

ESTUDO CITOQUÍMICO DO COMPLEXO DE GOLGI EM FIBROBLASTOS DO TECIDO CONJUNTIVO DE RATO

Fausto MARCHI*

RESUMO: Foi realizado o estudo citoquímico ao nível de microscopia eletrônica, em fibroblastos do tecido conjuntivo de rato, após a impregnação prolongada com tetróxido de ósmio e pela detecção da enzima tiaminopirifosfatase. Os dois sáculos da face cis da pilha do Golgi, com as suas porções centrais achatadas e as porções periféricas dilatadas ficaram impregnados pelo tetróxido de ósmio, enquanto o produto de reação para detecção da enzima TPPase foi observado nos sáculos da região trans. Tais resultados comprovam a nítida compartimentalização do complexo de Golgi em fibroblastos do tecido conjuntivo de rato.

UNITERMOS: Citoquímica; complexo de Golgi; fibroblasto.

INTRODUÇÃO

O complexo de Golgi em fibroblastos do tecido conjuntivo de rato mostra-se constituído por pilhas de sáculos achatados e que mostram as suas extremidades dilatadas. MARCHI & LEBLOND^{8,9} através de estudos ultra-estrutural e radioautográfico, caracterizaram as face cis e trans da pilha de sáculos do complexo de Golgi, mostrando que as dilatações esféricas com um conteúdo de finos filamentos enovelados estão associadas com os 1º e 2º sáculos da pilha (face cis). Por outro lado, as distensões cilíndricas ou retangulares mostrando no interior feixes de filamentos dispostos em paralelo estão relacionadas com os 3º, 4º e 5º sáculos da pilha (face trans). Na interface entre o retículo endoplasmático granular e a face cis do complexo de Golgi são vistas inúmeras vesículas e túbulos intermediários responsáveis pelo transporte dos precursores de colágeno entre um compartimento e outro⁹. Nas proximidades da face trans da pilha de sáculos são observados os grânulos de secreção imaturos e maduros.

O objetivo deste trabalho é uma posterior análise da compartimentalização do complexo de Golgi em fibroblastos do tecido conjuntivo de rato, utilizando os métodos clássicos da impregnação prolongada pelo tetróxido de ósmio⁵ e pela detecção da enzima tiaminopirifosfatase¹⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Impregnação pelo tetróxido de ósmio

Foram usados ratos albinos, da linhagem Sherman, com 3 dias de idade. Após perfu-

são seqüencial de solução de lactato de Ringer (1/2min) e glutaraldeído a 2,5% (em tampão cacodilato de sódio 0,1M e contendo 4% de sucrose e 0,025% de cloreto de cálcio, pH 7,4) por 5 minutos, as eminências plantares foram recortadas em pequenas peças e imersas em tetróxido de ósmio aquoso a 2%, não tamponado (pH 6,2-6,8). Os frascos, previamente envoltos com folha de papel alumínio, foram colocados em estufa a 40°C, por 40 horas⁵. Nos tempos iniciais, foram feitas trocas da solução de tetróxido de ósmio, a cada intervalo de 2 horas, até ser observada a ausência de um precipitado escuro na solução de tetróxido de ósmio removida dos frascos. Após o período em estufa, as peças foram desidratadas em álcoois e óxido de propileno, infiltradas e incluídas em Epon. Cortes ultrafinos com 60-80 µm foram obtidos com navalha de diamante e, foram examinados ao microscópio eletrônico Philips EM-301, do IBBMA, do Campus de Botucatu (UNESP), sem empregar-se qualquer tipo de contracoloração.

b. Detecção da enzima tiaminopirofosfatase (TPPase)

A perfusão de ratos com 3 dias de idade foi idêntica à da "Impregnação pelo tetróxido de ósmio". Procedeu-se, em seguida, ao recorte das eminências plantares em fatias com aproximadamente 1 x 1 x 2 mm, e que foram colocadas no mesmo tipo de fixador usado na perfusão, por 1 hora a 4°C. As peças, mantidas no refrigerador, foram lavadas por um período de 12 horas com trocas freqüentes de tampão cacodilato de sódio 0,1M, contendo sucrose a 4%.

Após a lavagem, as peças fixadas foram colocadas sobre um disco plástico, previamente resfriado em geladeira e recoberto com papel de filtro; uma solução de ágar a 7%, à temperatura de 47°C, foi despejada sobre as peças, e o disco foi imediatamente recolocado na geladeira onde foi mantido por 15 minutos para permitir que o ágar se solidificasse. O excesso de ágar foi recortado e foram obtidos cortes de 75 µm de espessura em um micrótomo Smith-Farquhar TC-2 (Du Pont Instruments, Sorval Operations, Newtown, CT, U.S.A.). Estes foram lavados várias vezes em tampão Tris-maleato 0,1M contendo sucrose a 4%, pH 7,2. A atividade da enzima tiaminopirofosfatase foi demonstrada pela incubação em um meio com pirofosfato de tiamina (Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.) como substrato, pH 7,2, segundo NOVIKOFF & GOLDFISCHER¹⁰. Após 60 minutos de incubação, os cortes foram lavados várias vezes com o mesmo tipo de tampão da incubação e, em seguida, lavados em várias trocas de tampão cacodilato de sódio a 0,1M contendo sucrose a 4%.

Cortes incubados simultaneamente em um meio livre de substrato serviram como controle.

Em seguida, os cortes foram pós-fixados por 1 hora, a 4°C, em uma mistura de partes iguais de tetróxido de ósmio aquoso a 2% e ferrocianeto de potássio a 3%, de acordo com o método de Karnovsky⁷. O material foi desidratado e incluído em Epon. Cortes ultrafinos foram examinados ao microscópio eletrônico Philips EM-301, do IBBMA, do Campus de Botucatu (UNESP), sem prévia contracoloração.

RESULTADOS

a. Impregnação pelo tetróxido de ósmio

Nos fibroblastos do tecido conjuntivo, a impregnação ósmica ocorreu na face cis da pilha de sáculos do complexo de Golgi (Fig. 1). A reação foi intensa no primeiro sáculo e irregular e mais fraca no segundo sáculo. Nestas estruturas as regiões achatadas mostraram uma reação mais forte do que em suas dilatações periféricas. Algumas vesículas e túbulos intermediários presentes na interface entre o retículo endoplasmático granular e a face cis do complexo de Golgi, apresentaram-se fortemente impregnados pelo tetróxi-

do de ósmio (Fig. 1). Ocasionalmente, as distensões esféricas relacionadas com 1º e 2º sáculos mostraram uma fraca reação, ou se apresentaram livres da mesma. Os sáculos da face trans do complexo de Golgi assim como as suas distensões cilíndricas mostraram-se não reativos.

As outras organelas citoplasmáticas foram negativas à impregnação ósmica, com exceção dos corpos multivesiculares, que exibiram uma reação positiva sobre algumas de suas vesículas (Fig. 1).

b. Detecção da enzima tiaminopirofosfatase

O produto de reação foi um achado constante sobre as estruturas da face trans da pilha de sáculos do complexo de Golgi (Fig. 2). A reação era forte no segmento achatado do sáculo número 4, assim como em algumas de suas dilatações cilíndricas periféricas. A reação enzimática, por outro lado, era irregular e menos intensa sobre o terceiro e o último sáculo (5º) da face trans da pilha do Golgi (Fig. 2). As demais organelas citoplasmáticas estiveram livres do produto de reação da enzima tiaminopirofosfatase.

Os espécimens controles não mostraram reação citoquímica detectável.

DISCUSSÃO

Para o estudo citoquímico foram usados ratos com 3 dias de idade, e as reações empregadas são consideradas clássicas para a distinção das faces cis e trans da pilha de sáculos do Golgi em eucariontes^{3,6}. Os resultados do método da impregnação pelo tetróxido de ósmio evidenciaram os sáculos da face cis do Golgi, assim como alguns dos elementos intermediários, tal como o descrito por FRIEND & MURRAY⁵; FRIEND⁴ e PAVELKA & ELLINGER¹¹. A similitude de resultados nestes 2 compartimentos é indicativa de uma suposta associação morfológica e funcional entre ambos. A reatividade positiva em algumas vesículas no interior dos corpos multivesiculares está de acordo com os resultados de FRIEND⁴. Todavia, até o momento, o significado funcional das localizações específicas dos produtos da impregnação prolongada pelo tetróxido de ósmio, permanece em grande parte especulativo^{3,14}.

O produto da reação da enzima tiaminopirofosfatase estava localizado na face trans da pilha de sáculos do Golgi o que concorda com os resultados de NOVIKOFF & GOLDFISCHER¹⁰; BROADWELL & OLIVER² e TANG *et alii*¹³. Trabalhos recentes admitem que esta enzima atue, tal como a uridina difosfatase, no processo de glicosilação terminal de macromoléculas^{1,12} e, portanto, os presentes resultados seriam sugestivos dos prováveis locais de incorporação de radicais glicídios terminais às moléculas de procolágeno.

Em síntese, os resultados citoquímicos proporcionaram informações adicionais sobre a existência de especializações entre os componentes das faces cis e trans da pilha de sáculos do complexo de Golgi, em fibroblastos do tecido conjuntivo.

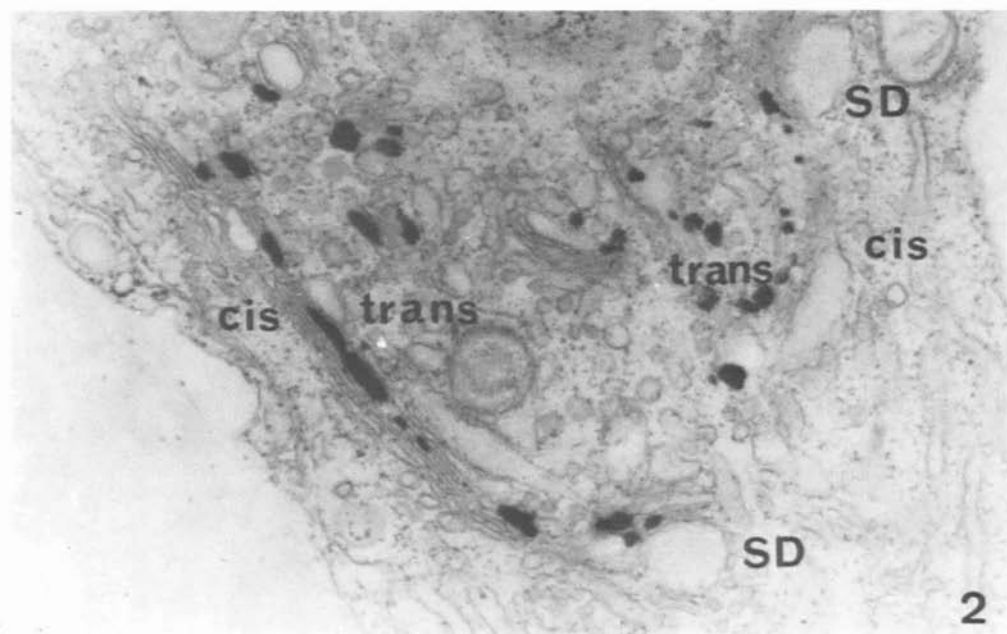
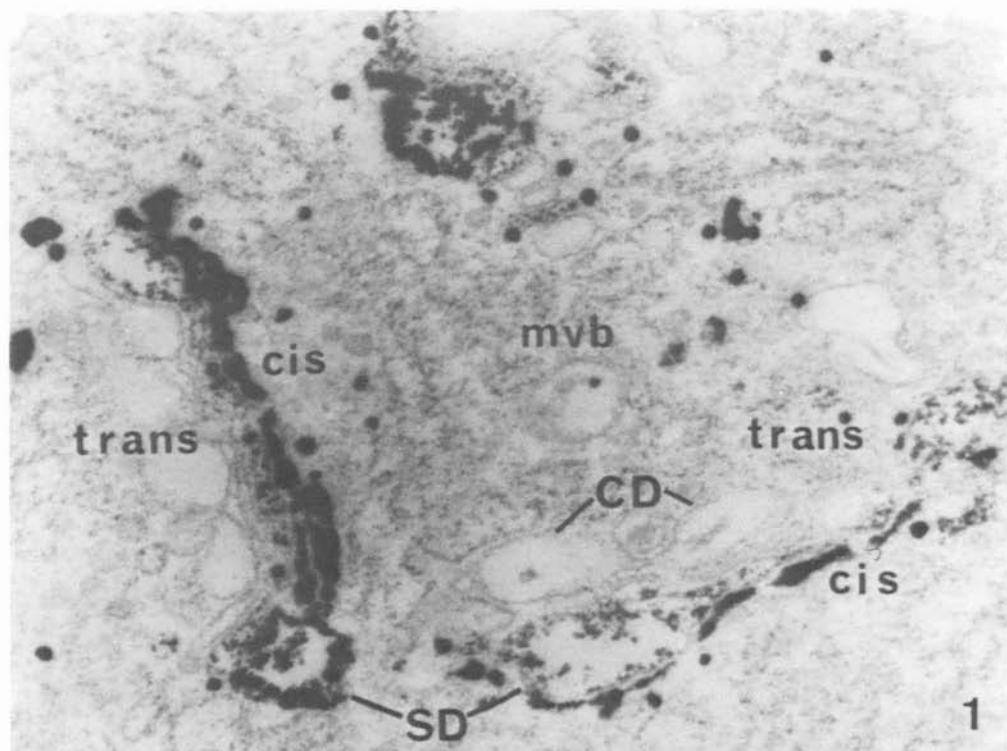


FIG. 1 . Fotografia ao microscópio eletrônico de fibroblasto de rato após a impregnação pelo tetróxido de ósmio (OsO_4). A deposição do precipitado negro de ósmio metálico é evidente sobre os dois primeiros sáculos da face cis das pilhas do complexo de Golgi, tanto sobre suas partes achatadas e fenestradas, como sobre as suas distensões esféricas (SD). Pequenas vesículas localizadas próximas à face cis do Golgi estão impregnadas pelo depósito metálico. Os sáculos da face trans do complexo de Golgi, incluindo as suas distensões cilíndricas (CD), estão livres de reação. As vesículas no interior dos corpos multivesiculares (mvb) podem ou não mostrar uma reação positiva. Sem coloração. Aumento de 40.000x.

FIG. 2 . Fotografia ao microscópio eletrônico de fibroblasto de rato após a reação citoquímica para detecção da enzima TPPase. O depósito negro está restrito aos sáculos da face trans do complexo de Golgi, particularmente naquele de número 4, no sentido cis-trans da pilha. O produto da reação é bastante concentrado nas porções achatadas do sáculo e ocasionalmente, em grumos sobre as distensões cilíndricas. Na face cis as porções achatadas dos sáculos assim como as suas distensões (SD), e também os elementos intermediários não se mostram reativos. Sem coloração. Aumento 40.000x.

MARCHI, F. - Cytochemical study of the Golgi complex compartmentalization on fibroblasts of the rat foot pad. *Rev. Odont. UNESP*, São Paulo, **15/16**: 83-89, 1986/87.

ABSTRACT: The Golgi complex of fibroblasts from the rat foot pad was characterized using cytochemical methods. After prolonged impregnation with osmium tetroxide black deposits were seen over the two first saccules (cis face) of the stack, including their straight and dilated portions. TPPase reaction products were seen mainly over the straight portion of the 4 th saccule (trans face). This study added further evidence of the compartmentalization of the Golgi complex in collagen-producing fibroblast.

KEY-WORDS: Cytochemical study; Golgi complex; fibroblast.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANDAN, R. & FLEISCHER, B. - Orientation and role of nucleoside diphosphatase and 5' - nucleotidase in Golgi vesicles from rat liver. *Biochemistry*, **21**: 4640-45, 1982.
2. BROADWELL, R.D. & OLIVER, C. - Golgi apparatus, GERL, and secretory granule formation within neurons of the hypothalamo-neurohypophyseal system of control and hyperosmotically stressed mice. *J. Cell Biol.*, **90**: 474-84, 1981.
3. FARQUHAR, M.G. & PALADE, G.E. The Golgi apparatus (complex) - (1954-1981) - from artifact to center stage. *J. Cell Biol.*, **91** (1, part 2): 77s-103s, 1981.
4. FRIEND, D.S. - Cytochemical staining of multivesicular body and Golgi vesicles. *J. Cell Biol.*, **41**: 269-79, 1969.
5. FRIEND, D.S. & MURRAY, M.J. - Osmium impregnation of the Golgi apparatus. *Am. J. Anat.*, **117**: 135-49, 1965.
6. HAND, A. - Cytochemical differentiation of the Golgi apparatus from GERL. *J. Histochem. Cytochem.*, **28**: 82-6, 1980.
7. KARNOVSKY, M.J. - Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc. 14th Ann. Meeting Am. Soc. Cell Biol.*, 1971. p. 146, (Abstract).
8. MARCHI, F. & LEBLOND, C.P. - Collagen biogenesis and assembly into fibrils, as shown by ultrastructural and ³H-proline radioautographic on the fibroblasts of the rat foot pad. *Am. J. Anat.*, **168**: 167-97, 1983.
9. MARCHI, F. & LEBLOND, C.P. - Radioautographic characterization of successive compartments along the Rough Endoplasmic reticulum - Golgi pathway of collagen precursors in foot pad fibroblasts of ³H proline-injected rats. *J. Cell Biol.*, **98**: 1705-9, 1984.
10. NOVIKOFF, A.B. & GOLDFISCHER, S. - Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**: 2781-87, 1961.
11. PAVELKA, M. & ELLINGER, A. - Effect of colchicine on the Golgi complex of rat pancreatic acinar cells. *J. Cell. Biol.*, **97**: 737-48, 1983.
12. ROTH, J. & BERGER, E.G. - Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *J. Cell Biol.*, **93**: 223-9, 1982.
13. TANG, X.M.; LALLI, M.F. & CLERMONT, Y. - A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am. J. Anat.*, **163**: 283-94, 1982.

14. WHALEY, W.G. & DAUWALDER, M. - The Golgi apparatus, the plasma membrane and functional integration. *Int. Rev. Cytol.*, 58: 199-245, 1979.

Recebido para publicação em 19.02.86