

Unitat 26

Mètodes d'estudi de la cèl·lula.

Cèl·lules procariotes i eucariotes.

La cèl·lula animal i vegetal.

1. Mètodes d'estudi de la cèl·lula
2. Tipus d'organització cel·lular: cèl·lules procariotes i eucariotes.
3. Cèl·lules eucariotes: cèl·lules animals i vegetals.

1. Mètodes d'estudi de la cèl·lula

Des de la segona meitat del segle XVII en què Robert Hooke i Van Leeuwenhoek van realitzar les primeres observacions de cèl·lules al microscopi, s'ha avançat molt en el coneixement de la morfologia i fisiologia cel·lular. Això ha estat possible gràcies al desenvolupament d'una sèrie de mètodes de treball cada cop més precisos i específics.

Estudis morfològics: microscòpia òptica i electrònica

La major part de les cèl·lules només es poden veure amb l'ajut d'un microscopi. Per això, el coneixement de la cèl·lula va començar amb la microscòpia òptica, la qual encara avui dia, conjuntament amb la microscòpia electrònica, és un instrument essencial.

En el microscopi òptic, l'augment de la mostra s'aconsegueix usant un sistema de lents que manipula el pas dels raigs de llum entre la mostra i els ulls. El microscopi electrònic usa un raig d'electrons controlat per un camp magnètic.

Microscopi òptic

El microscopi òptic consta d'una part òptica i d'una part mecànica (que serveix de suport de la part òptica).

Les lents d'un microscopi òptic són el *condensador*, l'*objectiu* i l'*ocular*. La llum que entra ha de concentrar-se sobre la preparació i per això s'usa el condensador. Un cop la llum travessa la mostra passa a l'objectiu. L'objectiu és la lent situada més prop de la mostra. L'augment primari produït per l'objectiu i la imatge invertida es transmeten a l'ocular, on es realitza l'augment final.

Els microscopis més comunament usats solen estar equipats amb diversos objectius de diferents augments (x5, x10, x40, així com l'objectiu d'immersió). Aquests objectius estan muntats sobre una peça anomenada revòlver que pot girar per tal d'alinejar l'objectiu desitjat amb el condensador.

La imatge formada per l'objectiu és finalment augmentada per l'ocular. L'augment total d'un microscopi compost és el producte de l'augment del seu objectiu per l'augment produït pel seu ocular. Aquests microscopis generalment aconseguen augments de 1000 cops el tamany original de la mostra, podent inclús arribar als 2000 cops. El microscopi compost és capaç d'aconseguir augments molt més grans que el construït amb una sola lent (microscopi simple). Aquest últim s'usa principalment com a lupa d'augment.

El perfeccionament del microscopi òptic té com a límit, l'anomenat *poder de resolució*, és a dir, la distància mínima a la qual poden estar dos punts perquè se'ls vegi separats. Aquest límit depèn de la *longitud d'ona* de la llum amb que s'il·lumina la mostra i de l'*obertura numèrica* (una propietat òptica de la lent). Per als microscopis òptics que treballen amb la llum visible, la resolució màxima que es pot obtenir és de 0,2 μm (500 vegades superior al poder de resolució de l'ull humà que és de 100 μm)

L'observació de cèl·lules i teixits al microscopi òptic requereix que les mostres es deixin travessar per la llum, cosa que obliga a la realització de talls prims. A més per examinar els orgànuls cel·lulars, cal que existeixi un contrast òptic entre ells, cosa que s'aconsegueix

mitjançant l'ús de colorants. Cal tenir en compte que la microscòpia depèn tant del rendiment del mateix microscopi com de les tècniques per a la preparació de les mostres.

En microscòpia òptica es fan servir diferents tipus de microscopis, cadascun amb unes característiques pròpies que els fan més adequats per a determinades observacions:

- Microscopi de camp clar
- Microscopi de camp fosc
- Microscopi de fluorescència
- Microscopi de contrast de fases
- Microscopi de contrast de fases interferencial

La manipulació de les mostres en la microscòpia òptica

Tot i que es possible observar cèl·lules vives sense sotmetre-les a cap tipus de manipulació, mantenint-les durant l'estudi en un medi adient, la major part de les cèl·lules no tractades són invisibles al microscopi òptic convencional.

Una manera de fer-les visible consisteix en sotmetre-les a una **tinció** amb colorants. Els colorants es fixen selectivament sobre les diferents estructures i orgànuls cel·lulars. Entre els colorants més usats podem citar: blau de metilè (bàsic), violeta de genciana, hematoxilina (bàsic), eosina (àcid), picrofucsina (àcid), fucsina bàsica, solució de lugol (per veure granuls de midó), safranina, verd de malaquita, etc.

Abans de tenyir-se però, la majoria dels teixits biològics han de fixar-se. La **fixació** permeabilitza les cèl·lules als colorants. Els fixadors són productes químics capaços de penetrar ràpidament en les cèl·lules sense alterar morfològicament les seves estructures. Podem citar entre les més usats el formaldehid o formol, l'etanol i l'àcid acètic. Un agent físic que també es fa servir sovint com a fixador és la calor.

La fixació i la tinció no són els únics preparatius que s'utilitzen en microscòpia. La majoria de teixits són massa gruixuts per què les seves cèl·lules siguin observades directament a gran augment. Aquests teixits ha de ser tallats en fines seccions, cadascuna de les quals es dipositada després sobre la superfície d'un portaobjectes. Els talls s'obtenen amb un **micròtom**. Atès que generalment els teixits són tous i fràgils, no poden ser tallats directament, amb la qual cosa abans de l'obtenció dels talls cal **incloure'ls** en un medi per endurir-los. El medi més usat és la parafina. En alguns casos la mostra s'endureix per congelació i es talla amb un micròtom especial.

Moltes vegades alguns dels components de la cèl·lula es perden o queden alterats durant la fixació i la tinció. Actualment existeixen microscopis òptics especials que permeten visualitzar estructures en cèl·lules vives sense necessitat de cap tipus de manipulació. Es tracta del microscopi de contrast de fases, el microscopi de contrast de fases interferencial i el microscopi de camp fosc. Un dels principals avantatges d'aquests microscopis es que podem observar les cèl·lules en acció i estudiar els moviments intracel·lulars que es produeixen en processos com la mitosi.

Microscòpia electrònica

Els microscopis electrònics utilitzen feixos d'electrons en lloc de raigs de llum. La longitud d'ona dels feixos d'electrons és molt més curta que la de la llum visible, amb la qual cosa, aquests microscopis aconseguen una resolució per als objectes biològics de 2nm, o sigui, unes 100 vegades major que la resolució del microscopi òptic. Els augments aconseguits poden arribar a ser d'un milió de cops el tamany de la mostra original.

Microscopi electrònic de transmissió (MET)

És, a grans trets, similar al microscopi òptic, però molt més gran i invertit. Està format per una columna o tub en què es fa el buit i que té un filament o càtode en la seva part superior que emet electrons. Aquests són concentrats sobre el pla on es disposa la mostra mitjançant uns electroimants situats a intervals al llarg de la columna, que fan igual que el condensador en un microscopi òptic. Després el feix d'electrons passa a través de la mostra i, a continuació, dos electroimants que funcionen com a lents donen una imatge engrandida de l'objecte. Alguns dels electrons que arriben a la mostra són dispersats, d'acord amb la densitat del material, i els restants són focalitzats formant la imatge que es projecta per ser observada sobre una placa fotogràfica o sobre una pantalla fluorescent. Com que els electrons dispersats no apareixen en la imatge, les regions més denses de la mostra apareixen fosques i les menys denses o transparents als electrons són de color brillant.

A causa de la naturalesa d'aquest instrument, sols es poden examinar materials molt prims, inclús un bacteri és massa gros per ser observat directament. Per preparar mostres per al microscopi electrònic es necessiten tècniques especials de tall ultrafins. Els materials han de ser primer **fixats** i **deshidratats** (etanol o acetona), després cal **incloure'ls** en resines dures i és en aquest moment quan es realitzen talls ultrafins amb un **ultramicrotòtom**, equipat generalment amb una ganiveta de diamant. Una sola cèl·lula bacteriana pot amb aquets microtòtom especial tallar-se amb 5 o 6 seccions molt fines.

Les seccions ultrafines obtingudes són talls bidimensionals d'un teixit i no donen idea de la disposició tridimensional dels components cel·lulars. Tot i que la tercera dimensió pot ser reconstruïda a partir de centenars de seccions seriades, el procés és llarg i meticulós. Afortunadament existeixen maneres més directes d'obtenir imatges tridimensionals. Una d'elles consisteix en examinar la mostra amb un microscopi d'escombratge.

Microscopi electrònic d'escombratge (d'exploració o de reflexió)

En aquest microscopi el feix d'electrons es reflecteix sobre la superfície de la mostra en lloc de travessar-la. Prèviament la mostra s'ha de fixar i secar, i després recobrir amb una fina cap de metall pesant, com l'or (no es necessari fer talls fins). Un feix d'electrons és dirigit cap a la preparació. Quan els electrons xoquen amb la mostra es produeixen uns electrons "secundaris" sobre la superfície metal·litzada, i aquests són detectats i convertits en imatge sobre una pantalla de televisió. Les imatges així obtingudes donen una aparença tridimensional del material observat.

La resolució que es pot obtenir amb aquest microscopi és inferior que amb el microscopi de transmissió (10 nm, amb un augment de fins a uns 20.000 cops), tot i així es molt utilitzat en biologia cel·lular perquè permet apreciar millor textures i estructures en tres dimensions.

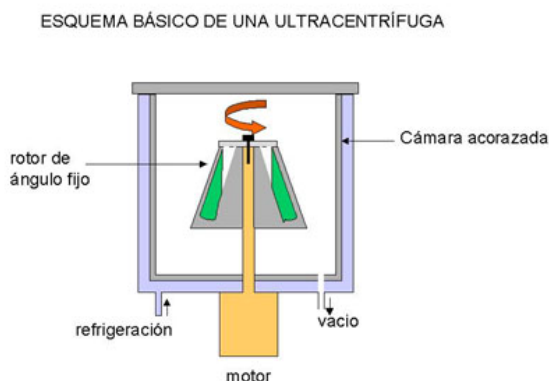
Estudi bioquímic de la cèl·lula

Si bé mitjançant la microscòpia es pot determinar la disposició dels orgànuls i dels grans agregats macromoleculars en cèl·lules i teixits, i inclús es pot localitzar molècules específiques usant procediments específics de tinció, la comprensió detallada d'una cèl·lula requereix l'anàlisi bioquímic. Els anàlisis bioquímics solen implicar la desorganització de la cèl·lula i la destrucció de la seva anatomia.

Fraccionament cel·lular

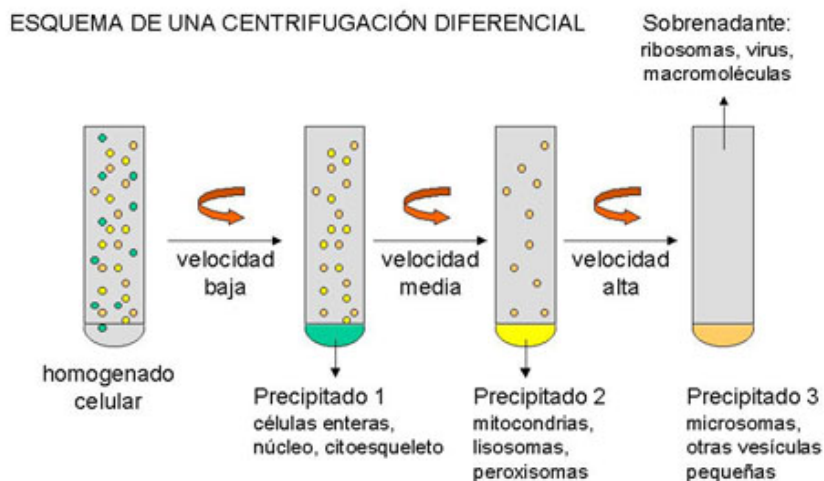
Es tracta d'un mètode d'aïllament i separació dels orgànuls cel·lulars, amb l'objectiu d'estudiar-los després independentment. Per això es segueixen els passos següents:

Es realitza un **homogeneïtzat** del teixit que cal estudiar mitjançant tractaments químics o físics que trenquen les cèl·lules, com per exemple, el xoc osmòtic, la trituració, l'aplicació d'ultrasons o l'ús de detergents. Aquest procés s'ha de fer amb suavitat amb el fi que es trenquin les membranes cel·lulars però quedin intactes els orgànuls. Obtenim d'aquesta manera un homogeneïtzat que conté cèl·lules senceres, nuclis sencers, orgànuls diversos com mitocondris, lisosomes, peroxisomes, etc. L'homogeneïtzat es dissol en una solució salina o de sacarosa.



A continuació, se separen els diferents components en funció de la seva densitat, mitjançant una **ultracentrífuga**. Primer l'homogeneïtzat es sotmet a centrifugació a baixa velocitat, i queden les parts més denses (cèl·lules senceres, nuclis, etc) en el precipitat i els menys denses en el sobrenadant (mitocondris, ribosomes, etc). El sobrenadant es decanta per ser sotmès de nou a centrifugació a major velocitat i, així, successivament anar obtenint una sèrie de fraccions en els diversos precipitats, que contenen els diferents constituents cel·lulars.

Per saber quins orgànuls té cada precipitat, s'utilitza el microscopi electrònic.



Marcadors radioactius. Autoradiografia

Si s'introdueix en una cèl·lula un compost que s'hagi marcat prèviament amb un isòtop radioactiu, es pot seguir el pas a través dels orgànuls cel·lulars i estudiar les funcions. La radiació que emeten els nuclis d'aquests àtoms permet detectar la molècula marcada i seguir-ne els moviments. Entre els isòtops radioactius més emprats en biologia hi ha el ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{45}Ca i ^{35}S .

L'**autoradiografia** es fa servir per a localitzar les substàncies marcades radioactivament en seccions de cèl·lules senceres o teixits.

El procés consisteix en el següent: les cèl·lules vives s'exposen durant un període de temps, generalment breu, a un compost radioactiu, transcorregut el qual, aquest compost s'elimina del medi. Les cèl·lules així marcades es fixen sobre un portaobjectes, es recobreixen amb una fina capa d'una emulsió fotogràfica i es deixen en la foscor uns dies, després del quals es revela l'emulsió i s'observa al microscopi. La radioactivitat emesa impressiona la placa fotogràfica, per la qual cosa en revelar la pel·lícula apareixen taques fosques que determinen la posició de la substància marcada.

Per exemple, exposant cèl·lules amb un precursor radioactiu d'ADN (*timidina* marcada amb ^3H), s'observa que l'ADN es forma en el nucli i roman en ell. En canvi, el marcatge de les cèl·lules amb un precursor de l'ARN (*uridina* marcada amb ^3H), revela que l'ARN és forma inicialment en el nucli però després s'acumula ràpidament en el citoplasma cel·lular.

Cultiu cel·lular

La majoria de les cèl·lules sobreviuen, es divideixen, i fins i tot, es diferencien en un medi de cultiu en condicions adequades. Després, les cèl·lules es poden utilitzar per a visualitzar-les al microscopi o per a analitzar-les bioquímicament.

L'interès pel cultiu de cèl·lules i teixits és extraordinari a causa de les seves aplicacions en el camp de la biologia experimental, en medicina, en agricultura, etc. El cultiu de cèl·lules i teixits han permès conèixer el procés de la mitosi, els moviments cel·lulars, la resposta de la cèl·lula a les substàncies tòxiques, bacteris, virus, etc. També es poden estudiar els efectes de l'addició o eliminació al medi de cultiu de molècules específiques tals com hormones o factors de creixement.

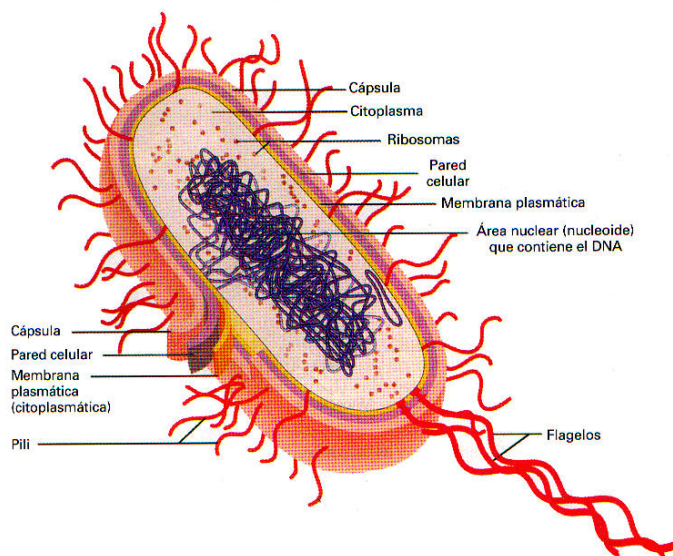
2. Tipus d'organització cel·lular: cèl·lules procariotes i eucariotes

Entre els éssers vius hi ha dos tipus d'organització cel·lular: l'organització procariota i l'organització eucariota.

L'organització típica de les cèl·lules més senzilles i primitives és la procariota. Són cèl·lules molt petites, el seu tamany mitjà és d'1 a 10 μ m. La seva principal característica és posseir el material genètic dispers pel citoplasma, sense estar envoltat per una membrana, és a dir, no tenen nucli. El seu material genètic està constituït per una única molècula d'ADN bicatenari, circular i no associada amb histones. Tampoc tenen orgànuls cel·lulars, només ribosomes (70S).

Els éssers vius amb cèl·lules procariotes són organismes unicel·lulars tals com els bacteris, els cianobacteris, els micoplasmes i les rickètsies, tots ells del regne monera.

Altres característiques: metabolisme aeròbic i anaeròbic, parets cel·lulars de peptidoglicà, divisió cel·lular per fissió binària i locomoció per flagels.



Les cèl·lules eucariotes són més grans i més complexes que les procariotes. La seva mida mitjana se situa entre 10 i 100 μ m. El seu material genètic està dins d'un nucli, encerclat per un embolcall. Consta de dos o més molècules d'ADN bicatenari, lineal, molt llarg i associat a histones, organitzat en cromosomes. El citoplasma conté diversos orgànuls i sistemes de membranes com els ribosomes(80S), els mitocondris, els cloroplasts, el reticle endoplasmàtic, etc. que divideixen el citoplasma en compartiments. El metabolisme dels organismes eucariotes és aeròbic. La divisió cel·lular té lloc per mitosis (o meiosis) i la locomoció cel·lular és per cilis o flagels.

L'organització eucariota és pròpia dels organismes pluricel·lulars (animals, plantes, fongs i algues) així com de molts unicel·lulars (protozous, algues unicel·lulars i fongs unicel·lulars). Tots ells inclosos en els regnes protocista, fongí, vegetal i animal.

3. Cèl·lules eucariotes: cèl·lules animals i vegetals

En una cèl·lula eucariota podem distingir tres parts fonamentals: membrana, citoplasma i nucli.

La **membrana plasmàtica** és una capa contínua que envolta la cèl·lula i li confereix la seva individualitat en separar-la del seu entorn. Controla l'intercanvi de substàncies entre la cèl·lula i el medi. Està formada per una bicapa lipídica en què estan immèrgides diferents proteïnes. Algunes cèl·lules animals posseeixen per damunt de la membrana plasmàtica una coberta de radicals glucídics de les glicoproteïnes i dels glicolípidis de la mateixa membrana, que formen una matriu extracel·lular o **glicocalze**. Les cèl·lules vegetals tenen una paret gruixuda de cel·lulosa que cobreix, protegeix i dona forma a les cèl·lules. La **paret cel·lular** està formada principalment per cel·lulosa. De vegades la cel·lulosa s'impregna d'altres substàncies i la paret augmenta la seva rígidesa o impermeabilitat. Permet que les cèl·lules vegetals puguin viure en el medi hipotònic de la planta.

El **citoplasma** és la part de la cèl·lula que està compresa entre la membrana plasmàtica i la membrana nuclear. Està format per un medi aquós, el **citosol**, en el qual estan immersos un gran nombre d'òrgànuls. El citosol conté, també, una gran varietat de filaments proteics que li proporcionen una estructura interna complexa; el conjunt d'aquests filaments constitueix el **citoesquelet**. El citoesquelet està involucrat en la forma, el moviment i en la divisió cel·lular.

El **nucli** és l'òrgànul més voluminós de la cèl·lula i, a més, es pot dir que és un òrgànul director ja que conté la majoria de l'ADN cel·lular. Sol ocupar una posició central en la cèl·lula, encara que moltes d'elles el tenen desplaçat cap a un costat del citoplasma. A l'interior del nucli es troben els nuclèols i la cromatina, tota una matriu de ADN associada a histones que durant el procés de la divisió cel·lular es condensa i dona lloc als cromosomes.

Els òrgànuls citoplasmàtics són els següents: ribosomes, reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi, lisosomes, vacúols, peroxisomes, mitocondris, cloroplasts i centríols.

Segons el tipus de nutrició, les cèl·lules eucariotes poden ser *autòtrofes*, com és el cas de les plantes i de les algues, i *heteròtrofes* com els animals, els protozous i els fongs. Les cèl·lules vegetals posseeixen cloroplasts, grans vacúols i una paret cel·lular per damunt de la membrana plasmàtica. Les cèl·lules animals posseeixen centríols. La resta d'òrgànuls són comuns a ambdues cèl·lules.

Els **ribosomes** són petits òrgànuls globulars, constituïts per dues subunitats, una major (65S) i una menor (40S), formats per ARN i proteïnes. Es poden trobar lliures pel citosol o units a les membranes del RE. La seva funció és la síntesi de proteïnes.

El **reticle endoplasmàtic** està format per una xarxa complexa de membranes interconnectades que formen sàculs aplanats i túbuls que s'estenen per tot el citoplasma. El RE pot ser rugós (si porta adherits ribosomes en la cara externa de la seva membrana) o llis. La seva funció està relacionada amb la síntesi i el transport de lípids i proteïnes de molts òrgànuls i, també, de les proteïnes que són segregades a l'exterior.

L'**aparell de Golgi** està format per un conjunt de cisternes, limitades per membrana, aplanades i apilades de les quals es desprenen per gemmació petites vesícules carregades de substàncies. Està situat prop del nucli, i en les cèl·lules animals, envolta el centríol. Intervé en la secreció

cel·lular i en la formació, a partir de vesícules, d'òrgànuls cel·lulars, tals com lisosomes i vacúols.

Els **lisosomes** són vesícules que contenen enzims digestius. S'encarreguen de digerir substàncies alimentàries i òrgànuls cel·lulars danyats.

Els **vacúols** són grans vesícules membranoses que poden arribar a ocupar fins al 90% del volum cel·lular. Són característics de les cèl·lules vegetals. Emmagatzemen una gran varietat de substàncies (substàncies de reserva, productes de rebuig, pigments, etc.) A vegades funcionen com a lisosomes. Intervenien en els processos osmòtics de la cèl·lula.

Els **peroxisomes** són vesícules que contenen enzims oxidatius, el més abundant és la catalasa. Aquests enzims utilitzen el peròxid d'hidrogen, obtingut per l'oxidació de diferents substrats per oxidar-ne d'altres i així impedir l'acumulació perillosa H_2O_2 , que pot arribar a ser tòxica per a la cèl·lula.

Els **mitocondris** són òrgànuls energètics presents en totes les cèl·lules eucariotes. Estan envoltats per dues membranes, la cavitat interna es denomina matriu i conté molts enzims, ADN, ARN i ribosomes. Hi té lloc la respiració cel·lular, procés que consisteix en l'oxidació de la matèria orgànica per obtenir energia mitjançant la qual les cèl·lules porten a terme totes les seves funcions.

Els **cloroplasts** són òrgànuls energètics exclusius de les cèl·lules vegetals. Estan envoltats per dues membranes concèntriques. L'espai intern, anomenat estroma, conté un medi aquós amb nombrosos enzims, ADN, ARN i ribosomes, també contenen uns sacs membranosos, els tilacoides, on s'hi localitza la clorofil·la. Són els encarregats de realitzar la fotosíntesi, procés mitjançant el qual l'energia de la llum, absorbida per la clorofil·la, s'utilitza per transformar la matèria inorgànica en matèria orgànica.

Els **centríols**, exclusius de les cèl·lules animals, són dos òrgànuls cilíndrics que organitzen el citoesquelet i intervenen en la forma i el moviment de les cèl·lules, així com en la divisió cel·lular.

