

Elaboração de uma atividade de ensino por investigação sobre o desenvolvimento de linfócitos B

Elaboration of an inquiry-based learning about development of B-lymphocytes

Daniel Manzoni-de-Almeida

Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo
danielmanzoni@yahoo.com.br

Silvia Luzia Frateschi Trivelato

Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo
slftrive@usp.br

RESUMO

O ensino por investigação é importante para auxiliar o aprendizado dos conceitos teóricos abstratos dos fenômenos biológicos aprendidos em aulas teóricas e proporcionar a aproximação de alunos com a natureza da ciência. Como trabalhar temas importantes na Imunologia com base no ensino por investigação? Nosso trabalho apresenta os resultados da pesquisa teórica, nas bases experimentais da caracterização do desenvolvimento de linfócitos B na medula óssea, e a construção de uma atividade de ensino por investigação para as aulas de imunologia para o ensino superior.

Palavras-Chaves: ensino de imunologia; sequência didática; ensino por investigação

ABSTRACT

Inquiry-based learning is important to assist the learning of abstract theoretical concepts of biological phenomena learned in lectures and provide students with the approach of the nature of science. Our work presents the results of theoretical research, the experimental basis of the characterization of the development of B-lymphocytes in the bone marrow, and the construction of an educational activity for research for immunology classes for higher education.

Key words: immunology teaching; instructional sequence; inquiry-based education

A estrutura da nossa problemática e a articulação com a proposta do ensino por investigação

A aula de cunho investigativa é atividade fundamental no ensino de ciências e

proporciona ao aluno espaço para que ele seja atuante e agente do próprio aprendizado, descobrindo, assim, que o aprender é mais que o mero conhecimento de fatos, interagindo com suas próprias dúvidas, chegando à conclusão e a aplicação dos conhecimentos por ele obtido. O principal objetivo da Imunologia é entender os mecanismos fisiológicos do sistema imune de um indivíduo no estado de não infecção, nas infecções por micro-organismos e na desregulação da homeostase fisiológica do sistema como em casos de doenças imunológicas. Segundo Barral & Barral-Neto (2007) o Brasil ocupa o décimo sétimo lugar de produção científica enquanto a produção da Imunologia brasileira ocupa o décimo primeiro lugar. Em 1990, a Imunologia correspondia a 5% da produção total da área biomédica, já em 1995 esse valor atingia 9% (BARRAL & BARRAL-NETO, 2007). Esse cenário sugere que há um interesse na formação de cientistas brasileiros voltados para o estudo da Imunologia. No Brasil, esses cientistas na área da imunologia começam a ser formados a partir dos cursos de graduação nas áreas de ciências biológicas e da saúde.

Assim como outras disciplinas das ciências biológicas, o aumento do conhecimento na área de Imunologia cresce a cada ano como observado no site de base de dados científicos *PubMed*. Outro ponto são as diferenças importantes entre o conteúdo dos livros texto de imunologia básica utilizados para ensino de imunologia nos cursos de graduação, como por exemplo, o *Imunologia Celular e Molecular* do Abul Abbas, Andrew Lichtman e Shiv Pillai (das 6 [2008] para 7 edição [2012]) e os novos conteúdos da imunologia na atualidade. A Imunologia está em pleno desenvolvimento e as pesquisas científicas tornam este conhecimento mais robusto e complexo fazendo com que as informações contidas nos livros textos fiquem defasadas. Um exemplo disso é o trabalho de Siqueira-batista e colaboradores (2009) que mostra a análise de diferentes capítulos de livros textos de imunologia os quais diferem quanto a explicação da relação entre patógenos e hospedeiros, um paradigma entre ataque *versus* defesa. Entretanto, diversas evidências experimentais têm mostrado que estas relações vão além, como por exemplo, a participação comensal de micro-organismos nos processos de interações do sistema imunológico. Diante dessa questão sobre o ensino de imunologia, uma proposta de solução para esse problema não pode se basear exclusivamente no aumento do volume ou da eficiência da transmissão do conhecimento. O ensino com atividades de investigação de uma problemática proposta, centrada na resolução de problemas e não na execução de protocolos pré-determinados, estimula o desenvolvimento das habilidades e atitudes desejáveis como a capacidade de buscar e encontrar informações relevantes para realização de um determinado trabalho; desenvolve a capacidade para avaliar informações novas e habilidade de encontrar soluções criativas para problemas práticos.

Essa perspectiva está em concordância com as propostas sobre o ensino por investigação da área de ensino de ciências na escola básica, com o objetivo da “alfabetização científica”, que mostram que as atividades de cunho investigativas no ensino das ciências devem providenciar aos estudantes não apenas a manipulação de materiais e ferramentas para a realização das atividades práticas, mas a observação de dados, a utilização de linguagens para comunicar aos outros suas hipóteses e sínteses, as habilidades necessárias para o “fazer científico” (SASSERON e CARVALHO, 2011). Assim, consideramos que o ensino por investigação pode ser realizado por um trabalho baseado em ideias de ensino/aprendizagem de ciências desenvolvido no processo de construção e reconstrução do conhecimento científico, como por exemplo, no contexto da prática científica

(proporcionar aos alunos a vivência da prática científica e formas como um cientista exerce seu trabalho no campo do estudo de uma ciência) e orientador por um professor (GUISASOLA *et al.*, 2007; SMITHERY, 2010). Trabalhando que essas habilidades necessárias a formação científica, que podem ser desenvolvidas no âmbito no ensino superior em cursos das áreas de biológicas e da saúde.

No âmbito específico da disciplina de Imunologia, um levantamento realizado por nós, no ano de 2013, na disciplina de Imunologia Básica para duas turmas de estudantes da graduação de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, mostrou que de todos os pontos de conteúdos oferecidos na carga horária da disciplina, o tema de *Linfócitos B e a expressão gênica dos receptores de antígeno* foi o tema que os alunos mais apontaram como um tema de difícil entendimento, pouco aprendido e rejeição do conteúdo. Outro fato interessante desse levantamento é que 95% dos alunos disseram que gostariam de mais aulas práticas durante a disciplina. Considerando esses fatos e diante das problemáticas técnicas laboratoriais para trabalhar uma aula prática para a temática, nossa pergunta para esse estudo foi: como trabalhar e desenvolver uma sequência investigativa para sobre como é o desenvolvimento de linfócitos B e anticorpos nas aulas de imunologia que contemplem a exposição dos alunos as práticas investigativas da natureza da ciência? Dessa forma, nossos objetivos com esse foram: (i) analisar as bases teóricas na literatura científica sobre a temática de “Linfócitos B e a expressão gênica dos receptores de antígeno”; e (ii) posteriormente construir uma atividade com base investigativa.

Metodologia

Capítulos, sobre o tema da atividade investigativa, foram selecionados de dois livros didáticos de imunologia (um brasileiro e outro internacional). Foi realizada análise dos capítulos e seleção dos principais artigos clássicos (que foram utilizados pelos autores dos livros para construção dos capítulos) que foram indicados nas referências de cada capítulo para a construção dos dados experimentais, inscrições literárias, para utilização dos estudantes na investigação. Posteriormente, a atividade investigativa foi estruturada nos níveis 0 e 1 (de *Verificação* e *Estruturação*, respectivamente) baseada nas orientações propostas sobre níveis de investigação no ensino por Smithenry (2000) e adaptações de Blanchard *et al.* (2010). A construção dos cadernos de laboratório, para resposta dos alunos, foi baseada na estrutura do argumento proposto por Toulmin (2006).

Resultados

Guisasola, Furió e Cerebio (2006), apresentam uma estrutura de ensino por investigação, que contempla as características da cultura científica, que está organizada comportando os elementos estruturantes que estão presentes na construção do conhecimento científico quanto na clareza dos objetivos da proposta e contemplando as dimensões epistemológica e ontológica. A linguagem científica está inserida na cultura científica, e possui características específicas e que podem apresentar diferentes formas de expressão, como por exemplo, as anotações dos dados coletados dos experimentos no laboratório – as chamadas inscrições literárias – e a escrita de relatórios e artigos científicos – baseada na argumentação (LATOUR; WOOLGAR, 1986). Entender as características estruturantes

dessas abordagens da linguagem pode facilitar a aprendizagem das ciências, principalmente para estudantes do ensino superior de cursos. Essas características da linguagem científica foram as bases da construção da nossa atividade investigativa. Abordamos nossa temática baseada nas duas principais formas da linguagem científica: a) a construção das inscrições literárias derivadas dos experimentos realizados no campo da imunologia; e b) a arquitetura da atividade investigativa baseada no padrão básico de Toulmin (2006) – dados, justificativa e conclusões.

Começamos pelas *construções das inscrições literárias* derivadas dos experimentos realizados no campo da imunologia. Para esse estudo tomamos por base os capítulos, de um livro nacional e um livro internacional, de uso nos cursos de imunologia do ensino superior brasileiro, sobre: a) “Geração da diversidade de receptores para antígenos (BCR e TCR)” (páginas 81 à 93) e “Maturação, ativação e recirculação de linfócitos” (páginas 113 à 123) no livro CALICH & VAZ [2º ed. 2009]; e b) “Desenvolvimento dos linfócitos e o rearranjo e expressão de genes dos receptores de antígenos” (páginas 153 à 188) de (ABBAS, LICHMAN & PILLAI [6º ed. Tradução 2008]), investigando qual é o conceito central que estrutura a temática sobre células B. A análise dos capítulos citados nos mostrou que o conceito sobre linfócitos B e a expressão gênica dos receptores de antígeno está estruturado no processo de diferenciação ou ontogenia dos linfócitos B na medula óssea (em mamíferos). Esse conceito está resumido nos quadros de ilustrações sobre a ontogenia das células B na página 115 em CALICH & VAZ [2º ed. 2009] e 170 em (ABBAS, LICHMAN & PILLAI [6º ed. Tradução.2008]). Esses quadros apresentam um resumo dos mecanismos de expressão gênica (de genes para importantes enzimas, como as *RAGs* [*Genes da ativação da recombinação*] no processo recombinação V(D)J para formação da diversidade de moléculas de anticorpos nas células B), funções biológicas de linfócitos B (proliferação celular com estímulo antigênico), expressão de moléculas de anticorpos “prontas” na superfície de células B maduras e os mecanismos da expressão gênica para formação da molécula de anticorpo (as recombinações somáticas V(D)J).

A partir da definição do conceito central a ser trabalho na atividade – “A diferenciação de linfócitos B” – analisamos os artigos científicos, citados nas referências bibliográficas básica de cada capítulo (página 93 e 123 em CALICH & VAZ [2º ed. 2009] e página 188 em (ABBAS, LICHMAN & PILLAI [6º ed. Tradução.2008]), que foram fundamentais para a construção do conhecimento atual sobre a ontogenia de células B. Dos trabalhos citados nas referências bibliográficas, os selecionados, que remetem e revisão a construção do conceito central da atividade, foram os artigos de: BUSSLINGER (2004), HARDY & HAYAKAWA (2001), JUNG et al., (2006), TONEGAWA (1983) (**Quadro 1**). Nosso olhar para os artigos base foi no sentido de selecionar as técnicas e os experimentos realizados nos artigos que levaram a caracterização dos fenômenos da diferenciação dos linfócitos B. Dessa análise, enumeramos quatro técnicas e experimentos utilizados nos artigos que foram utilizados para caracterizar os fenômenos. 1) a técnica da “Reação em cadeia da polimerase” (*Polymerase chain reaction* [PCR]) para avaliar a expressão do gene para a enzima RAG em várias fases de diferenciação dos linfócitos B; 2) a técnica de citometria de fluxo para avaliar a expressão de moléculas de anticorpos IgM e IgD e proliferação dos linfócitos B nas várias fases de diferenciação; 3) a técnica de *Northern blot* para análise de RNAm na expressão gênica na recombinação somática V(D)J.

Livros	Capítulos	Artigos/Referências
CALICH & VAZ [2º ed. 2009]	1) “Geração da diversidade de receptores para antígenos (BCR e TCR)”; 2) “Maturação, ativação e recirculação de linfócitos”.	TONEGAWA (1983)
ABBAS, LICHMAN & PILLAI [6º ed. Tradução 2008]	1) “Desenvolvimento dos linfócitos e o rearranjo e expressão de genes dos receptores de antígenos”	BUSSLINGER (2004); HARDY & HAYAKAWA (2001); JUNG <i>et al.</i> , (2006).

Quadro 1. Análise dos capítulos de dois livros didáticos de imunologia.

Baseados nesses achados e com algumas modificações das técnicas que foram utilizadas nos trabalhos originais foram construídos *dados* experimentais hipotéticos para análise dos alunos e *conclusões* na atividade que serão detalhados mais adiante.

O nosso interesse para nossa atividade está no desenvolvimento e expressão dos receptores linfócitos B devido a dúvida gerada pelos alunos. Resumidamente, os linfócitos B são células que participam dos mecanismos do sistema adaptativo e que são as produtoras de anticorpos. Os receptores de linfócitos B, assim como os anticorpos secretados, são milhares de moléculas proteicas distintas, que são formados por recombinação somática do genes que é orquestrada por diferentes mecanismos dentro da célula. A descrição sobre o processo de recombinação somática descrita por Tonegawa (prêmio de medicina em 1987) revolucionou os conceitos de biologia celular e molecular. Em ambos livros didáticos selecionados por nós para a análise, os capítulos destinados a produção de anticorpos por linfócitos B realizam uma abordagem ontogênica do desenvolvimento dos linfócitos B (página 115 em CALICH e VAZ; e página 170 em ABBAS). Nossa problemática foi baseada no fato que diferentemente do linfócito T, o linfócitos B se originam e seu processo de diferenciação acontece na medula óssea em mamíferos (HARDY & HAYAKAWA, 2001). Experimentos clássicos da imunologia mostraram que a transferência de células do sistema imune de um animal experimental para outro animal trouxe avanços significativos para o conhecimento em imunologia e em outras áreas médicas. Podemos citar como exemplos, a descoberta da imunidade mediada por células (SILVERSTEIN, 1989), os transplantes de medula óssea e mais recentemente os adventos das transferências de células-tronco hematopoiéticas para o tratamento de doenças autoimunes, infecciosas e crônicas (JUNG *et al.*, 2006). Assim, tomamos a apresentação dos mecanismos de diferenciação de linfócitos B como o conceito central para a atividade.

Nossa atividade está dividida em 3 partes. A parte I corresponde a apresentação da problemática e da pergunta a ser investigada. A parte II está destinada ao contato, análise dos dados hipotéticos pelos alunos. Nessa fase os alunos são incentivados a produzir gráficos e descrever os dados observados. A parte III consiste na elaboração da conclusão escrita. Assim, elaboramos a situação problema e uma pergunta norteadora para a investigação na **Parte I**:

“Em 1b: um pesquisador no laboratório de Imunologia tem um camundongo (B) com uma doença crônica e um outro camundongo (A) saudável. Ele pretende transferir células da medula óssea do animal A para o animal B para testar uma terapia. Em 1a: foram coletadas 3 amostras de células da medula óssea do camundongo A. Antes de efetuar a transferência é preciso saber a fase de diferenciação da célula que será transferida. As células das 3 amostras foram submetidas a análise quando: 1) presença de IgM e IgD na membrana das células; 2) respostas da células a antígenos; 3) expressão do gene para RAG; e 4) análise dos genes para imunoglobulinas”

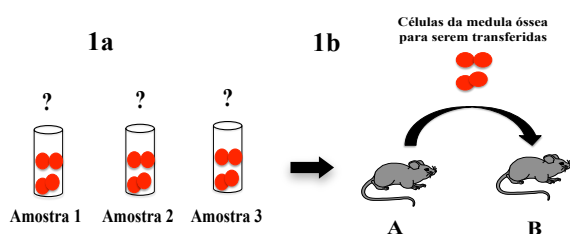


Figura 1. Esquema da situação problema e da pergunta para a atividade. Em qual tubo estão as células hematopoiéticas indiferenciadas obtidas e purificadas do camundongo A para serem transferidas para o camundongo B? Em (a) estão representados os tubos com as células purificadas do camundongo A a serem transferidas para o camundongo B. Em (b) é a representação da situação problema: a transferência de células indiferenciadas para o camundongo B.

Na **Parte II**, cada grupo de alunos recebe um conjunto de resultados obtidos pelas respectivas técnicas experimentais e terão que: 1) analisar os dados; 2) descrever os resultados; 3) concluir a investigação respondendo a questão: “*em que fase de diferenciação estão as células nas amostra que seu grupo analisou?*”

Em Jung e colaboradores (2006) os pesquisadores revisaram e mostraram, dentre outros mecanismos genéticos de linfócitos, que as enzimas RAGs eram enzimas importantes nos processos de recombinação gênica para expressão dos receptores de células B. Essa enzima só é expressa e ativa em fases intermediárias de diferenciação dessas células, as chamadas células Pré-B. Para analisar a expressão do gene para a RAG os pesquisadores podem utilizar a técnica de PCR¹. Essa técnica consiste na reação para multiplicar ácidos nucleicos ácidos e quantificar o DNA obtido. Para avaliar a expressão de um determinado gene é realizado em conjunto, com essa análise, a expressão de um gene constitutivo da célula/tecido que não terá sua expressão modificada com o estímulo ou fase de desenvolvimento da célula. Um exemplo de um gene constitutivo é o gene para a proteína actina. Na análise dos dados hipotéticos (valores numéricos) fornecidos aos alunos os resultados da expressão um determinado gene podem ser representados pela porcentagem do aumento da expressão do gene em comparação ao gene constitutivo.

Busslinger (2004) e Hardy & Hayakawa (2001) publicam artigos de revisão concatenando os dados de anos de estudos que mostraram que apenas linfócitos B maduros, ou seja, totalmente diferenciados são capazes de apresentar as moléculas de anticorpos IgM e IgD completas na membrana celular e ser ativados quando estimulados com antígeno específico ou policlonal em culturas celulares. Células indiferenciadas ou pré B não possuem essas propriedades. Uma das formas que os pesquisadores chegaram a

¹Aqui nos valem de adaptações das técnicas para o fornecimento dos dados para análise dos alunos. Para o exercício usamos o princípio da técnica de PCR em tempo real, pois nos fornece dados numéricos. O fornecimento de dados numéricos hipotéticos para os alunos teve como objetivo que os dados fossem trabalhados para construção de gráficos e análise dos resultados. Para análises de expressão de IgM e IgD e quantificação do número de células nos valem da citometria de fluxo. Para análise dos mecanismos de expressão gênica das moléculas de anticorpos utilizamos o princípio do *northern blot* para a construção dos dados para a atividade

essa conclusão foi analisando a expressão dessas moléculas na superfície das células e quantificando a proliferação das mesmas após o estímulo com antígeno em culturas celulares. Essas duas formas de avaliação de células podem ser realizadas pela técnica de citometria de fluxo¹. A Citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células suspensas em meio líquido. Por meio de um aparelho de detecção óptico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e químicas de uma célula.

Tonegawa (1983) publica uma revisão concatenando os achados sobre a geração somática da diversidade das moléculas de anticorpos nos linfócitos B. Esse fenômeno pode ser mostrado pela técnica de biologia molecular. O *northern blot*¹ é utilizado nas pesquisas para investigar se um dado gene de um genoma é ou não transcrito em RNA.

Na **parte III** os alunos podem ter a oportunidade de discutir os dados analisados e concluir a investigação com o objetivo de responder a pergunta da atividade.

Em conclusão, esperamos que essa atividade de ensino por investigação possa ressaltar o papel que a argumentação entre os alunos possa desempenhar no aprendizado da ciência imunologia, tanto do ponto de vista conceitual, a partir do domínio da linguagem científica, quando do ponto de vista epistemológico compreendendo sua estrutura social. Uma das formas de classificação da escrita científica é a argumentação, que visa uma audiência definida e que está relacionada diretamente com as práticas científicas (STOCKSON, 1994). Dessa forma, o artigo científico é considerado um trabalho argumentativo. Assim, podemos definir que a argumentação é o padrão utilizado para estabelecimento do conhecimento na comunidade acadêmica. Com essa atividade investigativa, também, esperamos utiliza-la como ferramenta de pesquisa no campo de investigação da argumentação e operações epistêmicas no ensino de biologia.

Agradecimentos e apoios

A FAPESP.

Referências bibliográficas

ABBAS AK; ANDREW H; LICHTMAN, Jordan S. PILLAI. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2008

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO. Uma breve perspectiva da Imunologia no Brasil e na Bahia. **Gazeta médica da Bahia**. 2, 2007, p. 241-244.

BLANCHARD, M. R.; SOUTHERLAND, S. A.; OSBORNE, J. W.; SAMPSON, V. D.; ANNETA, L. A.; GRANGER, E. M. Is inquiry possible in light of accountability? A quantitative comparison of the relative effectiveness of guided inquiry and verification laboratory instruction. **Science Education**, s. l., p. 577-616, Mar. 11, 2012.

BUSSLINGER M. Transcriptional control of early B cell development. **Annual Review of Immunology**. 22:, 2004, p. 55-79.

CALICH, V. L. G & VAZ, C. A. C. **Imunologia**. 2a Edição. Editora Revinter: Rio de

Janeiro, 2009.

GUISASOLA, J.; FURIÓ, C.; CEREBIO, M. Science education based on developing guided research. **Science Education in Focus**. s.l., 2006, p. 56-83.

GUISASOLA, J.; ZBIMENDI, J.; ALMUDÍ, J.M.; CEREBIO, M. Propuesta de enseñanza en cursos introductorios de física en la Universidad, basada en la investigación didáctica: siete años de experiencia y resultados. **Enseñanza de las ciencias**, s.l., n.25(1), p.91-106, 2007.

HARDY, R.R.; K Hayakawa. B cell development pathways. **Annual Review of Immunology**. 19:, 2001, p. 595-622.

JUNG, D; C GIALLOURAKIS, R. MOSTOSLAVSKY, F.W alt. Mechanism and control of V(D)J recombination at immunoglobulin heavy chain locus. **Annual Review of Immunology**. 24:, 2006, p. 541-570.

LATOUR, B.; WOOLGAR, S. Laboratory life: the construction of scientific facts. **New Jersey: Princeton University Press**, 1986.

SANTOS, N. F.; RUMJANEK, V .M. Brazilian Immunology: 100 years later. **Scientometrics** 50:, 2001, p. 405-418.

SASSERON, L. H.; CARVALHO, A. M. P. Alfabetização Científica: uma revisão bibliográfica. **Investigações em ensino de ciências**. V. 16, n. 1, 2011, p. 59-77.

SILVERSTEIN, ARTHUR. A history of Immunology. Academic Press, INC, San Diego:1989.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, AP.; ALBUQUERQUE, V.S.; MANDALON-FRAGA, R.; ALEKSANDROVIWZ, A.M.C.; GELLER, M. Ensino de Imunologia na educação médica: lições de Akira Kurosawa. **Revista Brasileira de Educação Médica**. 2009, p. 186-190.

SMITHENRY, D. W. Integrating guided inquiry into a tradicional chemistry curricular framework. **International Journal of Science Education**, s.l., n. 32(13), p. 1689-1714, Set. 2010

STOCKTON, S. Students and professionals writing biology: disciplinary work and apprentice storytellers. **Language and Learning Across the Disciplines**., n. 1(2), 1994, p. 79-104.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**. 302:1983, p. 575-81.

TOULMIN, S. E. Os usos do argumento. 2. ed. (Trad. de R. Guarany e M. B. Cipolla). São Paulo: Martins Fontes, 2006.