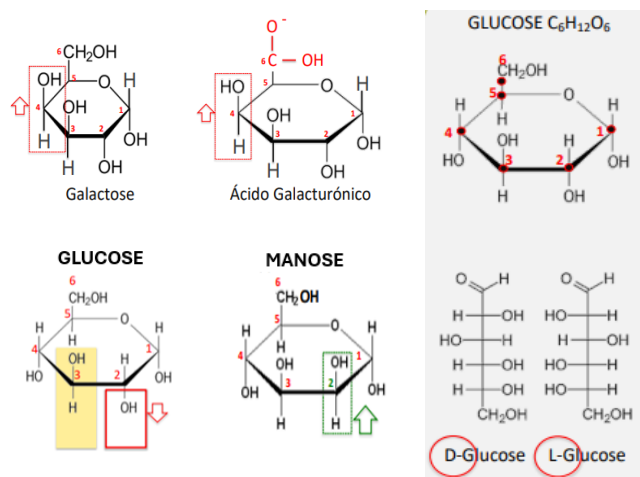
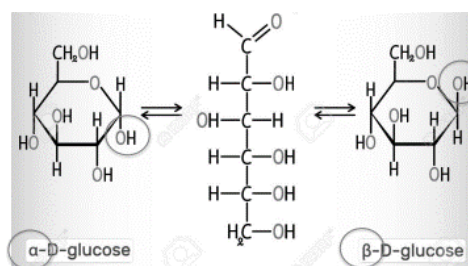
Monómeros – monossacarídeos/ oses/ açúcares simples:

Trioses (3 carbonos; Aldose/ Ketose), Tetroses (4 carbonos), Pentoses (5 carbonos; Ribose), Hexose (6 carbonos; Glicose/ Frutose/ Galactose), Heptose (7 carbonos)

Polímeros

Oligossacarídeos (2 a 10): Dissacarídeos (2 oses), Trissacarídeos (3 oses) – ligação glicosídica

Polissacarídeos (+10): Glucano (D-glicose), Celulose (longas cadeias lineares de glicose), Glicogénio (entre 20 a 30 000 glicoses), Amido (dois polímeros de glicose), Quitina (parede celular das células e fungos; exosqueleto de insetos)



LÍPIDOS

Compostos ternários compostos por carbono, oxigénio e hidrogénio; podem ter outros elementos como enxofre, azoto ou fósforo. **Ligação:** ligação éster (covalente) entre os grupos hidroxilo e carboxilo

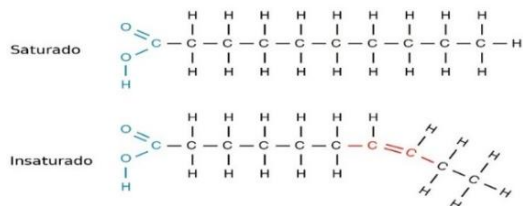
Englobam as gorduras (animais e vegetal), as ceras, os esteroides, entre outros. São pouco solúveis em água e bastante solúveis em solventes orgânicos (éter, clorofórmio, benzeno)

Monómeros

Ácido gordo: cadeia de hidrocarbonetos (C-H) + grupo carboxilo (-COOH) + grupo metil (CH₃)

- **Insaturados:** Ómegas – 10: 1ω-3 (10 representa o número de carbonos; 1ω representa o número de insaturações; 10 representa onde se localiza a insaturação, a contar do metil)

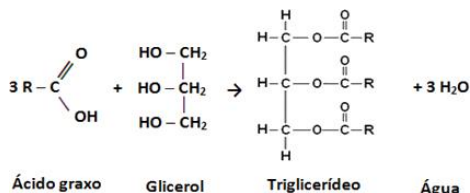
- **Saturados:** Manteiga, Banha, Gorduras animais



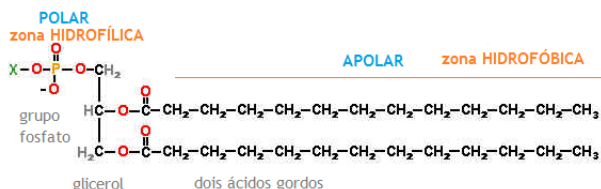
Glicerol/ Glicerina: álcool com 3 grupos hidroxilo (-OH)

Polímeros

Glicéridos - lípidos de reserva: n ácido gordo + glicerol. Monoglicérideo (glicerol + 1 ácido gordo); Diglicérideo (glicerol + 1 ácidos gordos), Triglicérideo (glicerol + 3 ácidos gordos)



Fosfolípidos - lípidos estruturais: constituídos por carbono, hidrogênio, fósforo e azoto. Contêm um grupo fosfato. São moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma parte polar (hidrofílica – solúvel em água) e uma parte apolar (hidrofóbica insolúvel em água)



Ceras: resultam da união de ácidos gordos com um álcool diferente do glicerol; altamente insolúvel; tornam as superfícies que revistem a água impermeáveis

Carotenoides: sem ácidos gordos nem glicerol; pigmentos amarelos e vermelhos – papel importante na fotossíntese

Esteroides: colesterol - constituinte das membranas celulares e é precursor de hormonas

ÁCIDOS NUCLEICOS

Ligações: nucleotídicas - fosfodiéster (covalente) estabelecem-se entre o carbono 5` (ligado ao grupo fosfato) e o carbono 3` do nucleótido seguinte (direção 5` - 3`)

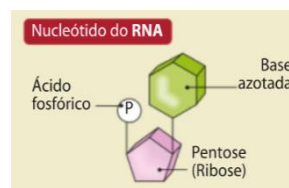
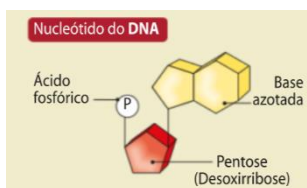
Monómero - nucleótidos: constituídos por:

- **Pentose:** ribose (RNA) ou desoxirribose (DNA)
- **Base azotada:** ligada ao carbono 1` ; caráter hidrofóbico
 - **Purinas – 2 anéis:** Adenina e Guanina
 - **Piridimina – 1 anel:** Citosina, Uracilo e Timina
- **Grupo fosfato:** ligada ao carbono 5` ; caráter hidrofílico; confere características ácidas à molécula

Polímeros

Ácido desoxirribonucleico (DNA): desoxirribose + grupo fosfato + base azotada (Adenina/ Timina/ Guanina/ Citosina) A cadeia de nucleótidos de DNA enrola-se nos **nucleossomas**: 1 nucleossoma é constituído por 8 **histonas** + 1 histona que prende o DNA

Ácido ribonucleico (RNA): ribose + grupo fosfato + base azotada (Adenina/ Uracilo/ Guanina/ Citosina)



ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA

NÍVEIS SUB-VIRAL E SUB-CELULAR

Necessitam de colonizar uma célula para se replicar, por exemplo os vírus.

NÍVEL CELULAR

1. Organismos Unicelulares: vivem sob a forma unicelular embora possam formar agregados muito numerosos

- **Sem núcleo:** bactérias e archae (procariotes)
- **Com núcleo:** fungos, leveduras e algas (eucariontes)

2. Organismos Multicelulares: o conjunto de células eucariontes tem propriedades que não correspondem apenas ao somatório das células (Tecido → Órgãos → Sistemas → Organismos: aumento de organização e complexidade)

REINOS

ARQUEABACTÉRIAS - PROCARIONTE

- Organização do DNA: cccDNA (cromossoma circular fechado covalentemente responsável pela resistência aos antibióticos de certas bactérias; têm a capacidade de sair das células) com histonas
- 1º aminoácido nas proteínas: metionina
- Lípidos na membrana: ligação éter
- Componentes da parede celular: sem peptidoglicano
- Sensibilidade a antibióticos: não
- Papel biológico: extremófilos

Extremófilos

- **Hipertermófilos**: ambientes com elevadas temperaturas
- **Halófilos extremos**: ambientes com elevada salinidade
- **Psicrófilos**: ambientes com baixas temperaturas
- **Alcalófilos**: ambientes salgados com pH elevado (básicos)
- **Acidófilos**: ambientes com pH baixo (ácidos)

EUBACTÉRIAS – PROCARIONTES COM PAREDE CELULAR

- Organização do DNA: cccDNA sem histonas
- 1º aminoácido nas proteínas: formilmetionina
- Lípidos na membrana: ligação éster
- Componentes da parede celular: com peptidoglicano
- Sensibilidade a antibióticos: sim
- Papel biológico: ubíquas patogénicas ou comensais (flora intestinal, flora vaginal)
- Forma: esferas/coccus, pequenas e redondas, ou bastonetes (bacillus, médias e alongadas, ou espirais, longas com flagelo)

O DNA está dividido em:

- Cromossoma bacteriano: DNA circular de grandes dimensões. Genoma
- Plasmídeos: DNA circular de muito pequenas dimensões.

Genoma extracromossomal

EUCARYA - EUCARIONTE

- Eucariontes

TECIDOS

Um **tecido** é a organização primária, mais simples, presente num organismo multicelular.

Dentro dos tecidos há **células diferenciadas**, células que têm tamanhos, morfologias, metabolismo, fisiologia e funções diferentes. O crescimento do organismo é acompanhado pelo crescimento dos tecidos e pela diferenciação das células (ovo → embrião).

Difícilmente se mantém células diferenciadas em laboratório. Estas células não diferenciadas, quando expostas a sinais extracelulares metabólicos e moleculares – hormonas -, que promovem a diferenciação, diferenciar-se-ão.

TECIDOS VEGETAIS

Xilema: transporte de seiva bruta das raízes para as folhas

Floema: transporte de seiva elaborada contendo substâncias concentradas produzidas pela planta (nomeadamente por fotossíntese) pelo caule até às folhas e raízes

Parênquima: tecido pouco especializado que forma a parte inferior de muitos órgãos das plantas, como a raiz e o caule jovens e as folhas das plantas vasculares, ou das frondes e talos das algas

Meristema ou tecido merismático: grupo de células indiferenciadas que podem aumentar de tamanho/ volume e são responsáveis pela multiplicação celular nos tecidos que vão crescendo.

- Meristema apical: raízes e plântulas
- Meristema intercalar: aumento de altura
- Meristema lateral: aumento de largura/ espessura dos caules e raízes

TECIDOS ANIMAIS

Muitos dos tecidos animais são ricos em fibras proteicas e polissacáridos. Outros tipos de tecidos são predominantemente compostos por células.

Tecido conjuntivo: responsável pelo estabelecimento e pela manutenção da forma do corpo. Rico em:

- **Fibras proteicas - colagénicas**: constituídas por fibrilas, constituídas por 3 cadeias polipeptídicas, unidas em hélice tripla, constituídas por glicina + 2 aminoácidos variáveis. Esta variável permite a existência de vários colagénios.

- **Matriz extracelular (ECM):** substância “amorfa” ou “fundamental”; constitui suporte para as células, separa os tecidos uns dos outros, regula a comunicação entre as células: circulação/ partilha de hormonas, sinais moleculares, nutrientes, fármacos, iões; alterações em função de estímulos físicos; modulação de mobilidade, flexibilidade e rigidez; e condiciona o comportamento dinâmico das células. Encontra-se ligada às proteínas membranares das células. É diferente de tecido para tecido, o que é importante para evitar a rejeição de substâncias. É constituída por proteoglicanos ligados a glucosaminoglicanos

- **Proteoglicanos:** proteínas glicosiladas
- **Glucosaminoglicanos:** polissacáridos constituídos por açúcares sulfatados (grupo sulfato fá-los agentes anticoagulantes): Heparina (muito anticoagulante), Condroitina Sulfato, Queratano Sulfato, Ácido Hialurónico (único que não tem grupo sulfato; estabelece a ligação com os proteoglicanos)

- **Poucas células: Fibroblastos** (produzem fibras que unem as células formando estruturas mais rígidas, como os epitélios, e matriz extracelular e estão envolvidos na produção de fatores de crescimento), **Adipócitos** (armazenam gordura, protegem os órgãos, fonte de energia, vitaminas lipossolúveis e água), **Macrófagos** (fagocitose), **Mastócitos** (processo inflamatório); **Linfócitos** (detecção da natureza do invasor e expulsão), **Plasmócitos** (produção de antígenos)

Une, liga (cria uma interface entre os órgãos), nutre, sustenta (permite o movimento de partículas entre os órgãos e espalham células de defesa pelo corpo) e protege (possui capacidades elásticas que amortece movimentos mecânicos) todas as células noutros tecidos. São responsáveis pelo estabelecimento e pela manutenção da forma do corpo.

Permite a migração de células cancerígenas, o que leva a que vários estudos para travar a disseminação do cancro envolvam a matriz.

- **T. C. Não Especializados:** Frouxo/Laxo e Denso

- **T. C. Especializados:** Cartilaginoso, Ósseo, Sanguíneo, Hematopoiético e Mucoso

Tecido epitelial: revestimento de órgãos

- Tecido epitelial cuboidal simples
- Tecido epitelial colunar

Tecido muscular

Tecido nervoso

Tecidos sem matriz extracelular

Verifica-se a existência de uma matriz residual. A comunicação entre as células implica que todo o tecido entre em contacto com as substâncias que migram e é feita a partir das seguintes multiproteínas:

- **Gap junctions (plasmodesmata – c. vegetais):** cruzamento com intervalos. Canais hidrofílicos. Responsáveis pelo acoplamento elétrico (diferencial elétrico), o que permite um fluxo elétrico coordenado. Só passam as partículas com as quais têm afinidade.
- **Tight junctions:** cruzamento apertado. Há uma rede que liga as membranas, que sela as camadas externas dos tecidos, o que limita as perdas. A seleção é feita pelas próprias células. Típicas dos epitélios.
- **Adherens junctions:** cruzamento aderente. Proteínas que, diretamente ligadas ao citoesqueleto ligam as células
- **Desmossomas:** estrutura especializada na adesão de células; através de placas, que se encontram perto da membrana, no meio intracelular, específicas de tecidos de grande desgaste mecânico (músculo cardíaco, bexiga, epitélios)

COLÓNIAS

Cada colónia apresenta características e formas diferentes, mesmo sendo constituída por organismos da mesma espécie, no mesmo meio, a variante é a estirpe.

Quando manipulamos a criação de uma colónia em **laboratório**, as células multiplicam-se muitas vezes, e, por isso, tendem a perder a diferenciação, criando uma colónia mais homogénea.

Quando se cria uma colónia num **meio natural**, as células diferenciadas adotam estruturas diferentes. Os diferentes graus de diferenciação celular, nas colónias, levam à formação de colónias diferentes.

FLOCOS

As células ligam-se e formam-se flocos (com ou sem espuma). A maioria dos biofilmes e colónias na natureza são multi-espécies.

BIOFILMES

Agrupamento de milhões de células que tanto podem ser iguais, como também diferentes.

1. **Adesão:** microrganismo-superfície inerte ou tecido biológico
2. **Maturação:** formação da matriz extracelular, quimicamente diferente da das células animais, mas funcionalmente semelhante e estrutura-se espacialmente
3. **Fixação e proliferação:** a matriz extracelular faz com que as células fiquem retidas, havendo uma grande proliferação
3. **Dispersão:** remodelação da ECM. Os propágulos, fragmentos do biofilme, libertam-se e são arrastados pela corrente, e irão aderir a outra superfície, resultando noutro biofilme.

Este fenómeno é, do ponto de vista clínico, perigoso pois, como a matriz promove a diferenciação celular, pode haver produção de hifas, haver penetração nos vasos sanguíneos e a partir daí, haver multiplicação e invasão dos tecidos humanos.

CULTURA DE MICRÓBIOS

Meio de cultura: meio que contém nutrientes básicos que a célula usa para o seu metabolismo celular.

Micróbios podem ser cultivados em meio sólido ou líquido:

A. Sólido

É adicionado agar ao meio (constituído por agarose, dissacarídeo, e agarpectina, trissacarídeo), o que faz com que o meio fique com um aspeto gelatinoso, permitindo uma melhor distribuição dos nutrientes por todo o meio.

B. Líquido

1. **Processo batch (descontínuo):** meio líquido semi-fechado, possuindo algodão no limite do recipiente, sem haver controlo das trocas. O crescimento bacteriano divide-se em 3 fases: fase exponencial, fase estacionária e fase de morte. Utilizado na biotecnologia.

Em contexto industrial, quando as células começam a entrar na fase estacionária, retira-se o produto, centrifuga-se as bactérias e volta-se a coloca-las nos recipientes com os nutrientes; as bactérias entram novamente em fase exponencial e voltam a reproduzir-se.

2. **Processo cultura contínua:** controlo da atmosfera que está em contacto com a amostra – trocas controladas – e do meio interno, para que as células tenham sempre nutrientes disponíveis, ou seja, as células mantêm-se na fase exponencial devido ao controlo de nutrientes, não permitindo que se esgotem. Utilizado na farmacologia (técnica mais cara)

COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA

- **pH:** ajustado com NaOH, mais básico, ou HCl, mais ácido
- **Temperatura:** ajustar para a temperatura do organismo
- **Fonte de nutrientes:** funcionamento do organismo
- **Fonte de carbono:** tal como a glucose
- **Fonte de vitaminas e minerais**
- **Oligoelementos:** elementos da Tabela Periódica que se encontram em quantidades ínfimas

A. Meio Mineral/ Sintético/ Mínimo: o controlo das substâncias é feito manualmente

B. Meio rico/ Completo: meios não controláveis. Podem ser constituídos por:

- Extratos de leveduras: componentes de uma cultura de levedura em que o conteúdo citoplasmático das células foi separado das paredes celulares, e desidratado/lioofilizado, fornecendo vitaminas, aminoácidos e oligoelementos
- Peptona/Triptona: mistura de polipéptidos provenientes da hidrólise ácida ou enzimática de uma mistura de proteínas, que fornece nutrientes básicos e fatores de crescimento

- **Cloreto de sódio (NaCl):** mantém a isotonicidade do meio
- (**Isotonicidade:** iguais concentrações dos meios interno e externo)

CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

As culturas de células animais formam-se em monocamada, em frascos horizontais, ou mais raramente em suspensão em meio de cultura semi-sólido.

Os meios de cultivo podem ser sintéticos, orgânicos, ou uma mistura dos dois:

Meios sintéticos: são meios químicos complexos desenvolvidos para um tipo de células específico

Meios orgânicos: constituídos por soro sanguíneo e/ou extrato de tecido

A. Células primárias: são cultivadas e conseguem multiplicar-se algumas vezes, depois entram em senescência e não se replicam mais (retiradas de um tecido)

B. Tecido celular mantido *in vitro*: aumento de tamanho, têm frequentemente mais do que um núcleo, aumentam a biogénese de lisossomas (entram em autofagia)

C. Linha celular imortal: população de células proveniente de um organismo pluricelular que não entram em senescência e se dividem sucessivamente, desde que tenham alimento.

Há vários métodos de **perpetuar uma linha celular**, introduzindo mutações que impedem a senescência replicativa – transformando a linha numa linha que se reproduz sempre com a mesma taxa e vigor.

A 1ª Linha Celular teve origem em células de cancro cervical.

COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTURA

- **Nutrientes**
- **pH** específico
- Vasto e heterogéneo **conjunto de agentes moleculares** que promovem a diferenciação e controlam (positiva e negativamente) a proliferação celular
- **Atmosfera:** meio rico em CO₂, à semelhança do organismo

CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS

Ao contrário dos micróbios, as células vegetais necessitam de nutrientes muito mais simples nos meios de cultura, pois são organismos fotossintéticos.

A. Micropropagação – reprodução *in vitro*: Seleccionamos num fragmento da planta que queremos cultivar – **explant** – é cultivamo-lo num meio onde perde a sua diferenciação, formando um **callus** (agrupamento de células totipotentes), que posteriormente será colocado num meio líquido e vai-se multiplicar, podendo dar origem a um embrião, capaz de formar uma planta completa.

COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA

- **Assepsia:** manipulação sem contaminação, através da câmara de fluxo, que empurra o ar no sentido mais benéfico
- **Temperatura controlada**
- **Atmosfera controlada** (O₂ e CO₂): a quantidade de oxigénio no nosso organismo é inferior à existente no meio ambiental
- **Fotoperíodo:** ciclos de luz e escuridão

METODOLOGIAS DE OBSERVAÇÃO

MICROSCOPIA ÓTICA

Com um microscópio ótico podemos ter imagens com ampliação até 100x.

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Imagens que permitem a visualização e a localização de determinados compostos. Resultam da deteção de uma certa radiação, ou seja, é necessário excitar o **fluorocromo**, um composto fluorescente que emite radiação com comprimentos de onda (varia conforme o fluorocromo). Cada comprimento de onda corresponderá uma proteína.

Excitação: transmissão de eletrões de um nível para o outro. O espectro de excitação é diferente do de observação porque o comprimento de onda de excitação é diferente do comprimento de onda quando ocorre a emissão.

MÉTODOS

- Dio é o corante

- Adicionamos um gene que codifica uma proteína fluorescente, logo a seguir ao gene da proteína que pretendemos localizar. Assim, quando a proteína fluorescente for sintetizada, saberemos onde está a outra.
- Ligamos a proteína fluorescente a um anticorpo primário, que se vai ligar a um antígeno específico e permitir-nos-á localizar esse antígeno
- Ligamos a proteína fluorescente a um anticorpo secundário, mais genérico, que se vai ligar ao anticorpo primário, que por sua vez se vai ligar ao antígeno que pretendemos localizar

1. Método de fluorescência: a amostra é iluminada com um feixe de luz com o comprimento de onda necessário para excitar o fluorocromo. Todas as partes da amostra são banhadas pelo mesmo feixe de luz e, portanto, são excitadas ao mesmo tempo, resultando na deteção de fluorescência, muita da qual no background da amostra.

- Iluminado por um dado c.d.o. – excitação
- Emite luz de outro c.d.o. – emissão

2. Método confocal

A amostra é iluminada com um feixe de luz estreito com o comprimento de onda necessário para excitar o fluorocromo, que atravessa um minúsculo buraco (pinhole), que filtra a radiação que não é importante, permitindo uma imagem de alta-definição. Só a luz produzida pela amostra muito perto do plano focal é que vai ser detetada, a imagem aparece com profundidade de campo e maior resolução.

MICROSCOPIA ELETRÓNICA

Relaciona-se com o tipo de imagem com a ampliação.

1. Método de Transmissão: um feixe de eletrões atravessa a amostra, oferecendo uma imagem, que varia consoante as zonas onde passam mais ou menos eletrões, resultando numa imagem preto e branco 2D:

- Zonas mais escuras – são zonas de maior densidade que absorvem mais eletrões
- Zonas mais claras – são zonas menos densas que absorvem menos eletrões

Para uma imagem mais clara, necessitamos de uma amostra muito fina, que obtemos através da utilização do ultramicrotomo.

Colocamos a amostra numa amostra, que, depois de secar, forma blocos duros. Posteriormente, utilizando um **ultramicrotomo**, que tem uma faca de diamante, conseguimos cortá-la em fatias muito finas, na ordem dos nanómetros. Podemos pigmentar a amostra com corantes, para conseguirmos perceber se a amostra está suficientemente fina.

2. Método de Scanning/ Varrimento (SEM): a superfície de uma dada amostra é varrida, *scanned*. por um feixe de eletrões. Os eletrões interagem com a superfície da amostra, que tem de ser condutora, para permitir que a radiação penetre parcialmente nela. Os átomos da amostra produzem vários sinais específicos que contêm informação sobre a tipologia e composição da superfície. Ao embater na superfície, os eletrões podem arrancar eletrões da amostra (**Secondary electron – SE**). Neste caso é emitido um fóton e o espaço vazio é preenchido por outro eletrão (**eletrão de Auger**). Os eletrões da radiação são refratados (**Backscattered electrons – BSE**), fornecendo uma imagem 3D.

Modo de preparação

1. Esterilizar uma rodela de fita de carbono com UV
2. Colocar a rodela num suporte e a amostra por cima
3. Fixar a amostra (com resina) e desidratar
4. Montar a fita com a amostra no suporte
5. *Coating*: revestir com uma camada finíssima homogênea de ouro. É necessário para evitar hipotéticas reações químicas entre a amostra e os eletrões ou até a queima da amostra.

Métodos com maior precisão

1. Eletrões: Transmissão – Scanning
2. Laser: Força atômica – Confocal/ Fluorescência
3. Luz: Ótico

AFINIDADE QUÍMICA

Reconhecimento de duas moléculas mutuamente, que provoca a sua ligação mais ou menos capaz.

Estrutural ou molecular: a enzima reconhece os substratos por afinidade (ligação/reconhecimento) e posiciona-os da forma correta para ocorrer a reação e a velocidade da reação aumenta (catálise)

Enzima: proteína que acelera reações químicas. Esta faz com que os substratos se coloquem na posição certa para que ocorra a reação. Cada uma tem uma afinidade específica para uma molécula. Quanto maior for a afinidade com a enzima, mais rápida será a reação.

PATRIMÔNIO GENÉTICO

Ácido desoxirribonucleico (DNA)

O patrimônio genético corresponde ao conjunto de genes que define uma espécie, que se dividem em:

- 40% **Genes e sequências gênicas** (zonas regulatórias): 2% codificam proteínas e 38% são RNA funcional
- 60% **Intergénico** (JunkDNA): Cromossomas cuja função é desconhecida: 18% são cópias e 42% repetitivo (coerência populacional, acumulação de mutações silenciosas), parentalidade, DNA viral (importância histórica)

O que perdura de geração em geração é o DNA, que comanda a vida bioquímica da célula através da síntese de proteínas. O RNA atua como um mediador e regulador.

CONCEITOS

Gene: segmento de DNA

Genoma: toda a informação hereditária de um organismo

Genótipo: conjunto de genes recebido do pai e da mãe

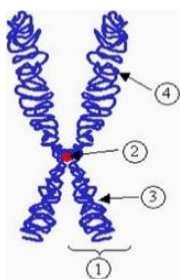
Fenótipo: genes que se expressam

Cariótipo: conjunto de cromossomas (número/ tamanho/ estrutura)

ESTRUTURA DO CROMOSSOMA

O cromossoma é constituído por heterocromatina, DNA envolvido em histonas, de uma forma condensada

1. Telómero: repetições numerosas de pequenas sequências de nucleótidos localizadas nas extremidades dos cromossomas lineares. Adquirem estrutura terciária que atrasa a degradação do DNA. Sintetizados pela telomerase



(polimerase de DNA dependente de RNA – usa uma cadeia de RNA como molde). Por serem repetitivas, têm uma maior suscetibilidade para estabelecerem pontes de hidrogénio entre si (G-G / C-C)

2. Centrômero: cuja função é a segregação dos cromossomas durante a mitose através da sua ligação ao cinetocoro (proteínas que ligam ao citoesqueleto e permitem a migração do centrômero)

3. Braço curto (bq)

4. Braço longo (bl)

A estrutura do cromossoma depende da posição do centrômero e do bandamento – **banda escura** (heterocromatina, poucos elementos genéticos, ricas em pares AT) ou **banda clara** (eucromatina, mais elementos genéticos, ricas em pares CG)

No **fim da fase S**, os cromátídeos estão unidos pela coesina.

No **início da prófase**, os cromátídeos permanecem unidos pela coesina e são condensados. No **meio da prófase**, a coesina liberta-se, permitindo o início da separação dos cromátídeos. Na **anáfase**, a coesina que fica ligada aos centrômeros, é degradada, permitindo a separação total dos cromátídeos.

Graças à existência de coesina, é possível o crossing-over, durante a **meiose**.

Proporção de Chargaff – Erwin Chargaff (1956)

- $[A] + [G] = [C] + [T]$
- $[A] = [T] \quad [C] = [G]$

Rosalind Franklin

- Visualizou o DNA através do atravessamento do raio X por um cristal, que permitiu ver as ligações da molécula e descobrir a sua periodicidade dupla (hélice)

Estrutura de dupla-hélice – J. Watson & F. Crick (1963)

- **Cadeias antiparalelas:** uma cadeia está no sentido 3' - 5' e a outra está no sentido 5' - 3'
- **Complementaridade de bases:** cada base azotada de uma cadeia liga-se com uma base azotada específica da cadeia

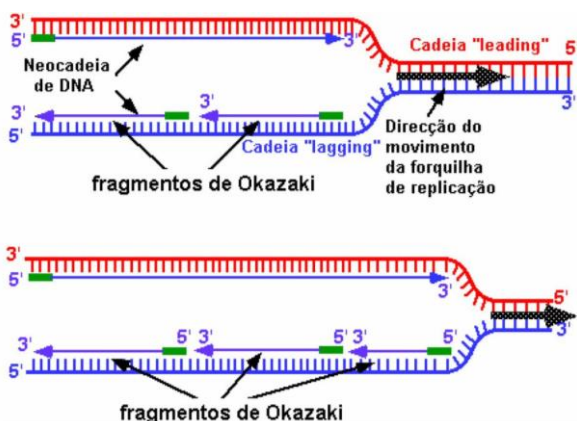
oposta. Entre as bases, estabelecem-se pontes de hidrogénio (ligações fracas): $[A] = [T]$ / $[C] \equiv [G]$.

- **Diâmetro constante:** uma base púrica liga-se a uma pirimídica, tornando-se uma molécula estável
- **Viscosidade do DNA:** é uma molécula grande e com uma estrutura de dupla hélice
- **Caráter hidrofóbico:** característica das bases azotadas, que tendem a isolar-se no interior da molécula
- **Caráter hidrofílico:** característico dos grupos fosfatos, daí a encontrar-se virado para o exterior da molécula
- **Hélice de periodicidade dupla:** com ligações fracas (pontes de hidrogénio) entre si, muito fácil de desnaturar sem perder a sequência polinucleotídica. Energia necessária: $[A] = [T] < [C] \equiv [G]$
- **Molécula estável**

Replicação do DNA – Hipótese Semiconservativa

- Uma molécula de DNA dá origem a duas moléculas: cada uma com uma cadeia de DNA antigo e outra de DNA recém-formado, sempre na direcção 5' - 3'

1. A **enzima helicase** abre a molécula e separa as duas cadeias, partindo as pontes de hidrogénio e deixando as bases azotadas expostas. Cria-se uma bolha de replicação (tem origem no início da replicação e avança em sentido contrário, até que se obtenha uma nova cadeia independente)
2. A **enzima primase** ajuda a adição de um primer de RNA, onde se inicia o processo de formação.
3. A **enzima DNA Polimerase** junta nucleótidos livres às cadeias. Estabelecem-se pontes de hidrogénio entre as bases azotadas e posteriormente ligações covalentes entre os grupos fosfato e os carbonos.



A polimerização começa sempre no primer de RNA e acaba na forquilha de replicação. Contudo, na formação contínua, a polimerização tem o sentido 5' - 3' e na formação descontínua tem o sentido 3' - 5'.

4. A **enzima ligase** liga os fragmentos de Okasaki entre si

AFINIDADE QUÍMICA DNA- HISTONAS

Quanta menor for a afinidade DNA-Histonas, mais fácil é de separar este complexo e mais facilitada será a transcrição.

Como o DNA é um ácido e tem carga negativa, e as histonas têm carga positiva, quanta maior for a diferença de cargas, maior será a afinidade do complexo.

Se houver **elevada afinidade** (histonas não acetiladas e citosinas metiladas), os genes vão ficar extremamente “enrolados”, tornando-se **genes silenciados**

Se houver **baixa afinidade** (histonas acetiladas e citosinas não metiladas), os genes vão ficar menos “enrolados”, tornando-se **genes expressos**.

MUTAÇÕES QUE MUDAM A AFINIDADE DNA-HISTONAS

Metilação do DNA: adição de um grupo metil. Aumenta a carga negativa do DNA e, por isso, a afinidade.

Nós herdamos dos nossos progenitores certos padrões de metilação. Os padrões de metilação silenciam genes.

Acetilação das histonas: adição de um grupo acetil. Aumenta a carga negativa das histonas e, por isso, diminui a afinidade.

Fosforilação das histonas: adição de um grupo fosfato. Aumenta a carga negativa das histonas e, por isso, diminui a afinidade.

Ácido ribonucleico (RNA)

- As moléculas de RNA são constituídas por uma cadeia simples de nucleótidos. Assim sendo, a razão $[A] + [G] \neq [C] + [T]$. O RNA é formado a partir de um gene de DNA e transporte informações específicas. É uma molécula instável.

- Todos os RNA nascem por transcrição a partir de uma sequência de DNA (excepto alguns vírus que replicam diretamente o seu genoma de RNA)

- É sempre codificado por DNA, processo a partir do qual uma cadeia dupla forma uma cadeia simples com

enrolamentos múltiplos, estabelecidos por pontes de hidrogénio

- Quanta maior for a complexidade das células, maior será o tamanho do RNA

RNA ENVOLVIDO NA TRANSCRIÇÃO/ TRADUÇÃO

RNA Mensageiro (mRNA): transporta uma informação. Presente em todas as células e alguns vírus.

RNA Transferência (tRNA): transporta o anticódon e um aminoácido. Presente em todas as células.

RNA Ribossómico (rRNA): faz parte dos ribossomas. Presente em todas as células

hnRNA: Presente em todas as células

RNA ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO

snRNA: Presente nos eucariontes superiores

microRNA: Presente nos eucariontes superiores

siRNA: Presente nos eucariontes superiores

TRANSCRIÇÃO DO DNA

DNA → mRNA: no núcleo

A cadeia dupla do DNA abre, criando a bolha de transcrição, para a passagem da RNA Polimerase, que estimula a ligação de nucleótidos livres de RNA (vindos da enzima) e dos nucleótidos de DNA

1. Iniciação: É selecionado um excerto de DNA. A molécula de DNA abre nessa zona. De um lado temos a cadeia template (antisense: 3' - 5'), que serve de molde à transcrição, e do outro temos a cadeia não template (sense: 5' - 3')

2. Elongação: Entram nucleótidos livres e completam a cadeia exposta, a cadeia template (antisense: 3' - 5')

3. Terminação: formação de uma ança que promove a desagregação da estrutura

Codão: tripleto de nucleótidos do mRNA (5' - 3')- igual à sense

Codogene: tripleto de nucleótidos de DNA

Anticódon: tripleto de nucleóticos de tRNA (3' - 5') – igual à antisense

Promotor: zona regulatória do DNA que permite a ligação de fatores (proteínas) de auxílio à transcrição às quais se liga a RNA Polimerase

- A ligação dos fatores de transcrição ao DNA ocorre devido ao reconhecimento/ afinidade do fator a uma sequência nucleotídica específica. Todas as fases da transcrição requerem auxílio à RNA Polimerase por diferentes fatores de transcrição.

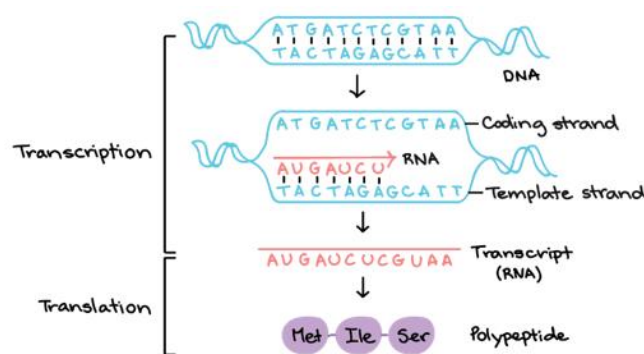
Maturação do RNA

1. A cadeia divide-se em intrões e exões
2. Os intrões são retirados e os exões unem-se, formando o mRNA funcional

TRADUÇÃO DO mRNA

mRNA → Proteína: nos ribossomas

1. **Iniciação:** mRNA liga-se à subunidade pequena do ribossoma e o tRNA traz um anticódon e um aminoácido. Cada anticódon liga-se a um codão específico da cadeia.
2. **Alongamento:** ligam-se vários aminoácidos trazidos pelo tRNA
3. **Finalização:** destrói-se a estrutura inicial e o péptido é libertado



CÓDIGO GENÉTICO

- **Não é ambíguo:** 1 codão codifica apenas 1 aminoácido
 - **É redundante:** 1 aminoácido pode ser codificado por vários codões
 - Nas células menos complexas (células procarióticas), o código genético é menos redundante, mais específico.
- Codão non-sense:** não correspondem a nenhum aminoácido
- Codão stop:** fazem parar a tradução (há vários seguidos)

MUTAÇÕES CELULARES

O genótipo que codifica o fenótipo pode sofrer mutações (induzidas ou espontâneas), criando uma imensidão de possíveis fenótipos.

Qualquer modificação ou alteração brusca no material genético, seja nos genes ou nos cromossomas, pode provocar uma variação hereditária ou uma mudança no fenótipo. A mutação pode produzir uma característica favorável num dado ambiente e desfavorável noutro.

As mutações são a **fonte primária de variabilidade genética**, pois introduzem numa população uma maior variabilidade de indivíduos sobre a qual atua a seleção natural.

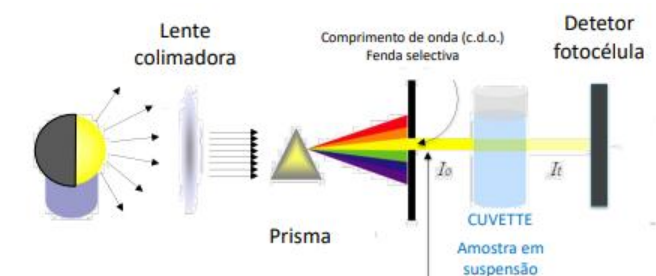
Quando há uma menor diversidade genética numa população, perante uma mudança ambiental, os organismos vão reagir de forma semelhante, podendo levar à extinção da população.

Quando há uma maior diversidade genética numa população, perante uma mudança ambiental, os organismos vão reagir de forma diferente, e, desta forma, a seleção natural tem um maior leque de atuação.

Há algumas mutações que provocam **efeitos positivos** no indivíduo tais como a mudança de cor. Os indivíduos que são afetados designam-se **mutantes**.

Quando as mutações ocorrem nas **células reprodutoras** podem originar maior capacidade reprodutora (acontecerá a proliferação de organismos mutantes), menor capacidade reprodutora (sem efeito na biodiversidade), ou mista (relação de dominância e recessividade)

MEDIÇÃO DO DNA



Espectrofotómetros: a radiação emitida é alinhada por uma lente e, de seguida, intersesta um prisma, através do qual é dividida consoante o seu comprimento de onda. Há um filtro de um determinado comprimento de onda (DNA- 260nm; células microbianas – 600 nm), que é ultrapassado pela

radiação filtrada. De seguida a radiação intersesta a cuvete de plástico (de modo a não haver refração da radiação). Uma parte da radiação é absorvida pela amostra e outra parte intersesta o detetor.

- **“Branco”:** cuvete sem amostra; ponto de referência
- **Absorvância:** intensidade absorvida pela amostra e que nunca chega ao detetor. $A = \log \frac{I_0}{I_T}$

$$\text{Absorvância (A)} = \text{Densidade ótica (DO/ OD)}$$

I_0 = intensidade da radiação que intersesta a amostra

- **Transmitância:** intensidade da radiação transmitida (I_t) que atinge o detetor depois de atravessar a amostra

LEI DE LAMBERT-BEER

A Lei de Lambert-Beer estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática (raios luminosos paralelos).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

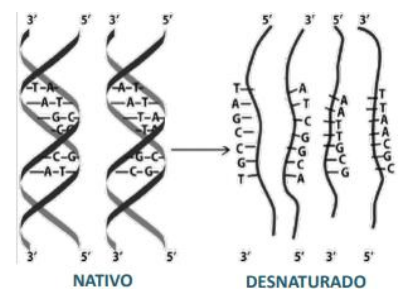
ε : coeficiente de absorção

c : concentração de partículas na solução

l : distância percorrida pelo feixe de radiação

DESNATURAÇÃO TÉRMICA DO DNA

- Quebra das ligações das pontes de hidrogénio através de um elevando aumento de temperatura.

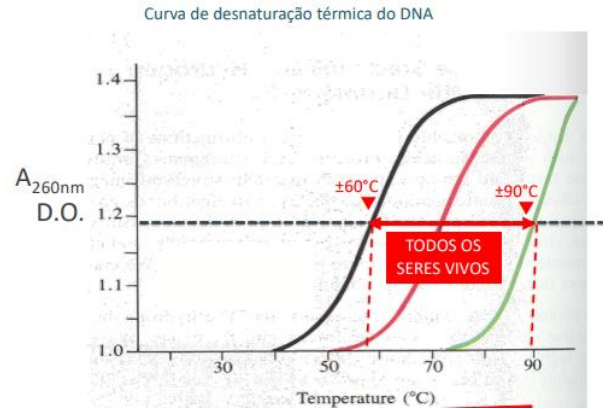
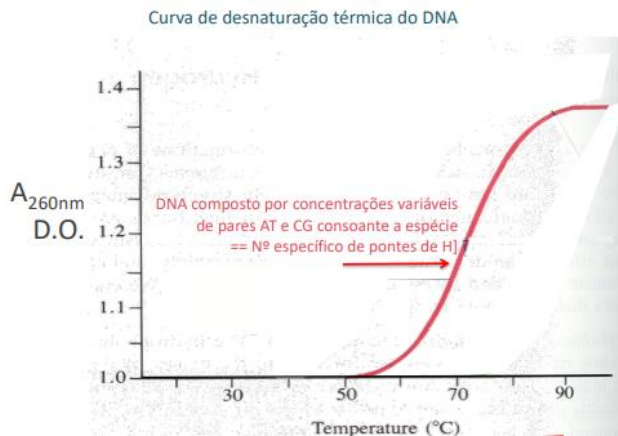


- DNA nativo, através do aumento da temperatura, torna-se DNA desnaturado. Verifica-se um aumento da densidade ótica.
- É necessária mais energia para desnaturar DNA composto 100% por ligações C-G, dado que tem 3 pontes de hidrogénio

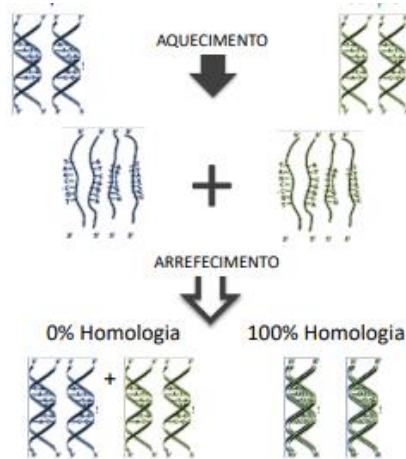
Temperatura média de desnaturação (T_m): temperatura à qual 50% do conteúdo total do DNA está desnaturado 50% do conteúdo total do DNA está em cadeia dupla.

- Valor taxonómico importante para a determinação da proximidade entre várias espécies (**Taxonomia:** agrupamento

de espécies por semelhança (agrupamento por semelhança molecular)



Reassociação de DNA: ocorre quando o DNA em cadeia simples é arrefecido lentamente, permitindo o reencontro das cadeias e a formação das pontes de hidrogénio.



- Espécies não semelhantes molecularmente apresentam 0% homologia e espécies semelhantes molecularmente apresentam 100% homologia (formam-se híbridos com cadeia dupla heterólogas)
- A distância genética, determinada pela acumulação de mutações. Quando mais distantes geneticamente, menos a % de homologia.

Maior distância – maior ramo – curvas afastadas

Menor distância – menor ramo – curvas próximas

A **distância entre a curva de desnaturação e a curva de renaturação** é equivalente à diferença entre as % dos nucleótidos de cada sequência, que corresponde à **distância genética**.

Esta distância só se verifica ao longo do tempo, por acumulação de mutações.

Relógio molecular: permite a conversão entre mutações e tempo de divergência, assumindo que a taxa de mutação é constante.

A **DNA Polimerase I** atua na replicação do DNA, mas também atua na sua reparação. A todo o momento, dentro das células, há enzimas a reparar o DNA. Quando essa reparação não é eficaz, verifica-se uma mutação.

Estas enzimas atuam menos ao nível do **Junk DNA**, uma vez que estas mutações não afetam o equilíbrio do organismo. Assim, verifica-se, nesta zona, uma grande acumulação de mutações e, consequentemente, uma maior taxa de **evolução rápida e impactante**.

Pelo contrário, ao nível dos **genes codificantes**, verifica-se uma maior atuação destas enzimas e, consequentemente, menos mutações, verificando, desta forma, uma **evolução lenta**. É nestes casos que ocorre a **fixação das mutações** – são transmitidas à descendência e sobrevivem à seleção natural.

Verifica-se um número variável de mutações necessárias para mudar um aminoácido ou uma proteína, que depende de vários fatores, entre os quais a quantidade de codões que codifica esse mesmo aminoácido e a posição no codão do nucleótido mutante.