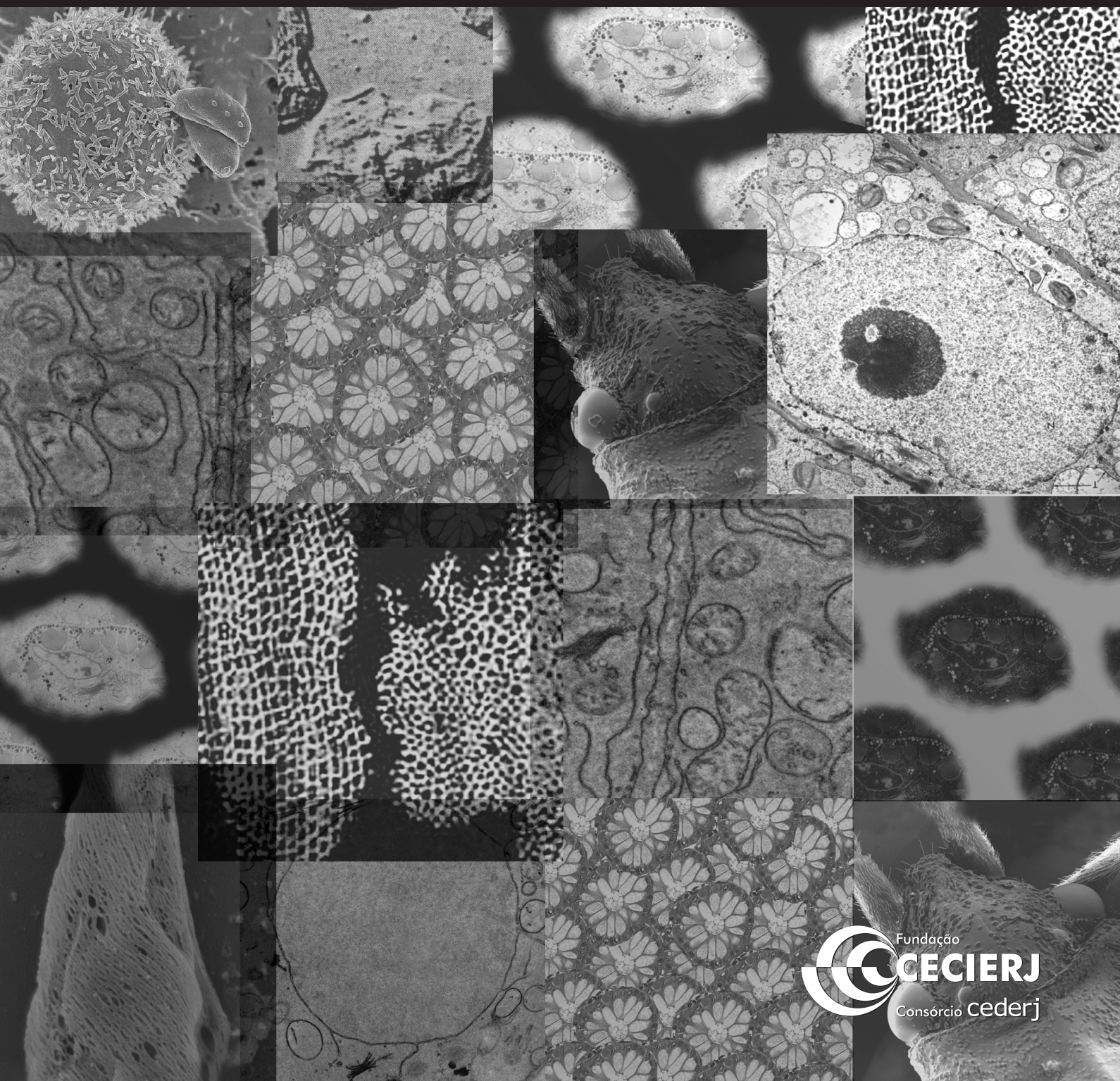


Biologia Celular I





Fundação

CECIERJ

Consórcio **cederj**

Centro de Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro

Biologia Celular I

Volume 1 - Módulos 1 e 2
4ª edição

Márcia Attias
Narcisa Cunha e Silva



SECRETARIA DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA



Ministério
da Educação



Apoio:



Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Rua Visconde de Niterói, 1364 – Mangueira – Rio de Janeiro, RJ – CEP 20943-001

Tel.: (21) 2334-1569 Fax: (21) 2568-0725

Presidente

Masako Oya Masuda

Vice-presidente

Mirian Crapez

Coordenação do Curso de Biologia

UENF - Milton Kanashiro

UFRJ - Ricardo Iglesias Rios

UERJ - Cibebe Schwanke

Material Didático

ELABORAÇÃO DE CONTEÚDO

Márcia Attias

Narcisa Cunha e Silva

COORDENAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL

Cristine Costa Barreto

DESENVOLVIMENTO INSTRUCIONAL E REVISÃO

Alexandre Rodrigues Alves

Ana Tereza de Andrade

Márcio Paschoal

COORDENAÇÃO DE LINGUAGEM

Cyana Leahy-Dios

REVISÃO TÉCNICA

Ana Tereza de Andrade

Marta Abdala

Departamento de Produção

EDITORA

Tereza Queiroz

COORDENAÇÃO EDITORIAL

Jane Castellani

REVISÃO TIPOGRÁFICA

Carmen Irene Correia de Oliveira

COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO

Jorge Moura

PROGRAMAÇÃO VISUAL

Andréa Dias Fiães

Vera Lopes

COORDENAÇÃO DE ILUSTRAÇÃO

Eduardo Bordoni

ILUSTRAÇÃO

Equipe CEDERJ

CAPA

David Amiel

PRODUÇÃO GRÁFICA

Patricia Seabra

Copyright © 2005, Fundação Cecierj / Consórcio Cederj

Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, mecânico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, da Fundação.

A885b

Attias, Márcia

Biologia Celular I. v.1. 4.ed / Márcia Attias.-
Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2010.

166p.; 19 x 26,5 cm.

ISBN: 85-7648-148-0

1. Membrana celular. 2. Microscopia óptica. 3.
Criofratura.

4. Cultura celular. I. Silva, Narcisa Cunha e. II. Título.

CDD: 571.6

2010/1

Referências Bibliográficas e catalogação na fonte, de acordo com as normas da ABNT.

Governo do Estado do Rio de Janeiro

Governador
Sérgio Cabral Filho

Secretário de Estado de Ciência e Tecnologia
Alexandre Cardoso

Universidades Consorciadas

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**
Reitor: Almy Junior Cordeiro de Carvalho

**UERJ - UNIVERSIDADE DO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**
Reitor: Ricardo Vieiralses

UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
Reitor: Roberto de Souza Salles

**UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO**
Reitor: Aloísio Teixeira

**UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DO RIO DE JANEIRO**
Reitor: Ricardo Motta Miranda

**UNIRIO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**
Reitora: Malvina Tania Tuttman

SUMÁRIO

Módulo 1

Aula 1 – Microscopia óptica _____ **7**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 2 – Princípios de funcionamento dos microscópios eletrônicos ____ **21**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 3 – Criofratura _____ **39**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 4 – Cultura de células _____ **47**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 5 – Métodos bioquímicos para o estudo da célula _____ **57**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 6 – O uso de anticorpos na pesquisa _____ **75**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Módulo 2

Aula 7 – Estrutura da membrana plasmática _____ **87**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 8 – Proteínas de membrana _____ **103**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 9 – Permeabilidade da membrana _____ **117**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 10 – As proteínas transportadoras _____ **125**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 11 – Transporte passivo _____ **131**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Aula 12 – Transporte ativo _____ **139**

Márcia Attias / Narcisa Cunha e Silva

Gabarito _____ **153**

Microscopia óptica

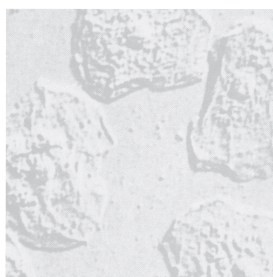
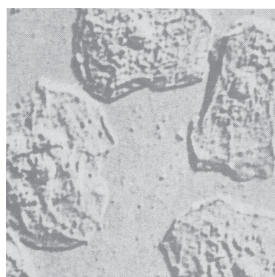
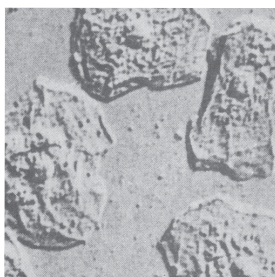
AULA

1

objetivos

Ao fim desta aula, você deverá ser capaz de:

- Traçar um breve histórico da microscopia.
- Definir o que é um microscópio.
- Conceituar limite de resolução.
- Descrever os princípios de funcionamento de um microscópio simples.
- Listar os principais tipos de microscópios ópticos e suas aplicações.
- Enumerar as principais etapas do preparo de amostras para microscopia óptica.



INTRODUÇÃO

O primeiro problema a enfrentar no estudo das células é o seu tamanho: as células são pequenas demais para serem observadas a olho nu. Por esse motivo, as primeiras células foram observadas e descritas apenas no século XVII, quando foi inventado o microscópio óptico.

Você tem idéia de qual é o tamanho de uma célula? As maiores células (algumas amebas de vida livre, células de algas filamentosas) medem cerca de 0,2mm; mas, em média, uma célula é 10 ou 20 vezes menor do que isso.

Você sabe qual o tamanho dos menores objetos que podemos distinguir a olho nu (sem ajuda de instrumentos especiais)? A resposta você vai encontrar mais adiante. Podemos distinguir uma formiga de uma pulga, mas somos capazes de ver os olhos desses insetos?

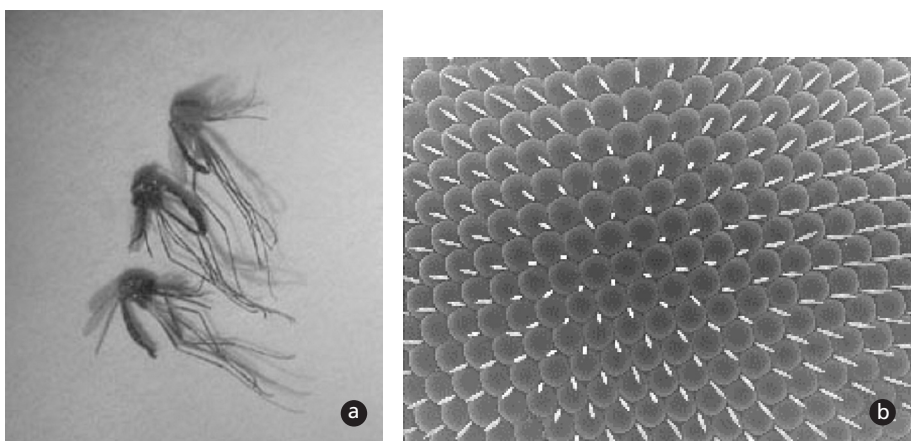


Figura 1.1: (a) Insetos como o mosquito *Aedes* são visíveis a olho nu, mas para vermos detalhes como o olho composto (b), precisamos utilizar equipamentos especiais (Fotos: Márcia Attias).

HISTÓRICO

No século XVII, foram construídos os primeiros *microscópios*. Com um deles, Robert Hooke (veja o box explicativo) observou lâminas de cortiça, chamando *células* aos pequenos espaços regulares da sua estrutura (**Figura 1.2**). Mais tarde, tanto Hooke quanto outros pesquisadores da época observaram que as células vivas não eram ocas como a cortiça, mas o nome original permanece até hoje. Não seria injusto ou incorreto dizer que o estudo da Biologia Celular começou nessa época.



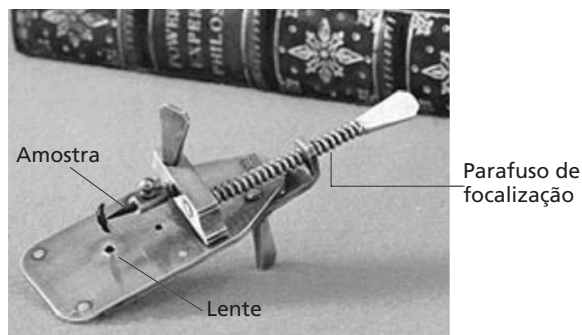
Figura 1.2: (a) Microscópio semelhante ao usado por Hooke. As partes componentes são análogas às dos microscópios usados hoje em dia. (b) Reprodução de um desenho feito por Hooke a partir da observação de lâminas de cortiça ao microscópio construído por ele. Cada um dos espaços foi por ele chamado de célula.

Robert Hooke (1635-1703)

O inglês Robert Hooke foi, em pleno século XVII, o que hoje chamamos de “homem dos sete instrumentos”, atuando com contribuições relevantes nos campos da Física, Astronomia, Química, Biologia, Geologia, Arquitetura e Tecnologia Naval. Foi colaborador de cientistas como Isaac Newton, seu grande rival da época, e Robert Boyle, a quem auxiliou na determinação das leis dos gases. Correspondeu-se com Antony van Leeuwenhoek confirmando suas observações ao microscópio. Entre outras criações, inventou ou melhorou instrumentos como o barômetro e o anemômetro e um mecanismo que tornou os relógios mais precisos. A Lei de Hooke, equação que descreve a elasticidade, é empregada até hoje. Suas contribuições nos campos da Biologia e Paleontologia não foram menos importantes. A reputação de Hooke na história da Biologia se deve em grande parte a sua obra *Micrographia*, publicada em 1665. Hooke desenvolveu o microscópio composto e o sistema de iluminação mostrados na **Figura 1.2.a**, utilizando-o para descrever detalhadamente uma grande variedade de organismos como insetos, esponjas, penas e aquela que parece ser sua maior contribuição, finas lâminas de cortiça (**Figura 1.2.b**). Em desenhos detalhados, Hooke descreveu a estrutura como pequenos poros, semelhantes a favos de mel, dando-lhes o nome de *células* (= pequenas celas, alojamentos dos monges nos conventos). Embora as estruturas observadas correspondessem apenas às paredes celulares de células vegetais já mortas, o nome prevaleceu e dele derivaram os termos Citologia e, mais modernamente, a Biologia Celular. Sua obra permanece até hoje, embora não exista nenhum registro de sua própria aparência.

Outro pioneiro da Microscopia e da Biologia Celular foi Antony van Leewenhoek, holandês que construía seus próprios microscópios (**Figura 1.3**) com apenas uma lente, mas com resolução suficiente para observar até mesmo protozoários e bactérias.

Figura 1.3: Um dos microscópios montados por Leeuwenhoek.



Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)

Embora tenha feito descobertas fundamentais em Biologia, como as bactérias e os protozoários (parasitas e de vida livre), Antony van Leeuwenhoek não era um cientista convencional para seu tempo. Ser filho de comerciantes, sem fortuna, sem educação universitária e sem dominar outros idiomas senão o holandês já seria o bastante para excluí-lo do ambiente acadêmico da época.

Ainda assim, com habilidade extraordinária para polir lentes, uma curiosidade infinda e uma mente aberta e livre dos dogmas científicos de sua época (o século XVII), Leeuwenhoek foi o primeiro a descrever as hemácias, os espermatozóides e muito mais. Acredita-se que, inspirado pelo livro de Hooke, *Micrographia*, Leeuwenhoek começou a polir lentes e a fabricar seus microscópios, tendo montado mais de 500 deles.

Seus microscópios (**Figura 1.3**), embora dotados de uma única lente, eram capazes de aumentar até em 200 vezes os objetos. Por outro lado, a iluminação era deficiente e sua manipulação bastante desconfortável para o observador. Em 1673, Leeuwenhoek começou a enviar cartas com suas observações à recém-criada Royal Society of London. Em 1680 foi eleito Membro Titular da mesma, juntando-se a Robert Hooke, Isaac Newton, Henry Boyle e outros cientistas de renome marcantes até nossos dias.

PRINCÍPIOS DO FUNCIONAMENTO DE UM MICROSCÓPIO ÓPTICO

Os microscópios ópticos atuais (**Figura 1.4**) guardam grande semelhança com os primeiros modelos usados por Hooke (**Figura 1.2.a**).

Figura 1.4: Principais componentes de um microscópio óptico simples.



Em todos os microscópios ópticos, atuais e antigos, teremos uma *fonte de luz* que é concentrada por um sistema de *lentes condensadoras* sobre uma *amostra* montada sobre uma lâmina. O feixe luminoso atravessa a amostra e é captado por uma *lente objetiva* que produz uma primeira imagem ampliada do objeto, que será em seguida captada pela *lente ocular* que projetará a imagem final na retina do observador (**Figura 1.5**).

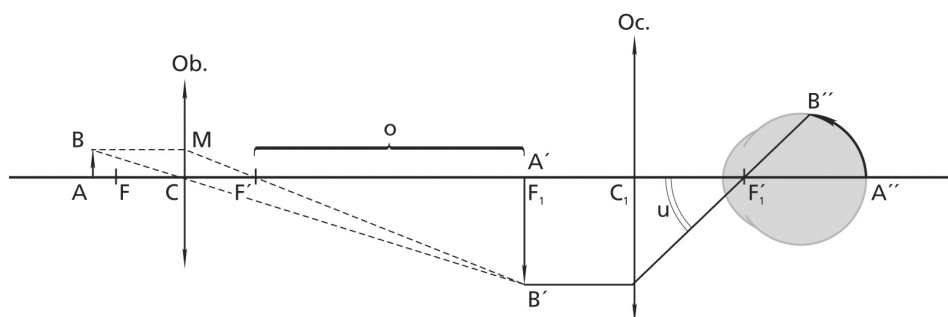


Figura 1.5: Esquema da formação da imagem em um microscópio óptico simples.

QUANTO AUMENTA UM MICROSCÓPIO ÓPTICO?

O aumento final é o resultado da multiplicação do aumento dado pela lente objetiva pelo aumento da lente ocular. Como existem várias lentes objetivas num mesmo microscópio, uma grande variedade de aumentos pode ser facilmente atingida, bastando girar o revólver. Assim, se utilizamos uma objetiva de 20x e uma ocular de 10x, o aumento final será de 200x ($10 \times 20 = 200$). Hoje em dia não é mais necessário desenhar as imagens observadas (como Hooke e seus contemporâneos faziam): a imagem final pode ser capturada por uma câmara fotográfica, de vídeo ou ainda por um sistema de computação. Uma ampliação suplementar pode ser obtida ampliando uma fotografia da imagem observada. Entretanto, de nada adiantaria ampliar a imagem além de determinado ponto, pois nenhuma informação suplementar será obtida. Este é o princípio do *limite de resolução*.

O LIMITE DE RESOLUÇÃO

Se dependêssemos apenas de nossos olhos, não conseguiríamos enxergar nada que medisse menos de 0,2mm. Este é o limite de resolução de nossos olhos (se enxergarmos muito bem, diga-se de passagem). Graças aos microscópios ópticos, pudemos distinguir objetos que medem até 1 milésimo desse valor, isto é, o limite de resolução dos microscópios ópticos é de 0,2 μ m. Naturalmente, isso depende da qualidade das lentes, mas, principalmente, do comprimento de onda da luz utilizada. Para saber como esse valor foi calculado, consulte o box a seguir.

O limite de resolução

O ponto-chave da Microscopia, seja ela óptica ou eletrônica, é o limite de resolução de um microscópio. Este conceito é bastante simples: trata-se da menor distância entre dois pontos em que eles podem ser vistos como objetos distintos.

Complicado? Nem tanto, observe a seguir:



Os objetos A e B estão a uma distância que nos permite separá-los como distintos, mas se eles estiverem muito próximos, não podem ser nitidamente separados, ou seja, o poder de resolução dos nossos olhos não é suficiente para determinar os limites de cada objeto.



Esse conceito é universalmente expresso na seguinte fórmula:
$$d = \frac{0,61\lambda}{\alpha}$$

em que:

d = limite de resolução.

λ = comprimento de onda da radiação utilizada; no caso do feixe luminoso do microscópio óptico, 550nm.

$\alpha = n \cdot \sin \theta$, onde n é o índice de refração do meio (ar/água) e θ é metade do ângulo formado pelo cone de luz que entra na objetiva (**Figura 1.6**).

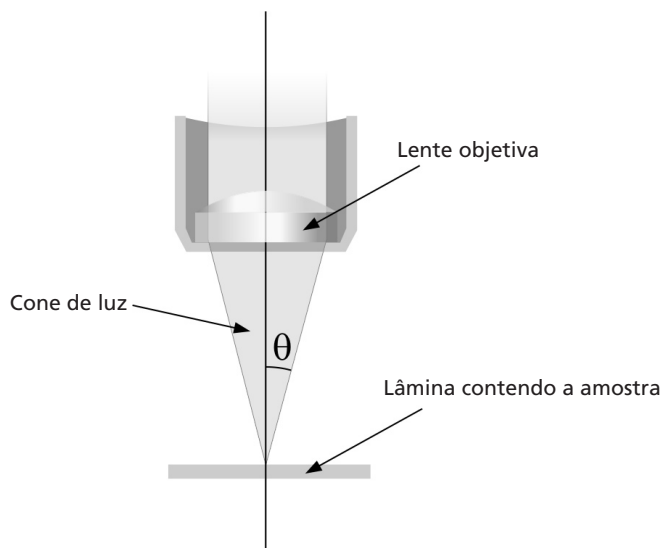


Figura 1.6

Feitas as contas, $d = 0,2\mu\text{m}$ no microscópio óptico e, como você deve saber, $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$.

Na próxima aula, você verá que esse limite foi novamente ultrapassado com a construção de microscópios eletrônicos, capazes de resolver (distinguir) objetos de até 0,2nm. Caso você não esteja familiarizado com estas **UNIDADES DE MEDIDA**, consulte a **Figura 1.7**.

A **Figura 1.7** é uma escala relativa das dimensões de células e estruturas subcelulares, assim como do alcance dos instrumentos (microscópios) utilizados na sua descrição e estudo.

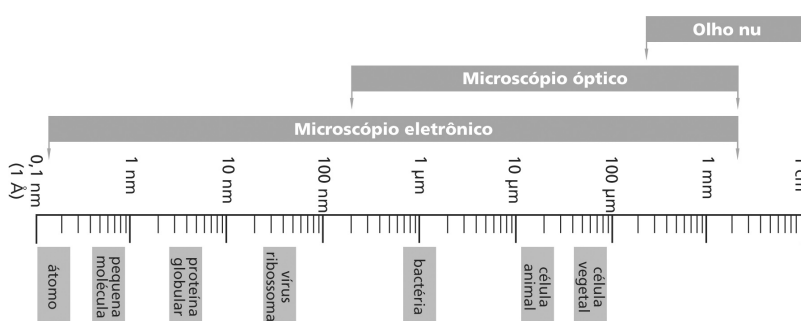


Figura 1.7: Escala comparada do limite de resolução da microscopia óptica e da eletrônica e os objetos que cada uma pode discriminar.

Se você ainda não está convencido de que a resolução não depende só das lentes, fique sabendo que Antony van Leeuwenhoek já observava bactérias no século XVII, quando a tecnologia para construção de lentes e microscópios era muito inferior à de nossos dias, mas as propriedades físicas da propagação da luz eram as mesmas.

Caso você esteja considerando ampliar indefinidamente uma imagem observada ao microscópio óptico até conseguir enxergar a estrutura da membrana celular, por exemplo, podemos adiantar que isso será tão eficaz quanto ampliar uma foto 3x4 para contar quantos cílios há na pálpebra superior esquerda da pessoa.

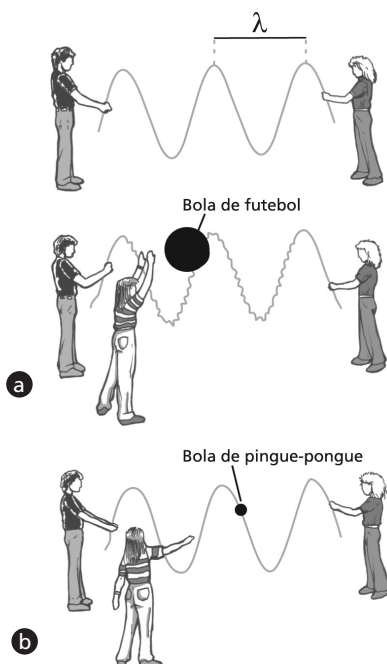
Concluindo: aumento e resolução são coisas distintas, e o aumento que não traz informações adicionais sobre a amostra é chamado *aumento vazio*.

Por que será que isso acontece? Tudo é consequência da luz.

As células e as estruturas que as compõem são muito pequenas para serem medidas em centímetros ou milímetros, como os objetos do nosso cotidiano. Portanto, para elas usamos as **UNIDADES DE MEDIDA** dos micrômetros (símbolo μm) e nanômetros (símbolo nm). O micrômetro vale 1 milésimo do milímetro e o nanômetro vale 1 milésimo do micrômetro.

$$1\text{m} = 10^3\text{mm} \\ \text{ou } 10^6\text{mm} \\ \text{ou } 10^9\text{nm}$$

Observação: 10^3 é a maneira simplificada com que os matemáticos escrevem as potências de 10, isto é, igual a 1.000; da mesma forma 10^6 é 1.000.000, e assim por diante.



Observe a **Figura 1.8**: a luz se propaga na forma de ondas. Estas ondas colidem com as partículas que formam a amostra, sofrendo interferências. Assim se origina a sensação de contraste (claro/escuro). A onda, por sua vez, representa a luz visível: apenas objetos até um determinado tamanho são grandes o bastante para causar interferência no trajeto do raio luminoso. Objetos menores passam despercebidos, e não causam alteração na propagação da onda.

Figura 1.8: O comprimento de onda da luz sofre interferência de objetos de determinado tamanho (a), enquanto objetos menores não desviam o trajeto da luz (b). Os do primeiro tipo são visíveis, e os do segundo, não.



Dê uma paradinha!

Imagine-se andando de bicicleta numa ciclovia. Você segue em linha reta à velocidade da luz. Você é um raio de luz! Pedrinhas, formigas e outros pequenos objetos não impedem que você continue deslizando suavemente, sem interferências.

Já uma chapinha de refrigerante ou um pedregulho podem fazer sua bicicleta se desviar do trajeto e, no caso de obstáculos maiores, podem impedir sua passagem. Assim se comporta a luz ao atravessar as amostras observadas ao microscópio óptico. Agora, chega de passear: de volta ao estudo!

OS DIFERENTES MICROSCÓPIOS ÓPTICOS

Além de pequenas, as células possuem outras características que tornam difícil sua observação:

1. em geral, são transparentes;
2. são muito hidratadas e frágeis;
3. quando em órgãos ou tecidos, precisam ser cortadas em lâminas finas que permitam a passagem do feixe luminoso.

Por conta disso, foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos tanto novas técnicas de preparo das amostras (vide box), que lhes conferissem maior resistência e contraste, quanto novas tecnologias na construção de microscópios que permitissem a observação de células vivas.

O preparo de amostras para o microscópio óptico de campo claro

Para que possam ser guardadas por muito tempo, as amostras de células e tecidos precisam em geral de um tratamento químico que garanta sua preservação. Esse tratamento inclui várias etapas.

1. Fixação: é o tratamento da amostra com substâncias químicas, como o formol, que preservam sua forma original.

2. Desidratação: é a substituição da água presente dentro e fora das células por um solvente orgânico, como o etanol ou metanol. Esse solvente tanto pode ser removido deixando a lâmina secar quanto pode ser substituído por parafina ou outra resina que torne o tecido rígido, permitindo que seja fatiado.

3. Microtomia: tecidos como fígado ou músculo são muito espessos e precisam ser cortados em fatias mais finas, que permitam a passagem parcial da luz. Uma vez embebidos em parafina, deixa-se solidificar, e o tecido pode ser cortado (fatiado).

4. Coloração: como a maioria das células e seus componentes não são naturalmente coloridos, uma série de corantes foi testada e, devido a sua afinidade química por determinados componentes celulares, são empregados, ajudando na identificação dos diferentes compartimentos celulares. O azul de metileno é um desses corantes.

Mais detalhes sobre as técnicas de preparo de amostras para microscopia óptica, você terá em outra disciplina.

OS DIFERENTES MICROSCÓPIOS ÓPTICOS

O resultado disso é que existe hoje uma grande família de microscópios ópticos, cada um com suas vantagens e limitações sobre os demais. Dentre os de uso mais corriqueiro, é essencial que você conheça:

1. Microscópio de campo claro ou microscópio simples: é o microscópio “padrão” representado na **Figura 1.9.a**. Em geral, requer que a amostra seja fixada e corada antes da observação (**Figura 1.9.b**). Entretanto, desde que a iluminação seja ajustada fechando-se um pouco mais a passagem de luz pela condensadora, é possível observar células *a fresco*, isto é, sem coloração prévia (**Figura 1.9.c**).

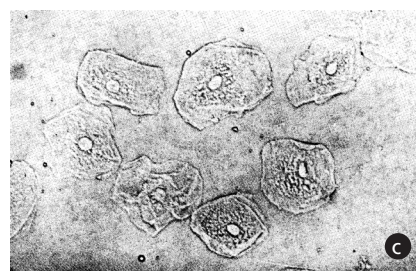
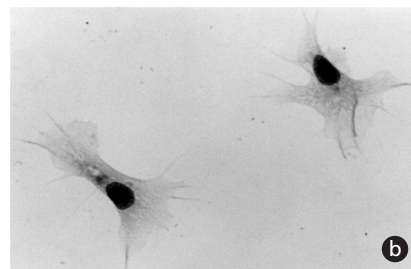


Figura 1.9: Em (a), microscópio óptico de campo claro. Em (b), hemócito (célula do sangue) de um molusco corado. Em (c), células que revestem a mucosa bucal observadas sem nenhum tipo de corante. Que estruturas você reconhece? (Fotos b: Marco Antonio V. Santos, c: Raul D. Machado).

2. Microscópio de contraste de fase: dispensa o uso de corantes, permitindo a observação de células vivas (**Figura 1.10**). Um sistema de filtros (anéis de fase) interfere no trajeto da luz, criando um contorno claro/escuro em torno das estruturas celulares. Esse contraste permite a observação de células vivas, mas se elas estiverem muito aglomeradas, a imagem se torna confusa, requerendo um sistema óptico mais elaborado.

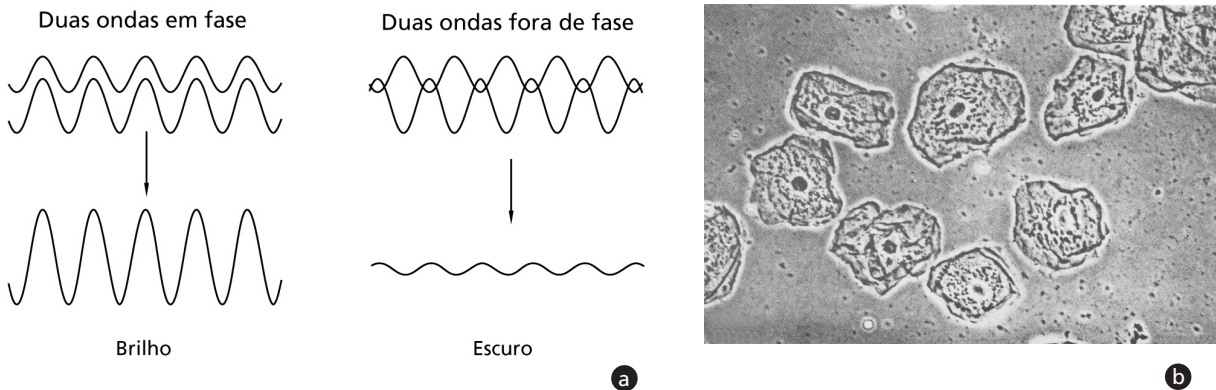
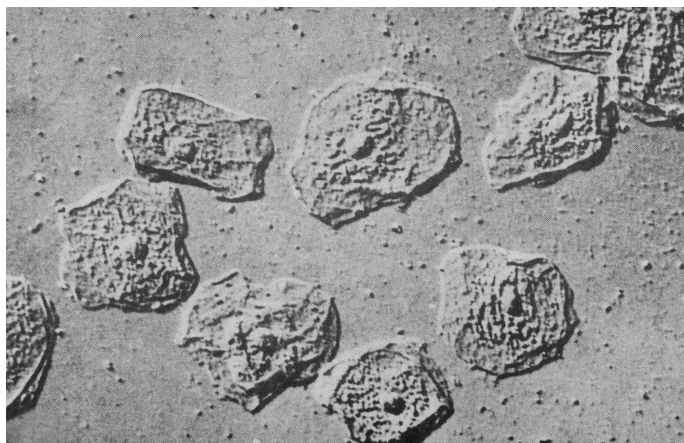


Figura 1.10: A luz, ao interagir com um sólido (= célula), tem sua trajetória atrasada, criando um contraste em relação à luz que não encontrou nenhum obstáculo (a) (esquema à esquerda). Esse é o princípio do microscópio de contraste de fase. À direita (b), você vê as mesmas células epiteliais (retiradas da mucosa bucal) já observadas em campo claro tal como aparecem nesse microscópio. Há um halo em torno da célula e de algumas de suas estruturas internas.

3. Microscópio de contraste interferencial: também utiliza filtros para criar contraste a partir de diferenças no trajeto da luz. A imagem final é mais agradável para o observador (**Figura 1.11**), mas o sistema é menos comum, pois é mais caro que o contraste de fase. Também permite observar células vivas. Quando essas células estão dispostas em camadas, pode-se focalizar apenas um plano, obtendo-se assim cortes ópticos sem que o tecido seja cortado.

Figura 1.11: As mesmas células epiteliais, observadas na Figura anterior, agora em contraste interferencial. A imagem sombreada dá noção de relevo das estruturas celulares (Foto: Raul D. Machado).



4. Microscópio de fluorescência: utiliza uma fonte de luz ultravioleta e requer o uso de corantes fluorescentes (você verá mais detalhes na Aula 6) que se ligam a componentes específicos das células. Esses corantes são capazes de absorver luz de um determinado comprimento de onda (ultravioleta, por exemplo) e emitir num outro, dentro do espectro visível (**Figura 1.12**). Em algumas situações, as células podem ser observadas vivas; em outras, não.

O mais comum é que um modelo possa ter seus jogos de lentes e fontes de luz alternados (intercambiados) para que se possa observar amostras pelos três métodos.

5. Microscópio confocal de varredura a laser: a conjugação da ciência da computação aos microscópios de fluorescência trouxe uma nova dimensão à microscopia óptica.

O microscópio confocal possui, além de uma fonte de luz visível, uma fonte de luz ultravioleta e uma fonte de raio laser. O feixe de laser incide sobre a amostra; um sistema de filtros e aberturas especiais captura sucessivamente a fluorescência emitida de vários planos focais.

Este conjunto de imagens é capturado digitalmente, e imagens como as da **Figura 1.13.b** em que você pode ver a distribuição de microtúbulos em uma célula são geradas em programas específicos de computador.

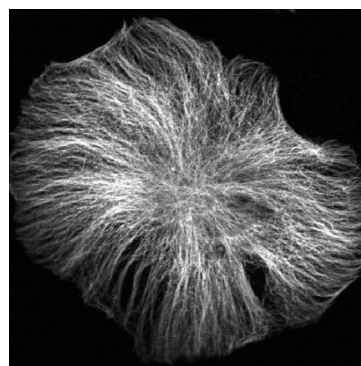
**a****b**

Figura 1.12: (a) Microscópio confocal de varredura a laser do Laboratório de Ultra-estrutura Celular do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). (b) Distribuição de microtúbulos em uma célula de mamífero (Foto: Tecia Ulisses de Carvalho).

Alguns links interessantes – apesar de serem em inglês, vale a pena visitar esses endereços na internet.

1- Dados biográficos de Leeuwenhoek

<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>

2- Dados biográficos de Robert Hooke

<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/hooke.html>

3- Museu da Microscopia. Tutoriais sobre princípios de óptica. Galeria de imagens, vídeos on line. Vale a visita

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/museum/index.html>

4- Página da Sociedade Americana de Biologia Celular que disponibiliza muitos links, imagens e vídeos interessantes.

<http://www.ascb.org/>

5- Atlas de imagens de Microscopia (óptica e eletrônica), organizado pelo departamento de Histologia da UERJ.

<http://www2.uerj.br/~micron/>

6- Maravilhosas imagens de fluorescência obtidas em microscópio de fluorescência confocal.

<http://www.molbio.princeton.edu/confocal/510image2/Zeisslist2.html>

7- Imagens de protistas em Microscopia óptica de contraste interferencial e de fase. Links para imagens desses mesmos organismos em microscopia eletrônica, mostrando como vários métodos de observação devem ser conjugados na análise de um organismo.

<http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/gallery.html> -

8- Página da Nikkon, com tutoriais onde se pode manusear virtualmente vários tipos de microscópio óptico.

<http://www.microscopyu.com/tutorials/>

Faça sua própria busca na internet a partir de palavras-chave como:

- Microscopia
- Microscope
- Fluorescência
- Fluorescence
- Células

Se quiser, faça outras buscas, com palavras que você escolher.

RESUMO

Os microscópios ópticos começaram a ser construídos no século XVII, e com eles foram observadas e batizadas as primeiras células. O aperfeiçoamento na construção de lentes, filtros e sistemas de iluminação deu origem a uma grande variedade de microscópios ópticos. Além dos de campo claro, que requerem que o material seja corado, existem microscópios de contraste de fase e de contraste interferencial, onde as células podem ser observadas vivas e sem coloração especial. Os microscópios de fluorescência permitem ver estruturas normalmente muito finas para serem observadas com os comprimentos de onda da luz visível. O microscópio confocal a laser inaugurou uma nova era na microscopia óptica, mas a observação da maior parte das estruturas que compõem a célula só é possível com um instrumento de maior poder de resolução: o microscópio eletrônico, tema da próxima aula.

EXERCÍCIOS

1. Com base no que foi estudado, calcule o aumento final de um microscópio óptico que utilize as seguintes combinações de lentes oculares e objetivas:

Ocular	Objetiva	Aumento final
5x	40x	
10x	20x	
20x	10x	
10x	100x	

2. Por que as células receberam esse nome?
3. Compare o microscópio de Hooke (**Figura 1.2**) com o modelo atual (**Figura 1.4**), identificando as partes análogas.
4. Qual a importância de cada um dos componentes listados a seguir para observação ao microscópio óptico?
- fonte de luz;
 - lente condensadora;
 - espessura da amostra;
 - contraste da amostra.

5. Em que tipo(s) de sistema óptico podemos observar células vivas e sem a adição de corantes?
6. O que você entende por microscopia de fluorescência?
7. O que é limite de resolução? Qual o limite de resolução do microscópio óptico?
8. Uma hemácia mede 8mm(oito milímetros). Quando observada sob um aumento total de 1000 vezes, quanto medirá?
9. Por que, em geral, o núcleo é a única estrutura claramente visível dentro de uma célula observada ao microscópio óptico?
10. Converta para as unidades correspondentes:

5 μm =nm

0,5mm= μm

100 μm =nm

1000 μm =mm

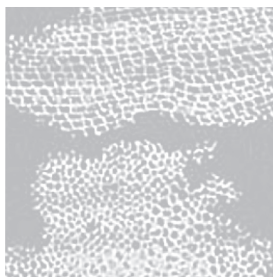
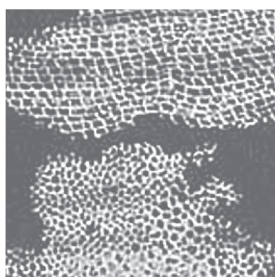
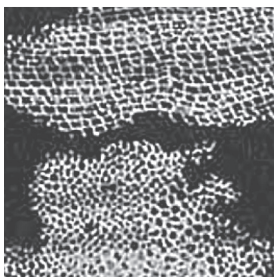
60nm=..... μm
11. Uma célula foi fotografada com 2000x de aumento no microscópio óptico. Uma estrutura que tenha na realidade 2 μm aparecerá com que comprimento na foto?
12. Procure determinar em que tipo de microscópio óptico foram obtidas as imagens que estão na última página deste livro. Se conseguir identificar as amostras, melhor ainda; caso contrário, consulte o gabarito desta aula no final do livro.

Princípios de funcionamento dos microscópios eletrônicos

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Situar a microscopia eletrônica como instrumento básico no estudo da célula.
- Situar a microscopia eletrônica num contexto histórico.
- Reconhecer os componentes básicos do funcionamento de um microscópio eletrônico.
- Discriminar os diferentes tipos de microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura.
- Correlacionar os equipamentos usados e as informações contidas nas imagens.



INTRODUÇÃO

Os microscópios eletrônicos são instrumentos fundamentais no estudo da célula. Foram desenvolvidos na primeira metade do século XX, sendo contemporâneos da televisão e dos aparelhos de raios-X.

HISTÓRICO

O século XX conheceu uma verdadeira "febre" a partir da descoberta dos elétrons, feita por Thompson, em 1897. Tanto os cálculos feitos pelos físicos teóricos, quanto os experimentos feitos nos "tubos de raios catódicos" vieram a provar a natureza ondulatória dos elétrons. Esses pioneiros provavelmente não faziam a menor idéia aonde aquelas observações iriam levar, mas o estudo do comportamento ondulatório dos elétrons resultou tanto na invenção dos aparelhos de televisão quanto na de um dos instrumentos fundamentais no estudo da Biologia Celular: o **microscópio eletrônico**. No ano de 1926, Bush provou que era possível focalizar um feixe de elétrons utilizando uma lente eletromagnética circular, estabelecendo assim os fundamentos da óptica eletrônica. Com base nesses princípios, foi iniciada em 1931 a construção do primeiro microscópio eletrônico por um grupo liderado por Ruska. Pelo enorme avanço que a microscopia eletrônica trouxe para as ciências, Ruska recebeu o Prêmio Nobel na década de 80. Em 1939, a Siemens já construía o primeiro modelo comercial de microscópio eletrônico.

Quando falamos em microscópio eletrônico, na verdade estamos nos referindo a uma família de instrumentos que utiliza um feixe de elétrons para produzir uma imagem ampliada de um objeto. Essa família é composta por dois tipos de microscópios: os *microscópios eletrônicos de transmissão* e os *microscópios eletrônicos de varredura*. Os primeiros se baseiam na capacidade do feixe de elétrons de atravessar a amostra, enquanto nos segundos o feixe de elétrons percorre a superfície da amostra gerando um sinal que será visualizado num monitor (Figura 2.1).

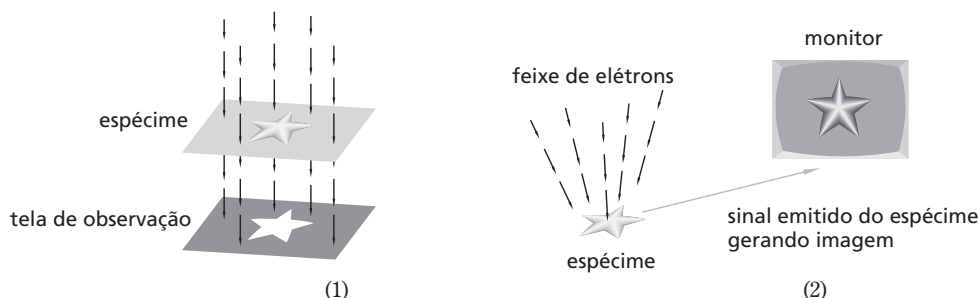
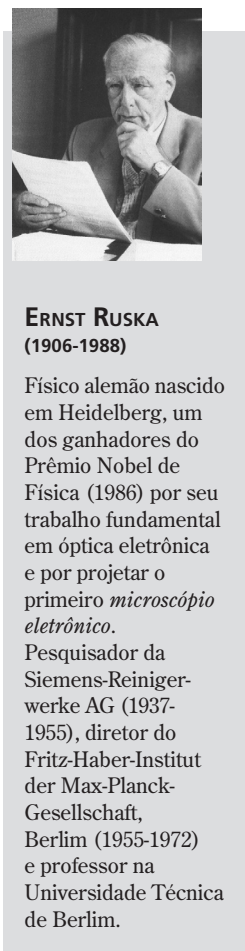


Figura 2.1: Princípios de funcionamento do microscópio eletrônico de transmissão e do microscópio eletrônico de varredura. No microscópio eletrônico de transmissão (1) o feixe de elétrons atravessa as áreas da amostra onde átomos mais leves estão presentes. No microscópio eletrônico de varredura (2) a interação dos elétrons com a superfície da amostra gera sinais que formam uma imagem num monitor de TV.

Três séculos de microscopia óptica serviram para acelerar os progressos na interpretação das imagens da microscopia eletrônica. Ao microscópio óptico não é difícil determinar o formato geral da célula e a localização do núcleo, mas não é muito fácil identificar estruturas dentro da célula. Por quê? Veja a resposta ao lado.

Mesmo assim, grande parte das estruturas intracelulares, as *organelas*, já havia sido descrita ao microscópio óptico. Naturalmente, as funções e a estrutura detalhada dessas organelas só foram esclarecidas mais tarde. O grande salto conferido à Biologia Celular depois da invenção desse instrumento reside no grande *poder de resolução* que suas imagens possuem.



Resposta:
Porque são pequenas, transparentes, de forma e tamanho variável

$$d = \frac{0,61\lambda}{\alpha}$$

onde, d = limite de resolução

λ = comprimento de onda da radiação, no caso de elétrons, $0,37\text{\AA}$

α = abertura da objetiva em radianos ($0,5^\circ = 0,01\text{rad}$)

assim,

$d = 2,2\text{\AA}$ no microscópio eletrônico e

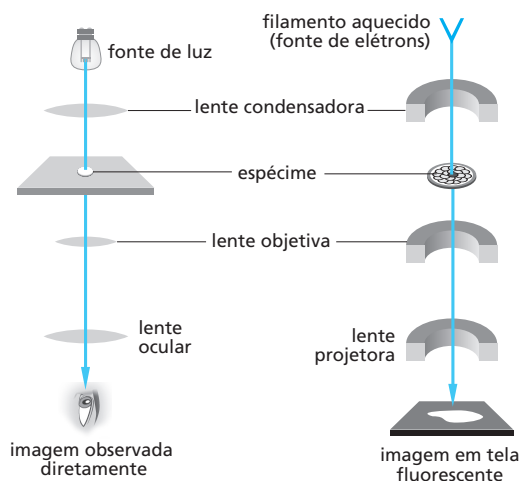
\AA = angstrom. Sabe quantos angstroms há em 1 m? $1\text{m} = 10^{10}\text{\AA}$

Isto é, não é apenas uma questão de **aumentar** mais as células e sim de permitir que sejam observadas estruturas **menores** dentro delas.

O microscópio eletrônico de transmissão

O microscópio eletrônico de transmissão é idêntico ao microscópio óptico na montagem de seus itens básicos (Figura 2.2), apenas é maior e invertido.

Figura 2.2: Comparação entre o microscópio óptico (1) e o microscópio eletrônico de transmissão (2) mostrando a posição relativa e a equivalência de seus componentes.



O que os diferencia fundamentalmente é:

1– *a fonte*: luz visível no microscópio óptico e feixe de elétrons no microscópio eletrônico de transmissão;

2– *o vácuo* na coluna do microscópio eletrônico de transmissão;

3– *as lentes*: de vidro no microscópio óptico e eletromagnetos no microscópio eletrônico de transmissão;

4– *a espessura da amostra*: da ordem de micrômetros (μm) no microscópio óptico e de nanômetros (nm) no microscópio eletrônico.

O *feixe de elétrons* é gerado por um filamento de tungstênio que é aquecido; podemos comparar ao que observamos numa lâmpada em que o filamento aquecido emite o feixe luminoso (e elétrons também).

O *vácuo*, que também existe dentro do bulbo da lâmpada, é necessário não apenas para impedir a combustão do filamento na presença de oxigênio como também para impedir a colisão do feixe de elétrons com moléculas do ar. Por outro lado, esse é um dos fatores que impossibilita a observação de células vivas no microscópio eletrônico de transmissão.

As *lentes magnéticas* desviam e orientam o feixe de elétrons da mesma forma que as lentes de vidro desviam e orientam o feixe de luz; lembre-se de que elétrons são uma radiação de carga negativa, sendo portanto atraídos por cargas opostas e repelidos por cargas semelhantes.

Já a *amostra* precisa ser cortada em fatias muito finas para ser atravessada pelos elétrons. Mesmo a lâmina de vidro mais fina barraria o feixe de elétrons. Por esse motivo são usadas telas de cobre para servir de suporte para os cortes *ultrafinos* (o processamento e o preparo das amostras para observação serão descritos mais adiante).

A seguir você vê uma foto de um microscópio de transmissão; note como ele é bem maior que os microscópios ópticos, a começar pela coluna por onde passa o feixe de elétrons e onde estão distribuídas as lentes magnéticas (**Figura 2.3**).

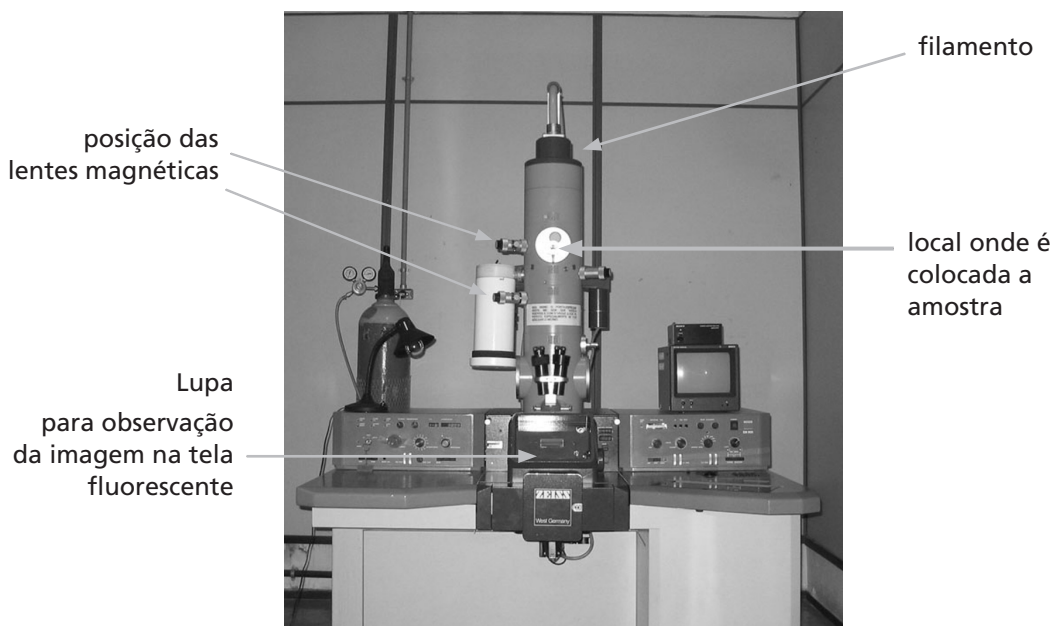


Figura 2.3: Microscópio eletrônico Zeiss 900 instalado no Instituto de Biofísica da UFRJ.

COMO SE FORMA A IMAGEM NUM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO?

Ao interagir com a amostra, os elétrons do feixe podem (Figura 2.4):

- 1– passar entre os átomos sem colidir com eles;
- 2– ser barrados por um átomo desviando-se num grande ângulo (desvio elástico);
- 3– ser levemente desviados de sua rota por um átomo (desvio inelástico);

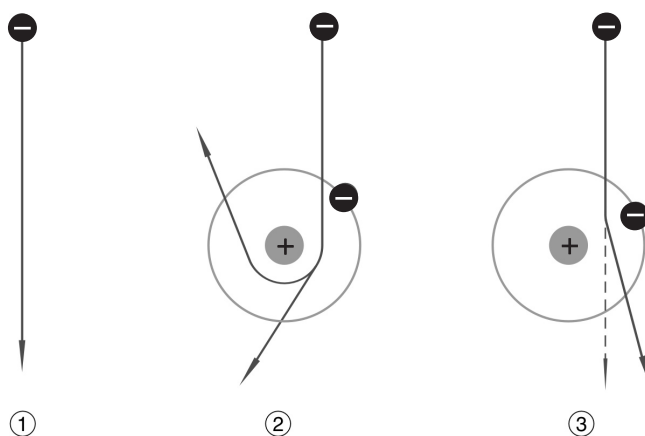


Figura 2.4: Possíveis desvios na trajetória de um elétron ao interagir com um átomo.

Destas três possibilidades de interação resultará a imagem no microscópio eletrônico de transmissão: os elétrons barrados ou desviados (2) serão excluídos da imagem final, resultando em pontos escuros, enquanto os elétrons que atravessarem a amostra (1 e 3) irão colidir com uma tela fluorescente, dando origem a pontos claros (**Figura 2.5**).

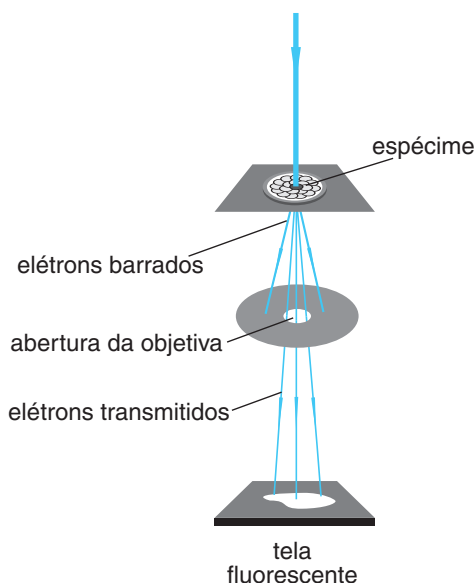


Figura 2.5: Formação da imagem no microscópio eletrônico de transmissão.

PREPARO DE AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

O ambiente no interior da coluna do microscópio eletrônico – vácuo, feixe de elétrons – não é nem um pouco favorável à preservação da estrutura celular. Além disso, a composição química das células, basicamente átomos leves como C, H, O e N, também não é propícia à formação de imagens no MET. Por esses motivos, assim como o microscópio foi-se aperfeiçoando desde sua invenção, paralelamente toda uma metodologia de preparação de amostras para observação ao microscópio eletrônico de transmissão foi sendo desenvolvida.

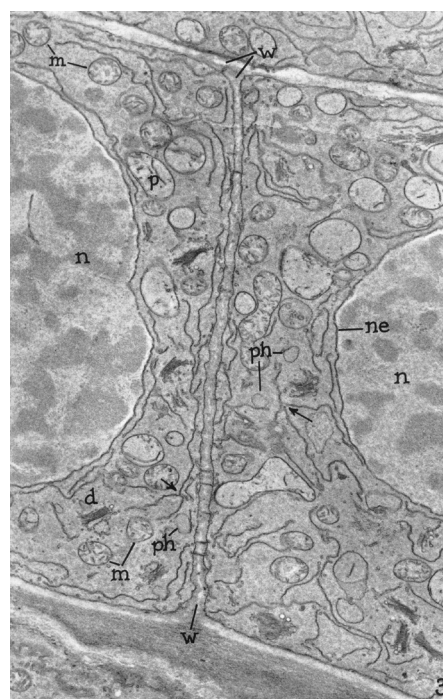
No início era assim:

A micrografia ao lado foi obtida em 1945 com microscópio de transmissão utilizando espécime biológico (um fibroblasto de embrião de pinto). Repare que é uma célula inteira e que a imagem lembra muito o que observamos em microscopia óptica.

Cortesia de www.rockefeller.edu/rucal/journey/journey.html

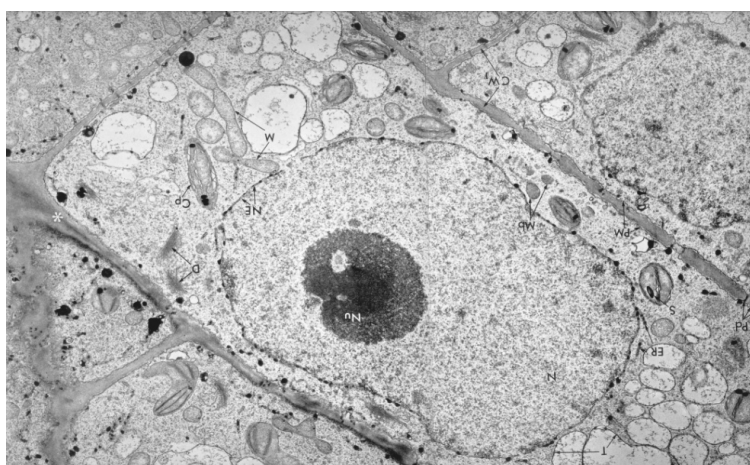


O uso de substâncias para preservar as estruturas celulares, chamadas fixadores, tornou o microscópio muito mais útil. Veja na figura ao lado a imagem de uma célula vegetal fixada com uma solução de KMnO_4 . O citoplasma aparece “vazio”, mas muitas estruturas já são reconhecíveis. Veja no final da aula, se você identificou corretamente as organelas.



Keith Porter e Raul D. Machado

O uso mais recente do glutaraldeído, do OsO_4 e de soluções tampão, que mantêm o pH e a osmolaridade adequadas à boa preservação celular, resulta em imagens como esta, em que a estrutura da célula pode ser observada em toda a sua complexidade.



Ledbetter e K. Porter

As etapas desse processo estão esquematizadas na **Figura 2.6** e são as seguintes:

1– Fixação: Em geral é feita mergulhando as células ou tecidos em soluções que estabilizam as membranas e os constituintes celulares na forma o mais próxima possível da *in vivo*. Os mais utilizados são o formaldeído (sim, o formol, também utilizado na preservação de cadáveres) e o glutaraldeído, superior ao formol e por isso mais utilizado do que este. Essas substâncias, chamadas **fixadores**, são empregadas diluídas em **tampões**, que ajudam a manter o pH e a osmolaridade da solução fixadora o mais próximas possível das condições vitais. Dessa maneira evita-se a deformação ou o rompimento das estruturas celulares.

2– Pós-fixação e contrastação: Como os seres vivos são compostos basicamente por átomos leves que desviam pouco ou nada a passagem do feixe de elétrons, são utilizadas soluções de sais de metais pesados (Fe, Os, Ur, Pb), que, além de melhorarem a preservação das células, aumentam o contraste das amostras quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Esses sais se impregnam seletivamente nas membranas (caso do ósmio e do chumbo), no DNA (caso do urânio) ou em outros componentes celulares, facilitando a visualização dessas estruturas. O tetróxido de ósmio (OsO_4) impregna-se nas membranas funcionando como um fixador e conferindo simultaneamente maior contraste às mesmas. Por ser utilizado depois do glutaraldeído, é um *pós-fixador*. Já os sais de chumbo e urânio geralmente são utilizados na última etapa de preparação da amostra, logo antes da observação ao microscópio eletrônico.

3– Desidratação, inclusão e microtomia: A fixação confere preservação às células; entretanto, o fato de serem em geral muito espessas e hidratadas para que o feixe de elétrons possa atravessá-las também é um obstáculo a ser superado. Para isso as amostras têm toda sua água substituída, inicialmente por um solvente orgânico como álcool etílico ou acetona, e em seguida por uma resina que, inicialmente, é líquida, mas nas condições adequadas (em geral ao ser aquecida) endurece, permitindo que as amostras sejam cortadas em fatias finas o suficiente para que os elétrons possam passar nas áreas em que não se impregnaram os metais pesados.

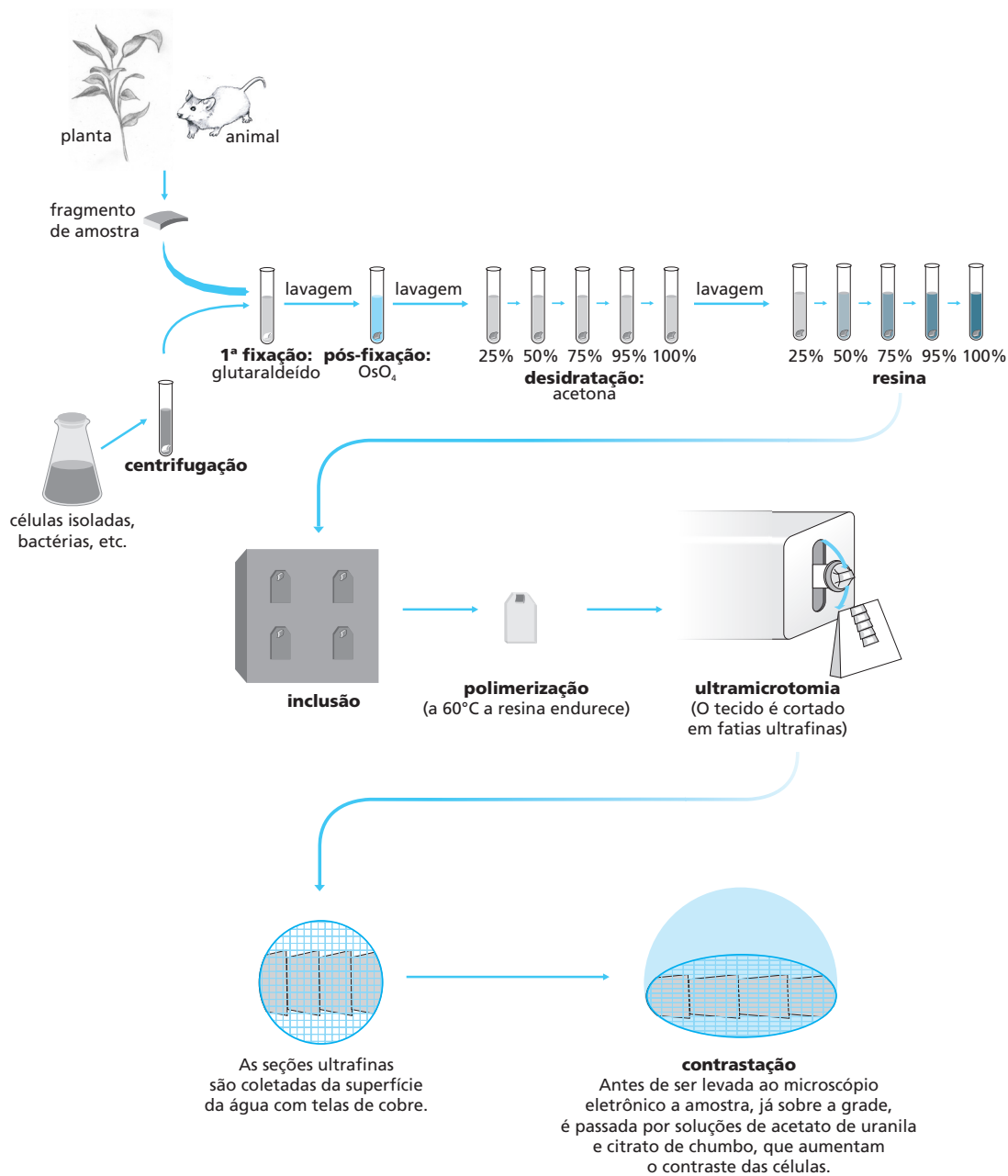
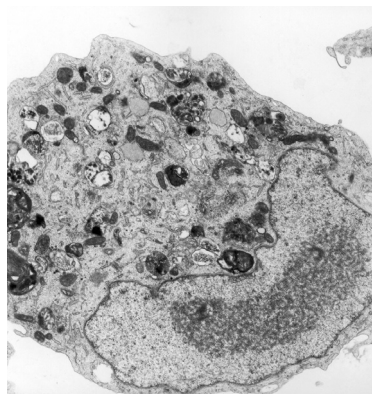


Figura 2.6: Preparo de amostra para microscópio eletrônico de transmissão.

As imagens das amostras observadas ao microscópio eletrônico de transmissão podem ser fotografadas ou gravadas digitalmente para registro e estudo posterior (Figura 2.7).

Uma idéia mais clara sobre a preparação de amostra para microscopia eletrônica você terá consultado a plataforma Cederj.

Figura 2.7: Corte ultrafino de um hemócito de caramujo como o visto na Figura 1.8D. Ao microscópio eletrônico de transmissão podemos observar que o núcleo não é compacto e que diversas organelas estão dispersas no citoplasma. (Foto Marco Antonio Vasconcelos Santos)



Dê uma paradinha!

Elétrons, fótons, fixadores e microtomia... quanta novidade, não? Neste ponto sugerimos que você interrompa a leitura e reveja os muitos conceitos aqui apresentados, antes de iniciar a leitura do texto sobre microscopia eletrônica de varredura. Questões de auto-avaliação sobre este tema você encontrará junto com as de microscopia eletrônica de varredura. No pólo você encontrará material em vídeo sobre o assunto.

A microscopia eletrônica de transmissão permite a observação do interior da célula e de suas estruturas e organelas. Infelizmente, como a observação é em geral feita em fatias muito finas das células, temos sempre imagens bidimensionais de objetos que, na realidade, são tridimensionais. Essa dificuldade foi, ao menos parcialmente contornada pela microscopia eletrônica de varredura, onde a resolução de detalhes da célula se combina à observação da sua estrutura tridimensional.

O MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

No início deste texto você pôde observar um esquema muito simplificado, comparando as imagens obtidas num microscópio de transmissão com o de varredura (Figura 2.1). A Figura 2.8 compara os componentes do microscópio eletrônico de varredura com o de transmissão. No microscópio de varredura (Figura 2.8) um filamento de tungstênio aquecido gera um feixe de elétrons, que também incide sobre a amostra, mas ao invés de atravessá-la varre a superfície ponto a ponto; porém, nesse caso, ao invés de atravessá-la, interage com a amostra, extraindo da superfície desta outros elétrons (chamados elétrons secundários) que geram um sinal luminoso que é convertido numa imagem (Figura 2.9).

Como acabamos de comentar, o feixe de elétrons passeia sobre a amostra, como o feixe de *laser* sobre o CD que você ouve. Assim como de cada ponto do CD é extraído um sinal sonoro diferente (a música!), cada ponto da amostra interage de modo diferente com o feixe de elétrons e dessas diferenças são gerados pontos mais ou menos brilhantes que formarão a imagem. Essa imagem é observada num monitor de TV e pode ser registrada em fotografia ou num computador. Veja também um modelo de microscópio eletrônico de varredura na **Figura 2.10**.

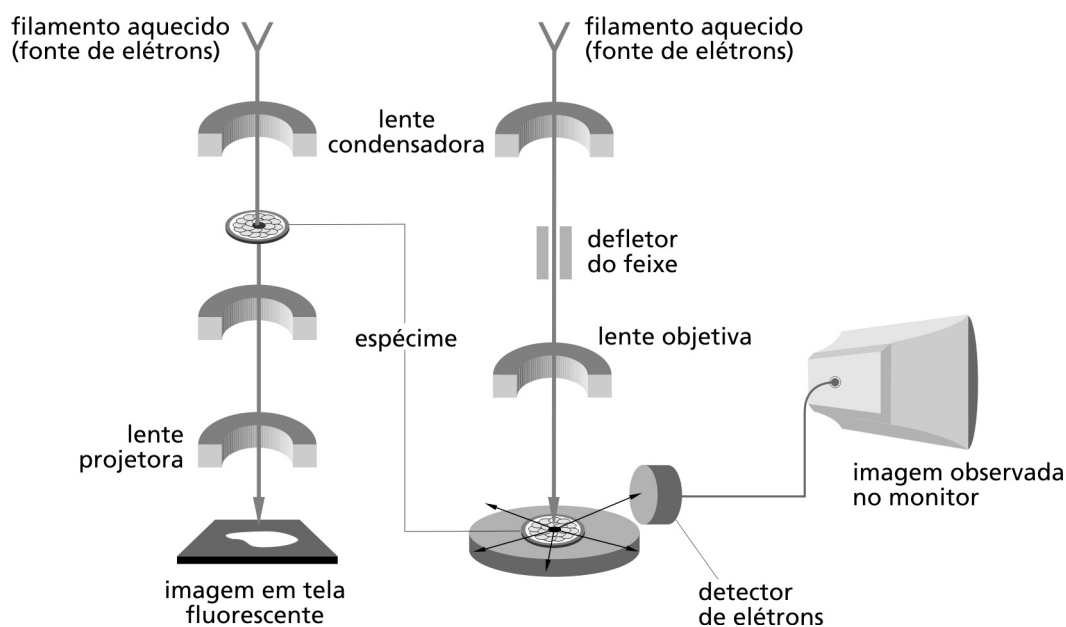


Figura 2.8: Filamento aquecido (fonte de elétrons) do MET, apontar a lente objetiva do MEV.

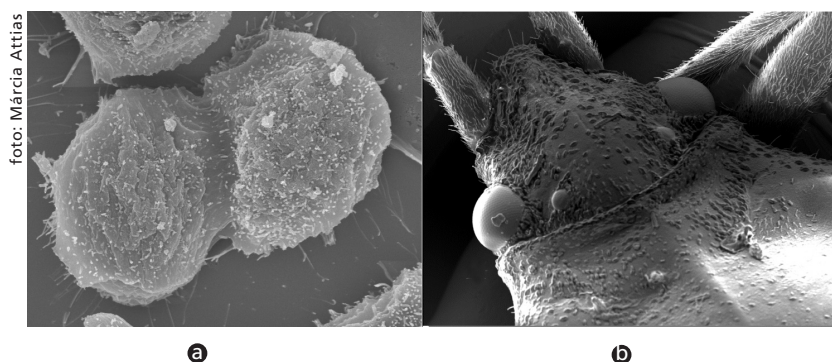


Figura 2.9: Imagens de microscopia de varredura: A: Células na fase final da divisão. B: Detalhe da região anterior do inseto *Oncopeltus fasciatus*. A sensação de profundidade e relevo são as principais características dessa modalidade de microscopia eletrônica.

foto: Márcia Attias



Figura 2.10: Foto de microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310 em operação no Instituto de Biofísica da UFRJ.

PREPARO DA AMOSTRA PARA MICROSCOPIA DE VARREDURA

Como, em geral, o objetivo do pesquisador ao utilizar o microscópio eletrônico de varredura é obter informações sobre a forma externa das amostras (sejam elas células, folhas, insetos, dentes, pêlos etc.), estas não são cortadas em fatias. O processamento para observação no microscópio eletrônico de varredura envolve, após o tratamento com soluções fixadoras, a secagem do material (para remover toda a água, já que esse microscópio também opera sob vácuo) e seu revestimento com ouro ou outro elemento condutor, para geração do sinal (**Figura 2.11**). Para maiores detalhes, consulte a plataforma Cederj.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA VARREDURA

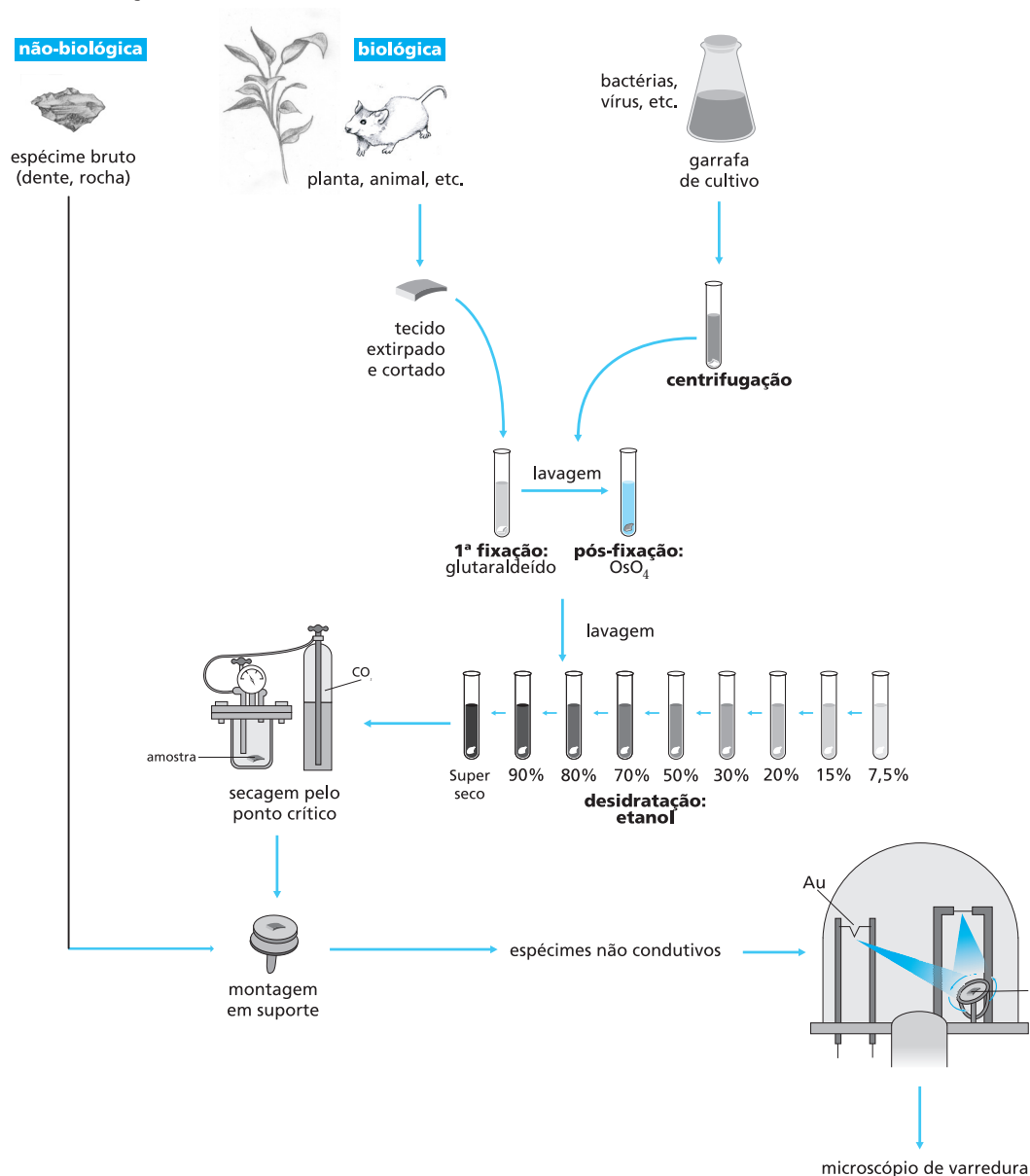


Figura 2.11: Esquema das principais etapas do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura.

Outras imagens obtidas com o microscópio de varredura podem ser observadas nos seguintes endereços da Internet:

http://www.ou.edu/research/electtron/www-vl/-_links para muitas coleções de imagens, tanto de microscopia óptica quanto eletrônica.

http://www.uq.edu.au/nanoworld/images_1.html

<http://www.prbc.hawaii.edu/nanoworld/~kunkel>

<http://www2.uerj.br/~micron/> laboratório de microscopia e processamento de imagens

<http://www2.uerj.br/~micron/>

Você também pode localizar outros endereços interessantes nos sites de busca como o:

www.google.com

www.yahoo.com

Compartilhe os resultados de sua busca com seu tutor e com os colegas do pólo.

OUTROS MICROSCÓPIOS ELETRÔNICOS

Como comentamos no início da aula, os microscópios eletrônicos formam uma verdadeira família. De acordo com os acessórios de que são dotados ou ainda conforme as amostras sejam preparadas, diferentes tipos de imagem e de informação são obtidos.

O MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE ALTA VOLTAGEM

Enquanto no microscópio eletrônico de transmissão convencional o feixe de elétrons é acelerado de 50 a 80 KV, permitindo a observação de amostras até 100-150 nm de espessura, no microscópio eletrônico de transmissão de alta voltagem a aceleração do feixe é de até 1.000 KV. Isso permite a observação de amostras bem mais espessas (até 2 μm !). A maioria das células é mais espessa do que isso (5-20 μm), mas mesmo assim aspectos importantes das células foram observados nesse microscópio eletrônico de transmissão (**Figura 2.12**)



Figura 2.12: Microscópio eletrônico de alta voltagem (1.000 KV) instalado na Universidade do Colorado em Boulder. (Imagem retirada do site <http://bio3d.colorado.edu/m.html>).

MICROANÁLISE

De acordo com a natureza dos átomos presentes na amostra, a colisão com os elétrons do feixe gera raios-X e outras radiações que podem ser captadas por detectores especiais, dando informações sobre a composição química da amostra. Esses detectores são acessórios que podem ser adaptados ao microscópio eletrônico de transmissão ou ao microscópio eletrônico de varredura.

VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO

Nesse microscópio (Figura 2.13) o feixe emitido é muito fino, varrendo áreas muito menores da amostra. Assim, detalhes que passam despercebidos na varredura convencional podem ser resolvidos. Organelas e filamentos do citoesqueleto (Figura 2.14), que normalmente não são visíveis ao microscópio eletrônico de varredura, podem ser vistas aqui.

Figura 2.13: Microscópio de varredura de alta resolução Jeol.

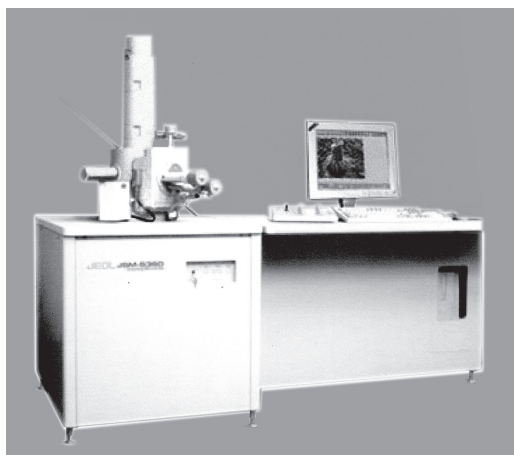


Foto: Celso Sant'Anna

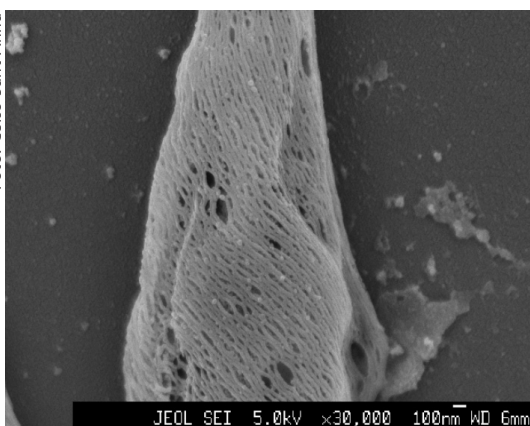


Figura 2.14: Os microtúbulos que formam o citoesqueleto desse protozoário (*Herpetomonas megaseliae*) não seriam visíveis no microscópio de varredura convencional.

VARREDURA DE PRESSÃO VARIÁVEL (AMBIENTAL)

Nesse modelo de microscópio eletrônico de varredura, a pressão na coluna é variável, sendo possível observar amostra frescas, isto é, sem nenhum tratamento químico e sem o processo de secagem. Potencialmente, podem ser observadas amostras vivas nesse microscópio, mas o poder de resolução é ainda bastante limitado.

RESUMO

O poder de resolução da microscopia eletrônica é muito maior do que os dos microscópios ópticos porque o comprimento de onda dos elétrons é muito menor do que o da luz visível. Os princípios da microscopia eletrônica foram estabelecidos por Ruska no início do século XX. Os microscópios eletrônicos podem ser divididos em de transmissão e de varredura. Nos primeiros, as imagens são de cortes ultrafinos ou mostram a região interna da célula com a estrutura de membrana, as organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático etc. No microscópio de varredura a imagem é formada quando o feixe percorre a superfície da amostra, arrancando de sua superfície elétrons que irão formar uma imagem da superfície externa que estiver sendo "varrida".

Links de interesse:

<http://www.mos.org/sln/SEM/works/slideshow/semmov.html>

- animação sobre o funcionamento do MEV.

<http://www.denniskunkel.com/> - imagens de microscopia óptica e eletrônica artificialmente coloridas. Muito bonito!

<http://www.molbio.princeton.edu/confocal/510image2/Zeisslist2.html> - Maravilhosas imagens de fluorescência obtidas em microscópio de fluorescência confocal.

<http://mgasun.bch.umontreal.ca/protists/gallery.html> - imagens de protistas em microscopia óptica de contraste interferencial e de fase. Links para imagens desses mesmos organismos em microscopia eletrônica, mostrando como vários métodos de observação deve ser conjugados na análise de um organismo.

<http://www.msa.microscopy.com/ProjectMicro/Books4.html> - coleção de CD-roms selecionados com comentários.

EXERCÍCIOS

1. Defina, em suas próprias palavras, o que é o poder de resolução.
2. Se uma determinada estrutura mede 100nm de diâmetro, quanto medirá se observada ao microscópio eletrônico com 10.000X de aumento?
3. Se a área de observação na tela do microscópio eletrônico mede 9x9 cm e uma célula mede cerca de 30 μm de diâmetro, qual o maior aumento com o qual poderemos observar toda sua circunferência?
4. Faça uma tabela comparando o poder de resolução, a natureza das lentes e o tipo de emissão do filamento do microscópio eletrônico de transmissão em relação ao microscópio óptico.
5. A formação da imagem no microscópio de transmissão se dá sobre uma tela fluorescente. Nos pontos em que os elétrons foram barrados pelos átomos da amostra, a imagem é _____, enquanto os elétrons não barrados incidem sobre a tela e fornecem _____. Átomos de elementos mais leves tendem a _____ mais elétrons e elementos mais pesados tendem a _____ mais elétrons.
6. Por que é necessário que a coluna dos microscópicos eletrônicos permaneça sob vácuo?
7. As células são hidratadas e, mesmo sendo formadas por elementos leves (C, H, N, O), são muito espessas para permitir a passagem de um feixe de elétrons. Quais os principais processos a que precisam ser submetidas antes da observação ao microscópio de transmissão?
8. No microscópio eletrônico de varredura as imagens são _____. O feixe de elétrons _____ a superfície da amostra gerando um sinal para um monitor de TV.
9. São bons exemplos de estrutura mais bem visualizadas no microscópio de transmissão: _____

10. São bons exemplos de estrutura mais bem visualizadas no microscópio de varredura: _____

objetivos

Ao final desta aula, o aluno deverá ser capaz de:

- Conhecer os princípios da criofratura.
- Entender as informações contidas numa réplica de criofratura.
- Correlacionar a criofratura à construção do modelo do mosaico fluido de membrana.



INTRODUÇÃO

Nas aulas anteriores, procuramos abordar os princípios de funcionamento dos microscópios ópticos e eletrônicos, assim como o tipo de informação e as limitações de sua utilização nas Ciências Biológicas. No caso do microscópio eletrônico de transmissão, uma das maiores limitações sempre foi o fato de as observações serem feitas a partir de cortes ultrafinos das amostras, isto é, imagens bidimensionais de estruturas (células) tridimensionais. Para entendermos o tipo de dificuldade que pode resultar disso é só pensarmos num ovo cozido: se ele for fatiado, a aparência de cada fatia será diferente – com clara e gema, sem gema, longitudinal, transversal etc (**Figura 3.1**).

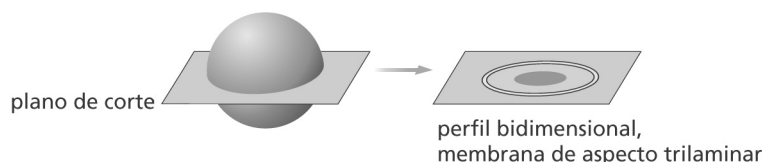


Figura 3.1: Podemos comparar os cortes ultrafinos de microscopia a um ovo fatiado. Dependendo do plano e sentido do corte, cada fatia terá um aspecto (e uma informação) diferente.

Em contrapartida, a microscopia eletrônica de varredura proporciona informações sobre a forma da célula, mas, em princípio, não é capaz de revelar detalhes de sua estrutura interna (veja a Aula 2).

Estes aspectos puderam ser contornados com a observação de cortes seriados, a partir dos quais se pode montar um modelo tridimensional da célula e de suas estruturas. Entretanto, esta é uma técnica cujo princípio é simples, mas a execução é bastante trabalhosa (**Figura 3.2**).

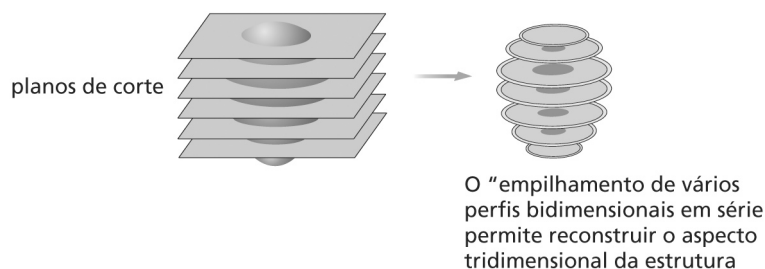


Figura 3.2: Cortes em série podem dar uma noção da forma tridimensional de uma estrutura.

Em cortes ultrafinos, a membrana plasmática aparece sempre como uma estrutura trilaminar, com uma faixa clara limitada por duas linhas mais escuras (**Figura 3.3**).

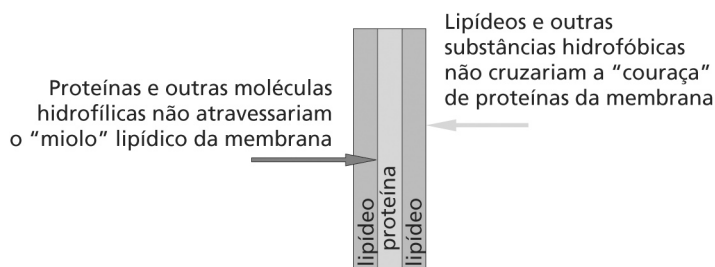


Figura 3.3: O “modelo do sanduíche” da membrana era rígido e não explicava os movimentos celulares e o transporte através da membrana, embora correspondesse à imagem de microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos. Obs.: este “modelo do sanduíche” é errado e você verá o modelo correto na Aula 7 deste curso.

Há muito tempo já era sabido que a membrana plasmática era composta principalmente de proteínas e lipídeos; entretanto, a observação da estrutura trilaminar da membrana em cortes ultrafinos levou à conclusão errada de que a estrutura da membrana seria um “sanduíche” de proteínas recheado por uma bicamada lipídica.

Uma membrana com essa organização seria não apenas muito rígida, dificultando os movimentos celulares, como seria quase impossível que substâncias passassem através dela: aquelas hidrofílicas ficariam impedidas de passar pela bicamada lipídica, assim como seria impossível que as substâncias hidrofóbicas atravessassem a cobertura de proteínas (**Figura 3.3**).

Esse aspecto dificultou a determinação da real estrutura da membrana, levando a conclusões erradas acerca da distribuição de proteínas e lipídeos, porém o desenvolvimento da técnica da criofratura abriu um novo horizonte de informações sobre as membranas celulares.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

A técnica da criofratura surgiu no século XX e começou a ser desenvolvida na década de 60 e a idéia inicial foi reduzir ao máximo os artefatos decorrentes da fixação química por aldeídos. O objetivo era parar instantaneamente a atividade celular, provocando a fixação das células sem que nenhum processo de decomposição celular tivesse tempo de acontecer.

O procedimento básico para criofratura consiste em quatro etapas (**Figura 3.4**):

1. Congelamento das células em nitrogênio líquido;
2. Fratura das células;
3. Evaporação da superfície fraturada com carbono e platina formando um “molde” (chamado réplica) da superfície fraturada;
4. Digestão dos restos celulares, de modo que apenas a réplica metálica é observada ao microscópio eletrônico de transmissão.

Figura 3.4: Principais etapas do processo de criofratura.

A – A amostra é congelada sobre um suporte.

B – Uma lâmina passa sobre a amostra congelada, que assim é fraturada.

C – A superfície exposta pela fratura é evaporada com platina (em ângulo de 45°).

D – Em seguida, a superfície recebe uma camada de carbono, que forma um filme suporte para a réplica.

E – imersão em ácidos para digestão da parte orgânica da amostra.

F – a réplica de platina/carbono é recolhida em uma grade para observação no microscópio eletrônico de transmissão.

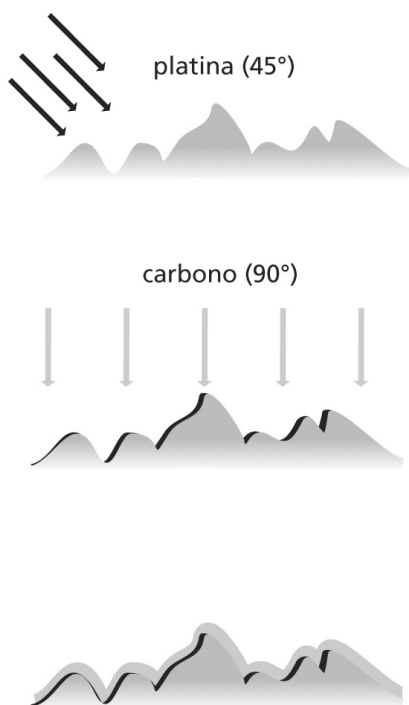
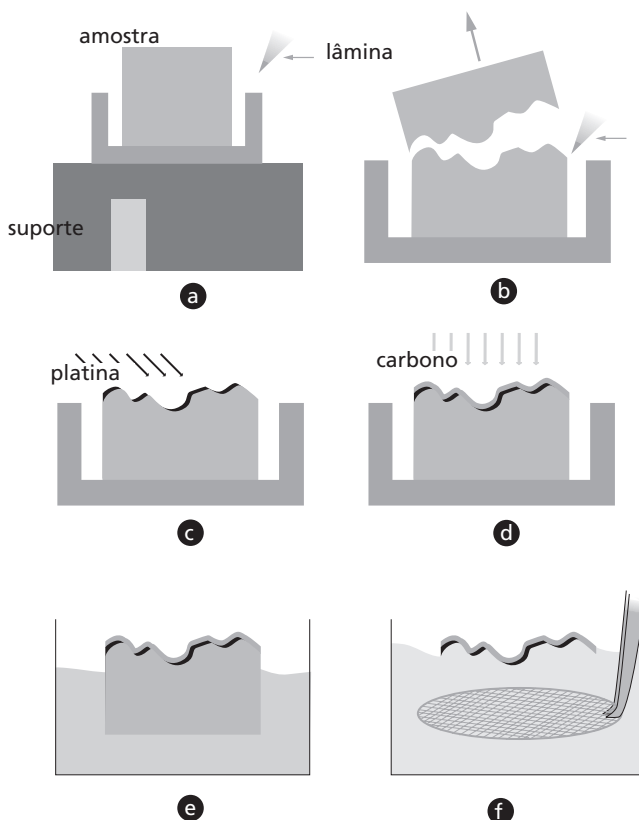


Figura 3.5: A platina evaporada em ângulo se deposita apenas em algumas partes da superfície fraturada. O carbono forma um filme contínuo sobre a superfície fraturada.

Na Plataforma você encontrará mais detalhes sobre a metodologia e o tipo de equipamento necessário para a execução desta técnica. Queremos agora que você conheça o aspecto da réplica observada ao microscópio eletrônico de transmissão e acompanhe a interpretação das imagens.

Observe na **Figura 3.5**, que a platina é depositada em ângulo, ela não se deposita homogeneamente sobre a superfície exposta. Já o carbono forma uma película de espessura uniforme. Agora lembre-se do que dissemos na aula anterior: no microscópio eletrônico, os elétrons do feixe têm maior chance de serem barrados por átomos de elementos pesados, como a platina, do que por átomos leves como o carbono. Como algumas regiões possuem platina e carbono e outras só carbono, mas os elétrons do feixe serão barrados na primeira e atravessarão a segunda.

AS PARTÍCULAS INTRAMEMBRANOSAS CORRESPONDEM A PROTEÍNAS DA MEMBRANA

Em 1966, foi possível demonstrar que quando a fratura expõe a membrana plasmática, em geral são separados os dois folhetos que compõem a bicamada lipídica, isto é, a fratura ocorre, preferencialmente, no plano médio da membrana (**Figura 3.6**). Também ficou provado que as partículas que apareciam nas réplicas correspondiam às proteínas integrais da membrana. Como? Muito simples: foram feitas réplicas de lipossomas (vesículas formadas apenas por bicamadas lipídicas) e de membranas extraídas de hemácias, observou-se então que apenas as últimas possuíam partículas, o que equivale a dizer que quando não havia proteínas nas membranas, também não havia partículas nas réplicas. Essa foi uma das evidências mais importantes para a sustentação do modelo do mosaico fluido, proposto por Singer e Nicolson em 1972.

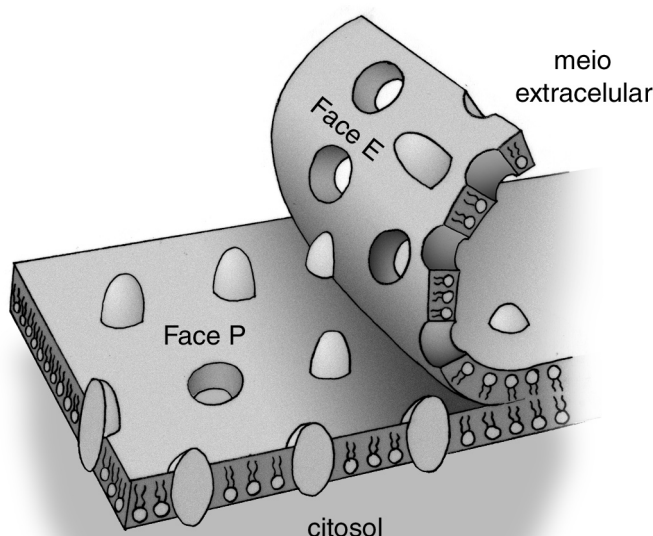


Figura 3.6: O plano de fratura preferencial divide os folhetos da bicamada lipídica. Podem ser observados o folheto voltado para o citoplasma (face P) ou o lado voltado para o meio extracelular (face E) da membrana.

Também de acordo com o tipo de proteína, algumas ficavam agarradas ao folheto voltado para o lado externo da célula, a face E da membrana, e outras partículas ao lado voltado para o protoplasma, a face P. Numa mesma réplica existem células que foram fraturadas de diversos modos, de modo que serão observadas faces P, faces E e aspectos do citoplasma de várias células semelhantes. Na **Figura 3.7** você pode observar uma hemácia, um tipo de célula em que a única membrana é a plasmática. De acordo com a clivagem, pode ser exposta a face P ou a face E dessa membrana. O resultado disso pode ser observado nas **Figura 3.8**.



Figura 3.7: Esquema de uma hemácia sendo fraturada. Conforme o plano de fratura pode ser exposta a face P, côncava, ou a face E, convexa.

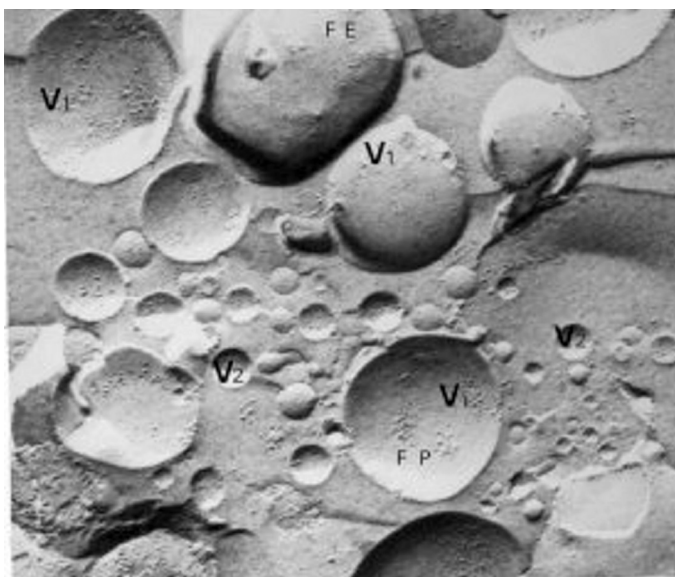


Figura 3.8: Faces P e E de uma preparação de membranas. Vesículas maiores (V_1) e menores (V_2). Foto: Márcia Attias

INTERPRETAÇÃO DAS RÉPLICAS

Como não se pode prever onde a lâmina vai clivar a célula, por vezes é exposto o citoplasma e as organelas (**Figura 3.9**), enquanto outras vezes a clivagem ocorre ao longo da membrana, resultando em áreas recobertas por partículas que podem ou não seguir um padrão (**Figura 3.10**).

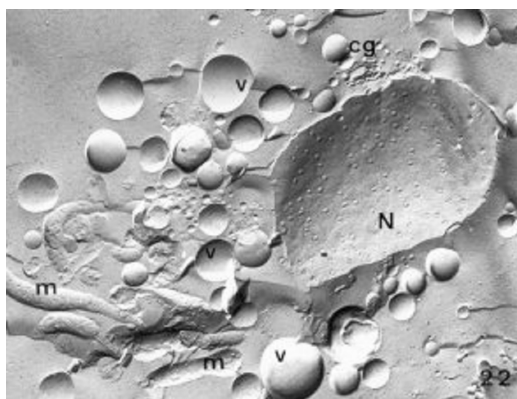
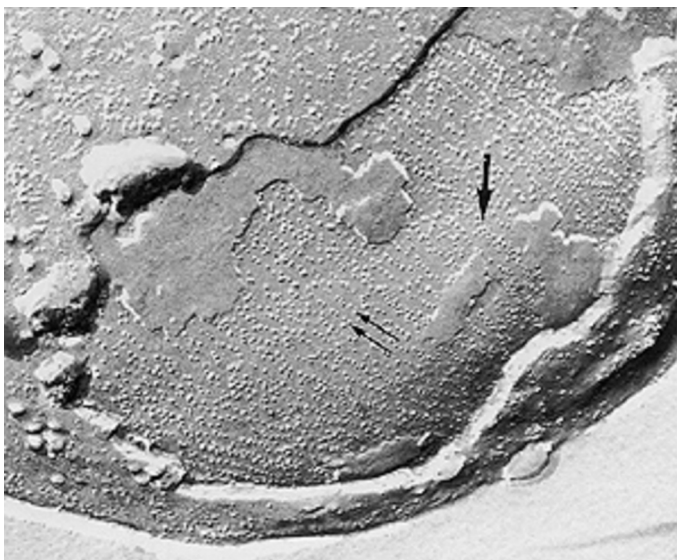


Figura 3.9: Quando a célula é fraturada em seu plano médio, expondo o meio citoplasmático, é possível reconhecer estruturas como o núcleo (N) que, além de ser relativamente grande, possui um envoltório duplo e complexos de poro, mitocôndrias (m), cisternas do complexo de Golgi (cg) e vesículas (V). foto: Márcia Attias.

Figura 3.10: Quando a fratura expõe a superfície da célula, observamos várias partículas intramembranas, que correspondem às proteínas da membrana.

Nesta foto, as partículas intramembranas formam linhas paralelas entre si (setas), mas isso não é comum nas membranas celulares.

foto: Márcia Attias.



CONCLUSÃO

A criofratura continua sendo uma técnica importante no estudo das células. Atualmente, muitas variações foram introduzidas, permitindo a observação não apenas do “miolo” da membrana, mas também das faces voltadas para o citoplasma ou para o meio extracelular e também de estruturas citoplasmáticas, como o citoesqueleto.

RESUMO

- A técnica de criofratura consiste em fraturar células ou tecidos depois de congelados.
- A fratura tem grande probabilidade de ocorrer entre as duas camadas de fosfolipídeos que formam as membranas, expondo uma matriz homogênea (os lipídeos) com partículas de diversos tamanhos nela inseridas. Essas partículas “intramembranas” correspondem a proteínas que atravessam a bicamada lipídica.
- A réplica pode expor tanto a face da membrana em contato com o meio extracelular – face E – como a face em contato com o protoplasma– face P.
- Para que a face fraturada possa ser observada ao microscópio eletrônico de transmissão é feita uma réplica em carbono e platina da mesma.
- Esta metodologia foi importante para a construção do modelo do mosaico fluido da membrana.

EXERCÍCIOS

1. Liste as etapas do procedimento para criofratura, explicando os objetivos de cada uma.

2. Qual a parte da membrana que é exposta a fratura?

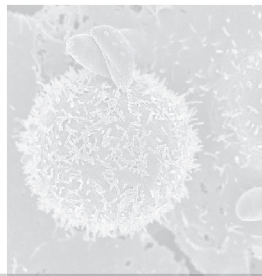
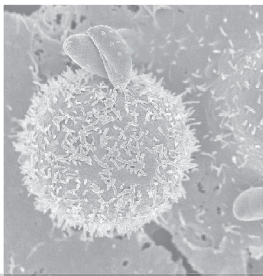
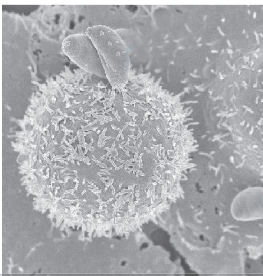
3. A que correspondem as partículas intramembranas observadas nas réplicas?

4. Qual a contribuição da criofratura na elaboração do modelo do mosaico fluido?

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Conhecer os fundamentos do cultivo de células:
 - Dados históricos;
 - Os objetivos do cultivo de células;
 - Princípios técnicos;
 - Linhagens celulares;
 - Principais aplicações e perspectivas:
 - Produção de heterocárions
 - Emprego em pesquisa e diagnóstico
 - Células-tronco



INTRODUÇÃO

No início do século XX, alguns pesquisadores desejavam estudar a diferenciação de células nervosas. Para tanto, removeram algumas células de espinha dorsal de uma cobaia e as colocaram numa câmara de vidro, úmida e mantida a 37 graus com plasma sanguíneo. De tempos em tempos, essa câmara era observada ao microscópio. Nessas condições as células não apenas sobreviveram como se diferenciaram, assumindo o aspecto estrelado dos neurônios. Esse foi o início da técnica de cultura de células.

O QUE É CULTIVAR CÉLULAS?

Cultivar células, em princípio, consiste em manter vivas células retiradas de um organismo. Geralmente isso é feito em tubos de ensaio, garrafas ou placas de Petri (**Figura 4.1**). Hoje em dia esses recipientes também podem ser feitos de plástico transparente mas, originalmente, eram sempre de vidro. Daí a expressão *in vitro*, que significa um experimento ou observação feita em células crescidas fora de um organismo. Por outro lado, observações ou experimentos que são conduzidos em animais são ditos *in vivo*.

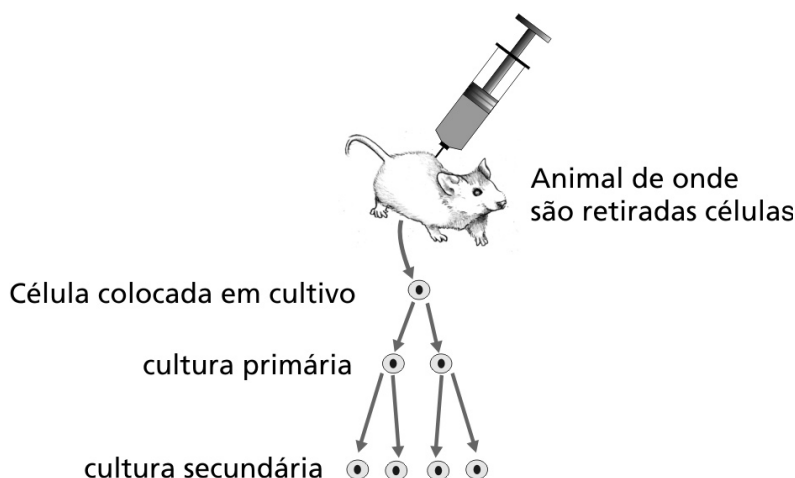


Figura 4.1: Alguns tipos celulares só podem ser mantidos em animais hospedeiros (a). Outras vezes as células são aspiradas do organismo doador e passam a se multiplicar em placas de Petri, garrafas ou tubos (b).

Como se faz uma cultura?

As culturas podem ser preparadas diretamente de tecidos retirados de um animal. Nesse caso, são chamadas de culturas primárias. Grupos de células que são retirados das culturas primárias e continuam a crescer *in vitro*, dão origem a culturas secundárias (**Figura 4.2**). Esse processo pode ser repetido várias vezes, mantendo as células por semanas ou meses.

Figura 4.2: Células extraídas de um organismo e colocada em cultivo formam a cultura primária. Se algumas células dessa cultura primária forem transferidas para novo meio de cultura e nele crescerem, constituirão culturas secundárias que poderão tornar-se "imortais".



Do que precisa uma célula em cultura?

Para que uma célula sobreviva *in vitro* devem ser garantidas condições de temperatura e umidade semelhantes às do organismo onde ela se originou. Além disso, o ambiente precisa ser mantido livre de bactérias, fungos e outros microorganismos que podem contaminar a cultura de células. As células também precisam nutrir-se; portanto, o meio de cultura deve conter todos os nutrientes necessários para o metabolismo de cada tipo celular em cultivo. As células em cultura também produzem excreções que modificam a acidez do meio e podem intoxicar e matar as células em cultivo. Tais substâncias precisam ser removidas, seja pela substituição periódica do meio de cultura, seja pela transferência de grupos de células para placas ou garrafas com meio novo.



Células em cultura requerem cuidados com alimentação, temperatura e limpeza comparáveis aos de um bebê.

O que é o meio de cultura?

O meio de cultura é uma mistura de moléculas necessárias à nutrição da célula. Originalmente era utilizado o soro de animais como cavalo ou boi. Também foi muito empregado o extrato de embriões de galinha. Atualmente existem muitas fórmulas quimicamente definidas, em que se pode avaliar o efeito da omissão ou adição de determinado componente sobre o comportamento das células. Além de aminoácidos, açúcares, vitaminas e sais minerais, geralmente entram na composição dos meios de cultura proteínas do soro, antibióticos e fungicidas, estes dois últimos para diminuir o risco de contaminação. O meio de cultura deve ter **osmolaridade** e **pH** adequados para o tipo celular em estudo.

Cá entre nós...
Que bela sopa é esse tal
meio de cultura, não?





Se você não lembra o que é osmolaridade ou pH, consulte o material da disciplina Bioquímica I.

POR QUANTO TEMPO UMA CULTURA PODE SER MANTIDA?

Num organismo, cada tipo celular é programado para um determinado número de divisões e tempo de vida. Por exemplo, as células de nossa pele estão constantemente se renovando, graças a divisões das células das camadas mais profundas. Essas culturas mantêm *in vitro* as mesmas características dos tecidos de onde se originaram. Assim, os fibroblastos (**Figura 4.3**), células do tecido conjuntivo, secretam colágeno; células cardíacas retiradas de embriões se contraem, como no músculo cardíaco e as células epiteliais retiradas das camadas de crescimento da pele aderem entre si e formam uma camada sobre a placa de cultivo. Poder contar com uma população celular homogênea é uma grande vantagem para testar os efeitos de diferentes condições experimentais sobre células, pois estas preservam as características biológicas dos tecidos que lhes deram origem. Um grande entrave é a limitação do número de subculturas secundárias. Felizmente, tal limitação pode ser amenizada pelo uso de linhagens celulares estabelecidas.

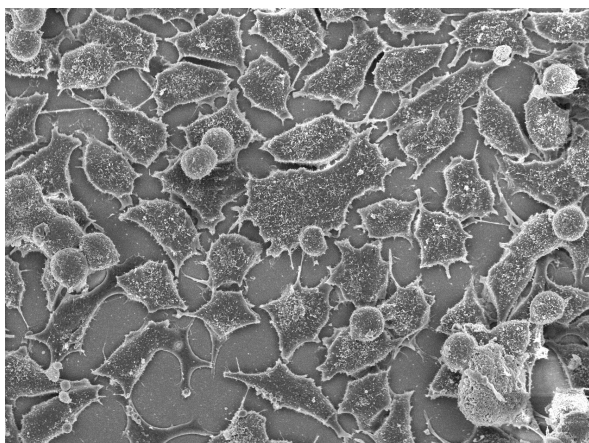


Figura 4.3: Aspecto em microscopia eletrônica de varredura de uma cultura de células epiteliais em cultivo sobre uma lamínula de vidro. Note que algumas células ainda estão arredondadas e outras espalhadas sobre a superfície, fazendo contatos entre si. Pequenas microvilosidades emergem da superfície das células.

O QUE SÃO LINHAGENS CELULARES ESTABELECIDAS?

Eventualmente, alguns tipos celulares sofrem modificação genética que torna ilimitada sua capacidade de proliferação. Ao contrário das células cancerosas, que também se multiplicam indefinidamente, essas linhagens celulares conservam várias das características das células que lhes deram origem, como a capacidade de adesão, no caso de células epiteliais.

Além das linhagens naturalmente transformadas, a transformação pode ser induzida por métodos químicos ou infecções virais. Algumas linhagens transformadas, se reintroduzidas em animais, podem induzir tumores, assim como algumas linhagens estabelecidas tiveram origem em tumores malignos.

As linhagens celulares tornaram possível obter uma grande quantidade de células homogêneas para experimentos. Também podem ser armazenadas por longos períodos em baixa temperatura, em nitrogênio líquido, sendo descongeladas e recolocadas em cultivo quando necessário. Existem verdadeiros “bancos” de células em diversos laboratórios. A seguir, algumas das linhagens celulares mais usadas.

Linhagem	Origem
MDCK (<i>Madin-Darbin canine kidney</i>)	Epitélio de rim de cachorro
PtK1	Epitélio de rato canguru
HeLa	Epitélio humano
3T3	Fibroblasto de camundongo
CHO (<i>chinese hamster ovary</i>)	Ovário de hamster

UMA LINHAGEM É UM CLONE?

Não. Uma linhagem é formada a partir de um grupo de células extraídas de um organismo. Estas, embora sejam muito semelhantes, não são idênticas. Porém, uma cultura derivada da multiplicação de uma única célula é um clone (Figura 4.4). Vários clones podem ser obtidos de linhagens celulares já estabelecidas. Um exemplo são as células CHO a partir das quais foram originados vários clones com características específicas.

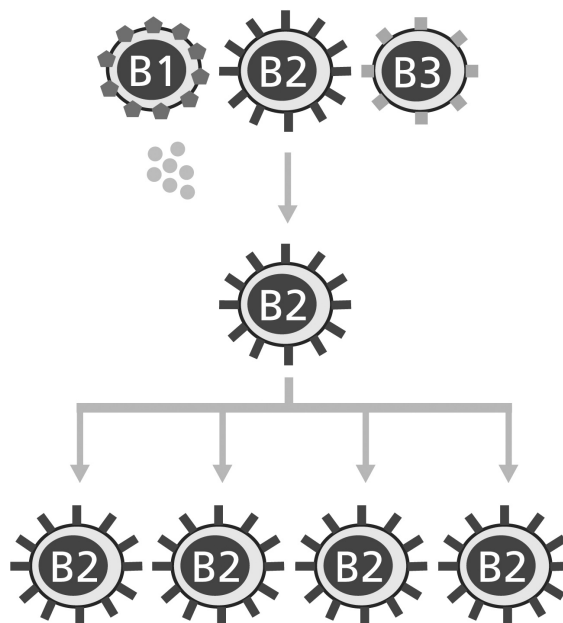


Figura 4.4: Numa cultura de células podem conviver diversas variantes de um mesmo tipo celular (células B1, B2 e B3). Se for produzida uma cultura exclusivamente a partir das células B2, esta será um clone de B2 e produzirá as proteínas específicas de B2, como os componentes da superfície esquematizados.

AS CARACTERÍSTICAS DE DUAS CÉLULAS PODEM SER COMBINADAS?

(**hibridoma** vem do radical *hibrid*, que quer dizer mistura, e a terminação *oma*, que designa tumores em geral.)

Sim. A fusão entre duas células de origens diferentes pode ser induzida, levando à união em uma única célula onde o núcleo contém o DNA das duas células (**Figura 4.5**). As células resultantes dessa fusão contêm dois núcleos e são chamadas **heterocárions** (*hetero* = diferente, *karyon* = núcleo). Quando acontece dos dois núcleos se fundirem num só, dizemos que formou-se um **hibridoma** (**Figura 4.5**). Um tipo de hibridoma muito interessante é o que reúne o poder de rápida multiplicação de uma célula cancerosa à capacidade de secretar anticorpos dos **linfócitos B**. As células que reúnem essas duas características em geral são selecionadas e clonadas para produção de anticorpos em grandes quantidades. Para que produzir anticorpos em laboratório? Isso é o assunto da Aula 6.

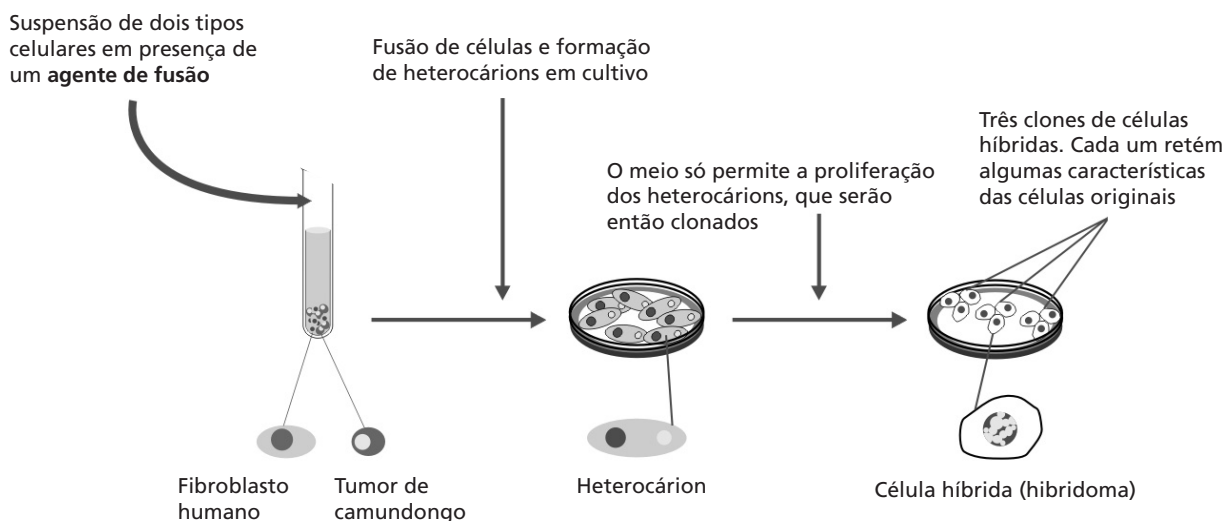
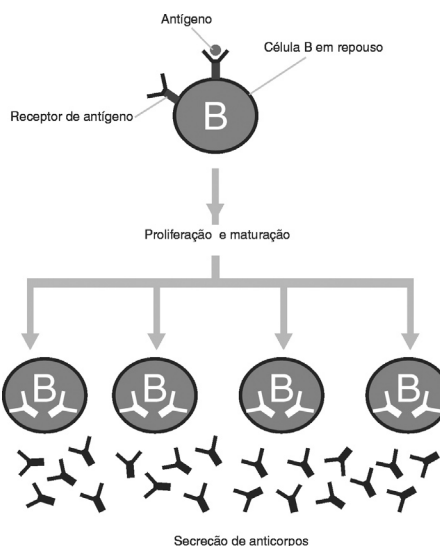


Figura 4.5: Etapas da produção de um heterocáion.



O que são linfócitos B?

São um tipo de glóbulo branco do sangue que produz e secreta anticorpos que aderem aos organismos invasores (bactérias, vírus etc.). Qualquer molécula ou organismo estranho é denominado antígeno. Veja o esquema ao lado.



O QUE SÃO CÉLULAS-TRONCO?

Por definição, célula-tronco é uma célula capaz de se multiplicar e se diferenciar em qualquer tipo celular. Por isso mesmo é chamada **pluripotente**. Ao se dividir, uma célula pluripotente pode dar origem a duas células iguais a ela ou, então, a uma célula ainda pluripotente e a outra mais diferenciada, que é chamada **multipotente**, pois pode dividir-se e diferenciar-se em vários tipos celulares dentro de uma categoria. O que induz ou não essa diferenciação é a própria programação genética da célula, além de fatores químicos presentes no meio extracelular. Já é sabido que todas as células sangüíneas se diferenciam a partir de um único tipo celular primordial (**Figura 4.6**).

Empregando as técnicas de cultura de células, os pesquisadores estão procurando obter células-tronco e induzir *in vitro* sua diferenciação. O domínio dessa tecnologia pode representar a cura para diversos tipos de leucemia, pois as células que se tornam cancerosas são de um tipo mais diferenciado. Além disso, será possível a fabricação de sangue a partir de células-tronco do próprio paciente para utilização em cirurgias, sem a necessidade de doadores.

Em projetos ainda mais ambiciosos, existe a perspectiva de regenerar órgãos inteiros, como o fígado e o coração, que poderiam ser utilizados em implantes, e até mesmo a possibilidade de recompor nervos lesados e recuperar pessoas paraplégicas ou tetraplégicas. Como podemos notar, embora as pesquisas ainda estejam começando, as possibilidades são imensas.



A cultura de células já está entre nós.

Ao contrário do que você possa pensar, a cultura de células já faz parte do nosso dia-a-dia. Quer ver?

1- Os chamados bebês de proveta resultam da fecundação *in vitro* de um óvulo por um espermatozóide. Essa célula-ovo é mantida em condições controladas de cultivo durante as primeiras divisões, quando então é implantada no útero materno para prosseguir seu desenvolvimento.

2- No tratamento de queimados têm sido utilizados fibroblastos que, em meio de cultura definido, são estimulados a se multiplicar e diferenciar-se em células epiteliais. Essa pele artificial é usada em implantes na superfície destruída pela queimadura.

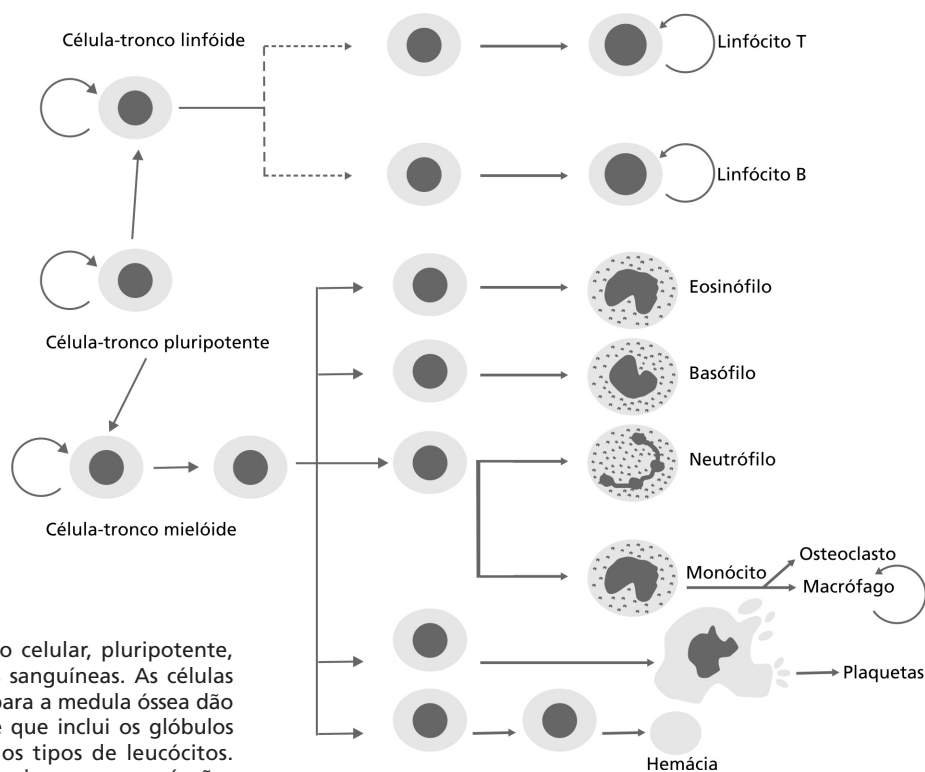


Figura 4.6: De um único tipo celular, pluripotente, têm origem todas as células sanguíneas. As células multipotentes que migram para a medula óssea dão origem à linhagem mielóide que inclui os glóbulos vermelhos, plaquetas e vários tipos de leucócitos. As células multipotentes que migram para os órgãos linfáticos dão origem aos linfócitos, leucócitos responsáveis pela fabricação de anticorpos.

RESUMO

Células retiradas de organismos, em geral embriões ou recém-nascidos, podem ser cultivadas em frascos ou placas de vidro ou plástico. Essas células precisam ser mantidas em meio que contenha nutrientes e fatores de crescimento, além de temperatura, pH e osmolaridade adequados. Embora a maioria das células só possa ser mantida por um número de gerações limitado, existem linhagens de células transformadas que podem ser multiplicadas indefinidamente. Clones de uma única célula com características específicas podem ser produzidos a partir de uma cultura, assim como dois tipos celulares podem ter suas características combinadas num heterocácion, ou hibridoma. O cultivo de células-tronco, células pluripotentes que dão origem a todos os tipos celulares durante o desenvolvimento do embrião, são uma esperança da Ciência na regeneração de órgãos e cura de vários tipos de leucemia.

EXERCÍCIOS

1. Quais os requisitos básicos para manutenção de células em cultura?
2. O que você entende por células *in vitro*? E *in vivo*?
3. O que é uma cultura primária?
4. Diferencie uma célula transformada de uma célula cancerosa.
5. O que é um hibridoma?
6. Da fusão de uma célula tumoral com uma célula secretora foram obtidos heterocárions com as seguintes características:
 - a. Células com baixa capacidade de divisão, mas alta atividade secretora
 - b. Células com alta capacidade de divisão e baixa atividade secretora
 - c. Células com alta capacidade de divisão e alta atividade secretora
 - d. Células com baixa capacidade de divisão e baixa atividade secretoraQual desses heterocárions será mais interessante? Justifique sua resposta.
7. O que são células-tronco?

INFORMAÇÕES SOBRE A PRÓXIMA AULA

Nas aulas seguintes, vamos estudar como o cultivo de células fornece matéria-prima para as técnicas de fracionamento celular e a importância na localização e identificação de componentes celulares ao microscópio óptico e eletrônico.

Métodos bioquímicos para o estudo da célula

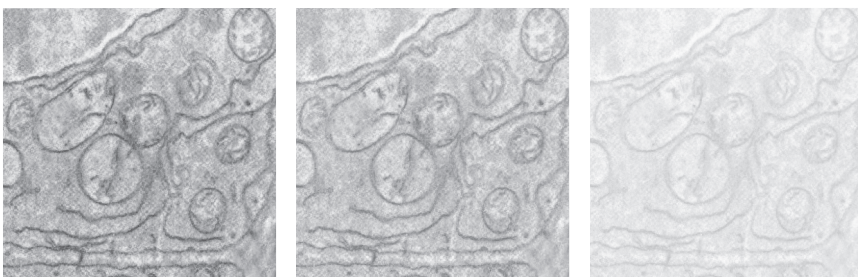
AULA

5

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Entender como se obtêm preparações de organelas isoladas, que assim podem ser estudadas fora do contexto celular.
- Entender os princípios, e assim os resultados obtidos por metodologias cromatográficas e eletroforéticas.



I) FRACIONAMENTO CELULAR

HISTÓRICO

Nas primeiras décadas do século XX, já havia muita informação sobre as reações químicas ligadas ao metabolismo celular. Nessa época também os primeiros microscópios ópticos já tinham sido criados, levando ao conhecimento de que uma célula não parecia ter só um núcleo em seu interior, mas também outros componentes menores, cujo tamanho estava quase fora da capacidade de observação daqueles microscópios. A questão era como correlacionar esses conhecimentos anteriormente acumulados usando diferentes abordagens.

Um bioquímico não era capaz de responder em que local da célula se passava determinada reação enzimática que ele conseguia medir no espectrofotômetro. Algumas vezes, era mesmo necessário romper as células da preparação, fazendo um extrato para que certas reações pudessem ocorrer *in vitro* e serem medidas. Isso mostrava que as enzimas que se queriam medir nesse ensaio estavam confinadas em algum compartimento intracelular, a que os reagentes adicionados externamente não tinham acesso.

De modo recíproco, um morfologista não era capaz de responder que etapas do metabolismo celular ocorriam nas várias partes da célula que ele podia ver, especialmente ao se aproximar a metade do século, em que os microscópios eletrônicos começavam a ser usados para observar material biológico.

Nessa época, dois grupos trabalhavam intensamente para conhecer melhor o conteúdo das células: o do Dr. Keith Porter, no Instituto Rockefeller, em Nova York, Estados Unidos, e o grupo da Universidade de Louvain, Bélgica, formado por Albert Claude, George Hogeboom e, pouco depois, Christian De Duve.

O grupo do Dr. Porter estava criando, com sucesso, métodos adequados ao preparo de material biológico para observação de amostras biológicas ao microscópio eletrônico, métodos que, aliás, são usados até hoje (veja Aula 2). A nova metodologia mostrou, no interior de células eucarióticas, muitos compartimentos internos envolvidos por membrana, muitos grânulos e muitos filamentos. O grupo da Bélgica estava, desde meados da década de 30, realizando experimentos em que células de fígado de rato eram rompidas e seu conteúdo assim liberado era separado por centrifugação em várias frações, ditas subcelulares.

Depois de separada, cada fração era observada ao microscópio óptico e ensaiada em várias características bioquímicas. Assim, em 1940, o grupo belga publicou um trabalho muito importante em que descrevia os primeiros resultados de **fracionamento celular**: as células do fígado de rato rompidas podiam ser divididas em quatro frações. A fração mais densa continha os núcleos; a próxima, em ordem decrescente de densidade, era formada por grandes grânulos e consumia oxigênio produzindo CO_2 ; a seguinte era formada por pequenos grânulos e hidrolisava proteínas em pH ácido; a menos densa continha proteínas solúveis, sendo provavelmente o citoplasma.

Como correlacionar as frações descritas por Claude e colaboradores com as observações de Porter ao microscópio eletrônico? A saída foi a colaboração direta entre os dois grupos, dando um novo impulso ao conhecimento do conteúdo celular e levando à descrição de várias organelas. É importante destacar que o avanço espetacular da Biologia Celular nesse período não foi só resultado do esforço de médicos, biólogos, químicos e físicos. Houve importante colaboração de engenheiros e técnicos que trabalhavam nas oficinas das universidades e dos institutos de pesquisa. A ultracentrífuga e o ultramicrotomo, por exemplo, foram criados nas oficinas do Instituto Rockefeller nesse período.

Preparando a amostra

Para obter preparações de organelas isoladas e purificadas é preciso evidentemente romper as células. No entanto, se nossa amostra é formada por células de diferentes tipos, devemos pensar que depois de rompermos as células não temos mais condições de identificar de que tipo celular veio uma mitocôndria, por exemplo. Por isso, antes de começar a pensar em como romper as células, temos de pensar em como tornar a amostra uma preparação homogênea, ou seja, formada por apenas um tipo celular. Essa tarefa vai ser diferente para cada tipo de material. Vamos considerar alguns exemplos:

Exemplo 1 – Amostra de exsudato peritonial. Para obter amostras de células do sistema imune que residem aderidas na parede interna do peritônio, injetamos pequena quantidade de líquido nessa cavidade de um animal anestesiado (geralmente um camundongo) e massageamos levemente para que as células se soltem da parede. Em seguida, retiramos o líquido que vem com uma mistura de células. É esse líquido que chamamos de exsudato ou lavado peritoneal. A mistura

é formada principalmente por macrófagos e várias classes de linfócito. Eventualmente, dependendo das condições fisiológicas do animal, também pode haver número significativo de neutrófilos. Para várias linhas de pesquisa na área de Parasitologia, é necessário estudar a interação de patógenos com macrófagos, já que estas células são as primeiras a interagir com agentes invasores de nosso organismo.

Para separar os macrófagos das outras células dessa preparação e fazer uma cultura primária (veja aula de Cultura de Células), podemos explorar uma atividade biológica natural, a adesão a substratos. Todas as células retiradas no exsudato aderem a substratos, mas fazem isso em velocidades diferentes. Os macrófagos aderem a substratos como vidro ou plástico em cerca de 15 minutos, se estiverem em meio de cultura e a 37°C, enquanto os linfócitos levam mais de meia hora nas mesmas condições. Assim, podemos obter uma preparação homogênea de macrófagos usando a sua atividade biológica natural. Mas, na maioria das vezes, isso não é possível. Veja os próximos exemplos.

Exemplo 2 – Separação de células do sangue. As hemácias e os leucócitos circulantes (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos etc.) podem ser separados uns dos outros e do plasma por diferença de densidade. Se deixarmos um tubo com sangue heparinizado em repouso sobre a bancada, depois de algum tempo haverá separação de seus elementos, que se depositarão no fundo do tubo. A deposição dos elementos do sangue nessas condições será muito lenta.



Atenção! Não confunda com o processo de coagulação! Faz parte do plasma sangüíneo uma série de proteínas da coagulação: quando retiramos sangue de um vaso, ou lesamos um vaso, forma-se uma rede protéica cujo principal componente é a fibrina, que retém todas as células e deixa escapar o líquido. A rede protéica contendo as células é chamada de coágulo e o líquido é chamado de soro. Assim, a diferença entre plasma e soro é que o primeiro ainda contém as proteínas da coagulação e o segundo não. Esse processo é fisiológico e pode ser inibido *in vitro* por algumas substâncias como heparina e citrato de sódio, entre outras. Quando retiramos sangue para exame, por exemplo, o processo de coagulação é inibido para que, além do plasma, as células também possam ser examinadas.

Se o tubo com sangue heparinizado for centrifugado, essa deposição ocorrerá em poucos minutos, colocando as hemácias no fundo porque são mais densas; sobre elas se forma uma fina camada esbranquiçada (*buffy coat*) que contém os leucócitos e, no sobrenadante, o plasma sem células.

Que fique clara então a definição dos termos: **precipitado** é o material que se depositou no fundo no tubo que foi centrifugado e **sobrenadante** é o material que não se depositou. Na linguagem de laboratório, nós nos referimos ao precipitado de uma centrifugação pelo nome em inglês, *pellet*, talvez para não confundir com o precipitado resultante de uma reação química. Esse método é bom para separar as hemácias das outras células do sangue, porque a densidade dela é muito diferente. Mas como fazer para separar células de densidade muito próxima?

Exemplo 3 – Nos últimos anos, tem sido necessário separar as diferentes classes de linfócito para realizar estudos de interação com o vírus HIV ou mesmo procedimentos clínicos em que apenas a classe de linfócito que o vírus infecta é tratada e depois devolvida à circulação sangüínea do paciente.

Apesar de exercerem funções bastante diversas na defesa de um organismo (você vai aprender mais adiante no curso), as diferenças entre as classes de linfócitos que nos permitem separá-los são principalmente moléculas de sua membrana plasmática expostas ao meio extracelular. Quando essas moléculas foram descritas e foram produzidos anticorpos contra elas, uma importante ferramenta ficou disponível. Assim, podemos incubar a mistura de linfócitos com anticorpos que só reconhecem uma das classes. Se esses anticorpos estiverem conjugados com fluorocromos, podemos separar os linfócitos em um aparelho que reconheça moléculas fluorescentes. Veja na **Figura 5.1** um esquema deste aparelho, o citômetro de fluxo, ou FACS (*fluorescence activated cell sorter*).

Colocamos a mistura de linfócitos que já foram incubados com anticorpos fluorescentes numa entrada do aparelho que parece um funil. A ponta do funil é muito fina e está submetida a uma vibração que faz com que pinguem gotículas regulares e de tamanho tão pequeno que só comportam uma célula (ou nenhuma). As gotículas passam em fila indiana entre um *laser* (que vai excitar o fluorocromo) e um detector (que vai ler se aquela gota tem célula, de que volume, se ela é fluorescente ou não, e qual a intensidade da fluorescência). Associado ao detector há um sistema que coloca carga negativa nas gotas que contêm uma célula

fluorescente (colocando íons no líquido da gota, não nas células) e positiva nas que contêm células não fluorescentes. As gotas que contêm mais de uma ou nenhuma célula não recebem carga. Todas as gotas passarão

por um campo elétrico que desviará as gotas positivas para um recipiente e as negativas para outro, separando assim os linfócitos marcados em um recipiente e as outras células em outro recipiente. Os citômetros de fluxo eram aparelhos raros (e caros!) no início da década de 90, mas hoje já são encontrados em vários institutos de pesquisa, nos grandes hospitais e em alguns laboratórios de análises clínicas.

Exemplo 4 – E se nós quiséssemos trabalhar com um órgão como o fígado? Para conseguir uma preparação homogênea de hepatócitos, por exemplo, seria necessário primeiro soltar as células que estão unidas entre si e à matriz extracelular (você vai saber detalhes desse assunto em Biologia Celular II). A união das células com a matriz e com outras células pode ser de vários tipos, mas tem duas

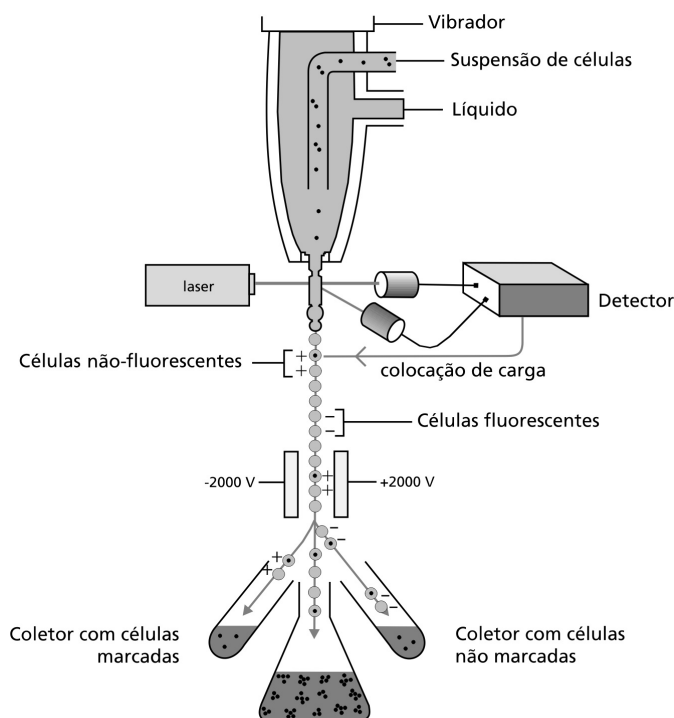


Figura 5.1: Citômetro de fluxo (FACS).

características em comum: são ligações protéicas, estabilizadas por cálcio. Se quisermos soltá-las, então vamos retirar o cálcio, usando quelantes (substâncias que ligam íons metálicos, tornando-os indisponíveis para outras ligações) como EDTA ou EGTA, e quebrar as ligações protéicas, usando enzimas proteolíticas, como a tripsina. Esses tratamentos devem ser controlados para não romper as próprias células. Depois de soltas, as células podem ser separadas por diferença de densidade, usando centrifugação.

Assim, de alguma das maneiras acima, conseguimos uma preparação homogênea, o que nos permite começar o fracionamento celular propriamente dito, rompendo as células.

Rompimento celular

No fracionamento celular, o que se deseja fazer é romper a membrana plasmática sem romper as membranas das organelas. É difícil conseguir isso, e para cada tipo celular existem métodos de rompimento mais adequados que outros. Além disso, as células de uma preparação não se rompem todas simultaneamente; o processo é progressivo e precisa ser acompanhado ao microscópio óptico. Dentre os métodos mais usados estão:

- a) choque osmótico: as células são colocadas em meio hiposmótico, aumentando de volume até arrebentar. É o método de escolha para romper hemácias, por exemplo. Em outras células, temos de nos preocupar em restaurar a osmolaridade ideal rapidamente para que as membranas das organelas não se rompam também.
- b) choque térmico: as células devem ser congeladas e descongeladas rapidamente, alternando-se, por exemplo, imersão em nitrogênio líquido (-196°C) e banho de 37°C .
- c) maceração: pode ser realizada com homogeneizadores parecidos com um liquidificador, ou de modo mais delicado com homogeneizadores de vidro, que se parecem com um copo onde um êmbolo entra justo, forçando as células a sofrer o atrito entre os vidros. Seguindo o mesmo princípio, alguns pesquisadores usam pequenas pérolas de vidro misturadas à preparação. Agitando a preparação, as pérolas se chocam, rompendo as células.
- d) sonicação: todas as estruturas, biológicas ou não, possuem uma frequência de ressonância característica. Uma vibração nessa frequência que tenha grande intensidade pode romper a estrutura. É a mesma história da ponte que vibra com a marcha dos soldados ou do estádio lotado que vibra com os gritos e pulos da torcida. Teoricamente, é possível usar ultra-som com uma frequência de vibração e intensidade adequadas para romper apenas a membrana plasmática e deixar as estruturas intracelulares intactas. Na prática porém, os sonicadores (aparelhos que emitem ultra-som) não têm um controle de intensidade, frequência e amplitude tão bom que permita esse ajuste. Mesmo assim, a sonicação é um dos melhores métodos para o rompimento de células.

- e) tratamento com detergente não iônico: como as moléculas de detergente não iônico são anfipáticas, elas conseguem substituir as moléculas de fosfolípido na membrana plasmática, causando o rompimento. Os detergentes são usados em concentração muito baixa e por pouco tempo.

Depois do rompimento, os fragmentos de membrana logo se resselam para esconder da água a porção hidrofóbica da bicamada lipídica, formando pequenas vesículas. Os fragmentos de membrana podem resselar mantendo para fora o folheto da membrana que estava voltado para o meio extracelular, formando vesículas do lado direito (*inside-in*), ou do lado do avesso (*inside-out*) quando o folheto que era virado para o citoplasma fica voltado para fora na vesícula resselada (Figura 5.2).



Figura 5.2: Esquema da produção de vesículas de membrana.

Com o rompimento adequado, conseguimos obter um homogeneizado total, isto é, uma preparação em que a maioria das células está rompida, as organelas estão íntegras mas espalhadas na preparação, e o conteúdo solúvel do citoplasma está misturado com o líquido onde as células foram rompidas.

Centrifugação diferencial

A maneira de separar o conteúdo celular em várias frações é explorar as diferenças de densidade (relação massa/volume) entre os componentes celulares, usando uma ultracentrífuga.

Centrifugando o homogeneizado a baixa velocidade (cerca de 1.000g, 10 min), conseguiremos colocar no *pellet* os componentes mais densos da mistura, que são as células não rompidas e os núcleos. Se vertermos o sobrenadante em um novo tubo de centrífuga, podemos centrifugá-lo a uma velocidade maior (cerca de 10.000g, 10 min) e assim colocar no *pellet* mitocôndrias, peroxissomos, lisossomos (e cloroplastos, se estivermos trabalhando com vegetais). Se mais uma vez passarmos o sobrenadante para um novo tubo e centrifugarmos em velocidade

ainda maior (cerca de 20.000g, 30 min), poderemos “peletar” a chamada fração microssomal, formada por vesículas de origem variada, como a membrana plasmática, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e os endossomos. Desta vez, o sobrenadante contém ribossomos, partículas virais (se houver), e macromoléculas, como DNA e grandes complexos enzimáticos. Esses componentes também são centrifugáveis, mas para “peletá-los” são necessárias altíssimas velocidades (200.000g) por muitas horas. O sobrenadante final, ou fração sobrenadante, é uma solução verdadeira, que contém os componentes solúveis do citoplasma (Figura 5.3).



Uma centrífuga é um aparelho em que um motor faz um eixo girar em grande velocidade (como numa máquina de furar). Essa velocidade é medida em **rpm** (rotações por minuto). Ao eixo que gira se adapta uma peça, o rotor, onde colocaremos tubos com o material a ser centrifugado. Durante a centrifugação, forma-se um campo gravitacional cuja intensidade (medida em gravidades - **g**) é proporcional à velocidade da centrifugação. Assim, a força centrífuga empurra o material para o fundo do tubo numa velocidade que depende da centrifugação, da densidade do material e do meio em que ele se encontra.

Veja se você entendeu: a medida rpm se refere à velocidade com que o rotor gira. A medida **g** se refere à intensidade do campo gravitacional formado durante a centrifugação.

Dentre os diferentes componentes de uma amostra submetidos às mesmas condições de centrifugação, os mais densos vão para o fundo primeiro, os de densidade intermediária depois, e por fim os de menor densidade. Claro que a própria densidade do líquido em que os componentes celulares estão suspensos também influencia. As primeiras centrífugas tinham eixo horizontal e foi um grande avanço quando foram construídas centrífugas cujo eixo girava na vertical.

As mais simples são ditas centrífugas clínicas, por serem muito usadas em laboratórios de análises clínicas (existe uma no laboratório de aulas práticas no pólo; observe-a melhor) para separar os componentes do sangue (veja exemplo 2, anteriormente). Essas centrífugas atingem velocidades de até 3.000 rpm. No entanto, para separar componentes de densidade menor, como organelas, é necessário um campo gravitacional mais intenso, que só é conseguido em centrifugações de velocidade muito maior. Isso só foi possível quando se construíram as primeiras ultracentrífugas, na década de 30. Nesses equipamentos, o rotor gira numa câmara blindada, refrigerada e sem ar (no vácuo), diminuindo assim as forças de atrito.

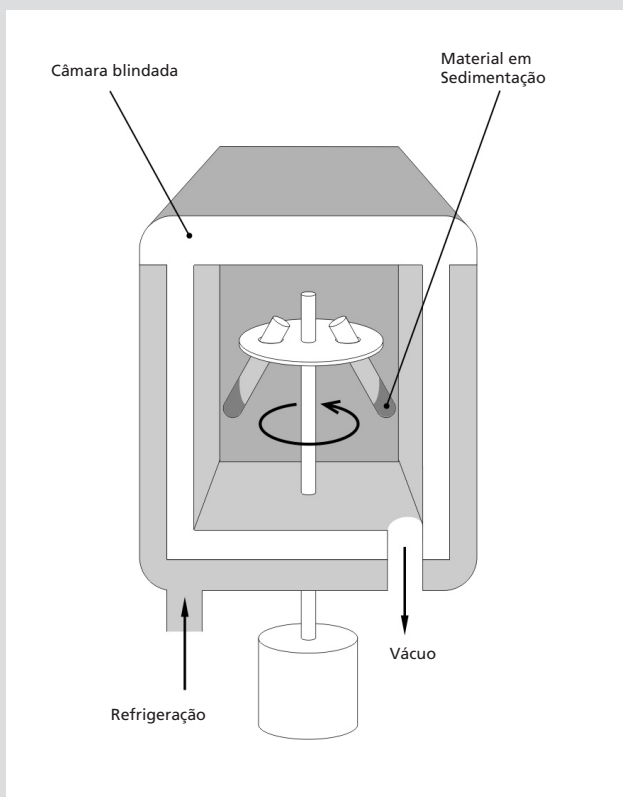
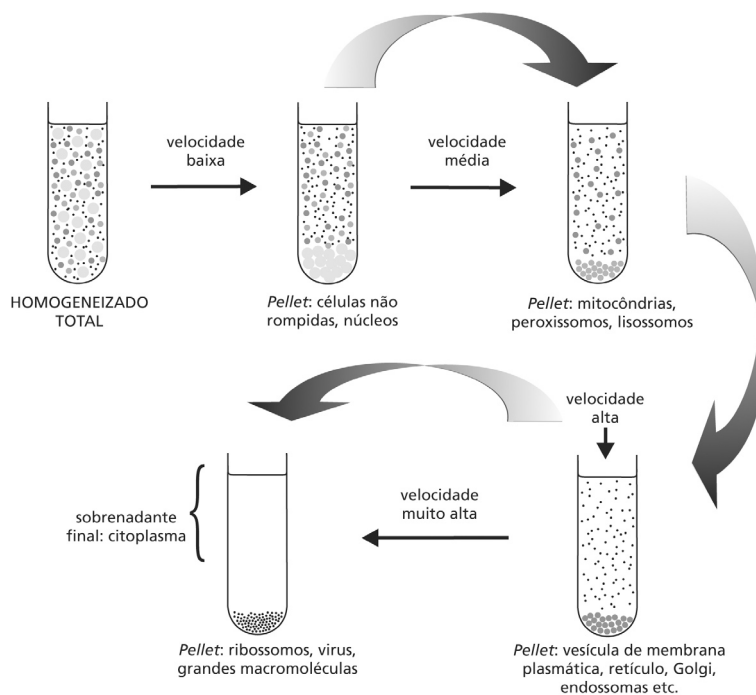


Figura 5.3: Esquema de uma centrifugação diferencial.



Você já deve ter notado que apenas com a centrifugação diferencial não podemos obter organelas totalmente isoladas das demais. Isso acontece porque a diferença de densidade entre lisossomos e peroxissomos, por exemplo, não é muito grande. Além disso, nem todas as organelas do mesmo tipo têm exatamente a mesma densidade, há pequenas variações. Para resolver isso, podemos recorrer a um tipo de centrifugação em que, além de variar a velocidade e o tempo de centrifugação, podemos variar também a densidade do meio em que as organelas são centrifugadas. Depois de fazer centrifugação diferencial, retomamos o *pellet* e o colocamos sobre um gradiente de densidade previamente montado num tubo de centrífuga (**Figura 5.4**). Para montar esse gradiente, usamos soluções concentradas de densidade conhecida, como sacarose para separar organelas, cloreto de cério para separar DNA e outros meios especiais que variam de densidade sem exercer efeito osmótico.

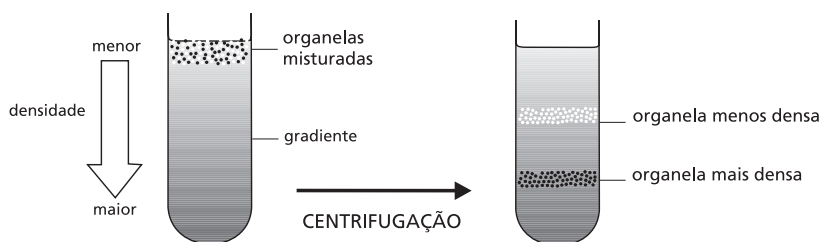


Figura 5.4

Neste tipo de centrifugação, o material que está a caminho do fundo do tubo encontra densidades cada vez maiores do líquido, tendo cada vez mais dificuldade de prosseguir. Quando um componente da mistura de organelas encontrar uma região do gradiente que tenha densidade igual à sua, entrará em equilíbrio, formando uma “banda”. Essa banda poderá ser recolhida cuidadosamente com uma pipeta ou uma seringa e, assim, finalmente, temos uma organela purificada.

O sucesso de um protocolo de fracionamento celular pode ser avaliado de duas maneiras:

a) por microscopia eletrônica, processando cada etapa e observando no microscópio que componentes da célula estão presentes naquela fração e se esses componentes estão bem conservados ou se o fracionamento os danificou;

b) pela dosagem de **enzimas marcadoras** em todas as frações; para uma enzima ser considerada marcadora de uma organela, é preciso que ela esteja presente apenas nessa organela e em nenhum outro lugar da célula e que seja encontrada nessa organela em todos os tipos celulares. Essas enzimas foram estabelecidas nos primeiros trabalhos de fracionamento celular e depois confirmadas por citoquímica (veja na próxima aula).

A partir de frações subcelulares contendo organelas purificadas, ou até mesmo de células inteiras, podemos purificar as macromoléculas que desejamos estudar. Existem várias metodologias, cada uma mais apropriada para proteínas ou lipídeos ou ácidos nucleicos ou açúcares. Para exemplificar, vamos ver a seguir os princípios das metodologias bioquímicas mais usadas em Biologia Celular: cromatografias e eletroforese.

II) CROMATOGRAFIA

a) Cromatografia de partição

A cromatografia de partição é adequada para separação de moléculas pequenas, como lipídeos e aminoácidos. Pode ser feita em papel ou numa fina camada de material inerte, como celulose ou sílica, aplicada sobre uma superfície de vidro. Nesses suportes é possível conseguir particionar a amostra entre duas fases líquidas, uma móvel e outra estacionária. Veja como funciona: colocamos um papel ligeiramente umedecido em água num recipiente, em contato com um solvente orgânico (veja a **Figura 5.5**); o solvente subirá pelo papel por capilaridade, enquanto a água continuará imóvel.

Quando o solvente chegar perto da borda superior do papel, retiramos do recipiente, deixamos o papel secar e borrifamos com corante adequado para o que desejamos: para fosfolipídeos ou para aminoácidos, por exemplo. Logo veremos que os componentes da amostra foram separados. Essa separação ocorreu porque cada componente da amostra tem afinidade diferente, pelo solvente ou pela água. Assim, quem tiver mais afinidade com o solvente vai se deslocar mais e quem tiver mais afinidade pela água, que está imobilizada no papel, vai se deslocar mais devagar ou mesmo ficar parado. Dizemos que os componentes da amostra particionaram entre a água e o solvente.

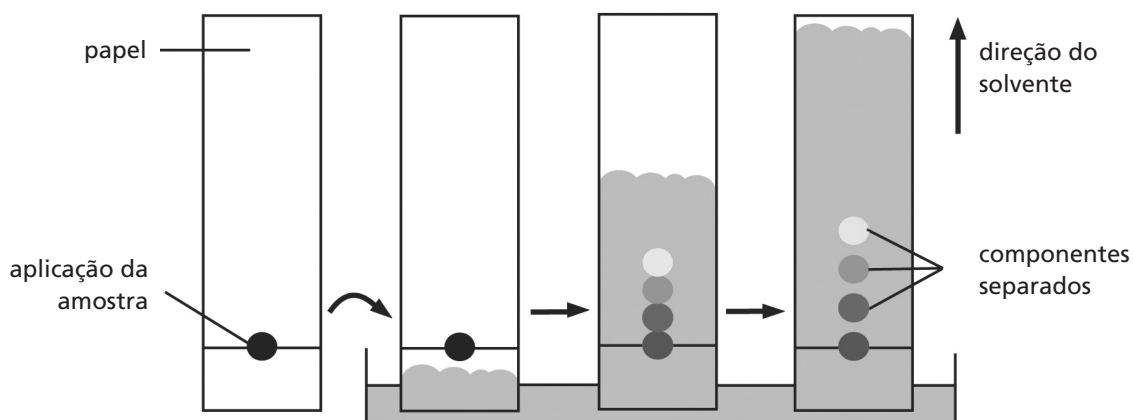


Figura 5.5: Cromatografia de partição.



Você pode fazer essa cromatografia em casa: use um pedaço de papel daqueles de coar café e pingue tinta de caneta-tinteiro azul ou preta perto de uma das bordas do papel. Mergulhe essa borda em um pouco de acetona e veja que, à medida que a acetona sobe pelo papel, ela arrasta os componentes da tinta, uns mais e outros menos, separando uma mancha vermelha, uma amarela e outra esverdeada.

b) Cromatografias em coluna

Nestes tipos de cromatografia, usamos uma coluna de vidro (ou plástico, ou metal) que foi preenchida com uma resina que exercerá um efeito de separação na amostra que a percorrer. Veja na **Figura 5.6** como funciona.

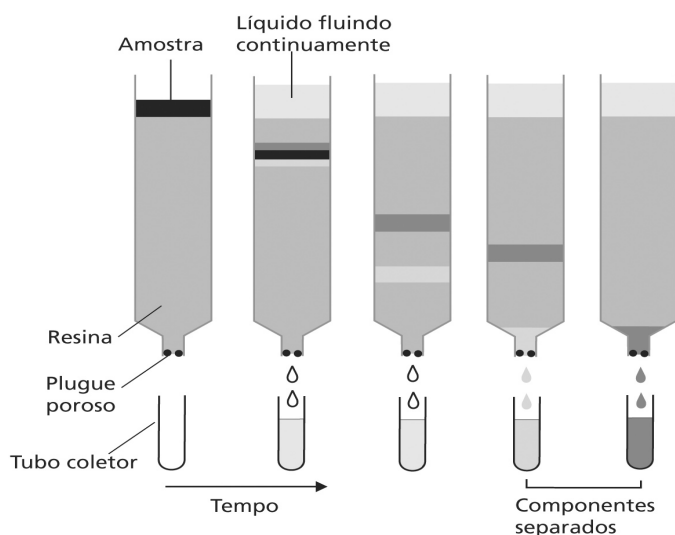


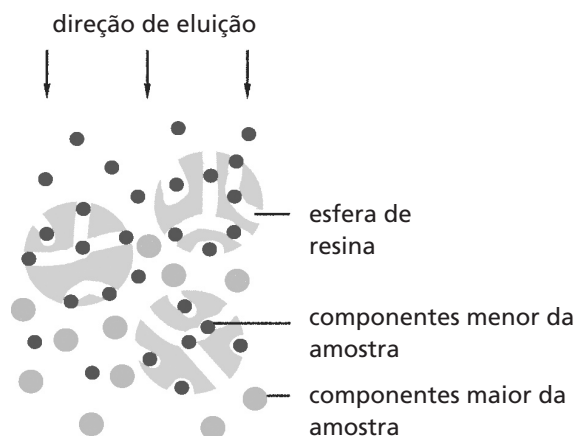
Figura 5.6: Cromatografia em coluna.

A amostra é aplicada sobre a resina, que já foi previamente preparada na solução-tampão adequada. Em seguida, esse mesmo tampão é adicionado continuamente sobre a resina, e recolhido na saída da coluna, obrigando a amostra a percorrer a resina e sofrer seus efeitos de separação. Esse processo (chamado eluição) pode levar de minutos, se a coluna for pequena, a dias, se a coluna for grande. Atualmente, mesmo as maiores colunas podem ser eluídas em minutos graças a uma tecnologia de eluição sob alta pressão, a que se deu o nome de HPLC (*high performance liquid chromatography*).

Os efeitos de separação numa cromatografia dependem da natureza da resina e podem ser de três tipos:

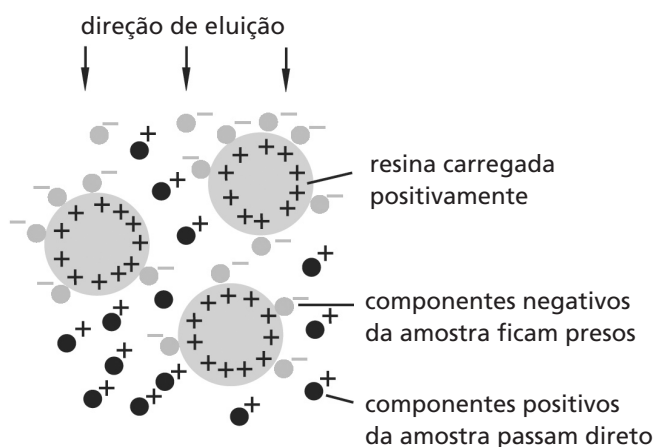
- **filtração em gel:** a resina é formada por esferas muito pequenas, perfuradas por poros de tamanho definido (**Figura 5.7**). Conforme o líquido vai escoando, os componentes maiores da amostra, de diâmetro maior que a abertura dos poros da resina, passam direto e saem logo da coluna, enquanto os menores caem nos canais da resina e demoram a sair. Assim, obtém-se uma separação por tamanho, muito usada para separar proteínas de diferentes pesos moleculares.

Figura 5.7 Resina de filtragem em gel.



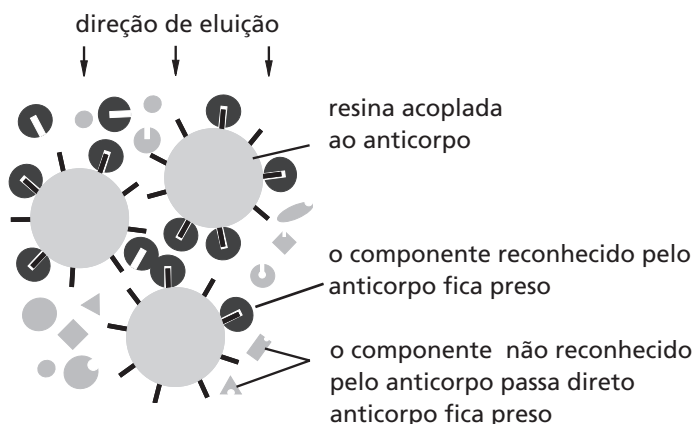
- **troca iônica:** as amostras percorrem uma resina formada por microesferas sem poros, mas que têm carga em sua superfície (Figura 5.8), prendendo os componentes da amostra que têm carga contrária. Se forem justamente esses os componentes desejados, é possível desligá-los da resina com variações de pH ou de força iônica da resina.

Figura 5.8: Resina de troca iônica.



- **afinidade:** a resina está revestida com um ligante específico para o componente da amostra que se deseja separar: um anticorpo (veja próxima aula), por exemplo (Figura 5.9). O mesmo recurso de variação de pH ou força iônica é usado para soltar a molécula da coluna.

Figura 5.9: Cromatografia de afinidade.



Se você achou a cromatografia de afinidade mais eficiente que a de filtração em gel ou a de troca iônica, acertou. Mas para que ela funcione bem é preciso que haja um ligante específico para acoplar à resina e que a amostra não esteja muito sobrecarregada de contaminantes. Por isso, geralmente usam-se as outras duas cromatografias para dar uma “limpada” na amostra e só então se usa a cromatografia de afinidade para purificar a proteína que queremos.

III) ELETROFORESE

A técnica bioquímica mais usada em Biologia Celular é certamente a eletroforese. Ela se baseia no estudo do comportamento de uma molécula num campo elétrico. As macromoléculas são geralmente carregadas (reveja, em Bioquímica I): os ácidos nucleicos são negativos e as proteínas podem ser negativas ou positivas, dependendo do pH em que se encontram. Por isso, quando colocados num campo elétrico, os ácidos nucleicos sempre vão para o pólo positivo e as proteínas, para o positivo ou negativo, dependendo do pH. Mas a eletroforese não é feita com as moléculas soltas no líquido (apesar de ter sido inventada assim, há muitos anos). Usamos um suporte sólido, que geralmente é um gel poroso.

Para ácidos nucleicos, que são muito grandes, usamos amido (isso mesmo, um mingau!) ou agarose (parece uma gelatina), que formam géis de poro grande; e para proteínas, que não são tão grandes, usamos um gel próprio para eletroforese, a poli(acrilamida). Todos esses materiais permitem que, ao prepará-los, possamos escolher o tamanho do poro do gel por onde passarão as moléculas, a caminho do pólo que tem carga oposta à sua.

A carga dos ácidos nucleicos é proporcional ao seu tamanho; quanto maior a molécula, mais negativa. Já as proteínas não, existem proteínas grandes e muito carregadas, grandes e pouco carregadas, pequenas e muito carregadas e pequenas e pouco carregadas, dificultando bastante a análise do resultado. Além disso, como percorrem os poros de um gel, a forma da molécula vai fazer diferença: uma proteína em forma de bastão vai passar pelos poros com mais dificuldade se estiver de lado. Por isso, as proteínas são desnaturadas antes de serem aplicadas ao gel (**Figura 5.11**). Assim, as diferenças de forma não influenciam mais a corrida eletroforética, apenas a carga e o tamanho da molécula contam.

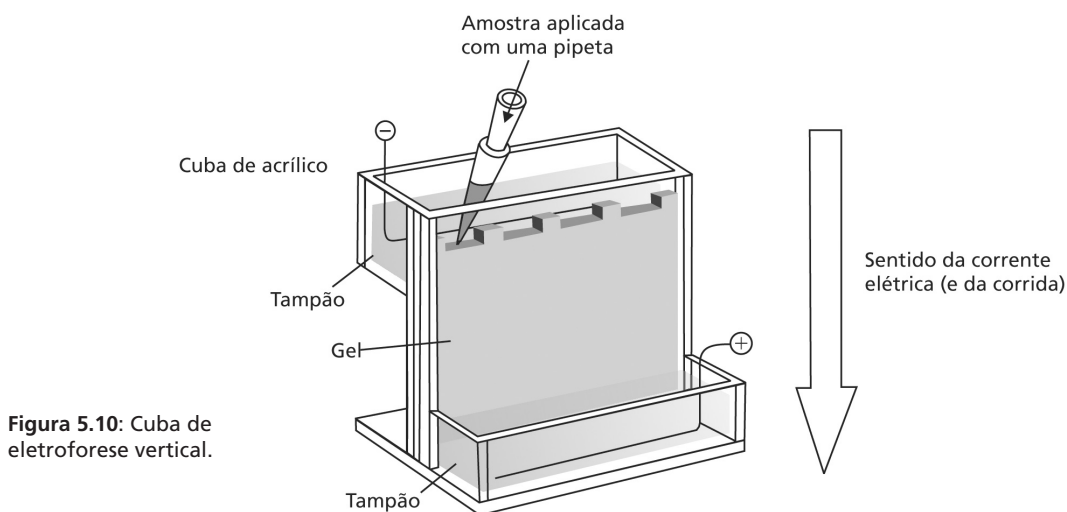


Figura 5.10: Cubo de eletroforese vertical.

Para desnaturar uma proteína, podemos fervê-la e, além disso, são usados dois reagentes: a) o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente iônico que, além de desnaturar, adiciona cargas negativas às ligações peptídicas, tornando a carga da proteína sempre negativa e proporcional ao seu tamanho (claro, porque quanto maior a proteína, mais ligações peptídicas ela tem!); b) o 2-mercaptoetanol, poderoso agente redutor que adiciona hidrogênios às pontes dissulfeto, desfazendo-as (**Figura 5.11**).

! Reveja, em Bioquímica I: uma proteína desnaturada é aquela que perdeu suas estruturas terciária e secundária, ficando só com a primária, ou seja, os aminoácidos ligados covalentemente e enovelados ao acaso, o que faz com que todas as proteínas desnaturadas sejam aproximadamente globulares.

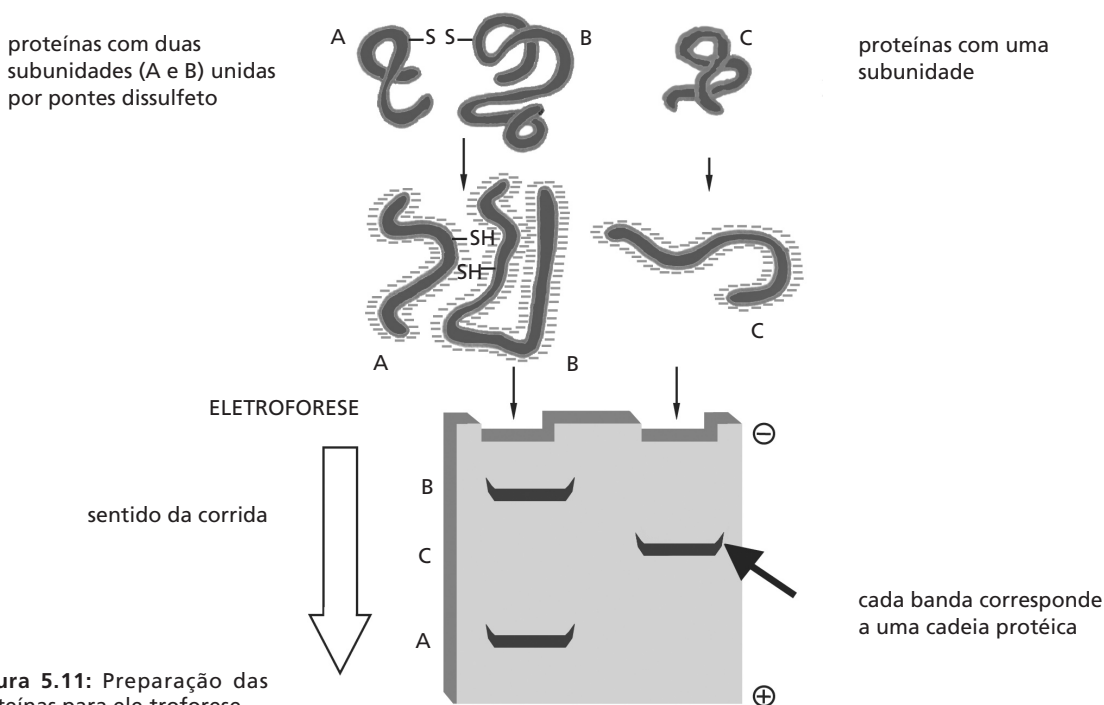


Figura 5.11: Preparação das proteínas para ele-troforese.

A eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (conhecida pela sigla SDS-PAGE, de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) é, portanto, uma técnica que separa proteínas de acordo com seu tamanho, ou **massa molecular**. Depois que a corrida eletroforética terminou, o gel é descolado dos vidros da cuba e corado com o corante desejado. O mais comum, o azul de Coomassie, só cora proteínas. Uma das aplicações de SDS-PAGE pode ser procurar quantas proteínas fazem parte de uma amostra. Veja na **Figura 5.12** a foto de um gel em que foram aplicadas como amostras as etapas de purificação de uma proteína. Da esquerda para a direita, a amostra está cada vez mais purificada.

Às vezes precisamos testar se uma proteína que foi separada num gel é reconhecida por um anticorpo específico, seja produzido no laboratório ou mesmo presente no soro de paciente (veja na próxima aula). Nesse caso, é preciso retirar as proteínas do gel, já que o anticorpo não desnaturado (para poder funcionar não podemos desnaturá-lo!) é uma molécula grande demais para entrar no gel. Ao mesmo tempo, não queremos misturar de novo as proteínas. A técnica de **eletrotransferência** (ou *Western blot*.) veio resolver esse problema. Depois de correr o gel como descrito anteriormente, colocamos o gel em contato com um papel especial, a nitrocelulose, que tem a capacidade de ligar proteínas (chamamos de membrana, mas é um papel), e fazemos passar a corrente elétrica desta vez no sentido perpendicular ao gel (veja na **Figura 5.13**). As proteínas vão sair do gel ainda do jeito que estavam separadas e grudar na nitrocelulose, ficando expostas para qualquer ensaio.

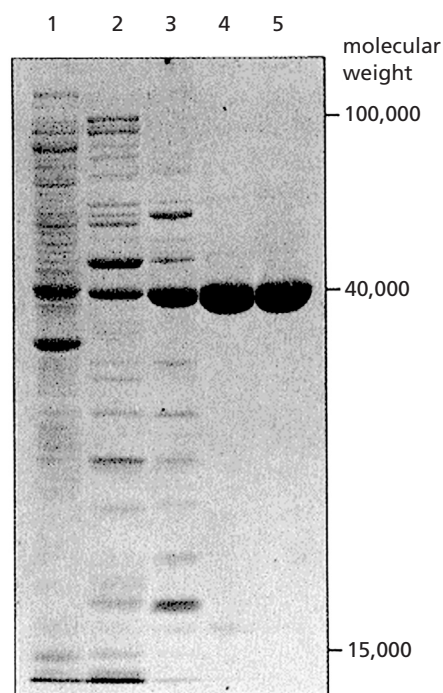


Figura 5.12: Gel de SDS-PAGE do acompanhamento de purificação de uma proteína. A mesma quantidade de proteína total foi aplicada em todas as amostras.



Figura 5.13: Eletrotransferência.

Também os ácidos nucleicos separados por eletroforese têm de ser transferidos para um papel de nitrocelulose se for preciso testar, por exemplo, se um fragmento de RNA (chamado sonda) é complementar a algum fragmento de DNA presente no gel. Você vai saber mais sobre isso em outras matérias do curso.

Outras metodologias de Bioquímica vêm sendo cada vez mais usadas em Biologia Celular para que se possa conhecer a composição de uma determinada organela, por exemplo. Se for necessário para o seu entendimento, essas técnicas mais sofisticadas (e menos usadas também) serão explicadas quando oportuno.

QUESTIONÁRIO

1. Por que é preciso uma preparação homogênea para começar um fracionamento celular?
2. Quais são os métodos mais usados para romper células?
3. Como se separam organelas de um homogeneizado?
4. O que é centrifugação em gradiente de densidade?
5. Qual o princípio de separação da cromatografia de partição?
6. Qual o princípio de separação da cromatografia de filtração em gel?
7. Qual o princípio de separação da cromatografia de troca iônica?
8. Qual o princípio de separação da cromatografia de afinidade?
9. Quais as aplicações da técnica de eletroforese?
10. Quais as aplicações da técnica de eletrotransferência ou Western blot.?

O uso de anticorpos na pesquisa

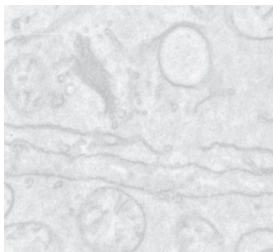
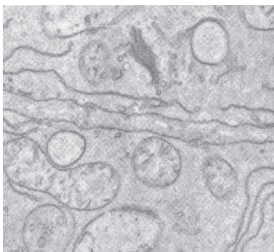
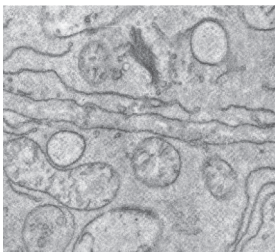
AULA

6

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Saber o que é um anticorpo.
- Conhecer os principais métodos que utilizam anticorpos:
 - Em microscopia óptica (fluorescência);
 - Em microscopia eletrônica.



INTRODUÇÃO

Apesar de muito pequenas, daí dependerem de microscópios para serem vistas, as células são muito complexas. Entre açúcares, lipídeos, enzimas e proteínas em geral, um enorme número de moléculas teve e ainda tem de ser identificado em termos estruturais e funcionais. Por isso mesmo a Bioquímica é uma ferramenta tão importante no estudo das células que acabou por tornar-se uma vertente específica das Ciências Biológicas. Você já foi apresentado aos métodos bioquímicos de estudo da célula na disciplina de Bioquímica. Além disso, a Aula 5 trata especificamente de alguns métodos rotineiramente empregados em Biologia Celular. Associar a identificação de moléculas específicas à sua localização celular sempre foi uma meta perseguida pelos pesquisadores. Dessa busca tiveram origem os métodos histoquímicos e citoquímicos usados, respectivamente, para identificar determinados grupos de substâncias em tecidos e células.

Os métodos citoquímicos procuram identificar determinada classe de substâncias no compartimento celular onde estão presentes. Assim, existem métodos específicos para localização de carboidratos, lipídeos e diversas enzimas. As enzimas características de um determinado compartimento são usadas para identificá-lo. Por exemplo, a fosfatase ácida é a enzima característica dos lisossomas, e sua presença permite distinguir essa organela de outros tipos de vesículas citoplasmáticas. Na tabela a seguir, estão relacionadas algumas estruturas celulares e suas enzimas características.

Estrutura	Enzima característica
Complexo de Golgi	Nucleosídeo difosfatase
Complexo de Golgi	Tiamino-pirofosfatase
Lisossoma, retículo endoplasmático	Fosfatase ácida
Membrana plasmática	Fosfatase alcalina
Membrana plasmática	5'nucleotidase
Mitocôndria	Citocromo oxidase
Peroxisomos	Peroxidase
Peroxisomos	Catalase
Retículo endoplasmático	Glicose-6-fosfatase

Como você pode notar, algumas enzimas estão presentes em mais de um compartimento, como a fosfatase ácida, enquanto algumas organelas possuem mais de uma enzima marcadora para sua localização. A quantidade de enzima e sua susceptibilidade ao processamento em laboratório tornam difícil a aplicação de alguns métodos citoquímicos em várias situações. Essas dificuldades foram em grande parte contornadas com o desenvolvimento de métodos que utilizam anticorpos para a marcação de moléculas e estruturas celulares.

O QUE SÃO ANTICORPOS

Anticorpos, também chamados **imunoglobulinas**, são uma classe de proteínas produzida pelo sistema imune em resposta à presença de uma molécula estranha ao organismo. As moléculas capazes de estimular a produção de anticorpos são chamadas **antígenos**. A Figura 6.1 resume a estrutura de uma imunoglobulina.

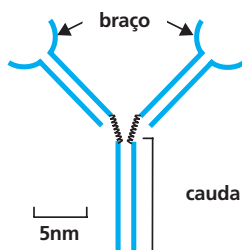
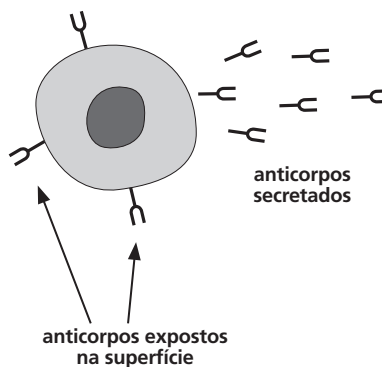


Figura 6.1: Anticorpos são proteínas em forma de "Y". Os "brazos" do Y ligam-se a moléculas consideradas estranhas ao organismo. A "cauda" do Y será reconhecida por uma célula encarregada de destruir o organismo ou molécula invasora.

Sistema imune

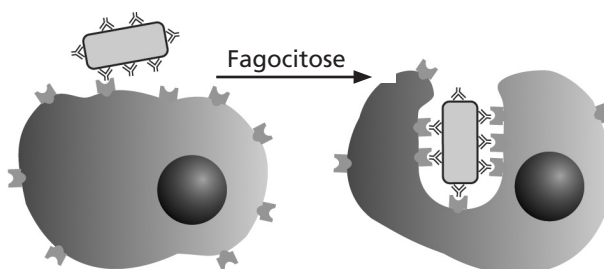
Todos os animais, mesmo os mais simples, possuem células especializadas na defesa do organismo contra vírus, bactérias ou mesmo moléculas estranhas. No caso dos mamíferos o sistema imune é constituído pelos chamados glóbulos brancos que, na verdade, incluem vários tipos celulares. Destes, os **linfócitos B** são responsáveis pela produção de anticorpos. Os linfócitos podem ser do tipo T ou do tipo B, de acordo com sua origem. Os do tipo T passam pelo **timo**, uma glândula localizada sobre o osso esterno. Nas aves os linfócitos B se originam da **bursa de Fabricius**, daí seu nome. Nos mamíferos, eles se formam e amadurecem na medula óssea. Os linfócitos B sintetizam anticorpos que tanto são expostos em sua superfície, quanto secretados para o meio extracelular (no caso, o sangue). Os anticorpos utilizados como marcadores celulares são provenientes de linfócitos B.



POR QUE PRODUIZIR ANTICORPOS EM CULTURAS DE CÉLULAS?

Os anticorpos se ligam fortemente às moléculas contra as quais foram produzidos, inativando-as ou marcando-as para destruição (Figura 6.2).

Figura 6.2: Uma bactéria com vários anticorpos aderidos à sua superfície é reconhecida e ingerida (fagocitada), sendo assim destruída.



ANTICORPOS COMO INSTRUMENTOS DE PESQUISA

Quando uma molécula estranha, como uma proteína vinda de outra espécie, é injetada em um animal, os linfócitos B deste produzirão grande quantidade de anticorpos capazes de se ligar (= reconhecer) a essa molécula estranha (Figura 6.3). O soro do animal inoculado, agora rico nesses anticorpos, pode ser usado para detectar essa molécula estranha em outras células ou animais em que ela esse já presente. Isto é, os anticorpos podem ser usados para identificar a presença da molécula em outras células. Embora a Figura 6.3 represente um camundongo, ratos, coelhos, cabras e cavalos também são muito utilizados na produção de anticorpos. Naturalmente, quanto maior o animal, maior o volume de soro imune que pode ser obtido do mesmo.

ANTÍGENO

É qualquer molécula estranha, contra a qual o organismo de um indivíduo passa a produzir anticorpos.

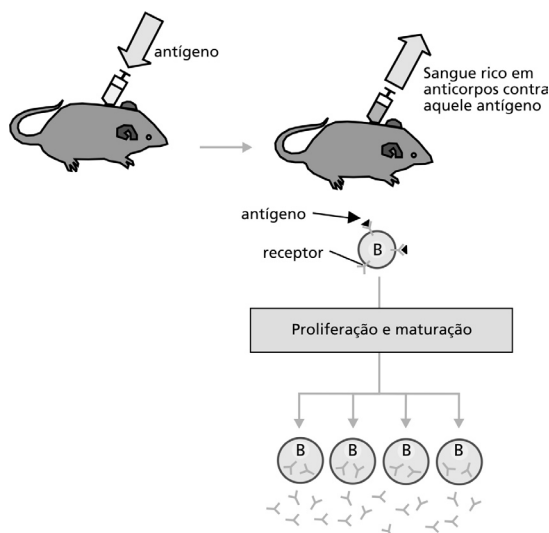


Figura 6.3: Anticorpos podem ser produzidos em laboratório injetando-se determinados antígeno sem um animal. Os linfócitos B reconhecerão e passarão a secretar grande quantidade de anticorpos contra esses antígenos. Aspirando o sangue do animal, o soro estará enriquecido em anticorpos contra esse antígeno.

Nesse ponto, surgem duas questões:

1. Na extração do soro, muitas vezes o animal é sacrificado e, naqueles que sobrevivem, a concentração daquele anticorpo diminui bastante depois de algum tempo; portanto, por maior que seja a quantidade de soro imune obtida contra uma molécula de interesse, o que fazer quando ele acaba?

2. Um antígeno, ainda que seja uma molécula e não uma bactéria ou vírus inteiro, será reconhecido por vários linfócitos B. A partir daí, todos esses linfócitos vão começar a se dividir e secretar anticorpos capazes de reconhecer aquele antígeno. Como cada um desses linfócitos estimulados a se dividir está gerando um *clone* (veja aula de cultura de células), os anticorpos produzidos por esse animal são chamados de **policlonais** (Figura 6.4)

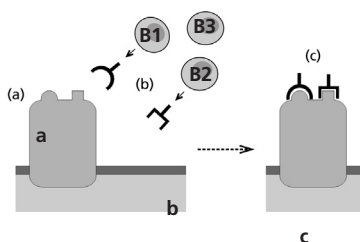


Figura 6.4: Diversas regiões de uma molécula (a) são reconhecidas como antígenos por diferentes linfócitos (b). O soro imune é chamado policlonal por ser uma mistura de anticorpos gerados por diversos clones de linfócitos, capazes de se ligar a diferentes porções do antígeno (c).

OS ANTICORPOS MONOCLONAIS

A produção contínua de anticorpos de um único tipo e com especificidade para uma determinada região da molécula é possível a partir do cultivo de **hibridomas**, culturas celulares resultantes da fusão de dois tipos celulares distintos que conjugam, características interessantes das duas linhagens originais (veja Aula 4). Como esses anticorpos são originados de um clone celular, são chamados **monoclonais**. Além da especificidade, outra vantagem dos anticorpos monoclonais é que, como provêm de linhagens celulares que podem ser mantidas permanentemente em cultivo, sua produção é mantida por tempo indeterminado. Como desvantagem, há o fato de que nem todos os hibridomas secretam anticorpos interessantes e a seleção das linhagens úteis é bastante trabalhosa (Figura 6.5). Também pode acontecer de um hibridoma se perder por problemas durante o cultivo, como contaminação ou falha humana. As principais etapas do processo de produção de anticorpos monoclonais estão esquematizadas na Figura 6.5.

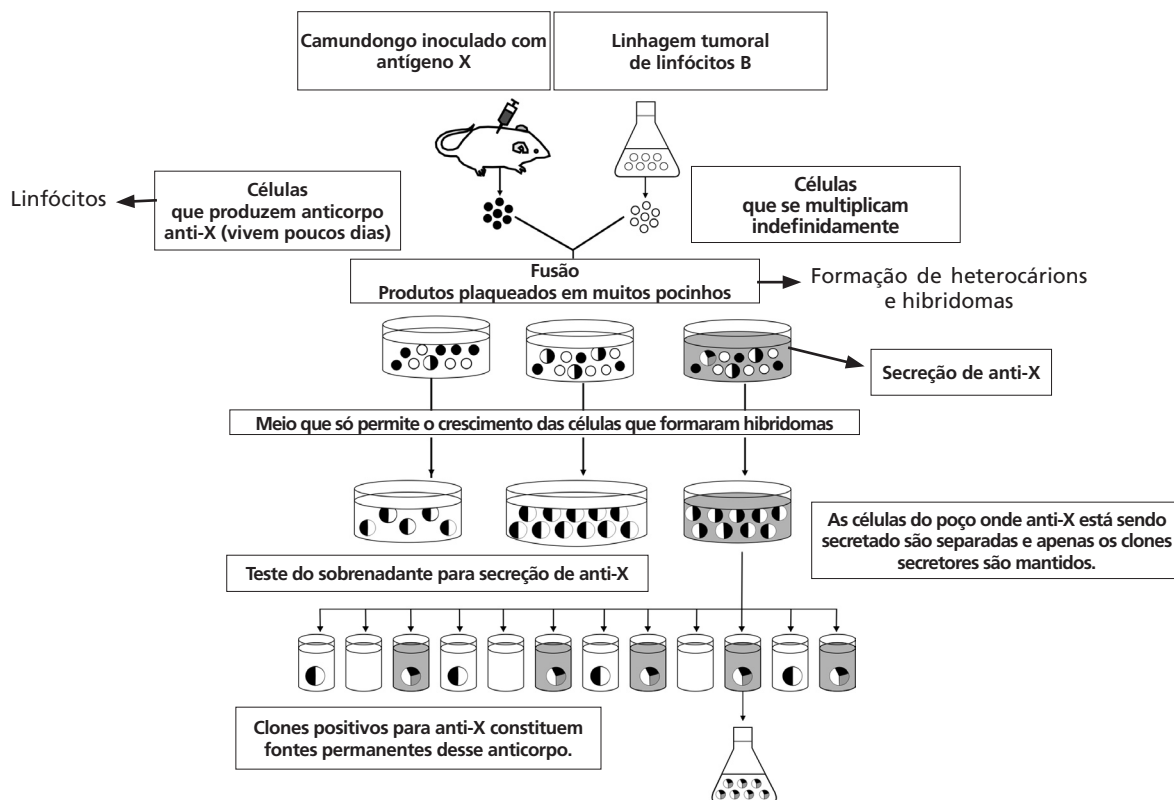


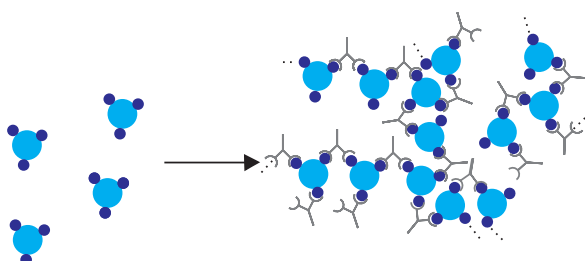
Figura 6.5: A produção de anticorpos monoclonais depende de hibridomas que conjuguem a capacidade de multiplicação indefinida de células tumorais à secreção de anticorpos específicos.

ONDE E COMO SÃO USADOS OS ANTICORPOS PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO

Os anticorpos tornaram-se ferramentas indispensáveis no dia-a-dia da Biologia Celular. Localizar moléculas e determinar sua função celular tornou-se muito mais rápido e preciso com o uso de anticorpos. Os anticorpos são utilizados para mostrar a distribuição de moléculas dentro e fora da célula. Em outras palavras: são utilizados como marcadores moleculares.

Quando as moléculas às quais se ligam se encontram na superfície da célula, os anticorpos em geral provocam a aglutinação entre as mesmas (Figura 6.6). Quanto mais moléculas daquele tipo existirem na superfície, menor será a concentração do anticorpo necessária para que as células se aglutinem.

Figura 6.6: Células em suspensão aglutinam-se em presença de anticorpos que reconhecem moléculas em sua superfície, pois cada “braço” do anticorpo pode ligar-se a uma célula, estabelecendo ligações cruzadas. Esta é uma das maneiras que o organismo tem de imobilizar e destruir bactérias invasoras.



A utilização de anticorpos pré-fabricados não chega a ser uma novidade. Todos sabemos que em caso de mordida de cobra é utilizado o **soro antiofídico**, assim como o **soro antitetânico** é aplicado para reverter, ainda no início, um quadro de tétano. Esses *soros* são produzidos pela contínua injeção de toxinas ofídicas e tetânicas, respectivamente, em animais, geralmente cavalos. Periodicamente esses animais são sangrados e o soro rico em anticorpos, purificado. Dessa forma, numa situação em que o sistema imune do indivíduo não teria tempo de desenvolver uma resposta que neutralizasse essas toxinas, ele recebe uma dose concentrada de anticorpos pré-produzidos.

A LIGAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO PODE SER VISUALIZADA?

As propriedades de ligação específicas entre anticorpos e moléculas têm sido aproveitadas em várias metodologias de estudo da célula. Quando acoplados a uma molécula capaz de emitir cor, a presença dos anticorpos ligados a antígenos pode ser observada. Anticorpos conjugados a moléculas fluorescentes podem ser utilizados para observação de vários componentes celulares ao microscópio óptico de fluorescência ou, na sua versão mais sofisticada, ao microscópio confocal a *laser* (Figura 6.7), ambos citados na Aula 1. Esses mesmos anticorpos podem ser conjugados a partículas eletrondensas como a proteína ferritina ou ouro coloidal (Figura 6.8). Nesse caso, a visualização pode ser feita no microscópio eletrônico de transmissão.

Foto: Técia V. de Carvalho

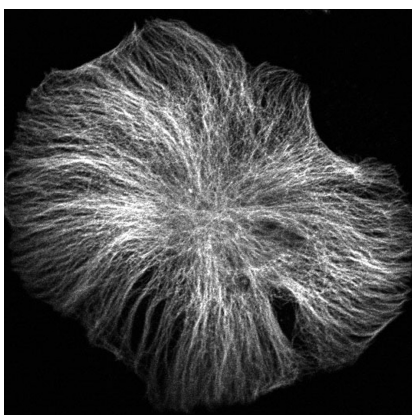


Figura 6.7: Esta célula foi incubada na presença de um anticorpo fluorescente contra tubulina, mostrando feixes de microtúbulos que se irradiam a partir do centro celular.

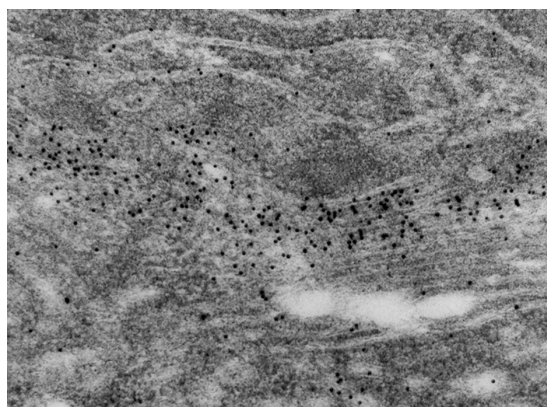


Figura 6.8: Essa célula foi tratada com anticorpo conjugado a partículas de ouro coloidal, que aparecem como bolinhas negras.

MARCADORES FLUORESCENTES

Também chamados fluorocromos, são corantes específicos para microscopia de fluorescência, pois têm a capacidade de absorver um comprimento de onda da luz e emitir em outro, mais longo. Se for utilizado um filtro que permita a passagem apenas do comprimento de onda emitido, esse será visto brilhando contra um fundo escuro, permitindo que quantidades muito pequenas dessas moléculas sejam detectadas. Na microscopia de fluorescência, esse princípio é utilizado para detectar componentes celulares específicos, como proteínas ou açúcares. Nesses casos, os marcadores fluorescentes são acoplados a moléculas que se ligam de modo específico aos componentes celulares, como anticorpos ou lectinas. Os marcadores mais utilizados são a rodamina, que emite em vermelho, e a fluoresceína, que emite em verde (Figura 6.9 e 6.10).

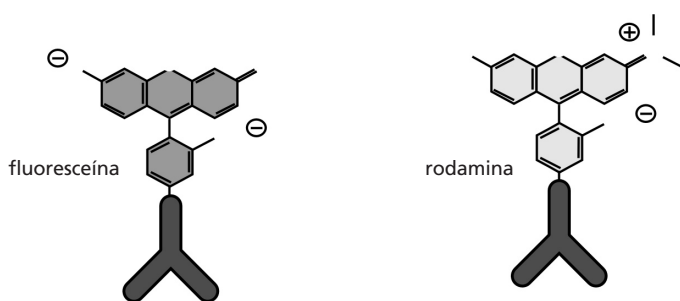
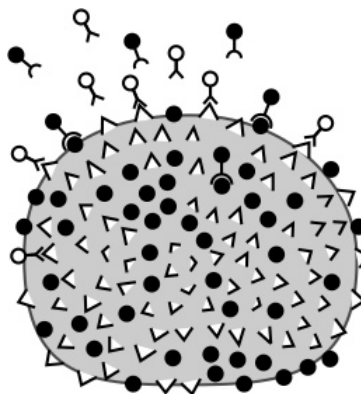


Figura 6.9: A fluoresceína (verde) e a rodamina (vermelha) podem ser conjugadas a anticorpos ou outras moléculas e funcionar como marcadores moleculares.

Figura 6.10: Anticorpos marcados com moléculas que emitam cor permitem ver em que regiões da célula existem os antígenos por eles reconhecidos.



QUE OUTRAS TÉCNICAS UTILIZAM ANTICORPOS?

Além de serem associados às microscopias óptica e eletrônica, os anticorpos também são marcadores indispensáveis para aplicação em métodos bioquímicos, como os descritos na Aula 5. É possível associar anticorpos às partículas de resina de uma coluna de cromatografia. A técnica recebeu o nome de **cromatografia de afinidade**.

Os anticorpos também podem ser utilizados para purificar uma determinada molécula, como no método de **imunoprecipitação**, que é muito parecido com a cromatografia de afinidade, só que, ao invés de montar uma coluna, os anticorpos acoplados à resina são misturados com a amostra. A molécula que se deseja purificar pode ser, por exemplo, uma proteína do soro. Depois de algum tempo de incubação, a mistura é centrifugada em velocidade baixa, suficiente apenas para colocar no *pellet* a resina acoplada com anticorpo que “pescou” a proteína do soro, separando-a das outras.

Num método chamado *Western blot*, proteínas separadas por eletroforese podem ser transferidas para um papel de nitrocelulose (eletrotransferência, veja aula anterior) e a presença de uma determinada proteína é revelada pela ligação de anticorpos conjugados a uma enzima que depois será revelada por incubação com seu substrato, formando um produto corado onde está a banda protéica específica que se desejava detectar (Figura 6.11).

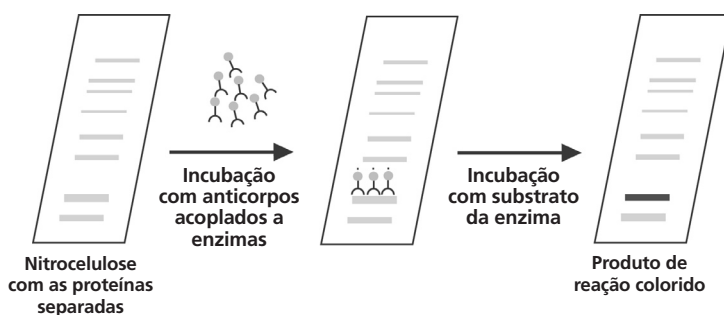


Figura 6.11: *Western blot*.

Hoje em dia, a técnica de *Western blotting* é bastante usada não só em pesquisa científica mas também em análises clínicas. Seria muito difícil marcar os anticorpos presentes no soro de cada paciente com uma enzima ou mesmo com um fluorocromo; por isso usamos anticorpos secundários, que reconhecem outros anticorpos, estes ditos primários. Podemos injetar imunoglobulinas humanas, por exemplo, numa cabra, e ela reconhecerá essas imunoglobulinas como estranhas, isto é, como antígenos. Produzirá então anticorpos contra imunoglobulinas humanas, que reconhecerão as imunoglobulinas de qualquer pessoa. Esses anticorpos que a cabra fez, os **anticorpos secundários**, serão depois acoplados a fluorocromos, ou a enzimas, ou a ouro coloidal, e usados como ferramentas para reconhecer onde estão os anticorpos primários, que por sua vez ligarão onde estiverem os antígenos que eles reconhecem especificamente.

É fácil saber se uma pessoa teve contato com algum agente causador de doença incubando uma nitrocelulose contendo as proteínas do provável parasito, separadas por eletroforese, com o soro da pessoa. Se houver anticorpos no soro, eles se ligarão às bandas do parasito. Em seguida, incubamos a nitrocelulose com anticorpos secundários acoplados à enzima e revelamos em que banda ela se ligou usando seu substrato. Assim é feita obrigatoriamente a segunda testagem para HIV, o vírus que causa AIDS. A primeira testagem (chamada ELISA, de *enzyme linked immunoadsorbent assay*) é feita com extratos do vírus não separados por eletroforese; todas as proteínas juntas são incubadas com o soro do paciente e depois com anticorpos secundários acoplados à enzima. A resposta do ELISA é sim ou não, isto é, tem ou não tem anticorpos. Os pacientes com resposta positiva serão chamados a fornecer outra amostra de sangue para confirmar o teste. Nesse segundo teste, usa-se o *Western blot*, para saber quais são as proteínas do vírus reconhecidas pelo soro do paciente. Assim é possível identificar qual variante do vírus infectou aquela pessoa, dado importante para encaminhar o tratamento daquele paciente e também para estudos epidemiológicos.

NEM SÓ ANTICORPOS SÃO USADOS COMO MARCADORES CELULARES

Além dos anticorpos, outras moléculas podem ser utilizadas como marcadores celulares, seja em experimentos de aglutinação, seja complexadas a fluorocromos e partículas de ouro coloidal. Nas próximas aulas, algumas vezes faremos referência a **lectinas**, proteínas e glicoproteínas isoladas de plantas e animais que se ligam a seqüências específicas de açúcares presentes na superfície das células. As lectinas, na grande maioria das vezes, são responsáveis pela toxicidade de uma determinada planta ou animal para outras espécies. Por se ligarem a componentes da superfície celular, podem inibir processos de adesão e reconhecimento entre a célula e o meio ambiente. A tabela a seguir lista algumas espécies animais e vegetais de onde já foram isoladas lectinas.

Espécie	Nome vulgar
<i>Canavalia ensiformis</i>	Feijão-cavalo
<i>Triticum vulgaris</i>	Trigo
<i>Helix pomatia</i>	Caracol
<i>Limulus polyphemus</i>	Límulo ou caranguejo-ferradura
<i>Arachis hypogaea</i>	Amendoim
<i>Ricinus comunis</i>	Mamona

O Límulo, ou caranguejo ferradura, é um artrópode que já foi classificado entre os crustáceos, depois entre os aracnídeos e hoje constitui a classe merostomata. Atualmente existem apenas quatro espécies desse animal, nenhuma na América do Sul. Os esquemas a seguir representam o límulo em vista dorsal e ventral.

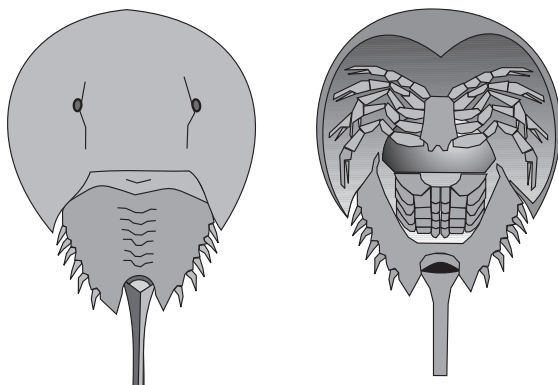


Figura 6.12: Esquema de um caranguejo-ferradura retirado do site <http://www.horseshoecrab.org>.

RESUMO

Anticorpos são proteínas secretadas pelos linfócitos em resposta a uma molécula ou um organismo estranho.

Um organismo produz vários anticorpos diferentes, capazes de reconhecer diferentes porções de uma mesma molécula estranha. O soro contendo essa mistura de anticorpos é chamado policlonal.

Quando se produz um clone a partir da fusão de um linfócito e de uma célula tumoral, essa linhagem pode ser mantida indefinidamente em cultura e secretará anticorpos monoclonais.

Os anticorpos servem para identificar a presença de moléculas na superfície de células por provocarem aglutinação quando presentes.

Os anticorpos também podem ser associados a moléculas visíveis ao microscópio óptico de fluorescência (fluorocromos) ou a partículas de ouro coloidal, permitindo localizar moléculas específicas em microscopia eletrônica.

Os anticorpos também podem ser utilizados para reter moléculas numa coluna de cromatografia e permitir sua purificação e para demonstrar a presença de uma proteína entre as bandas de um gel.

As lectinas são proteínas extraídas de plantas e animais que se ligam de forma específica a determinadas seqüências de açúcares presentes na superfície celular, permitindo sua identificação.

EXERCÍCIOS

1. O que são anticorpos?
2. Por que os anticorpos podem causar aglutinação de células?
3. Defina:
 - anticorpos policlonais
 - anticorpo monoclonal
 - soro imune
 - hibridoma
4. A que tipo de molécula os anticorpos são associados para observação em:
 - Microscopia óptica
 - Microscopia eletrônica
5. O que são lectinas?

Estrutura da membrana plasmática

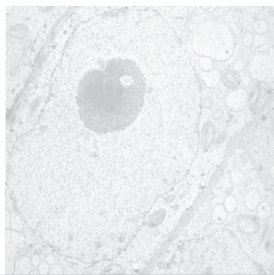
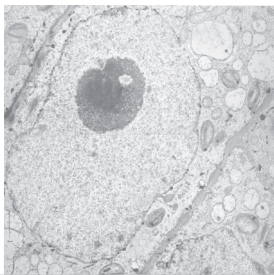
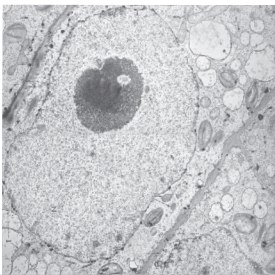
AULA

7

objetivos

Ao final desta aula, o aluno deverá ser capaz de:

- Entender por que a membrana é uma bicamada lipídica;
- Enumerar os tipos de lipídios que compõem a bicamada;
- Entender o que é a assimetria da bicamada;
- Exemplificar as consequências da assimetria na fisiologia celular;
- Conceituar o que é a fluidez da bicamada e os fatores que a influenciam;
- Conceituar domínios lipídicos.



INTRODUÇÃO

Coloque-se no lugar dos pesquisadores que, através da microscopia óptica, descreveram uma enorme variedade de tipos celulares e elaboraram a **teoria celular**. Que estruturas ou características você acha que eles descreveram como comuns a todos os tipos celulares?

É claro que você sabe: **a membrana**, o núcleo, a mitocôndria, o citoplasma... Você sabe que para quase todas as estruturas celulares existem exceções. Assim, as hemácias não possuem núcleo, as amebas não possuem mitocôndrias, nenhuma célula animal possui cloroplastos etc. Nem por isso deixam de ser células. Porém, **todos** os tipos celulares possuem um **limite**, ou seja, é possível definir um espaço intracelular (dentro da célula) e um espaço extracelular (fora da célula) (**Figura 7.1**).

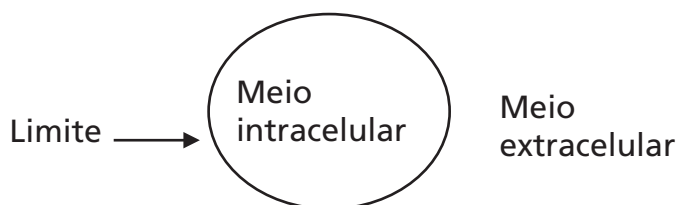


Figura 7.1: A membrana estabelece um limite entre o meio intracelular e o meio extracelular.

Nessa linha de raciocínio, podemos concluir que, se as células são as **unidades** formadoras dos seres vivos, é lógico supormos que essas unidades possuem um **limite**.

Nessa altura, você já deve ter concluído que esse limite é a **membrana celular** ou **membrana plasmática** ou plasmalema, tema desta aula.

Dê uma paradinha

Responda a este questionário de pré-avaliação de seus conhecimentos anteriores sobre membrana. Vale a pena respondê-lo antes de continuar. Veja o gabarito no final desta aula.

1. A membrana celular é uma estrutura que limita as células e _____.
2. A composição química da membrana é de _____, _____ e _____.

3. Os lipídeos são principalmente do tipo _____ e se organizam na membrana formando uma _____.
4. Os lipídeos da membrana se caracterizam por possuir uma extremidade da molécula _____ e a outra _____. Moléculas com essa natureza são chamadas _____.
5. Na bicamada lipídica, essas moléculas se organizam com as cabeças hidrofílicas para _____ e a região hidrofóbica para _____.
6. Enquanto isso, as proteínas se inserem mais ou menos profundamente _____, e os carboidratos (açúcares) _____.

Estamos certos de que o conceito de membrana, sua estrutura e composição química são seus velhos conhecidos, não apenas pelo conteúdo de Biologia Celular apresentado no Ensino Médio como também pela Bioquímica, que você já cursou. O que acabamos de revisar são os rudimentos do modelo estrutural da membrana plasmática, proposto em 1972 pelos pesquisadores americanos Singer e Nicolson. Esse modelo é conhecido como *modelo do mosaico fluido* (Figura 7.2), e resultou de anos de pesquisas em que foram utilizados vários métodos de estudos físicos, químicos e biológicos.



Nos cadernos didáticos de Bioquímica I estão minuciosamente descritos os conceitos aqui rapidamente revistos e os experimentos que levaram a eles. Vale a pena dar uma conferida antes de prosseguir no texto.

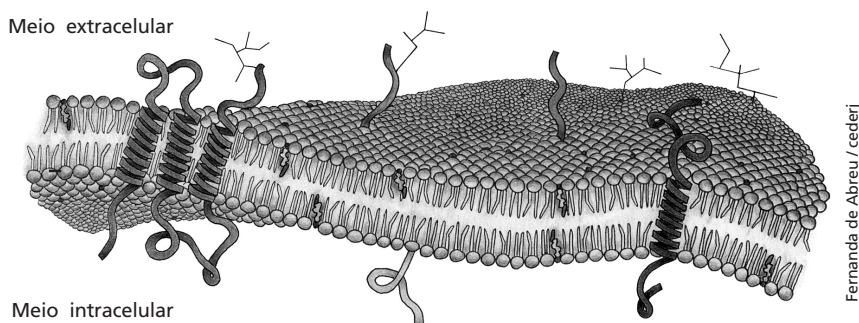


Figura 7.2: De acordo com o modelo do mosaico fluido da membrana, as diferentes proteínas se inserem entre os lipídeos da bicamada.

Resumindo:

1. Todos os seres vivos são células ou conjuntos de células.
2. Todas as células são limitadas por uma membrana que define e separa o meio intracelular do meio extracelular, a **membrana celular**. Delimite na **Figura 7.3** o meio intracelular e o meio extracelular.

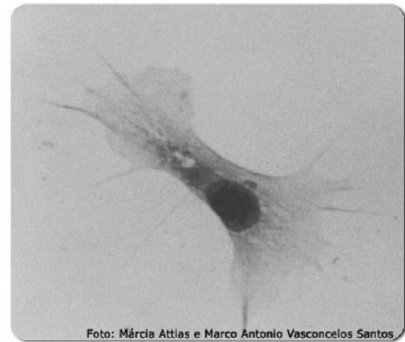


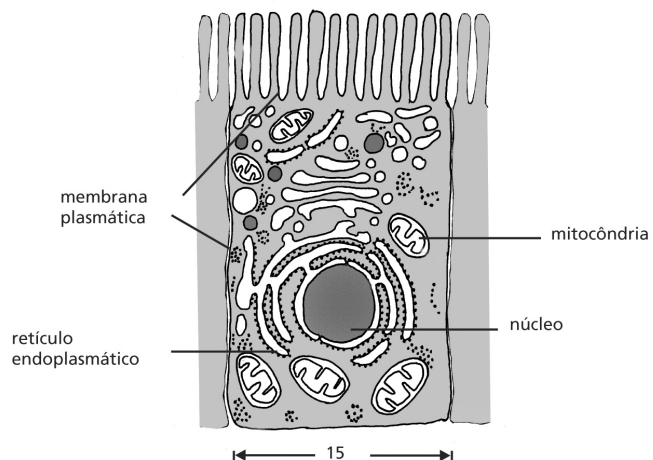
Foto: Márcia Attias e Marco Antonio Vasconcelos Santos

Figura 7.3: Hemócito de molusco.

BÁSICO

Todas as células são limitadas por uma membrana que define e separa o meio intracelular do extracelular. Dentro da célula, outros compartimentos também são definidos por membranas. Um exemplo disso é o núcleo, onde fica confinado o material genético. Outros exemplos que nos são familiares são as membranas que limitam o retículo endoplasmático e as mitocôndrias (**Figura 7.4**).

Figura 7.4: As membranas celulares delimitam os contornos mais externos da célula, assim como compartimento internos: o núcleo, o retículo endoplasmático e mesmo subcompartimentos, como nas mitocôndrias, onde duas membranas delimitam dois compartimentos.



DADOS HISTÓRICOS

A estrutura e a composição química das membranas celulares começaram a ser esclarecidas no século XIX.

O primeiro a propor uma natureza lipídica para as membranas celulares foi Overton, ao observar que as células podiam inchar ou murchar, de acordo com a composição do meio em que se encontravam.

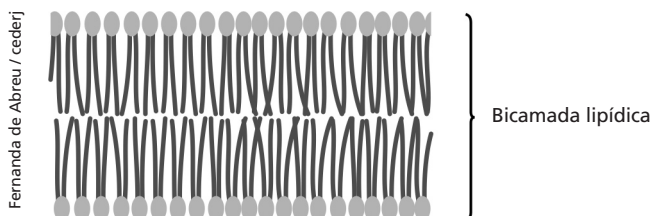
Mais adiante, em 1917, Langmuir demonstrou que não apenas as membranas eram formadas por lipídeos como estes eram de natureza anfipática, isto é, uma região da molécula era hidrofílica e a outra era hidrofóbica.

Como explicar a organização desses lipídeos numa membrana em que tanto o meio interno quanto o externo são hidrofílicos? A resposta foi dada em 1925 por Gorter e Grendel, estudando as membranas extraídas de hemácias (os glóbulos vermelhos do sangue). Eles concluíram que os lipídeos se organizam na membrana como uma camada dupla (bicamada).

Chamamos de folheto cada uma das camadas da bicamada lipídica. Assim, a membrana plasmática tem um folheto externo, voltado para o meio extracelular, e um folheto interno, voltado para o citoplasma.

A **Figura 7.5** representa uma bicamada de moléculas anfipáticas.

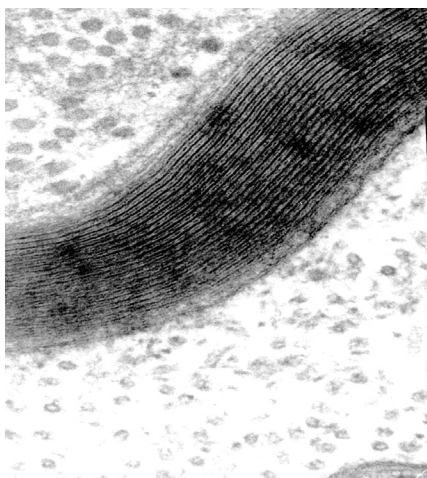
Figura 7.5: Bicamada lipídica. As cabeças polares (hidrofílicas) ficam em contato com o meio aquoso, enquanto as caudas apolares (hidrofóbicas) se voltam para o interior da bicamada.



Na década de 1930, R. Chambers, comparando medidas de tensão superficial de bicapas lipídicas artificiais e de membranas naturais, concluiu que as membranas biológicas não eram compostas apenas por lipídeos. Foi a primeira indicação da presença das proteínas na composição da membrana.

Os **lipídeos** são os componentes universais das membranas biológicas; entretanto, as atividades específicas de cada tipo celular dependem principalmente das proteínas. Além dessas duas classes de moléculas, os glicídios associados às proteínas ou aos lipídeos também fazem parte da composição das membranas biológicas.

OS LIPÍDEOS DA MEMBRANA



Os lipídeos correspondem a cerca de 50% da massa na maioria das membranas, sendo os outros 50% referentes principalmente a proteínas. Essa proporção é variável, havendo membranas praticamente desprovidas de proteínas, como é o caso da bainha de mielina, que envolve os neurônios. Portanto, os lipídeos formam a base das membranas celulares, sendo também responsáveis por suas características fundamentais de fluidez e permeabilidade. As membranas celulares são formadas por três tipos principais de lipídeos:

- fosfolipídeos,
- esteróis,
- glicolipídeos.

Todos são do tipo **anfipático** ou **anfifílico** (do grego *amphy* = dois; *philos* = amigo), isto é, uma parte de sua molécula é **hidrofílica** ou **polar**, e a outra extremidade é **hidrofóbica** ou **apolar** (Figura 7.6).

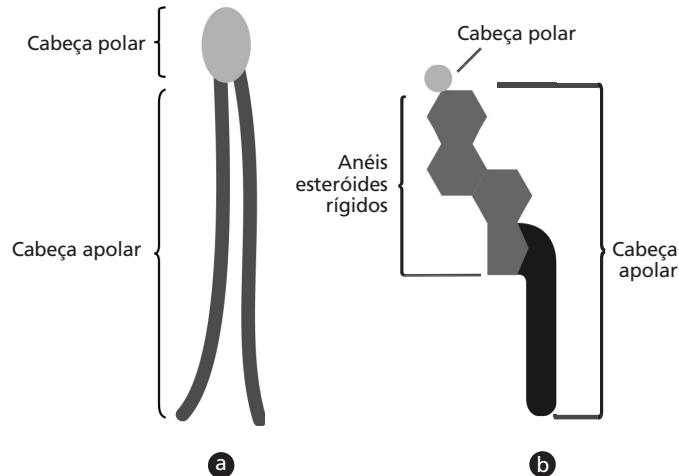


Figura 7.6: Representação esquemática de um fosfolípido (a) e do colesterol (b), dois tipos de lipídeo que compõem as membranas biológicas. As cabeças hidrofílicas estão assinaladas em cinza mais claro e as caudas hidrofóbicas em tons mais escuros. O esquema não está em escala, o colesterol é uma molécula muito menor que o fosfolípido.

Em meio aquoso, os lipídeos anfipáticos podem formar **micelas**, em que as cabeças polares ficam voltadas para o exterior e as caudas apolares para o interior, ou então formam bicamadas, em que as cabeças polares ficam em contato com o meio aquoso e as caudas apolares se voltam para o interior (Figura 7.7). Essas bicamadas tendem a selar-se em vesículas de 0,25 a 1,0mm de diâmetro, chamadas lipossomas.

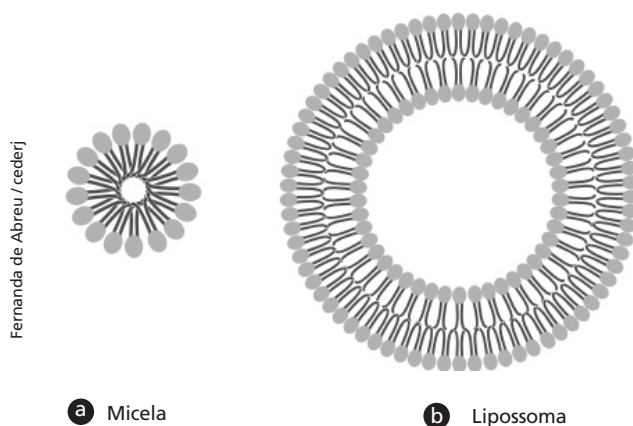


Figura 7.7: Os lipídeos anfipáticos podem se organizar em pequenas micelas (a) ou em lipossomas (b). Os segundos são maiores e fazem contato com a água tanto pelo lado interno quanto pelo externo.

Dessa maneira, os grupos apolares das extremidades também não ficam em contato com a água. Guardadas as devidas proporções, as micelas são semelhantes a bolhas de sabão, só que enquanto as bolhas de sabão ficam em contato com o ar (tanto por dentro quanto por fora), as micelas ficam em meio aquoso, além de serem muitíssimo menores.

OS FOSFOLIPÍDEOS

Os fosfolipídeos são formados por um grupo hidrofílico, composto por um esqueleto de glicerol com um radical fosfatado e uma cauda hidrofóbica, composta por duas cadeias de ácidos graxos de comprimento variável (14 a 24 carbonos). Uma dessas cadeias geralmente é saturada, isto é, não há duplas ligações entre os átomos de carbono, e a outra pode ser saturada ou insaturada (Figura 7.8).

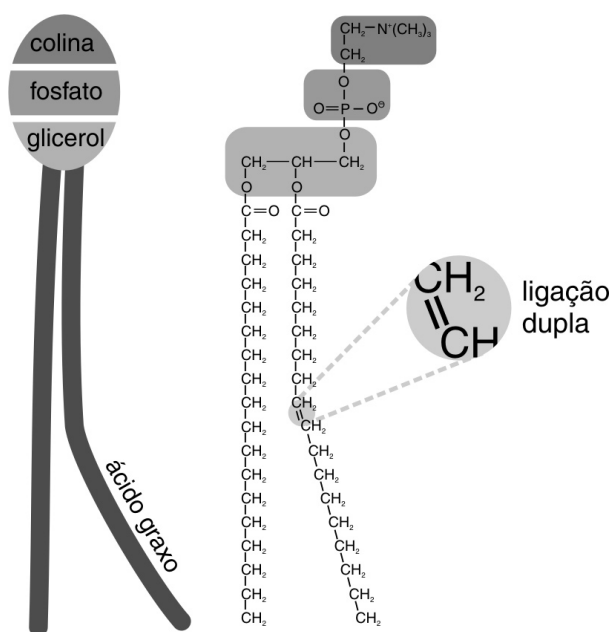


Figura 7.8: Os fosfolipídeos são formados por uma cabeça polar onde a um esqueleto de glicerol ligam-se um fosfato e um radical orgânico. A cauda apolar é formada por duas cadeias longas de ácidos graxos. Uma dessas pode ser insaturada.

Os fosfolipídeos podem variar quanto ao radical fosfatado da molécula (Figura 7.9), quanto ao comprimento das cadeias de ácidos graxos e quanto ao grau de insaturação dessas cadeias. Em geral, uma das cadeias de ácido graxo dos fosfolipídeos é saturada, e a outra não é.

OS FOSFOLIPÍDEOS

Quatro tipos de fosfolipídeos predominam nas membranas celulares dos mamíferos: **fosfatidilcolina**, **fosfatidilserina**, **esfingomielina** e **fosfatidiletanolamina**.

Sobre as particularidades de cada um, podemos dizer que:

- Apenas a **fosfatidilserina** é carregada negativamente em pH fisiológico.
- O **fosfatidilinositol** é um lipídeo minoritário, mas é o único que serve de âncora a proteínas, num arranjo descrito mais recentemente e de grande importância em vários processos celulares (veja aula de proteínas de membrana).
- Os fosfolipídeos não se distribuem simetricamente nas duas metades da membrana. Em eritrócitos humanos, por exemplo, a **fosfatidilcolina** e a **esfingomielina** se distribuem apenas na camada voltada para o meio externo, enquanto a **fosfatidilserina** e a **fosfatidiletanolamina** se localizam apenas na camada interna. Isso causa diferença de cargas entre a face interna e a face externa da membrana. Essa distribuição diferenciada dos fosfolipídeos é uma das causas da **assimetria** da membrana (Figura 7.10), uma característica que discutiremos mais adiante.

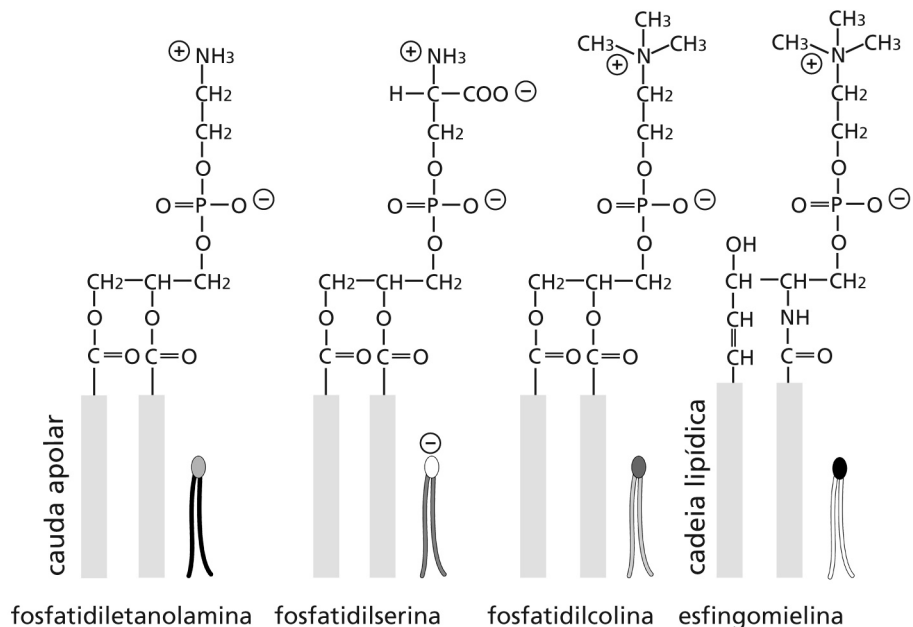
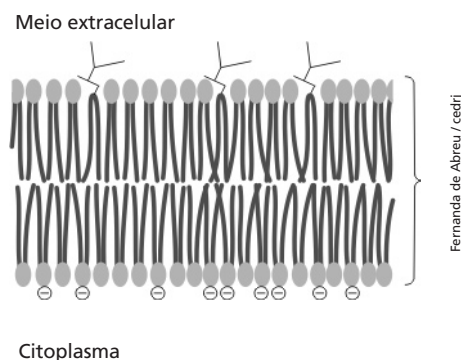


Figura 7.9: Principais tipos de fosfolipídeos encontrados nas membranas biológicas.

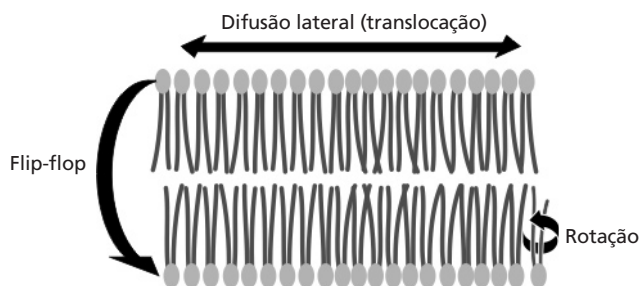
Figura 7.10: Assimetria dos fosfolípidos da membrana. Os fosfolípidos voltados para o meio extracelular não são idênticos aos voltados para o citoplasma.



A FLUIDEZ DA BICAMADA LIPÍDICA

Nas membranas naturais, os lipídeos podem se mover livremente no plano lateral da membrana (translocação), assim como rodar em torno de seu próprio eixo (rotação) (**Figura 7.11**). Essa propriedade é a essência da fluidez da membrana. Esses movimentos ocorrem o tempo todo e com uma rapidez incrível! Além disso, as cadeias carbônicas dos ácidos graxos também podem flexionar-se.

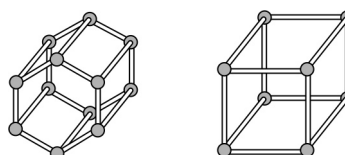
Figura 7.11: Os lipídios da membrana realizam movimentos de translocação e de rotação constantemente. O *flip-flop*, entretanto, só ocorre em situações específicas.



Por outro lado, é muito raro que um lipídeo mude de plano na bicamada, movimento denominado *flip-flop*. O *flip-flop* é comum no retículo liso e requer enzimas específicas e gasto de energia (você vai ver mais sobre isso na aula de retículo endoplasmático).

Cada fosfolídeo passa do estado líquido (fluido) para o estado *cristalizado* (gel) a uma determinada temperatura, a chamada **fase de transição**, que já foi determinada experimentalmente em membranas artificiais compostas por apenas um tipo de fosfolídeo.

Num cristal, as moléculas se dispõem de forma periódica e repetitiva, estabelecendo um padrão que pode ser cúbico, hexagonal etc.



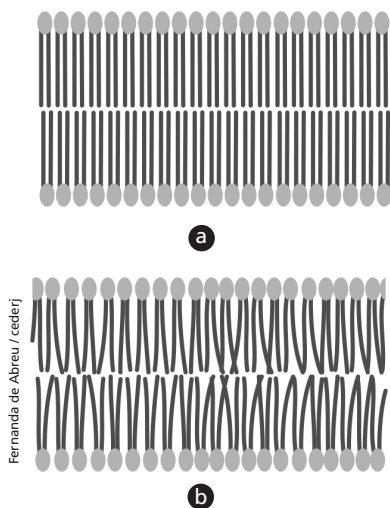


Figura 7.12: (a) Cadeias insaturadas, membranas mais fluidas; (b) cadeias saturadas, membrana menos fluida.

Como as membranas naturais são formadas de vários fosfolípidos diferentes misturados, elas não se cristalizam, mesmo quando em temperaturas próximas da fase de transição de alguns deles. Essa mistura é essencial, principalmente para células diretamente expostas a ambientes de temperatura muito variável.

A fluidez dos lípidos da membrana varia com o comprimento e com o número de duplas ligações da cadeia de ácidos graxos. A forma da cadeia insaturada implica um aumento da distância mínima entre esse fosfolípido e os que o rodeiam. Portanto, quanto maior a quantidade de fosfolípidos com cadeias insaturadas, maior será a fluidez da membrana (**Figura 7.12**). Entretanto, quanto mais longas as cadeias carbônicas, menos fluida é a membrana, porque duas cadeias longas colocadas lado a lado interagem mais, limitando a liberdade de movimento de cada uma.

Organismos simples, como bactérias e leveduras, são capazes de modular a síntese de fosfolípidos com mais duplas ligações quando a temperatura cai. Assim, a fluidez de sua membrana é mantida relativamente inalterada.

ESTERÓIS

O **colesterol** é o esteroide mais importante nas membranas biológicas. Na maioria das membranas dos eucariontes, há praticamente uma molécula de **colesterol** para cada molécula de fosfolípido. As moléculas de colesterol são pequenas, e sua estrutura, contendo anéis, é bastante rígida (**Figura 7.13**).

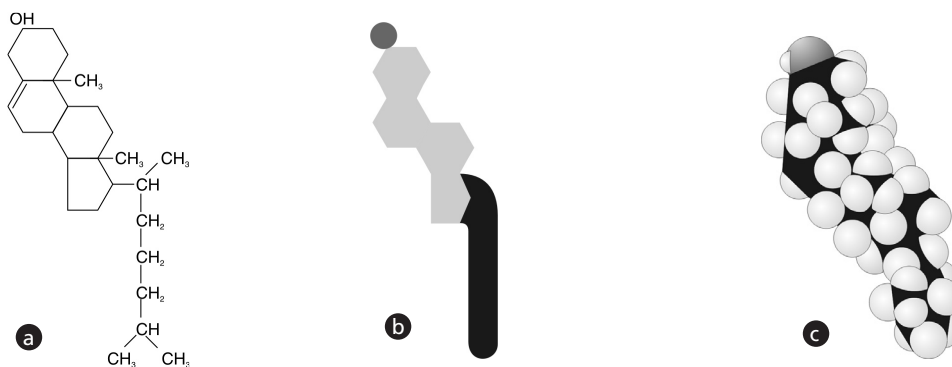
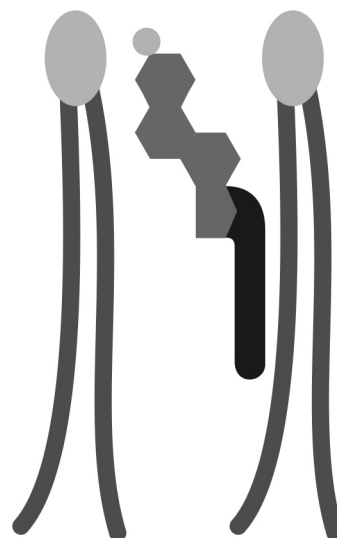


Figura 7.13: A estrutura do colesterol, com anéis aromáticos, torna a molécula bastante rígida. (a) fórmula plana, (b) fórmula esquemática, apontando em cinza médio a parte hidrofílica da molécula, em cinza claro os anéis carbônicos e em preto a cauda de hidrocarbonetos, (c) fórmula tridimensional onde o oxigênio da hidroxila aparece em cinza, os carbonos em preto e os hidrogênios em branco.

Elas se dispõem por entre as moléculas dos fosfolipídeos, conferindo maior rigidez à membrana e aumentando sua resistência à deformação. Assim, quanto mais ricas em colesterol, menos fluidas são as membranas, porque os anéis aromáticos do colesterol atrapalham o movimento das caudas dos fosfolipídeos, que são muito flexíveis. Se, por um lado, isso soa como uma desvantagem, por outro, a presença de colesterol entre as moléculas de fosfolipídeos dificulta sua cristalização em baixas temperaturas. Para haver a formação de um cristal, é preciso que os fosfolipídeos se aproximem muito, o que é dificultado pelo colesterol (Figura 7.14).

Figura 7.14: A molécula de colesterol, pequena e pouco flexível, se insere entre os fosfolipídeos, maiores e mais maleáveis. A “cabeça” polar do colesterol é muito pequena, apenas uma hidroxila, mas é ela que determina o posicionamento do colesterol na bicamada.



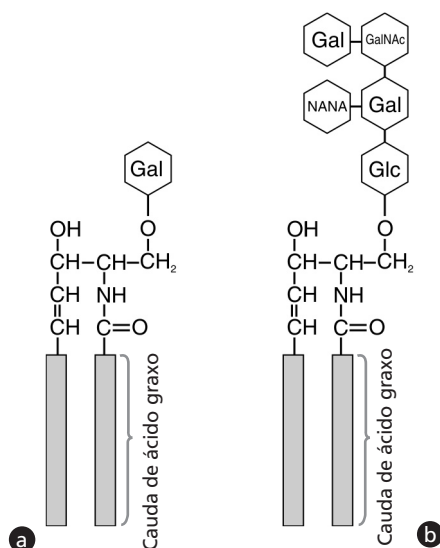
Isso representa uma grande proteção para organismos sujeitos a grandes variações de temperatura. Alguns microorganismos também variam a composição lipídica de suas membranas de acordo com a temperatura do ambiente.

Além do colesterol, as membranas de fungos, plantas e alguns protozoários podem conter outros esteróis, como o ergosterol.

OS GLICOLIPÍDEOS

Os glicolipídeos, como o próprio nome indica, resultam da associação (por meio de uma molécula de glicerol) entre um glicídio, que compõe a porção hidrofílica da molécula, e duas cadeias de ácidos graxos (Figura 7.15).

Figura 7.15: Nos glicolipídeos, a porção hidrofílica da molécula é formada por uma (a) ou mais (b) moléculas de açúcares, incluindo muitas vezes o ácido siálico (NANA), que confere carga negativa à molécula.



Há glicolípídeos apenas no lado da membrana voltado para o meio extracelular. Esses lipídeos apresentam uma forte tendência a se associar, em parte devido a pontes de hidrogênio que se formam entre as moléculas de açúcares, mas também graças às forças de van der Waals entre as cadeias carbônicas de suas longas caudas lipídicas. Por essas características – localização e tendência à agregação, esses lipídeos aumentam ainda mais a assimetria entre os dois folhetos da bicamada.

Os glicolípídeos mais complexos são os **gangliosídeos** (Figura 7.15b) que, por possuírem resíduos de ácido siálico, são negativamente carregados. Os gangliosídeos são especialmente abundantes na membrana plasmática das células nervosas, mas também estão presentes em outros tipos celulares.

Uma célula que exponha muitos glicolípídeos na superfície de sua membrana ficará mais protegida do ataque de ácidos ou enzimas que possam atingir sua superfície. Isto é especialmente importante em compartimentos como o lisossoma (Aula 20), cujas membranas não podem ser destruídas pelas enzimas ali contidas. Em contrapartida, a grande diversidade de combinações possíveis para os açúcares expostos é fundamental em processos de reconhecimento entre células.

A bactéria causadora do cólera reconhece e só penetra em células que exponham um determinado tipo de glicolípídeo em sua superfície. Sua entrada em células do epitélio intestinal desencadeia uma reação que leva a célula a perder grande quantidade de sódio e água, resultando na diarreia característica da doença.

DOMÍNIOS LIPÍDICOS

Que em vários tipos celulares cada região da membrana poderia ter composição, forma e função diferentes, já era sabido há muito tempo. Esse é, em essência, o conceito de **domínio de membrana**, uma região da membrana diferente das demais, com características próprias. Por exemplo, por que a região apical das células do epitélio intestinal possui microvilosidades e a superfície basal e lateral destas células é lisa (Figura 7.4)? Por que os neurônios recebem estímulos pela região do corpo celular e os transmitem apenas na extremidade do axônio?

Inicialmente, verificou-se que cada domínio poderia conter proteínas de membrana diferentes, mas não se sabia o que mantinha essas proteínas restritas a essas regiões. A resposta foi obtida há alguns

anos, quando foi descoberto que algumas regiões da bicamada lipídica têm fluidez menor que o resto da bicamada que as cerca. Esta menor fluidez é resultante da aglomeração de fosfolípideos de cadeias longas – especialmente esfingomielina e colesterol nessas regiões. As caudas de ácidos graxos desses lipídeos se emaranham, formando assim um conjunto que não se mistura com o resto e se move em conjunto, como se fosse uma jangada flutuando no mar. Nessa comparação, a jangada seria o conjunto de lipídeos de menor fluidez (ou seja, com menor liberdade de se misturar aos outros), e o mar em volta seria todo o resto da membrana. Por esta razão, as plataformas lipídicas foram denominadas *lipid rafts*, pois *raft* significa jangada, em inglês. O maior comprimento das cadeias de ácidos graxos desses lipídeos aumenta a espessura da bicamada nessas regiões, formando verdadeiras **plataformas lipídicas** (Figura 7.16), denominação que adotaremos neste texto.

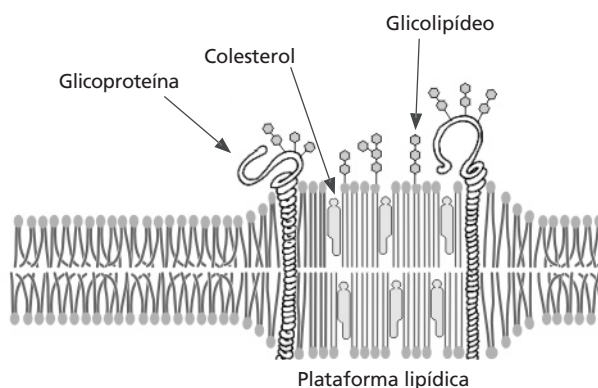


Figura 7.16: As plataformas lipídicas são regiões da membrana onde se concentram lipídeos de cadeias longas, especialmente do tipo esfingolípideos e colesterol. Conseqüentemente, a bicamada nessas regiões é mais espessa, menos fluida, e só proteínas com determinada extensão podem se inserir ali.

Sabemos hoje que as plataformas lipídicas ocorrem em praticamente todos os tipos celulares, mantendo próximos elementos da membrana, como proteínas, por exemplo, que participam de um mesmo conjunto de reações (veja a Aula 13) ou função. Como a espessura da bicamada nas plataformas é maior, apenas alguns tipos de proteínas conseguem se *encaixar* nessas regiões. Sabe-se também que, ao contrário do que se acreditava inicialmente, essas plataformas lipídicas não ficam necessariamente *navegando à deriva* pela membrana. A superfície apical das células do epitélio intestinal, por exemplo, é basicamente uma região de plataformas lipídicas. Um outro tipo de plataforma lipídica, que não se desloca e forma uma pequena invaginação permanente na membrana plasmática, recebeu o nome de cavéola (Figura 7.17). Nas cavéolas concentram-se receptores de um tipo pouco comum, os ancorados (veja na Aula 8).

Tornaremos a falar dos domínios de membrana, incluindo a participação das proteínas, nas aulas seguintes.

Figura 7.17: As setas apontam as cavéolas na membrana de uma célula de tireóide humana.

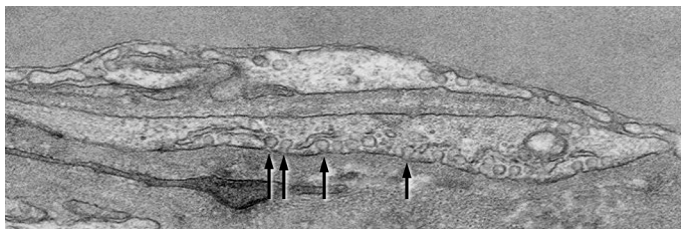


Foto: Márcia Attias

CONCLUSÃO: A IMPORTÂNCIA DA ASSIMETRIA DA BICAMADA LIPÍDICA

Embora a bicamada lipídica seja representada em muitos esquemas didáticos de maneira simétrica e uniforme (com os dois folhetos idênticos), você viu, nesta aula, que seus componentes podem constituir domínios de membrana. Além disso, os dois folhetos são bastante distintos, a começar pela presença de glicolipídeos (e também glicoproteínas) apenas no folheto voltado para o meio extracitoplasmático, enquanto a fosfatidilserina, um fosfolípido negativamente carregado, insere-se apenas no folheto voltado para o meio intracelular. E o que acontece quando esta disposição é perturbada? No caso da fosfatidilserina, observa-se que em células que possuem um tempo de vida limitado, como é o caso das hemácias e dos leucócitos, o aparecimento desse fosfolípido no folheto externo da membrana sinaliza que a célula está morrendo e é um dos fatores pelos quais elas são reconhecidas pelos fagócitos responsáveis por removê-las. Esse processo de morte celular programada, ou apoptose, será estudado na disciplina Biologia Celular 2.

RESUMO

- A estrutura das membranas é constituída por lipídeos das classes dos fosfolipídeos, glicolipídeos e esteróis.
- Os lipídeos que formam a membrana são anfipáticos. Distribuem-se em bicamada, com a parte hidrofílica de sua molécula voltada para o meio aquoso, extracelular ou citoplasmático, e a parte hidrofóbica voltada para o interior da membrana.
- Cada camada da bicamada é chamada de folheto.
- As membranas são assimétricas porque os fosfolipídeos que compõem os seus folhetos são diferentes.

- As membranas são fluidas porque os lipídeos que as compõem movem-se o tempo todo, fazendo flexão das cadeias de ácidos graxos, rotação, translocação e, raramente, *flip-flop*.
- Existem regiões menos fluidas na bicamada lipídica, as plataformas lipídicas, ricas em ácidos graxos de cadeia longa e colesterol.
- Regiões diferenciadas em termos de composição lipídica, função e fluidez das membranas constituem domínios de membrana.

EXERCÍCIOS

1. Descreva de modo sucinto o modelo do mosaico fluido da membrana.
2. Defina e diferencie meio intracelular e meio extracelular.
3. O que você entende por compartimento celular?
4. Como se organizam os lipídeos nas membranas?
5. O que você entende por fluidez dos lipídeos da membrana?
6. Que tipos de movimento realizam os lipídeos na membrana?
7. O que é *flip-flop*? Quando ocorre?
8. Como atuam os seguintes fatores sobre a fluidez da membrana:
 - a) comprimento das cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos?
 - b) duplas ligações nas cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos?
9. Por que o colesterol diminui a fluidez da membrana?
10. Descreva a assimetria da bicamada lipídica.
11. Como podem os lipídeos formar domínios na membrana?
12. O que são as plataformas lipídicas?

Proteínas de membrana

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de:

- Reconhecer as diferentes proteínas e carboidratos de membrana de acordo com:
 - sua função (transporte, reconhecimento e adesão etc.);
 - sua inserção na bicamada lipídica (unipasso, multipasso, ancorada, periférica etc.);
 - sua organização em domínios de membrana.

Pré-requisitos

Aulas de 11 a 16 de Proteínas (Bioquímica I).



INTRODUÇÃO

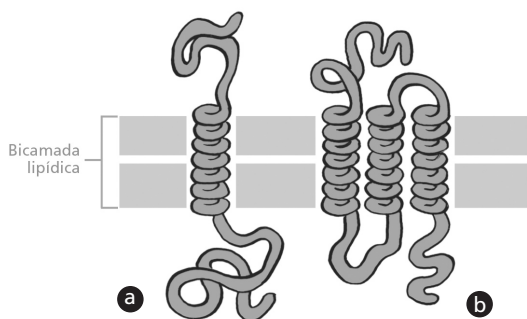
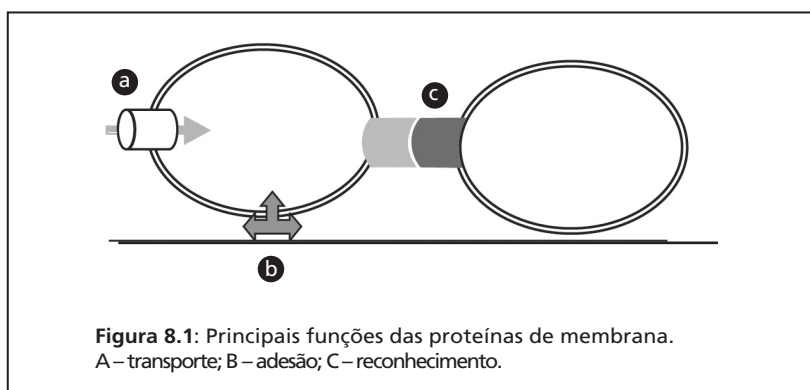
A estrutura básica de todas as membranas biológicas é formada por uma bicapa lipídica; entretanto, são as **proteínas** que conferem individualidade e especificidade às membranas celulares.

As funções desempenhadas por cada membrana (transporte, reconhecimento, adesão, veja **Figura 8.1**) dependem primariamente de suas proteínas constituintes.

As proteínas correspondem, em média, a cerca de 50% da massa de uma membrana, podendo chegar a 75%, no caso da membrana mitocondrial interna.

A técnica da criofratura (veja Aula 3) permitiu, pela primeira vez, observar que as proteínas de membrana se distribuem na bicamada lipídica ora atravessando-a de um lado ao outro, ora inserindo-se apenas no folheto externo ou interno da bicapa.

Assim, na descrição clássica do **modelo do mosaico fluido**, as proteínas da membrana são classificadas em dois grupos: **transmembrana**, quando atravessam a matriz lipídica; **periféricas**, quando se encontram associadas a outras proteínas integrais ou lipídeos da membrana.



MODOS DE INSERÇÃO DE UMA PROTEÍNA NA MEMBRANA

Decorridos quase 30 anos da proposição do modelo do mosaico fluido das membranas, sabe-se hoje que uma proteína pode inserir-se na bicapa lipídica de várias formas:

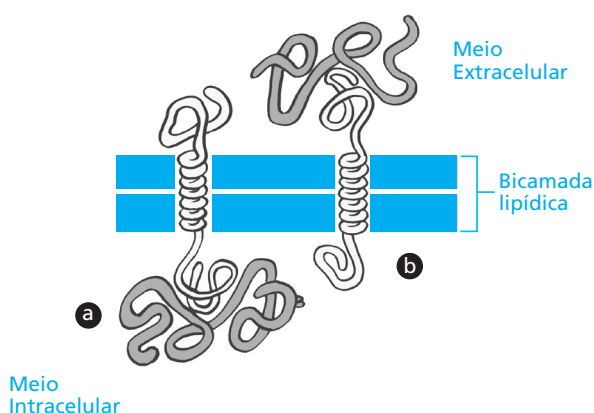
1. As proteínas transmembrana atravessam a bicapa lipídica de um lado a outro, expondo parte de si de cada lado da membrana (**Figura 8.2**).

Algumas proteínas atravessam apenas uma vez a bicamada e são chamadas **unipasso** (Figura 8.2A), enquanto as que passam muitas vezes pela bicamada são chamadas **multipasso** (Figura 8.2B). Muitas vezes, as proteínas multipasso criam em seu interior um ambiente hidrofílico que pode atuar como um “poro” transmembrana.

2. Há proteínas que se associam à membrana de modo indireto, ou seja, formam ligações não covalentes com proteínas transmembrana (Figura 8.3). Estas correspondem às proteínas periféricas inicialmente descritas no modelo do mosaico fluido.

! A proteína que transporta glicose para dentro das células é do tipo multipasso, assim como a bomba de sódio/potássio.

Figura 8.3: As proteínas periféricas ligam-se a proteínas inseridas na bicamada, seja pelo lado intracelular (a) ou pelo lado extracelular (b).



3. Outras proteínas de membrana se prendem à bicamada apenas por uma ligação covalente a um dos lipídeos da membrana. Estas são chamadas de **proteínas ancoradas** (Figura 8.4 A e B).

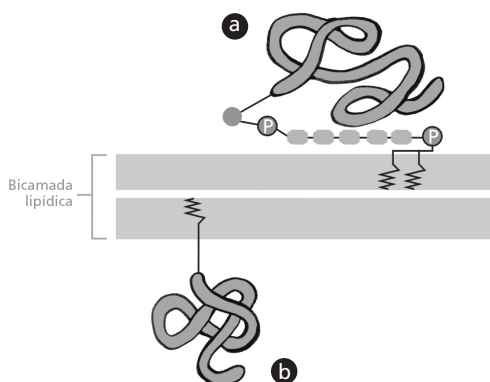


Figura 8.4: As “âncoras” que prendem as proteínas pelo lado citoplasmático (b) são diferentes daquelas do lado extracelular (a).



As âncoras de membrana podem ser de vários tipos, específicos para o lado citoplasmático ou para o lado extracelular da membrana. Proteínas ligadas covalentemente a lipídeos podem ser encontradas no folheto citoplasmático. Proteínas ancoradas via **glicosil-fosfatidil-inositol (GPI)**, só existem na face da membrana voltada para o meio extracelular. A proteína ancorada por GPI se prende sempre ao fosfolípido fosfatidilinositol, tendo como ponte entre a proteína e o fosfolípido uma seqüência de açúcares, que é sempre a mesma, uma etanolamina. É interessante como uma mesma estrutura está presente na ligação de proteínas tão diferentes à membrana.

As proteínas podem ser separadas dos folhetos lipídicos da membrana por meios mais ou menos drásticos, de acordo com seu modo de inserção nesta. As proteínas do tipo 1 (transmembrana) podem ser isoladas da membrana com o uso de detergentes que solubilizam a bicamada lipídica (**Figura 8.5**).

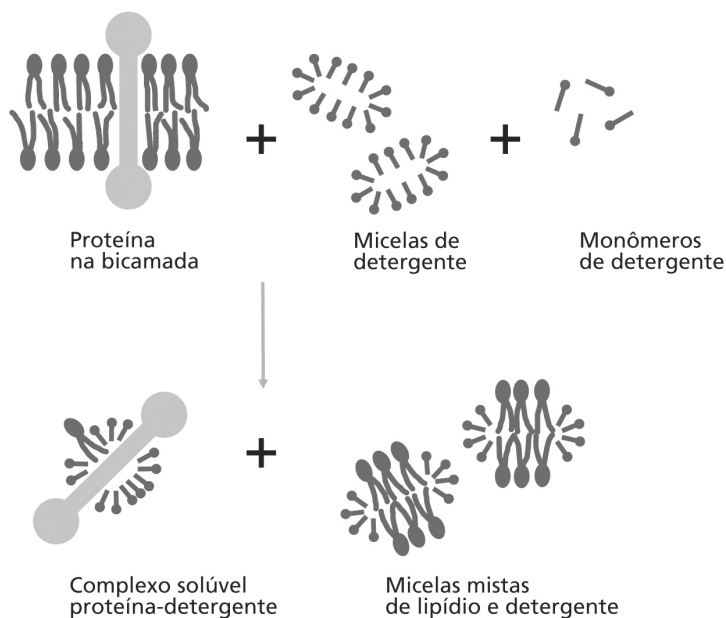


Figura 8.5: As proteínas que atravessam integral-mente a bicamada lipídica podem ser isoladas pelo tratamento com detergentes que se ligam aos lipídeos, separando-os das proteínas.

Já as proteínas do tipo 2 se soltam facilmente. Tratamentos brandos, como o uso de soluções que alteram o pH e/ou a força iônica são suficientes para romper as forças que as mantêm presas à membrana (**Figura 8.6**).

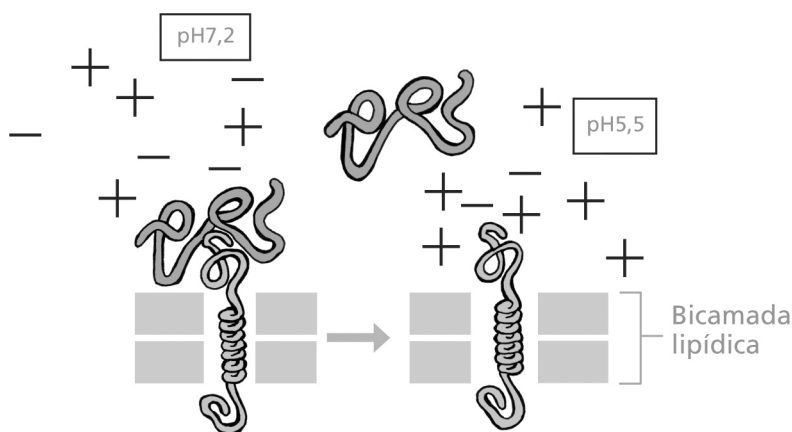


Figura 8.6: Proteínas que se ligam por carga a outros componentes da membrana podem se soltar da mesma, se a força iônica da solução onde se encontram for drasticamente alterada.

Finalmente, as do tipo 3 só podem ser removidas pelo uso de enzimas específicas da família das fosfolipases, que “cortam” as âncoras, deixando as proteínas livres.

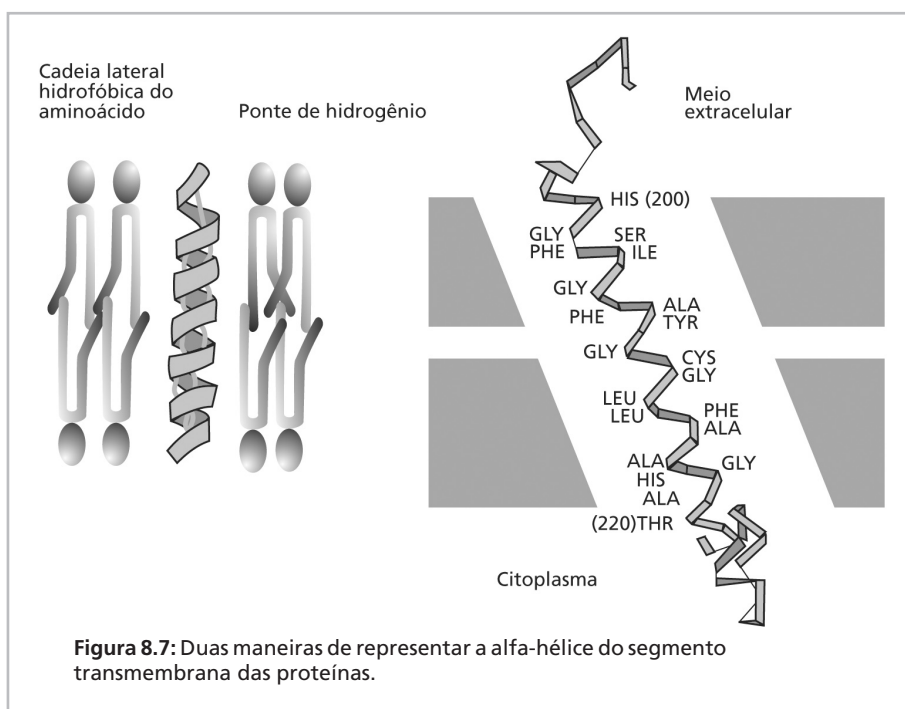
Assim, as proteínas também podem ser classificadas pela dificuldade de sua extração da membrana plasmática. As do tipo 1, transmembrana, e as do tipo 3, ancoradas, são consideradas proteínas **integrais** da membrana plasmática, enquanto as do tipo 2, fáceis de extrair, são consideradas **periféricas**.



Protozoários parasitas como o *Trypanosoma brucei* (agente da doença do sono) e o *Plasmodium* (causador da malária) periodicamente secretam a enzima **fosfolipase-c** específica para **fosfatidil inositol**. Dessa forma, todas as proteínas ancoradas por GPI na superfície deles são rapidamente eliminadas e os protozoários se tornam “invisíveis” para os anticorpos já produzidos pelo hospedeiro.

COMO AS PROTEÍNAS ATRAVESSAM A BICAMADA LIPÍDICA?

As porções de uma proteína de membrana que se voltam para o citoplasma ou para o meio extracelular são naturalmente hidrofílicas. Entretanto, o segmento da cadeia polipeptídica que atravessa a bicamada lipídica precisa passar por um ambiente hidrofóbico que, a princípio, seria “hostil”. Esse segmento é composto principalmente por aminoácidos cujas cadeias laterais são hidrofóbicas, podendo, portanto, ficar voltadas para as moléculas apolares (= hidrofóbicas) adjacentes. Em contrapartida, os laços peptídicos da cadeia são normalmente hidrofílicos, ficando voltados para o centro, onde formam pontes de hidrogênio uns com os outros. Isso leva a cadeia polipeptídica a enrolar-se em torno de um eixo imaginário, formando uma alfa-hélice (Figura 8.7).



O que são as proteínas unipasso?

Se você estiver se perguntando que tipos de proteína têm essa *configuração*, a resposta é: principalmente proteínas que atuam como receptores. (Por quê? Veja aula de receptores.) Já as proteínas multipasso criam um microambiente hidrofílico na membrana através da qual podem passar (= ser transportadas) moléculas específicas (veja as aulas de Transporte, 9 a 12).

NEM TODAS AS PROTEÍNAS ATRAVESSAM A BICAMADA FORMANDO UMA HÉLICE

Mais raramente, as cadeias polipeptídicas não se enrolam em alfa-hélice, mas adquirem uma conformação em fita beta-pregueada, curvando-se em idas e vindas através da bicamada e originando uma estrutura em canal relativamente rígida chamada *beta-barril*. As *porinas* são proteínas que possuem essa conformação e são encontradas na membrana externa das mitocôndrias e de algumas bactérias, sendo responsáveis pela passagem de pequenas moléculas nutrientes e íons (**Figura 8.8**). Além de serem relativamente pouco seletivos, esses poros são muito menos versáteis do que as composições possíveis com as proteínas em alfa-hélice.

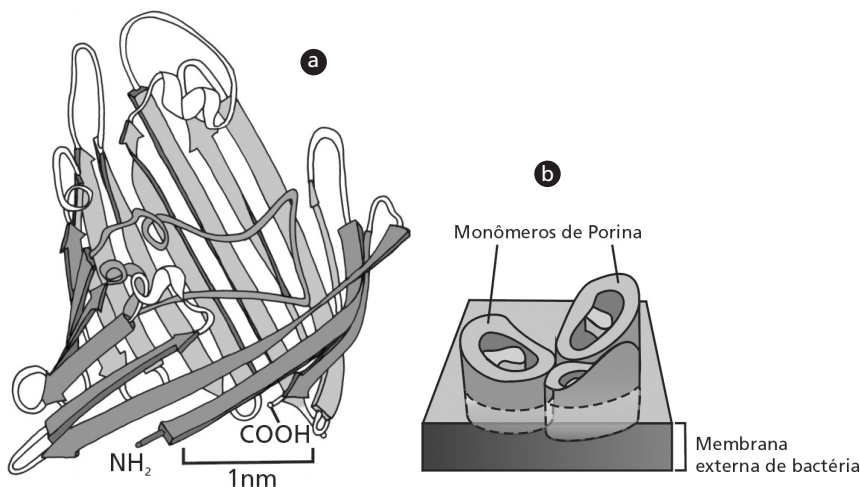
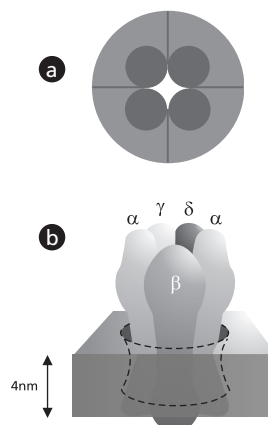


Figura 8.8: (a) conformação em beta-barril. As cadeias de aminoácidos formam fitas relativamente rígidas; (b) porinas, formando canais na membrana de bactérias.

AS PROTEÍNAS SE ASSOCIAM EM COMPLEXOS PROTÉICOS

Além de criarem um ambiente hidrofílico através das proteínas multipasso, muitas proteínas ainda formam **complexos** na membrana. Algumas vezes, todas as proteínas componentes do complexo são iguais (**Figura 8.9A**). Outros complexos são formados por proteínas diferentes (**Figura 8.9B**). Esses complexos protéicos também formam uma área hidrofílica pela qual podem passar moléculas como íons ou açúcares, que normalmente são barrados pela bicamada lipídica.

Figura 8.9: (a) Proteínas se associam formando um complexo em que todas as subunidades são iguais. (b) O receptor de acetilcolina é um complexo protéico em que as subunidades não são iguais.



AS PROTEÍNAS TAMBÉM SE MOVEM

Assim como os lipídeos, as proteínas de membrana também são capazes de girar em torno de seu próprio eixo (**rotação**) e de deslocar-se no plano da membrana (**difusão lateral**). O *flip-flop* de proteínas não ocorre nunca. A comprovação dos movimentos laterais foi obtida em 1970 por Frye e Edidin em experimentos com heterocárions (uma célula híbrida com dois núcleos diferentes). Eles fabricaram anticorpos que reconheciam as proteínas da superfície de células de camundongo e marcaram esses anticorpos com fluorocromo verde. Também fabricaram anticorpos que só reconheciam as proteínas da superfície de células humanas e os marcaram com fluorocromo vermelho. Depois fizeram um experimento em que fundiam uma célula de camundongo com uma célula humana. Isso não acontece espontaneamente e é difícil conseguir. Hoje já se conhecem substâncias que induzem a fusão de células diferentes e isso é usado na produção de anticorpos monoclonais (veja Aula 4). No

tempo de Frye e Edidin, só se podia fazer fusão entre células diferentes com a ajuda de vírus, e foi o que eles fizeram, obtendo um heterocácion. Depois incubaram o heterocácion com os anticorpos, a baixa temperatura, e olharam no microscópio de fluorescência. Ele tinha metade da membrana fluorescendo em verde e metade em vermelho, correspondendo às proteínas de membrana que vieram das células de camundongo e humana, respectivamente. Resolveram colocar o heterocácion já marcado com os anticorpos na temperatura fisiológica por alguns minutos e olharam de novo: as fluorescências tinham se misturado completamente, não sendo mais possível distinguir verde e vermelho.

Assim, ficou demonstrado que as proteínas podem se mover no plano da membrana plasmática e que a membrana é fluida (**Figura 8.10**).

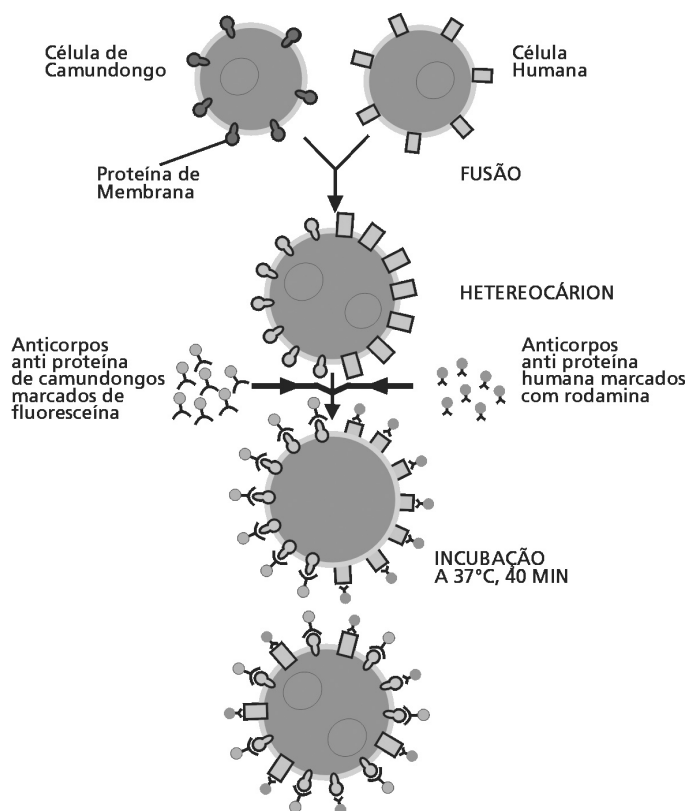


Figura 8.10: Esquema do experimento que comprovou a fluidez da membrana.

MECANISMOS DE RESTRIÇÃO À MOBILIDADE DAS PROTEÍNAS: BARREIRAS E DOMÍNIOS

Tem sido observado que muitas proteínas não se difundem livremente no plano da membrana. A membrana plasmática se divide em várias áreas, chamadas **domínios**, entre as quais podem existir **barreiras**. Essa restrição é interessante por vários motivos: algumas células, como as do epitélio intestinal, possuem, na superfície voltada para a luz do órgão, proteínas que garantem a absorção dos nutrientes num só sentido; outras, como os espermatozoides, possuem proteínas específicas na região da cabeça (que fará contato com o óvulo) que não estão presentes na cauda e vice-versa. Os mecanismos básicos que restringem a mobilidade das proteínas no plano da membrana são:

1. **Formação de complexos:** várias proteínas se associam formando complexos. Esses complexos protéicos só podem se deslocar como um todo. Alguns complexos são formados por diferentes proteínas, enquanto outros resultam do agrupamento de proteínas semelhantes (**Figura 8.11A**).

2. **Associação ao citoesqueleto ou à matriz extracelular:** algumas proteínas têm sua mobilidade lateral limitada por estarem associadas a macromoléculas do meio extra ou intracelular como elementos da matriz extracelular e do citoesqueleto, respectivamente (**Figura 8.11B,C**).

3. **Ligação entre proteínas:** as proteínas de duas células adjacentes podem ligar-se, limitando assim a mobilidade de ambas. A adesão entre células ou entre uma célula e o substrato, por exemplo, é formada pela união dos complexos protéicos das duas células vizinhas ou de uma célula e uma molécula do meio extracelular (veja aula de Junções Celulares) (**Figura 8.11D**).

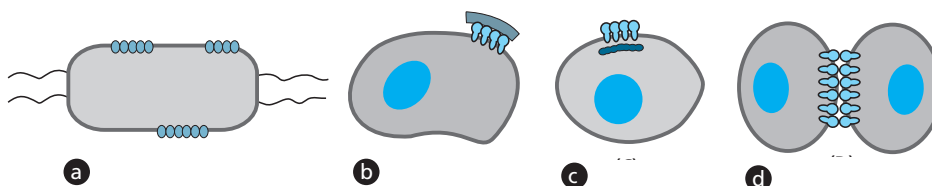
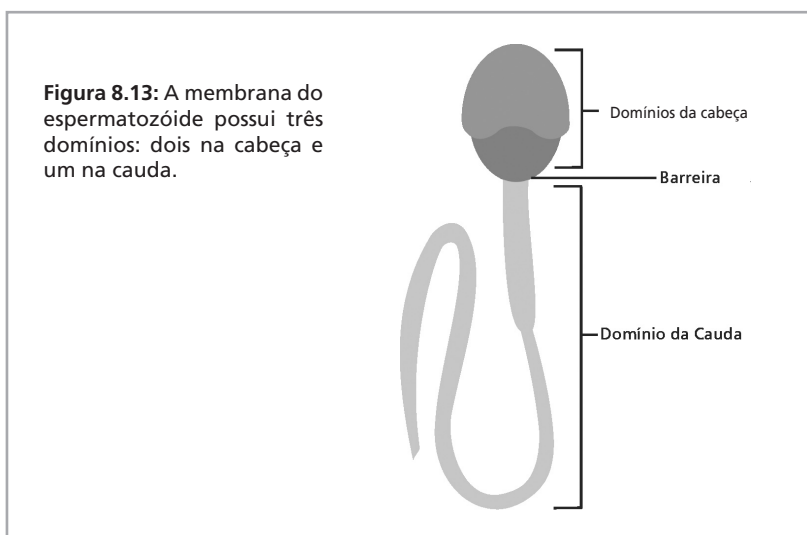
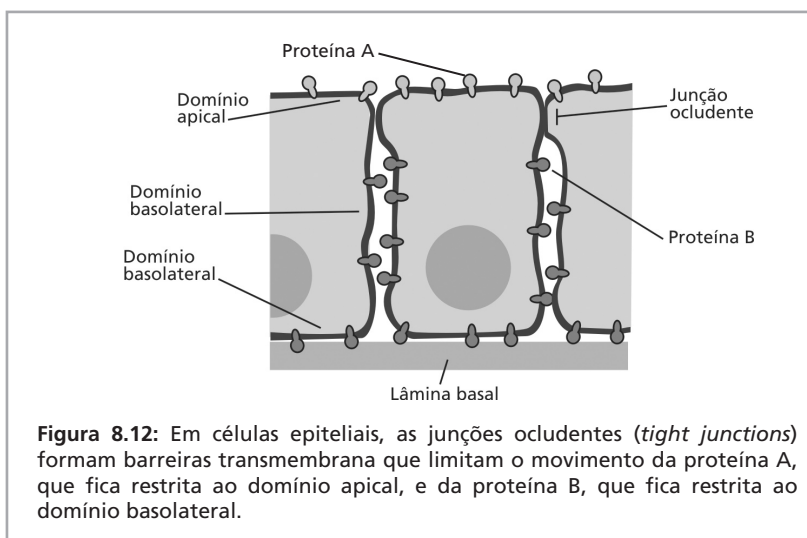


Figura 8.11: Mecanismos de restrição à mobilidade lateral das proteínas de membrana:

- (a) formação de agregados,
- (b) associação a elementos do meio extracelular,
- (c) associação a elementos do citoesqueleto e
- (d) formação de complexos de interação entre as proteínas de duas células.

FORMAÇÃO DE BARREIRAS

Alguns domínios são consequência da existência de **barreiras**. As barreiras são formadas por arranjos de proteínas que impedem a livre difusão de outras proteínas ou lipídeos entre elas. As proteínas se difundem livremente dentro de um determinado domínio; entretanto, não passam aos domínios vizinhos por não serem capazes de cruzar as barreiras. As junções entre células que formam epitélios (**Figura 8.12**) constituem barreiras. As proteínas existentes no corpo celular do espermatozóide também não são encontradas no flagelo deste pela existência de uma barreira que restringe sua mobilidade e divide esses dois domínios (**Figura 8.13**).



OS CARBOIDRATOS DE MEMBRANA

Correspondem aos açúcares. Grande parte dos lipídeos e das proteínas de membrana voltados para o meio extracelular apresenta-se ligado a carboidratos, formando **glicoproteínas** ou **glicolipídeos**. Há ainda um terceiro tipo de carboidratos: são as **proteoglicanas**, que geralmente são encontradas na matriz extracelular (serão abordadas em maior detalhe em Biologia Celular 2), mas algumas se inserem na bicamada lipídica por parte de sua porção protéica ou por meio de uma âncora do tipo GPI.

O conjunto de carboidratos da membrana forma o chamado **glicocálix** ou *cell-coat*. Quanto mais carboidratos contiver uma membrana, mais espesso será o glicocálix (**Figura 8.14**).

Além de estarem sempre ligados a uma proteína ou a um lipídio na membrana plasmática, os açúcares estão sempre voltados para o meio extracelular (**Figura 8.15**).

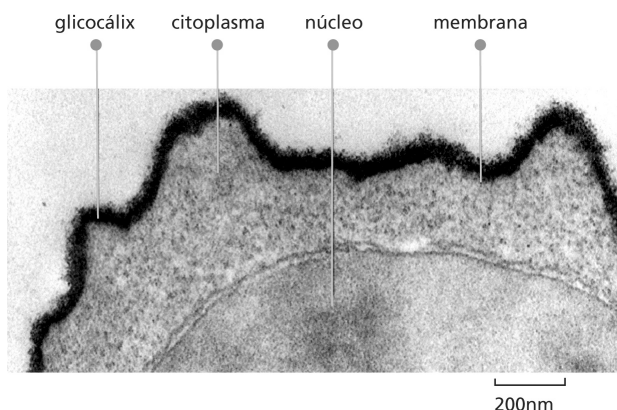


Figura 8.14: Fotomicrografia da periferia de uma célula cujo glicocálix foi evidenciado por uma técnica específica.

DE: ALBERTS, Bruce et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4.ed. Nova York: Garland Science Publishing, 2002.

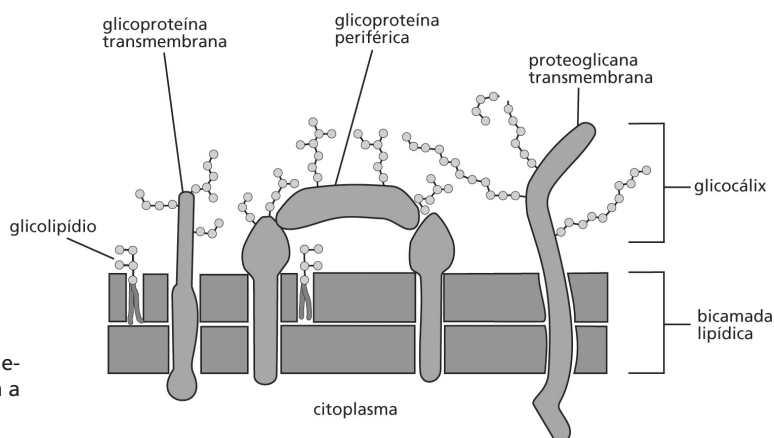


Figura 8.15: Esquema dos componentes do glicocálix e sua relação com a bicamada lipídica.

Isso é uma consequência do seu processo de síntese no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (veja aulas correspondentes). As enzimas que acrescentam os açúcares a uma proteína ou a um lipídio durante sua síntese se localizam no interior dessas organelas e vão anexando os carboidratos a proteínas ou lipídios que estão inseridos no folheto da membrana voltado para o lúmen, evidentemente. Ao chegar à superfície, esse folheto estará voltado para o meio extracelular (**Figura 8.16**).

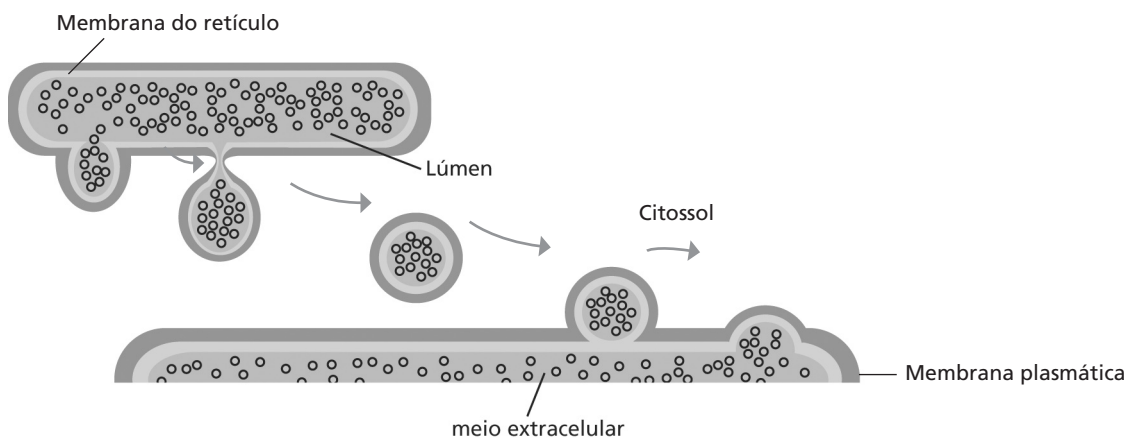


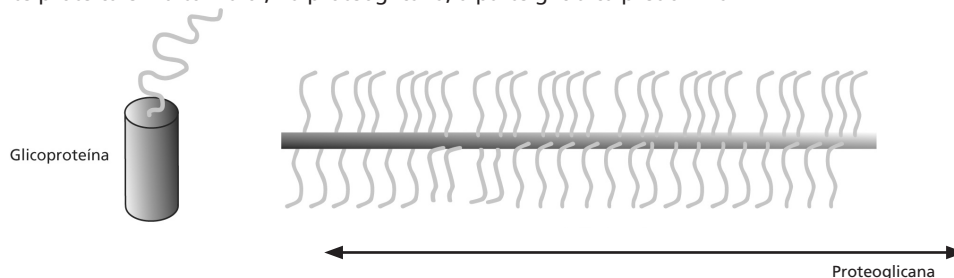
Figura 8.16: Correspondência espacial entre o meio extracelular e o interior (lúmen) das organelas.

QUAL A FUNÇÃO DOS AÇÚCARES NA MEMBRANA?

Na superfície celular, os açúcares exercem muitas funções, dentre as quais podemos destacar a de proteger a bicamada lipídica, conferir carga negativa à superfície celular como um todo e atuar em processos de reconhecimento e adesão celular, o que você vai conhecer com mais detalhes em outras aulas.

Além disso, os espaços entre as células são freqüentemente preenchidos por açúcares de tipos especiais como, por exemplo, a celulose, que forma a parede celular dos vegetais. A celulose, como você provavelmente sabe, é formada pela polimerização de moléculas de glicose. O tecido conjuntivo e a cartilagem também possuem grandes quantidades de carboidratos, as **proteoglicanas**. As proteoglicanas são moléculas muito longas e ramificadas que atuam como verdadeiras “esponjas”, ajudando na retenção de água por esses tecidos.

Proteoglicanas diferem de **glicoproteínas** em algumas características: as glicoproteínas têm uma cadeia ramificada de monossacarídeos diferentes ligados a uma proteína. Já as proteoglicanas têm longas cadeias lineares de dissacarídeos repetidos ligados a uma proteína. A relação em massa entre a cadeia de açúcares e a cadeia protéica também é diferente: enquanto na glicoproteína a parte protéica é muito maior, na proteoglicana, a parte glicídica predomina.



RESUMO

- As membranas celulares formam barreiras que confinam moléculas e atividades específicas a esses compartimentos.
- As funções de uma membrana dependem principalmente das proteínas que a compõem.
- Nas membranas podem estar presentes proteínas cuja função seja de reconhecimento, transporte, adesão, enzimas etc.
- As proteínas transmembrana atravessam toda a extensão da bicamada lipídica, geralmente como uma ou mais alfa-hélices ou como uma fita beta-pregueada em forma de barril.
- Outras proteínas não atravessam a bicamada, mas formam ligações covalentes com lipídeos da membrana. Outras ainda formam ligações fracas (não covalentes) com outras proteínas da membrana.
- A maior parte das proteínas e alguns dos lipídeos voltados para o lado externo da membrana apresentam cadeias de açúcar ligadas. Esses açúcares ajudam a proteger e a lubrificar a superfície da célula e estão relacionados a processos de reconhecimento célula-célula.
- Embora muitas proteínas possam difundir-se livremente no plano da mesma, as células têm meios de confinar certas proteínas a determinados domínios da membrana, imobilizando-as através de ligações a macromoléculas localizadas dentro ou fora da célula.

EXERCÍCIOS

1. Por que a criofratura foi fundamental para se saber como as proteínas se inserem na bicamada lipídica.
2. Defina os seguintes conceitos:
 - proteína transmembrana
 - proteína periférica
 - proteína ancorada
 - α -hélice proteica e fita β -pregueada
 - proteína unipasso
 - proteína multipasso
 - porinas
 - complexo proteico
3. Quais os tipos de movimento que as proteínas podem fazer na membrana?
4. O que é um heterocárion?
5. O que são domínios de membrana?
6. O que são barreiras de membrana?
7. Como os açúcares se ligam às membranas?
8. O que é glicocálix?
9. Diferencie glicoproteínas de proteoglicanas.
10. Por que todos os carboidratos de membrana se localizam na face extracelular da mesma?

Permeabilidade da membrana

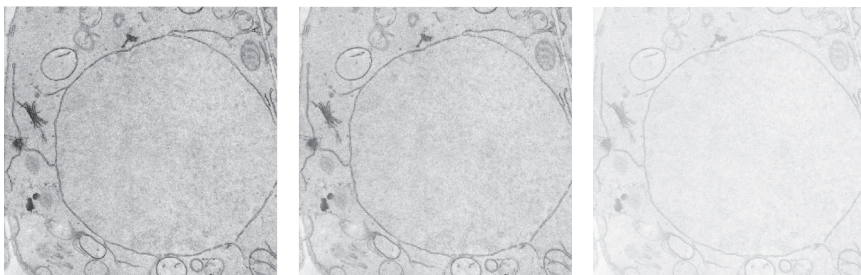
objetivos

Ao final desta aula, você deverá reconhecer:

- A importância do transporte através das membranas.
- A permeabilidade de uma bicamada lipídica.
- Osmose.

Pré-requisito

Estrutura de proteínas (Bioquímica I)



INTRODUÇÃO

Sabemos que a membrana plasmática funciona como uma barreira, separando o ambiente intracelular do meio externo. Entretanto, as células interagem durante toda sua vida com o meio externo, seja na absorção do oxigênio de que necessitam para a respiração celular e conseqüente liberação do gás carbônico, seja na obtenção de íons e moléculas maiores, como a glicose e outros açúcares.

Estamos acostumados a nos referir à membrana como dotada de **permeabilidade seletiva**, mas o que será isso? Será que cada célula é capaz de “escolher” as moléculas que passam pela membrana?

Bom, você já deve ter percebido que a passagem de moléculas através da membrana obedece a certos critérios. Esses critérios são universais e independem do tipo de célula ou da atividade que ela esteja exercendo, estando vinculados à natureza lipídica da membrana.

Recordando:

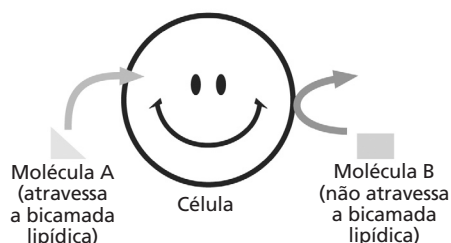
As membranas celulares são compostas por uma bicamada de lipídeos, onde estão inseridas proteínas. Enquanto as proteínas variam muito de acordo com as atividades específicas dos diferentes tipos celulares, os lipídeos são, além de majoritários, praticamente os mesmos nas membranas plasmáticas das diferentes células. Os lipídeos podem ser definidos como moléculas hidrofóbicas não carregadas, embora os fosfolipídeos e mesmo o colesterol nas membranas possuam uma extremidade hidrofílica em suas moléculas.



Se o texto acima lhe parece confuso, volte à Aula 7.

A PERMEABILIDADE SELETIVA DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A chave para compreendermos a natureza da *permeabilidade seletiva* das membranas está justamente na natureza da bicamada lipídica. A “seleção” das moléculas que atravessam a bicamada é feita em função de seu tamanho, polaridade e carga (Figura 9.1).



Tamanho: quanto menor a molécula, mais facilmente ela atravessará a bicamada lipídica.

Polaridade: como a natureza da bicamada lipídica é *apolar*, as moléculas apolares têm muito mais facilidade para atravessar a bicamada do que moléculas *polares*.

Carga: moléculas dotadas de carga, como os *íons*, embora geralmente pequenas, não atravessam a bicamada lipídica.

Esses três fatores atuam em conjunto, de modo que as moléculas que passam através da bicamada lipídica com mais facilidade são aquelas bem pequenas, apolares e sem carga. Os melhores exemplos de moléculas desse tipo são o CO_2 e o O_2 . Entretanto, vários solventes orgânicos, como o metanol, também se enquadram nessa categoria e são extremamente prejudiciais às células.

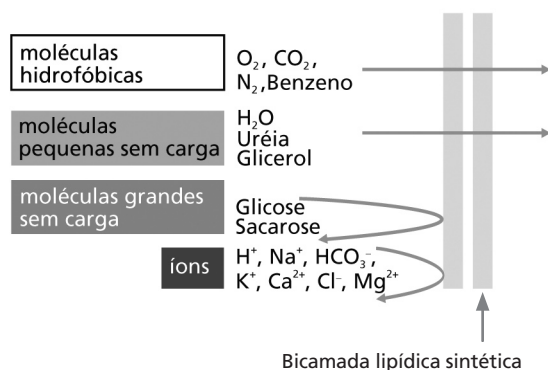


Figura 9.1: Esquema da permeabilidade da bicamada lipídica frente a diferentes moléculas.

A uréia, o glicerol e a água são *moléculas polares*, mas ainda pequenas e sem carga, e também atravessam a bicamada lipídica.

Já a glicose e a sacarose, embora sem carga, são polares e grandes demais para passar pela bicamada lipídica.

Por último, os íons, como o Na^+ , K^+ e Cl^- , embora sejam moléculas muito pequenas, são hidrofílicos, “prendendo” em volta de si uma grande quantidade de moléculas de água (a chamada *camada de solvatação*), o que aumenta muito o seu tamanho e os torna incompatíveis com a natureza da bicamada lipídica.

Dê uma paradinha. Vá até a cozinha, prepare uma limonada, pegue umas batatinhas fritas e, na volta, reveja estes conceitos de Bioquímica I:

- Molécula polar X molécula apolar
- Molécula hidrofílica X molécula hidrofóbica
- Íon

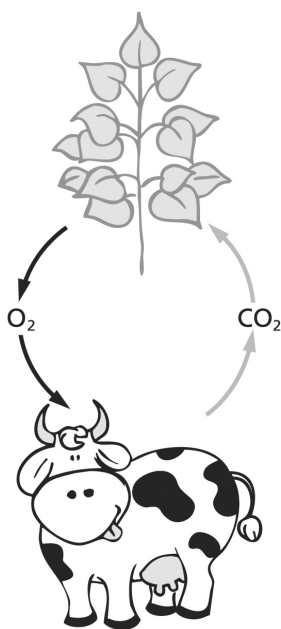
- Camada de solvatação

– “Ah, não tem nada a ver!”

– “Como não? Já imaginou tomar limonada se o açúcar não dissolver na água? E a batata? Fica horrível, encharcada de óleo de fritura!

Repare que esses conceitos fazem parte do nosso dia-a-dia.”

A concentração é o quarto fator que influencia a passagem de uma molécula através da membrana. Assim, as moléculas de oxigênio atravessarão a membrana para o meio intracelular apenas enquanto a concentração de oxigênio no meio intracelular for menor que no meio extracelular. Isso explica por que as plantas, que produzem oxigênio dentro de suas células, liberam-no para a atmosfera, enquanto as células animais, que consomem oxigênio, o absorvem do meio (Figura 9.2). Todo o processo ocorre sem que a célula gaste energia (ATP). No box você observa como se dá a troca desses gases entre os alvéolos pulmonares e as hemácias.



Hemácia nos capilares do pulmão:
a concentração de CO_2 dentro da célula é maior que no alvéolo, portanto o CO_2 SAI.
Já a concentração do O_2 no meio externo é maior que dentro da hemácia, portanto ele ENTRA.

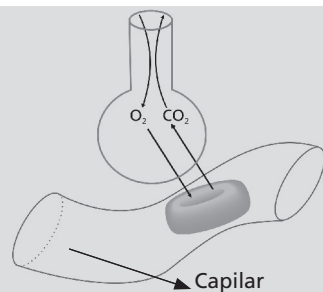


Figura 9.2: A troca de gases entre os seres vivos e o meio ambiente é feita sempre por difusão simples, obedecendo à diferença de concentração. Como a planta está produzindo O_2 , ele é lançado ao meio ambiente. Já o animal consome continuamente O_2 e expira CO_2 , que é lançado ao meio ambiente e absorvido pela planta, em cujas células a concentração é mais baixa.

Vimos, assim, que a *permeabilidade seletiva* da bicamada lipídica nada tem a ver com a “utilidade” das moléculas para a célula, dependendo apenas das características físico-químicas das mesmas.

DIFUSÃO SIMPLES

É o processo que acabamos de descrever: a passagem de substâncias através da bicamada lipídica é chamada difusão simples. Observe o esquema no box para entender melhor como funciona.

No caso de a molécula transportada ser a água, recebe o nome de osmose.

OSMOSE

Na osmose, a água, que é o solvente universal tanto do meio intracelular quanto do meio extracelular, se comporta como soluto. A osmose pode ser observada em dois experimentos muito simples, que você pode executar no pólo.

Experimento 1:

Material:

Luvas de látex descartáveis
Hemácias (sangue de camundongo ou outra cobaia)
Soro fisiológico
Sal de cozinha (NaCl)
Tubo de ensaio
Pipetas e bulbos
Lâminas e lamínulas
Microscópio óptico

Procedimento:

1. Sempre usando as luvas, recolha uma amostra (1 ml) do sangue do animal num tubo contendo soro fisiológico (1 ml). Este será o tubo 1. Misture, colha com a pipeta uma gota da mistura, monte entre lâmina e lamínula e observe ao microscópio óptico. Qual o formato das hemácias?

2. Retire 1 ml do conteúdo do tubo 1 e misture num outro tubo contendo apenas água destilada. Esse será o tubo 2. Misture e colha uma gota com a pipeta. Monte entre lâmina e lamínula e observe ao microscópio óptico. Qual o formato das hemácias?

3. Retire 1 ml do conteúdo do tubo 1 e misture num outro tubo (tubo 3) contendo 1 ml de soro fisiológico ao qual se adicionou uma pitada de sal de cozinha. Misture e colha uma gota com a pipeta. Monte entre lâmina e lamínula e observe ao microscópio óptico. Qual o formato das hemácias?

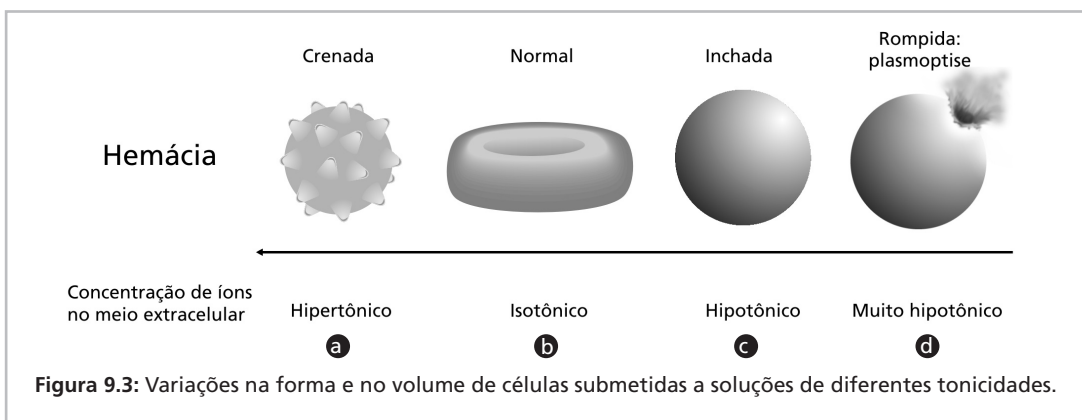
Discussão dos resultados:

A solução do tubo 1 é chamada isotônica em relação ao citoplasma das hemácias. A concentração de NaCl é igual à existente no citoplasma das hemácias. Por isso, seu volume não sofreu alteração (**Figura 9.3 B**).

A do tubo 2 é hipotônica em relação ao citoplasma das hemácias. A concentração de NaCl é menor que no citoplasma. Nessa situação a água atravessou a membrana plasmática (**Figura 9.3C**) e as membranas terminaram por se romper (**Figura 9.3D**).

No tubo 3, a solução é hipertônica em relação ao citoplasma das hemácias. A concentração de NaCl é muito alta, as hemácias perderam água e por isso murcharam (**Figura 9.3A**).

Nas três situações, o que atravessou a membrana das hemácias não foram os íons Na^+ e Cl^- , já que a bicamada lipídica é impermeável a eles. A água, que apesar de ser uma molécula polar não possui carga e é bem pequena, atravessa a bicamada, sempre no sentido em que a “concentração” da água estiver menor, isto é, para o compartimento onde o NaCl estiver mais concentrado.



EXPERIMENTO 2:

Material:

Uma cebola sem casca

Água destilada

Açúcar (sacarose)

Tubo de ensaio

Pipetas e bulbos

Lâminas e lamínulas

Microscópio óptico

Procedimento:

1. Puxe cuidadosamente uma película da superfície da cebola. Estenda essa película sobre uma gota d'água colocada numa lâmina e monte com uma lamínula. Observe e descreva o formato das células ao microscópio.

2. Puxe uma outra película semelhante à primeira mas monte sobre uma gota de uma solução saturada de açúcar em água. Observe ao microscópio e descreva as alterações.

Discussão dos resultados:

Embora não tenham carga, as moléculas de açúcar (sacarose) são muito grandes para atravessar a bicamada lipídica. Assim, para que a concentração de sacarose dentro e fora da célula fique igual, a célula perde água e sua membrana se descola da parede celular, murchando, embora a parede não altere sua forma. A osmose é o mecanismo primordial pelo qual as plantas absorvem do ambiente a água de que necessitam.

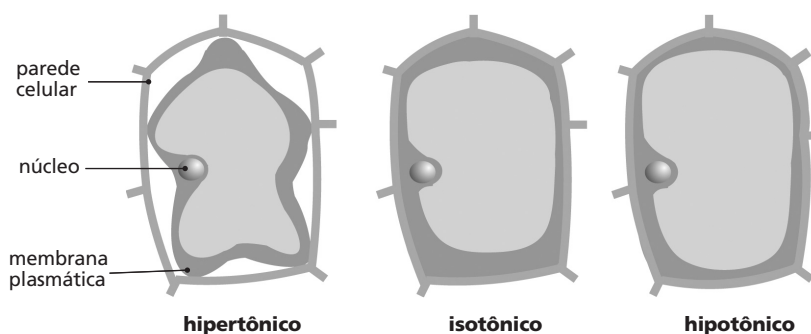


Figura 9.4: Variações na forma de uma célula vegetal submetida a soluções de diferentes tonicidades. Repare que a parede celular impede mudanças drásticas na forma e no tamanho das células.



A DIFUSÃO SIMPLES NÃO ATENDE A TODAS AS NECESSIDADES DA CÉLULA

Embora todo o O_2 e CO_2 utilizados e produzidos por uma célula passem através da membrana por difusão simples, esse não é, nem poderia ser, o único processo de troca de substâncias entre a célula e o meio extracelular. Não é possível imaginar que alterações da concentração externa de íons levem as células a absorver água até romper ou, ao contrário, provoquem seu murchamento. Também a produção de ATP é dependente da absorção de moléculas como a glicose, incapaz de atravessar a bicamada lipídica.

Qual será, então, o mecanismo que atende às diferentes necessidades das diferentes células? É o que veremos na aula seguinte. Ao final da Aula 12, você encontrará o resumo e os exercícios referentes a esta aula.

As proteínas transportadoras

objetivos

Ao final desta aula, você deverá compreender o que são:

- Proteínas transportadoras: carreadores e canais.
- Aquaporinas.



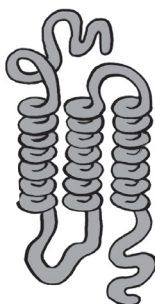
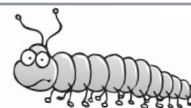
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Dentre as proteínas presentes na membrana celular de todas as células, destacam-se aquelas cuja principal função é permitir a passagem das moléculas que não são capazes de atravessar a bicamada lipídica. Todas as proteínas transportadoras possuem as seguintes características:

1. Atravessam a bicamada lipídica de um lado ao outro, isto é, são proteínas transmembrana.
2. São do tipo *multipasso*, isto é, sua seqüência de aminoácidos atravessa muitas vezes a bicamada. Muitas proteínas transportadoras são, na verdade, complexos de duas ou mais proteínas que terminam por formar uma região hidrofílica na membrana, permitindo assim a passagem de moléculas hidrofílicas.

Dê uma paradinha:

Se você acha que proteína multipasso é isso, dê uma espreguiçada, endireite as costas e volte à aula de proteínas de membrana (número 8) para refrescar sua memória.



Proteína multipasso é aquela cuja cadeia polipeptídica atravessa muitas vezes a bicamada lipídica.

3. São específicas para um tipo de molécula, isto é, um transportador de glicose não transportará frutose, assim como a proteína que permite a passagem de Na^+ não pode ser usada para transportar K^+ ou outro cátion.

COMO ATUA UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA

As proteínas transportadoras se dividem em duas grandes categorias, de acordo com seu modo de atuação: **carreadoras** e **canais**.

As **carreadoras** (também chamadas carregadoras) se ligam à molécula a ser transportada em um dos lados da membrana e a liberam do outro lado (**Figura 10. 1**).

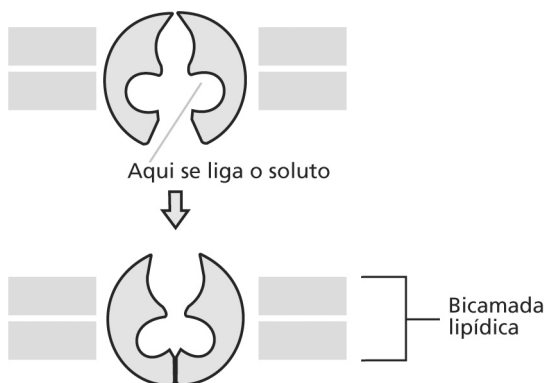


Figura 10.1: Princípio do funcionamento de um carreador por mudança de conformação

Podem ser comparadas às enzimas, pois, como elas, ligam-se a um soluto específico e sofrem alterações na sua forma até liberar esse soluto do outro lado da membrana e reiniciar o processo com uma nova molécula; porém, diferentemente das enzimas, não alteram o soluto que é transportado por elas. Outro ponto importante é que cada unidade de uma proteína carreadora transporta poucas moléculas do soluto por vez. Um bom exemplo de carreador é a proteína que continuamente transporta a glicose do sangue para dentro das células. Nos momentos em que um determinado tipo celular necessita de maior aporte de glicose, isso é feito aumentando o número de transportadores na membrana



das células, pois a velocidade com que um carreador é capaz de atuar não se modifica. Situações de esforço muscular, como uma corrida, levam a esse tipo de situação; entretanto, o tecido mais vulnerável à falta de glicose é o nervoso.

As proteínas carreadoras podem ser constituídas por complexos de duas ou mais subunidades, como dois carregadores que trabalham em conjunto para transportar o móvel.

Já as proteínas do tipo **canal** atuam como comportas: ao se abrirem, formam um poro ou canal pelo qual passa rapidamente um enorme número de moléculas (**Figura 10.2**). Como a imensa maioria dos canais transporta apenas íons, são também chamados **canais iônicos**. É importante ressaltar que cada tipo de canal iônico é altamente específico para um dado íon, o que os diferencia de um simples poro aquoso.

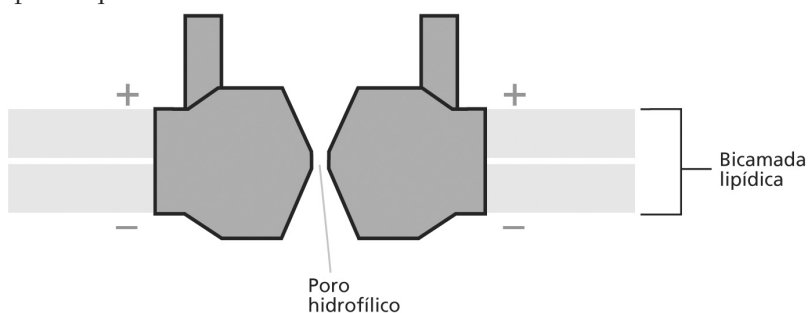


Figura 10.2: Esquema de uma proteína do tipo canal no estado aberto.

Podemos fazer um paralelo entre o funcionamento de uma proteína carreadora e uma proteína canal, comparando-as ao procedimento de descarga de um caminhão de areia: se a areia vier em sacos, será necessário que os operários descarreguem saco por saco. Se o caminhão for do tipo basculante e a areia não estiver ensacada, basta levantar a caçamba e toda a areia será despejada de uma só vez. A primeira situação corresponde ao transporte via carreadores – poucas unidades por vez num ritmo constante, enquanto houver moléculas para serem transportadas. O caminhão basculante funciona como uma proteína canal, abre-se por um pequeno intervalo de tempo e uma grande quantidade de pequenas moléculas (os íons podem ser comparados aos grãos de areia) passa em pouco tempo.



AS AQUAPORINAS

A passagem de água através da membrana das hemácias é muito rápida (podendo mesmo levar ao seu rompimento), enquanto outros tipos celulares, como os ovócitos de peixes e anfíbios, permanecem na água dos rios e lagos sem absorver ou perder quantidades significativas de água. A constatação e a pesquisa em torno desses fatos levou à descoberta de um novo tipo de proteína transportadora: as **aquaporinas**.

Naturalmente, as proteínas dessa família estão ausentes da membrana dos ovócitos desses animais, para evitar que eles arrebentem quando lançados em água doce ou desidratem quando os ovos são postos em água salgada.

As aquaporinas formam uma família de proteínas de membrana específicas para a passagem de moléculas de água e já foram identificadas na membrana de muitos tipos celulares, além das hemácias. Na membrana dos túbulos coletores dos glomérulos renais (**Figura 10.3**), por exemplo, ajudam a captar a maior parte da água perdida durante o processo de filtração do sangue, o que diminui o volume final de urina produzido. Ao contrário dos canais iônicos, as aquaporinas permanecem abertas o tempo todo, permitindo a passagem da água do meio mais diluído (geralmente o extracelular) para o mais concentrado (o citoplasma).

O controle de sua atividade é feito de outra forma: quando a célula recebe determinado tipo de estímulo (geralmente por parte de um hormônio), moléculas de aquaporina que estavam *armazenadas* dentro da célula são direcionadas a se inserir na membrana, acelerando a passagem de água através dela.

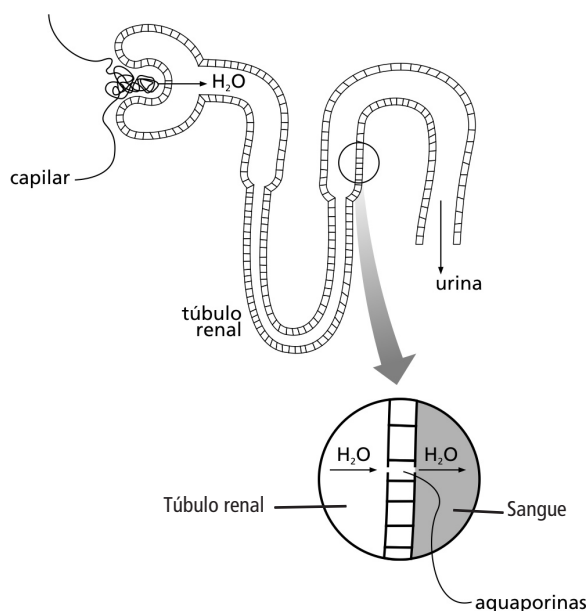


Figura 10.3: No processo de filtração do sangue, grande quantidade de água é absorvida pelos túbulos renais, ajudando a diluir as toxinas. Parte dessa água é recuperada, voltando para o sangue, através de aquaporinas presentes na membrana do túbulo distal. Com isso, o volume de urina produzido diminui.



Ciência é vida!

Os portadores do diabetes do tipo 2 produzem grande quantidade de urina, sempre muito diluída. Nesses indivíduos, a reabsorção de água nos túbulos renais é deficiente justamente pela falta de aquaporinas na sua membrana. Diversas outras doenças também estão associadas ao mau funcionamento dessas proteínas.



Tudo é relativo Talvez você esteja se perguntando: serão as aquaporinas carreadores ou canais? Pense no assunto; voltaremos a ele na seção de exercícios.

Na próxima aula, vamos colocar as proteínas transportadoras *para funcionar*. Você verá que, em sua aparente complexidade, os processos de transporte obedecem a um número pequeno de regras, capazes de se adequar a todas as situações da vida celular.

Na Aula 12 você encontra o resumo sobre transporte através de membranas.

Transporte passivo

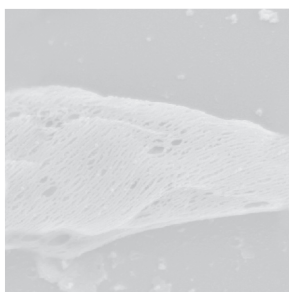
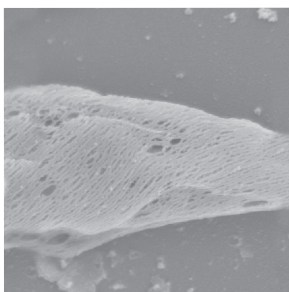
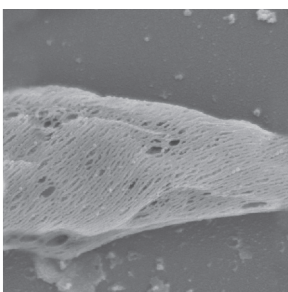
AULA

11

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de compreender o significado e o funcionamento dos mecanismos de:

- Transporte passivo através de canais iônicos.
- Transporte passivo através de carreadores.



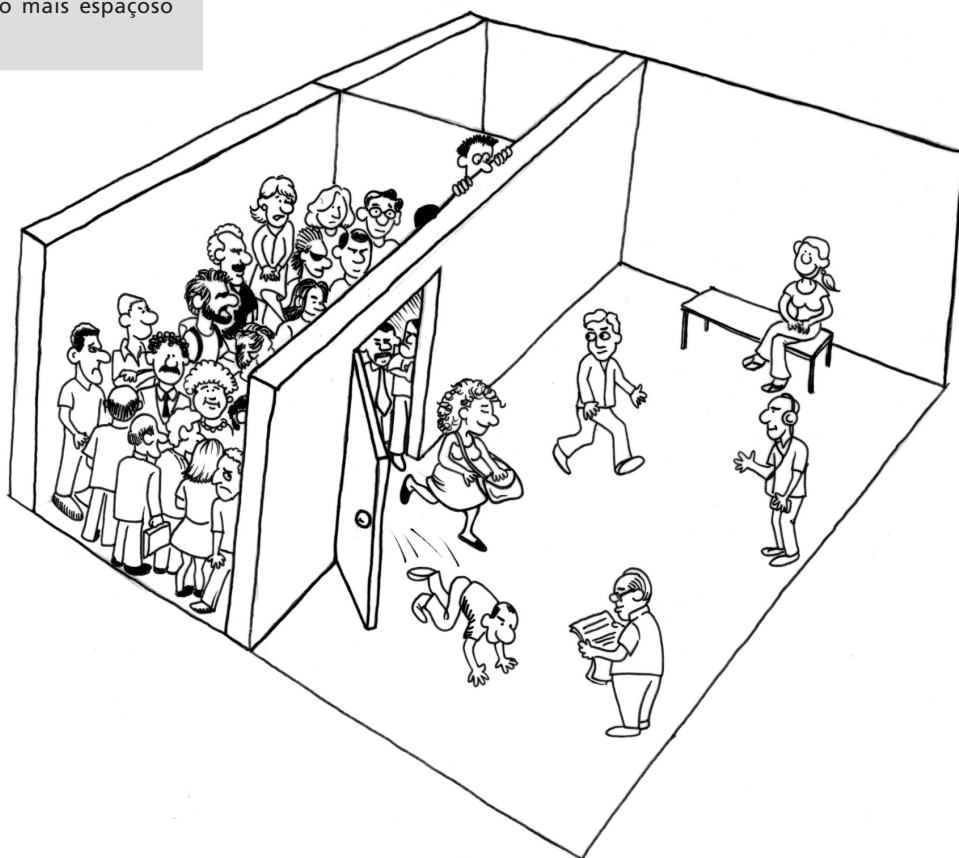
OS CANAIS IÔNICOS E O TRANSPORTE PASSIVO

Ao contrário dos carreadores, cuja atividade de transporte é relativamente lenta e constante, os canais iônicos permanecem em geral abertos apenas por algumas frações de segundo (lembre do exemplo do caminhão basculante da aula anterior). Durante esse período, uma verdadeira enxurrada de íons passa através deles, sempre a favor do gradiente eletroquímico e de concentração. Isso quer dizer que os íons se movem através dos canais iônicos sempre saindo do compartimento onde sua concentração esteja maior para o compartimento onde ela seja menor. Uma vez aberto o canal, não há dispêndio de energia para que os íons passem. Por isso mesmo, esse tipo de transporte é chamado de passivo.

Se nesse ponto você lembrou que na difusão simples também não há gasto de energia, você está absolutamente certo: a difusão simples também é considerada um tipo de transporte passivo, embora não haja proteínas envolvidas neste caso.



Assim como nos canais iônicos, as pessoas espremidas numa saleta também tendem a se espalhar, quando uma porta para um compartimento mais espaçoso é aberto.



O QUE LEVA UM CANAL IÔNICO A ABRIR-SE?

Cada canal iônico responde (= se abre) a um tipo de estímulo (Figuras 11.1, 11.2 e 11.3). Esse estímulo pode ser um ligante, uma sensibilidade do canal a alterações de voltagem ou a um estímulo mecânico.

Nos canais ativados por ligante, uma molécula se liga ao canal e induz uma mudança no formato da molécula que abre a comporta (Figura 11.1A e 11.1B). Um bom exemplo de ligante é a adrenalina (vide box). Quando ficamos nervosos ou com medo, essa substância é liberada na corrente sanguínea e, ao encontrar canais iônicos que são ativados por ela na superfície de vários tipos de célula, dispara processos químicos que resultam na aceleração dos batimentos cardíacos, no suor frio e outros sintomas relacionados a essas situações. Repare no esquema: há canais que são abertos por ligantes extracelulares (como a adrenalina) e outros por ligantes produzidos na própria célula, ou seja, são abertos por dentro (Figura 11.1B).

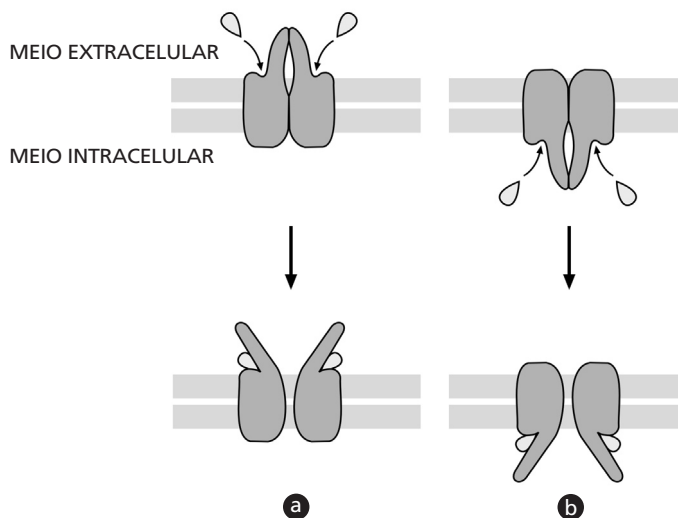
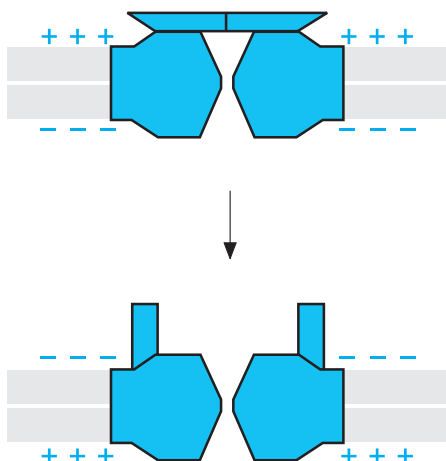


Figura 11.1: Para alguns canais, o ligante que o abre é uma substância que vem de fora da célula (a). Em outros casos, o canal é aberto por uma substância presente no interior da própria célula (b).



Ter um ataque de nervos no trânsito abre vários canais iônicos dependentes de adrenalina.



Uma alteração no potencial elétrico da membrana leva à abertura dos canais ativados por *voltagem* (Figura 11.2). Estes existem em grande número nas células musculares (vide boxe), e é por conta disso que a musculatura se contrai quando levamos um choque.

Figura 11.2: A inversão na distribuição de cargas entre os dois lados interno e externo da membrana provoca a abertura dos canais ativados por voltagem.



A atividade muscular depende tanto de canais que se abrem por ligante como de canais ativados por voltagem.



Já na atividade cerebral participam muitos canais dependentes de voltagem.



Algumas plantas insetívoras possuem pêlos que, ao serem pressionados por uma presa em potencial, disparam a abertura de canais iônicos sensíveis a *estímulos mecânicos*, levando a folha a fechar-se, aprisionando o inseto (Figura 11.3).

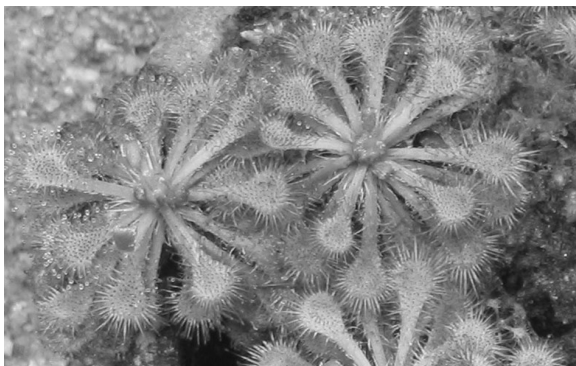
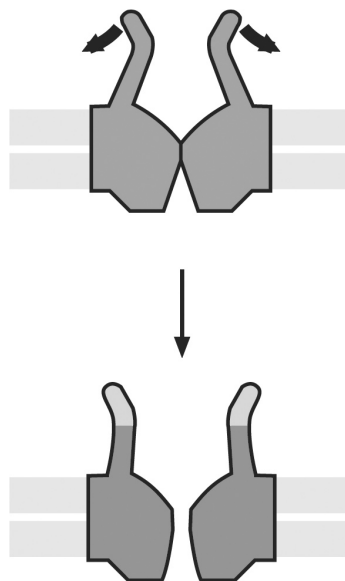


Figura 11.3: Algumas plantas, como a *Dionaea*, possuem canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos que, quando abertos, causam o fechamento das folhas.
(Foto: Márcia Attias)



Você já deve ter notado que grande parte dos exemplos que temos utilizado nesta aula se refere aos tecidos chamados excitáveis, isto é, músculos e nervos. Os tipos celulares desses tecidos necessitam responder rapidamente a estímulos. Isso é conseguido quando, em resposta a um estímulo, abrem-se canais e por eles passam grandes quantidades de íons em pequeno intervalo de tempo.

No estado de repouso, a membrana dessas células se encontra polarizada. Isto é, há um acúmulo de cátions (especialmente Na^+ e K^+) no meio extracelular. Em consequência, o meio intracelular é negativo em relação ao extracelular. Essa diferença de cargas (chamada potencial de membrana) é mantida pelo transporte ativo desses cátions, a ser estudado na Aula 12.

Meio extracelular			
+	+	+	+
-	-	-	-
Meio intracelular			
Membrana em repouso			

Meio extracelular			
+	-	-	+
-	+	+	-
Meio intracelular			
Membrana despolarizada			

O QUE LEVA UM CANAL IÔNICO A SE FECHAR?

Em condições normais, os canais iônicos permanecem abertos por intervalos de tempo da ordem de milissegundos (milésimos de segundo). No caso dos canais ativados por ligantes, essa ligação rapidamente se desfaz, e o canal passa a um estado inativo chamado período refratário, durante o qual ele não se abrirá, mesmo na presença do estímulo específico. Esse período refratário é observado em todos os canais iônicos, mesmo nos ativados por voltagem (**Figura 11.4**).

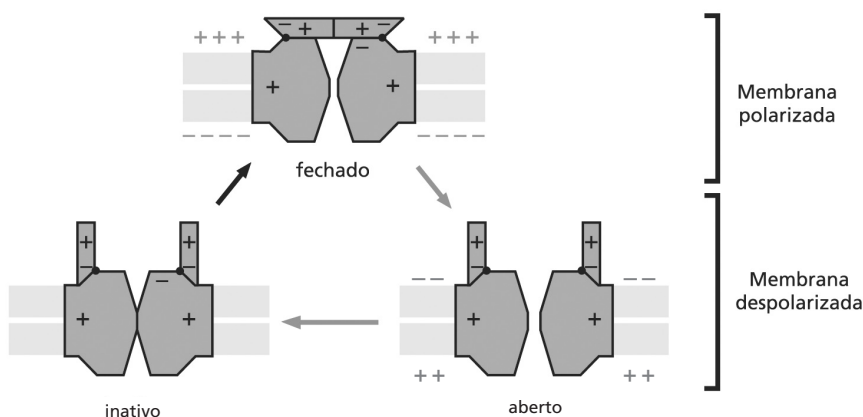


Figura 11.4: Os canais iônicos permanecem fechados no estado de repouso. Uma vez abertos, rapidamente passam para um estado inativo, ou refratário. Nesse estágio, mesmo que sejam estimulados, não se abrirão.

A propagação de um estímulo pela abertura de sucessivos canais iônicos através da membrana das células nervosas é muito rápida e eficiente (**Figura 11.5**). A existência do período refratário impede que o estímulo "volte", reativando antes do tempo, e sem necessidade, trechos da membrana já percorridos.

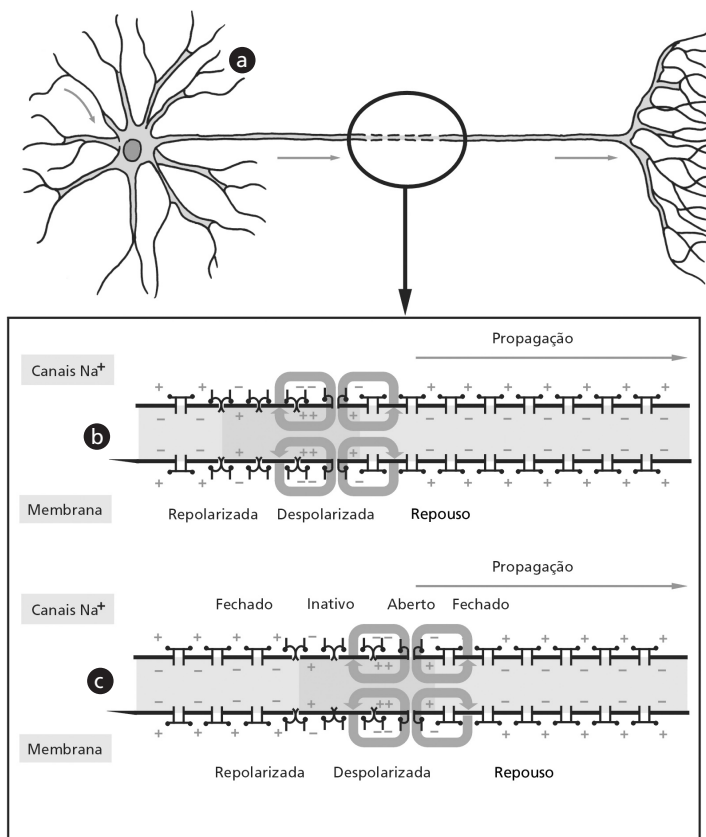


Figura 11.5: A propagação de um estímulo nervoso percorre a membrana do neurônio (a). As figuras B e C mostram o percurso do estímulo ao longo de um trecho da membrana, onde se abrem sucessivamente canais iônicos ativados por voltagem (b). Os canais abertos criam uma área de inversão da voltagem que induz à abertura dos canais vizinhos. Enquanto os canais recém-ativados se encontram no estado inativo (área sombreada), impedindo que o estímulo dê "marcha à ré", os canais à frente abrem-se, permitindo a propagação do estímulo no sentido correto.

O TRANSPORTE PASSIVO NÃO OCORRE SÓ NOS CANAIS IÔNICOS

Duas condições definem o transporte passivo:

1. Sempre ocorre a favor do gradiente (do lado onde o soluto está mais concentrado para o lado onde está menos concentrado).
2. Não há dispêndio de energia.

Embora todos os canais iônicos façam transporte passivo, é importantíssimo considerar que várias proteínas *carreadoras* também transportam seus solutos a favor do gradiente de concentração e sem gasto energético, isto é, fazem transporte passivo (Figura 11.6). O transportador de glicose da maioria das células é um carreador do tipo passivo.

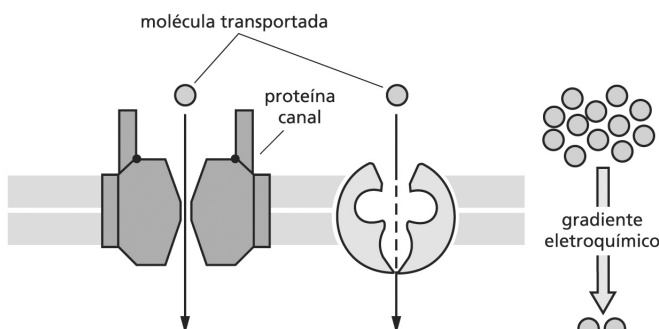
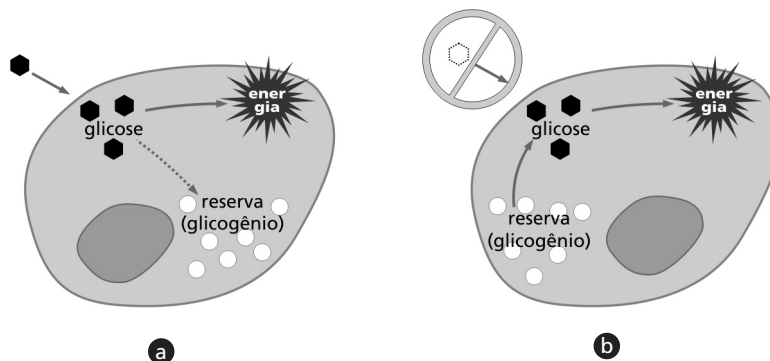


Figura 11.6: O transporte passivo ocorre tanto através de carreadores como de canais. O essencial é que não há gasto de energia e o caminho é sempre no sentido de igualar a concentração da molécula nos dois lados da membrana.

A glicose é o principal combustível utilizado pelas células para produção de energia (a). Além de sua quebra constante no meio intracelular criar um gradiente de concentração em que sua absorção pela célula é favorecida, a célula também é capaz de transformar a glicose que não será utilizada imediatamente em glicogênio (no caso de células animais) ou amido (nas células vegetais). Essas estratégias favorecem a formação de um gradiente de entrada de glicose nas células. Se não houver glicose disponível para entrar na célula, os estoques formados anteriormente, serão disponibilizados (b).



CONCLUSÃO

Podemos comparar o transporte passivo a um caminhão sendo esvaziado. No caso dos canais iônicos, seria um caminhão basculante, que descarrega toda a areia de uma vez. Já no caso dos carreadores, os trabalhadores precisam descarregar saco por saco. O que há de comum nos dois processos é que ele é feito do compartimento onde há areia (o caminhão), para onde há menos (fora do caminhão). Já para encher o caminhão, a história será outra...



Pense só quantos "problemas" da célula já resolvemos até agora: o transporte de gases (CO_2 e O_2), a aquisição de nutrientes como a glicose, a propagação de estímulo nervoso por canais iônicos...

Pois é, mas isso não resolve tudo, veremos na próxima aula situações que o transporte passivo por si só não pode solucionar.

Na Aula 12 você encontra o resumo sobre transporte através de membranas.

Transporte ativo

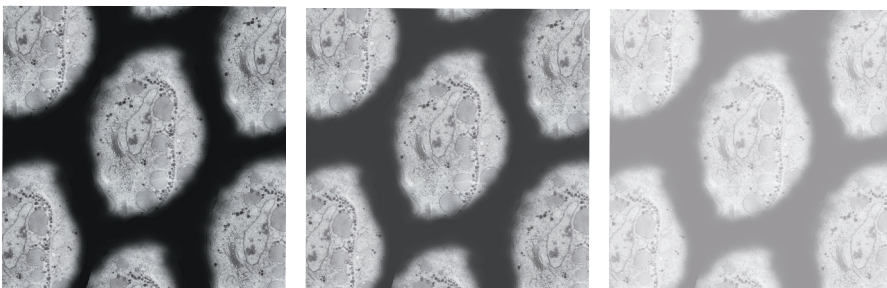
AULA

12

objetivos

Ao final desta aula, você deverá ser capaz de saber o significado de:

- Transporte ativo;
- Bomba de sódio/potássio;
- Uniporte, simporte e antiporte;
- Proteínas de multirresistência a drogas.

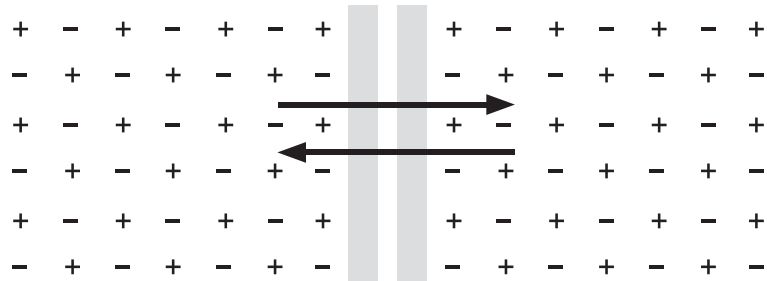


TRANSPORTE ATIVO. PARA QUÊ?

Numa célula que, ao longo de um determinado período, realize apenas transporte passivo, a distribuição de íons dos meios intracelular e extracelular tenderá a ser idêntica (**Figura 12.1**). Como a tonicidade do meio intracelular resulta da concentração de íons, proteínas solúveis e açúcares do citosol, essa célula tenderá a tornar-se hipertônica em relação ao meio externo, acarretando a absorção de água por osmose e um aumento de seu volume que poderá levar ao rompimento.

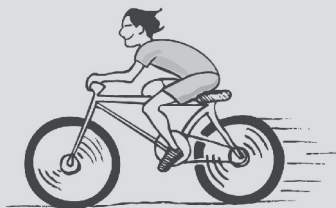
Além disso, com o equilíbrio entre os meios intra e extracelular, o transporte iônico simplesmente não ocorrerá. Como devolver ao compartimento de origem os íons que passaram pelos canais iônicos? A resposta funcional a esse dilema é o transporte ativo.

Figura 12.1: Se apenas os canais iônicos promovessem o transporte de íons, em pouco tempo haveria uma distribuição uniforme de cargas dentro e fora da célula e a diferença de cargas entre o lado interno e o externo da membrana celular seria zero.



A harmonia do desequilíbrio:

Assim como uma bicicleta só se mantém equilibrada nas duas rodas se estiver em movimento, a vida celular também requer atividade constante. Por exemplo, no caso dos neurônios, o que indica se seu estado é de repouso ou atividade é a diferença de cargas nos lados interno e externo na membrana celular. Quando a célula está em repouso, o exterior é positivo em relação ao meio interno. Em atividade, essa polaridade se inverte momentaneamente e o interior se torna positivo. Essa mudança de carga se faz pela passagem de íons (principalmente Na^+ e K^+). Se a distribuição de íons fosse igual nos dois lados da membrana, a célula “não saberia” em que estado se encontra.



Tal como um ciclista que precisa manter constantemente o equilíbrio pedalando, a célula está constantemente alterando a composição iônica dos meios intra e extracelular, mantendo-se num equilíbrio dinâmico.

O QUE É TRANSPORTE ATIVO

O transporte ativo (Figura 12.2) contrapõe-se ao passivo em seus dois postulados básicos:

1. dá-se sempre contra o gradiente de concentração do soluto que está sendo transportado;
2. requer gasto energético (ATP) por parte da célula.

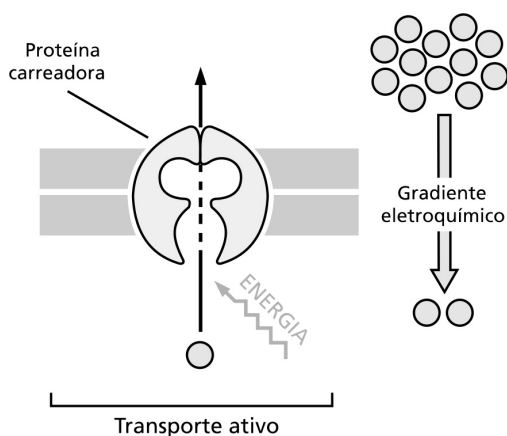


Figura 12.2: No transporte ativo, a substância é transportada por um carreador contra o seu gradiente eletroquímico, ou seja, do compartimento onde está em menor concentração para onde já existe em maior quantidade.

A esses postulados acrescenta-se mais uma norma: apenas proteínas do tipo carreador são capazes de realizar transporte ativo.

Este mantém um desequilíbrio dinâmico entre os meios intracelular e extracelular, especialmente com relação aos íons. Enquanto a abertura dos canais iônicos tende a uniformizar a distribuição intra e extracelular de ânions e cátions, além de aumentar a tonicidade do ambiente intracelular, a expulsão seletiva de íons por transporte ativo traz duas consequências:

1. equilíbrio da tonicidade do meio intracelular, impedindo a absorção excessiva de água por osmose (controle do volume celular) (Figura 12.3);

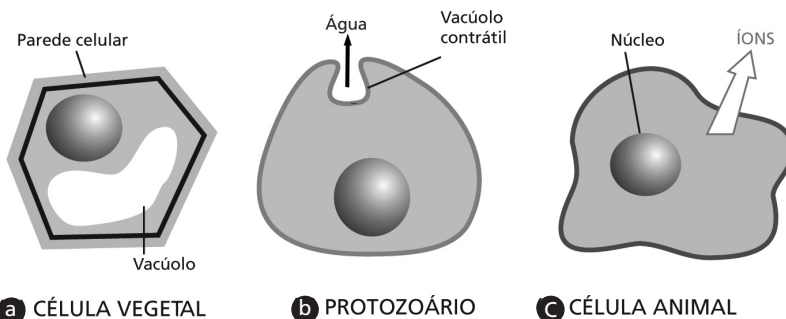


Figura 12.3: Devido à presença de íons, proteínas, açúcares e outras moléculas em solução no citoplasma, além do espaço ocupado pelas organelas, sua concentração é sempre maior que a do meio extracelular. Por isso mesmo, há uma natural tendência de que as células absorvam água por osmose. A absorção excessiva de água é evitada por vários mecanismos: (a) a presença de uma parede celular semi-rígida nos vegetais, (b) vacúolos contráteis em protozoários e (c) a expulsão ativa de íons nas células eucariontes em geral.

2. estabelecimento de uma distribuição diferenciada de íons (gradiente) entre os meios intra e extracelular.

Numa célula típica em repouso, a quantidade de Na^+ intracelular é 10 a 30 vezes menor do que no meio extracelular, enquanto a quantidade de K^+ é cerca de 30 vezes maior no meio intracelular que no meio extracelular. Considerando, além desses cátions majoritários, outros íons como Cl^- , Mg^{++} , Ca^{++} e PO_4^{--} , o ambiente intracelular é negativo em relação ao meio extracelular (Figura 12.4).

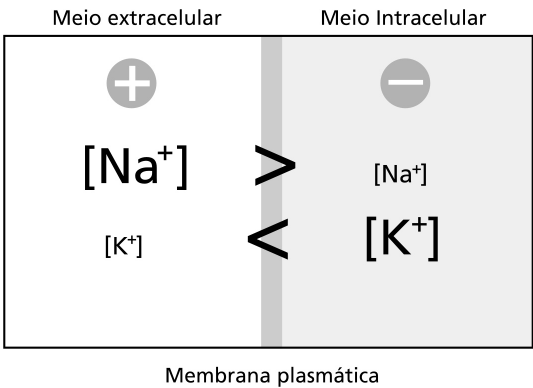
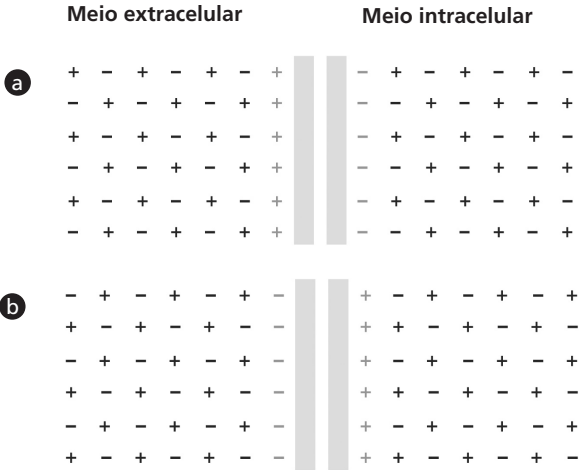


Figura 12.4: Numa membrana em repouso, há mais cátions no lado extracelular que no citoplasma. Portanto, o meio externo é positivo em relação ao meio interno.

Devido a essa distribuição diferenciada de cargas, dizemos que a membrana plasmática é polarizada. Dizemos que a membrana está em repouso enquanto for mantida essa polaridade (positiva fora, negativa dentro) (Figura 12.5A). Quando os canais forem abertos e o citoplasma for invadido por íons, estará ocorrendo uma despolarização da membrana (Figura 12.5B). A despolarização sinaliza uma alteração no estado funcional da célula. Por exemplo, se for uma célula muscular, a consequência dessa mudança de sinal será a contração muscular. No caso de uma glândula, pode ser esse o sinal para a secreção de um hormônio, e assim por diante.

Figura 12.5: (a) A diferença na distribuição de íons entre os lados intra extracelular da membrana cria um potencial de membrana onde o interior é negativo em relação ao exterior. (b) Quando se abrem os canais iônicos, os íons movem-se a favor de seu gradiente eletroquímico, invertendo a distribuição de cargas entre os dois lados da membrana.



Quando um determinado estímulo leva à abertura de canais iônicos para Na^+ e K^+ , a rápida entrada no citoplasma de uma grande quantidade de íons Na^+ e a evasão de uma quantidade também considerável de íons K^+ para fora da célula provocam a despolarização. Como no balanço final a entrada de cátions é maior que a saída, o meio interno se torna positivo em relação ao meio externo.

Até este ponto, descrevemos eventos que dependem apenas da abertura de canais, isto é, transporte passivo. O papel do transporte ativo será fazer com que a célula retorne ao estado de repouso, ou seja, refazer a distribuição dos íons de modo que o meio intracelular seja negativo em relação ao meio extracelular, mesmo que isso signifique deslocar íons do compartimento onde eles estão em menor concentração para outro onde sua concentração seja maior. A repolarização (retorno ao estado polarizado) da membrana é feita por um sistema de transporte ativo chamado de bomba de sódio/potássio.

Dê uma paradinha:

O transporte ativo, energeticamente falando, é sempre feito ladeira acima. Isto é, enquanto para descarregar um caminhão de areia basta erguer a caçamba e despejar o conteúdo, para enchê-lo serão necessários vários operários com pás.



Outra boa comparação seria um escorregador: descer por ele não requer nenhum esforço; já a subida...



A BOMBA DE SÓDIO/POTÁSSIO

A bomba de Na^+/K^+ é um dos sistemas de transporte ativo mais estudados e mais bem conhecidos. A **Figura 12.6** resume suas principais características funcionais.

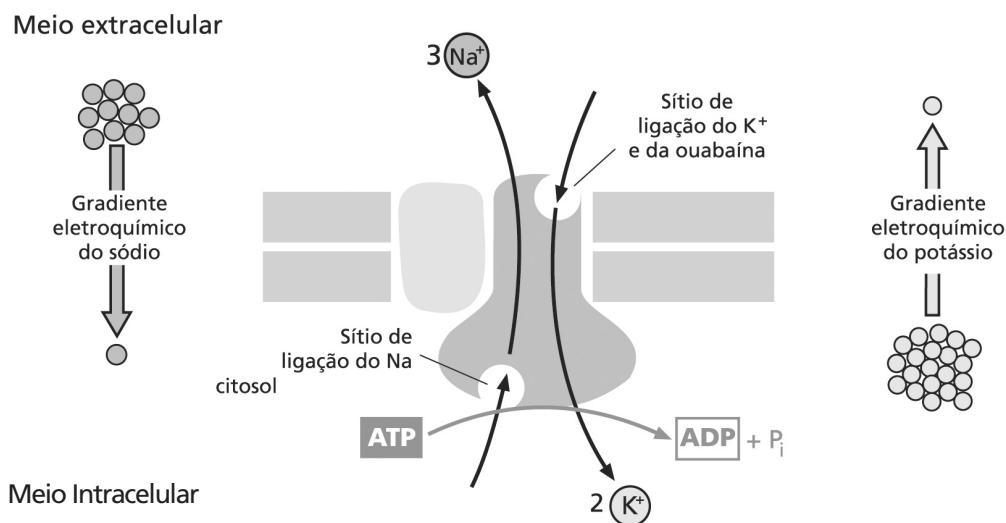


Figura 12.6: A bomba de Na^+/K^+ é um complexo protéico formado por duas subunidades. Na maior delas estão o sítio catalítico (intracelular) onde ocorre a hidrólise do ATP e os locais por onde passam os íons Na^+ (para o meio externo) e K^+ (para o meio intracelular). Para cada 3Na^+ que saem, entram 2K^+ e uma molécula de ATP é hidrolisada a ADP e P_i .

A energia de cada molécula de ATP que é hidrolisada a ADP e P_i (fosfato inorgânico) é utilizada para bombear três íons Na^+ para fora da célula e dois íons K^+ para dentro. Acredita-se que o processo envolva inicialmente a ligação do Na^+ pelo lado interno da subunidade do complexo protéico, seguida da hidrólise do ATP. A energia resultante provoca uma mudança na forma dessa subunidade que resulta: (a) na liberação do Na^+ no lado externo da membrana, (b) na ligação do K^+ também pelo lado extracelular. A ligação do K^+ à subunidade leva à liberação do P_i . Sem o P_i , a subunidade novamente muda de conformação, levando à liberação do K^+ no citoplasma e ao reinício do processo. A **Figura 12.7** ilustra as principais etapas desse ciclo.

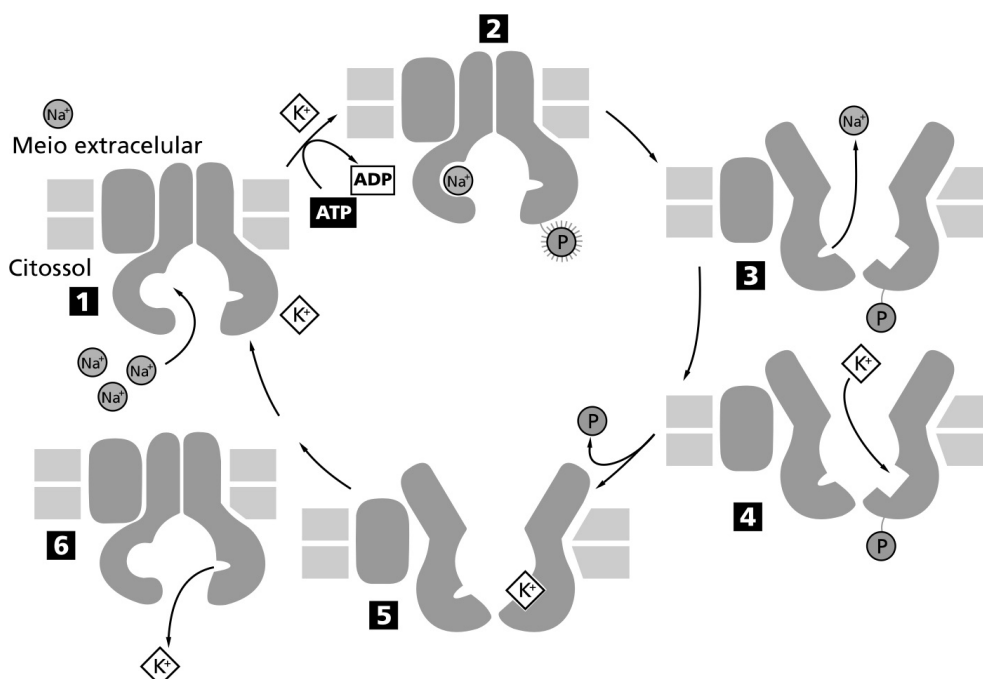


Figura 12.7: O funcionamento da bomba de sódio/potássio decorre de mudanças na forma do complexo proteico que a constitui. (1) Inicialmente se ligam 3 íons Na^+ pelo lado citoplasmático da membrana (apenas um está representado). (2) Nesse ponto, ocorre a hidrólise do ATP em ADP e P_i de alta energia. (3) Essa energia será utilizada em nova mudança de forma da molécula e conseqüente expulsão do Na^+ . (4) A seguir, ligam-se pelo lado externo dois íons K^+ (apenas um está representado). Essa (5) nova ligação induz a liberação do P_i , cuja energia já foi gasta, e nova mudança de conformação da molécula para o estado inicial, quando poderá se ligar a novos íons Na^+ e reiniciar o ciclo.

Repare que cada etapa leva a uma mudança conformacional da proteína transportadora que dispara a etapa seguinte. Se o ciclo for interrompido em algum ponto, todo o mecanismo de bombeamento ficará bloqueado. É o que acontece com a ouabaína, uma droga extraída de uma planta africana. Seu efeito tóxico consiste justamente em ligar-se ao local normalmente ocupado pelo K^+ na molécula. Sob seu efeito, a bomba de Na^+/K^+ é paralisada.

As sinistras proteínas MDR

Certos transportadores ativos são especializados em expulsar ativamente substâncias tóxicas para as células. Essas proteínas continuam presentes em células que se tornam cancerosas. Após algum tempo, as células malignas aprendem a reconhecer e expulsar os remédios que são usados na quimioterapia, fazendo com que o tratamento não funcione, mesmo se a dosagem das drogas for aumentada. Essas proteínas são chamadas de proteínas de multirresistência a drogas, ou MDR (do nome em inglês). Esse tipo de transporte ativo (gasta ATP!) também se desenvolve em parasitas como o Plasmódio, causador da malária, que já possui várias cepas resistentes aos remédios utilizados no tratamento da doença.

UNIPORTE, SIMPORTE, ANTIPORTE

A bomba de Na^+/K^+ é uma proteína carreadora através da qual passam, em sentidos opostos, dois íons diferentes (o sódio e o potássio). Já o transportador de glicose, também uma proteína carreadora, transporta apenas um tipo molecular. Essas características levaram ao agrupamento das proteínas carreadoras em três grupos: as que fazem uniporte, as que fazem simporte e as do grupo antiporte (Figura 12.8).

As proteínas uniporte transportam apenas um tipo de molécula. É o caso do transportador de glicose presente na membrana da maioria das células.

Na superfície voltada para a luz, as células do epitélio intestinal possuem uma proteína transportadora de glicose que carrega simultaneamente íons sódio. Chama-se a isso simporte ou co-transporte. Veja no box da página 145 as vantagens desse tipo de transporte para a célula. Já na bomba de Na^+/K^+ também ocorre a passagem de duas moléculas distintas, mas em sentidos opostos. A isso chamamos antiporte.

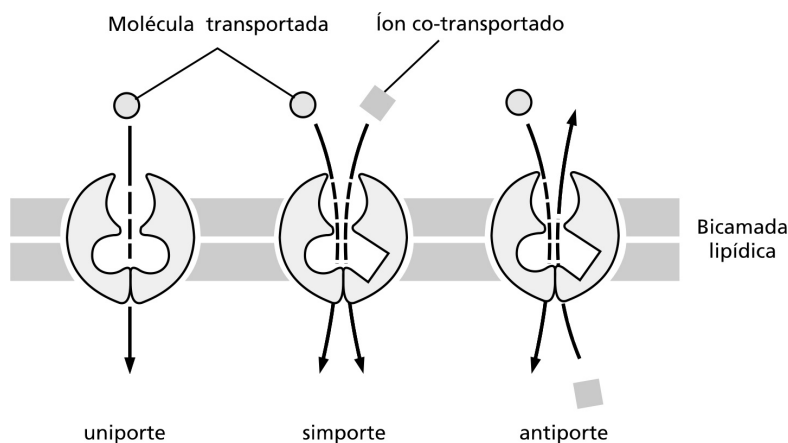


Figura 12.8: Alguns carreadores levam apenas um tipo de molécula (uniporte); outros realizam o transporte de duas espécies moleculares diferentes, que pode ser no mesmo sentido (simporte) ou em opostos (antiporte).

DIFUSÃO FACILITADA OU TRANSPORTE ATIVO SECUNDÁRIO

O alimento que ingerimos é absorvido pelas células que revestem o intestino delgado – o epitélio intestinal (Figura 12.9). Durante a digestão, essas células devem absorver grandes quantidades de glicose da luz intestinal e distribuí-la pelo resto do organismo. Essa absorção é feita por um mecanismo de simporte entre sódio e glicose. Esse tipo de transporte existe apenas na superfície apical das células e força que a

glicose seja sempre transportada da luz para o citoplasma, pois devido à ação da bomba de Na^+/K^+ o gradiente de concentração do sódio é sempre muito maior no meio externo, favorecendo sua entrada na célula juntamente com a glicose. Esse tipo de transporte é chamado de difusão facilitada ou transporte ativo secundário, pois embora não dependa diretamente de ATP e obedeça ao gradiente de concentração do Na^+ , depende do funcionamento da bomba de Na^+/K^+ , um transportador ativo. Esse mecanismo impede que as células intestinais percam glicose em direção à luz intestinal nos períodos de jejum. Essa situação já foi comentada quando estudamos os domínios de membrana (Aula 8). A célula do epitélio intestinal possui então dois domínios: o apical, onde existem as microvilosidades e o co-transportador de sódio e glicose e o domínio basolateral, onde o transportador de glicose é do tipo uniporte.

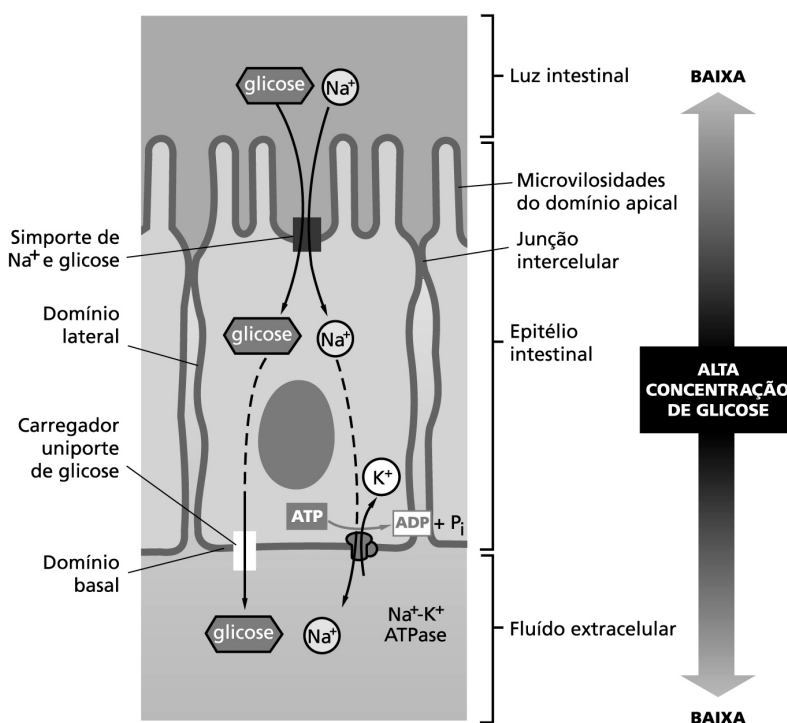
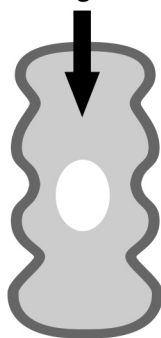


Figura12.9: A existência de dois transportadores diferentes para a glicose no epitélio intestinal tanto impede a concentração excessiva de glicose nessas células durante a fase de absorção da luz intestinal quanto a perda de glicose para a luz intestinal nos períodos de jejum. Nessa fase, a célula estará recebendo glicose pelos transportadores uniporte do domínio basolateral. Assim, a concentração citoplasmática de glicose nessas células será sempre superior à do meio extracelular, como indica o sombreado da seta à direita.

TRANSPORTE INTRACELULAR E TRANSPORTE TRANSCELULAR

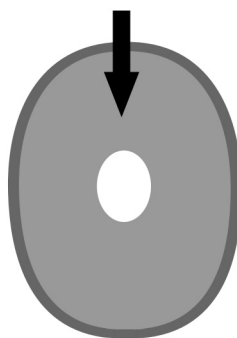
A maior parte da glicose (e de todos os nutrientes) que as células do epitélio intestinal absorvem apenas atravessa essas células a caminho da circulação. Esse fenômeno é chamado de transporte **transcelular**. Além desse, temos o transporte **intracelular**, quando moléculas são levadas de um compartimento celular para outro (do núcleo para o citosol, por exemplo) e o **transporte celular** propriamente dito, em que as moléculas são transportadas para dentro ou para fora das células através da bicamada ou das proteínas de membrana.

Cotransporte
 Na^+ e glicose



Difusão simples

H_2O



A receita de soro caseiro (1 colher de chá de sal e 1 colher de sopa de açúcar em 1 litro de água), utilizada para reidratação oral de pessoas com diarreia, se baseia no simporte de Na^+ e glicose que ocorre no intestino. A absorção do Na^+ (do doreto de sódio) e da glicose derivada do açúcar aumenta a tonicidade do citoplasma das células intestinais, fazendo com que a água seja absorvida por osmose.

OUTROS TIPOS DE TRANSPORTE ATIVO

Embora o sistema da bomba de Na^+/K^+ seja o mais conhecido e mais bem estudado, muitos outros sistemas de transporte ativo mantêm o saudável desequilíbrio entre os diferentes compartimentos intra e extracelulares.

1. Nas membranas do retículo endoplasmático liso, um transportador ativo de Ca^{++} bombeia esse cátion do citoplasma para o interior do retículo. O Ca^{++} dispara vários eventos celulares, como por exemplo a contração muscular. Para que o músculo volte ao estado de relaxamento, é necessário que todo o Ca^{++} seja recolhido novamente ao retículo, caso contrário o músculo permanecerá contraído, fenômeno conhecido por tetania.

2. Em vários microorganismos e bactérias existe uma bomba de prótons, as H^+ ATPases, ou próton-ATPases. Elas funcionam como a bomba de Na^+/K^+ , expulsando íons H^+ (prótons) às custas de ATP.

Em compensação, quando os H^+ acumulados em um dos lados da membrana retornam, passando por uma proteína específica, ocorre a síntese de ATP para a bactéria.

3. As proteínas de multirresistência a drogas, já comentadas anteriormente, fazem parte de uma grande família de transportadores ativos, as proteínas ABC (de ATP Binding Cassete, uma sequência de aminoácidos presente nas proteínas dessa família que se ligam ao ATP, necessário para que o transporte através delas seja realizado). As proteínas dessa família atuam tanto no transporte de íons como de pequenas moléculas, participando de processos de detoxificação por várias drogas de natureza lipídica.

A importância dos transportadores ABC pode ser bem avaliada no caso da fibrose cística, uma anomalia genética relativamente comum. Nos portadores dessa doença o gene que codifica um transportador de Cl^- é defeituoso, ou inexistente, acarretando profundos desbalanceamentos no equilíbrio hídrico e eletrolítico do indivíduo. Esses sintomas se manifestam como alta concentração de sal no suor, alta viscosidade do muco que reveste as vias respiratórias, ocasionando obstrução delas, e muitos outros que diminuem a qualidade e a expectativa de vida dos afetados.

OUTROS TIPOS DE ANTIPOORTE

Nem todo antiporte é feito com gasto de energia. A manutenção do pH ótimo nos diversos compartimentos celulares depende de alguns mecanismos de antiporte que funcionam a favor do gradiente de concentração. Muitas células possuem em sua membrana plasmática uma proteína antiporte que regula o pH citoplasmático da seguinte forma: o pH citoplasmático deve permanecer em torno de 7,0; assim, se o aumento da concentração de H^+ levar à queda do pH, este será trocado por Na^+ , sempre muito abundante no meio extracelular por conta da bomba de Na^+/K^+ .

Um sistema antiporte também aumenta a eficiência do transporte do CO_2 retirado das células pelas hemácias. Ao difundir-se para dentro das hemácias, o CO_2 é convertido em HCO_3^- (íon bicarbonato). Nessa forma ele é mais solúvel no sangue que o CO_2 e é trocado por Cl^- pelo antitransportador aniônico presente na membrana das hemácias, chamado de banda 3. Assim, uma quantidade muito maior de CO_2 pode ser transportada livre no sangue (na forma de bicarbonato) e não apenas no interior das hemácias (**Figura 12.10**).

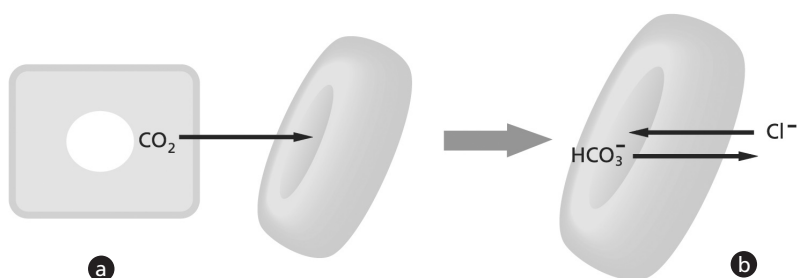


Figura 12.10: O CO_2 produzido pelos tecidos passa por difusão simples para o interior das hemácias (a). Na hemácia (b) o CO_2 se transforma em HCO_3^- (ion bicarbonato) e é trocado por Cl^- através da proteína antiporte banda 3.

RESUMO

- A bicamada lipídica das membranas celulares é altamente impermeável à maioria das moléculas hidrossolúveis e a todos os íons. A transferência de nutrientes, metabólitos e íons através da membrana plasmática e membranas intracelulares é feita através de proteínas transportadoras.
- As membranas celulares contêm várias proteínas transportadoras, cada uma das quais é responsável pela transferência de um soluto específico através da membrana. Existem duas classes de proteínas transportadoras: *carreadoras* e *canais*.
- O gradiente eletroquímico representa a força direcional de um íon resultante de seu gradiente de concentração e do campo elétrico.
- No *transporte passivo*, um soluto não carregado move-se a favor do gradiente de concentração, do lado em que está mais concentrado para o lado em que está menos concentrado, enquanto um soluto carregado move-se a favor de seu gradiente eletroquímico.
- No *transporte ativo*, um soluto não carregado move-se contra o gradiente de concentração; um soluto carregado move-se contra o gradiente eletroquímico; esse processo requer energia.
- As proteínas carreadoras ligam-se a solutos específicos (íons inorgânicos, pequenas moléculas orgânicas ou ambos), fazendo com que atravessem a membrana através de mudanças em sua conformação que expõem o sítio de ligação do soluto a um lado da membrana e a seguir ao outro.
- As proteínas carreadoras podem agir como bombas para transportar o soluto “ladeira acima”, contra o gradiente eletroquímico, utilizando energia derivada da hidrólise de ATP, pelo fluxo de íons como Na^+ e H^+ , ou pela luz.
- A bomba de Na^+/K^+ da membrana de células animais é uma ATPase que transporta ativamente Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro, mantendo um gradiente de Na^+ através da membrana que é utilizado para promover o transporte de outras moléculas e para transmitir sinais elétricos.

- As proteínas do tipo canal formam poros aquosos através da bicamada lipídica, por onde os solutos podem se difundir. Enquanto o transporte pelas proteínas carreadoras pode ser ativo ou passivo, o transporte através dos canais é sempre passivo.
- A maior parte das proteínas do tipo canal é de canais iônicos seletivos que permitem a passagem de íons inorgânicos específicos de acordo com seu tamanho e carga. O transporte através desses canais é pelo menos 1.000 vezes mais veloz que o transporte através de qualquer carreador conhecido.
- A maior parte dos canais iônicos só se abre sob determinados estímulos, como a alteração do potencial de membrana (ativados por voltagem) ou a ligação de uma molécula específica (ativados por ligante).

EXERCÍCIOS

1. Marque certo ou errado e justifique:

- a) A membrana plasmática é impermeável a moléculas carregadas. ()
- b) Proteínas canal ligam-se aos solutos que vão transportar. ()
- c) Apenas o transporte passivo é capaz de manter o equilíbrio celular. ()
- d) O transporte através de carreadores é mais rápido que através de canais ()
- e) Simporte e antiporte são a mesma coisa. ()

2. Comente a frase a seguir: “Podemos comparar o transporte através de um canal ao de um carreador a encher uma garrafa com grãos de feijão usando um funil ou uma colher.”

3. Por que alguns autores chamam o simporte de Na^+ e glicose através da membrana de “transporte ativo secundário” se não há consumo de ATP no processo?

4. O que são aquaporinas? Qual sua importância nos dutos coletores das células renais?

5. Releia o texto. Enumere os tipos de transportadores de Na^+ citados e o sentido de sua atividade.

6. Comente a frase: “Dizer que a membrana é dotada de permeabilidade seletiva é dizer que através dela só passam as moléculas de que a célula necessita.”

Biologia Celular I

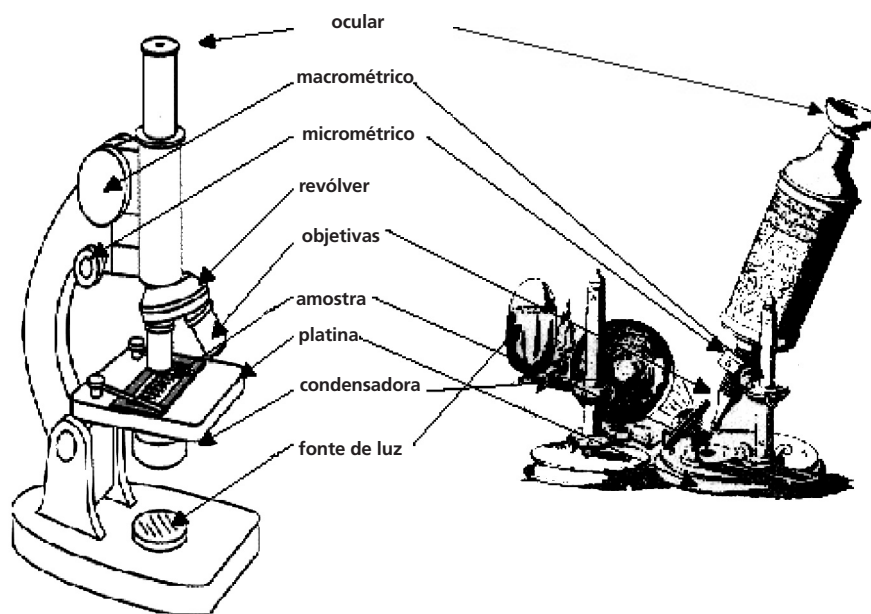
Gaboarito

1.

ocular	objetiva	aumento final
5x	40x	200X
10x	20x	200X
20x	10x	200X
10x	100x	1000X

2. As células recebem este nome porque o que Hooke descreveu foram as paredes celulares remanescentes onde antes haviam estado células que morreram, deixando lacunas semelhantes às celas dos monges.

3. Comparação do microscópio de Hooke (**Figura 1.1**) com o modelo atual (**Figura 1.4**), identificando as partes análogas.



4. A importância de cada um dos componentes para observação ao microscópio óptico: fonte de luz: atravessar a amostra, formando uma imagem na retina do observador; lente condensadora: concentrar a luz, aumentando a intensidade do feixe; espessura e contrastada amostra: quanto mais espessa a amostra, maior o contrastel, mas menor a visibilidade de detalhes.

5. Podemos observar células vivas e sem adição corantes tanto no contraste de fase quanto no contraste interferencial.

6. No microscópio de fluorescência a amostra é tratada com um corante fluorescente e iluminada com uma fonte de luz ultravioleta, capaz de fazer com que apenas as áreas onde o corante se fixou apareçam na imagem.

7. Limite de resolução é a menor distância em que dois pontos são distinguíveis como individuais. O limite da resolução do microscópio óptico é de $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

8. Uma hemácia mede $8\text{ }\mu\text{m}$. Quando observada sob o aumento total de 1.000 vezes, medirá $8.000\text{ }\mu\text{m} = 8 \times 10^3\text{ }\mu\text{m} = 8\text{ mm} = 0,8\text{ cm}$

9. O núcleo é a única estrutura claramente visível dentro de uma célula observada ao microscópio óptico devido a seu tamanho, localização e porque as outras estruturas ou são muito pequenas ou aparecem apenas como túbulos ou vesículas dentro da célula.

10. $5\text{ }\mu\text{m} = 5.000.\text{nm}$

$0,5\text{ mm} = 500\text{ }\mu\text{m}$

$100\mu\text{m} = 100.000\text{ nm}$

$1.000\mu\text{m} = 1\text{ mm}$

$60\text{ nm} = 0,06\text{ }\mu\text{m}$

11. Uma célula foi fotografada com 2.000x de aumento no microscópio óptico. Uma estrutura que tenha na realidade $2\text{ }\mu\text{m}$ aparecerá na foto com $4.000\text{ }\mu\text{m} = 4\text{ mm} = 0,4\text{ cm}$.

12. A. Campo claro, amostra corada de esfregaço sanguíneo.

B. Cromossomos em microscopia de fluorescência.

C. Corte de pele, microscopia de campo claro.

D. Contraste interferencial de Nomarski, epitélio da mucosa bucal.

E. Fluorescência: núcleo em azul, citoesqueleto em verde.

F. Células do epitélio vaginal coradas pelo método de Papanicolau. Campo claro.

1. É a menor distância em que dois pontos podem ser definidos como distintos.

$$2. 10^4 \times 10^2 \times 10^{-9} \text{ m} = 10^{4+2-9} \text{ m} = 10^{-3} \text{ m} = 1 \text{ mm}$$

$$10.000 = 10^4$$

$$100 \text{ nm} = 10^2 \times 10^{-9} \text{ m}$$

$$10^4 \times 10^2 \times 10^{-9} \text{ m} = 10^{4+2-9} \text{ m} = 10^{-3} \text{ m} = 1 \text{ mm}$$

Resposta: 1 milímetro

$$3- 30 \mu\text{m} = 30 \times 10^{-4} \text{ cm}$$

$$9/30 \times 10^{-4} = 3 \times 10^{-3} = 3.000$$

Resposta: 3000 vezes. Obs.: em geral esse é o aumento inicial para observação ao microscópio de transmissão. Uma vez localizada a área de interesse usamos aumentos bem maiores.

4.

	Microscópio óptico	Microscópio eletrônico
Poder de resolução	2 μm	2 nm
Lentes	De vidro	Eletromagnéticas
Emissão do filamento	Luz visível	Elétrons (radiação não-visível)

5. A formação da imagem no microscópio de transmissão se dá sobre uma tela fluorescente. Nos pontos em que os elétrons foram barrados pelos átomos da amostra a imagem é escura, enquanto os elétrons não barrados incidem sobre a tela fornecem áreas claras. Átomos de elementos mais leves tendem a deixar passar mais elétrons e elementos mais pesados tendem a barrar mais elétrons.

6. Para que os elétrons não sejam barrados ou desviados por moléculas de ar (O_2 , CO_2 , H_2O vapor) na coluna. O oxigênio também causaria a combustão do filamento.

7. Fixação: para estabilizar a forma e estrutura química

Desidratação: para remover a água e substituí-la por um solvente orgânico (acetona ou etanol)

Inclusão: substituição do solvente orgânico por resina

Ultramicrotomia: cortes ultrafinos na resina endurecida contendo fatias das células.

Contrastação: impregnação com metais pesados (urânio, chumbo) para aumentar o contraste das estruturas celulares, especialmente membranas.

8. No microscópio eletrônico de varredura as imagens são tridimensionais. O feixe de elétrons varre a superfície da amostra gerando um sinal para um monitor de TV.

9. Unidade de membrana, ribossomas, organelas em geral, cromatina, estruturas intracelulares.

10. Superfície celular, pseudópodes, exoesqueleto de artrópodes, superfície de folhas, dentes, conchas e outras estruturas mineralizadas.

Módulo 1 - Aula 3

1.

- Fixação: manter a estrutura geral da célula
- Infiltração com glicerol: o glicerol impede a formação de cristais de gelo durante o congelamento. Os cristais perfurariam e destruiriam a célula
- Fratura: feita a baixa temperatura e sob vácuo, expõe as superfícies das membranas plasmática e das organelas intracelulares.
- Evaporação com platina: feita em ângulo de 45° visa criar áreas sombreadas segundo o relevo das proteínas de membrana e estruturas celulares.
- Evaporação com carbono: feita homogeneamente por toda a réplica, cria uma "base", sendo o carbono transparente ao feixe de elétrons.
- Limpeza da réplica: feita com ácidos ou bases fortes. Remove restos celulares que estejam grudados na réplica.
- Lavagem: feita com água. Depois dela a réplica é recolhida sobre uma grade e levada ao microscópio eletrônico de transmissão.

2. O plano médio, isto é, aquele para onde convergem as caudas hidrofóbicas dos fosfolípidos.
3. Às proteínas integrais da membrana.
4. Mostrou que as proteínas se inserem na bicamada lipídica, podendo ser de diferentes tamanhos e estar distribuídas aleatoriamente (ao acaso) ou formando arranjos como linhas paralelas, círculos, aglomerados, etc. Daí a comparação a um mosaico.

Módulo 1 - Aula 4

1. As células, para serem mantidas em cultura, devem estar em ambiente estéril, a temperatura, pressão e pH dentro de uma faixa que permita sua sobrevivência e multiplicação. O meio de cultura deve conter ainda todos os nutrientes necessários (proteínas, açúcares, lipídeos, sais minerais) e fatores de crescimento, como vitaminas e hormônios.
2. Cultivar *in vitro* consiste em retirar células de um organismo e fazê-las sobreviver em um recipiente como uma placa de Petri, tubo de ensaio ou outros. Algumas células se multiplicam *in vitro*, outras apenas sobrevivem e se diferenciam, geralmente aderindo às paredes do vidro ou plástico do recipiente. *In vivo* consiste em manter células dentro de um organismo, que será seu hospedeiro. Alguns protozoários parasitas, como o *Toxoplasma gondii*, são normalmente mantidos em camundongos, já que morrem rapidamente se não penetrarem em outras células. Alguns heterocáritons formam tumores que secretam anticorpos de interesse para os pesquisadores. Esses tumores também são mantidos por passagem entre animais.
3. É uma cultura inicial, obtida a partir de células extraídas de um animal.
4. Tanto a célula tumoral quanto a transformada podem se multiplicar indefinidamente; entretanto, a célula transformada guarda as características do tipo celular que lhe deu origem (e.g., a cultura de células epiteliais transformadas forma uma camada com as células unindo-se entre si, como num epitélio normal), enquanto a célula cancerosa cresce desorganizadamente, formando grumos ou massas.
5. É uma célula formada pela fusão de dois tipos celulares diferentes. Seu núcleo reúne o DNA das duas células originais e ela se comporta combinando características das duas células originais.

6. C, pois com a alta taxa de multiplicação será mais rápida a obtenção de grandes quantidades da proteína secretada.

7. São células pluripotentes, que ao se multiplicar podem dar origem a todos os tipos celulares que constituem um organismo.

Módulo 1 - Aula 5

1. Porque depois de rompidas as células é impossível saber de que tipo celular vieram as organelas.

2. Choque osmótico, choque térmico, maceração, sonicação e tratamento com detergente não iônico.

3. Por centrifugação diferencial, que consiste em centrifugar o homogeneizado usando velocidades e tempos de centrifugação progressivamente maiores para colocar no pellet organelas cada vez menos densas.

4. É a centrifugação de uma amostra sobre várias camadas de soluções de uma substância inerte (geralmente sacarose) que tenham concentrações e, portanto, densidades cada vez maiores. Assim a amostra que está sendo centrifugada vai encontrar cada vez mais resistência até que a solução numa certa região do tubo tem densidade igual à da amostra, que pára de migrar para o fundo, formando uma banda que pode ser recolhida.

5. Na cromatografia de partição pequenas moléculas como fosfolipídeos, lipídeos neutros ou aminoácidos livres são separados conforme seu grau de polaridade ou apolaridade.

6. Na cromatografia de filtração em gel ou peneira molecular, proteínas e glicoproteínas podem separadas conforme sua massa molecular.

7. Na cromatografia de troca iônica as moléculas são separadas conforme sua carga.

8. Na cromatografia de afinidade uma molécula pode ser separada de uma mistura por sua ligação específica com outra molécula, geralmente um anticorpo, que foi acoplado à resina.

9. A eletroforese usa um campo elétrico para separar ácidos nucléicos ou proteínas, que foram previamente desnaturadas e tratadas com SDS, conforme sua massa molecular. A massa molecular de uma certa proteína da amostra pode ser feita por comparação com padrões colocados na mesma corrida eletroforética. A eletroforese serve também para acompanhar a purificação de uma proteína, porque permite observar quantas proteínas diferentes estão presentes numa amostra.

10. Na técnica de Western blot proteínas já separadas por eletroforese podem ser transferidas para uma membrana de nitrocelulose, ficando acessíveis à incubação com anticorpos ou outros ligantes específicos. Assim, é possível mostrar que uma certa proteína está presente numa amostra porque um anticorpo específico a reconheceu. Ou mostrar que o soro de um paciente reconhece antígenos de um parasito, portanto ele já teve contato com o parasito.

Módulo 1 - Aula 6

1. São proteínas sintetizadas pelos linfócitos B que se ligam a moléculas ou organismos estranhos a um dado indivíduo.

2. Como cada molécula de anticorpo possui dois sítios de ligação para cada antígeno, é possível a formação de ligações cruzadas, ou seja, um dos braços da molécula de anticorpo se liga a um antígeno e o outro a outro antígeno (veja esquema).

3. Defina:

Anticorpos policlonais – Reconhecem várias porções diferentes de um antígeno e resultam da produção de várias linhagens de linfócitos B. Pode-se dizer que são uma mistura de anticorpos diferentes que reconhecem moléculas de um mesmo organismo. (veja Figura 6.4).

Anticorpo monoclonal- Reconhece uma determinada sequência antigênica e deriva de uma única linhagem clonal de um linfócito B.

Soro imune – é o soro extraído um animal previamente inoculado com determinados antígenos, por exemplo, o soro antiofídico e o soro anti-rábico.

Hibridoma – é o resultado da fusão de uma célula tumoral (daí o sufixo oma) com um linfócito B. O resultado é uma célula que se multiplica indefinidamente, como a célula tumoral, e que secreta continuamente anticorpos, como o linfócito B.

4. Associações de anticorpos e moléculas.

Microscopia óptica - fluorocromos (fluoresceína, rodamina) ou enzimas (peroxidase, fosfatase alcalina).

Microscopia eletrônica – partículas de ouro coloidal.

5. São proteínas ou glicoproteínas derivadas de animais ou plantas que reconhecem (se ligam) seqüências específicas de açúcares presentes na superfície de células.

Módulo 2 - Aula 7

Exercício inicial

1. [as estruturas intracelulares como núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vacúolos].
2. [proteínas] [lipídeos] e [carboidratos ou glicídeos].
3. [fosfolipídeo] [bicamada].
4. [hidrofílica] [hidrofóbica] [anfipáticas].
5. [fora] [dentro]. [entre as moléculas de lipídeos] [se ligam a proteínas ou lipídeos da membrana apenas no lado extracelular dela]

Exercício final

1. A membrana é formada por uma bicamada lipídica onde se inserem mais ou menos profundamente as proteínas. Os lipídeos da bicamada são anfipáticos e as cabeças polares ficam voltadas para o exterior, enquanto as caudas apolares ficam voltadas para o interior da bicamada.
2. Meio intracelular é tudo que fica da membrana plasmática para dentro da célula. Meio extracelular é o que fica da membrana plasmática para fora. Os compartimentos delimitados por retículo endoplasmático, complexo de Golgi e o interior de organelas e vacúolos também são considerados como meio extracelular, já que também ficam separados do citoplasma por uma membrana.

3. É qualquer espaço limitado por uma membrana contínua e separado do meio externo ou do citosol. A mitocôndria, por exemplo, possui duas membranas e dois compartimentos, o intermembranas e a matriz mitocondrial, separados pela membrana mitocondrial interna.
4. Numa bicamada onde as cabeças polares ficam voltadas para o exterior, enquanto as caudas apolares ficam voltadas para o interior da bicamada.
5. Eles podem se deslocar livremente no plano da membrana.
6. As caudas hidrofóbicas dos ácidos graxos podem oscilar, os fosfolipídeos podem realizar movimentos de rotação em torno de seu próprio eixo e de translação no plano do folheto em que estão inseridos.
- 7) É quando um fosfolipídeo muda de folheto na bicamada. Esse é um evento raro que necessita de enzimas específicas, as flipases, para ocorrer.
8. a- Quanto mais curtas as cadeias de ácidos graxos, mais fluida a membrana.

b- Quanto mais fosfolipídeos com cadeias insaturadas, mais fluida a membrana.
9. O colesterol é uma molécula pequena e muito rígida por conta dos anéis aromáticos. Pelo seu tamanho, ela se insere entre as moléculas de fosfolipídeo, diminuindo o espaço disponível para os movimentos deles.
10. A composição das membranas varia com relação à quantidade de cada tipo de fosfolipídeo. Além disso, alguns fosfolipídeos nunca são flipados só estando presentes em um dos folhetos da bicamada lipídica. Fosfatidilcolina e a esfingomielina se distribuem apenas na camada voltada para o meio externo, enquanto a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina se localizam apenas na camada interna.
11. Algumas regiões são compostas por lipídeos de menor fluidez que permanecem agregados, formando domínios com funções específicas. Quando esses domínios ocorrem em invaginações da membrana, são chamados cavéolas.
12. São regiões da membrana em que se acumulam ácidos graxos de cadeias mais longas e colesterol, formando regiões menos fluidas, onde a espessura da bicamada é maior e em que apenas proteínas com determinada expansão das alfa hélices podem inserir-se.

1. Porque a técnica separa os dois folhetos da bicamada lipídica, expondo protuberâncias que correspondem às proteínas transmembrana.

2.

- proteína transmembrana: é aquela que atravessa a bicamada lipídica.
 - proteína periférica: é aquela que se liga de modo não covalente a lipídeos ou a proteínas transmembrana.
 - proteína ancorada: é um tipo de proteína integral que se insere na bicamada por uma porção lipídica à qual se liga por uma seqüência de açúcares.
 - alfa-hélice protéica e fita beta-pregueada. Os aminoácidos da cadeia polipeptídica podem atravessar a bicamada lipídica (hidrofóbica), enrolando-se numa hélice onde os aminoácidos hidrofílicos fiquem voltados para o interior da hélice e os hidrofóbicos para o exterior. Esse é o caso da alfa-hélice. Na fita beta-pregueada, os aminoácidos formam arranjos mais lineares e rígidos, que atravessam a bicamada lipídica, formando um “barril”.
 - proteína unipasso: são aquelas cuja cadeia polipeptídica atravessa a bicamada apenas uma vez.
 - proteína multipasso: são aquelas cuja cadeia polipeptídica vai e vem através da membrana várias vezes.
 - Porinas - são proteínas do tipo “barril”, que formam poros aquosos em algumas membranas, como a membrana externa das mitocôndrias.
 - complexo protéico: é quando dois ou mais polipeptídeos de membrana, iguais ou diferentes, se associam para constituir um complexo funcional.
3. Podem se deslocar lateralmente na bicamada lipídica e rodar em torno de seu eixo.
4. É uma célula formada pela fusão do citoplasma e dos núcleos de duas outras, diferentes entre si.
5. São áreas da membrana onde se concentram proteínas e, conseqüentemente, funções específicas.

6. São mecanismos que impedem o livre fluxo de proteínas no plano da membrana. Podem ser associações de proteínas em complexos de membrana ou associações com elementos do citoesqueleto ou do meio extracelular ou mesmo regiões de adesão entre duas células vizinhas que impedem a passagem de proteínas da face apical da membrana para a superfície basolateral e vice-versa.
7. Sempre se ligam a proteínas ou lipídeos da membrana formando, respectivamente glicoproteínas e glicolipídeos.
8. É a camada de resíduos de cadeias de açúcares que reveste as células.
9. As proteoglicanas são moléculas muito grandes nas quais um grande número de cadeias de açúcar se liga a uma cadeia protéica. São características do meio extracelular, especialmente no tecido conjuntivo. As glicoproteínas são proteínas nas quais a parte protéica é a principal e possui acopladas a ela cadeias de açúcares.
10. Por causa da sua via de biossíntese, no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Os açúcares são adicionados voltados para o interior dos elementos do Golgi e, quando as vesículas que dali brotam se fundem à membrana, os açúcares ficam voltados para fora.

Módulo 2 - Aula 12

1.
 - a) Correto, moléculas com carga (íons) formam em volta de si uma camada de solvatação de moléculas de água incompatível com o caráter hidrofóbico da bicamada lipídica da membrana.
 - b) Errado, apenas carreadores ligam-se temporariamente aos solutos que transportam. Por isso mesmo, poucas moléculas são transportadas por vez.
 - c) Errado, a célula depende de uma instabilidade dinâmica que sinalize estados de atividade e repouso.
 - d) Errado, os solutos passam em grande quantidade e velocidade através dos canais numa velocidade 1.000 vezes superior ao transporte através de carreadores.
 - e) Errado, além de o antiporte ser uma troca de moléculas entre dois compartimentos, o simporte é o transporte necessariamente conjunto de um íon e uma segunda espécie molecular, por exemplo a glicose, sempre no mesmo sentido.

2. A frase é uma boa analogia. Enquanto um enorme número de grãos passa pelo funil em poucos segundos, levaríamos muito mais tempo para colocar igual quantidade de grãos usando uma colher. Cada grão deve estar na colher, enquanto nem todos os grãos entrarão em contato com as bordas do funil.

3. Porque, para que ele ocorra, é necessário que a bomba de Na^+/K^+ esteja mantendo maior a concentração de sódio no meio extracelular. Do contrário, a célula poderia até perder glicose para o meio externo.

4. Aquaporinas são proteínas transportadoras de água encontradas nas membranas de várias células animais. Nos dutos das células coletoras essas proteínas aceleram a reabsorção da água perdida durante a filtração do sangue, impedindo a excessiva diluição da urina e a perda de água do organismo.

5. O sódio pode ser transportado a favor do gradiente de concentração (transporte passivo) por canais iônicos e também no co-transporte de sódio e glicose. O transporte ativo de sódio (contra o gradiente e com gasto de energia) é feito pela bomba de sódio/potássio. No caso do sódio, a favor do gradiente quer dizer para dentro da célula; e contra o gradiente, para fora da célula.

6. A frase está incorreta. A permeabilidade seletiva se refere aos diferentes graus de afinidade que as moléculas que formam a bicamada lipídica possuem pelas moléculas dos meios intra e extracelular. A bicamada é permeável a várias substâncias tóxicas que sejam solúveis em lipídeos (metanol, benzeno), enquanto substâncias “boas” como a glicose só passam através de proteínas específicas da membrana, pois ela não é permeável a moléculas hidrofílicas como a glicose.

Serviço gráfico realizado em parceria com a Fundação Santa Cabrini por intermédio do gerenciamento laborativo e educacional da mão-de-obra de apenados do sistema prisional do Estado do Rio de Janeiro.



Maiores informações: www.santacabrini.rj.gov.br

ISBN 85-7648-148-0



9 788576 481485



UENF
Universidade Estadual
do Norte Fluminense



Universidade Federal Fluminense

uff



UNIRIO



**FUNDAÇÃO
SANTA CABRINI**
Provedora de acesso à Cidadania



FAPERJ
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo
à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro



**GOVERNO DO
Rio de Janeiro**

SECRETARIA DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA



**Ministério
da Educação**

