ATLAS CITOLÓLOGICO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE CITOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

Tema Citológico: **Morfologia e Ultraestrutura Bacteriana Gram Negativa**

Autor: **Miriam Carla de Souza Santos**

Período do Curso: **Julho de 2011 a Dezembro de 2012**

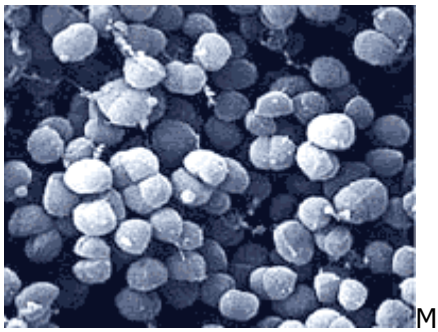
Endereço para correspondência:
e-mail: miriad12@hotmail.com

Morfologia

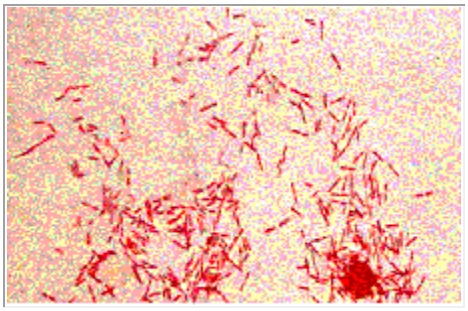
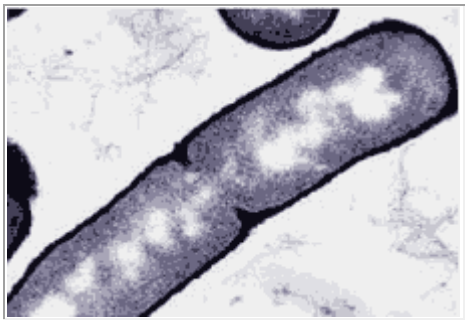
As bactérias são extremamente variáveis quanto ao tamanho e formas que apresentam. Muitas bactérias medem de 2 a 6 µm de comprimento, por 1 a 2 µm de largura, mas certamente estes valores não podem ser definidos como absolutos, pois eventualmente encontramos bactérias de até 500 ou 800 µm, como no caso de *Epulopiscium* ou *Thiomargarita*. Em relação às formas, a maioria das bactérias estudadas seguem um padrão menos variável, embora existam vários tipos morfológicos distintos. De maneira geral, as bactérias podem ser agrupadas em três tipos morfológicos gerais: cocos, bacilos e espiralados.

Os ***cocos*** correspondem a células arredondadas, podem se dividir sem um plano de orientação definido, o que leva a um grande número de arranjos diferentes. Assim temos os cocos isolados, diplococos (*Neisseria*, pneumococos), tetracocos, sarcinas (cubos contendo 8 células), estreptococos (cocos em cadeia) e estafilococos (cocos formando massas irregulares).

N. meningitidis


Microscopia eletrônica de varredura das células apresentadas acima.

Os ***bacilos*** têm forma de bastonetes, podendo apresentar extremidades retas (*Bacillus anthracis*), arredondadas (*Salmonella, E. coli*), ou ainda afiladas (*Fusobacterium*). Como seu plano de divisão é fixo, ocorrendo sempre no menor eixo, os bacilos exibem uma menor variedade de arranjos, sendo via de regra encontrados isolados, como diplobacilos ou ainda como estreptobacilos. Há ainda um arranjo, denominado "em paliçada", também denominado letras chinesas, que é típico do gênero *Corynebacterium*. Tal tipo de arranjo ocorre porque a parede celular desses organismos é dupla e no momento da divisão celular ocorre a ruptura de apenas uma das camadas, deixando as células unidas pela camada de parede que não se rompeu. Os bacilos podem ainda apresentar-se como pequenas vírgulas (*Vibrio cholerae*) ou em forma de meia lua (*Selenomonas*).

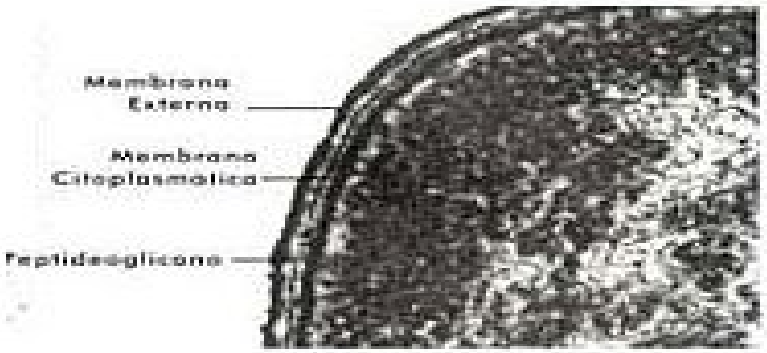
	Microscopia óptica, corada pelo método de Gram, de bacilos arranjados dois a dois (diplobacilos).
	Microscopia eletrônica de transmissão, de um bacilo em processo de divisão celular.

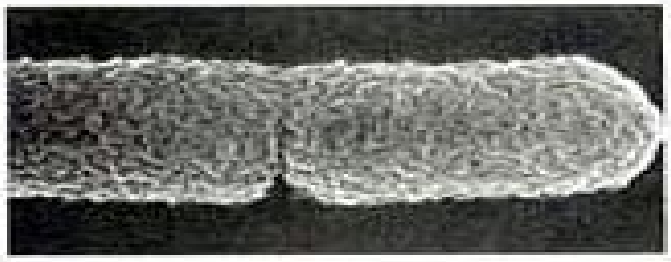
Espiralados: Sua nomenclatura é bastante controvertida ainda. Um tipo de classificação divide os espiralados em dois grupos, os *espiroquetas*, que apresentam uma forma de espiral flexível, possuindo flagelos periplasmáticos. O outro grupo são os *espirilos*, que exibem geralmente morfologia de espiral incompleta e rígido. Geralmente os espiralados são microrganismos bastante afilados, de difícil observação por microscopia de campo claro, sendo muitas vezes analisados por meio da microscopia de campo escuro, ou de técnicas de coloração empregando a impregnação por sais de prata.

	Microscopia óptica de fluorescência, de um organismo espiralado

Ultraestrutra Bacteriana

Parede Celular **-** Estrutura presente na maioria das bactérias conhecidas. Corresponde a uma das estruturas mais importantes nas células bacterianas, estando localizada na porção mais externa, acima da membrana citoplasmática. Devido à sua grande rigidez, a parede celular é responsável pela manutenção da forma do microrganismo. Como o ambiente intracelular é bastante concentrado em relação ao meio externo, (variando de 2 a até 10 atm), a parede atua como uma barreira física rígida, que mantém a forma celular, impedindo que a célula estoure em decorrência do grande turgor. Além disso, a parede celular atua como uma barreira de proteção contra determinados agentes físicos e químicos externos, tais como o choque osmótico. A parede pode ainda desempenhar importante papel em microrganismos patogênicos, em decorrência de presença de componentes que favorecem sua patogenicidade, tais como antígenos ou moléculas envolvidas no reconhecimento celular.
Em 1884, Christian Gram desenvolveu um método de coloração de bactérias que permitia sua separação em dois grupos distintos, as Gram positivas (que coram-se em roxo) e as Gram negativas (que coram-se em vermelho). A partir do advento da microscopia eletrônica e do aperfeiçoamento das técnicas de análise bioquímica dos diferentes componentes celulares, as células Gram negativas exibem uma parede mais delgada (de 9 a 20 nm) e de aspecto bastante complexo, aparentemente apresentando mais de uma camada. As Gram negativas apresentavam-se com maior complexidade superficial.

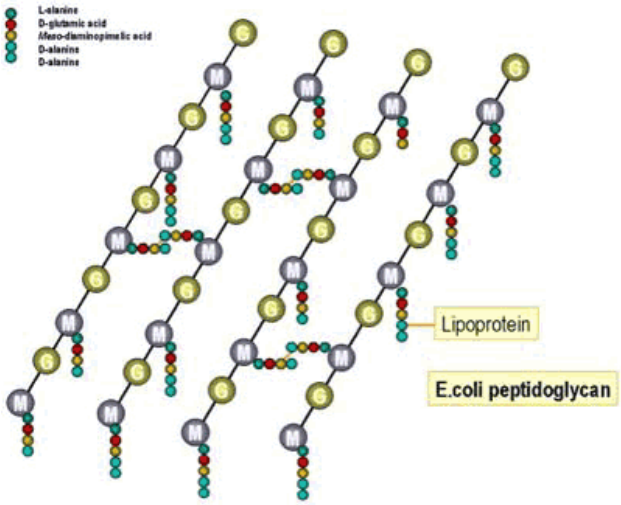




Composição da parede celular

<u>Peptideoglicano</u> (mureína ou mucopeptídeo): Composto exclusivamente encontrado no domínio *Bacteria*, sendo o responsável pela rigidez da parede celular. O peptideoglicano corresponde a um enorme polímero complexo, nas Gram negativas está presente, formando apenas uma ou duas camadas.
O peptideoglicano corresponde a um esqueleto, formado por dois derivados de açúcares, a N-acetilglicosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmico (NAM), unidos alternadamente, através de ligações do tipo ß-1,4. O grupo carboxil de cada molécula de NAM liga-se a um tetrapeptídeo, composto por aminoácidos que alternam-se nas configurações L e D. Destes aminoácidos, o D-glutamato, D-alanina e o ácido meso-diaminopimélico não são encontrados em qualquer outra proteína conhecida. Acredita-se que sua presença confira maior resistência da parede contra a maioria das peptidases. Assim, em cada resíduo de NAM há um tetrapeptídeo associado.

A enorme rigidez da parede celular é resultante das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes. Nas bactérias Gram negativas (Ala-Glu-DAP-Ala), a ligação entre os tetrapepídeos é direta, ocorrendo entre o grupamento amino do DAP subterminal (posição 3) e o grupamento carboxi da D-Ala terminal (posição 4). A análise da figura abaixo deixa clara a grande estruturação do peptídeoglicano, em virtude das inúmeras ligações cruzadas existentes ao longo da molécula. Assim, devido a esta complexa estruturação física, o peptideoglicano confere rigidez à parede, embora exiba certo grau de elasticidade e também porosidade.

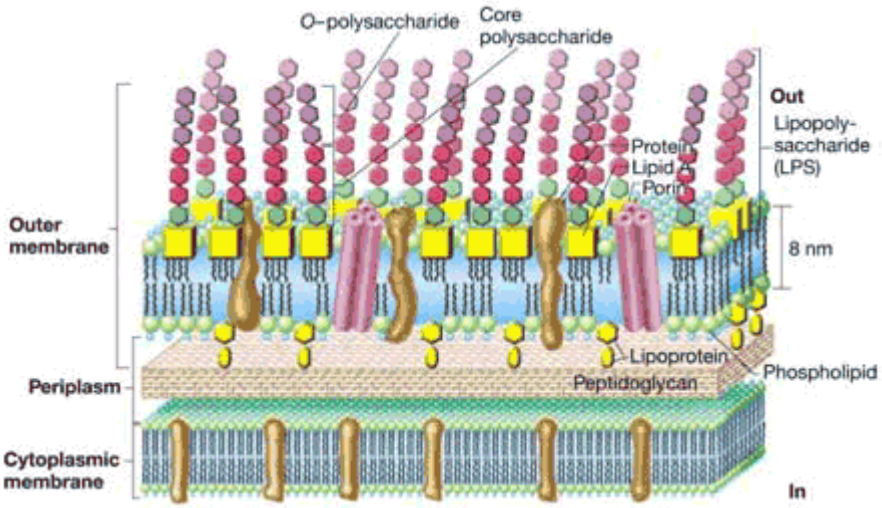


peptideoglicano de células Gram negativas

Nas bactérias Gram negativas, cerca de 10% da parede corresponde ao peptideoglicano, existindo geralmente como uma camada única ou dupla.

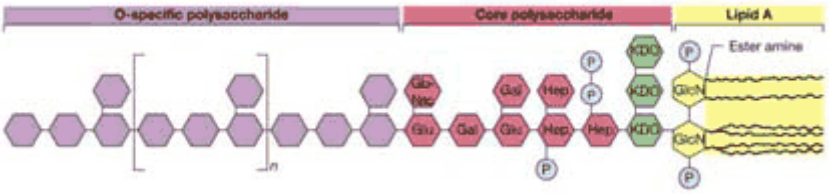
<u>Membrana Externa</u>: Esta, embora denominada "membrana" externa é um componente da parede celular, presente apenas nas bactérias Gram negativas. A membrana externa corresponde a uma segunda bicamada lipídica (semelhante à membrana plasmática), localizada acima do peptideoglicano, contendo fosfolipídeos, lipoproteínas, proteínas e também lipopolissacarídeos. Quando comparada à membrana citoplasmática, a membrana externa exibe maior permeabilidade a pequenas moléculas, tais como glicose ou outros monossacarídeos.Sua face interna geralmente é rica em pequenas lipoproteínas (7,2 kDa), denominadas lipoproteínas de Braun, que ligam-se covalentemente ao peptideoglicano, ancorando firmemente a membrana externa à camada de peptideoglicano. Estudos indicam que a membrana externa e a membrana citoplasmática mantém contato em algumas discretas regiões celulares, denominadas sítios de adesão. Acredita-se que estas regiões de junção podem conferir maior rigidez à parede celular das

bactérias Gram negativas, além de fixar melhor a membrana externa, não às deixam frouxa, associada somente ao peptideoglicano. O sítio de adesão foi também denominado, junções de Bayer e acredita-se que possam ser importantes locais de passagem de compostos citoplasmáticos, ou seja, componentes envolvidos na síntese da membrana externa ou diferentes nutrientes.



Esquema da parede celular de organismos Gram negativos

A face externa da membrana externa é rica em lipopolissacarídeo (LPS), inexistente na membrana citoplasmática. Estes componentes são também denominados de endotoxina, uma vez que provocam febre, choque e eventualmente morte, quando injetados em animais. O LPS é uma molécula complexa, composta por 3 regiões distintas: lipídeo A, polissacarídeo central e cadeia polissacarídica lateral O, ou Antígeno O.



Esquema do lipopolissacarídeo, encontrado na face externa da membrana externa

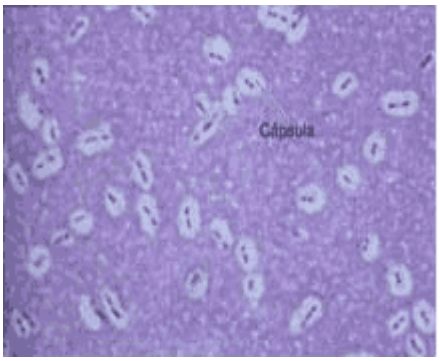
O lipídeo A corresponde à porção mais interna da molécula, ancorando o LPS à porção hidrofóbica da membrana externa. Este componente corresponde à porção tóxica do LPS e geralmente é composto por ácido esteárico, palmítico, mirístico, láurico ou capróico. Estes ácidos graxos estão ligados a um dissacarídeo de NAcGlicosamina-P. A porção polissacarídica localiza-se acima do lipídeo A, em direção ao exterior, sendo composta por duas regiões, o polissacarídeo central e polissacarídeo O, que é mais externo, de natureza repetitiva. Em *Salmonella*, o cerne é composto por 10 açúcares pouco usuais. Conectado ao cerne, há o Ag O, que geralmente é composto por 3 a 5 açúcares bastante peculiares e variáveis. A natureza destes açúcares pode ser modificada pelos microrganismos, resultando em um mecanismo de evasão do sistema imune. O LPS também confere carga negativa à superfície celular.
O LPS se associa a proteínas, formando a face externa da unidade de membrana.
A membrana externa apresenta um grupo especializado de proteínas, denominadas genericamente de **porinas**, que atuam como canais para a passagem de pequenas moléculas hidrofílicas, participando assim do processo de nutrição. As porinas podem ser específicas, contendo sítios de ligação para 1 ou mais substratos, ou inespecíficas, compondo canais aquosos.
A maioria das porinas correspondem a proteínas transmembrânicas, com 3 subunidades idênticas, que formam orifícios de cerca de 1 nm, sendo que, aparentemente, possuem mecanismos para a abertura e fechamento. Para algumas substâncias, a membrana externa é mais restritiva.

Compostos que afetam a Integridade da Parede Celular

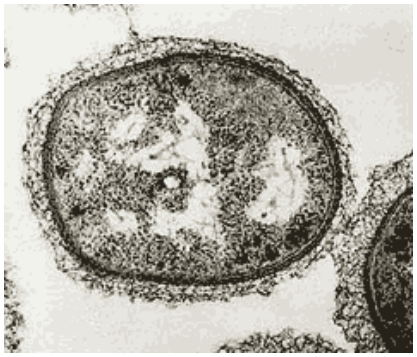
Ação da Lisozima na Parede Celular: Esta enzima, sintetizada por alguns organismos e por glândulas endócrinas do homem, age clivando as ligações do tipo β-1,4, presentes no peptideoglicano. Nas células Gram positivas, o tratamento com lisozima origina *protoplastos* (células sem parede celular), enquanto nas Gram negativas, a lisozima origina *esferoplastos* (células com resquícios de parede celular).

Ação da penicilina na Parede Celular: Este antibiótico impede a ligação dos tetrapeptídeos. A droga se liga irreversivelmente às PBPs, que são proteínas envolvidas no processo de biossíntese do peptideoglicano. Paralelamente, as autolisinas, que atuam em conjunto com a maquinaria de biossíntese, passam a degradar porções do peptideoglicano. Como a síntese está bloqueada, o resultado líquido é a formação de uma parede defeituosa.

Cápsula, Glicocálix e camada limosa **-** A cápsula pode ser definida como uma camada externa à parede celular, geralmente apresentando-se como um material viscoso, fortemente associado à superfície celular, geralmente de natureza polissacarídica e raramente protéica. Por outro lado, o termo camada limosa é algumas vezes definido como uma zona difusa, contendo material pouco organizado, sendo facilmente removida.
A presença da cápsula normalmente confere vantagens às bactérias, pois suas principais funções incluem: ligação às células do hospedeiro, fator de virulência por dificultar a fagocitose e também a proteção, seja aumentando a resistência ao dessecamento, uma vez que armazenam grandes quantidades de água, fonte de nutrientes e proteção contra a infecção por bacteriófagos, ou interação com anticorpos.
Outros microrganismos apresentam cápsula de natureza heteropolimérica - *S. pneumoniae*. Eventualmente, a cápsula pode ser de natureza polipeptídica, como em *B. anthracis* (ácido glutâmico, na forma D).



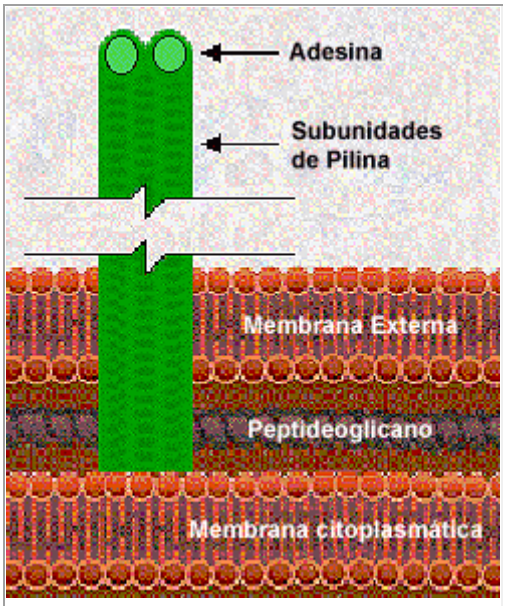
Micrografia óptica, empregando a técnica de coloração negativa, revelando células capsuladas.



Micrografia eletrônica de transmissão, revelando a delgada cápsula circudando a célula

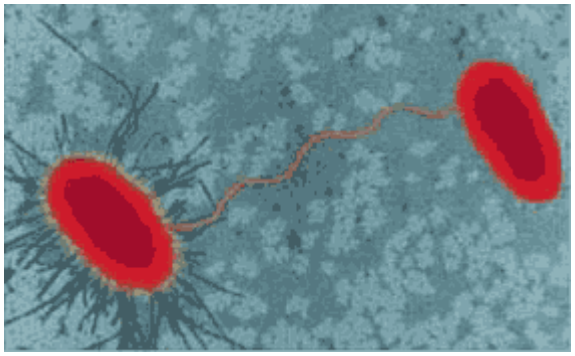
Fímbrias e Pili **-** Muitas bactérias Gram negativas apresentam apêndices finos (3 a 10 nm), retos e curtos, denominados fímbrias. Geralmente estas são bastante numerosas, podendo atingir números de 1000 ou mais por célula. Como são muito pequenas e delgadas, somente podem ser visualizadas pela microscopia eletrônica. As fímbrias s ão de natureza protéica, compostas por subunidades repetitivas de uma proteína denominada genericamente de pilina. As fímbrias possuem, geralmente em sua extremidade, e algumas vezes ao longo da estrutura, proteínas distintas, denominadas *adesinas*, as quais mediam a adesão específica da célula bacteriana a diferentes substratos.

Micrografia eletrônica de varredura de bacilos apresentando fímbrias



Esquema ilustrando a organização estrutural de uma fímbria, assinalando a presença de moléculas do tipo adesina, situadas na extremidade da estrutura

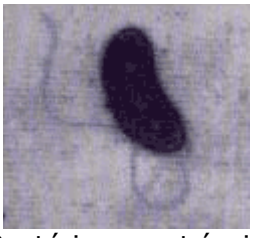
Muitas bactérias podem ainda apresentar outro tipo de apêndice, denominado pilus F ou fímbria sexual, o qual exibe semlhanças estruturais com as fímbrias. No entanto, este tipo de fímbra é normalmente encontrado em um menor número nas células, variando de 1 a 10. O pilus F corresponde a uma estrutura bastante longa e menos rígida que as fímbrias convencionais, estando envolvida no reconhecimento de outras bactérias, em um processo de transferência de genes denominado conjugação.



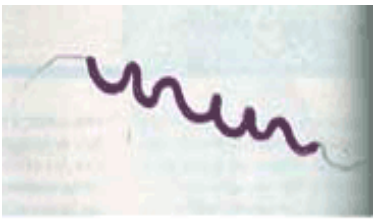
Micrografia eletrônica colorizada, revelando a longa fímbria sexual (pilus F). Observar também a presença de fímbrias.

Atualmente, diferentes tipos diferentes de fímbrias vêm sendo descritos, sendo vários destes associados à adesão, ou à virulência.

Flagelos **-** Estruturas longas, delgadas e relativamente rígidas, apresentando cerca de 20 nm de espessura e 15 a 20 µm de comprimento, responsáveis pela locomoção das bactérias. Devido à sua pequena espessura, os flagelos somente podem ser visualizados por meio de colorações específicas, microscopia de campo escuro, ou por icroscopia eletrônica.
De acordo com o número e distribuição dos flagelos, as bactérias podem ser classificadas como: atríquias (sem flagelos), monotríquias (um único flagelo), anfitríquias (um flagelo em cada extremidade) lofotríquias (um tufo de flagelos em uma, ou ambas as extremidades) e peritríquias (apresentando flagelos ao longo de todo o corpo bacteriano).

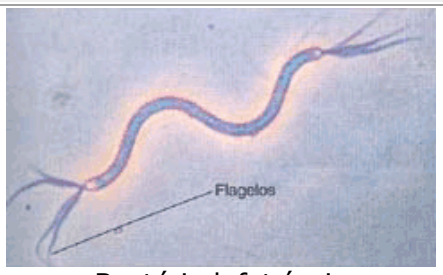


Bactéria monotríquia



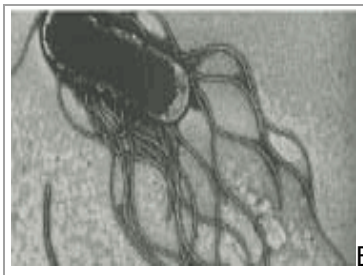
Bactéria anfitríquia

Bactéria lofotríquia



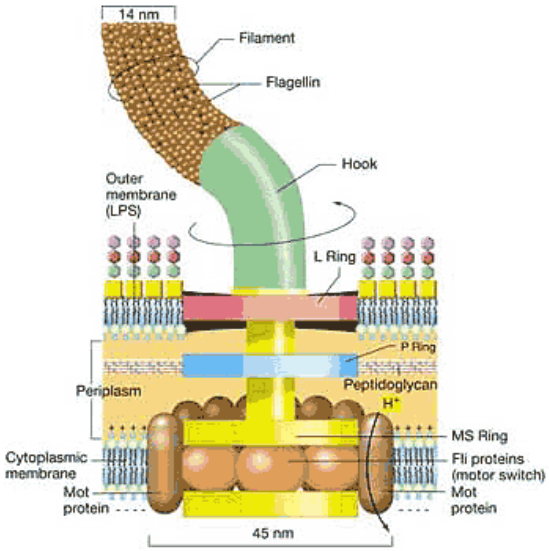
Bactéria lofotríquia

Bactéria peritríquia



Bactéria peritríquia

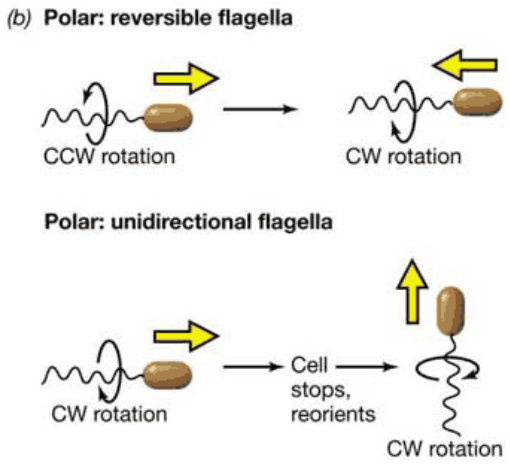
<u>Estrutura</u> **-** Estruturalmente, o flagelo pode ser subdivido em 3 regiões: filamento, corpo basal e gancho, sendo estas duas últimas importantes para a inserção e movimento do filamento. O filamento dos flagelos apresenta estrutura helicoidal, com comprimento de onda constante para cada espécie. Este corresponde a um cilindro longo e oco, composto por unidades repetitivas de uma proteína denominada genericamente de flagelina, que pode variar de 30 a 60 kDa, dependendo do microrganismo. Sua extremidade distal é revestida por uma proteína seladora. Algumas bactérias apresentam bainhas de diferentes naturezas revestindo o filamento, tal como em *Vibrio cholerae*, ou *Bdellovibrio*. O gancho apresenta maior espessura que o filamento, sendo composto por diferentes subunidades protéicas. O corpo basal corresponde à porção mais complexa do flagelo, apresentando 4 anéis ligados a um bastão central em bactérias Gram negativas. Os anéis externos L e P associam-se ao LPS e peptidioglicano, respectivamente, enquanto os anéis S e M estão associados à membrana citoplasmática.



Detalhe ampliado da estrutura de um flagelo de células Gram negativas

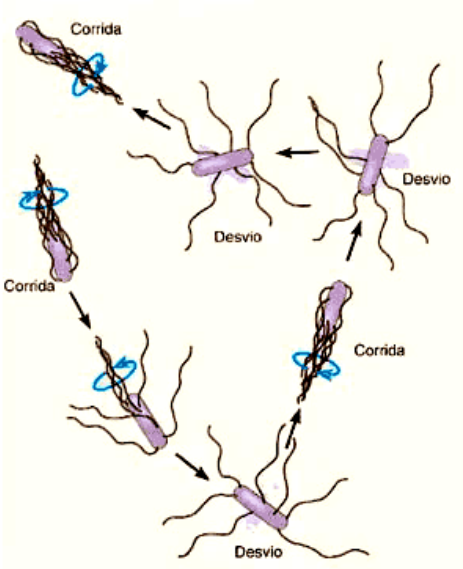
***<u>Síntese flagelar</u>* -** Muitos genes estão envolvidos na síntese do flagelo e na mobilidade celular. Em *E. coli* e *Salmonella* foram identificados mais de 40 genes (*fla*), que codificam proteínas estruturais, de exportação de componentes para o exterior e de regulação de muitos eventos bioquímicos envolvidos na síntese de novos flagelos. A síntese de flagelos é fortemente regulada, tanto por fatores metabólicos como por sinais emitidos durante a divisão celular. Acredita-se que as subunidades de flagelina sejam transportadas ao longo do filamento e se auto - arranjam espontaneamente, quando atingem a ponta.

***<u>Movimentação</u>* -** A movimentação dos flagelos ocorre através de um mecanismo de rotação do filamento, em velocidades que podem atingir até 270 ou 1100 rps, o que permite uma locomoção de até 100 µm/segundo, correspondendo a 100 vezes o seu comprimento/minuto. Os flagelos atuariam de maneira análoga os propulsores de um barco, sendo o sentido da rotação importante para o tipo de movimentação resultante. Em muitas células monotríquias, a rotação no sentido anti-horário promove a movimentação para frente, enquanto a rotação no sentido horário faz com que a célula se locomova no sentido oposto.
Em outras monotríquias, quando o flagelo gira no sentido horário promove a locomoção.



Tipos de movimentação de células monotríquias

No caso de bactérias peritríquias, quando os flagelos giram no sentido anti-horário as células se movem para frente. Estes dobram seus ganchos e seus filamentos se agrupam, formando um feixe, que gira e propele a célula. Quando a rotação ocorre no sentido horário, os flagelos se separam e a bactéria passa a vibrar somente, até que os flagelos voltem a girar no sentido anti-horário, impulsionando novamente a célula para frente.
Para que haja a movimentação, o bastão localizado entre o gancho e o anel M tem a capacidade de rodar livremente na membrana citoplasmática. Acredita-se que o anel S esteja fixo na parede celular, sem a possibilidade de rodar. Os anéis P e L sustentariam o bastão. Há evidências que o corpo basal atuaria como uma estrutura passiva que giraria no interior de um complexo proteíco inserido na membrana, semelhante a um rotor de um motor elétrico, que gira no centro de um anel de eletromagnetos (estator). A energia necessária para a rotação é provida pela força próton motiva. A dissipação do gradiente de prótons cria uma força que gira o flagelo no sentido anti-horário, impelindo o microrganismo. O rotor seria composto pelo bastão central, pelo anel M e por um anel C, ligado ao M através da membrana citoplasmática. Estes anéis são formados por várias proteínas, sendo a FliG bastante importante. No estator, temos as proteínas MotA e MotB, que formam um canal de prótons, sendo que MotB também ancora o complexo ao peptideoglicano.



Esquema ilustrando a movimentação de bactérias peritríquias

<u>Flagelos periplasmáticos</u> **-** Estes flagelos são encontrados apenas nos espiroquetas (sendo muitas vezes denominados de filamentos axiais). Como o próprio nome indica, estes flagelos situam-se no periplasma, localizando-se abaixo da membrana externa destas bactérias. Os flagelos periplasmáticos originam-se a partir dos pólos celulares, voltando-se em direção ao centro da célula, envolvendo a membrana citoplasmática do corpo bacteriano.

Micrografia eletrônica colorizada, revelando os flagelos periplasmáticos (amarelo)	Micrografia eletrônica revelando o flagelo periplasmático, situado abaixo da membrana externa

Referência bibliográfica

*vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/**morfologia1**/**morfologia1**.html*
*vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/**morfologia2**/**morfologia2**.html*