

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA

APLICAÇÃO DE RESULTADOS DE PESQUISA EM FAGOCITOSE NO ENSINO DE  
BIOLOGIA CELULAR: DA PRÁTICA À CONSTRUÇÃO DE MÍDIAS EDUCACIONAIS

CURITIBA

2012

ANA CLARA SANS SALOMÃO BRUNOW VENTURA

APLICAÇÃO DE RESULTADOS DE PESQUISA SOBRE FAGOCITOSE NO ENSINO DE  
BIOLOGIA CELULAR: DA PRÁTICA À CONSTRUÇÃO DE MÍDIAS EDUCACIONAIS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ruth Janice Schadeck

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira

CURITIBA

2012

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe e ao meu pai, por seu amor, apoio, compreensão e incentivo contínuos; também por serem o meu maior e melhor exemplo.

À minha irmã, por ser a minha companheira de vida.

Ao Henrique, pela sua paciência, ajuda e amor.

Às minhas duas filhas, Sofia e Alice, os amores do minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ruth Janice Schadeck, por seus ensinamentos e sua dedicação.

Ao Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias, em especial à Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira e à Prof. Dra. Dorly de Freitas Buchi, pelo apoio e disponibilidade de materiais.

À banca de defesa da dissertação, Profa. Dra. Odissea Boaventura de Oliveira e Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, por suas valiosas contribuições.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

“Em um mundo de transformações tão rápidas, talvez ensinar como aprender seja mais importante do que ensinar conteúdos específicos.”

Lawrence Summers

## RESUMO

Nas últimas décadas houve um fantástico avanço da ciência e inúmeros processos celulares foram descritos. Isso gerou, para os educadores, o desafio de criar condições de aprendizagem para que seus alunos construíssem novos conhecimentos em um tempo relativamente curto. Para que ocorra a compreensão dos eventos celulares é necessário, contudo, que se realize a representação mental das estruturas da célula, cada qual ocupando posições definidas no espaço e interagindo entre si. Dessa forma, tornaram-se necessárias metodologias de ensino que possibilitassem representações mentais, promovessem a curiosidade e despertassem a motivação. Neste contexto, as tecnologias de informação e comunicação, tais como as multimídias educativas, são recursos poderosos para tornar o processo de ensino-aprendizagem mais eficiente. Estes artefatos permitem a conversão de um conceito abstrato em um objeto visual específico, esclarecendo processos celulares dinâmicos e possibilitando a interatividade. Em todo o mundo, multimídias vêm sendo utilizadas para promover a aprendizagem. Entretanto, no Brasil são poucos os que atuam no desenvolvimento de novas tecnologias para a educação em biologia celular. Sendo assim, este trabalho visa descrever o emprego de metodologias e resultados de pesquisa relacionados ao ensino e construir material didático virtual a partir dos mesmos. Para isso, foram selecionados e editados resultados de pesquisas prévias sobre fagocitose por macrófagos, resultantes das técnicas de DIC e microscopia de luz sem coloração alguma, reação citoquímica para detecção da fosfatase ácida, coloração Giemsa e captura do vermelho neutro. Além disso, foram realizados também novos experimentos envolvendo microscopia eletrônica de transmissão (MET) para elucidação de detalhes observados na microscopia de luz. Nesse, foram caracterizadas ultraestruturalmente as primeiras fases da internalização de leveduras por macrófagos. Para tanto, macrófagos peritoneais de camundongo foram cultivados *in vitro*, incubados com *Saccharomyces cerevisiae* e processados para análise de suas estruturas em MET. Os resultados obtidos através das eletronicografias corroboraram os resultados das pesquisas prévias em microscopia de luz, que então foram utilizados para a criação do material didático virtual interativo, dos vídeos e das animações.

## ABSTRACT

In the past few years several cellular mechanisms were described, resulting in scientific development, but also in the challenge of create learning conditions to students, who need to comprehend facts in a short time. Therefore, new teaching methodologies, promoting mental representations of cellular structures and, subsequently, of their functions, become essential to the learning process. Communication and Information Technologies, as multimedias, can be powerful resources to promote learning. They allow the conversion of an abstract concept into a specific visual object, clarifying dynamic cellular events, besides might as well offer interactivity. All around the world, educational multimedias are being used, however, in Brazil, few are the cellular biology researchers who dedicate studies for the development of these learning technologies. Hence, this work aims to describe the use of methodologies and research results for learning purposes and to create a virtual multimedia based on them. To achieve these objectives, research results concerning phagocytosis accomplished by DIC, light microscopy without staining, ACPase detection, Giemsa staining and neutral red uptake were selected. TEM experiments were also made, to elucidate details observed by light microscopy techniques. TEM protocols consisted of the cultivation *in vitro* and incubation of mice peritoneal macrophages mice and *S. cerevisiae*. These cells were processed so their structures could be analised in a transmission electron microscope. The results obtained were in concordance with the previous results examined, therefore, a virtual interactive educational multimedia were created based on phagocytosis images, videos and animations.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O ENSINO DE BIOLOGIA CELULAR E AS TECNOLOGIAS DE INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO (TICs)</b> .....	8
1.1 ENSINO DE BIOLOGIA CELULAR NO BRASIL E NO MUNDO: ALGUMAS VISÕES ...	8
1.2 TECNOLOGIAS DA INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO E A APRENDIZAGEM .....	11
1.3 TICs E A APRENDIZAGEM EM BIOLOGIA CELULAR .....	14
1.4 ENSINO X PESQUISA .....	16
1.5 O USO DOS RESULTADOS DE PESQUISA SOBRE FAGOCITOSE ACOPLADOS ÀS TICs PARA A APRENDIZAGEM EM BIOLOGIA CELULAR .....	18
<b>CAPÍTULO 2 – O PROCESSO DE FAGOCITOSE</b> .....	19
2.1 FAGOCITOSE .....	19
2.1.1 <i>Macrófago como modelo para o ensino da fagocitose</i> .....	21
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
4.1 OBJETIVO GERAL .....	23
4.2 METAS .....	23
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
5.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS RESULTADOS COM POTENCIAL DIDÁTICO .....	23
5.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA AMPARAR A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PRÉVIOS UTILIZADOS .....	24
5.2.1 <i>Animais</i> .....	24
5.2.2 <i>Coleta de células</i> .....	25
5.2.3 <i>Cultivo de células</i> .....	25
5.2.4 <i>Incubação dos macrófagos com Saccharomyces cerevisae</i> .....	25
5.2.5 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> .....	25
5.2.6 <i>Seleção e edição de vídeos didáticos</i> .....	26
5.3 FOTOGRAFIA DE EXPERIMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DA ANIMAÇÃO .....	26
5.4 DESENVOLVIMENTO DA MULTIMÍDIA .....	27
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
6.1 SELEÇÃO DOS RESULTADOS COM POTENCIAL DIDÁTICO .....	27
6.1.1 <i>Aplicação dos resultados de pesquisa através da experimentação em laboratório didático</i> .....	28
6.2 COMPREENDENDO A FAGOCITOSE ATRAVÉS DE DIC E MICROSCOPIA DE LUZ	29
6.2.1 <i>Adesão e receptores</i> .....	31

6.2.2 <i>Internalização</i> .....	33
6.2.3 <i>Remodelagem de membranas e fontes de membranas dos fagossomos</i> .....	33
6.2.4 <i>Formação de pseudópodos, internalização e citoesqueleto</i> .....	34
6.2.5 <i>Movimentação dos fagossomos no citoplasma</i> .....	35
6.2.6 <i>Maturação e digestão</i> .....	36
6.3 <b>COMPREENDENDO A FAGOCITOSE ATRAVÉS DA COLORAÇÃO GIEMSA</b> .....	36
6.3.1 <i>Adesão</i> .....	36
6.3.2 <i>Internalização</i> .....	38
6.3.3 <i>Receptores e maturação dos fagossomos</i> .....	39
6.4 <b>COMPREENDENDO A ACIDIFICAÇÃO DO FAGOSSOMO ATRAVÉS DA CAPTURA DO VERMELHO NEUTRO</b> .....	41
6.5 <b>COMPREENDENDO A PRESENÇA DE ENZIMAS NO FAGOLISSOMO</b> .....	45
6.6 <b>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)</b> .....	49
6.7 <b>MULTIMÍDIA VIRTUAL INTERATIVA</b> .....	52
6.7.2 <i>Resultados obtidos com DIC</i> .....	55
6.7.3 <i>Resultados obtidos com a coloração Giemsa</i> .....	58
6.7.4 <i>Resultados obtidos com a captura do vermelho neutro</i> .....	58
6.7.5 <i>Resultados obtidos com a citoquímica para fosfatase ácidas</i> .....	58
6.7.6 <i>Considerações gerais</i> .....	59
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## **INTRODUÇÃO**

Com o avanço do conhecimento acerca de células e funções celulares, novas metodologias de ensino estão sendo requisitadas para tornar o processo de ensino-aprendizagem mais eficiente. Considerando que a nossa sociedade está imersa em tecnologias de informação e comunicação, a produção de multimídias que propiciem a compreensão de um fenômeno biológico, aproveitando resultados e metodologias de pesquisa para aplicação na educação, é uma alternativa válida de ensino. Pode-se ressaltar ainda a importância do macrófago para a defesa do organismo e o fato de a fagocitose ser um assunto essencial para as profissões da área da saúde e das ciências biológicas, o que torna válida a construção de materiais didáticos virtuais, sobre a fagocitose em macrófagos, a partir de resultados de pesquisa, que possam ser aplicados através de diferentes métodos no ensino de graduação. Para tanto, houve a seleção e análise de resultados de pesquisa com potencial didático sobre o tema fagocitose, a realização do protocolo de microscopia eletrônica de transmissão para esclarecer detalhes ultraestruturais dos resultados previamente observados, a construção de filmes e animações, e por fim, desenvolveu-se uma multimídia virtual interativa baseada em resultados de experimentos laboratoriais, mesclando imagens estáticas, vídeos e animações.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O ENSINO DE BIOLOGIA CELULAR E AS TECNOLOGIAS DE INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO (TICs)**

A necessidade de inovações no ensino de biologia celular é amplamente reconhecida. Sendo assim, novas metodologias de ensino têm sido pesquisadas e sugeridas. Uma destas metodologias, de grande potencial, é o uso das tecnologias de informação e comunicação, mais especificamente, das multimídias, que combinam modelos pictoriais e verbais, sendo ideais para o ensino científico. Sobre o tema fagocitose, inclusive, raros são os materiais desenvolvidos. Portanto, a criação de uma multimídia sobre este tema, a partir de resultados de pesquisa, supriria esta falta, além de que integraria pesquisa e ensino, duas funções igualmente importantes e mutuamente benéficas, essenciais para o crescimento da biologia celular.

### **1.1 ENSINO DE BIOLOGIA CELULAR NO BRASIL E NO MUNDO: ALGUMAS VISÕES**

O Programa Internacional de Avaliação de Estudantes (PISA) de 2009, que avalia conhecimentos e pensamentos críticos em matemática, leitura e ciências na educação

básica, revela dados preocupantes sobre a educação básica brasileira. O Brasil ficou na 53ª colocação, entre mais de 65 países participantes, apresentando resultados comparáveis a países como Trinidad e Tobago, Colômbia, Argentina, Tunísia e Cazaquistão. Pesquisas científicas, mais especificamente no campo da educação em biologia celular, apontam que estudantes brasileiros que recém terminaram o ensino médio não estão familiarizados com imagens reais de células ou com a sua visualização através do microscópio (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2004). Esses estudos sugerem que seu pouco e fragmentado conhecimento sobre estrutura celular vem principalmente da visualização de ilustrações, o que dificulta a compreensão a respeito da relação existente entre morfologia e função celular (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2004).

Quando os dados provenientes da educação básica revelam tantas dificuldades, a educação a nível superior deve superar-se, a fim de compensar os desafios herdados (SAVKAR E LOKERE, 2010). Da mesma forma, dados como os provenientes de testes avaliatórios para entrada na pós-graduação da Fundação Osvaldo Cruz, demonstram não só conhecimento deficiente dos graduados na área biológica, mas também dificuldades em resolver problemas, ler, compreender e criticar resultados de artigos (GRINSZPAN E ARAÚJO-JORGE, 2000), sugerindo deficiências também na educação universitária brasileira. Isso acontece igualmente em nível mundial. Um bom exemplo está na publicação que mostra que somente 13% dos alunos que participaram do *European Molecular Biology Organization (EMBO) Receptor Mechanisms and Signal Transduction* passaram em um teste de conhecimentos realizado ao início do curso (KRAMER E THOMAS, 2006).

A necessidade de mudanças no ensino de biologia celular é reconhecida no mundo todo. Novas metodologias de ensino têm sido pesquisadas e sugeridas, embora as tradicionais aulas expositivas continuem sendo o método mais empregado (DICARLO, 2006; SENGER *et al.*, 2012). Jo Handelsman, professora do departamento de biologia celular, molecular e do desenvolvimento em Yale que recentemente recebeu o *Presidential Award for Science Mentoring*, postula que a utilização de somente palestras e aulas expositivas torna o ensino ineficiente. Esses métodos ajudam o estudante a coletar conceitos, mas são os menos eficazes em despertar a motivação dos estudantes (FISHER, 2011). Além disso, essa metodologia favorece uma atitude dependente por parte do discente (GRINSZPAN E ARAÚJO-JORGE, 2000), eliminando habilidades de questionamento e pensamentos de alto nível, críticos para o seu sucesso na área de pesquisa (KLIONSKY E KUMAR, 2006). Como resultado desta metodologia de ensino, na qual o aluno é passivo na construção de seu conhecimento, surgem alguns obstáculos à aprendizagem, tais como a dificuldade em o estudante integrar ideias científicas estudadas ao seu cotidiano (SENGER *et al.*, 2012) e

compreender processos celulares e moleculares dinâmicos e sistemas em diferentes níveis de organização (JENKINSON E MCGILL, 2011).

No entanto, aos poucos, outras estratégias de ensino têm sido empregadas para explicar os processos biológicos (MCCLEAN *et al.*, 2005; DICARLO, 2006). Por exemplo, a utilização de tecnologias que enriquecem as clássicas aulas expositivas em disciplinas universitárias têm aumentado (RICHMOND *et al.*, 2010; SENGER *et al.*, 2012). Isso também se verifica na disciplina de Biologia Celular oferecida pela UFPR. Além disso, em algumas situações, os estudantes têm a possibilidade de trabalhar os conteúdos em ambientes virtuais de aprendizagem, no seu ritmo e a partir de qualquer lugar equipado com internet. Por exemplo, alguns cursos presenciais se acessoram da Plataforma Moodle ou de recursos como o Atlas Virtual de Biologia Celular da UFPR (<http://www.bio.ufpr.br/ead>).

Acredita-se que a crise no ensino de ciências esteja acompanhada de uma crise na criatividade (FIGUEIRA-OLIVEIRA *et al.*, 2000). Cada vez mais torna-se necessário modificar os programas educacionais atuais ou propor novos programas, que acompanhem as transformações que vem ocorrendo na sociedade, que promovam a vocação científica, expandam a criatividade na ciência e aumentem a interação entre distintas áreas do conhecimento (GRINSZPAN E ARAÚJO-JORGE, 2000). Mundialmente existe um movimento para que o ensino de ciências seja mais estimulante. De fato, investimentos significativos estão sendo feitos aos cientistas e programadores, com o intuito de se criar um currículo científico estimulante e tecnológico (WALSH *et al.*, 2011). Pretende-se, dessa forma, que a aprendizagem seja um processo ativo para o estudante, incluindo a sua participação em projetos de pesquisa, que estimulem os alunos a assumirem mentalidades de cientistas, formulando, analisando e concluindo (FISHER, 2011; MILLER, 2010). Outras ações vêm sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar o processo de ensino-aprendizagem. Pode-se citar como exemplos, a coparticipação de estudantes na prática de ensino, que ministram juntamente com seus professores disciplinas das quais já participaram em Yale (FISHER, 2011); a criação de melhores representações visuais com o auxílio de tecnologias na Michigan State University (RICHMOND *et al.*, 2010); a utilização de organismos como *Tetrahymena* para se demonstrar uma série de processos celulares complexos (SMITH *et al.*, 2012); a integração de disciplinas básicas (como bioquímica, genética, biologia celular e molecular) na Universidade Anhembi-Morumbi, através de módulos baseados em questionamentos sobre saberes científicos (AZZALIS *et al.*, 2012); a produção de réplicas de microscópios simples por alunos de graduação para análise de microrganismos (SEPEL *et al.*, 2009); a apresentação de fotomicrografias de células para alunos de escolas de educação básica e para a comunidade, no sentido de popularizar o conhecimento científico (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2004). Além destes exemplos, têm sido

sugeridos para aprimorar o ensino-aprendizagem, a aprendizagem baseada em problemas (ABP, PBL), aprendizagem por pesquisa (Inquiry-based learning), estudo de caso, mapas conceituais e uso de recursos tecnológicos (DICARLO, 2006).

A formação de cientistas das áreas biológicas, bem como a dos profissionais da saúde, depende do ensino adequado da biologia celular, devido aos processos celulares serem tópicos imprescindíveis para a compreensão da fisiologia e patologia, ou seja, a base que sustenta o organismo e, em casos de desequilíbrio, leva a doenças. Já os estudantes que não se interessam pela carreira científica também devem ser educados cientificamente, para que saibam da importância da ciência para a sociedade (SAVKAR E LOKERE, 2010). Especificamente, o Brasil urge que esse conhecimento possa ser apreendido de forma a melhorar a qualidade de vida da população. Além disso, o acesso ao saber científico pela sociedade, fundamental para o bem estar da democracia, é necessário para que a sociedade e os políticos possam fundamentar opiniões acerca de temas cruciais da atualidade como, por exemplo, aquecimento global, pesquisa com células-tronco e aborto (FISHER, 2011).

O incentivo ao saber científico vem com a popularização da ciência e da desmistificação do trabalho e dos dados científicos (GRINSZPAN E ARAÚJO-JORGE, 2000). É importante que cientistas saibam comunicar descobertas biológicas complexas para o público geral, contribuindo para que ele saiba diferenciar mitos de fatos (FISHER, 2011). Especialmente em um país com tamanha biodiversidade como o Brasil, que tem a necessidade de preservar esta riqueza biológica, o conhecimento em ciências é vital. Sendo assim, o maior objetivo do ensino de ciências é a aquisição do conhecimento científico por uma população que compreenda e valorize a ciência como empreendimento social (KRASILCHIK, 2000).

## 1.2 TECNOLOGIAS DA INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO E A APRENDIZAGEM

Vive-se na era da informação e a Internet revolucionou os meios e a velocidade do acesso à informação. Os estudantes estão cada vez mais utilizando esta tecnologia na forma de *tablets*, aplicações da Internet e telefones celulares do tipo *smartphones*. As tecnologias participam da moldagem das funções cognitivas, propiciando o surgimento de novos estilos de raciocínio e conhecimento humanos com profundos reflexos no ato de aprender. Portanto, a geração atual de estudantes que passa pelos bancos escolares tem um estilo de raciocínio diverso da geração de 30 anos atrás. É consenso que, com o devido *design* instrucional e quando utilizadas de acordo com os objetivos propostos, as TICs, e em especial as multimídias, podem ser poderosas intervenções de ensino (SENGER *et al.*,

2012). O importante é assumir uma posição crítica no uso das TICs para a educação, como já preconizado por Paulo Freire, que defendia a atuação docente em ambientes interativos, com a utilização de recursos áudio-visuais como o vídeo, a televisão e a informática no processo de ensino-aprendizagem. O aluno deve ser o centro do processo e capaz de, através de diferentes recursos incluindo as TICs, levantar hipóteses, comparar, analisar e avaliar, e assim, construir o seu próprio conhecimento.

A coevolução entre tecnologias de informação e de comunicação e métodos de ensino-aprendizagem propiciou uma oportunidade única para que as multimídias revolucionassem a educação (BOCKHOLT, WEST E BOLLENBACHER, 2003). As multimídias combinam textos, imagens, vídeos, sons e animações para criar artefatos virtuais coesos para o estudante (HEYDEN, 2004). De fato, o ensino na área científica comumente requer a utilização de uma combinação de métodos verbais e pictoriais, como ocorre em uma multimídia. O método verbal envolve o aprendizado por palavras escritas ou faladas enquanto que o método pictorial envolve o aprendizado por gráficos estáticos (como ilustrações, diagramas, fotografias e gráficos) ou por gráficos dinâmicos (como animações ou vídeos). As palavras escritas e as imagens são processadas da mesma forma, chegando aos olhos e compondo uma imagem visual que fica brevemente guardada na memória sensorial visual (durante 0,25 segundo). No momento em que um estudante responde a alguma representação visual/auditiva passageira na memória sensorial, a informação é movida para a memória de trabalho (onde ocorre o processamento e o rearranjo em representações coerentes do material apresentado). A seguir, o aprendiz mentalmente organiza as palavras escritas em um modo verbal, e as imagens em um modo pictorial. Finalmente, o conhecimento relevante relacionado é ativado da memória de longo prazo e transferido para a memória de trabalho, onde o estudante deve conectar os modelos verbal, pictorial e o conhecimento relevante já assimilado para que ocorra o aprendizado significativo (MAYER, 2010). É importante ressaltar que a compreensão do conteúdo apresentado requer a integração e o uso do conhecimento (RICHMOND *et al.*, 2010).

O *design* instrucional pode ser definido como um particular método de ensino que envolve estratégias e tem a intenção de melhorar a apresentação do conteúdo e facilitar o aprendizado (SENGER *et al.*, 2012). Quando o *design* instrucional é deficiente, por exemplo, em uma situação na qual o texto sobre um conteúdo está em uma página e sua ilustração em outra, o estudante pode não ter a capacidade de se engajar no assunto para alcançar o aprendizado (MAYER, 2010). A aprendizagem pode ser ineficiente também em casos de alta complexidade, inerente ao conteúdo apresentado, o que resulta em sobrecarga da capacidade cognitiva, mais especificamente da memória de trabalho do estudante, reduzindo a compreensão do conteúdo (MAYER, 2010). Ferramentas que fornecem uma

visão muito complexa sobre o assunto, irrelevante para o objetivo do aprendizado, levam a uma deficiência na aprendizagem (MAYER, 2010). Pode até ser que o estudante guarde temporariamente maior quantidade de informações sobre o assunto, mas somente poucas destas informações, as mais básicas, ficarão retidas por um tempo mais longo. Da mesma forma, ferramentas que apresentam o conteúdo de forma superficial são inadequadas para o processo ensino-aprendizagem (JENKINSON E MCGILL, 2011).

Quando o ensino envolve métodos verbais e pictoriais, o *design* instrucional do material didático é adequado e o nível de complexidade do conteúdo está de acordo com os objetivos de ensino, a aprendizagem ocorre de forma apropriada. Especialmente quando o estudante tem a oportunidade de ser ativo no processo. Jean Piaget, cujas ideias sobre construtivismo tornaram-se conhecidas na década de 60, defende o papel central do estudante no ensino (KRASILCHIK, 2000), sendo o educador somente o facilitador do processo, ao utilizar estratégias de estudo definidas a fim de evocar certos comportamentos do aluno, tais como, a sua capacidade de esforço, exploração, explicação, elaboração e avaliação (BOCKHOLT, WEST E BOLLENBACHER, 2003). Sendo assim, as atividades didáticas devem ter como objetivo promover a curiosidade e despertar no aluno a motivação para adquirir conhecimento de forma independente (SEPEL, LORETO E ROCHA, 2009). Na perspectiva construtivista, as pré-concepções dos alunos sobre os fenômenos científicos e sua atuação nas aulas práticas são férteis fontes de investigação para os professores fazê-los progredir no raciocínio e análise dos fenômenos (KRASILCHIK, 2000).

Há um interesse crescente em incluir técnicas de aprendizagem ativas, que permitam ao estudante relacionar como as evidências científicas são utilizadas para construir o conhecimento (ALBERTS, 2009). Para tal objetivo, aulas práticas, de pesquisa, e aulas com multimídias são indicadas (LOPATTO *et al.*, 2008). Uma série de benefícios é alcançada através do uso de multimídias educativas bem elaboradas: interatividade, tornando o aluno ativo no processo de aprendizagem; facilidade de apresentação de processos simultâneos e integrados; possibilidade de repetição da cena, caso necessário; estimulação da investigação por parte do estudante; disponibilidade de acesso ao conteúdo a partir de qualquer lugar que esteja equipado com Internet ou leitor de CD/DVD (HEYDEN, 2004; LIU, 2007; STITH, 2004); apresentação de maior quantidade de informação em um tempo relativamente pequeno (MCCLEAN, 2005), facilitando a situação atual de contradição entre a duração dos cursos e a quantidade de conteúdo relevante a ser estudado. Ainda, multimídias que apresentem práticas de laboratório permitem a interação dos estudantes e a condução de experimentos, muitas vezes de difícil realização em laboratórios tradicionais devido a questões de segurança, alto custo de manutenção ou dilemas éticos (WATANABE, 2002).

Em termos dos aspectos técnicos da multimídia, ela deve ter um tamanho relativamente pequeno e o player da animação deve ser comumente disponível (STITH, 2004). As ferramentas (*softwares*) para criação da multimídia podem ser: *Apple's Quick Time*, *Macromedia's Flash*, *macromedia's Director/Shockwave*, *Netscape's JavaScript* ou *Newtek's LightWave*. O produto final pode ser entregue para o estudante *online* (pela internet) ou em CD/DVD (HEYDEN, 2004).

### 1.3 TICs E A APRENDIZAGEM EM BIOLOGIA CELULAR

A tecnologia quando aplicada na investigação biológica tem gerado costumeiramente novos insights sobre o que se conhece dos processos celulares (KLIONSKY E KUMAR, 2006). Muito do progresso da ciência nas últimas três décadas está relacionado com avanços na visualização da morfologia das células, o que possibilitou a revelação em detalhes de mecanismos e interações moleculares (LIU, 2007; JENKINSON E MCGILL, 2011). A descoberta das inúmeras conexões entre moléculas e processos intracelulares estabeleceu aos educadores o desafio de converter toda a complexidade da célula e seus componentes em uma sequência lógica e integrada de conteúdos (BOBICH, 2005). Novas metodologias de ensino, então, se tornaram necessárias para que os alunos aprendam biologia celular de forma eficiente e desenvolvam a habilidade de analisar dados ao invés de somente memorizar conteúdos que rapidamente irão se tornar ultrapassados (HOSKINS E STEVENS, 2009). Um exemplo destas metodologias são as multimídias interativas, especialmente as que combinam pesquisas científicas ao aprendizado, por exemplo, tendo o potencial de facilitar a compreensão de conceitos biológicos e também do processo científico (BOCKHOLT, WEST E BOLLENBACHER, 2003). Em 2005, Hammamieh desenvolveu um artefato onde o estudante trata células tumorigênicas utilizando drogas “desconhecidas” historicamente recomendadas para câncer de mama. O objetivo da multimídia é a análise da eficácia dos agentes farmacológicos através de técnicas comuns de biologia celular, desde cultura celular *in vitro* até microscopia de fluorescência (HAMMAMIEH, 2005). Precisa-se atentar ao fato de que as multimídias interativas ofereçam direcionamento ao estudante, com o intuito de que ele alcance o objetivo da multimídia, mas sem que se torne passivo diante deste processo. Diversas escolhas também devem ser disponibilizadas, suficientes para engajar os estudantes, mas não em excesso, de forma a confundi-los (HEYDEN, 2004). Na área de biologia molecular existem, por exemplo, alguns artefatos que permitem o estudante montar vias metabólicas: *Power law analysis and simulation* da Universidade de Lisboa (<http://enzymology.fc.ul.pt/software/plas>) e *PathwayLab* (<http://innetics.com/>) (KRAMER E THOMAS, 2006).

As multimídias interativas devem encorajar o estudante a criar pensamentos de alto nível (ou seja, criar a capacidade de correlacionar, aplicar, analisar e concluir), refletir sobre o seu nível de conhecimento e o relacionar a novos conceitos (STONE E OLIVER, 1999). Gibbons *et al* (2004) complementam ao afirmar que laboratórios virtuais são eficientes para o processo de ensino-aprendizagem na área de ciências biológicas, já que nem todos os laboratórios educacionais possuem a tecnologia necessária para a reprodução de trabalhos científicos desenvolvidos em laboratórios de pesquisa altamente especializados. O acesso a estes resultados pode acontecer via internet, através de sites contendo micrografias de qualidade, vídeos e outros dados de pesquisa, como no *Summer Research Program for Secondary School Science* (<http://www.scienceteacherprogram.org>); *Ted Salmon laboratory* (<http://www.biology.unc.edu/faculty/salmon/lab>); *John Heuser laboratory* (<http://heuserlab.wustl.edu>); *Howard Hughes Medical Institute - resource for educators* (<http://www.hhmi.org/resources/educators>); *oBioseminars* (<http://www.ibioseminars.org>); e *The National Center for Science Education* (<http://ncse.com>) (MILLER, 2010).

Nos Estados Unidos, um número cada vez maior de universidades centra seus esforços no desenvolvimento de multimídias disponibilizadas via Internet. O departamento de Biologia Molecular e Celular de Harvard criou *The Inner Life of the Cell* (<http://multimedia.mcb.harvard.edu/media.html>) com o objetivo de despertar a motivação do aluno com a surpreendente complexidade dos processos celulares. A sociedade Americana de Biologia Celular (ASCB) dedica-se conscientemente à educação. Inúmeros recursos didáticos podem ser encontrados no site mantido pela ASCB - BIOEDUCATE (<http://bioeducate.ascb.org/>) como uma galeria de vídeos e imagens (<http://cellimages.ascb.org>). Além disso, essa sociedade publica, dentre outras, a revista *Journal of Cell Biology Education - CBE- Life Sciences* (<http://www.lifescied.org/>). No site *Cells Alive* ([www.cellsalive.com](http://www.cellsalive.com)) estão disponíveis animações sobre eventos celulares, assim como no *Virtual Cell*, criado pela North Dakota State University. O projeto *University of Arizona Biology Project* ([www.biology.arizona.edu/Cell\\_bio/cell\\_bio.html](http://www.biology.arizona.edu/Cell_bio/cell_bio.html)) possui fotomicrografias, assim como os sites da Emory University (<http://physics.emory.edu/~weeks/confocal/>), da University of Washington (<http://depts.washington.edu/keck/intro.htm>), da Queen's University em Ontario (<http://meds.queensu.ca/qcri/flow/cr-cm.htm>) e da University of Delaware (<http://www.udel.edu/Biology/Wags/wagart/confocalpage/confocal.html>), especializados em microscopia confocal. Ainda, muitos livros-texto de biologia celular e molecular disponibilizam com a sua compra, multimídias criadas com o intuito de esclarecer eventos fundamentais da área (O'DAY, 2006): *Molecular Cell Biology* (LODISH *et al.*, 2003), a quarta edição do *Molecular Biology of the Cell* (ALBERTS *et al.*, 2002), *The World of the Cell*

(BECKER *et al.*, 2003), *Cell Biology* (POLLARD E EARNSHAW, 2002) e *The Cell: A Molecular Approach* (COOPER E HAUSMAN, 2004).

A animação, mais especificamente, assim como a videomicroscopia, permite ao estudante converter um conceito abstrato em um objeto visual específico. Contudo, sendo a biologia celular e molecular um domínio visual, depende-se de um conjunto de representações visuais (animações, imagens e diagramas) para descrever diferentes aspectos das estruturas e eventos celulares, especialmente o muito pequeno para se observar em microscópios ou extremamente rápidos e, portanto, de difícil visualização. Ainda, as explicações visuais são mais atrativas e mais facilmente guardadas na memória do que outras formas de comunicação (JENKINSON E MCGILL, 2011). Razões pelas quais microscópios virtuais foram criados em outras áreas do conhecimento, como na histopatologia ([www.webmicroscope.net](http://www.webmicroscope.net)), beneficiando a educação (LINDER *et al.*, 2008). Na patologia, o ambiente digital está sendo utilizado para interpretar lâminas histológicas, devido ao seu escaneamento em alta resolução ser o suficiente para se navegar e se diagnosticar com clareza o conteúdo presente (WANG *et al.*, 2012).

Outro desafio a ser vencido quando se trata da utilização de multimídias de qualidade é onde encontrá-las. Existem alguns sites que simplificam este trabalho ao reunir multimídias e disponibilizar estes recursos: *National Science Digital Library* (<http://nsdl.org>), *Multimedia Educational Resource for Learning and Online Teaching* ([www.merlot.org/merlot/index.htm](http://www.merlot.org/merlot/index.htm)) e *Online Multimedia Teaching Tool* (<http://omtt.usc.edu>) (WALSH *et al.*, 2011). Greenfield afirma que o ideal é que o ensino aconteça por um equilíbrio entre multimídias, exercícios interativos e textos tradicionais (WALSH *et al.*, 2011).

#### 1.4 ENSINO X PESQUISA

O “Manifesto dos pioneiros da educação nova”, criado na década de 30, concebeu a universidade segundo uma tríplice função de investigação científica, docente e popularizadora da ciência (XAVIER, 2012). Com a expansão dos programas de pós-graduação e delineamento de áreas específicas de pesquisa – dentre elas, o ensino de ciências - as organizações acadêmicas assumiram de fato a responsabilidade de investigar e procurar fatores e situações que melhorassem os processos de ensino-aprendizado. No plano internacional o processo foi equivalente (KRASILCHIK, 2000). Sendo assim, pode-se dizer que um das maiores equívocos da comunidade científica é a crença de que o processo educativo esteja fundamentalmente desvinculado da prática científica (MILLER, 2010), especialmente quando, como afirma Krahl *et al* (2009), se considera a possibilidade de se

transformar a pesquisa em ato educativo e assim, converter a instituição de ensino em um cenário de intercâmbio reflexivo e produtor de conhecimentos (SHEVEITZER *et al.*, 2012).

Embora seja durante a educação básica que os estudantes se interessem pela ciência, é no ensino superior que eles aprendem as habilidades necessárias para entender e realizar pesquisas ou adquirem conhecimento científico que servirá para suas vidas como professores, eleitores, políticos e pais (SAVKAR E LOKERE, 2010). Sendo assim, o ensino superior deve ser adequado para assegurar o alto nível científico da sociedade futura. Contudo, o artigo da revista *Nature - Time to Decide* (SAVKAR E LOKERE, 2010) traz em pesquisa realizada com professores/cientistas em 450 universidades de 30 países diferentes que mais da metade destes profissionais consideram a qualidade do ensino superior da sua região pobre ou medíocre, devido a causas como deficiente preparação recebida pelos alunos no ensino básico, falta de serviços de apoio aos estudantes universitários (como tutores e aconselhadores), estruturas de laboratórios inadequadas, custo proibitivo dos recursos educativos e a continuidade da metodologia de ensino tradicional, baseada na transmissão unilateral de informações, ao invés de ativa. As soluções mais citadas pelos entrevistados para melhorar o ensino superior foram “melhorar a educação básica” e “melhorar a qualidade das aulas dos alunos na universidade”. Conclui-se que os profissionais sabem que, como professores universitários, podem transformar os desafios herdados da educação básica. Realmente, a grande maioria deles (77%) considera suas responsabilidades de professor tão importantes quanto às de pesquisador. Entretanto, 41% dos entrevistados sentem que as suas instituições valorizam mais a pesquisa, com mais apoio, prêmios e estabilidade no emprego, em detrimento da educação. Talvez seja por essa razão que muitos professores pesquisadores se esquivem da função de professor em favor da pesquisa, acreditando que o reconhecimento em uma área ocorra às custas do reconhecimento na outra. A solução seria garantir o reconhecimento, inclusive financeiro, para profissionais na função de professor. Shirley Tilghman, professora de biologia molecular e presidente da Universidade de Princeton resume o paradigma atual “Nós vivemos em uma aparente tensão entre pesquisa e ensino porque estamos tentando cumprir duas coisas ao mesmo tempo. Na verdade as duas áreas deveriam ser vistas como mutuamente benéficas” (SAVKAR E LOKERE, 2010). De fato, a pesquisa e o ensino em biologia celular não são entidades separadas, mas partes interdependentes de um mesmo organismo, ambas com papéis vitais para o futuro da área (MILLER, 2010). Sendo assim, ensino e pesquisa podem se beneficiar reciprocamente (HUANG, 2000).

No Brasil, a maioria da pesquisa científica é conduzida em universidades públicas e, portanto, por cientistas que são também educadores. Assim, o interesse em integrar pesquisa e educação está cada vez maior devido à consciência pública da importância da

ciência para o desenvolvimento nacional (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2004). Caberá aos cientistas/educadores formular propostas curriculares atualizadas, relevantes e realistas, não só indicando as impropriedades, mas também propondo linhas de trabalho, sugestões para reformulação e substituição, e em especial, para se atuar em pontos de impacto para a mudança dos dados obtidos nos inúmeros processos de avaliação (KRASILCHIK, 2000). Nessa dissertação descreveremos como resultados de pesquisa com macrófagos podem ser aplicados para a aprendizagem da fagocitose, tendo como base as pesquisas realizadas no Laboratório de Célula Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR, que de longa data tem a prática de disponibilizar seus resultados de pesquisa para aulas práticas.

#### 1.5 O USO DOS RESULTADOS DE PESQUISA SOBRE FAGOCITOSE ACOPLADOS ÀS TICs PARA A APRENDIZAGEM EM BIOLOGIA CELULAR

Pesquisa realizada nos sites Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>) sob os termos *phagocytosis education* e afins não encontrou resultados significantes sobre a aplicação de resultados de pesquisa ou sobre a aplicação das TICs para promover a aprendizagem da fagocitose. O mais próximo a isso que se encontrou foi um artigo descrevendo certa metodologia de aprendizagem em autofagia: os alunos eram orientados a ler um material didático em casa para que, em aula, respondessem a um teste sobre autofagia. Posteriormente, recebiam aula expositiva focada em métodos e técnicas de laboratório utilizadas para monitorar a autofagia. Na aula seguinte, respondiam a perguntas e discutiam suas respostas, interpretando dados de pesquisa sobre o assunto. Para finalizar, os alunos respondiam novamente a um teste, desta vez com questões mais complexas. Concluiu-se que esse tipo de atividade, na qual o aluno constrói o seu conhecimento através da análise de dados laboratoriais, foi eficiente para o ensino da autofagia (KLIONSKY E KUMAR, 2006).

No departamento de biologia celular da UFPR, resultados de pesquisa do Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias da UFPR têm demonstrado aspectos morfológicos e bioquímicos, em diferentes tipos de microscopias, relativos às várias fases da fagocitose, como, dentre outras, a ativação do macrófago, a produção de radicais livres, a expressão gênica, o fagossomo, a participação de receptores, a atividade de inúmeras enzimas e as funções de proteínas (LOPES *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2008). Em paralelo, tem-se observado o alto potencial didático desses resultados, visto que mostram aspectos essenciais para a compreensão da fagocitose. Sendo assim, alguns destes resultados vêm sendo utilizados rotineiramente nas aulas práticas de Biologia Celular.

## CAPÍTULO 2 – O PROCESSO DE FAGOCITOSE

O conhecimento sobre o processo de fagocitose é importante para os profissionais da saúde pois é a base sobre a qual se fundamenta muitos conceitos de imunologia. O evento se caracteriza pelo reconhecimento, através de células especializadas, de organismos invasores e sua posterior destruição intracelular, em compartimentos onde atuam enzimas hidrolases.

### 2.1 FAGOCITOSE

Entre os protistas a fagocitose ocorre para que a célula adquira nutrientes, enquanto que nos organismos multicelulares a função deste evento evoluiu para defender o corpo contra partículas estranhas (RUSSEL *et al.*, 2009). A fagocitose envolve a ingestão de partículas por uma célula. Em mamíferos as principais células fagocíticas são o macrófago, a célula dendrítica e o neutrófilo, podendo essas serem denominadas fagócitos profissionais.

Receptores dos fagócitos profissionais conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Uma grande variedade de receptores fagocíticos podem reconhecer componentes da superfície de patógenos ou associados a patógenos, não precisando que ocorra o seu revestimento por anticorpos conhecido como opsonização (RUSSEL *et al.*, 2009). Dentro dessa categoria estão os receptores Toll-like (TLRs), que detectam padrões moleculares conservados em microrganismos, iniciando a resposta imunológica inata, os receptores *scavengers* que reconhecem inúmeros ligantes, inclusive lipopolissacarídeos e lipoproteínas da partícula a ser fagocitada e receptores de manose e manose dectina-1, que se ligam a resíduos de manose na superfície de bactérias e fungos e podem reconhecer também, respectivamente, fucose e glucanas (ALAN *et al.*, 1990). Dessa forma, ocorre a adesão da partícula à membrana do fagócito, e então o seu englobamento, formando o fagossomo (LEWIS *et al.*, 2012). Algumas das proteínas implicadas no processo de englobamento são proteínas quinases, fosfatases, GTPases, enzimas modificadoras de lipídeos, complexos adaptadores, proteínas ligadas à actina e mediadores de fusão e fissão da membrana. A ação das proteínas, cofatores e receptores causa uma remodelagem localizada da membrana, devido principalmente a sua ação no citoesqueleto de actina, e culmina na formação do fagossomo (SCOTT, 2003).

O fagossomo é formado com o englobamento da partícula pela membrana plasmática do macrófago e posterior fusão no topo da partícula, ingerindo-a. O processo de ingestão segue o padrão “modo-zíper”, receptor do macrófago e ligante da partícula

interagem por toda a superfície da partícula levando a aposição muito próxima entre partícula e membrana do fagossomo (HAAS, 2007). Sendo assim, estas interações se formam por toda a superfície da partícula. Juntamente com a reestruturação do citoesqueleto celular, então, ocorre o processo de internalização e fechamento da membrana, formando o fagossomo (HAAS, 2007). Logo após a formação do fagossomo inicia-se a sua maturação. Em adição, ocorre o *burst* oxidativo: reativos intermediários do oxigênio são gerados através da ação da NADPH oxidase na membrana plasmática durante a formação do fagossomo. Esse complexo gera ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a partir de oxigênio molecular, e radicais óxido nítrico (NO) a partir de arginina pela óxido nítrico sintase (RUSSEL *et al.*, 2009). O superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase. O superóxido pode se combinar com intermediários do óxido nítrico e com ferro, gerando peroxinitrito e ferro hipervalente, respectivamente, compostos nocivos e bactericidas.

O fagossomo funde-se transientemente com uma série de compartimentos intracelulares, tais como sistema endossomal, corpos multivesiculares e até mesmo, alguns estudos sugerem, retículo endoplasmático (GAGNON *et al.*, 2002; RUSSEL *et al.*, 2009). Durante a maturação do fagossomo ocorre a sua fusão com endossomos iniciais/tardios e lisossomos. Fagossomos do mesmo tipo celular contendo a mesma carga adquirem e perdem seus marcadores de maturação com cinéticas muito similares durante as fusões. Sendo assim, fagossomos iniciais fundem-se preferencialmente a endossomos iniciais ou, menos comumente, a endossomos tardios, enquanto que fagossomos tardios fundem-se preferencialmente a endossomos tardios e lisossomos (HAAS, 2007). Endossomos iniciais são fracamente ácidos (pH 6,1) e pobres em atividade hidrolítica. Endossomos tardios são caracterizados pela presença de estruturas multivesiculares, lúmen ácido (pH 5,5 a 6,0) e proteases ativas. Lisossomos são mais ácidos (pH 4,5 a 5,5) e repletos de proteases maduras. Na fusão entre compartimentos, as duas bicamadas lipídicas se unem transientemente, sendo assim, seus conteúdos podem ser trocados. Através das fusões, o lúmen do fagossomo torna-se fortemente acidificado (pH 4,5) pela ação da bomba de prótons transmembrana, complexo adenosina trifosfatase (ATPase), a ATPase vacuolar, responsável por bombear prótons para dentro do compartimento (HAAS, 2007). A acidificação faz com que a interação entre o receptor do macrófago e o seu ligante na levedura seja alterada, sendo o receptor desligado da sua carga. Dessa forma, ocorre o processo de reciclagem, quando a bicamada lipídica em torno do receptor deforma-se para formar uma pequena vesícula, contendo o receptor em sua superfície, que brota do fagossomo e migra em direção à membrana plasmática. Por fim, essa vesícula liga-se e funde-se a membrana plasmática, expondo o receptor na superfície celular. Sendo assim,

ele pode novamente reconhecer o seu ligante e reiniciar o processo. Contudo, nem todos os receptores são reciclados, alguns seguem com o compartimento fagocítico. O brotamento da vesícula devido a fatores como reciclagem de receptores (DAMIANA E COLOMBO, 2003), faz com que o tamanho do fagossomo permaneça praticamente constante, apesar de sua fusão a lisossomos e endossomos. As fusões entre fagossomos e endossomos/lisossomos possibilitam também o recebimento de enzimas hidrolases ácidas, sintetizadas no retículo endoplasmático e transferidas ao fagossomo através do sistema endossomo-lisossomo (LUZIO *et al.*, 2000; GRUENBERG, 2001; ESKELINEN *et al.*, 2003). Todas as hidrolases são transportadas para os fagossomos através de proteínas transmembranares, em vesículas da rede trans do Golgi, antes de serem acumuladas nos lisossomos. Dezenas de tipos diferentes de hidrolases (proteases, DNases, lipases, etc.), que são capazes de digerir a maioria das biomoléculas biológicas são lançadas dos lisossomos ao fagossomo, contribuindo para a digestão da partícula. O fagolisossomo apresenta ainda uma plethora de proteínas de membrana tais como enzimas envolvidas na produção de radicais livres, proteínas envolvidas na apresentação de antígeno, próton ATPases para manter o pH ácido do compartimento, proteínas associadas aos filamentos do citoesqueleto, proteínas estruturais (como LAMPs) e transportadores de membrana para importação de moléculas do citoplasma e exportação dos monômeros oriundos da digestão.

Fagossomos são formados em segundos ou minutos e se desenvolvem rapidamente. São organelas transientes que eventualmente desaparecem. A regressão dessas organelas no macrófago ainda não está esclarecida. Acredita-se que sofram fragmentações sucessivas e que os compartimentos menores resultantes se fundam aos lisossomos e endossomos e dessa forma desapareçam do citoplasma (BOTELHO E GRINSTEIN, 2011). Esse processo é bem diferente da fagocitose em um *Paramecium*, por exemplo, no qual os resíduos da digestão dos vacúolos digestivos são secretados para o meio (KISSMEHL *et al.*, 2002).

A fagocitose é um evento celular extremamente dinâmico, portanto o seu ensino é facilitado pelo uso de elementos visuais tais como eletronicografias, vídeos e animações, responsáveis por promoverem a criação de representações mentais do processo pelos estudantes.

### 2.1.1 Macrófago como modelo para o ensino da fagocitose

O macrófago foi descrito pela primeira vez no final do século XIX por Metchnikoff, que observou este tipo celular em diversos tecidos (PERES E CURI, 2005). A descoberta e caracterização dos macrófagos se deram graças à sua capacidade de internalizar partículas

grandes através da fagocitose (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Os macrófagos derivam de células precursoras mielóides da medula óssea que se dividem, influenciadas por fatores determinadores de linhagens, produzindo os monócitos, os quais circulam no sangue (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

Nos vertebrados, os macrófagos são fagócitos profissionais que residem em todos os tecidos do corpo e são especialmente abundantes em áreas que apresentam alto potencial de sofrer infecções. Também estão presentes nos tecidos conectivos, no fígado, no baço, nos nódulos linfáticos, nos espaços sinusóides, nos fluidos peritoneal, pleural ou sinovial, no colostro e nos espaço alveolares. Estas células podem sobreviver por meses no tecido, patrulhando-os e estabelecendo contato com os microrganismos invasores (ALBERTS *et al.*, 2010). Em certas regiões, os macrófagos recebem nomes diferentes como, por exemplo: células de Kupfer, no fígado; microglia, no sistema nervoso central; células de Langerhans, na pele; e osteoclastos, no tecido ósseo.

Os macrófagos possuem características morfológicas bastante variáveis dependendo do seu estado de atividade e do tecido que habitam (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Muitos macrófagos residentes nos tecidos estão em estado quiescente, ou seja, sem sofrer ação de nenhum estímulo. A sua morfologia é semelhante ao monócito e eles apresentam uma baixa capacidade de espraiamento (PERES E CURI, 2005). Essas células se distinguem dos macrófagos encontrados em sítios inflamatórios, que se depararam com estímulo proveniente de algum microrganismo ou de linfócitos, os chamados macrófagos ativados. A ativação é caracterizada por um rápido aumento do metabolismo celular, motilidade, atividade fagocítica e liberação de citocinas para atrair mais leucócitos para o sítio inflamatório (PARSLOW, 2000). Essas alterações intensificam a responsividade do macrófago ao invasor, pois a célula fagocítica adquire grande capacidade de proliferação e fagocitose, habilidade para aderir e espalhar-se em substratos. Além de que, à nível intracelular, ocorre a fusão entre lisossomos e vacúolos endocíticos, a produção de espécies reativas e a síntese de enzimas (ALBERTS *et al.*, 2010).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Para o ensino, especialmente de biologia celular, as explicações visuais são mais atrativas e mais facilmente guardadas na memória do que outras formas de comunicação. Além disso, esta ferramenta promove a curiosidade e desperta o interesse para que o aluno adquira conhecimento de forma independente. Levando-se em conta, ainda, a importância do macrófago para a defesa do organismo, justifica-se a construção de materiais didáticos

virtuais, sobre a fagocitose em macrófagos, a partir de resultados de pesquisa, que possam ser aplicados através de diferentes métodos de ensino.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver uma multimídia sobre fagocitose que desperte a curiosidade e questionamentos dos alunos de graduação das áreas biológicas e biomédicas.

### **4.2 METAS**

- Selecionar resultados de pesquisa de projetos anteriores utilizando macrófagos que possuam potencial didático sobre o tema fagocitose e analisar o seu conteúdo científico a luz da bibliografia atual;
- Realizar microscopia eletrônica de transmissão (MET) para esclarecer detalhes ultraestruturais dos resultados previamente observados através de microscopia de luz.
- Construir filmes e animações, baseado em resultados de pesquisa, para a compreensão da fagocitose;
- Construir uma multimídia virtual interativa em Adobe Flash baseada em resultados de experimentos laboratoriais, mesclando imagens estáticas, vídeos e animações;
- Divulgar no meio científico nacional e internacional, com apresentação das metodologias, dos resultados e de outros aspectos para implementação em laboratórios educacionais que disponham de infraestrutura adequada.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS RESULTADOS COM POTENCIAL DIDÁTICO**

Resultados sobre macrófagos e fagocitose de leveduras obtidos ao longo dos últimos 15 anos no Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas da UFPR foram analisados. Para a seleção levou-se em consideração os seguintes critérios:

- A possibilidade de serem trabalhados de tal forma que englobassem um ou mais dos principais aspectos da fagocitose – adesão, internalização, maturação do fagossomo e digestão;

- O rigor científico do material – os resultados deveriam representar eventos da fagocitose em concordância com o conhecimento científico atual, ou seja, amparados na bibliografia;
- A aplicação didática para a compreensão da fagocitose – ficaram excluídos os resultados muito específicos, que embora fundamentais para a pesquisa na qual foram produzidos, não traziam acréscimos expressivos à abordagem didática do conteúdo de fagocitose. Pelo contrário, poderiam produzir saturação de informações, não essenciais para aprendizagem sobre o evento celular e dificultar a compreensão.
- A alta qualidade visual, visto que este deveria ser um material didático baseado em microscopia;
- A possibilidade de complementação quando utilizados os resultados em conjunto. Assim, aspectos que com uma metodologia não eram observados poderiam se tornar claros com outra metodologia;
- Os aspectos que pudessem propiciar uma interpretação errônea deveriam ser comprovados ultraestruturalmente, quer seja utilizando-se bibliografia ou com a realização de experimentos. Assim, foram realizados experimentos em MET que ampararam a interpretação dos resultados, além de trazerem novas informações à respeito das fases iniciais da fagocitose.

As imagens escolhidas foram processadas com o uso do software Adobe Photoshop para se tornarem visualmente adequadas a uma multimídia educacional, no entanto não houve alteração de seu conteúdo científico.

## 5.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA AMPARAR A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS PRÉVIOS UTILIZADOS

### 5.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos com aproximadamente três meses de idade cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da UFPR. Todas as recomendações para manejo científico de animais da lei nacional (Nº 6.638, 5 de novembro de 1979) “Normas para Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais” foram respeitadas, além de aprovadas no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o número 568.

### 5.2.2 Coleta de células

Após a ortotanásia dos animais, a exposição do peritônio foi realizada através do rompimento da pele ventral. Com uma seringa de 10 ml e agulha estéreis, foi injetado na cavidade peritoneal tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*), pH 7,2, gelado (4°C) e também estéril. Após agitar a solução salina no interior do peritônio, para que os macrófagos presos na parte interna fossem soltos, a solução contendo macrófagos do peritônio foi aspirada através da açãoização da mesma seringa. Esse lavado foi transferido para um recipiente estéril e acondicionado no gelo. Ao final da coleta, o *pool* de células foi contado em câmara de Neubauer e microscópio de luz Nikon®.

### 5.2.3 Cultivo de células

Os macrófagos obtidos foram mantidos em meio de cultura “Dubecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo penicilina 1 U/ml e estreptomicina 1 ug/ml. As células foram acondicionadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.4 Incubação dos macrófagos com *Saccharomyces cerevisiae*

Uma alíquota de *Saccharomices cerevisiae*, mantida à -20°C, foi lavada três vezes com PBS. Imediatamente antes do início de cada experimento, as leveduras foram suspensas em Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) sem soro fetal bovino. O número de células foi determinado com a utilização de uma câmara de Neubauer e ajustado, quando necessário. Posteriormente, as leveduras foram incubadas com os macrófagos a uma taxa de 10:1 (macrófagos: leveduras). Passados 20 minutos, as leveduras não aderidas foram retiradas e os macrófagos, cultivados por 30 minutos em incubadora a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células foram pré-fixadas com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por duas horas em temperatura ambiente. Após-lavagem em tampão cacodilato, as células foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% e em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, durante aproximadamente uma hora no escuro. Ocorreu então a desidratação em acetona (70, 90 e 100%), infiltração em mistura de epon:acetona em série decrescente e

emblocagem em epon. Após a polimerização em estufa à 60°C, os blocos foram cortados em ultramicrótomo e os cortes contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila.

A observação das telas se deu no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e a captura das imagens foi feita através do uso de negativos. As imagens obtidas foram processadas com o uso do software Adobe Photoshop no sentido de se tornarem mais didáticas, mas sem alteração de seu conteúdo científico.

#### 5.2.6 Seleção e edição de vídeos didáticos

Vários vídeos capturados em DIC e microscopia de luz (células sem tratamento algum e células na presença da coloração vermelho neutro) foram selecionados ilustrando diferentes aspectos da fagocitose. Para tal, levou-se em consideração o seu potencial didático e a clareza visual. Os vídeos em formato AVI foram acelerados e editados em Adobe Premiere, sem modificação de seu conteúdo científico. Vários recursos de edição foram utilizados, como a inclusão de legendas para facilitar a compreensão de seu conteúdo pelo usuário.

#### 5.2.7 Construção de animações

As animações foram construídas a partir de imagens reais obtidas por DIC ou por microscopia de luz com a coloração Giemsa. As imagens originais foram editadas no software Adobe Photoshop, com o acréscimo de representações gráficas construídas no próprio Adobe Photoshop. Quadros sequenciais foram produzidos, constituindo uma sequência de imagens, importada pelo programa IMAGEJ e exportada como vídeos no formato AVI. Por fim, os vídeos foram editados utilizando o programa Adobe Premiere.

### 5.3 FOTOGRAFIA DE EXPERIMENTOS PARA CONSTRUÇÃO DA ANIMAÇÃO

Foram capturadas, utilizando a câmera CANON E 200, imagens de pipetas, placas de Elisa e outros itens de laboratório para a construção de uma animação interativa sobre cultivo celular. As imagens foram processadas com a utilização do software Adobe Photoshop e a animação foi construída utilizando-se o software Adobe Flash.

## 5.4 DESENVOLVIMENTO DA MULTIMÍDIA

Foi construído um *storyboard*, ou seja, uma estória didática que se inicia com um texto introdutório sobre o assunto, prossegue com a realização interativa do experimento em questão e culmina na observação e análise das imagens das microscopias.

Utilizando programas de edição de imagens e vídeos, Adobe Flash e Fireworks, foi desenvolvida a construção da multimídia em modo de apresentação (1024X768 pixels) no formato executável onde o usuário pode navegar pelo *storyboard* seguindo uma sequência planejada e interativa. A ferramenta Flash foi usada como base para mesclar imagens, vídeos e interatividade trazendo o usuário para dentro do laboratório. Sequências de animações foram aplicadas a fim de aproximar da realidade o processo de experimentação observação *in vitro*.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à escala microscópica das células e da enorme variedade de técnicas de visualização celulares não é surpresa que estudantes fiquem inspirados e ao mesmo tempo tenham dificuldades em compreender a morfologia das células (LIU, 2007). A complexidade dos processos moleculares e celulares aumenta ainda mais o grau dessas dificuldades (MCCLEAN *et al.*, 2005). Considerando que o sentido da visão permite a coleta de informações do meio para a formação de conceitos (MCCLEAN *et al.*, 2005), uma possibilidade de ensino de conceitos na área de biologia celular, em especial, na fagocitose, seria através da utilização de imagens, sempre associadas à linguagem. Nas seções seguintes serão descritos e discutidos os resultados selecionados, enfocando-se quais os aspectos da fagocitose podem ser compreendidos a partir de cada um deles.

### 6.1 SELEÇÃO DOS RESULTADOS COM POTENCIAL DIDÁTICO

A microscopia é uma importante ferramenta educacional na área da biologia celular devido a sua capacidade de oferecer visualização adequada das estruturas presentes na célula. Sendo assim, diferentes técnicas microscópicas, cada uma com suas particularidades e objetivos de ensino, foram analisadas com a finalidade de propiciar a conversão de um conceito abstrato em um objeto visual específico, que pode ser mentalmente manipulado (MCCLEAN *et al.*, 2005), com o intuito de esclarecer o dinâmico evento da fagocitose.

A tabela abaixo representa uma visão geral dos conteúdos essenciais para a compreensão da fagocitose e os relaciona às metodologias de pesquisa selecionadas que produzem resultados que propiciam o aprendizado destes tópicos.

<b>Conteúdo didático</b>	<b>Metodologia para a obtenção dos resultados</b>
Adesão	DIC, microscopia de luz e coloração de Giemsa
Internalização	DIC, microscopia de luz e coloração de Giemsa
Maturação do fagossomo	Coloração de Giemsa, captura do vermelho neutro (acidificação) e citoquímica para fosfatase ácida (enzimas hidrolíticas)
Digestão	DIC, microscopia de luz e coloração de Giemsa

**Tabela 1** - Visão geral das metodologias em microscopia de luz que produzem resultados com alto potencial didático

Todos os resultados e experimentos em microscopia de luz podem ser utilizados através das mais diferentes abordagens pedagógicas. Contudo, a forma de aplicação desses resultados no processo ensino aprendizagem depende de uma série de variáveis, como duração das aulas, número de aulas, recursos da instituição, segurança do laboratório, experiência e objetivos do professor e disponibilidade de técnicos. Os resultados podem ser desenvolvidos no laboratório de forma padronizada ou variando as diferentes condições experimentais, na forma de projetos, de aulas práticas ou da simples visualização e análise de micrografias. Os resultados podem ser ainda aplicados na forma de perguntas ou problemas, visto que o aprendizado significativo ocorre quando o estudante é ativo no processo de ensino-aprendizagem, relacionando, analisando e integrando conceitos (MAYER, 2010).

### 6.1.1 Aplicação dos resultados de pesquisa através da experimentação no laboratório didático

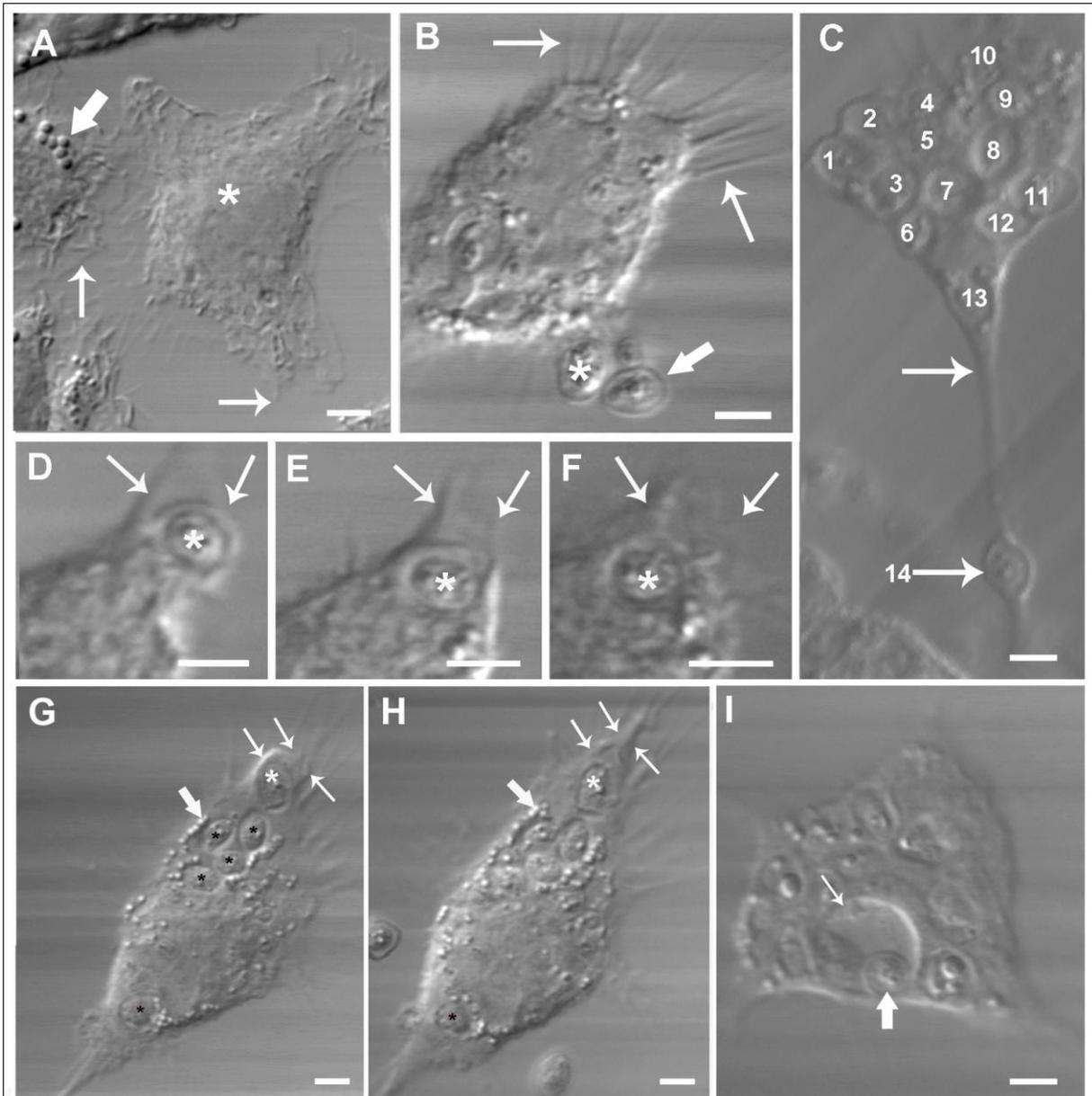
A experimentação pelos estudantes pode encontrar muitos entraves. Especialmente em nosso país, a falta de recursos financeiros, a ausência de infraestrutura e equipamentos, a escassez de pessoal técnico, a estrutura dos currículos, a falta de segurança em laboratório didáticos, dentre outros, dificultam a realização dos experimentos. Dentro deste contexto, a construção de um material didático visual, embora não substitua a prática laboratorial, pode ser um recurso vantajoso e de fácil aplicação para a compreensão da fagocitose partindo-se de resultados reais.

Nos tópicos seguintes serão descritos e discutidos, além da criação da multimídia, os resultados selecionados e como eles podem auxiliar na compreensão da fagocitose. Além disso, em várias situações, os resultados serão apresentados vinculados a questões, para

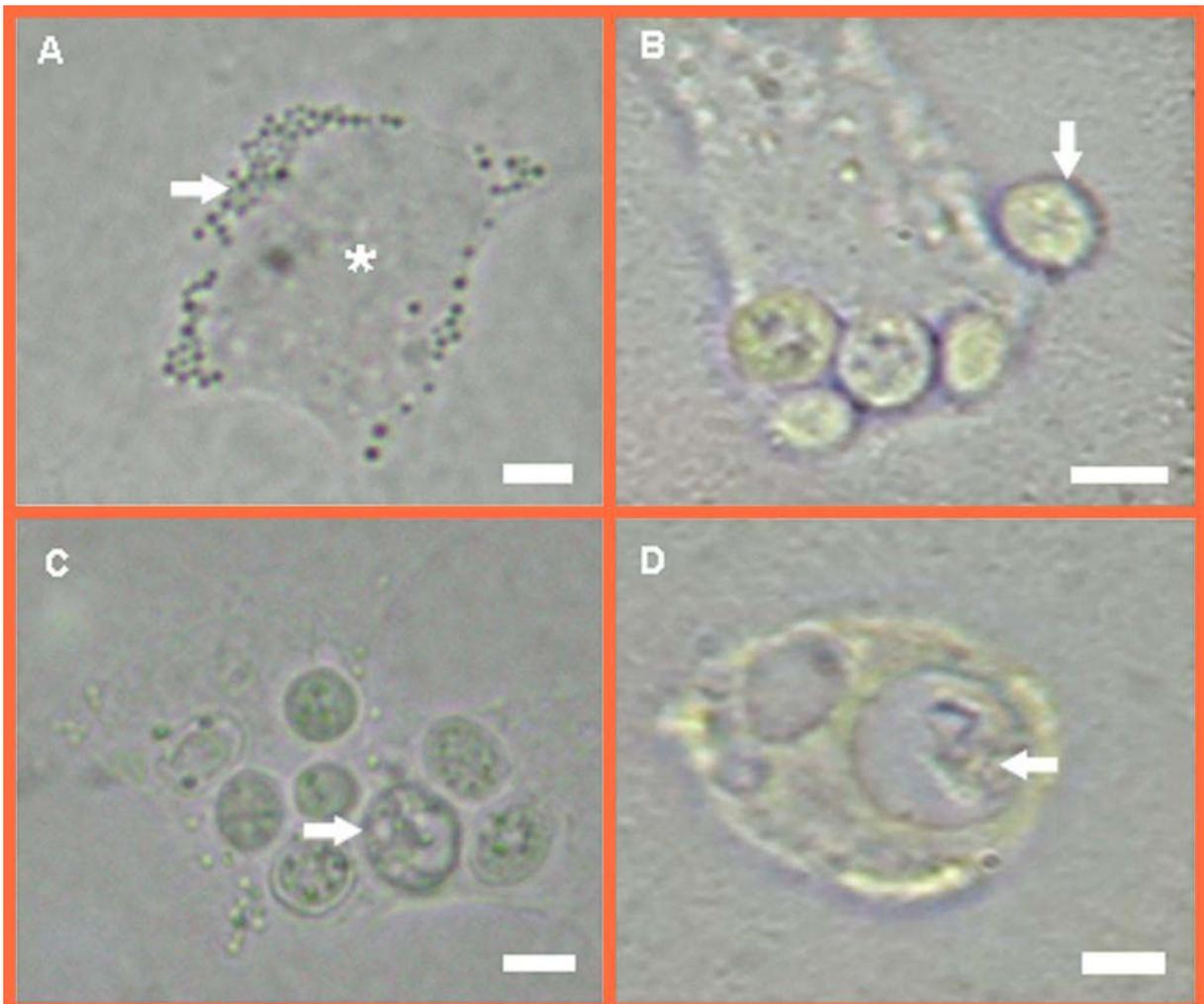
se exemplificar problemas que poderiam ser propostos aos estudantes durante o desenvolvimento das atividades, tendo em vista o caráter ativo do estudante na construção de seu conhecimento

## 6.2 COMPREENDENDO A FAGOCITOSE ATRAVÉS DE DIC E MICROSCOPIA DE LUZ

As figuras 1 (quadros dos vídeos 1 e 3, capturados através de DIC) e 2 mostram alguns dos principais eventos da fagocitose que podem ser explorados através de DIC e microscopia de luz, respectivamente. Com um sistema de lentes acoplado ao microscópio de luz, DIC produz imagens em relevo a partir de objetos praticamente transparentes e com índices de refração distintos, sendo que a velocidade da luz é alterada conforme ela atravessa estruturas com índices de refração diferentes (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004). Assim, podemos distinguir com precisão o que é o macrófago e o que é a levedura na imagem. A visualização das células vivas, por DIC ou microscopia de luz comum, inclusive, desperta o interesse do estudante pelo evento celular, pois ele acompanha a célula viva, visualizando as modificações na morfologia celular conforme elas surgem, ou seja, notando a dinamicidade do processo. Os vídeos resultantes de DIC e microscopia de luz podem ser utilizados de diferentes formas pelo professor, como em aulas clássicas, expositivas dialogadas ou como resultados de pesquisa, nos quais o estudante se baseia para analisar e interpretar eventos dinâmicos. Através destas metodologias, pode-se compreender a adesão, internalização, maturação e digestão, aspectos cruciais da fagocitose.



**Figura 1. Imagens estáticas representando a fagocitose de células in vivo** **A.** Macrófagos ativados contendo sem leveduras fagocitadas exibindo morfologia achatada, muitas projeções celulares (setas finas) pequenos grânulos intracelulares (seta grossa) e nenhuma grande organela (asterisco) **B.** Levedura aderida (asterisco) ao macrófago observado. Note que a levedura (seta grossa) que estava se movendo devido ao fluxo do meio choca-se a levedura aderida (asterisco). Observe a presença de filipódios (setas finas e colchetes). **C.** Citoplasma do macrófago repleto de leveduras, numeradas de 1 a 13. Note a fina extensão celular (seta) que se dilata no ponto de internalização da levedura 14. **D-F.** Três frames sequencias mostrando o início da internalização de leveduras (asterisco). Note as modificações das extensões citoplasmáticas durante este processo (setas) **G-H:** Dois frames sequencias mostrando leveduras (asterisco branco) no citoplasma apical e outras (asteriscos pretos) no interior do citoplasma assim como corpos intracelulares (setas grossas). Note a mudança em sua localização, indicando movimentos intracelulares. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2. Fagocitose observada através de microscopia de luz. A.** Macrófagos não incubados com leveduras. Note a superfície celular achatada e lisa (astrisco). Grânulos intracelulares podem ser observados na periferia celular (seta) **B.** Adesão de leveduras ao macrófago (seta) **C.** Diversas leveduras internalizadas (setas) observadas. **D.** Fagolisossomo contendo material desorganizado, prováveis resíduos de digestão (seta grossa) . Barra: 5 um.

### 6.2.1 Adesão e receptores

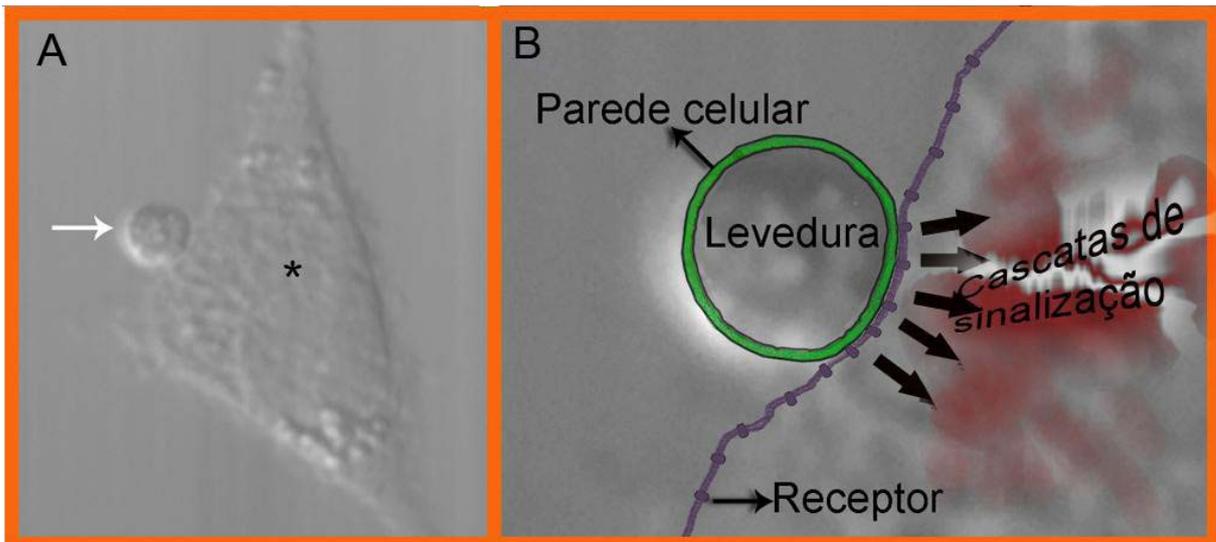
Os vídeos 1 e 4, bem como a figura 2B, ilustram a adesão entre leveduras e macrófagos. A figura 1B, quadro do vídeo 1, ilustra mais especificamente leveduras aderidas (setas grossas) que não se separam do macrófago, apesar do choque com leveduras livres (setas finas) movimentando-se devido ao fluxo do meio de cultura. Sendo assim, conclui-se que o fluxo é suficiente para mover leveduras livres, entretanto insuficiente para mover leveduras aderidas. Sugere-se, portanto, que a adesão entre levedura e macrófago, devido ao reconhecimento do polissacarídeo da parede celular da levedura (manana) por receptores nos macrófagos (receptor de manose e receptor de manose dectina-1), seja extremamente forte (ALAN *et al.*, 1990). Estes resultados suscitam a indagação: “Quais

forças ligam leveduras a macrófagos?”. Uma vez respondida esta questão: “Quais são os tipos de receptores do macrófago? O que eles reconhecem?”.

Para a discussão destas indagações e complementar a visualização de células por DIC, excelentes revisões podem ser utilizadas, como Haas (2007) e Russel (2009). Elas detalharão a função de receptores como os receptores Toll-like (TLRs), os receptores *scavengers*, os receptores do complemento e os receptores de manose.

Outro aspecto importante a ser mencionado sobre receptores é a sua capacidade de ativação de rotas metabólicas. Estas transformações moleculares desencadeiam modificações variadas, incluindo morfológicas, como observado nas figuras 1 D-F e no vídeo 1. Pode-se discutir a questão: “Como são ativadas tais rotas metabólicas?” em maiores detalhes através da explicação de que o reconhecimento de padrões moleculares dos microrganismos pelos receptores dos macrófagos, conforme representado na figura 3, desencadeiam cascatas de sinalização que levam a inúmeras transformações da atividade celular, como a reorganização do citoesqueleto, ativação da expressão gênica com a produção de mediadores inflamatórios e citocinas e ativação de produção de radicais livres (HAAS, 2007 e RUSSEL, 2009). Estas cascatas de sinalização envolvem proteínas kinases, fosfatases, GTPases, enzimas modificadoras de lipídeos, complexos adaptadores, proteínas ligadas à actina e mediadores de fusão e fissão da membrana.

Estes resultados podem ser integrados a conteúdos trabalhados em diferentes disciplinas. Por exemplo, ao se enfatizar que a fagocitose de patógenos é crítica para o sistema imunológico, pois a sua sinalização culmina na resposta imunológica do tipo adaptativa (RANG E DALE, 2001), abre-se a possibilidade da integração com a imunologia. Este diálogo entre disciplinas faz com que o estudante desenvolva a capacidade de relacionar conteúdos vistos em disciplinas distintas, aprimorando o desenvolvimento de pensamentos de alto nível.



**Figura 3. Adesão das leveduras ao macrófago.** Observe em **A** a levedura (seta) aderida ao macrófago (asterisco). Essa interação acontece através dos receptores de membrana do macrófago que se ligam as moléculas da parede celular da levedura, com o mostrado na figura **B**. Uma vez ligados os receptores desencadeiam cascatas de ativação de rotas metabólicas.

### 6.2.2 Internalização

Pela simples comparação entre células não incubadas com leveduras (Fig. 1A e 2A) com células incubadas (Figs. 1C, 1G, 1H, 1I, 2B e 2C) é possível constatar que os macrófagos internalizaram leveduras, e essas aparecem no interior celular de forma inequívoca. Observa-se também o grande número de leveduras fagocitadas por um único macrófago (Fig. 1 C).

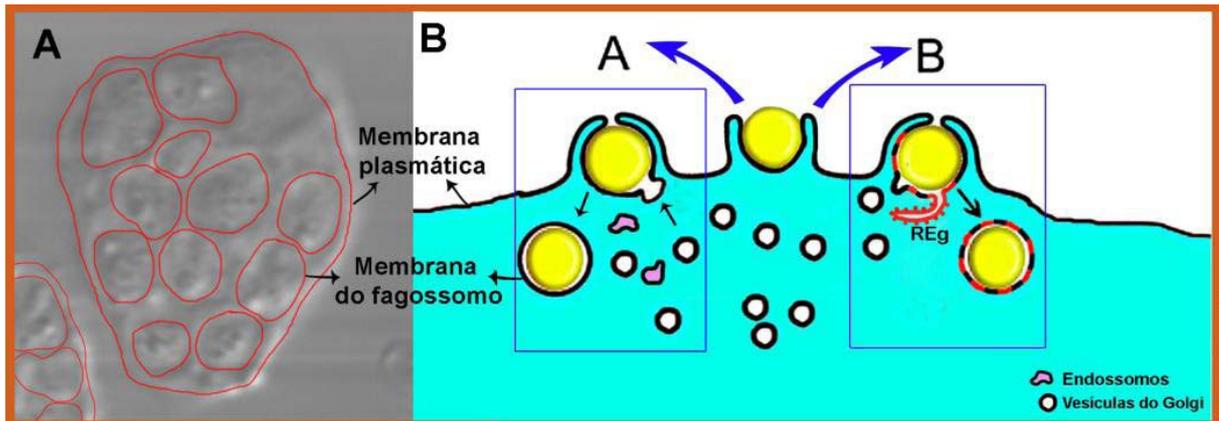
Os vídeos 1 e 4 mostram alguns dos eventos da fagocitose que podem ser observados através de DIC, dentre eles a internalização de leveduras.

### 6.2.3 Remodelagem de membranas e fontes de membranas dos fagossomos

De modo geral, os livros didáticos, como o de Alberts *et al* (2010) não discutem a dinâmica das membranas durante a formação do fagossomos. Comparando-se imagens como as figuras 1A e 1C, observa-se que não há uma redução no tamanho da área da membrana plasmática com a internalização de grandes quantidades de leveduras. Portanto, pode-se propor aos estudantes a questão “Qual é a fonte de membranas para reposição da membrana plasmática durante a fagocitose?”

De fato, existem duas hipóteses, conforme mostrado na figura 4. A primeira hipótese, convencional, propõe a incorporação de vesículas derivadas do Golgi e de endossomos iniciais ao fagossomo em formação, mantendo praticamente constante a área da membrana plasmática (Fig. 4, modelo A). A segunda hipótese, postulada recentemente, propõe a fusão

do retículo endoplasmático ao fagossomo, suprimindo, dessa forma, a necessidade de membranas para a sua formação (Fig. 4, modelo B) (TOURET *et al.*, 2005; ROGERS E FOSTER, 2007). Haas (2007) aponta que a fonte de membranas depende da célula fagocítica em questão, do seu tamanho, estrutura química e também do formato da partícula a ser fagocitada. Possivelmente, receptores dos macrófagos sejam os responsáveis por ativar diferentes estoques de membrana intracelulares.



**Figura 4. A origem das membranas durante a fagocitose.** Observa-se quantidade de fagossomos do macrófago em A, o que implica na necessidade do fornecimento de membranas. A origem destas membranas é explicada pelos dois modelos propostos em B. Modelo A propõe que a membrana é reposta por vesículas oriundas do complexo de Golgi e endossomos, enquanto o modelo B sugere que o retículo endoplasmático também pode se fundir diretamente ao fagossomo em formação.

#### 6.2.4 Formação de pseudópodos, internalização e citoesqueleto

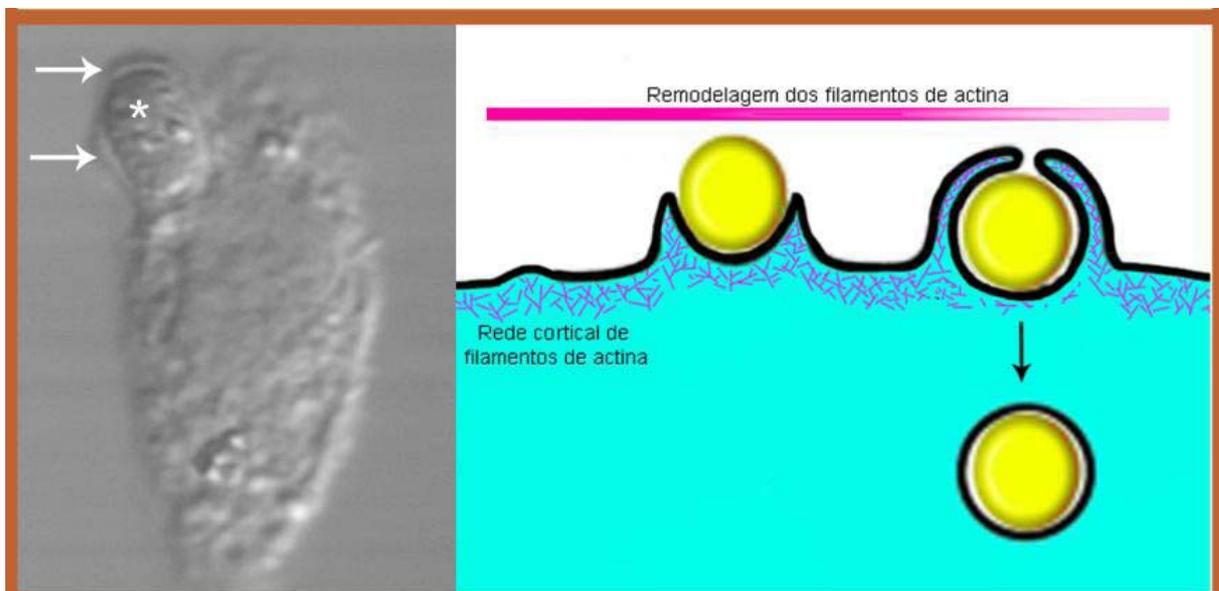
Um dos inúmeros processos celulares desencadeados pela ativação dos receptores dos macrófagos é a remodelagem dos filamentos de actina, o que dá suporte mecânico aos pseudópodos e ao processo de internalização (YEUNG *et al.*, 2006). Embora a observação de células vivas sem algum tipo de marcação não permita a visualização dos filamentos de actina, resultados como os observados nas figuras 1D-F e 5A, e nos vídeos 1 e 2, levam a seguinte questão, que pode ser proposta aos estudantes: “Tendo em vista a característica fluidez da membrana plasmática, como se explica que tenha a força mecânica necessária para englobar uma estrutura tão grande como uma levedura?”

Utilizando-se a bibliografia, torna-se possível extrapolar esses resultados e compreender o papel dos filamentos de actina na formação dos pseudópodos. Como se sabe, acontece a despolimerização da rede cortical de filamentos de actina e a sua repolimerização, no sentido a sustentar mecanicamente as projeções celulares que se formam ao redor do material a ser fagocitado (GIRAO *et al.*, 2008 e SWANSON, 2008), e a reorganizar a base do fagossomo nascente.

Diversos filmes publicados *online*, apresentando resultados obtidos a partir de avançadas metodologias, suportam esta interpretação (tabela 2).

Site	Referência
<a href="http://mcbi.ouhsc.edu/clarkelab/phagocytosis_movies/Clark_e_Movie1.mov">http://mcbi.ouhsc.edu/clarkelab/phagocytosis_movies/Clark_e_Movie1.mov</a>	Clarke e Maddera, 2006
<a href="http://www.molbiolcell.org/content/vol0/issue2004/images/data/E03-11-0847/DC1/video1.mov">http://www.molbiolcell.org/content/vol0/issue2004/images/data/E03-11-0847/DC1/video1.mov</a>	Hoppe e Swanson, 2004
<a href="http://jcs.biologists.org/content/vol119/issue9/images/data/1903/DC1/JCS02876movie1.mpg">http://jcs.biologists.org/content/vol119/issue9/images/data/1903/DC1/JCS02876movie1.mpg</a>	Herant <i>et al.</i> , 2006

**Tabela 2.** Filmes que apresentam o remodelamento da actina durante a fagocitose.



**Figura 5. Grandes modificações morfológicas na parede apical do citoplasma são verificadas na fagocitose. A.** Observe as projeções citoplasmáticas (setas) ao redor da levedura (asterisco). **B.** Esquema representativo da remodelagem dos filamentos de actina. Observe que as projeções celulares (setas) são sustentados mecanicamente pelos filamentos de actina e que a rede cortical deste filamentos torna menos espessa na base da região de internalização

### 6.2.5 Movimentação dos fagossomos no citoplasma

As figuras 1G-H e os vídeos 3 e 4 mostram dois momentos sequenciais da movimentação dos fagossomos/fagolisossomos no citoplasma. O fagossomo desloca-se no citoplasma através de proteínas motoras e microtúbulos. Da mesma forma, a fusão entre compartimentos requer o correto posicionamento dos mesmos, proporcionado pelos microtúbulos (BOTELHO E GRINSTEIN, 2011). Além disso, estes filamentos de tubulinas são os responsáveis pelo transporte das vesículas que partem do fagossomo em direção a membrana plasmática, durante a apresentação de antígenos (ARAKI, 2006).

### 6.2.6 Maturação e digestão

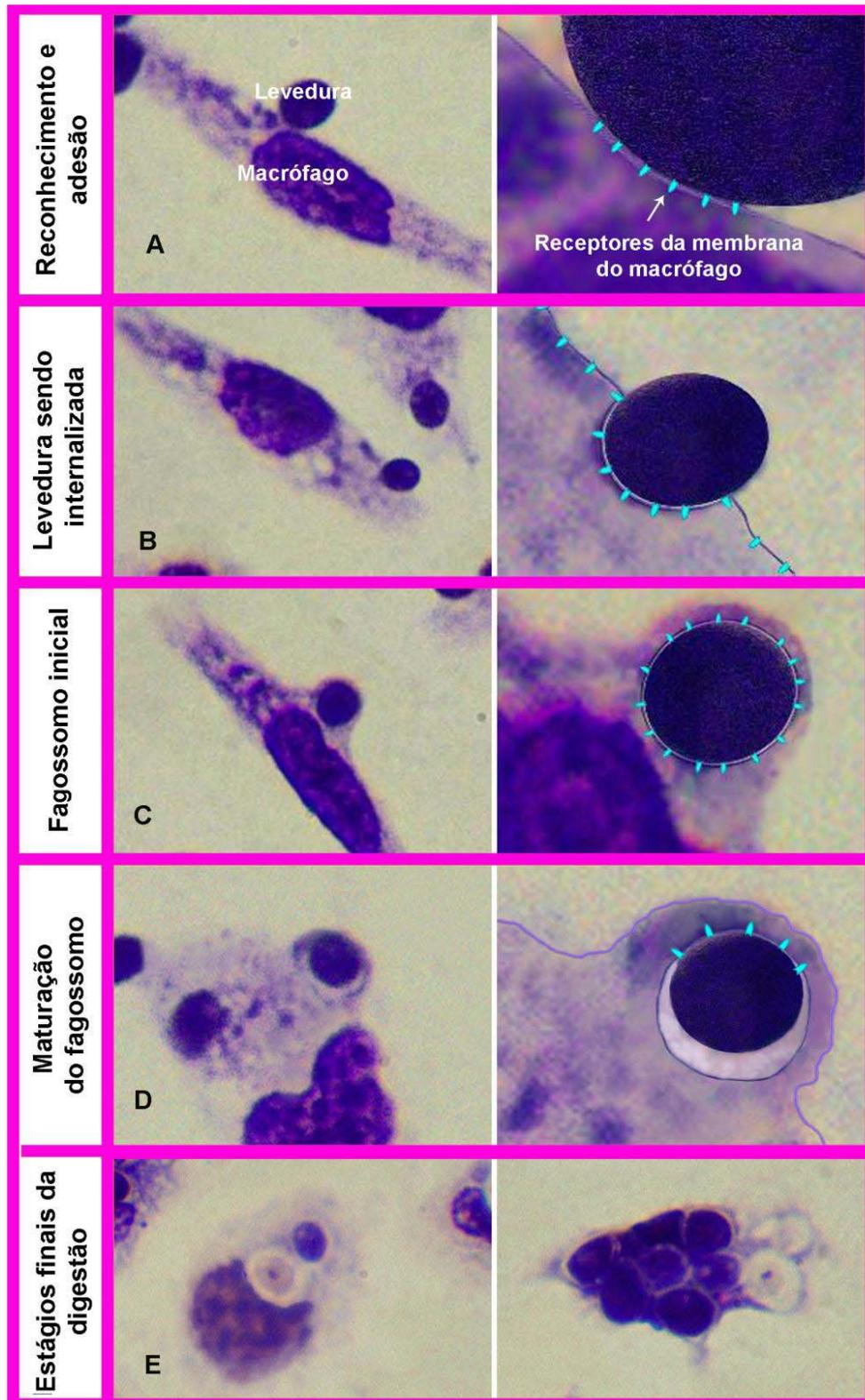
Células como as observadas na figura 11 e vídeo 1 mostram resíduos no interior de grandes compartimentos, sugerindo a degradação do material internalizado. Baseando-se nesses resultados e na literatura, torna-se possível discutir a maturação dos fagossomos. É consenso que, através da maturação, uma série coordenada de fusões entre o fagossomo e compartimentos do sistema endossomal e lisossomal, forma-se o fagolisossomo (LEWIS *et al.*, 2012), compartimento de pH ácido que contém hidrolases que atuam na digestão da levedura.

## 6.3 COMPREENDENDO A FAGOCITOSE ATRAVÉS DA COLORAÇÃO GIEMSA

A coloração Giemsa, metodologia clássica que possibilita a diferenciação entre leveduras recém internalizadas pelos macrófagos e leveduras que já sofreram a ação das enzimas hidrolases, mostra com clareza as alterações morfológicas em leveduras fixadas e coradas. Portanto, para a observação da digestão, dentre as metodologias analisadas, esta seria a mais adequada, sendo um método barato e de fácil de execução, possibilitando a observação de vários eventos importantes da fagocitose, conforme descrito nos itens a seguir.

### 6.3.1 Adesão

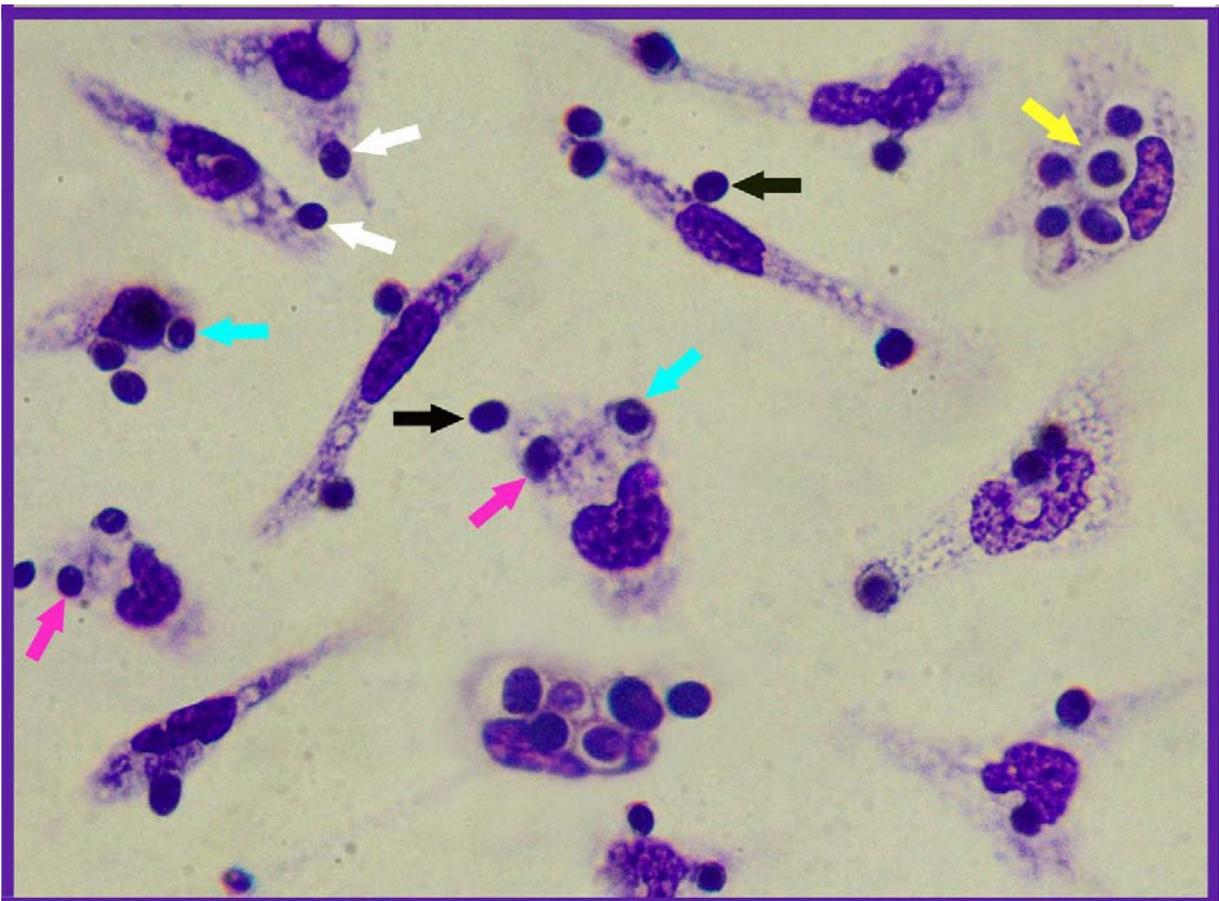
Através da coloração Giemsa, assim como por DIC, é possível observar a adesão (Figs. 6 A-B e 7, setas pretas).



**Figura 6. Estágios da fagocitose. A-D - Coluna da direita: fotomicrografias sem nenhuma edição. Coluna da esquerda: fotomicrografias ampliadas e editadas.** Observe na figura **A** a levedura aderida ao macrófago, representativa do estágio de adesão. Em **B**, na etapa seguinte, a levedura começa a ser internalizada. Em **C**, a levedura encontra-se completamente internalizada, sendo acomodada dentro do fagossomo. Em **D**, a maturação do fagossomo. E - Os estágios finais da fagocitose, os fagolisossomos apresentam somente resíduos da levedura, já digeridas, dentro do compartimento.

### 6.3.2 Internalização

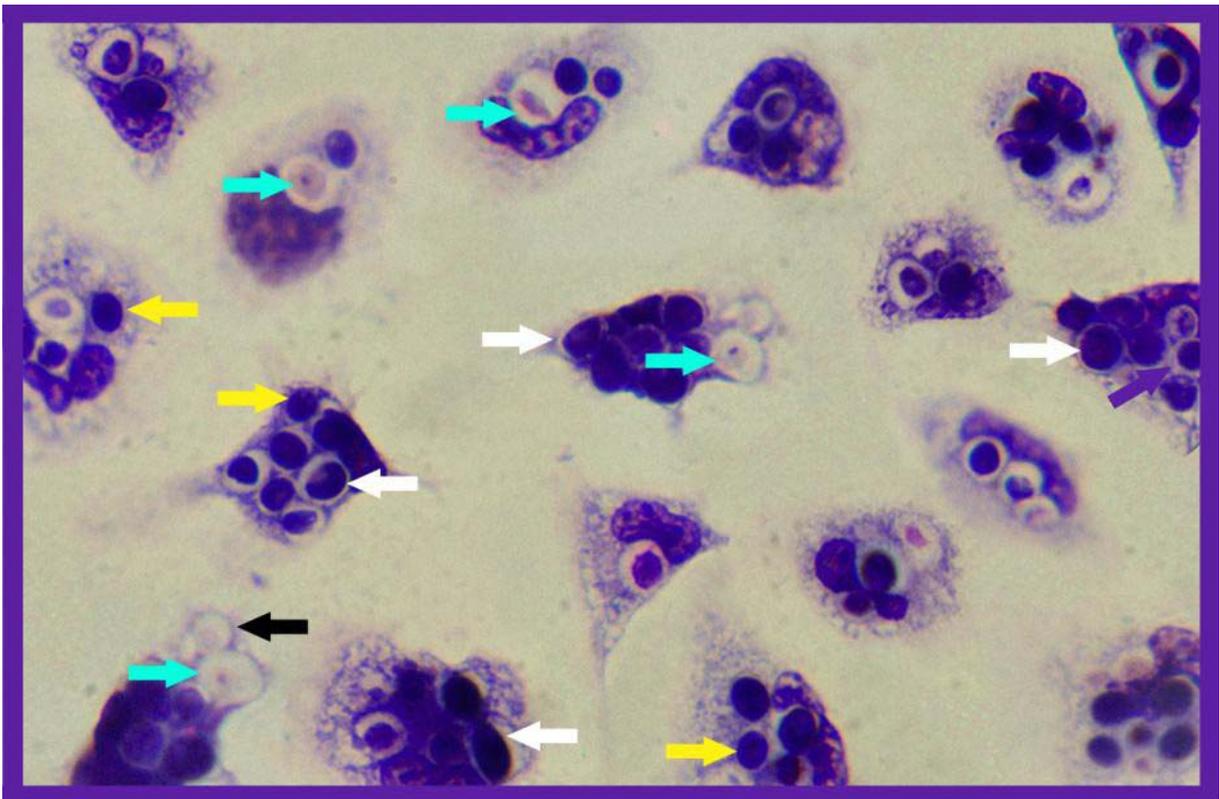
A coloração Giemsa possibilita a verificação de leveduras em diferentes estágios de internalização até a sua inclusão no citoplasma (Figs. 6 B e 7, setas brancas). O fagossomo formado é facilmente visualizado no interior do citoplasma (Figs. 6C e 7, setas rosas). O processo de ingestão segue o padrão “modo-zíper” no qual o receptor do macrófago e ligante da partícula interagem por toda a superfície da partícula levando a aposição muito próxima entre partícula e membrana do fagossomo (COSSAR E SANSONETTI, 2004), como representado nas figuras 6 B-C. Assim, nos primeiros momentos da internalização do fagossomo, as imagens observadas sugerem que a levedura está em contato direto com o citoplasma, visto que não se visualiza membrana em microscopia de luz (Figs. 6C e 7, setas rosas). Os resultados obtidos através de MET confirmam que fagossomos recém formados apresentam levedura ainda totalmente ligada à membrana fagossomal (Fig. 18).



**Figura 7. Fases iniciais da fagocitose.** Observa-se leveduras aderidas (setas pretas), em processo de internalização (setas brancas), internalizadas sem halo claro ao redor (setas rosas) e internalizadas com halo claro ao redor somente em uma parte do fagossomo (setas azuis) e com um halo claro ao redor de toda a levedura (seta amarela).

### 6.3.3 Receptores e maturação dos fagossomos

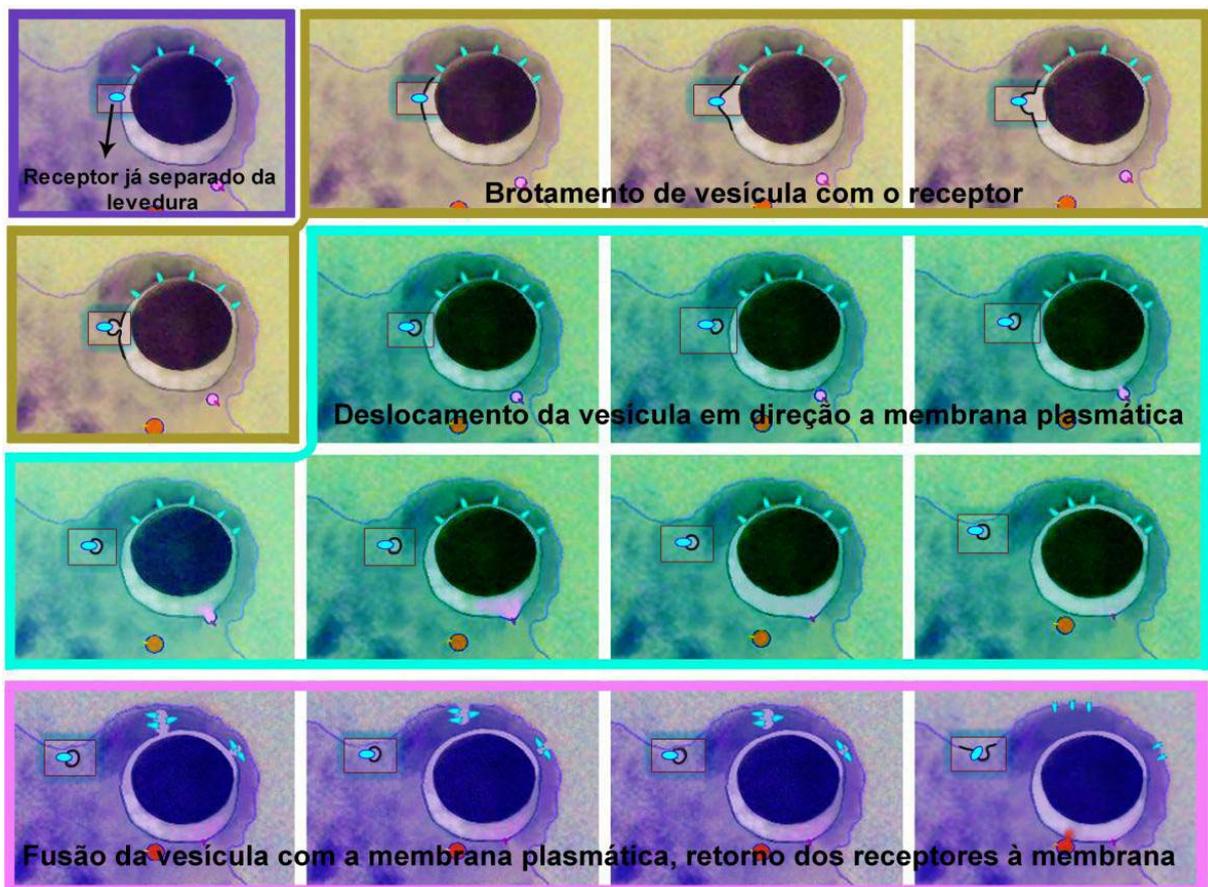
Morfologia arredondada e cor intensa são observadas nas leveduras não internalizadas (Figs. 6A e 7, setas pretas). Estas características permanecem durante os primeiros estágios após a internalização (Figs. 6 A-D). A medida em que o fagossomo amadurece, verifica-se a separação entre a levedura e a membrana fagossomal (Figs. 6E e 7, setas azuis e seta amarela; Fig. 8, setas brancas). Verifica-se também grandes alterações de formato e de cor nas leveduras (Fig. 8, setas azuis e seta preta), em contraste com o que se observa em certas leveduras, que parecem estar em contato com o citoplasma (Figs. 6C e 7, setas rosas; Fig. 8, setas amarelas). Estes resultados podem ser usados pelo professor pois intrigam e suscitam questionamentos como : “O que leva a estas alterações morfológicas?”; “O que representa o halo claro ao redor das leveduras?”.



**Figura 8. Estágios avançados da fagocitose.** Leveduras logo após a internalização (setas amarelas) mostram cor intensa e sem alterações morfológicas maiores; leveduras com halo claro ao redor (setas brancas) evidenciam seu desligamento dos receptores; leveduras em estados adiantados de digestão (setas azuis) exibem grandes modificações morfológicas; fagolisossomos com pouco resíduo (seta preta) demonstra estado avançado da digestão.

Para responder a essas questões, torna-se necessário conhecer a maturação dos fagossomos. Resumidamente, a medida em que o fagossomo funde-se sequencialmente a endossomos e lisossomos, o ambiente bioquímico muda e o pH fica mais ácido (BOTELHO E GRINSTEIN, 2011). Dependendo do receptor envolvido neste processo, a interação com o

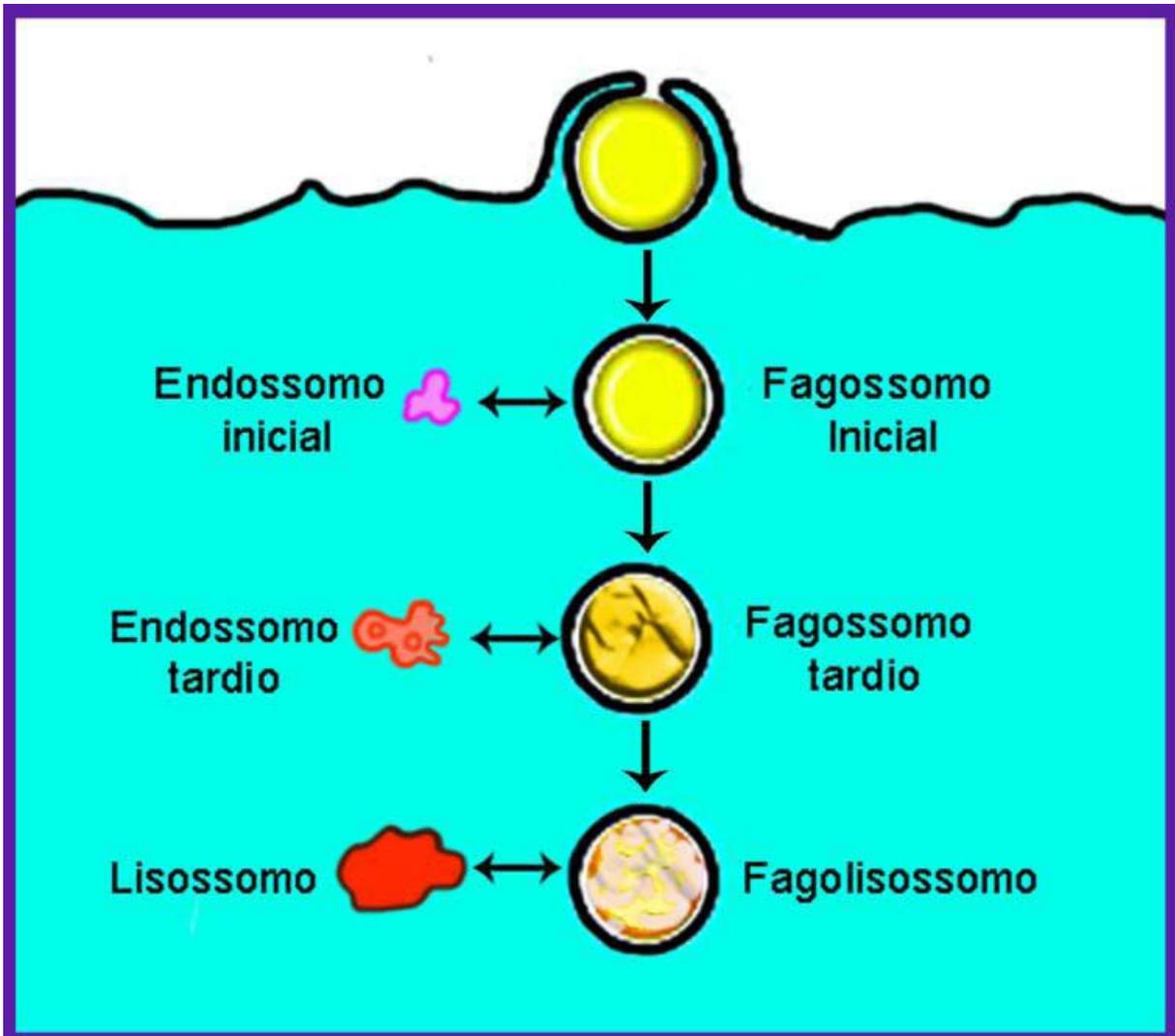
ligante (levedura) se altera, sendo o receptor desligado de sua carga, retornando a membrana plasmática no processo de reciclagem (BUCHI E SOUZA, 1992) e gerando um halo entre levedura e membrana fagossomal, agora não mais unidos. A figura 9 apresenta alguns quadros da animação do vídeo 9 (construído a partir da célula mostrada na figura 6D), representando o retorno dos receptores à membrana plasmática. Além da reciclagem dos receptores, são mostrados na animação, a fusão entre fagossomos e endossomos seguida da fusão entre fagossomos e lisossomos e digestão. Dessa forma, as leveduras que apresentam um halo claro incompleto ao seu redor, como observado na figura 6D, representam os primeiros estágios da maturação, quando acontece o desligamento gradual entre os receptores e a parede celular da levedura. Como a levedura ainda apresenta um aspecto íntegro (morfologia arredondada e cor intensa), conclui-se que a sua digestão ainda não se iniciou de maneira significativa.



**Figura 9. Reciclagem de receptores.** Receptores desligados da levedura (quadrado lilás) são removidos do fagossomo através de brotamentos de vesículas (quadrados amarelos), que migram até a membrana plasmática (quadrados verdes), fundem-se e incorporam-se a ela (quadrados lilás).

A medida em que o fagossomo amadurece, devido entre outros eventos, às fusões com endossomos/lisossomos (Fig. 10), ele adquire a capacidade de degradar o material internalizado. No modelo utilizado as alterações morfológicas nas leveduras são facilmente

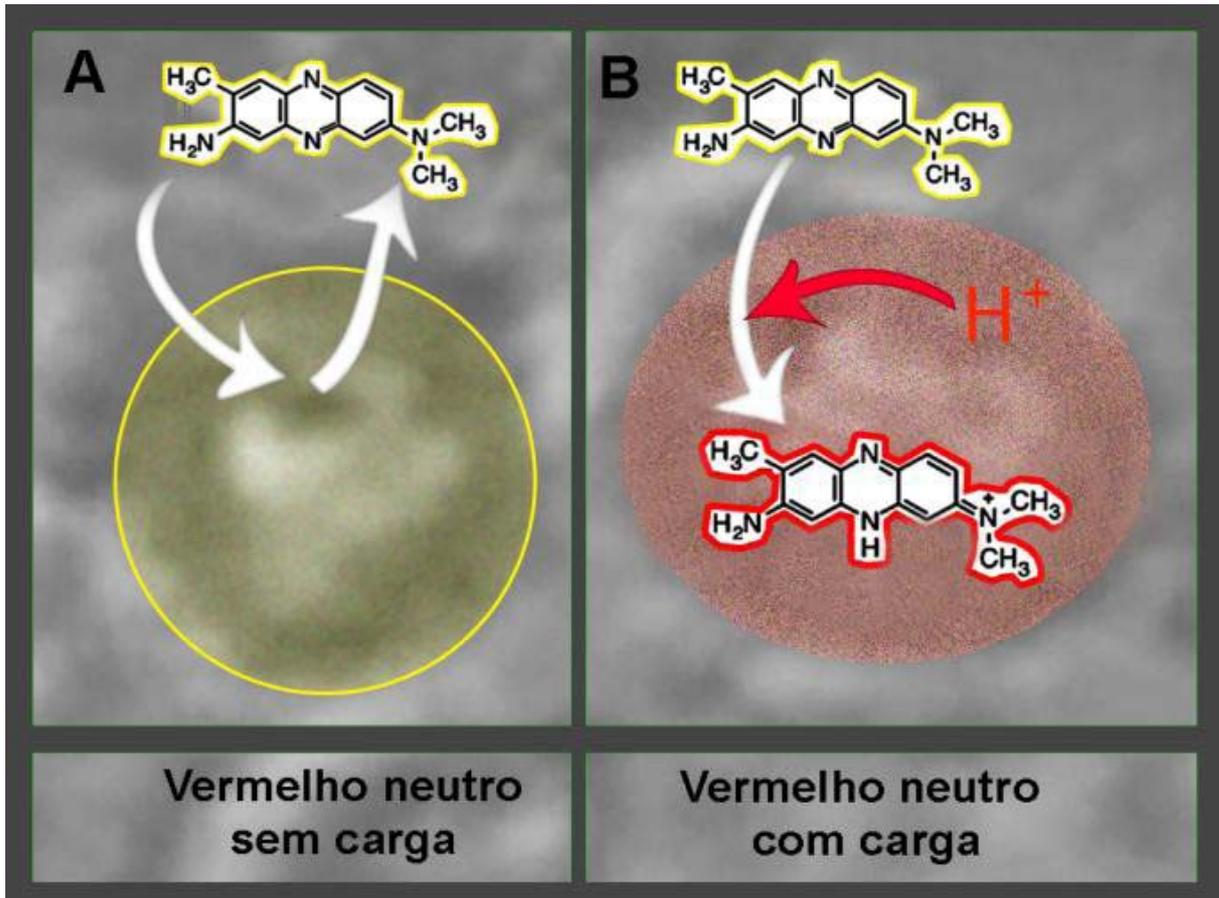
observadas, como mostrado nas figuras 6E-F e na figura 8 (setas azuis). Essas alterações evidenciam o processo de digestão.



**Figura 10. Maturação do fagossomo.** Sequência de fusões de vesículas do sistema endossomo/lisossomo que se inicia com o fagossomo inicial e culmina no fagolisossomo.

#### 6.4 COMPREENDENDO A ACIDIFICAÇÃO DO FAGOSSOMO ATRAVÉS DA CAPTURA DO VERMELHO NEUTRO

A molécula de vermelho neutro é uma base fraca e lipofílica, que no estado não protonado, difunde-se através das membranas. Uma vez dentro dos compartimentos ácidos (como endossomos, lisossomos e fagolisossomos), torna-se protonada (TIMMERS *et al.*, 1995) e contida no compartimento, corando-o de vermelho, como observado na figura 11. Esta coloração foi muito usada para estudar o sistema lisossomal de macrófagos durante a fagocitose e também em testes citotóxicos, devido a se acumular no interior de lisossomos intactos.

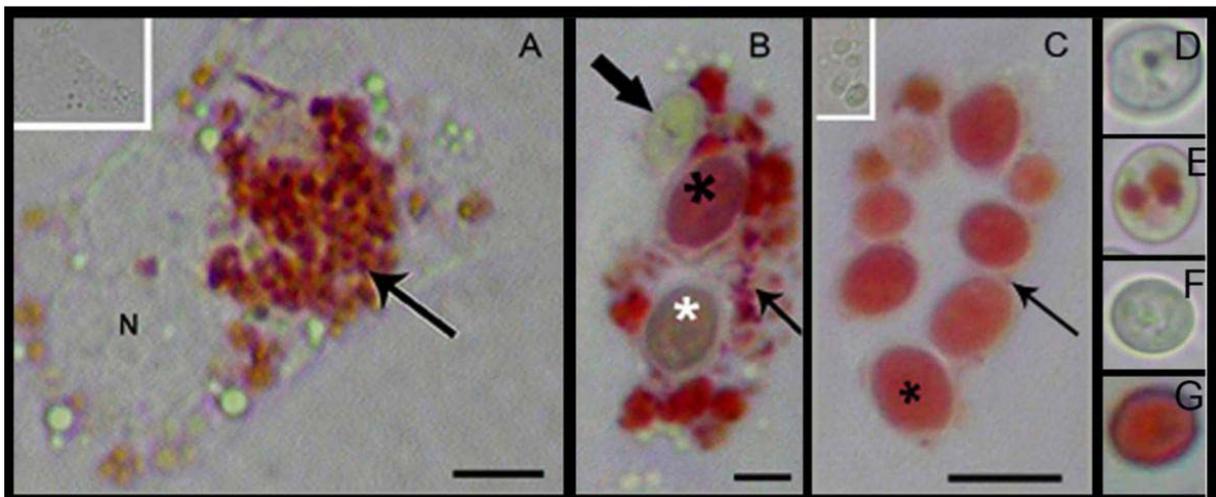


**Figura 11. Mecanismo de coloração vermelho neutro.** A molécula do vermelho neutro, em sua forma não protonada (Fig. A) atravessa livremente as membranas biológicas. Quando esta molécula entra em contato com prótons ( $H^+$ ) presentes em compartimentos ácidos, ela torna-se protonada (Fig. B). Neste estado, a molécula de vermelho neutro fica impedida de atravessar membranas biológicas, sendo retida no interior dos compartimentos ácidos e portanto corando-os de vermelho.

A microscopia de luz com a utilização do vermelho neutro pode ser extremamente útil para, após obter o conhecimento do modo de funcionamento do vermelho neutro, o estudante realizar o reconhecimento de compartimentos ácidos, a partir da aplicação do seu conhecimento prévio sobre vermelho neutro e fagocitose. Ainda, a microscopia com vermelho neutro é uma metodologia que utiliza células vivas, portanto, o estudante observa o desenvolvimento do processo de acidificação do compartimento, notando a mudança da coloração da organela, como observado nos vídeos 10 e 11. Dessa forma, desperta-se o interesse do estudante e o aproxima da realidade do processo. O professor pode guiar o estudante neste caminho ao questioná-lo: “Por que os compartimentos apresentam coloração diferenciada? Qual é a relação entre a cor do compartimento e o seu grau de maturação?”. A observação de que macrófagos não incubados com leveduras apresentam numerosas vesículas coradas (Fig. 12A) apoiam o conceito de que as vesículas vermelhas

observadas são compartimentos ácidos, correspondendo a endossomos ou lisossomos (BOUVIER *et al.*, 1994; GARIN *et al.*, 2001; HAAS, 2007; RUSSEL *et al.*, 2009).

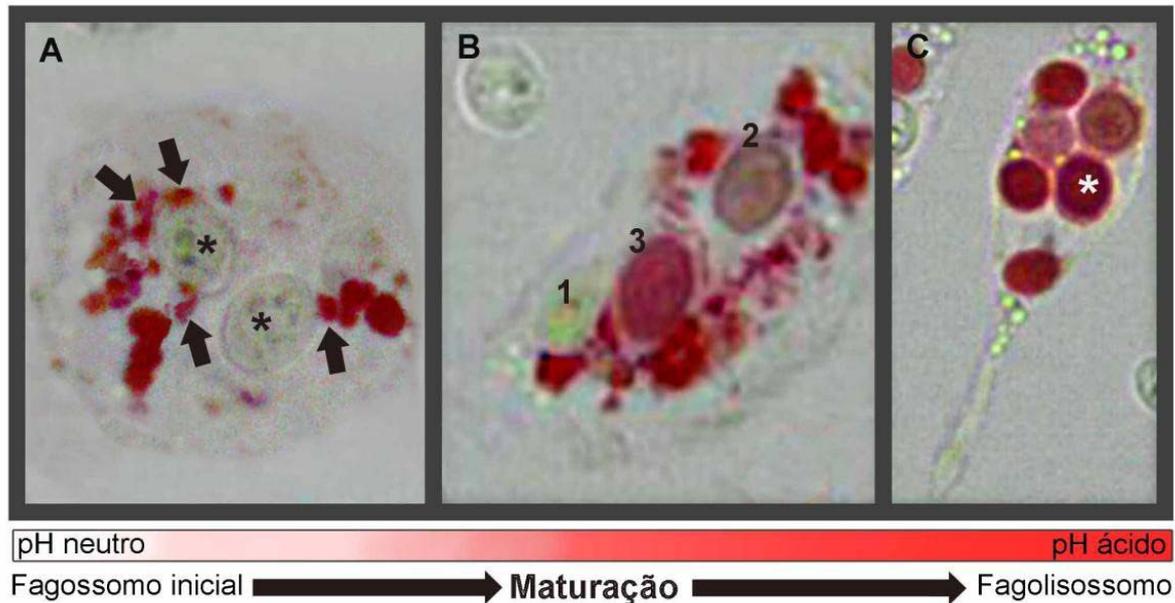
Após incubação dos macrófagos com leveduras, nota-se que leveduras vivas (Fig. 12D) e mortas (Fig. 12F) não se coram na concentração de vermelho neutro usada nesses testes. Em concentrações maiores, contudo, leveduras mortas (Fig. 12G) se coram homogeneamente. Portanto, as leveduras vermelhas no interior dos fagolisossomos demonstram que este compartimento tornou-se ácido, retendo o vermelho neutro (TRAVERS *et al.*, 2007) em concentrações altas o suficiente para corar leveduras (Fig. 12E). Assim, sugere-se que leveduras coradas (Figs. 12B-C) foram mortas no interior dos fagolisossomos.



**Figura 12. Acidificação do fagossomo observada por captura do vermelho neutro. A-C. Captura do vermelho neutro por macrófagos** A. Macrófagos não incubados com leveduras contendo diversas pequenas vesículas ácidas (setas) B. Macrófago incubado com leveduras contendo pequenas vesículas com vermelho neutro (setas finas) e diferentes padrões de coloração nos fagossomos/fagolisossomos: sem coloração (seta grossa), levemente corada (asterisco branco), intesamente corada (asterisco preto) C. Todas as leveduras internalizadas apresentando intensa coloração vermelha (asterisco). Note poucas vesículas no citoplasma (seta). **D-G. Captura do VN por leveduras.** D. Levedura viva não corada por vermelho neutro. E. Levedura capturando gradualmente o vermelho neutro F. Levedura morta não corada por vermelho neutro (baixas concentrações). G. Levedura morta corada por vermelho neutro (altas concentrações).

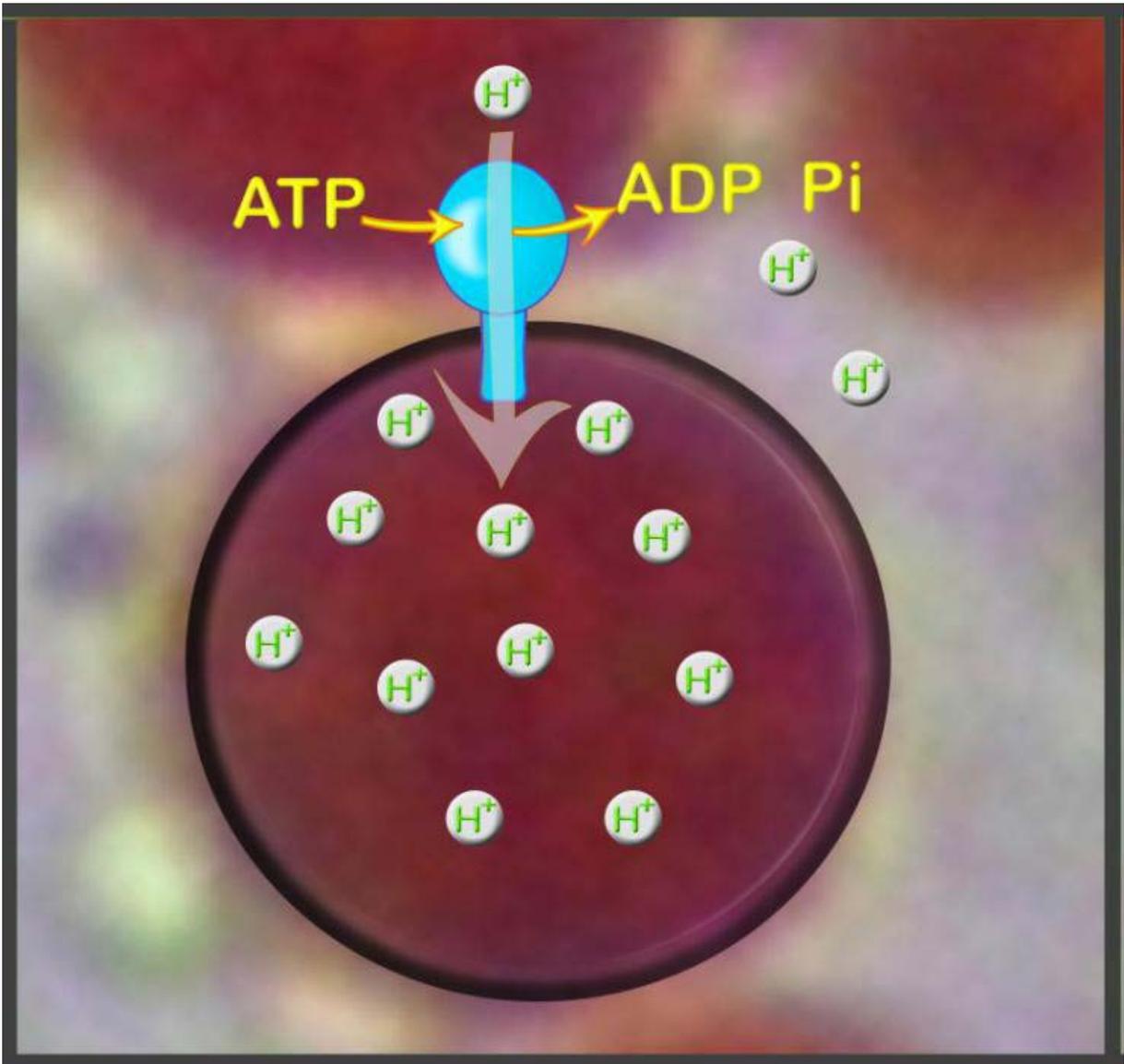
Como a coloração vermelho neutro pode diferenciar, nas células vivas, os compartimentos ácidos dos compartimentos com pH neutro e básico (Fig. 13), pode-se observar células nas quais nenhum fagossomo está corado (Fig. 13A), ou seja, fagossomos iniciais ainda não tendo iniciado a sua sequência de fusões; células com compartimentos com diferentes graus de coloração (Fig. 13B); e células com todos os compartimentos corados (Fig. 13C), ou seja, quando o fagolisossomo já está ácido. Outro aspecto interessante é a proximidade de vesículas coradas (endossomos tardios/lisossomos) aos fagossomos (Fig. 13 A), necessária para os processo de fusão. Nos vídeos 10 e 11, é

possível observar a coloração gradual de leveduras, ou seja, a acidificação, em andamento. A observação do fato em si pode ser muito estimulante, suscitar a curiosidade e levar o observador a procurar uma explicação para os fenômenos observados.



**Figura 13. Acidificação dos fagossomos observada através vermelho neutro.** Observe em **A** vesículas vermelhas (endossomos e lisossomos) (setas), justapostas aos fagossomos não corados (asteriscos), portanto neutro. Note em **B**, diferentes graus de acidificação: fagossomo 1 ainda está neutro, 2, apresentando coloração vermelha mais suave e 3, bem corado, Em **C** todos os fagossomos (\*) estão ácidos.

Os resultados com vermelho neutro podem ser utilizados para embasar explicações mais detalhadas a respeito da acidificação, pois, nos estágios iniciais da fagocitose, o fagossomo não apresenta a bomba de prótons responsável pela acidificação, V-ATPase (Fig. 14). A medida em que sofre maturação, a V-ATPase aumenta na membrana fagossomal. Sendo assim, sugere-se que a incorporação da V-ATPase acontece pelas fusões com compartimentos mais tardios do sistema lisossomal (HAAS, 2007; RUSSEL *et al.*, 2009; SUN-WADA *et al.*, 2009). Com a fusão entre fagossomos e endossomos/lisossomos, há também a liberação de diferentes tipos de hidrolases (proteases, DNases, lipases, etc.) que atuam em meio ácido digerindo o material presente no interior do compartimento e liberando-o na forma de produtos monoméricos e oligoméricos (HAAS, 2007).



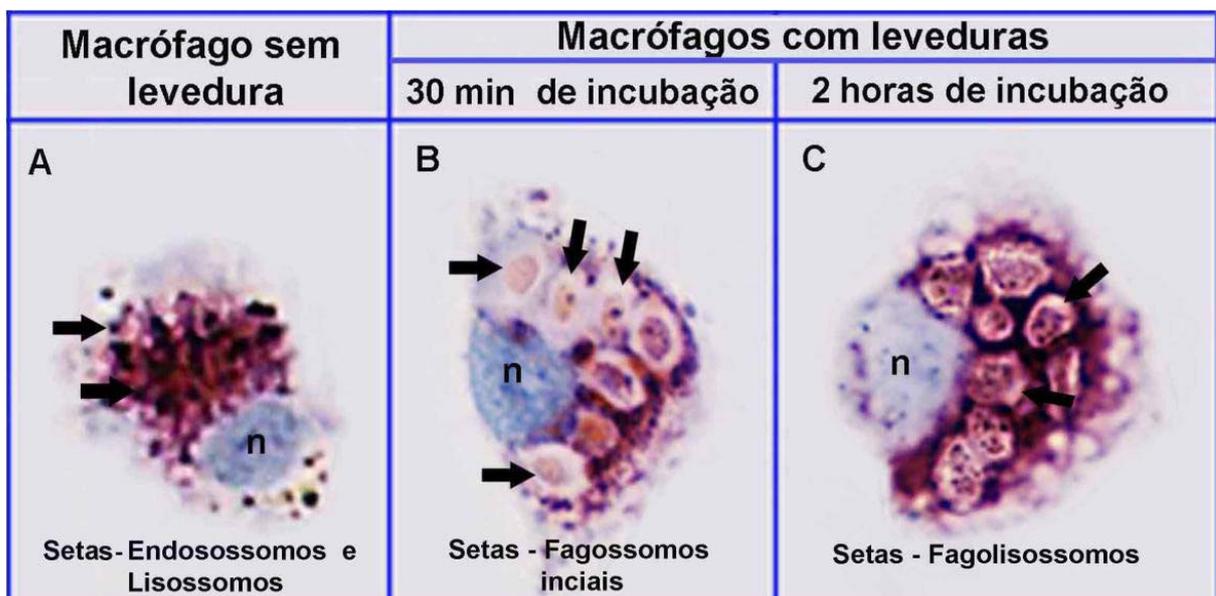
**Figura 14. Bomba V-ATPase.** A V-ATPase realiza transporte ativo, utilizando a energia do ATP (convertido em ADP+fosfato), para bombear prótons (H<sup>+</sup>) para o interior do compartimento, tornando-o ácido.

#### 6.5 COMPREENDENDO A PRESENÇA DE ENZIMAS NO FAGOLISSOSSOMO

Sabe-se de longa data que os fagolisossomos estão repletos de enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão da maior parte dos compostos orgânicos. A fosfatase ácida, uma destas enzimas hidrolíticas, cuja reação citoquímica é utilizada para a identificação do sistema lisossomal (ROBINSON E KARNOVSKY, 1983), é um bom parâmetro para se observar e discutir a liberação das enzimas hidrolíticas no fagossomo. A reação citoquímica para fosfatase ácida gera um produto de reação vermelho-arroxeadado visível em microscopia de luz, o que permite a observação e comparação entre diferentes estágios de amadurecimento dos fagossomos. Os resultados de pesquisa contendo citoquímica para fosfatase ácida podem ser usados para instigar os estudantes a pensar à respeito de como

ocorre a digestão do material fagocitado. Perguntas como: “Como o fagossomo adquire a capacidade de digerir e matar o material internalizado?” podem ser utilizadas no auxílio da construção do conhecimento sobre este tópico.

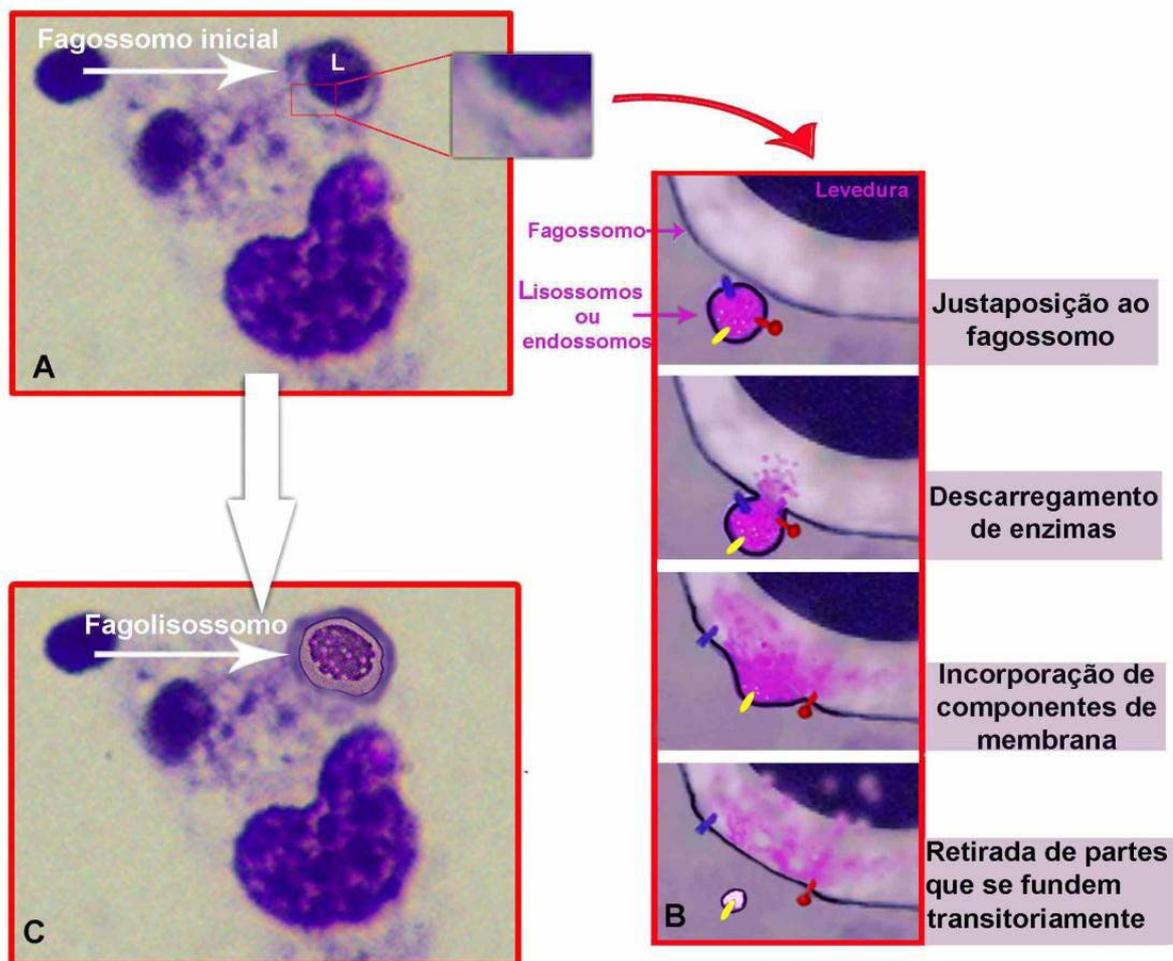
Nos estágios iniciais da maturação do fagossomo não é possível detectar o marcador para a fosfatase ácida no interior dos fagossomos, observado somente no interior de compartimentos como lisossomos e endossomos, conforme ilustra a figura 15B. Nos estágios posteriores de maturação, o marcador é encontrado nos compartimentos contendo leveduras (Fig. 15C), sugerindo a liberação da fosfatase ácida no interior do fagossomo. A comparação entre estes estágios de maturação dos fagossomos é útil para discutir a maturação como um evento dinâmico e sequencial.



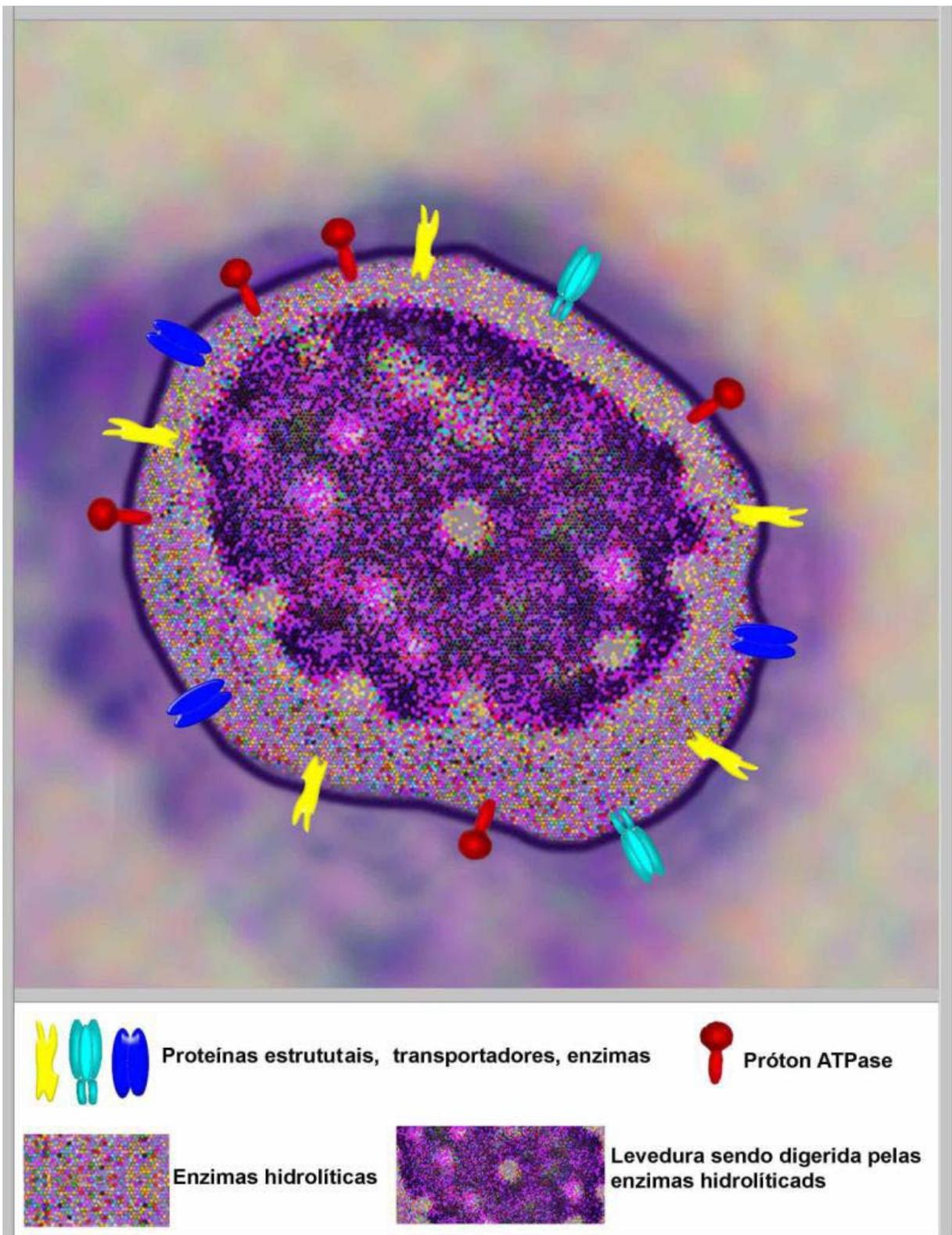
**Figura 15. Fosfatase ácida em macrófagos.** **A.** Macrófagos não incubados com leveduras exibem o citoplasma repleto com endossomos e lisossomos. **B.** Após incubação com levedura e fagocitose observa-se que os fagossomos iniciais não apresentam marcação para fosfatase ácida. **C.** Nos estágios avançados esta enzima fica evidente no lúmen de fagolisossomos.

A fosfatase ácida, como as demais hidrolases, é descarregada nos fagossomos durante a maturação através da fusão entre o fagossomo e vesículas do sistema endossomo/lisossomo. Na fusão, as duas bicamadas lipídicas se unem transitoriamente, sendo assim, seus conteúdos podem ser liberados enquanto que constituintes de membrana podem se integrar na membrana (HAAS, 2007), como observado na figura 16B. Sabe-se que o precursor da fosfatase ácida lisossomal é sintetizado como uma glicoproteína de membrana e então chega aos lisossomos através da via endocítica. Nos lisossomos, o domínio luminal do precursor da fosfatase ácida é liberado na matriz lisossomal (PETERS E FIGURA, 1994). Através dessa metodologia, pode-se concluir que as enzimas lisossomais são transferidas para o fagossomo e/ou fagolisossomo, enzimas estas importantes não só

por digerirem os componentes do material fagocitado mas também por participarem do processo de apresentação de antígenos pelos macrófagos, ligando, dessa forma, a resposta imunológica inata à resposta imunológica adquirida (RANG E DALE, 2001). Assim, fagocitose e a digestão intracelular transcendem a morte e destruição do patógeno e capacitam o organismo para a produção de anticorpos e para o restante dos processos relacionados a imunidade e a defesa do organismo. Portanto, o professor pode utilizar esta metodologia ao explicar o conceito de resposta imunológica, integrando diferentes áreas do conhecimento, no caso, biologia celular e imunologia, e direcionando o estudante a relacionar informações vistas em diferentes disciplinas, analisando e atingindo a aprendizagem plena.



**Figura 16. Representação da liberação de enzimas e incorporação de componentes de membrana no fagolisossomo.** Representação utilizando como base macrófagos corados por Giemsa. **A.** O fagossomo inicial contendo levedura (L) após fusões com endossomos e lisossomos. **B.** O fagossomo transforma-se em um fagolisossomo. **C.** O fagolisossomo torna-se competente para digerir a levedura. Observe que acontece a liberação de conteúdo das vesículas que se fundem e a difusão lateral de componentes da membrana (Fig. B).



**Figura 17. Composição do fagolisossomo.** A membrana apresenta proteínas de membrana tais como enzimas, proteínas estruturais, transportadores de membrana para importação de moléculas do citoplasma e exportação dos monômeros oriundos da digestão, além da próton ATPase. No lúmen do fagolisossomo, mais externamente, observa-se o pool de enzimas hidrolíticas como proteases, lipases, glicosídeos, nucleases e fosfatases. Enquanto que, mais internamente, nota-se leveduras sendo submetidas ao processo de digestão pela ação das enzimas hidrolíticas.

## 6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

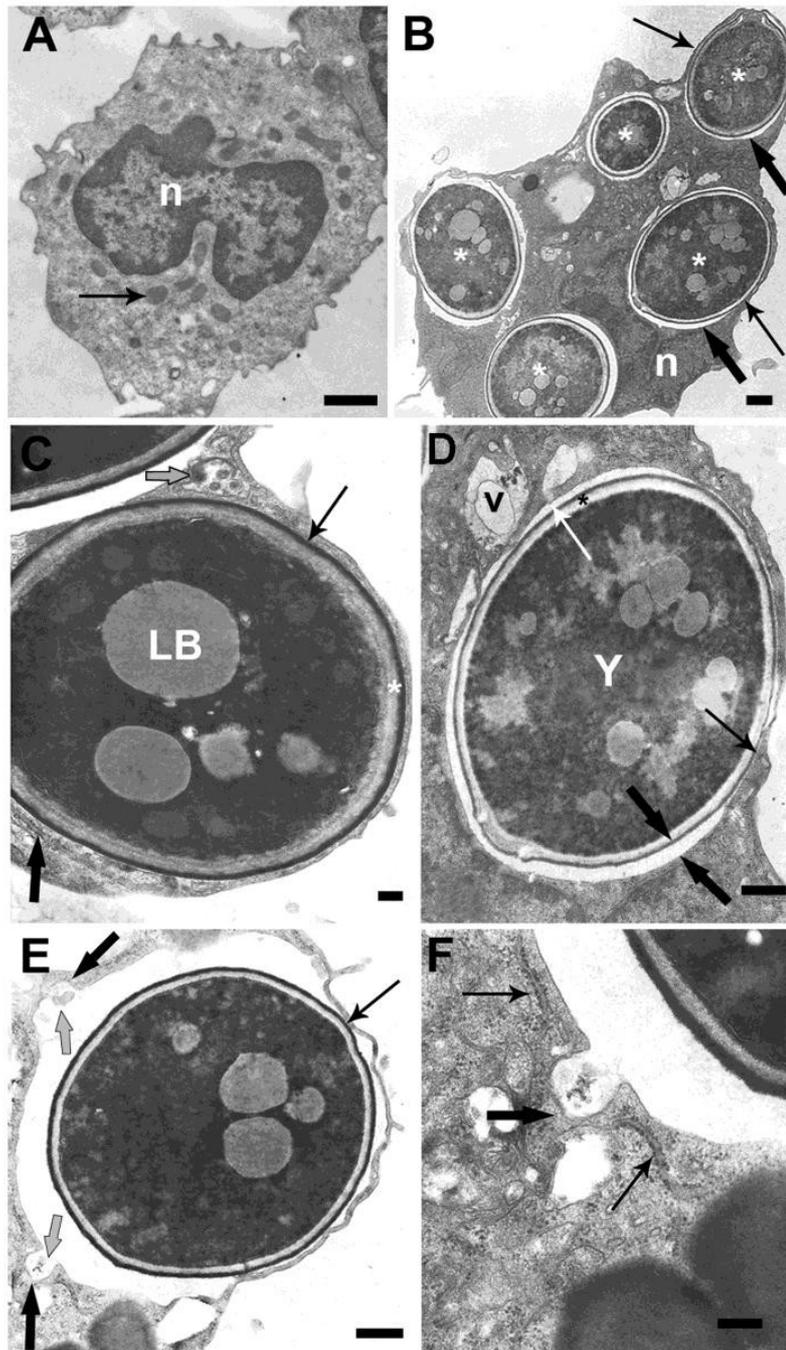
Muito do progresso da ciência se deve aos avanços na capacidade de visualização da morfologia celular (LIU, 2007). Um desses avanços foi a criação do microscópio eletrônico de transmissão, com capacidade de magnificação e de resolução mil vezes superior a oferecida pelo microscópio de luz (BOZZOLA, 1992), sendo, portanto, recomendado para a observação de detalhes morfológicos. Neste trabalho, as análises através de MET (Fig. 18) permitiram observar características da fagocitose que trouxeram informações importantes sobre os primeiros estágios da maturação do fagossomo em nível ultraestrutural e que permitiram interpretar com segurança resultados em microscopia de luz. Contudo, a MET pode ser utilizada também para aprimorar o processo de ensino-aprendizagem, na observação de estruturas menores e detalhes da célula. Sendo esta metodologia de difícil realização, necessitando de estrutura física e pessoal adequados, além do alto custo financeiro, outra possibilidade seria a observação e análise de eletronicografias.

As imagens obtidas, aqui resumidas na figura 18, mostram leveduras internalizadas com suas paredes celulares parcialmente aderidas à membrana do fagossomo (Figs. 18B e 18D). Algumas leveduras exibem suas paredes totalmente aderidas à membrana do fagossomo (Fig. 18C), enquanto outras se apresentam, em diferentes graus, desligadas delas (Figs. 18D e 18E). Estes resultados confirmam os obtidos com Giemsa (Figs. 6, 7 e 8) e podem ser utilizados em conjunto. No início do processo da fagocitose, existe um contato extremamente próximo entre a levedura e a membrana fagosomal devido à ligação química entre os receptores do macrófago e componentes presentes na parede celular da levedura. Conforme acontece a maturação, o pH diminui e o ambiente bioquímico muda. Esse novo ambiente bioquímico interfere na estrutura proteica (HAAS, 2007), e muda a ligação entre os componentes da parede celular da levedura e os receptores da membrana. Dessa maneira, acontece o desligamento da levedura tornando-a livre no compartimento (BUCHI E SOUZA, 1992). Assim forma-se gradualmente um halo entre a levedura e a membrana do fagossomo.

Vesículas de morfologia heterogênea, característica de endossomos, lisossomos e corpos multivesiculares, são comumente observadas próximas do fagossomo (Figs. 18C e 18D) ou intimamente ligadas à sua membrana (Fig. 18D). Essas imagens sugerem a ocorrência da etapa inicial da interação entre fagossomo e vesícula, que culmina com a fusão e o descarregamento de enzimas e outros componentes na membrana no lúmen fagosomal. Deve-se, entretanto, considerar que durante o processo de fagocitose acontecem fissões e brotamentos diversos a partir do fagossomo (YEUNG *et al.*, 2006).

Usando como critério o conteúdo que parece ser descarregado no lúmen (Figs. 18E e 18F) podemos assumir que essas vesículas estão se fundindo, descarregando o seu conteúdo no lúmen fagosomal. Esta hipótese está em conformidade com a literatura e resultados anteriores em citoquímica ultraestrutural (BUCHI E SOUZA,1992), sendo utilizada para embasar a dinâmica da construção da animação “Maturação do fagossomo” do vídeo 9. Porém, mesmo com a ocorrência de diversas fusões e com o descarregamento de componentes no lúmen fagosomal, as leveduras continuam aderidas à membrana do fagossomo em alguns pontos. Esses resultados confirmam que a maturação do fagossomo é um processo complexo, altamente dinâmico e se inicia assim que o fagossomo inicial é formado (HAAS, 2007).

Nos últimos anos, pesquisas demonstraram que proteínas normalmente encontradas no retículo endoplasmático rugoso são integrais também na membrana do fagossomo (GAGNON *et al.*, 2002). Existe a hipótese, portanto, de que o retículo endoplasmático rugoso, então, poderia fundir-se ao fagossomo para suprir a sua necessidade de membrana. Portanto, a proximidade entre o retículo endoplasmático e os compartimentos fagocíticos (Figs. 18C e 18F) pode ser decorrente dos eventos relacionados ao fornecimento de membranas ao fagossomo nascente. Sendo assim, pode-se perceber o grande potencial didático da utilização de imagens provenientes da MET, especialmente quando se leva em consideração a riqueza de detalhes fornecidos, contribuindo para o esclarecimento de processos celulares complexos.



**Figura 18. Fagocitose observada através de MET.** A. Macrófago sem leveduras internalizadas, exibindo núcleo (n) e organelas (setas finas) B. Macrófago com leveduras internalizadas (asteriscos) parcialmente ligadas à membrana do compartimento (seta fina) e parcialmente desligadas (seta grossa). C. Parede celular da levedura (asterisco) totalmente aderida ao fagossomo (seta fina). Note que o corpo multivesicular se encontra próximo do fagossomo (seta cinza). D. Vesícula próxima ao compartimento (V) contendo a levedura (Y). Observe a parede celular da levedura (asterisco) parcialmente destacada da membrana do fagossomo (seta grossa) e parcialmente ligada (seta fina). E. Interação entre o fagossomo/fagolisossomo e organela celular (seta grossa) que aparentemente se encontra descarregando material dentro do fagossomo (seta cinza). Note que somente uma pequena porção da levedura ainda se encontra ligada à membrana fagossomal (seta fina) F. Alta magnificação da figura E, exibindo a interação entre compartimentos (seta grossa). Barra: 5 $\mu$ m.

## 6.7 MULTIMÍDIA VIRTUAL INTERATIVA

Todos os experimentos e resultados em microscopia de luz podem ser utilizados através das mais diferentes abordagens pedagógicas. Entretanto, a realidade em nosso país (curta duração das aulas, ausência de recursos financeiros, técnicos e segurança no laboratório) não permite, na maior parte das vezes, que se adote estratégias como experimentação em aulas práticas, mesmo nos cursos de pós-graduação. Para contornar estas limitações, foi construído um material didático interativo que permite a navegação pelos resultados de microscopia de luz obtidos através das técnicas de DIC, coloração Giemsa, captura do vermelho neutro e citoquímica para fosfatase ácida. Embora este tipo de mídia não substitua a experimentação real, ela apresenta vantagens, otimizando outros recursos didáticos. Sabe-se que estudantes que visualizam multimídias criadas de acordo com os princípios do *design* instrucional aprendem tanto ou mais, em tempos significativamente menores, do que os que participam de palestras/aulas expositivas (SENGER *et al.*, 2012).

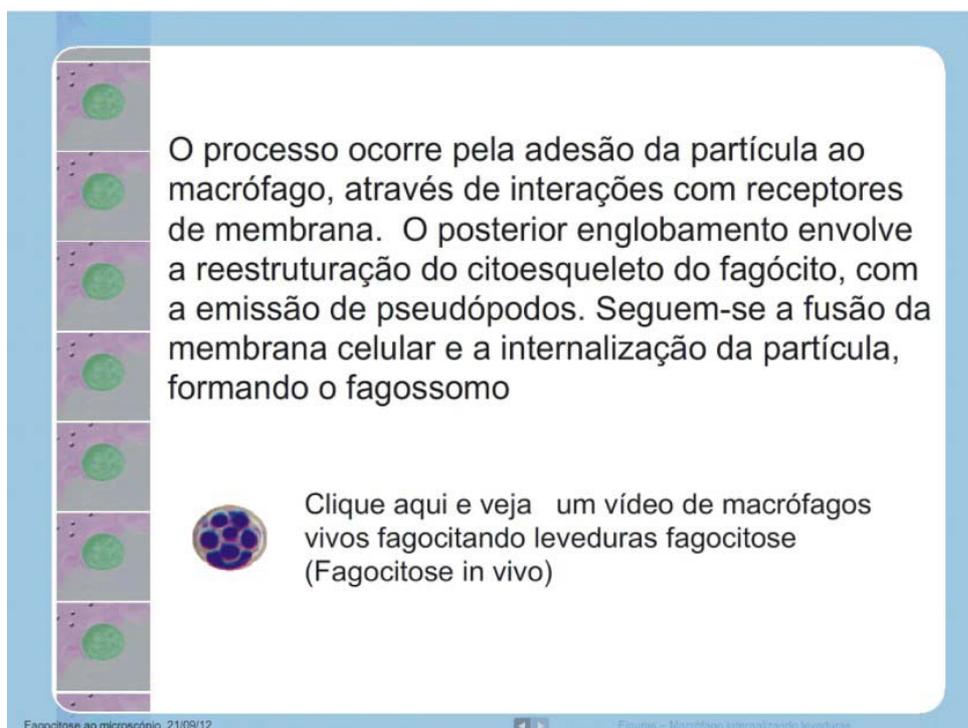
A multimídia criada fornece diversas imagens de células reais, vindo ao encontro da necessidade dos estudantes pouco familiarizados com imagens reais de células (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2004). O material interativo criado não tem a finalidade de ser autoexplicativo, mas sim de servir como ambiente virtual de aprendizagem para ser utilizado através de diferentes metodologias, de acordo com os objetivos educacionais do curso, a experiência do professor e a infraestrutura em informática da instituição de ensino. O professor poderá adequá-lo a sua experiência e tendências pedagógicas, às logísticas locais, ao período de aula e aos seus objetivos educacionais. A multimídia pode ser utilizada através de plataformas de ensino a distância; em atividades específicas, planejadas para o curso; ou em laboratórios de informática, em aulas presenciais.

Greenfield sugere que, para que o ensino seja pleno, deve haver um equilíbrio entre multimídias, exercícios e textos (WALSH *et al.*, 2011). Inclusive, o ensino na área científica requer o uso de uma combinação de recursos verbais (palavras escritas) e pictoriais (imagens, animações e vídeos) para que a compreensão ocorra (MAYER, 2010). Assim, associado ao material didático interativo pode-se utilizar textos clássicos sobre a fagocitose, como de livros didáticos ou revisões atualizadas.

Não se pretende aqui definir que o material deva ser utilizado restritamente baseando-se em teorias da aprendizagem, como a significativa ou através da aprendizagem problematizadora (KLIONSKY E KUMAR, 2006). O objetivo é a construção de um ambiente virtual interativo que possa ser utilizado com flexibilidade para a aprendizagem dos

estudantes. Sugerimos ao leitor que navegue no material didático (CD em anexo) enquanto analisa o descrito abaixo.

O ambiente virtual se inicia com texto introdutório (Fig. 19), explicando em linhas gerais como se desenvolve o evento fagocitose. Este texto é ofertado pois acredita-se ser importante que o estudante adquira um conhecimento prévio mínimo, aprendendo melhor com a multimídia pois já conhece a denominação dos componentes, suas características e os conceitos chave do processo (MAYER, 2010). Nesta parte introdutória, o estudante tem acesso a dois vídeos, através de botões, conforme mostrado na figura 19. Animações e vídeos facilitam a assimilação de processos celulares e moleculares dinâmicos, permitindo converter conceitos abstratos em representações visuais específicas (MCCLEAN, 2005). Seu benefício sobre as imagens estáticas é que auxiliam na internalização de processos que apresentam mudanças contínuas no decorrer de um período de tempo (SENGER *et al.*, 2012).

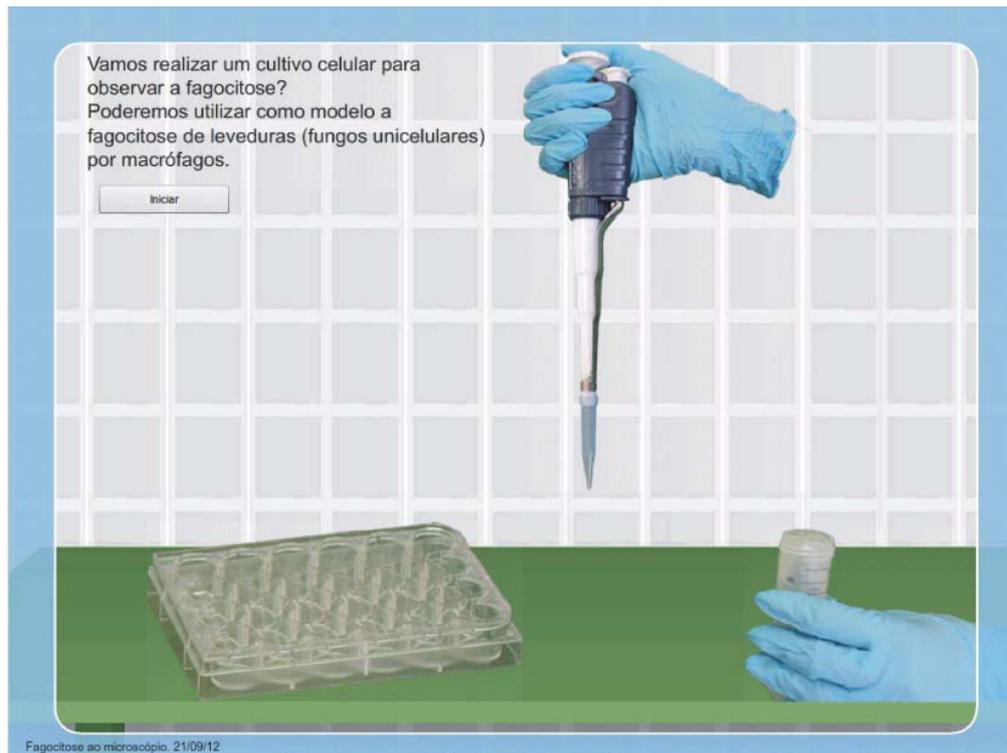


**Figura 19. Texto introdutório.** Tela do artefato virtual apresentando parte do texto introdutório sobre fagocitose. Também é possível visualizar um vídeo ilustrativo do evento.

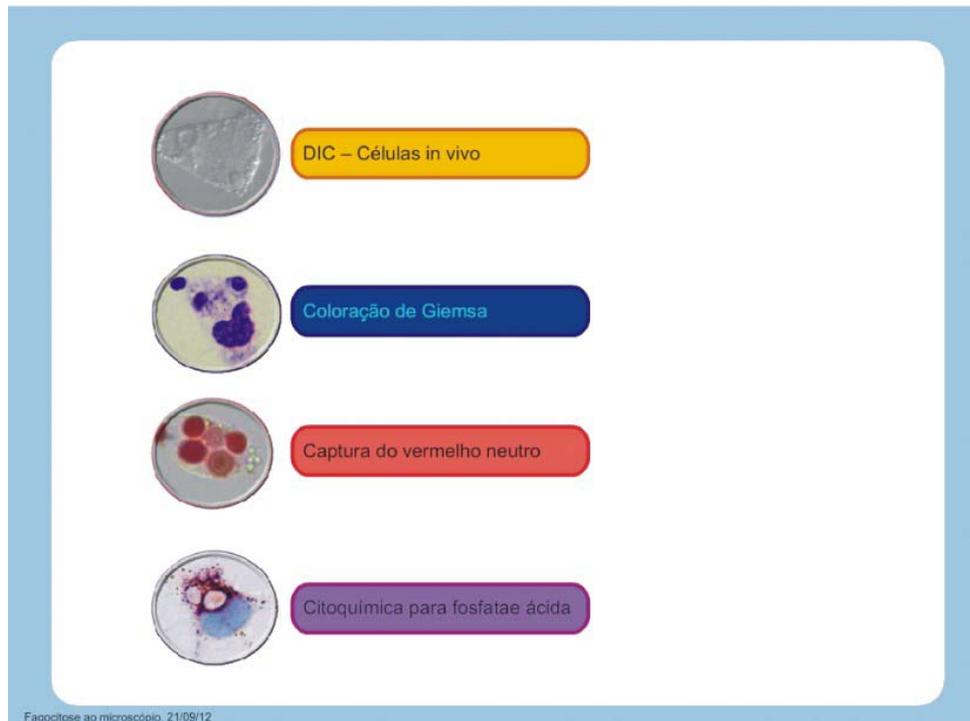
Após, segue-se uma animação interativa (dividida em etapas, pois, segundo Mayer (2010), aprende-se melhor quando uma lição grande é quebrada em pedaços menores) acerca de procedimentos de laboratório para cultivo celular. Sendo assim, conforme o usuário navega, ele pode entender os princípios dos métodos de cultura celular (Fig. 20).

Ao final dessa etapa, quando as células em cultivo já foram obtidas, um menu contendo quatro diferentes experimentos é apresentado ao usuário (Fig. 21). Dessa forma, o

usuário escolhe com qual técnica de microscopia/método de coloração ele quer visualizar a fagocitose das leveduras após seu cultivo. É importante que escolhas sejam disponibilizadas em multimídias interativas, suficientes para engajar os estudantes mas não em excesso, de forma a confundi-los (HEYDEN, 2004). Com este formato de multimídia, o aluno é ativo no processo de ensino-aprendizagem e pode formar suas próprias conclusões sobre o evento (FISHER, 2011; MILLER, 2010) de acordo com a metodologia utilizada pelo professor.



**Figura 20. Tela inicial da animação do experimento de cultivo celular.** Bancada de laboratório onde é realizado o cultivo. No falcon estão os macrófagos e, com o pipetador, eles são retirados e acondicionados em um poço da placa de elisa para que o experimento se inicie.



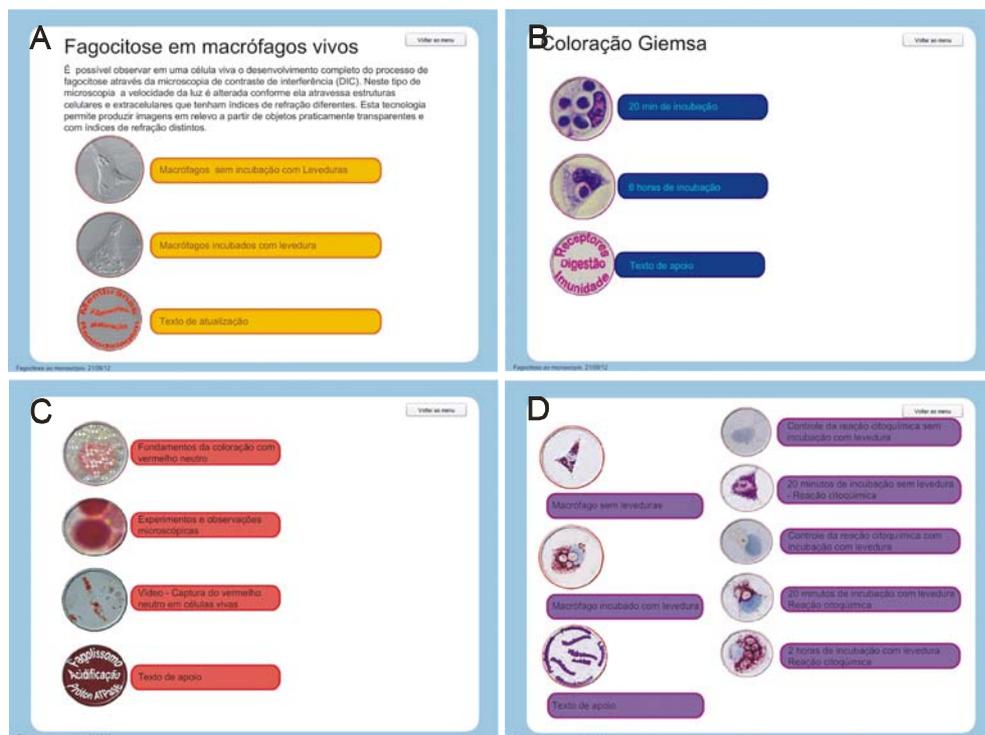
**Figura 21. Menu principal.** Nesta tela estão as quatro opções de experimentos: DIC, coloração Giemsa, captura do vermelho neutro e citoquímica para fosfatase ácida.

### 6.7.2 Resultados obtidos com DIC

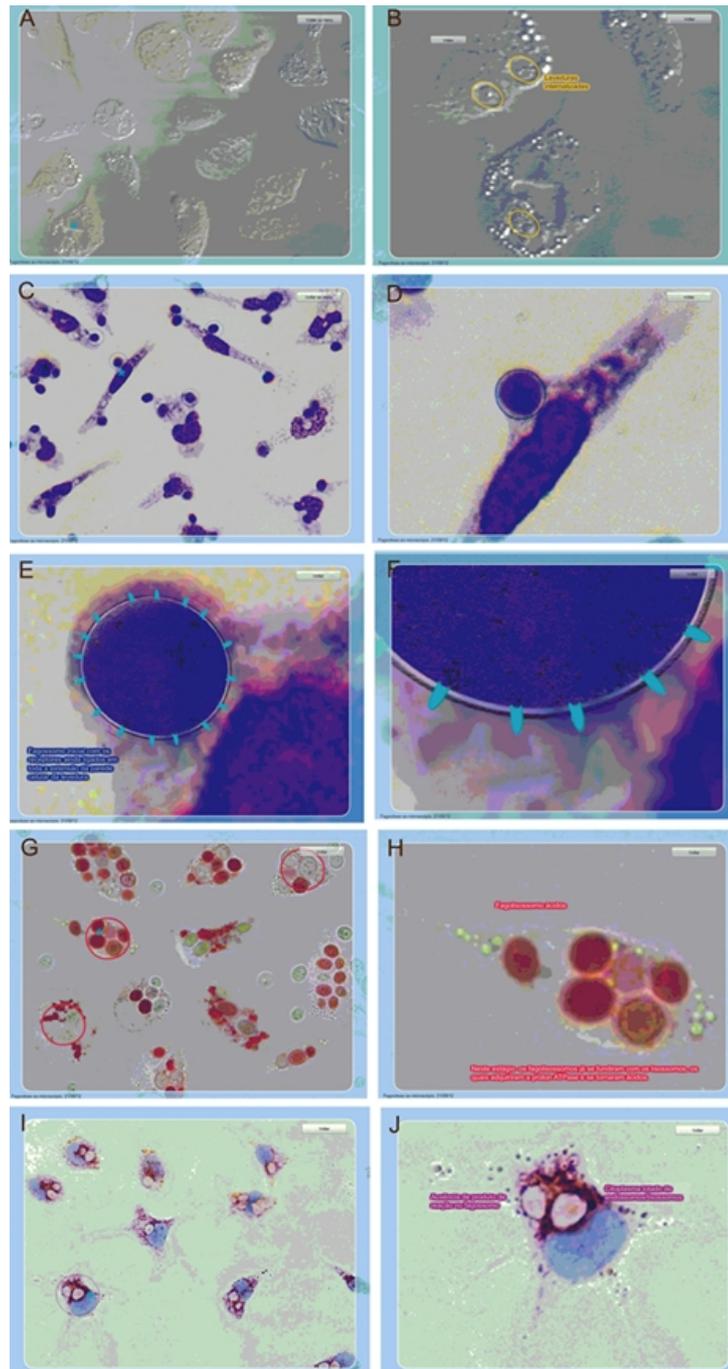
A figura 22A mostra o menu desse tópico. Nesta tela, o usuário tem acesso a um botão que mostra células não incubadas e a outro que mostra células incubadas com leveduras. No botão de células incubadas com leveduras, ele acessa um campo contendo células vivas em diferentes fases da fagocitose (Fig. 23A), que podem ser ampliadas (Fig. 23B) e caracterizadas segundo o seu estágio no processo de fagocitose. O estudante também pode assistir a diversos vídeos destas células, ilustrando a dinamicidade do processo de fagocitose. O botão de células não incubadas com leveduras possibilita ao estudante comparar o macrófago com leveduras internalizadas com o macrófago que não fagocitou leveduras. Esta metodologia, conforme já discutido (item 5.2), possibilita a observação e análise, em conjunto com técnicas de ensino como resolução de questões e leitura de textos, da adesão, internalização e digestão de leveduras pelos macrófagos, bem como serve de suporte para discutir o papel do citoesqueleto na fagocitose e a dinâmica das membranas na formação do fagossomo.

Para estimular a análise das imagens e vídeos, a comparação entre os resultados apresentados e promover a relação entre eles e o conteúdo teórico, são apresentados ao usuário, em diversos momentos, nas quatro diferentes metodologias, questionamentos acerca do que se está sendo visualizado. Sendo assim, o estudante é estimulado a pensar a respeito de questões importantes da fagocitose. Também está disponibilizado no menu de

DIC, assim como no de cada uma das metodologias, um texto científico de aprofundamento sobre o assunto, trazendo, dentre outras informações, exemplos de aplicações da ciência no cotidiano do aluno, no caso, aplicações médicas, sobre patologias e tratamentos relacionados à fagocitose, com o objetivo de suprir a dificuldade do estudante em integrar ideias científicas à sua rotina (SENGER *et al.*, 2012). Estes textos também servem como apoio à análise das imagens de microscopias observadas na multimídia a à resolução das questões propostas.



**Figura 22. Menus secundários.** **A.** Menu do DIC. Constam nesta tela as opções macrófagos sem incubação com leveduras, macrófagos incubados com leveduras e texto de atualização. **B.** Menu da coloração Giemsa. Constam nesta tela as opções 20 min. de incubação, 6 h de incubação e texto de apoio. **C.** Menu do vermelho neutro. Constam nesta tela as opções fundamentos da coloração com vermelho neutro, experimentos e observações microscópicas, vídeo e texto de apoio. **D.** Menu da citoquímica para fosfatase ácida. Constam nesta tela as opções macrófago sem leveduras (desdobra-se em controle da reação citoquímica sem incubação com levedura e 20 minutos de incubação sem levedura - reação citoquímica), macrófago incubado com leveduras (desdobra-se em controle da reação citoquímica com incubação com levedura, 20 minutos de incubação com levedura reação citoquímica e 2 horas de incubação com levedura - reação citoquímica), além do texto de apoio.



**Figura 23. Campos de microscópios.** **A.** Campo visualizado em DIC contendo diversas células. As destacadas podem ser clicadas e ampliadas. No caso, a marcada pelo asterisco será a ampliada. **B.** Célula marcada com asterisco em A. Estão destacas as leveduras internalizadas. **C.** Campo visualizado com microscopia de luz pela coloração Giemsa. Diversas célula podem ser clicadas e ampliadas. No caso, a ampliada será a marcada pelo asterisco. **D.** Célula marcada com asterisco em C. Levedura internalizada por um macrófago. **E.** Ampliação de D. Nesta imagem estão desenhados em azul claro os receptores do macrófago que reconhecem a parede celular da levedura. **F.** Ampliação de E. Receptores desenhados em azul claro em ampliação ainda maior. **G.** Campo visualizado com microscopia de luz pela captura do vermelho neutro. As células destacadas podem ser clicadas e ampliadas. No caso, a ampliada será a marcada pelo asterisco. **H.** Célula marcada com asterisco em G. Em vermelho, os fagossomos ácidos, já fusionados a lisossomos e endossomos. **I.** Campo visualizado com microscopia de luz por citoquímica da enzima fosfatase ácida. Diversas células podem ser clicadas e ampliadas. No caso, a ampliada será a marcada pelo asterisco. **J.** Célula marcada com asterisco em I. Estão evidenciadas as leveduras em estágio de digestão e vacúolos contendo o produto para a reação da fosfatase ácida.

### 6.7.3 Resultados obtidos com a coloração Giemsa

O botão de Giemsa (Fig. 21) abre um menu (Fig. 22B) no qual o estudante pode escolher entre células incubadas por dois períodos de tempo com leveduras. Com esta técnica pode-se observar e analisar as etapas de adesão, internalização e, mais detalhadamente, maturação dos fagossomos, pois, comparando-se células incubadas por um tempo menor com leveduras à células incubadas por um tempo maior, pode-se notar que, conforme o processo de fagocitose se desenvolve e os fagossomos amadurecem, halos transparentes são formados ao redor da levedura, sugerindo o seu desligamento dos receptores da membrana fagossomal, conforme já discutido (item 5.3). A partir de uma célula mostrada no campo maior (Fig. 23C) ele segue através de quadros interativos editados para que a interação receptor/componentes da parede celular fiquem evidentes (Figs. 23D, 23E e 23F).

### 6.7.4 Resultados obtidos com a captura do vermelho neutro

O menu da opção vermelho neutro (Fig. 22C) disponibiliza, além de imagens estáticas, um vídeo sobre células vivas submetidas à coloração durante realização da fagocitose e explica e o modo como o vermelho neutro é capturado, facilitando a análise das imagens de microscopia. Na escolha da observação de células vivas, parte-se de uma tela contendo várias células com fagossomos em diferentes estados de acidificação (Fig. 23G). As células assinaladas permitem a navegação no sentido de observar a acidificação gradual dos fagossomos devido a sua fusão com endossomos e lisossomos, conforme já discutido no item 5.4. Algumas células estão destacadas, permitindo que o usuário clique e amplie aquela célula, tendo acesso a sua legenda (Fig. 23H).

### 6.7.5 Resultados obtidos com a citoquímica para fosfatase ácida

Esta parte da animação foi construída baseando-se nas interpretações e discussões já descritas no item 5.5.

O menu desse experimento (Fig. 22D) abre uma tela contendo inicialmente dois botões com resultados de pesquisa: macrófagos incubados com leveduras e macrófagos não incubados com leveduras, e o texto de aprofundamento científico. Ao clicar no botão macrófagos não incubados com leveduras, tem-se o seu desdobramento em “Controle da reação citoquímica sem incubação com levedura” que leva a uma célula que não contém produtos da reação da fosfatase ácida com e “20 minutos de incubação sem levedura -

Reação citoquímica”, que leva a uma célula que, embora não tenha fagocitado leveduras, apresenta produtos de reação da fosfatase ácida. Sendo assim, o usuário pode comparar os aspectos de ambas as células e interpretá-los de acordo com o seu conhecimento sobre fagocitose. Caso o usuário prefira clicar no botão macrófagos incubados com leveduras, tem-se o desdobramento deste botão em outras três opções: Controle da reação citoquímica com incubação com levedura, 20 minutos de incubação com levedura Reação citoquímica e 2 horas de incubação com levedura - Reação citoquímica. As células visualizadas em cada um dos botões se apresentam em diferentes estágios da fagocitose e portanto, contém diferenças em relação a presença e localização dos produtos de reação da enzima digestória fosfatase ácida, possibilitando a comparação das imagens.

#### 6.7.6 Considerações gerais

O usuário pode comparar a fagocitose sob diferentes condições e em diferentes etapas. Seguiu-se o princípio de que, para facilitar o aprendizado, o material essencial deve ser enfatizado, portanto as células podem ser ampliadas e as estruturas que estão em análise no momento são realçadas. Também atentou-se a colocar curtas legendas perto de suas respectivas imagens, com o intuito de melhorar a compreensão do estudante (MAYER, 2010). Prestou-se atenção para que a complexidade da multimídia fosse adequada, sem falta ou excesso de informações pois se sabe que a aprendizagem é ineficiente tanto quando o conteúdo abordado apresenta alta complexidade como quando o assunto é abordado de forma superficial (MAYER, 2010). Sendo assim, detalhes desnecessários foram excluídos de forma a não sobrecarregar a capacidade cognitiva do aluno.

Com a utilização deste material didático, deseja-se que o estudante construa o seu conhecimento sobre fagocitose a partir da análise de resultados experimentais, tornando-se crítico ao observar resultados de pesquisas científicas na área de fagocitose. Esta capacidade é importante, pois é no ensino superior que os estudantes aprendem os artifícios necessários para realizarem suas profissões, sejam elas na área da pesquisa, educação ou diretamente relacionadas à saúde. Considerando que eventos celulares são mais facilmente compreendidos com o suporte de animações, vídeos e imagens, provenientes de diferentes microscopias (MCCLEAN *et al.*, 2005), espera-se que esta multimídia contribua para que o estudante formule pensamentos de alto nível e atinja conhecimento significativo sobre fagocitose.

## 7. CONCLUSÕES

- Os aspectos fundamentais da fagocitose podem ser compreendidos a partir de resultados de pesquisa básica em microscopia de luz, desde que construídos sob critérios pedagógicos e interpretados à luz da bibliografia atual;
- Resultados em DIC e coloração Giemsa possibilitam a observação das etapas de adesão, internalização e digestão. Adicionalmente, a coloração Giemsa favorece a discussão da maturação, já que alterações morfológicas das leveduras e dos fagossomos são evidenciadas por esta técnica;
- Resultados provenientes das técnicas de captura do vermelho neutro e citoquímica para fosfatase ácida são melhores aplicados na visualização da maturação do fagossomo, relacionados a acidificação do fagossomo e ao descarregamento de enzimas, respectivamente;
- Imagens em células vivas, através de DIC ou microscopia de luz, podem ser utilizadas na construção de vídeos didáticos, possibilitando o acompanhamento do processo de fagocitose durante as etapas de adesão, internalização, acidificação e digestão;
- Imagens estáticas de células reais podem servir como base para a construção de animações didáticas. Dessa forma, aspectos que não podem ser observados diretamente em células vivas, podem ser animados com o objetivo de facilitar a compreensão do estudante sobre o fenômeno em foco;
- As análises ultraestruturais permitem a interpretação mais precisa dos resultados em microscopia de luz, apoiando a construção do material didático virtual;
- As metodologias selecionadas podem ser divulgadas no meio científico através da produção de artigos, como o submetido à publicação, a fim de serem aplicadas em instituições de ensino que disponham das condições necessárias;
- Resultados provenientes de DIC, coloração Giemsa, captura do vermelho neutro e citoquímica para fosfatase ácida foram eficazes para a construção de uma multimídia interativa sobre a fagocitose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALBERTS, B. Redefining science education. **Science**, vol. 323, p. 437, 2009.

ARAKI, N. Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. **Front Biosci**, vol,11, p.1479-1490, 2006.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; CARDONA, T.S.; MENDES, C.L.S.; HENRIQUES-PONS, A.; MEIRELLES, R.M.S.; COUTINHO, C.M.L.M.; AGUIAR, L.E.V.; MEIRELLES, M.N.L.; CASTRO, S.L. de; BARBOSA, H.S.; LUZ, M.R.M.P. Microscopy images as interactive tools in cell modeling and cell biology education. **Cell Biology Education**, vol. 3, p. 99-110, 2004.

BOBICH, J. A ramble through the cell: how can we clear such a complicated trail? **CBE – Life Sciences Education**, vol. 5, p. 212-217, 2006.

BOCKHOLT, S.M.; WEST, J.P.; BOLLENBACHER, W.E. Cancer Cell Biology: a student-centered instructional module exploring the use of multimedia to enrich interactive, constructivist learning of science. **Cell Biology Education**, vol. 2, p. 35-50, 2003.

BOTELHO, RJ; GRINSTEIN, S. Phagocytosis. **Current Biology**, vol. 21, p. R533-R538, 2011.

BOUVIER, G.; BENOLIEL, A.M.; FOA, C.; BONGRAND, P. Relationship between phagosome acidification, phagosome-lysosome fusion, and mechanism of particle ingestion. **J. Leukoc Biol.**, vol. 55(6), p. 729-734, 1994.

BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron Microscopy**. 1 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1992.

BUCHI, D.F.; DE SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion os *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, vol. 24(1), p. 135-144, 1992.

CORDEIRO, L.M.C.; OLIVEIRA, S.M.; BUCHI, D.F.; IACOMINI, M. Galactofuranose-rich heteropolysaccharide from *Trebouxia* sp., photobiont of the lichen *Ramalina gracilis* and its effect on macrophage activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 436-440, 2008.

COSSART, P; SANSONETTI, PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, vol. 304, p. 242–248, 2004.

DAMIANIA, MT; COLOMBO, M.I. Microfilaments and microtubules regulate recycling from phagosomes. **Experimental Cell Research**, vol. 289, p. 152–161, 2003.

DE OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.;PROBST,C.M.; KRIEGER, M.A.; BUCHI, D. F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 1364-1377, 2008.

DICARLO, S.E. Cell biology should be taught as science is practiced. **Nature Review - Mol Cell Biol**, vol. 74, p. 290-296, 2006.

ESKELINEN, E.L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends Cell Biol**, vol. 13, p. 137-145, 2003.

GAGNON, E; DUCLOS, S.; RONDEAU, C.; CHEVET, E.; CAMERON, P.H.; STEELE-MORTIMER, O.; PAIEMENT, J.; BERGERON, J.J.; DESJARDINS, M. Endoplasmic reticulum mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. **Cell**, vol. 10, p. 119-131, 2002.

GARIN, J.; DIEZ, R.; KIEFFER, S. The phagosome proteome: insight into the phagosome functions. **J. Cell Biol.**, vol. 152(1), p. 165-180, 2001.

GIBBONS, N.J.; EVANS, C.; PAYNE, A.; SHAH, K.; GRIFFIN, D.K. Computer simulations improve university instructional laboratories. **Cell biology education**, vol. 3, p. 263-269, 2004.

GIRAO, H.; GELI, M.I.; IDRISSE, F.Z. Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. **FEBS Lett**, vol. 582(14), p. 2112-2119, 2008.

GRUENBERG, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. **Nat Rev Mol Cell Biol**, vol 2, p. 721-730, 2001.

HAAS, A. The phagosome: compartment with a license to kill. **Traffic**, vol. 8, p. 311-330, 2007.

HEYDEN, R. Approaches to cell biology: developing educational multimedia. **Cell Biology Education**, vol. 3, p. 93-98, 2004.

HOSKINS, S.G.; STEVENS, L.M. Learning our L.I.M.I.T.S.: less is more in teaching science. **Advances in Physiology Education**, vol. 33, p. 17-20, 2009.

HUANG, P.C. The integrative nature of biochemistry: challenges of biochemical education in USA. *Biochem Educ*, vol. 28, p. 64-70, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KISSMEHL, R.; FROISSARD, M.; PLATTNER, H.; MOMAYEZI, M.; COHEN, J. NSF regulates membrane traffic along multiple pathways in *Paramecium*. **J Cell Sci**, v. 115, p. 3935-3946, 2002.

LEWIS, L.E.; BAIN, J.M.; LOWES, C.; GILLESPIE, C.; RUDKIN, F.M.; GOW, N.A.R.; ERWIG, L.P. Stage Specific Assessment of *Candida albicans* Phagocytosis by Macrophages Identifies Cell Wall Composition and Morphogenesis as Key Determinants. **PLoS Pathog**, vol. 8(3), p. 1002578, 2012

LIU, D. Seeing cells on the web. **CBE – Life Sciences Education**, vol. 6, p. 21-24, 2007.

LOPATTO, D.; ALVAREZ, C.; BERNARD, D. Undergraduate research: genomics education partnership. **Science**, vol. 322, p. 684-685. 2008.

LOPES, L.; GODOYA, L.M.F.; OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D.F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, vol. 37, p. 277-387, 2006.

LUZIO, J.P.; ROUS, B.A.; BRIGHT, N.A.; PRYOR, P.R.; MULLOCK, B.M.; PIPER, R.C. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. **J. Cell Sci**, vol. 113, p. 1515-1524, 2000.

MCCLEAN, P.; JOHNSON, C.; ROGERS, R.; DANIELS, L.; REBER, J.; SLATOR, B.M.; TERPSTRA, J.; WHITE, A. Molecular and cellular biology animations: development and impact on student learning. **Cell Biology Education**, vol. 4, p. 169-179, 2005.

O'DAY, D. Animated cell biology: a quick and easy method for making effective. High-quality teaching animations. **CBE – Life Sciences Education**, vol. 5, p. 255-263, 2006.

PARSLOW, T.G. Linfócitos e tecidos linfóides. In: STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARLOW, T.G. **Imunologia Médica**. 9 ed. Guanabara Koogan, 2000, p. 33-56.

PERES, C.M.; CURTI, R. **Como Cultivar Células**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

PETERS, C.; VON FIGURA, K. Biogenesis of lysosomal membranes. **FEBS Lett**, vol. 346(1), p. 108-114, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

ROBINSON, J.M.; KARNOVSKY, M.J. Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. **J. Histochem. Cytochem**, vol. 31, p. 1197-1208, 1983.

ROGERS, L.D.; FOSTER, L.J. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol. 104(47), p. 18520-18525, 2007.

RUSSEL, D.G.; VANDERVEN, B.C.; GLENNIE, S.; MWANDUMBA, H.; HEYDERMAN, R.S. Macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. **Nature Reviews Immunology**, vol. 9, p. 594-600, 2009.

SCOTT, C.C.; BOTELHO, R.J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. **J. Membr Biol.**, vol. 193(3), p. 137-152, 2003.

SEPEL, L.M.N.; LORETO, E.L.S.; ROCHA, J.B.T. Using a replica of Leeuwenhoek's microscope to teach the history of science and to motivate students to discover the vision and the contributions of the first microscopists. **CBE – Life Sciences Education**, vol. 8, p. 338-343, 2009.

STITH, B. Use of animation in teaching cell biology. **Cell Biology Education**, vol. 3, p. 181-188, 2004.

STONE, S.; OLIVER, R. Can higher order thinking and cognitive engagement be enhanced with multimedia? **Interact multimedia electron j comput. enhanced learn**, vol. 1(2), 1999.

SWANSON, J.A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2008

TIMMERS, A.C.J.; TIRLAPUR, U.K.; SCHEL, J.H.N. Vacuolar accumulation of acridine orange and neutral red in zygotic and somatic embryos of carrot (*Daucus carota*, L.). **Protoplasma**, vol. 188, p. 236-244, 1995.

TOURET, N.; PAROUTIS, P.; GRINSTEIN, S. The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. **J Leukoc Biol**, vol. 77(6), p. 878-885, 2005.

WATANABE, M.E. Biology laboratories: Are they disappearing?. **Scientist**, vol. 16 (11), p. 23., 2002.

YEUNG, T.; BARISH, O.; PAROUTIS, P.; GRINSTEIN, S. Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. **Membranes and organelles**, vol. 18(4), p. 429-437, 2006.