

ANÁLISE DE CÉLULAS DE CEBOLA: OBSERVAÇÃO DO CICLO CELULAR E DE CÉLULAS TRATADAS COM COLCHICINA.

O processo mitótico nos organismos unicelulares está intimamente relacionado com a reprodução. Contudo, nos organismos multicelulares, as multiplicações celulares são responsáveis pelo crescimento corporal, desenvolvimento e reposição das células de órgãos e tecidos.

Os eventos relacionados com a multiplicação celular devem ser precedidos por aqueles da replicação do DNA durante a interfase (fase S) e podem ser didaticamente divididos em dois momentos distintos: a) mitose (*mitos* = filamento) que envolve a duplicação do núcleo; e b) citocinese, relacionada às modificações citoplasmáticas que resultam na divisão da célula.

As principais diferenças entre as células animais e vegetais em relação à multiplicação celular incluem a ausência de centríolos dos quais surgem as fibras do áster ou fusos acromáticos. Nas células vegetais há a presença de centros de organização polar do fuso chamados de MTOCs, os centros de organização dos microtúbulos.

As fases da mitose não diferem entre as células vegetais e animais e podem ser citadas e brevemente comentadas:

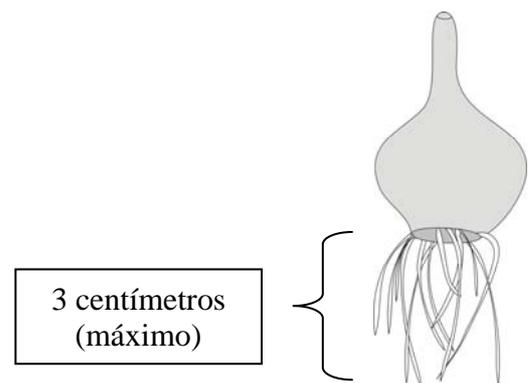
- ✓ prófase – os cromossomos, constituídos por duas cromátides irmãs idênticas iniciam o processo de condensação.
- ✓ metáfase – desaparecimento da membrana nuclear; a condensação cromossômica alcança o seu ápice e os cromossomos estão posicionados na placa equatorial da célula.
- ✓ anáfase – início da separação dos cinetocoros, separação das cromátides irmãs e tração dos cromossomos para os pólos da célula.
- ✓ telófase – reconstituição do envoltório nuclear e descondensação dos cromossomos.

O processo da citocinese difere entre as células animais e vegetais,

fundamentalmente devido à presença da parede celular. Nas células animais, a divisão entre células ocorre por meio da constrição mediana que acaba por separar as duas células filhas; nas células vegetais se forma uma placa celular ou partição na qual se deposita celulose de modo a reconstituir completamente as duas células.

As mudanças principais que ocorrem durante o ciclo celular podem ser observadas superficialmente por meio de preparações obtidas de tecidos com células em divisão e coradas com Giemsa. Os tecidos que podem ser usados são o meristema da ponta das raízes das plantas ou brotos. As raízes podem ser obtidas dos bulbos ou das sementes em germinação. Empregam-se, com frequência as pontas das raízes dos bulbos de cebola *Allium cepa* ou *Allium sativum*. Os procedimentos para se obterem boas preparações incluem:

1. Obtenção das pontas de raízes – devem ser preferencialmente jovens (até 3 cm), coletadas pela manhã entre as 10 horas e 10 horas e 30 minutos ou às 22 horas. Esse material pode ou não ter sido submetido à pré-tratamento.



2. Pré-tratamento

Finalidade:

- a) aumentar o número de células em divisão, através do bloqueio do ciclo mitótico
- b) provocar maior contração cromossômica, permitindo visualizar constrições e cromátides

c) destruir ou inibir a formação das fibras do fuso acromático, produzindo mais espalhamento cromossômico

Agentes:

a) Colchicina 0,2 % (0,125 – 2%) em água destilada, à temperatura ambiente, durante 4h (7 min – 72h);

b) Paradiclorobenzeno (PDB): solução aquosa saturada, ~24h à 4° C ou 4 – 8h à 16-20° C;

c) 8-hidroxiquinoleína (8-HQ): solução aquosa 0,002M, 3 a 6 h à temperatura de 16-18° C (acima de 18 ° C pode causar aderência dos cromossomos);

d) água destilada a $\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 6 a 24h (um vidrinho contendo material imerso em água mantém aproximadamente essa temperatura, quando colocado em uma forma com água e cubos de gelo na bandeja abaixo do congelador em um refrigerador).

3. Fixação

Finalidade:

a) coagulação dos constituintes da célula, evitando desintegração ou alteração da sua estrutura interna;

b) produção de condições ideais na superfície das estruturas fixadas tornando-as receptivas ao corante a ser utilizado;

c) enrijecer (no caso dos materiais que serão incluídos para cortes histológicos) ou amaciar (no caso dos materiais que serão esmagados em lâminas) os tecidos.

Agentes:

a) álcool etílico absoluto (6): clorofórmio (3): ácido acético glacial (1) ou

b) álcool etílico ou metílico absoluto (3): ácido acético glacial (1)

4. Estocagem

Pode ser feita guardando o material fixado no freezer, no próprio fixador usado, ou transferindo o material para etanol 70% e guardando no freezer ou na geladeira.

5. Hidrólise

Finalidade:

a) destruir as membranas de celulose que envolvem as células;

b) formar grupos aldeídos livres, que reagirão com o corante de Schiff na técnica de Feulgen.

Métodos:

a) emergir o material em HCl 5N à temperatura ambiente por 5-20 minutos

b) emergir o material em HCl 1N à 60 °C por 7-12 minutos

c) a conjugação de hidrólise ácida com maceração em enzimas oferece excelentes resultados em materiais mais resistentes. Uma solução de celulose- pectinase a 2% à temperatura de aproximadamente 35°C por um período de 15 min a 2h pode ser utilizada com ótimos resultados

6. Coloração

Agente:

a) orceína acética ou carmin acético a 1-2%

b) corante de Schiff

7. Obtenção da preparação cromossômica:

a) por meio de esmagamento de 1 ou 2 pontas de raiz.

Procedimentos na prática:

Duas fontes de células: com e sem pré-tratamento:

a. mergulhar as pontas das raízes cortadas em H₂O destilada durante 3 minutos.

b. fazer a hidrólise das raízes durante 8-12 minutos com HCl 5N.

c. mergulhar em H₂O destilada durante 3 minutos para interromper a hidrólise.

d. transferir as raízes para uma lâmina limpa e pingar uma gota de ácido acético a 45 %.

e. cortar a extremidade final da raiz desprezando o restante do material. Dissociar o material tomando o cuidado para não deixar secar.

f. colocar uma ou duas pequenas gotas de corante orceína acética esperar 3 minutos e cobrir com lamínula.

- g. fazer o esmagamento sobre um papel filtro ou outro absorvente, tendo o cuidado para a lâmina não se deslocar horizontalmente.
- h. analisar ao microscópio.

Exercícios:

- a) Desenhe as fases da mitose: prófase, metáfase e anáfase.
- b) Qual é o número cromossômico da *Allium cepa*?