



Ciências Biológicas

Cadernos CB Virtual 1

❖ Rafael Angel Torquemada Guerra (org.)

❖ Carlos Alberto de Almeida Gadelha ❖ Christianne Maria Moura Reis

❖ Hamilton Soares da Silva ❖ Luis Fernando Marques dos Santos

❖ Maria Regina de Vasconcellos Barbosa ❖ Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

❖ Marta Maria Gomes Van der Linden ❖ Pedro Roberto Pontes Santos



**Universidade Federal da Paraíba
Universidade Aberta do Brasil
UFPB VIRTUAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS À DISTÂNCIA**

Caixa Postal 5046– Campus Universitário - 58.051-900 – João Pessoa

Fone: 3216-7781 e 8832-6059

Home-page: portal.virtual.ufpb.br/biologia

UFPB

Reitor

Rômulo Soares Polari

Pró-Reitor de Graduação

Valdir Barbosa Bezerra

UFPB Virtual

Coordenador

Lucídio dos Anjos Formiga Cabral

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Diretor

Antônio José Creão Duarte

Departamento de Sistemática e Ecologia

Chefe

Juraci Alves de Melo

**Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas à Distância**

Coordenador

Rafael Angel Torquemada Guerra

Coordenação de Tutoria

Márcio Bernardino da Silva

Coordenação Pedagógica

Isolda Ayres Viana Ramos

Coordenação de Estágio

Paulo César Geglio

Apoio de Designer Instrucional

Luizângela da Fonseca Silva

Artes, Design e Diagramação

Romulo Jorge Barbosa da Silva

Apoio Áudio Visual

Edgard Adelino Ruiz Sibrão

Ilustrações

Christiane Rose de Castro Gusmão

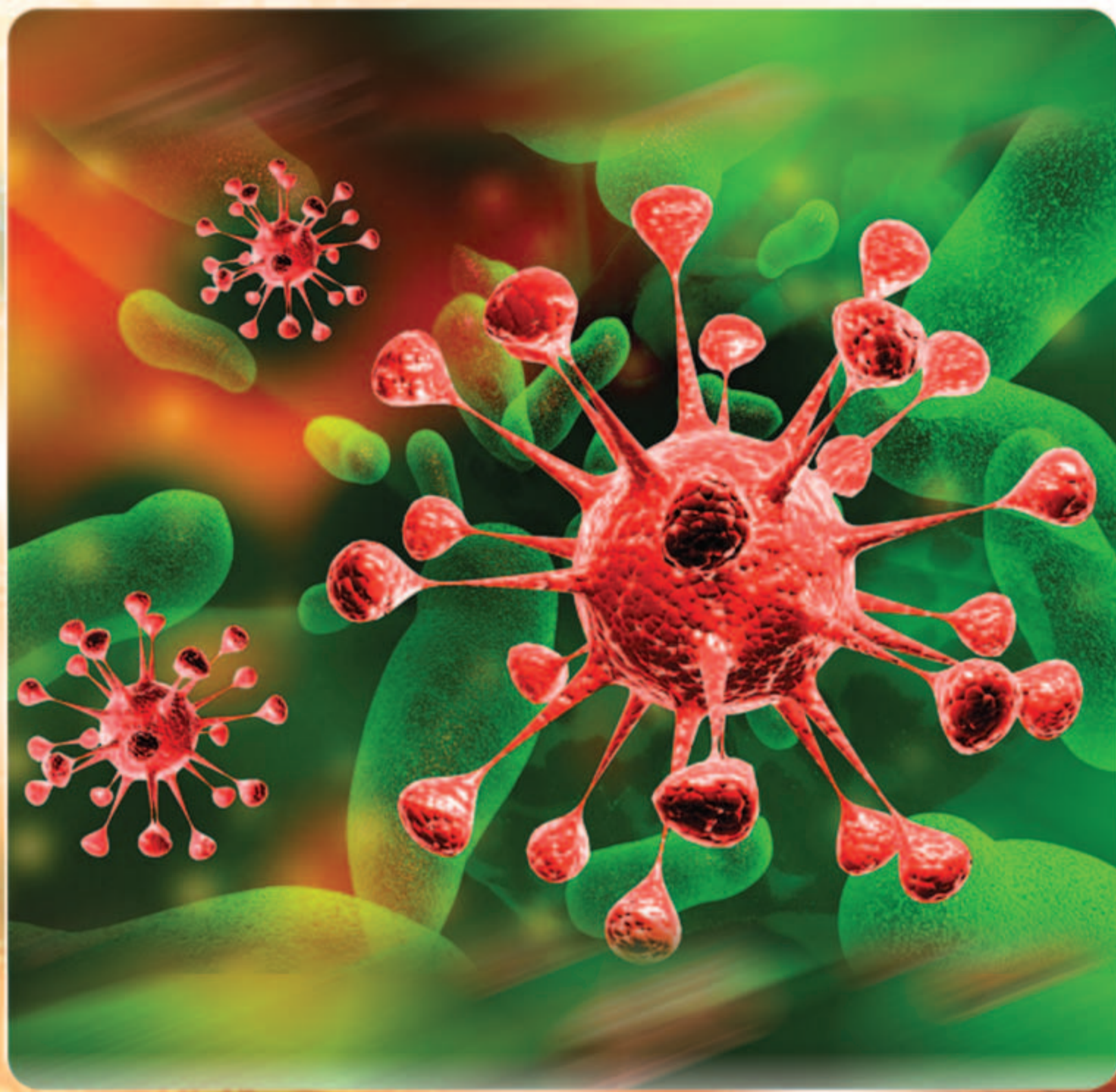
Fotos da contracapa: Rafael Angel Torquemada Guerra

Arte e Montagem da Contracapa: Romulo Jorge Barbosa da Silva

C 569 Cadernos Cb Virtual 1 / Rafael
Angel Torquemada Guerra ... [et al.]-
João Pessoa: Ed. Universitária, 2011.
516 p. : Il.
ISBN: 978-85-7745-678-9

Educação a Distância. 2. Biologia
I. Guerra, Rafael Angel Torquemada.
UFPB/BC CDU: 37.018.43

Este material foi produzido pelo curso de Licenciatura em Ciências Biológicas a Distância da Universidade Federal da Paraíba. A reprodução do seu conteúdo está condicionada à autorização expressa da UFPB.



Biologia e Fisiologia

Celular

Luis Fernando Marques dos Santos

BIOLOGIA E FISILOGIA CELULAR

Prof. Luis Fernando Marques dos Santos

UNIDADE 1

MÉTODOS DE ESTUDO DA CÉLULA

As células podem ser classificadas em dois tipos distintos: procarióticas e eucarióticas. As células procarióticas são desprovidas de endomembranas, não apresentando, portanto, organelas intracelulares. Nestas células, o material genético encontra-se disperso no citosol. A área das ciências biológicas que estuda as células procarióticas é a microbiologia. As células eucarióticas (*eu*, verdade + *karyon*, núcleo), por sua vez, possuem um sistema de endomembranas responsável pela compartimentalização do espaço intracelular e conseqüente formação das organelas, entre as quais podemos citar: o núcleo; a mitocôndria; os peroxissomos; os lisossomos; o retículo endoplasmático; e o complexo golgiense, entre outras (figura 1.1). A estrutura e a fisiologia das células eucarióticas são estudadas pela Biologia Celular. Até o final da década de 1970, grande parte do conhecimento acerca das células eucarióticas era restrito aos aspectos morfológicos. Naquela época, a Biologia Celular era mais conhecida como Citologia. A partir de meados da década de 1980, com a incorporação de novas tecnologias, a célula passou a ser revelada sob um prisma molecular e funcional. É baseada nessa visão contemporânea que faremos a nossa viagem pelas células eucarióticas.

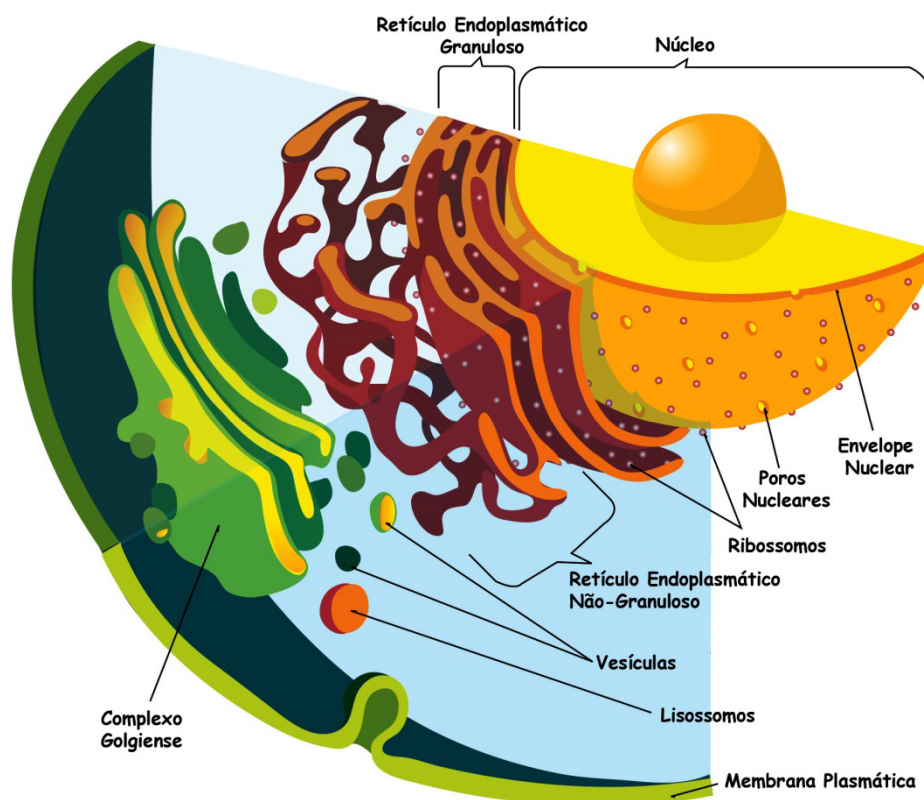


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo de uma célula eucariótica. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Endomembrane_system_diagram_en.svg

1. UM POUCO DE HISTÓRIA

1665! Este é o ponto de partida da nossa jornada pela célula. Neste ano, o cientista britânico Robert Hooke publicou o livro intitulado “*Micrographia*”. Trata-se do primeiro registro de um trabalho científico utilizando a microscopia como ferramenta de estudo para a observação e a descrição de um material biológico. Desde então, uma série de conquistas tecnológicas permitiram, aos cientistas, uma maior aproximação do mundo microscópico, revelando, aos poucos, o maravilhoso mundo celular e até mesmo subcelular.

Diversos pesquisadores do século XVII contribuíram para os primórdios da Biologia Celular, ramo da ciência que estuda as células e que inicialmente era denominado de Citologia. Alguns destes pesquisadores merecem destaque, como Antonie van Leeuwenhoek, microscopista holandês, que no ano de 1674 reportou a descoberta de protozoários flagelados. Um ano mais tarde, o pesquisador relata a descoberta dos glóbulos vermelhos sanguíneos em humanos, peixes, anfíbios e suínos. Em 1677, Leeuwenhoek descreveu, pela primeira vez, o espermatozóide em diversas espécies, tais como: peixes, anfíbios, aves, cães e seres humanos. Leeuwenhoek acreditava que os espermatozóides eram parasitas que residiam nos órgãos sexuais masculinos. No ano de 1683, o cientista holandês, observou, pela primeira, uma bactéria ao estudar o tártaro dentário, descrevendo em seguida a presença de bactérias e protozoários nas fezes. Leeuwenhoek contribuiu, ainda, para o aprimoramento da microscopia, desenvolvendo uma série de microscópios e lentes especiais, marcando de vez o seu nome na história da biologia celular e da Microbiologia. Seus estudos sobre a morfologia dos espermatozóides de diversas espécies levaram o cientista alemão Nicolaas Hartsoeker, inventor do microscópio simples ‘parafuso-barril’, a postular a hipótese do homúnculo (figura 1.2), onde propunha que o espermatozóide continha um indivíduo completamente pré-formado em seu interior. O desenvolvimento de novos indivíduos seria, portanto, apenas uma questão de crescimento do homúnculo. O conceito do homúnculo ia de encontro à hipótese hereditária do preformacionismo.

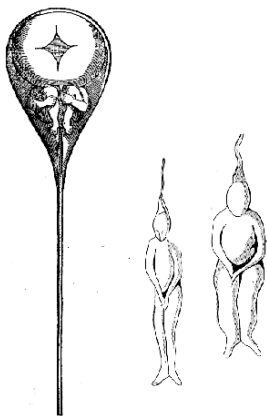


Figura 1.2 - Ilustração do Homúnculo. Nicolaas Hartsoeker, 1695.

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Preformation.GIF>

Na década de 30 do século XIX, o botânico alemão Matthias Jakob Schleiden e o fisiologista alemão Theodor Schwann propuseram a Teoria Celular, declarando que a célula é a unidade básica estrutural e funcional de todos os seres vivos, e que todas as células se originam de células pré-existentes. Alguns autores consideram este fato como marco formal do nascimento da Biologia Celular. Schwann foi um cientista bastante ativo, combatendo com veemência a Teoria da Geração Espontânea, que preconizava a origem de seres vivos a partir de matéria inanimada. Schwann atuou, também, na área de bioquímica, estudando a fermentação alcoólica por fungos e foi responsável por cunhar o termo metabolismo. As células da glia (do grego, “cola”) que recebem

o nome de Células de Schwann, e estão associadas à transmissão do impulso nervoso, é uma justa homenagem a este nobre pesquisador.

O núcleo foi a primeira organela celular a ser descrita. A descrição do núcleo é atribuída ao botânico escocês Robert Brown, que no ano de 1838 observou a organela ao estudar células de orquídeas. Entretanto, alguns autores ressaltam que estudos realizados por Leeuwenhoek, no século XVII, já reportam a observação de núcleo em hemácias de salmão, que, ao contrário das hemácias de mamíferos, são nucleadas. A segunda organela a entrar para a história foi a mitocôndria, descrita inicialmente por Albert von Kölliker no ano de 1857. Kölliker foi um cientista brilhante. O cientista suíço foi o primeiro a isolar uma célula de um tecido muscular liso, dando início a uma técnica fundamental na biologia celular que é a obtenção de células isoladas de tecidos para o estabelecimento de culturas celulares primárias. Além desta importante contribuição, Kölliker escreveu os primeiros tratados sobre Histologia e Embriologia humana. Seus estudos sobre a origem dos gametas masculinos e femininos o levaram a propor, muitas décadas antes da descoberta do DNA, que o núcleo era responsável pela hereditariedade.

No ano de 1879, o biólogo alemão Walther Flemming, ao estudar o processo de divisão celular em gúelras de salamandras, descreve, com uma precisão e clareza impressionantes, o comportamento dos cromossomos durante a mitose (figura 1.3). Os trabalhos de Flemming o colocaram no patamar de um dos mais importantes citologistas da história. Flemming foi homenageado, posteriormente, ao ter o seu nome associado a uma medalha que é concedida pela Sociedade Alemã de Biologia Celular (*Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie*) para grandes contribuições nesta área da ciência.

Nos anos de 1882 e 1883, o médico e pesquisador alemão Heinrich Hermann Robert Koch, utilizando a anilina como corante, identificou os microorganismos causadores da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e da cólera (*Vibrio cholerae*). A tuberculose era uma das principais causas de morte no século XIX. Por sua descoberta, Robert Koch foi contemplado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina no ano de 1905. Koch é considerado, junto com Louis Pasteur, um dos fundadores da Microbiologia.

O uso de técnicas para a visualização de tecidos e células começa a despontar no final do século XIX. O cientista alemão Paul Ehrlich foi um dos que contribuiu bastante para o desenvolvimento das técnicas de coloração, tendo sido o primeiro pesquisador a utilizar a fluoresceína como corante celular. Sua tese de doutorado, defendida no ano de 1878, foi um estudo sobre a teoria e a prática de coloração de tecidos animais. Ehrlich demonstrou que os corantes poderiam ser classificados como básicos, ácidos ou neutros. Os seus trabalhos sobre a coloração dos grânulos de células sanguíneas são um marco na história da hematologia, além de terem contribuído sobremaneira para a biologia celular. Ehrlich foi um cientista fabuloso, tendo atuado em diversas áreas, tais como: a já citada hematologia; a imunologia, através da qual ele recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1908; e a quimioterapia. Ehrlich foi o fundador da quimioterapia ao criar o primeiro fármaco sintético, o salvarsan, que foi utilizado, a partir da década de 1910, no tratamento da sífilis. Ehrlich ainda contribuiu para a ciência pelos seus estudos sobre a barreira hematoencefálica e pelo estabelecimento do conceito de receptores celulares.

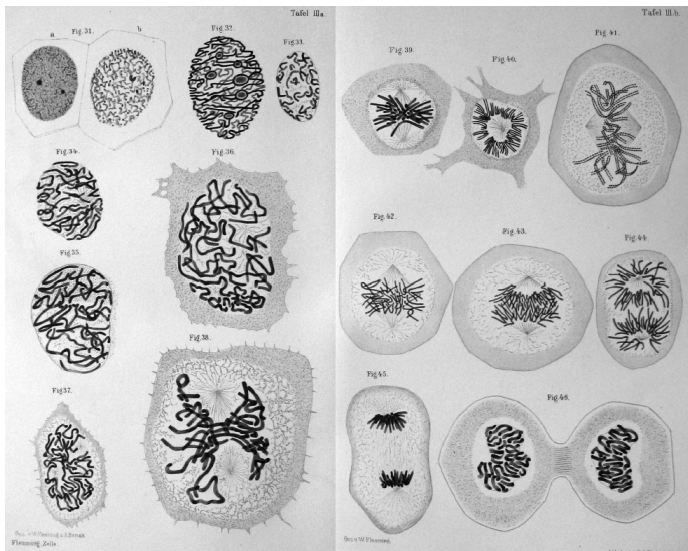


Figura 1.3 - Ilustração original dos estudos de Walther Flemming sobre a divisão celular.

Fonte: *Zell-substanz, Kern und Zelltheilung*, Flemming, 1882.

No final do século XIX, o Complexo Golgiense, conhecido anteriormente por Complexo de Golgi, é terceira organela a entrar para a história. O fisiologista italiano Camillo Golgi, utilizando técnicas de impregnação de tecidos com metais pesados, foi primeiro a descrever a organela, no ano de 1898. Os trabalhos de Camilo Golgi foram fundamentais para que o médico e pesquisador espanhol Santiago Ramón y Cajal, juntamente com outros histologistas, desenvolvessem métodos de coloração que permitiriam o estabelecimento das fundações da anatomia microscópica. Os estudos de Cajal o levaram à conclusão de que as unidades básicas do sistema nervoso eram representadas por elementos celulares individualizado, posteriormente denominados de neurônios pelo anatomista alemão Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz. Cajal é considerado, por muitos, o fundador da neuroanatomia por estabelecer os princípios básicos da organização do sistema nervoso. Camilo Golgi e Santiago Ramón y Cajal foram agraciados, no ano de 1906, com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

:: SAIBA MAIS... ::



Conheça um pouco mais sobre a vida de Paul Ehrlich, Camilo Golgi e Santiago Ramón y Cajal nos endereços abaixo.

Nobel Prize Foundation:

→ http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/ehrllich-bio.html

→ http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/golgi.html

→ http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1906/cajal-bio.html

2. UM POUCO DE TECNOLOGIA AJUDA...

Estudar células no século XIX não era uma tarefa muito fácil. Os microscópios ainda apresentavam uma série de restrições. A construção do primeiro microscópio composto foi sugerida por Kepler no ano de 1611. Até então, grande parte dos microscópios eram simples, ou seja, constituídos por apenas uma única lente. Somente no final do século XIX começaram a surgir os primeiros microscópios binoculares e os microscópios com várias objetivas, o que permitia uma observação mais apropriada do material biológico (o revólver, peça que dá suporte a mais de uma objetiva foi inventada por Ernst Leitz no ano de 1873). Entretanto, ainda era

necessário aprimorar o sistema óptico. Os trabalhos teóricos do físico alemão Ernst Karl Abbe, em conjunto com o desenvolvimento de um sistema adequado de lentes, pelo, também alemão, Carl Zeiss, permitiram um avanço extraordinário no campo da microscopia. Zeiss construiu uma série de lentes que permitiram a obtenção de imagens no limite teórico da luz visível. Era o início de uma nova era.

Em 1924, os cientistas franceses Antoine Lacassagne e Jeanne Lattés, ao injetarem polônio radioativo em ratos e coelhos, desenvolveram uma nova metodologia para a observação de órgãos e tecidos animais sob microscopia óptica. A nova técnica foi denominada autohorradiografia e abria novas possibilidades de investigação celular e tecidual.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Faça uma pesquisa sobre os isótopos radioativos e a sua aplicabilidade nas ciências biológicas!

Em 1930, Lebedeff projetou e construiu o primeiro microscópio de interferência. Dois anos mais tarde, o físico holandês Frits Zernike inventou o microscópio de contraste de fase, mudando os paradigmas da microscopia e da biologia celular. Até então, o uso de corantes era obrigatório para a visualização das estruturas internas de uma célula e como veremos adiante, o uso de corantes implica na morte da célula. Com o advento do microscópio de contraste de fase passa a ser possível visualizar algumas estruturas intracelulares sem a necessidade do uso de corante, portanto, em células vivas! Zernike procurou negociar a patente do seu invento com alguns fabricantes de microscópios, incluindo a já poderosa Zeiss, que subestimaram o potencial do seu microscópio de contraste de fase. No ano de 1953, Frits Zernike foi agraciado com o Prêmio Nobel de Física pelo seu invento.

No início da década de 1930 entramos na era da microscopia eletrônica, o que conferia uma nova dimensão à visualização das células e de suas estruturas, abrindo possibilidades para novas investigações e (re)descobertas. Em 1931, o engenheiro elétrico alemão Max Knoll e o físico alemão Ernst Ruska constroem o primeiro microscópio eletrônico de transmissão. Dois anos depois, Ruska constrói o primeiro microscópio eletrônico que ultrapassa a resolução do microscópio óptico. Logo em seguida, é obtida a primeira eletromicrografia de uma amostra biológica fixada com ósmio. No final da década de 1930, a Siemens passa, com o auxílio de Ernst Ruska, a produzir e comercializar o primeiro microscópio eletrônico de transmissão. Pelas suas contribuições científicas, Ruska dividiu o Prêmio Nobel de Física no ano de 1986, com o físico alemão Gerd Binnig e o físico suíço Heinrich Rohrer, inventores, em 1981, do microscópio eletrônico de tunelamento, que permite a obtenção de imagens tridimensionais (de superfície) dos objetos ao nível atômico. Em 1937, o físico alemão Manfred von Ardenne dá início aos estudos sobre os princípios físicos que culminariam na construção do primeiro microscópio eletrônico de varredura. Apesar da criação dos microscópios eletrônicos de transmissão no final da década de 1930, somente no início da década de 1950, com a criação dos primeiros ultra-micrótomos, pelo biólogo celular canadense Keith Roberts Porter e pelo mecânico americano Joseph Blum, foi possível dar um salto significativo na visualização dos materiais biológicos sob microscopia

eletrônica de transmissão. Os ultra-micrótomos são um aprimoramento dos micrótomos utilizados na preparação de lâminas histológicas e permitem a obtenção de seções extremamente delgadas (entre 20 e 100 nm) do material a ser examinado sob microscopia eletrônica de transmissão.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Você já ouviu falar em microscopia de força atômica? Faça uma pesquisa e descubra as suas aplicações, vantagens e limitações.

3. MUNDANDO O CURSO DA HISTÓRIA

A década de 1940 reservava novos horizontes para a biologia celular. O pesquisador e médico americano Albert Hewett Coons, ao estudar a febre reumática, iniciou uma grande revolução na imunologia e na biologia celular. Ao estabelecer a técnica de imunofluorescência, a partir da conjugação de anticorpos específicos com corantes fluorescentes, permitindo, assim, a identificação e a localização celular de proteínas, Coons mudaria, radicalmente, o curso da história da biologia celular. Setenta anos depois, a técnica de imunofluorescência é rotina em diversos laboratórios de Biologia Celular, Imunologia, Farmacologia, Parasitologia, Patologia, Microbiologia e em todos os outros onde se faz necessária a identificação ou a localização celular de uma proteína.

Durante as décadas de 1940 e 1950, um grupo de pesquisadores desenvolveu uma série de trabalhos que iria revolucionar a biologia celular. O ponto de partida foi o estabelecimento da técnica de fracionamento subcelular, técnica, esta, que permite o isolamento de diversos compartimentos celulares, como veremos mais adiante. O biólogo belga Albert Claude, o biologista celular romeno George Emil Palade, e o biologista britânico, radicado na Bélgica, Christian de Duve, a partir da separação e análise dos componentes celulares, identificaram diversas estruturas e organelas, tais como os lisossomos, os peroxissomos e o retículo endoplasmático. Adicionalmente, eles desvendaram uma série de processos celulares, com destaque para a via secretória e a intrínseca relação entre o retículo endoplasmático e o complexo golgiense. A biologia celular abria, ainda que de forma tímida, mas decisiva, as portas para uma visão mais funcional da célula. Os três pesquisadores tiveram o reconhecimento de suas contribuições para a biologia celular através da nomeação para o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina no ano de 1974.

Um passo, ainda maior, foi dado, no final dos anos 1960, com a criação da microscopia confocal. Essa história tem início, no final da década de 1950, com os trabalhos teóricos do americano Marvin Minsky, que foram fundamentais pela criação do conceito da confocalidade, e que culminaram com a construção do primeiro microscópio confocal, no final dos anos 1960, por David Egger e Mojmir Petran. A microscopia confocal, associada ao desenvolvimento da química de corantes fluorescentes, abria um novo leque para os estudos da biologia celular, permitindo a investigação de inúmeros processos celulares em células vivas. O desenvolvimento da citometria de fluxo, que começou, timidamente, no final da década de 1950, iria impulsionar, ainda mais, os estudos com corantes fluorescentes e células vivas. O primeiro modelo de citômetro de fluxo

(Model A Coulter Counter) foi produzido pelo americano Wallace H. Coulter, no ano de 1953, sendo utilizado na contagem de eritrócitos e leucócitos do sangue. Os modelos subsequentes começaram a agregar novas possibilidades de análises de parâmetros celulares ao equipamento, como o tamanho celular, por exemplo, e que culminaria, no final da década de 1960, com a incorporação da fluorescência, no modelo criado pelo alemão Wolfgang Göhde. O americano Leonard Arthur Herzenberg, na década de 1970, estenderia, ainda mais, as aplicações da citometria de fluxo ao criar o *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS), um equipamento que permite a seleção de células viáveis com base em propriedades específicas a partir do uso de sondas moleculares fluorescentes (anticorpos conjugados com corantes fluorescentes ou corantes fluorescentes com especificidade para determinados alvos celulares e moleculares). Nascia o nosso tempo.

Na primeira década do século XXI, ampliamos as possibilidades tecnológicas criadas pelos cientistas do século passado. Tornamos os processos mais ágeis e o mais importante: diminuimos o custo dos equipamentos e reagentes, permitindo que a ciência se tornasse universal e fosse feita, com qualidade, em todos os recantos do planeta.

4. MÉTODOS DE ESTUDO DA CÉLULA

Vamos conhecer de perto alguns dos principais métodos de estudo da célula. É importante que, ao final da unidade, você seja capaz de identificar o método mais adequado para cada estudo, ou seja, a abordagem experimental que permita que o seu objetivo seja alcançado.

4.1. MICROSCOPIA

A primeira pergunta que devemos nos fazer é: por que os microscópios são necessários para o estudo das células? Precisamos, então, nos lembrar do tamanho médio das células e do limite de resolução do olho humano. A maioria das células mede entre 1 e 100 micrômetros (μM). Uma bactéria pode medir entre 0,5 e 1 μM , enquanto que um óvulo de um ouriço-do-mar, pode medir até 200 μM (figura 1.4). As estruturas internas de uma célula são ainda menores: as mitocôndrias medem cerca de 200 nm; os ribossomos, cerca de 50 nm; e uma proteína globular, cerca de 5 nm. O limite de resolução do olho humano é de apenas 100 μM , ou seja, é necessária a utilização de um equipamento que permita ampliar as células e as suas estruturas internas para que possamos observá-las e estudá-las.

4.1.1 MICROSCOPIA ÓPTICA COMUM

O microscópio óptico comum utiliza a luz do visível como fonte luminosa. A invenção do primeiro microscópio composto, no ano de 1590, é creditada aos holandeses Hans e Zacharias Janssen. Nestes 400 anos, o microscópio foi recebendo uma série de aprimoramentos técnicos, tornando-se o braço direito do biólogo celular. A figura 5 mostra um microscópio óptico comum e seus principais componentes.

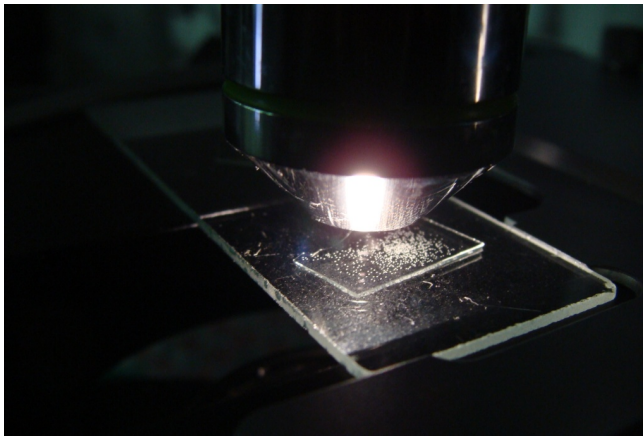


Figura 1.4 - Óvulos de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* sendo observados sob microscopia óptica comum. Os óvulos são os pontos brancos sobre as lâminas e medem cerca de 100 μ M. Fonte: Luis Fernando Marques-Santos (DBM/UFPB)

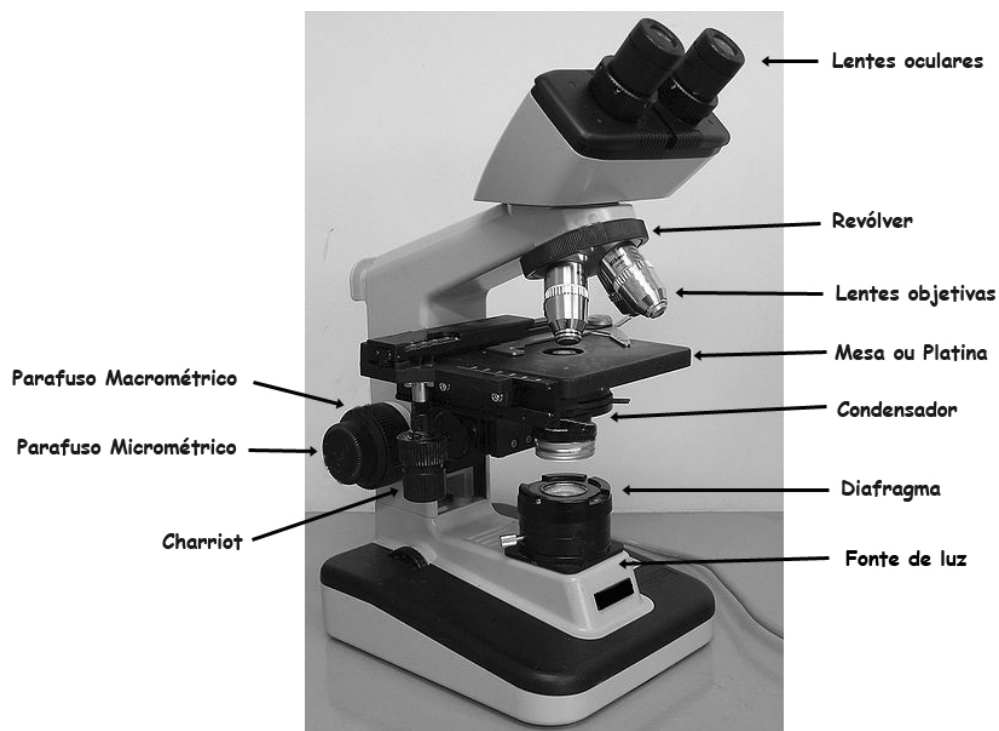


Figura 1.5 - Microscópio Óptico Comum e seus principais componentes. Modificado de [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Optical microscope nikon alpha%2B.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Optical_microscope_nikon_alpha%2B.jpg)

Os microscópios ópticos atuais conseguem aumentar um objeto em até 1000 vezes o seu tamanho original. Esse aumento depende, basicamente, do conjunto de lentes utilizadas (objetivas e oculares) e que constituem a parte óptica do microscópio. As lentes objetivas são assim denominadas por estarem próxima ao objeto, e a lentes oculares, por estarem próxima aos olhos do observador. Cada lente, tanto a objetiva quanto a ocular, é, na realidade, composta por um conjunto de lentes.

O aumento total observado corresponde ao aumento proporcionado pela lente objetiva amplificado pela lente ocular. Na medida em que ampliamos o aumento total reduzimos o diâmetro do campo de observação. A tabela 1.1 mostra uma relação entre o aumento total e o diâmetro do campo de visão considerando um microscópio com uma lente ocular SWF (super campo de visão) que proporciona um aumento 10 vezes (x) sobre o aumento da lente objetiva.

Lente Ocular (aumento em x)	Lente Objetiva (aumento em x)	Aumento Final (x)	Diâmetro do Campo de Observação (mm)
10	4	40	5,3
10	10	100	2,12
10	20	200	1,06
10	40	400	0,53
10	100	1000	0,21

Tabela 1.1 - Relação entre aumento total e diâmetro do campo de observação.

A resolução máxima obtida com o microscópio óptico é limitada pelo comprimento de onda da luz no espectro do visível (entre 400 e 700 nm). Um conceito importante em microscopia é o limite de resolução, que vem a ser a menor distância entre dois pontos que permite uma distinção entre os mesmos (individualização dos pontos). Sob condições ótimas (comprimento de onda de 0,4 μm e abertura numérica de 1,4), o limite teórico de resolução do microscópio óptico é 0,2 μm . Outro conceito importante em microscopia é o poder de resolução, que depende tanto do comprimento de onda da luz quando da abertura numérica do sistema de lentes utilizado e é inversamente proporcional ao limite de resolução, ou seja, quanto menor o limite de resolução, maior o poder de resolução. O poder de resolução expressa à capacidade do microscópio em detalhar, qualitativamente, uma imagem. A abertura numérica de uma lente objetiva corresponde à sua capacidade em captar luz. Quanto maior a abertura numérica de uma lente, maior será o seu poder de resolução. Algumas lentes requerem o uso de óleos de imersão (entre a lente e o material a ser observado) para proporcionarem um aumento na abertura numérica e conseqüentemente aumentarem o poder de resolução.

4.1.2. FIXAÇÃO E COLORAÇÃO

A fixação é o processo pelo qual preservamos um material biológico para posterior análise, sendo fundamental por impedirmos a degradação química ou microbiológica do espécime de interesse. Durante o processo de fixação é importante preservamos as estruturas celulares o mais próximo possível das condições naturais, mantendo assim as suas características morfológicas originais.

A fixação pode ser obtida por processos químicos ou físicos. A fixação física mais comum é a fixação por calor, muito utilizada na preparação de esfregaços sanguíneos utilizados nos hemogramas. Entretanto, os processos de fixação química são os mais utilizados. A fixação química pode ocorrer por promover a ligação cruzada entre macromoléculas, como no uso do formaldeído ou glutaraldeído, ou por ação de agentes precipitantes/desnaturantes, como o metanol, o etanol, a acetona e ácido acético.

A coloração é uma técnica que tem como objetivo aumentar o contraste entre os componentes celulares, proporcionando, assim, uma melhor visualização destas estruturas. As estruturas subcelulares apresentam uma densidade óptica muito semelhante, o que dificulta a identificação e a visualização das mesmas sob microscopia. O emprego dos corantes na biologia celular é bastante amplo e permite a observação de uma vasta gama de moléculas e estruturas. No entanto, os corantes utilizados em microscopia óptica comum requerem que as células sejam

previamente permeabilizadas. A permeabilização é obtida, normalmente, durante o processo de fixação. Uma das desvantagens desta técnica é que, para promovermos a permeabilização, induzimos a morte celular e acabamos sendo impedidos de trabalharmos com células vivas.

Os corantes são compostos orgânicos aromáticos que apresentam um grupamento cromóforo (ou cromofórico), responsável pela interação com a radiação eletromagnética (luz) e a conseqüente absorção de determinados comprimentos de onda responsável pela coloração do objeto. A presença de insaturações nos grupos cromóforos é que confere aos corantes as suas propriedades de coloração.

Os corantes podem ser classificados com relação à presença de grupamentos iônicos de caráter ácido ou básico. Os corantes básicos possuem grupos catiônicos (carga positiva) e os corantes ácidos possuem grupos aniônicos (carga negativa). Moléculas carregadas negativamente, como o DNA ou RNA, por exemplo, interagem com corantes básicos. Esse tipo de interação recebe o nome de basofilia. Por outro lado, moléculas carregadas positivamente, como algumas proteínas ricas em resíduos de aminoácidos com cadeias laterais com cargas positivas (como a lisina, arginina ou histidina), possuem afinidades por corantes ácidos. Neste caso, a interação recebe o nome de acidofilia. Na figura 1.6 podemos observar a estrutura química dos corantes safranina, eosina e azul de metileno.

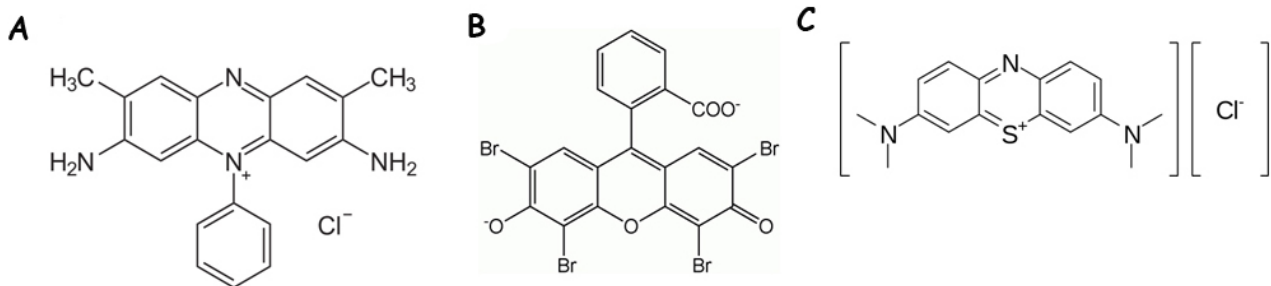
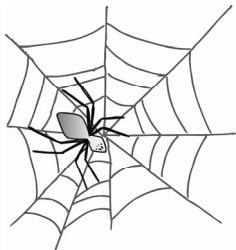


Figura 1.6 – Estrutura química da Safranina (A), Eosina (B) e Azul de Metileno (C). Fontes:
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Safranin_Cl.svg; http://en.wikipedia.org/wiki/File:Eosin_Y.png;
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Methylene_blue-2d-skeletal.svg

:: TA NA WEB!!! ::



No endereço abaixo você encontrará uma relação de diversos corantes usado em biologia celular, contendo a estrutura química e informações sobre as suas aplicabilidades:

Stains File → <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/dyes.htm>

4.2. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

A invenção do microscópio de contraste de fase abriu novas possibilidades de investigação na área de biologia celular ao permitir a visualização de células vivas. Este microscópio óptico é bastante semelhante ao microscópio óptico comum, sendo, no entanto, dotado de um sistema óptico particular (um anel de fase, localizado na objetiva, e um anel circular, localizado no condensador) que amplia a diferença de fase dos raios luminosos que atravessam a célula. Essa diferença de fase gerada pelo sistema óptico amplia o contraste entre os componentes intracelulares, permitindo uma melhor visualização do material biológico. As imagens obtidas em

microscopia de contraste de fase apresentam, caracteristicamente, um fundo de tons cinza, com regiões mais claras ou escuras no espécime. É comum notarmos uma intensidade maior de luz associadas à orlas escuras em regiões de grandes mudanças de densidade ótica, como, por exemplo, no limite entre o meio extracelular e uma célula. Isto, normalmente, se manifesta como uma leve auréola ao redor de um objeto escuro. A figura 1.7 ilustra uma célula epitelial sendo observada sob microscopia de contraste de fase, onde podemos notas as feições acima descritas.

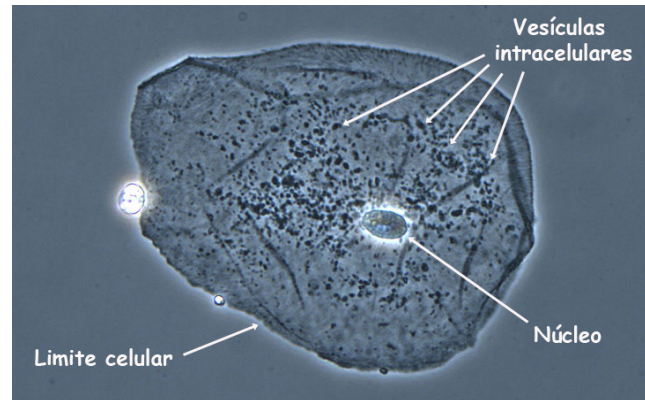


Figura 1.7 – Fotomicrografia de contraste de fase de uma célula epitelial da cavidade oral. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cheek_cell_phase_contrast.jpg.

4.3. MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO

A microscopia de campo escuro é um tipo de microscopia óptica que se utiliza de técnicas de iluminação para aumentar o contraste de células não coradas, podendo, assim como a microscopia de contraste de fase, ser utilizada para o estudo de células vivas. A microscopia de campo escuro, como o próprio nome sugere, produz uma imagem de fundo bastante escura, quase negra, destacando, assim, o material biológico, que se apresenta de forma muito brilhante (figura 1.8). Esse efeito é obtido através de um sistema óptico que elimina parte da luz, ao impedir a sua coleta pela lente objetiva, gerando assim o campo escuro e o forte contraste luminoso.

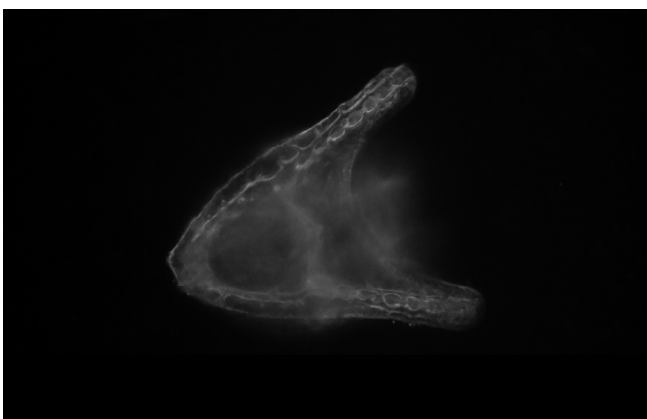


Figura 1.8 - Fotomicrografia de campo escuro de uma larva plúteo do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* 48 horas após a fertilização. Fonte: Luis Fernando Marques-Santos (DBM/UFPB)

4.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia de fluorescência foi uma grande conquista da biologia celular, ampliando de forma espetacular os estudos nessa área da ciência. A microscopia de fluorescência, assim como as outras microscopias ópticas, também utiliza a luz como fonte de radiação, sendo mais comum

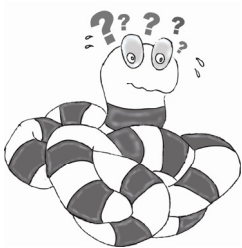
a utilização de lâmpadas de mercúrio e xenônio. No entanto, ao invés da reflexão, ou absorção da luz, pelo material biológico, a fluorescência é o fenômeno que dá suporte à microscopia que leva o seu nome.

E o que vem a ser o fenômeno de fluorescência? Inicialmente descrito por George Gabriel Stokes, no ano de 1852, ao estudar o mineral fluorita, a fluorescência é a propriedade que algumas moléculas apresentam em absorver luz em um determinado comprimento de onda, e emitir luz em outro comprimento de onda, menor do que o da luz absorvida, portanto, com menor energia. Os compostos que detêm essa propriedade são denominados fluorocromos ou simplesmente compostos fluorescentes. Tais compostos apresentam um grupamento funcional, denominado fluoróforo, que, de forma análoga aos cromóforos, são responsáveis pela absorção e emissão da luz. A fluorescência é produzida quando um elétron absorve energia e salta para um orbital mais externo. Ao retornar para o orbital original, o elétron libera energia na forma de um fóton luminoso.

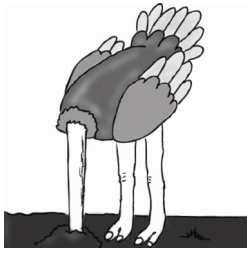
O microscópio de fluorescência utiliza filtros que selecionam o comprimento de onda que irá excitar o corante (filtro de excitação) e o comprimento de onda que será visualizado pelo observador (filtro de barreira). Uma vez que o fundo é escuro, a amostra fluorescente é facilmente visualizada.

Existem dezenas de corantes fluorescentes utilizados em biologia celular para a análise de diversos parâmetros celulares e moleculares, onde podemos citar: pH citosólico; conteúdo de DNA; potencial de biomembranas; concentração intracelular de íons; transporte de moléculas; entre outros. Uma técnica bastante utilizada na microscopia de fluorescência é a conjugação de corantes fluorescentes, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou a ficoeritrina, com anticorpos direcionados para proteínas de superfície celular ou para proteínas intracelulares.

:: PERGUNTAS?? ::



O que é um anticorpo? Qual é a natureza química de um anticorpo? Como é possível, tecnicamente, fazer com que um anticorpo se ligue a uma proteína intracelular?

:: FIQUE POR DENTRO!! ::

No ano de 2008, os cientistas americanos Martin Chalfie e Roger Tsien, e o cientista japonês Osamu Shimomura receberam o Prêmio Nobel de Química pela descoberta e desenvolvimento da Proteína Verde Fluorescente, mais conhecida como GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). A GFP foi isolada, pela primeira vez, da espécie de água-viva *Aequorea Victoria* (figura 1.9), no ano de 1962, pelo bioquímico japonês Osamu Shimomura. A GFP é constituída de 238 resíduos de aminoácidos e quando excitada com luz ultravioleta emite uma intensa fluorescência no comprimento de onda do verde. O seu grupamento cromóforo p-hidroxibenzilideneimidazolinona é formado pelos resíduos de aminoácidos da posição 65 a 67 (Ser-Tyr-Gly) presentes na sua estrutura primária e que requer apenas o oxigênio para a sua atividade fluorescente. Martin Chalfie foi o responsável pela clonagem do gene da GFP e da sua associação com o gene de diversas outras proteínas, criando proteínas fusionadas com propriedades fluorescentes. Finalmente, Roger Tsien ampliou as possibilidades da aplicação da GFP ao promover a alteração de certas sequências de resíduos de aminoácidos, gerando proteínas fluorescentes que absorvem e emitem luz em diversos comprimentos de onda do espectro. As técnicas que utilizam como sondas fluorescentes a GFP e proteínas similares permitem o monitoramento temporal e espacial de uma série de processos biológicos em células vivas, tais como: a expressão gênica; as interações proteína-proteína; a divisão celular; o endereçamento e tráfego de proteínas; biogênese de organelas; concentrações intracelulares de íons; entre outros.

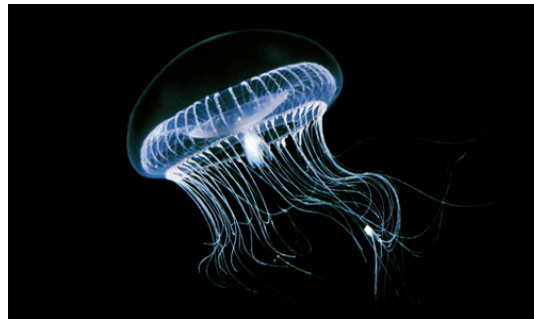
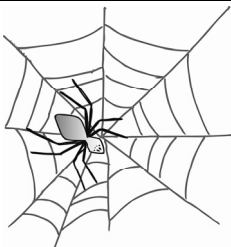


Figura 1.9 - *Aequorea Victoria*

Fonte:

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html

:: TA NA WEB!!! ::

No endereço abaixo você encontrará uma base de dados de corantes fluorescentes:
Table of Fluorochromes → <http://pingu.salk.edu/flow/fluo.html>

4.5. MICROSCOPIA CONFOCAL

A invenção do microscópio confocal foi um avanço espetacular no campo da microscopia, uma vez que possibilitou uma série de conquistas sobre a microscopia óptica convencional, com destaque para o controle da profundidade de campo, a eliminação, ou redução parcial, das informações que se encontram fora do plano focal, e a coleta de uma série de imagens seqüenciais de planos seccionais. A partir do processamento destas imagens é possível a construção de uma imagem tridimensional do espécime sob observação (figura 1.10).

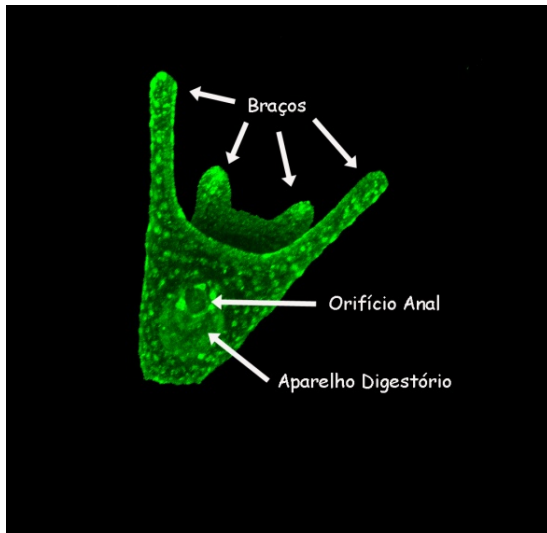


Figura 1.10 – Visão frontal de uma larva plúteo de *Echinometra lucunter* marcada com calceína-AM. Para a construção da imagem tridimensional foram realizadas 184 microfotografias em série. As fotomicrografias foram obtidas 48 horas após a fertilização. Fonte: Luis Fernando Marques-Santos (DBM/UFPB) e Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo (CPqAM/FIOCRUZ).

A microscopia confocal é a técnica de microscopia óptica que mais tem contribuído para o entendimento dos processos biológicos ao nível celular. Uma vez que a microscopia confocal também se baseia no uso de corantes vitais (que não necessitam de fixadores ou agentes permeabilizantes para atravessarem a membrana plasmática), que permitem o estudo de células vivas, diversos processos celulares antes pouco compreendidos, tais como o tráfego intracelular de vesículas, podem, hoje, serem melhores compreendidos, principalmente após o desenvolvimento das técnicas baseadas no uso da GFP. O microscópio confocal utiliza, como fontes luminosas, os lasers de argônio ou hélio/neônio ou, mais raramente, lâmpadas de mercúrio e xenônio (como os microscópios de fluorescência).

A figura 1.11 mostra duas imagens de óvulos de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* marcados com o corante verde calceína-AM. A imagem obtida pela microscopia confocal revela que a distribuição do corante ocorre apenas no córtex celular, ao contrário do que sugere a imagem obtida pela microscopia de fluorescência. Esta diferença se deve ao fato da imagem em B exibir apenas a fluorescência coletada em um único plano seccional da célula (plano focal), sem interferência dos demais planos, o que não ocorre na imagem apresentada em A.

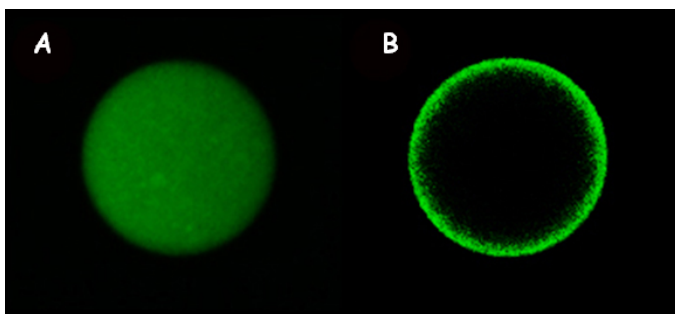


Figura 1.11 – Fotomicrografias de fluorescência (A) e confocal (B) de óvulos de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* marcados com o corante calceína-AM. Fonte: Luis Fernando Marques-Santos (DBM/UFPB) e Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo (CPqAM/FIOCRUZ).

4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica utiliza o feixe de elétrons como radiação. A fonte de elétrons é um filamento ou catodo que bombeia os elétrons através de uma estrutura cilíndrica até a amostra. A grande vantagem no uso do feixe de elétrons ao invés do feixe de luz, utilizado na microscopia óptica, é o reduzido comprimento de onda do feixe de elétrons (0,004 nm). Este valor é cerca de 100 mil vezes menor que o comprimento de onda da luz visível. Devido ao menor comprimento de onda do feixe de elétrons, o limite teórico de resolução do microscópio eletrônico é de 0,002 nm (0,02 Å). No entanto, devido à fatores técnicos, como limitações das lentes (de natureza eletromagnética), procedimentos para a preparação das amostras e ao próprio dano provocado pelo feixe de elétrons no espécime, a resolução de trabalho para a maioria das preparações biológicas fica em torno de 2 nm (20 Å), apesar de que em alguns casos ser possível obter uma resolução de cerca de 0,1 nm (1 Å).

A microscopia eletrônica permite a visualização de detalhes estruturais de organelas, tais como a mitocôndria, das nucleoporinas do envelope nuclear, dos ribossomos e de diversas outras estruturas celulares e, até, mesmo, de vírus.

Assim como na microscopia óptica, o material a ser analisado sob microscopia eletrônica necessita ser impregnado com substâncias que promovam uma diferença de contraste entre as estruturas celulares. As substâncias utilizadas com esta finalidade, na microscopia eletrônica, são sais de metais pesados, cujas características de eletrodensidade permitem a geração do contraste necessário para a individualização das estruturas celulares. Os sais de chumbo, urânio, ouro, tungstênio e, principalmente, o tetróxido de ósmio são os mais comumente utilizados. As estruturas celulares impregnadas com estes sais desviam o feixe de elétrons na medida em que os mesmos se chocam com estas. Os feixes de elétrons que não são desviados são captados para a formação da imagem.

A preparação das amostras para observação em microscopia eletrônica requer mais etapas do que as utilizadas em microscopia óptica. O uso específico de fixadores químicos, a criofixação (fixação pelo frio), o processo de congelamento, a desidratação e a necessidade de cortes ultrafinos, requer um treinamento técnico altamente especializado.

Existem três tipos de microscopia eletrônica: a microscopia eletrônica de transmissão, a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia eletrônica de tunelamento. Nas próximas seções vamos tratar das duas primeiras.

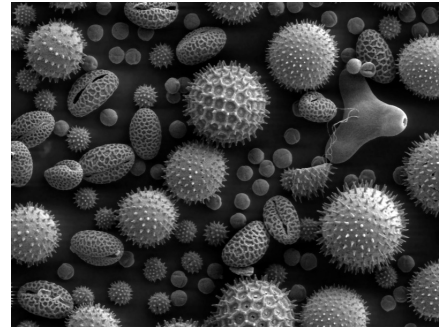
4.6.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão baseia-se na passagem do feixe de elétrons pela célula. Uma vez que o material está impregnado com sais de metais pesados, ao passar pela célula, parte do feixe é desviada (devido à presença dos metais pesados ligados à certas estruturas celulares) gerando uma imagem escura (eletrodensa) na tela de recepção. Por outro lado, parte do feixe é capaz de atravessar o material, gerando múltiplos tons de cinza na tela de recepção, que, posteriormente, é revelada em uma microfotografia. Desta forma, a microscopia eletrônica de transmissão permite uma análise das estruturas intracelulares com um grau de detalhamento impressionante. As figura 1 e 2 da unidade 4 são fotomicrografias obtida em microscopia eletrônica de transmissão.

4.6.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Na microscopia eletrônica de varredura o feixe de elétrons não atravessa o material biológico. A microscopia eletrônica de varredura se baseia na geração de elétrons secundários, que são emitidos por uma amostra após a mesma ser excitada por um feixe de elétrons, ou por elétrons retroespalhados, sendo a primeira técnica a mais utilizada por gerar imagens com melhor definição (maior profundidade de campo). Os elétrons secundários são coletados por um detector, que gera uma imagem virtual do material analisado. O material precisa ser fixado, desidratado e recoberto com ouro ou carbono para a obtenção de imagens topográficas com alta resolução. A figura 1.12 ilustra uma fotomicrografia eletrônica de varredura.

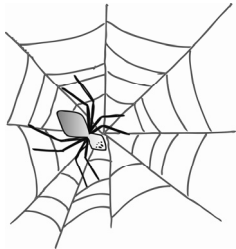
Figura 1.12 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de pólen das espécies *Helianthus annuus* (Girasol), *Ipomoea purpurea* (Corda-de-Viola ou Glória da Manhã), *Sidalcea malviflora* (Malva-Rosa), *Lilium auratum* (Lírio), *Oenothera fruticosa* (Onagra) e *Ricinus communis* (Mamona).



Fonte:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a4/Misc_pollen.jpg

:: TA NA WEB!!! ::



Nos links abaixo você irá encontrar uma série de textos, imagens e animações sobre microscopia.

Nobel Prize's Microscopes

→ <http://nobelprize.org/educational/physics/microscopes/1.html>

American Society for Cell Biology (Image & Video Library)

→ <http://cellimages.ascb.org/>

Molecular Expressions: Images from the Microscope

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

Nikon MicroscopyU

→ <http://www.microscopyu.com/>

Olympus Microscopy Resource Center

→ <http://www.olympusmicro.com/>

Harvard University (Department of History of Science)

→ <http://dssmhi1.fas.harvard.edu/emuseumdev/code/eMuseum.asp?lang=EN>

4.7 FRACIONAMENTO CELULAR

Uma das formas de ampliarmos os nossos conhecimentos sobre o funcionamento das organelas e demais estruturas celulares é através do isolamento dos constituintes celulares em frações puras. Para isto, precisamos romper delicadamente a membrana plasmática preservando as demais organelas e constituintes citoplasmáticos em processo de lise celular controlado que gere um homogenato celular íntegro.

Existem diversos métodos para promover a lise celular e a obtenção de um homogenato. Estes métodos podem ser divididos em químicos e físicos. Entre os métodos químicos podemos citar o uso de detergentes ou de soluções hipertônicas (choque osmótico). O rompimento da membrana plasmática por métodos físicos inclui o uso de homogenizadores (rompimento por esmagamento) ou sonicadores, entre outros. A escolha do método adequado depende, fundamentalmente, do tipo celular e do tecido de origem.

Após a obtenção do homogenato celular, os constituintes podem ser separados por centrifugação diferencial. Dois métodos de fracionamento são muito utilizados: a centrifugação diferencial ou a separação por gradiente de concentração. Na centrifugação diferencial o homogenato é submetido a diversas centrifugações sucessivas, com ordem crescente de velocidade de centrifugação. Na medida em que aumentamos a velocidade de centrifugação, promovemos a sedimentação e precipitação dos componentes menos densos (tabela 1.2). Após o isolamento do componente de interesse podemos estudar determinado processo biológico sem a interferência dos demais constituintes celulares. Essa compartimentalização do estudo é importante para identificarmos, por exemplo, qual organela é responsável por determinado processo. Foi a partir da conquista da técnica de centrifugação diferencial que os bioquímicos americanos Eugene Patrick Kennedy e Albert Lester Lehninger, no final da década de 1940, verificaram que o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), a oxidação de ácidos graxos, e a fosforilação oxidativa ocorriam na mitocôndria.

Velocidade de Centrifugação		Precipitado
Baixa	1.000 x G – 10 minutos	Células inteiras, núcleo e citoesqueleto
Média	20.000 x G – 20 minutos	Mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos
Alta	80.000 x G – 60 minutos	Microsossomos e pequenas vesículas
Super alta	150.000 x G – 180 minutos	Ribossomos e macromoléculas maiores

Tabela 1.2 – Fracionamento celular por centrifugação diferencial e o conteúdo do precipitado. G = gravidade.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Faça uma pesquisa e descubra o que são microsossomos!

4.8. CULTURA CELULAR

O marco inicial, que deu início ao estabelecimento da cultura celular, foi o trabalho de Wilhelm Roux no ano de 1885. O zoólogo alemão conseguiu manter, por alguns dias, células embrionárias de galinha em uma solução salina. Era a primeira vez que um cientista obtinha sucesso na tentativa de manter vivas as células de um organismo em um meio externo a ele.

O termo cultura celular refere-se à manutenção de células eucarióticas ou procarióticas em laboratório. No caso de organismos multicelulares, estas células são isoladas e mantidas em condições rígidas de cultivo. Os ensaios experimentais realizados com culturas celulares são chamados ensaios *in vitro* - em contraste com os ensaios realizados com organismos intactos, que denominamos ensaios *in vivo*.

As culturas celulares obtidas diretamente de organismos vivos, e mantidas em laboratório por um curto intervalo de tempo, são chamadas culturas primárias. Uma vez estabelecidas, as culturas primárias são mantidas pelo tempo necessário para a realização dos ensaios *in vitro*. As células também podem ser mantidas em culturas por meses ou anos. Neste caso, chamamos as culturas de culturas secundárias ou linhagens celulares. Um atributo fundamental e obrigatório, neste caso, é que tais células se dividam *in vitro*, desde que, é claro, sejam cultivadas em um meio de cultura adequado. O estabelecimento de uma linhagem celular depende de uma série de fatores, mas, fundamentalmente, tais células precisam estar constantemente entrando em um processo de divisão celular, o que é mantido por meio de estímulos extracelulares, mas que também deve ser uma característica intrínseca do próprio tipo celular.

As condições de manutenção de uma cultura celular dependem do tipo celular. Para cada tipo celular existe um meio de cultura apropriado, além de pH, temperatura e grau de oxigenação específicos. Com relação à composição dos meios de cultura, no geral, os meios de cultura para células eucarióticas são constituídos de aminoácidos, açúcares, vitaminas, fatores de crescimento, e antibióticos e antifúngicos para prevenir a contaminação com microorganismos.

Os estudos *in vitro*, realizados tanto nas culturas primárias quanto nas linhagens celulares, são essenciais para a biologia celular e para as mais diversas áreas das ciências biológicas e da saúde, tais como morfologia, farmacologia, imunologia, bioquímica, biofísica, genética, parasitologia, hematologia, oncologia, patologia e biologia de desenvolvimento, entre outras. O uso das linhagens celulares permite o desenvolvimento de estudos científicos com uma maior consistência e reprodutibilidade dos resultados.

Uma das desvantagens de se trabalhar com culturas celulares é que após um determinado período de manutenção destas células em cultura, e após sucessivas divisões celulares, as características originais das células podem ser alteradas. Para prevenir que tais alterações influenciem os estudos, o procedimento ideal é descartar a cultura após cerca de 50 ciclos de renovação do meio de cultura (repique da cultura). Você deve estar se perguntando: e começar tudo de novo? Isolar novas células dos organismos e começar tudo novamente? Não, não é preciso todo esse trabalho novamente. Existem diversos bancos de células que comercializam os mais variados tipos celulares. Além disso, é possível criopreservar a cultura original, descongelando as amostras quando necessário.

UNIDADE 2 BIOMEMBRANAS

1. VISÃO GERAL

As membranas presentes nos seres vivos são denominadas biomembranas. As biomembranas são fluidos bidimensionais, constituídos por uma bicamada lipídica, com espessura média de 5 nm, e proteínas associadas. A unidade e coesão das bicamadas lipídicas são mantidas graças às interações hidrofóbicas entre os lipídeos que constituem as biomembranas. Cerca de cinquenta por cento da massa das biomembranas é conferida pelos lipídeos. Estima-se, também, que cerca de trinta por cento de todas as proteínas celulares estejam associadas às biomembranas. As biomembranas são responsáveis pela compartimentalização celular. A membrana plasmática (figura 2.1) estabelece o limite celular, ao separar o conteúdo intracelular do meio externo, e é encontrada em todos os tipos celulares. As membranas internas formam o sistema de endomembranas. Tais membranas são responsáveis pela compartimentalização intracelular, delimitando as organelas, e conseqüentemente os processos celulares que ocorrem em cada uma delas. O sistema de endomembranas é encontrado somente em células eucarióticas.

As bicamadas lipídicas são assimétricas, apresentando uma composição diferente entre as duas monocamadas, ou faces, que a constituem. Na membrana plasmática, essa assimetria é notável em relação aos lipídeos presentes na face exoplasmática (localizada na superfície celular) e na face citosólica (voltada para o citosol).

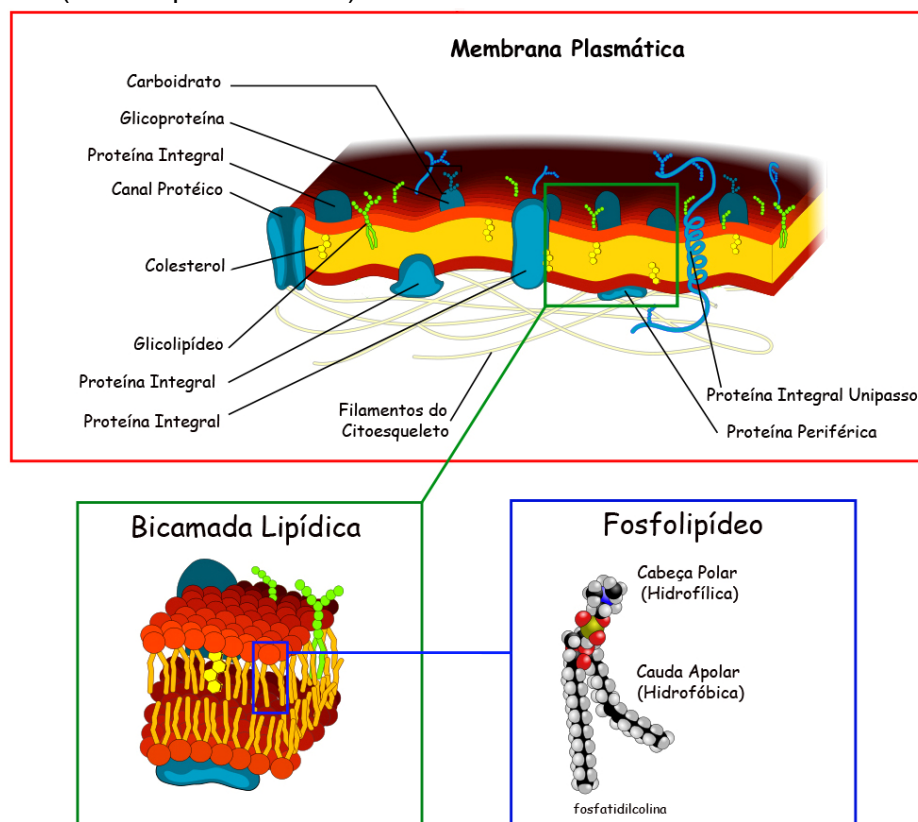


Figura 2.1 – Esquema ilustrativo da membrana plasmática.

Modificado de

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3a/Cell_membrane_detailed_diagram_4.svg/1000px-Cell_membrane_detailed_diagram_4.svg.png

2. COMO TUDO COMEÇOU...

A existência de uma membrana plasmática foi sugerida, inicialmente, por Nargeli, no ano de 1855. A natureza lipídica e a permeabilidade seletiva das membranas celulares foi proposta por Ernest Overton, em 1890. Trinta anos depois, dois cientistas alemães, E. Gorter e F. Grendel, estudando a composição da membrana de eritrócitos, verificaram que as membranas celulares eram formadas por uma bicamada lipídica. A observação de que as biomembranas não eram constituídas somente por lipídeos, mas também por proteínas associadas, foi feita por Davson e Danielli no ano de 1935.

Finalmente, no ano de 1972, S. J. Singer e G. Nicolson propuseram o modelo de mosaico fluido para as biomembranas (figura 2.2). Surge, assim, o conceito de que as membranas celulares eram dinâmicas. Neste modelo, tanto os lipídeos quanto as proteínas podem se movimentar bi-direcionalmente pela bicamada lipídica. Sabemos, hoje, que este dinamismo é fundamental para o papel biológico desempenhado pelas biomembranas.

Somente a partir dos anos 90 do século XX, surge o conceito de domínios de membrana. Estes domínios são regiões com características estruturais próprias, distintas do restante da membrana, e que apresentam particularidades funcionais. As balsas lipídicas são um exemplo de um domínio de membrana.

3. ESTRUTURA DE BIOMEMBRANAS

Para entendermos o papel biológico das membranas celulares precisamos responder a uma pergunta crucial: como são constituídas as biomembranas?

As biomembranas são constituídas por lipídeos, proteínas e carboidratos ligados covalentemente às proteínas (glicoproteínas ou proteoglicanas) ou lipídeos (glicolipídeos). Vamos aprender um pouco mais sobre a estrutura molecular e as características químicas de cada um destes componentes das biomembranas.

3.1. LIPÍDEOS DE MEMBRANA

Os lipídeos que constituem a membranas biológicas são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam tanto um caráter hidrofílico (afinidade pela água – caráter polar) quanto hidrofóbico (aversão à água – caráter apolar). A tabela 2.1 apresenta os principais lipídeos encontrados nas biomembranas. A composição das biomembranas varia enormemente de acordo com o tipo celular e com o compartimento intracelular delimitado por elas. Células vegetais e organismos procariotos, por exemplo, não apresentam colesterol na constituição das suas membranas.

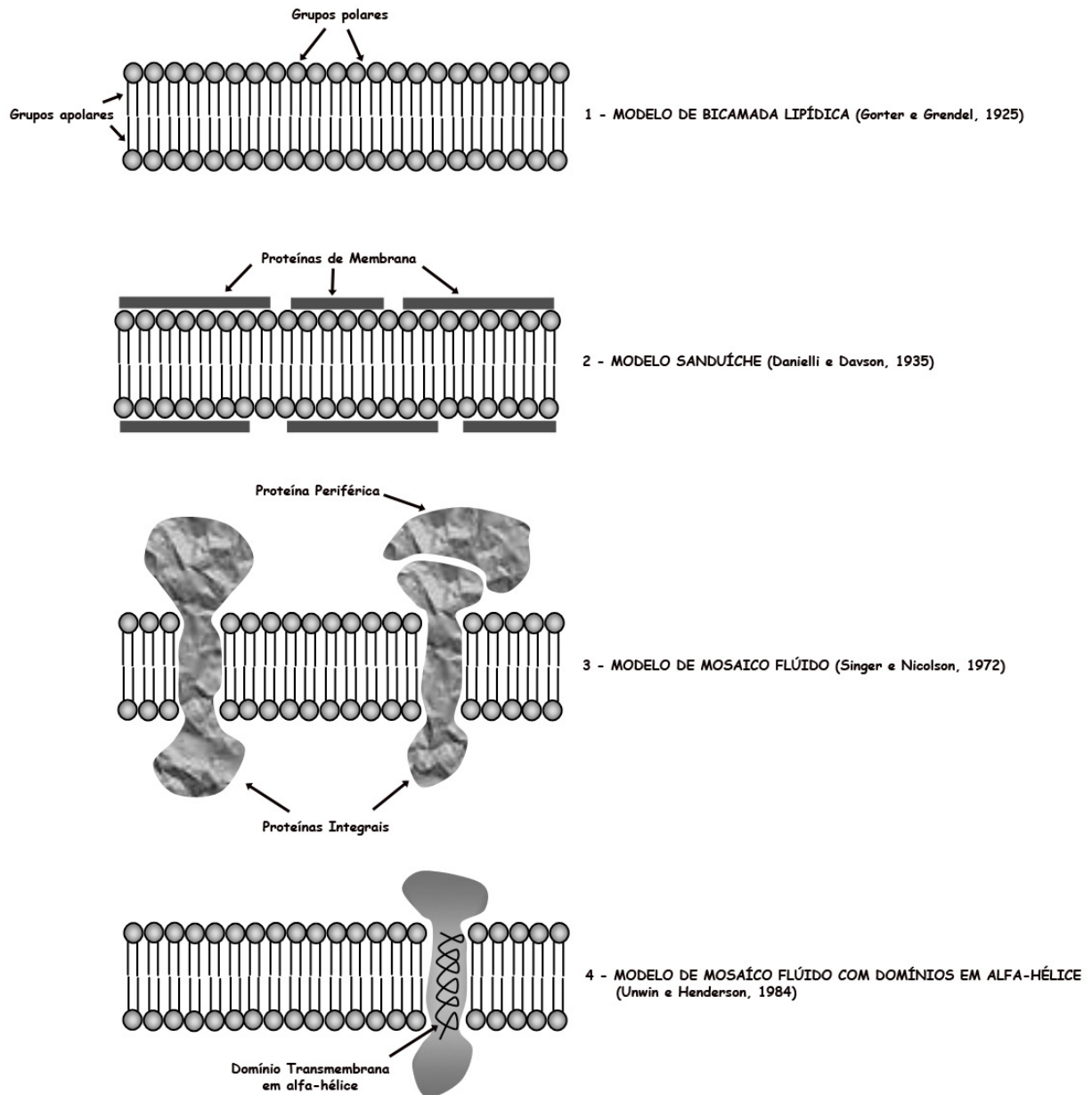


Figura 2.2 - Modelos de Biomembranas

Classe	Sub-Tipo	Lipídeo (Abreviação)
Fosfolipídeos	Fosfoglicerídeos	Fosfatidiletanolamina (PE)
		Fosfatidilcolina (PC)
		Fosfatidilserina (PS)
		Fosfatidilinositol (PI)
	Esfingolipídeos	Esfingomiéline (SM)
		Glicosésfingolipídeos
Esteróides	-	Colesterol

Tabela 2.1 - Lipídeos mais freqüentes em biomembranas

A unidade da membrana é mantida graças às interações hidrofóbicas e às interações de van der Waals que ocorrem entre as porções hidrofóbicas dos fosfolipídeos (caudas dos ácidos graxos) e do colesterol.

Vamos, agora, conhecer, mais de perto, cada um destes lipídeos.

Os fosfoglicerídeos representam a classe mais abundante dos fosfolipídeos de membrana. Todos os fosfoglicerídeos são constituídos por uma cabeça polar (um álcool) ligada, por esterificação, a um grupamento fosfato, que por sua vez encontra-se ligado a uma molécula de glicerol esterificada a duas caudas apolares de ácido graxo (figura 2.3).

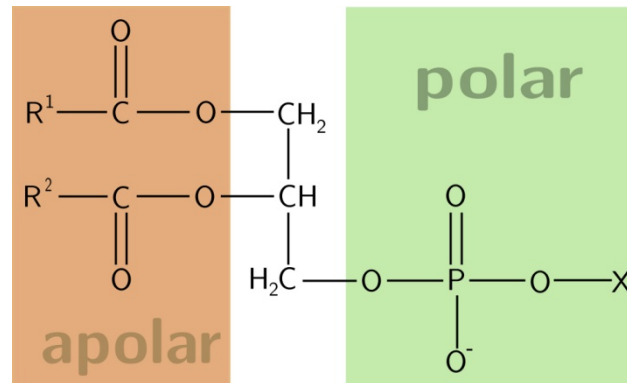


Figura 2.3 - Estrutura básica de um fosfoglicerídeo.

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phospholipid.svg>

O esfingolipídeo mais freqüentemente encontrado nas biomembranas é a esfingomielina (figura 2.4), que, assim como todos os esfingolipídeos, apresenta uma molécula de ceramida como seu núcleo hidrofóbico. A ceramida, por sua vez, é formada por um amino álcool insaturado de 18 carbonos, denominado esfingosina, ligado, por meio de uma ligação amídica, a outro ácido graxo saturado. Outra característica estrutural típica deste lipídeo de membrana, é que ao invés do cerne de glicerol, a cabeça polar da esfingomielina, fosfocolina ou fosfoetanolamina, é ligada aos ácidos graxos através de uma serina, e não de uma molécula de glicerol, como observado nos fosfoglicerídeos.

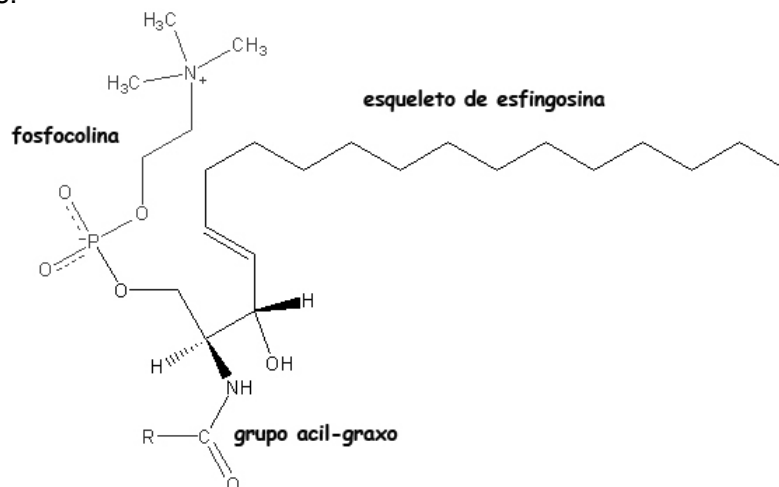
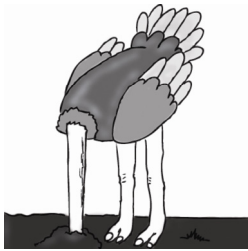


Figura 2.4 - Estrutura da Esfingomielina.

Modificado de: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sphingomyelin.png>

Outra classe importante de lipídeos de membranas é constituída pelos glicolipídeos, que são lipídeos ligados, covalentemente, a um ou mais resíduos de carboidratos (galactose, N-acetilglicosamina ou ácido siálico, por exemplo). Dentre os glicolipídeos, podemos destacar os glicoesfingolipídeos, tais como os cerebrosídeos e os gangliosídeos, que possuem a esfingosina no seu núcleo hidrofóbico, e desempenham papéis biológicos importantes em células musculares e nervosas.

:: FIQUE POR DENTRO!! ::



Os glicolipídeos presentes na superfície dos glóbulos vermelhos (eritrócitos) são utilizados como marcadores (antígenos) para a tipagem sanguínea baseada no sistema ABO. A diferença na composição dos resíduos de carboidratos dos oligossacarídeos presentes nestes glicolipídeos é quem determina o grupo (ou tipo) sanguíneo. Nos indivíduos com o tipo sanguíneo A, o resíduo terminal do oligossacarídeo é a N-acetilgalactosamina, ao passo que nos indivíduos com o tipo sanguíneo B, o resíduo terminal de açúcar é a galactose. Indivíduos cujos eritrócitos apresentam glicolipídeos com N-acetilgalactosamina terminal, assim como glicolipídeos com resíduos de galactose terminal são classificados como tipo AB. Indivíduos com o tipo sanguíneo O não apresentam tais resíduos na região terminal do oligossacarídeo, sendo, desta forma, também conhecidos como tipo 0 (zero). A tabela 2.2 ilustra a diferença encontrada nos resíduos de carboidratos dos glicolipídeos e os referidos grupos sanguíneos.

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Eritrócito				
Antígeno				
Anticorpo				

Tabela 2.2 - Grupos Sanguíneos e respectivos antígenos de superfície. Os anticorpos representados na tabela são encontrados no plasma dos indivíduos dos respectivos grupos sanguíneos. Gal = Galactose; GlcNAc= N-acetilglicosamina; Fuc = Fucose; GalNAc = N-acetilgalactosamina, Modificado de

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/32/ABO_blood_type.svg/1000px-ABO_blood_type.svg.png e <http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch11/Slide56.jpg>

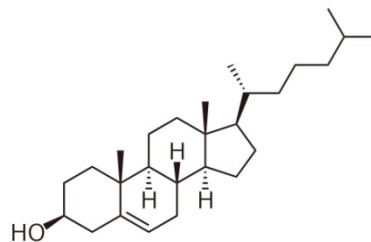
:: SAIBA MAIS... ::

Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO (Ana Carla Batissoco & Márcia Cristina Zago Novaretti, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2003, número 25, pg. 47-58) → <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v25n1/v25n1a08.pdf>

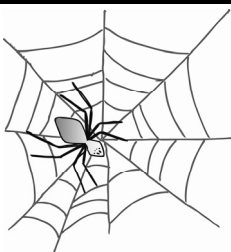
Outro lipídeo importante na composição das biomembranas é o colesterol, cuja estrutura está representada na figura 2.5. A quantidade do colesterol é bastante variada nas biomembranas. Por exemplo, na membrana plasmática de eritrócitos, a concentração estimada de colesterol é de 23%, enquanto que na membrana do retículo endoplasmático, o colesterol responde por apenas 6% dos lipídeos totais e este valor é ainda menor nas membranas mitocondriais interna e externa, onde o colesterol constitui apenas 3% do total de lipídeos.

Figura 2.5 - Estrutura do Colesterol.

Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9a/Cholesterol.svg/1000px-Cholesterol.svg.png>

**:: FIQUE DE OLHO!! ::**

A membrana plasmática é marcadamente assimétrica com relação à composição dos lipídeos presentes nos dois folhetos. Na monocamada interna da membrana plasmática encontramos, predominantemente, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, enquanto que na monocamada exoplasmática encontramos, majoritariamente, fosfatidilcolina e esfingomielina. Os glicolipídeos são encontrados somente na monocamada exoplasmática. Já o colesterol é distribuído de forma homogênea pelos dois folhetos da membrana. A assimetria da membrana é mantida por proteínas específicas, denominadas flipases, que realizam um movimento conhecido como flip-flop, que é responsável pela inversão dos fosfolipídeos entre as duas monocamadas. Os lipídeos da membrana apresentam uma alta mobilidade entre as monocamadas, podendo realizar movimentos bi-dimensionais, tais como difusão lateral, flexão das caudas de ácido graxo e rotação em torno do próprio eixo molecular. Essa mobilidade dos fosfolipídeos reflete-se numa característica fundamental para o exercício do papel biológico das biomembranas, que é a fluidez da membrana.

:: TA NA WEB!!! ::

No link abaixo você vai encontrar uma série de animações na língua portuguesa sobre estrutura de biomembranas, além de outros assuntos de Biologia Celular. Bom proveito!

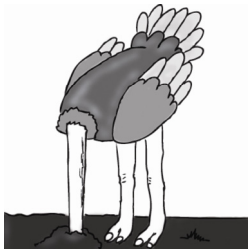
Cell Biology Animation em Português → <http://www.johnkyrk.com/index.pt.html>

3.1.1. FLUIDEZ DE MEMBRANA

A fluidez das biomembranas depende de alguns fatores cruciais, tais como a temperatura na qual se encontra a membrana e a própria composição lipídica da membrana. As biomembranas podem estar em dois estados físicos: paracristalino (gel) ou fluido (líquido). A mudança de um estado físico para o outro é conhecida como transição de fase e é determinante para a fluidez da membrana. Quanto mais elevada for a temperatura mais fluida será uma biomembrana. Com relação à composição lipídica, a presença de fosfolipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, ou de cadeia curta, favorece a fluidez das membranas. O colesterol também é importante na manutenção da fluidez da membrana em condições de baixa temperatura, uma vez que impede uma associação hidrofóbica mais forte entre as caudas dos ácidos graxos dos fosfolipídeos, e previne, assim, a transição de fase para o estado gel.

A fluidez da membrana é fundamental para diversos processos celulares, tais como transporte de moléculas e sinalização celular. As balsas lipídicas, domínios da membrana ricos em esfingolipídeos, colesterol e proteínas associadas, dependem da fluidez da membrana para a sua participação em processos de sinalização e endocitose.

:: FIQUE POR DENTRO!! ::



A membrana plasmática de células de peixes que habitam águas frias tende a ser rica em ácidos graxos insaturados, evitando, desta forma, que em baixas temperaturas ocorra uma transição de fase para o estado gel, e conseqüente diminuição da fluidez da membrana. Peixes como o atum, o bacalhau, o salmão e a sardinha, por exemplo, são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos graxos Omega-3. Alguns estudos demonstraram que populações cujo hábito alimentar é rico em peixes de água fria apresentam uma menor incidência de doenças cardiovasculares. Óleos extraídos destes peixes têm sido utilizados na dieta humana como recomendação para a prevenção de uma série de patologias, com as citadas doenças cardiovasculares. No entanto, o benefício do uso destes óleos encapsulados, como complementos alimentares, ainda carece de maiores estudos.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Além do papel estrutural dos lipídeos de membrana, essas moléculas também estão envolvidas em uma série de processos celulares vitais. Faça uma pesquisa e descubra outros papéis biológicos para os lipídeos de membrana. Como sugestão, procure sobre o envolvimento dos seguintes lipídeos em outros eventos celulares e fisiológicos: fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ceramida, esfingosina-1-fosfato, e glicolipídeos.

3.2 PROTEÍNAS DA MEMBRANA

As proteínas presentes nas biomembranas podem ser classificadas em: Integrais (intrínsecas) ou Periféricas (extrínsecas). Esta classificação se baseia no procedimento

necessário para promover a dissociação de uma proteína da membrana. Proteínas integrais só se dissociam da membrana através do uso de detergentes, tais como o dodecil sulfato de sódio ou o Triton-X-100, ao passo que proteínas periféricas podem ser dissociadas da membrana na presença de soluções hipersalinas ou soluções de pH extremos.

As proteínas periféricas se associam à membrana mediante interações iônicas com proteínas integrais ou com os fosfolípidos da membrana. Por outro lado, as proteínas integrais da membrana se associam com estas mediante interações hidrofóbicas fortes com os lípidos da membrana e podem ser subdivididas em três tipos:

a) **Proteínas Transmembrana.** São proteínas que atravessam completamente a bicamada lipídica, apresentando, pelo menos, três regiões bem definidas: domínio extracelular, domínio transmembrana (TM) e domínio citosólico. Tais proteínas podem cruzar a bicamada lipídica uma única vez (Proteína Integral Unipasso) ou diversas vezes (Proteína Integral Multipasso). A estrutura secundária do domínio TM das proteínas unipasso é sempre α -hélice, sendo este domínio constituído por 20 a 23 resíduos de aminoácidos. As proteínas integrais multipasso podem apresentar domínios TM com estrutura secundária organizada em α -hélice ou folha- β . Nas proteínas multipasso com domínio TM em estrutura α -hélice, é comum observarmos uma ligação covalente à lípidos do folheto interno, o que promove uma maior estabilidade e interação da proteína com a membrana. Já os domínios TM com estrutura folha- β das proteínas multipasso são constituídos por cerca de 10 resíduos de aminoácidos. Estas proteínas apresentam normalmente de 8 a 22 domínios TM e são encontradas somente em bactérias e nas membranas externas da mitocôndria e de cloroplastos. A interação das proteínas transmembrana com as biomembranas se dá por meio de interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos dos domínios TM das proteínas e a cauda dos ácidos graxos dos fosfolípidos da membrana.

b) **Proteínas Ancoradas por Lípidos.** São quatro tipos de âncoras de lípidos que promovem a interação destas proteínas com a membrana plasmática: âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), âncora de miristato, âncora de palmitato e âncora de prenilato. A ancoragem por GPI só ocorre no domínio extracelular da membrana plasmática, enquanto que a ancoragem pelos ácidos graxos é restrita à face citosólica da membrana plasmática. A interação destas proteínas com as membranas se dá pela interação hidrofóbica dos lípidos ligados covalentemente às proteínas com a cauda dos ácidos graxos dos fosfolípidos da membrana.

c) **Proteínas Ancoradas por α -Hélice.** Tais proteínas são ancoradas na membrana plasmática a partir da interação dos fosfolípidos da membrana com um domínio lateral hidrofóbico em α -hélice da proteína. Estas proteínas são encontradas somente na face citosólica da membrana plasmática.

As proteínas de membrana estão envolvidas em uma série de processos biológicos fundamentais para a fisiologia celular, tais como: transporte de moléculas, atividade enzimática, adesão celular, comunicação celular, reconhecimento celular e formação das junções celulares.

4. TRANSPORTE ATRAVÉS DAS BIOMEMBRANAS

Uma das características mais marcantes das biomembranas é a sua permeabilidade seletiva. Somente pequenas moléculas não carregadas podem se difundir livremente pela

bicamada lipídica. De forma geral, a bicamada lipídica é permeável aos gases, como o dióxido de carbono (CO₂), o óxido nítrico (NO) e o oxigênio (O₂), por exemplo; às pequenas moléculas de caráter hidrofóbico, como os hormônios esteróides; ou moléculas pequenas polares, mas sem carga, como o etanol. A bicamada é muito pouco permeável à água e praticamente impermeável aos íons e às moléculas maiores, polares ou não, tais como a glicose, lactose, frutose, aminoácidos e nucleotídeos. Como ocorre, então, o transporte destas moléculas através das biomembranas? Conforme discutimos na seção anterior, uma das atividades biológicas das proteínas da membrana é justamente realizar o transporte de íons e molecular através das bicamadas lipídicas, e isto é feito pelas proteínas multipasso.

O transporte através das biomembranas é classificado de acordo com a necessidade energética para a realização deste transporte. Assim, temos dois tipos de transporte: passivo e ativo. No transporte passivo não há gasto de energia, uma vez que as moléculas ou íons são transportados do compartimento de maior concentração (da molécula ou íon) para o compartimento de menor concentração (quadro A - figura 2.6). Ou seja, este tipo de transporte ocorre favor do gradiente de concentração e pode ou não ser mediado por proteínas da membrana. Quando o transporte não é mediado por proteínas da membrana denominamos difusão simples (transporte de ■ - figura 2.6) e quando o mesmo é mediado por proteínas, ele é denominado difusão facilitada (transporte de ● - figura 2.6). Quem facilita? As proteínas, sem as quais esse transporte não poderia ocorrer. A difusão facilitada pode ser mediada por: proteínas carreadoras, como, por exemplo, a proteína GLUT-4, que é o transportador de glicose encontrado no tecido adiposo e muscular cardíaco e esquelético; ou por canais iônicos, que, como o nome sugere, são proteínas envolvidas no transporte de íons através das biomembranas, íons, estes, que apresentam uma distribuição bastante distinta entre o meio extra e intracelular, como pode ser observado na tabela 2.3. Os canais iônicos podem ser regulados de diversas formas: por interação com ligantes extracelulares; por interação com ligantes intracelulares, por meio de alterações na voltagem da membrana; ou mecanicamente (estiramento da membrana).

Íons	Meio Extracelular (mM)	Meio Intracelular (mM)
Sódio	145	15
Potássio	5,0	140
Cálcio	1,0 a 2,0	10 ⁻⁴
Magnésio	1,0 a 2,0	0,5
Cloreto	110	5 a 15
Hidrogênio	4 x 10 ⁻⁵	7 x 10 ⁻⁵

Tabela 2.3 – Concentração extracelular e intracelular de alguns íons em células de mamíferos.

A velocidade do transporte na difusão facilitada depende de uma série de fatores. O caráter químico da molécula a ser transportada é determinante. Para moléculas sem carga, a velocidade de transporte é diretamente proporcional ao gradiente de concentração da molécula, ou seja, quanto maior a diferença na concentração da molécula entre os dois compartimentos separados pela membrana, maior será a velocidade do transporte. No entanto, para íons ou moléculas carregadas, dois fatores são decisivos: o gradiente de concentração e o potencial da membrana, que juntos constituem o gradiente eletroquímico. Moléculas carregadas positivamente,

por exemplo, são atraídas com maior velocidade para um compartimento com predominância de cargas negativas.

No transporte ativo, as moléculas ou íons são transportadas contra o seu gradiente de concentração (quadros B, C e D - figura 2.6). Este tipo de transporte requer um gasto energético, uma vez que promove a diminuição da entropia e, conseqüentemente, o aumento da energia livre do sistema. O transporte ativo pode ser dirigido por hidrólise de ATP (trifosfato de adenosina), sendo classificado como Transporte Ativo Primário (quadro B - figura 2.6), ou pode ser dirigido por gradiente eletroquímico, denominado Transporte Ativo Secundário (quadros C e D - figura 2.6), uma vez que o gradiente eletroquímico utilizado neste tipo de transporte é gerado por um transporte ativo primário dependente do ATP. As proteínas que realizam o transporte ativo primário são conhecidas como ATPases de membrana ou Bombas. Entre estas proteínas podemos destacar: a) a Na^+K^+ -ATPase, que, para cada molécula de ATP hidrolisada, realiza o transporte de 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o interior da célula; b) as proteínas da superfamília ABC (do inglês *ATP-binding cassetes*), que constituem a maior família de proteínas de membrana, sendo encontradas desde bactérias até seres humanos, e estão envolvidas no transporte de uma série de moléculas, desde hormônios, nucleotídeos, pequenos peptídeos até xenobióticos; c) a bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática e da membrana do retículo sarcoplasmático, responsáveis pelos baixos níveis citosólicos deste íon; d) a bomba de próton da membrana lisossomal, que mantém o pH ácido desta organela. No caso dos transportadores secundários, destacamos os trocadores iônicos, o Co-transportador Glicose- Na^+ , responsável pela absorção de glicose no trato digestório, e os Co-transportadores de aminoácidos e Na^+ .

Os transportadores da membrana também podem ser classificados quanto ao tipo e direcionamento do transporte efetuado. Proteínas que transportam uma única molécula, sem gasto energético, são denominadas Uniporte (quadro A – figura 2.6). Já os co-transportadores são denominados Simporte (quadro C – figura 2.6), quando transportam uma molécula e um ou mais íons diferentes na mesma direção, ou Antiporte (quadro D – figura 2.6), quando transportam uma molécula e um ou mais íons diferentes em direções opostas. No co-transporte, a passagem de um íon a favor do gradiente de concentração fornece a energia necessária para o transporte acoplado de outro íon, ou molécula, contra o gradiente de concentração.

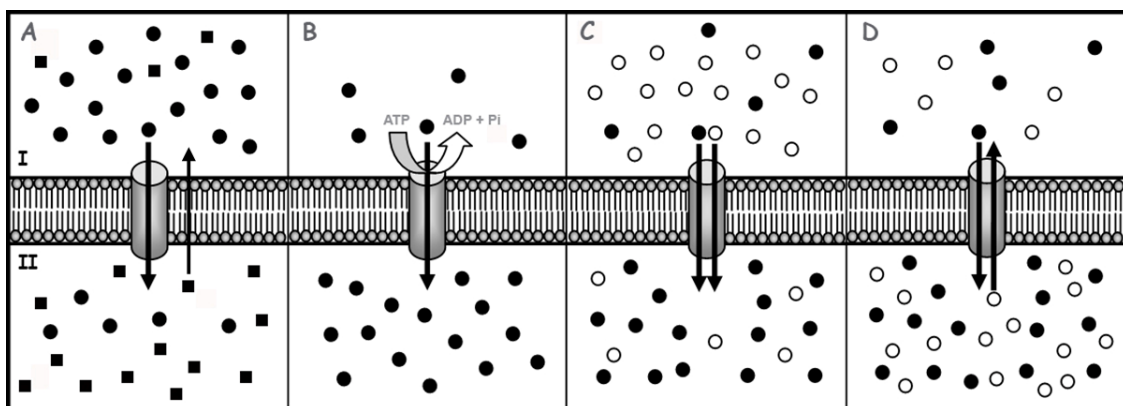
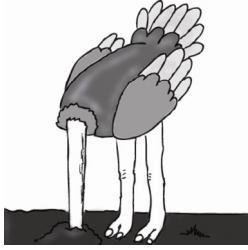


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo de transportadores da membrana

:: FIQUE POR DENTRO!! ::

Os transportadores ABC estão envolvidos em uma série de patologias humanas, como a resistência à quimioterapia em cânceres, também conhecida como resistência a múltiplas drogas e associada à superexpressão das proteínas ABCB1 (Glicoproteína-P), ABCC1 (Proteína MRP) e ABCG2 (Proteína BCRP). A superexpressão destas proteínas é responsável pela falência terapêutica no tratamento de diversos tumores humanos. Outra patologia humana correlacionada com as proteínas ABC é a fibrose cística, uma doença hereditária autossômica recessiva, onde mutações no gene que codifica para a proteína CFTR, um transportador de íon cloreto, levam a um quadro grave de complicações respiratórias, uma vez que o transporte dos íons cloreto é essencial para a fluidificação do muco.

UNIDADE 3

ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS

1. INTRODUÇÃO

A síntese de proteínas que são codificadas a partir do genoma nuclear, nos organismos eucariotos, pode ocorrer tanto nos ribossomos livres no citosol quanto nos ribossomos aderidos à face citosólica da membrana do Retículo Endoplasmático Granuloso. Nestes organismos, a síntese protéica também pode ocorrer nas mitocôndrias ou nos cloroplastos, a partir das informações contidas no DNA presente nestas organelas. Nesta unidade vamos discutir como as proteínas que são sintetizadas no citosol são endereçadas aos seus destinos finais.

A primeira questão que devemos fazer é: como a célula “sabe” para onde uma determinada proteína deve ser endereçada? A resposta é simples: a célula não “sabe”. Bem, mas se a célula não “sabe”, como a proteína chega, então, ao seu destino correto? Quem respondeu a essa pergunta pela primeira vez foi o cientista alemão Günter Blobel no ano de 1970. Blobel verificou que determinadas proteínas apresentavam sequências específicas de resíduos de aminoácidos como parte de sua estrutura primária, e que estas sequências eram responsáveis pelo endereçamento da proteína para um determinado compartimento celular. Estas sequências funcionam como verdadeiros *códigos postais* biológicos e são conhecidas como sequência sinal ou peptídeo sinal. Pelas suas contribuições no campo da biologia celular, Blobel foi contemplado com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia no ano de 1999.

2. SEQUÊNCIAS SINAIS

O endereçamento de uma proteína ao seu destino final é crucial para garantir à célula que todos os processos fisiológicos ocorram de forma adequada. As proteínas de localização citosólica são as únicas que não apresentam uma sequência sinal. Tais proteínas são sintetizadas nos ribossomos livres no citosol. As proteínas das mitocôndrias, dos cloroplastos, dos peroxissomos, e do interior do núcleo (nucleoplasma), são sintetizadas nos ribossomos livres no citosol (figura 3.1A). Por outro lado, as proteínas do retículo endoplasmático, do complexo golgiense, dos endossomos, dos lisossomos, das vesículas secretoras e da membrana plasmática, são sintetizadas nos ribossomos aderidos à face citosólica da membrana do retículo endoplasmático granuloso (figura 3.1B). O aspecto granuloso do retículo endoplasmático deve-se justamente à presença dos ribossomos envolvidos na síntese destas proteínas. É nesta região do retículo, conhecida como retículo endoplasmático granuloso (REG), onde ocorre a síntese da cadeia polipeptídica de forma simultânea ao transporte da mesma para o interior do retículo endoplasmático (lúmen do retículo).

Diversas sequências sinais já foram descritas. A tabela 3.1 apresenta uma relação de algumas sequências sinais características para o endereçamento para alguns compartimentos celulares, incluindo sequências sinais de retenção de proteínas no retículo endoplasmático e de exportação de proteínas do núcleo para o citosol. Estudos modificando as sequências sinais demonstraram que pequenas alterações nas sequências podem comprometer o endereçamento correto destas proteínas para o seu destino final. Além do mais, a inserção de uma sequência sinal em uma proteína de localização citosólica, pode direcionar esta proteína para um determinado compartimento celular.

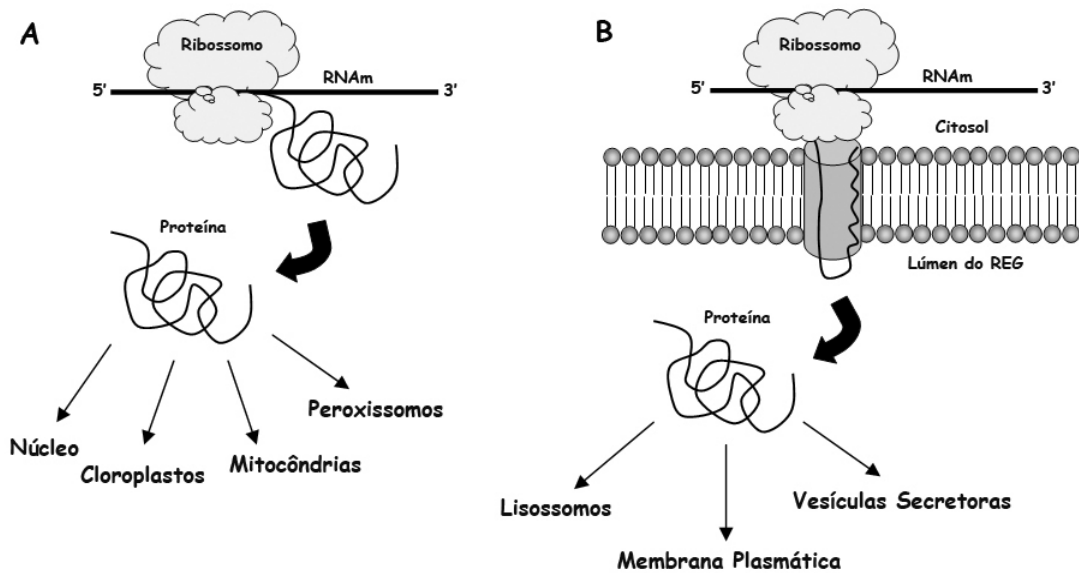


Figura 3.1 – Síntese e endereçamento de proteínas.

Destino	Sequência Sinal
Transporte para o Núcleo	~Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val~
Exportação do Núcleo	~Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile~
Transporte para o Retículo Endoplasmático	H ₃ N ⁺ -Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe- Gln~
Retenção no Retículo Endoplasmático	~Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻ (proteínas solúveis do lúmen) ~Asp-Asp-X-X-COO ⁻ (proteínas integrais da membrana)
Transporte para a Matriz Mitocondrial	H ₃ N ⁺ -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu~
Transporte para os Peroxissomos	~Ser-Lys-Leu-COO ⁻ H ₃ N ⁺ -----Arg-Leu-X ₅ -His-Leu~

Tabela 3.1 – Exemplos de sequências sinais. X representa qualquer resíduo de aminoácido hidrofóbico. COO⁻ representa a porção carboxi-terminal e H₃N⁺ representa a porção amino-terminal.

3. ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS

As proteínas para exercerem a sua atividade biológica necessitam adquirir a sua conformação nativa, ou seja, uma estrutura terciária que permita uma interação com o(s) seu(s) substrato(s) e conseqüentemente permita o pleno exercício de sua atividade biológica. O enovelamento de proteínas é o processo pelo qual as mesmas adquirem as suas estruturas tridimensionais funcionais. As proteínas sintetizadas nos ribossomos livres no citosol são enoveladas por proteínas específicas denominadas chaperonas. As chaperonas citosólicas são importantes para prevenirem o dobramento incorreto das proteínas antes do término da síntese e por auxiliarem no enovelamento da proteína para a aquisição da sua conformação nativa (figura 3.2). Dentro do lúmen do retículo endoplasmático granuloso também são encontradas chaperonas. Estas chaperonas reticulares se ligam em regiões hidrofóbicas de proteínas não-

dobradas, prevenindo o seu transporte precoce para o complexo golgiense. Uma enzima bastante importante no dobramento de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático é a Dissulfeto Isomerase, que catalisa a quebra e o estabelecimento de pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteína, permitindo o rearranjo correto destas pontes de dissulfeto e seu posterior enovelamento. No enovelamento das proteínas globulares, os resíduos de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica tendem a ficar no interior da mesma, enquanto que os resíduos de aminoácidos com cadeia lateral hidrofílica tendem a ficar na superfície das proteínas, permitindo, assim, que a proteína seja solúvel.

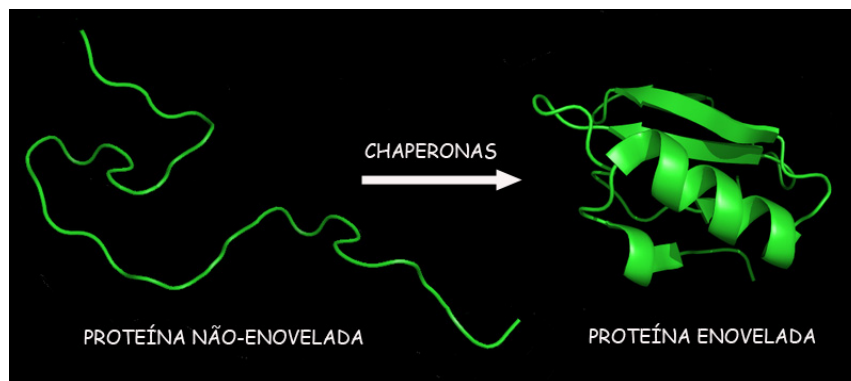
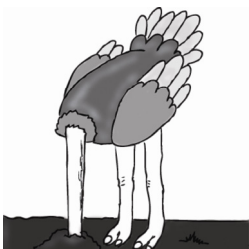


Figura 3.2 – Enovelamento de Proteínas. Modificado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Protein_folding.png

:: FIQUE POR DENTRO!! ::



A desnaturação é um processo químico no qual uma proteína perde a sua estrutura tridimensional funcional. Esse processo pode ser mediado por diversos fatores, tais como: elevadas temperaturas, elevadas concentrações de solutos, pH extremos, forças mecânicas ou desnaturantes químicos. Sob certas condições, algumas proteínas podem recuperar o seu estado funcional de dobramento, porém, na maioria dos casos, a desnaturação é irreversível. Uma proteína completamente desnaturada perde tanto a sua estrutura terciária como secundária. Um processo clássico de desnaturação de proteínas é a alteração do estado físico das proteínas que constituem a clara dos ovos quando o mesmo é submetido à elevadas temperaturas.

4. MECANISMOS DE ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS

As proteínas que possuem sequências sinais são endereçadas para os demais compartimentos celulares por meio de três mecanismos distintos: transporte mediado (núcleo), transporte vesicular (complexo golgiense, endossomos tardios, lisossomos e vesículas secretoras) e transporte transmembranar (retículo endoplasmático, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos).

4.1. TRANSPORTE MEDIADO

No transporte mediado, as proteínas que apresentam sequência de localização nuclear (SLN) são endereçadas ao nucleoplasma através do complexo de poros nucleares. Esse transporte é mediado por proteínas especializadas, denominadas importinas, que se ligam especificamente às SLNs, que, ao interagirem com proteínas fibrilares do complexo de poros nucleares, realizam o transporte das proteínas para o interior do núcleo. Algumas proteínas, como determinados fatores de transcrição, apresentam tanto SLN como um sinal de exportação nuclear, circulando, assim, entre o citosol e o nucleoplasma, de acordo com o estado fisiológico da célula.

4.2. TRANSPORTE TRANSMEMBRANAR

O transporte transmembranar é mediado por proteínas integrais transmembranares presentes nas membranas de determinados compartimentos celulares. Estas proteínas atuam como translocadores protéicos, formando poros, através dos quais as proteínas são inseridas nos compartimentos. Neste caso, as sequências sinais das proteínas interagem diretamente com os translocadores protéicos sem a necessidade de uma proteína mediadora (como a importina, por exemplo). No transporte para as mitocôndrias, por exemplo, complexos protéicos presentes na membrana mitocondrial externa (TOM) e na membrana mitocondrial interna (TIM), além de proteínas solúveis do espaço intermembrana, são responsáveis pela importação das proteínas mitocôndrias. Estas proteínas são enoveladas após a importação para a organela, por intermédio de chaperonas mitocondriais e as suas sequências sinais, de localização amino-terminal, são clivadas por peptidases presentes na organela. De forma diferente, as SLN não são clivadas das cadeias polipeptídicas após a importação das proteínas nucleares. A única exceção no transporte transmembranar de proteínas é o direcionamento para o retículo endoplasmático, uma vez que o transporte ocorre de forma simultânea à síntese protéica na maioria das células eucariontes.

Vamos, agora, analisar, com mais detalhamento, como ocorre o transporte para o retículo endoplasmático. Uma vez iniciada a síntese protéica no citosol, caso a proteína apresente uma sequência sinal de localização reticular, uma proteína citosólica solúvel, denominada Partícula de Reconhecimento de Sinal (PRS), se liga à sequência sinal do peptídeo nascente e interrompe a síntese protéica (figura 3.3 – passo 1). O complexo ribossomo/RNA_m/peptídeo nascente/PRS é, então, direcionado à face citosólica da membrana do retículo endoplasmático, onde a PRS interage com um receptor presente nesta membrana (receptor da PRS), ancorando todo o complexo traducional na superfície do retículo endoplasmático (figura 3.3 – passo 2). Em seguida, a PRS se desliga do complexo traducional e do receptor da PRS, e o complexo traducional passa a interagir com o translocador da membrana do REG. A síntese protéica, então, se reinicia, com a cadeia polipeptídica sendo inserida para o lúmen do retículo, caracterizando o transporte simultâneo à tradução (figura 3.3 – passo 3). Após o término da síntese, o complexo traducional é desfeito, sendo liberado no citosol, e o translocador sofre mudanças conformacionais que levam ao fechamento do poro na membrana reticular.

As proteínas que são sintetizadas nos ribossomos aderidos à membrana do REG podem ter destinos diferentes. Algumas destas proteínas são proteínas solúveis, liberadas no lúmen do REG, e podem ser direcionadas para o complexo golgiense (numa rota conhecida como via de exportação ou via de secreção), sendo, em seguida, endereçadas aos endossomos tardios, às vesículas secretoras ou para a membrana plasmática, onde serão liberadas no meio extracelular.

No caso de proteínas solúveis do lúmen do retículo, a sequência sinal é localizada na região amino-terminal da proteína e é clivada por uma peptidase reticular.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Faça uma pesquisa na internet e identifique proteínas, ou polipeptídeos, que são liberados no meio extracelular e cuja via biossintética está associada ao retículo endoplasmático granuloso. Algumas destas moléculas desempenham importantes papéis fisiológicos.

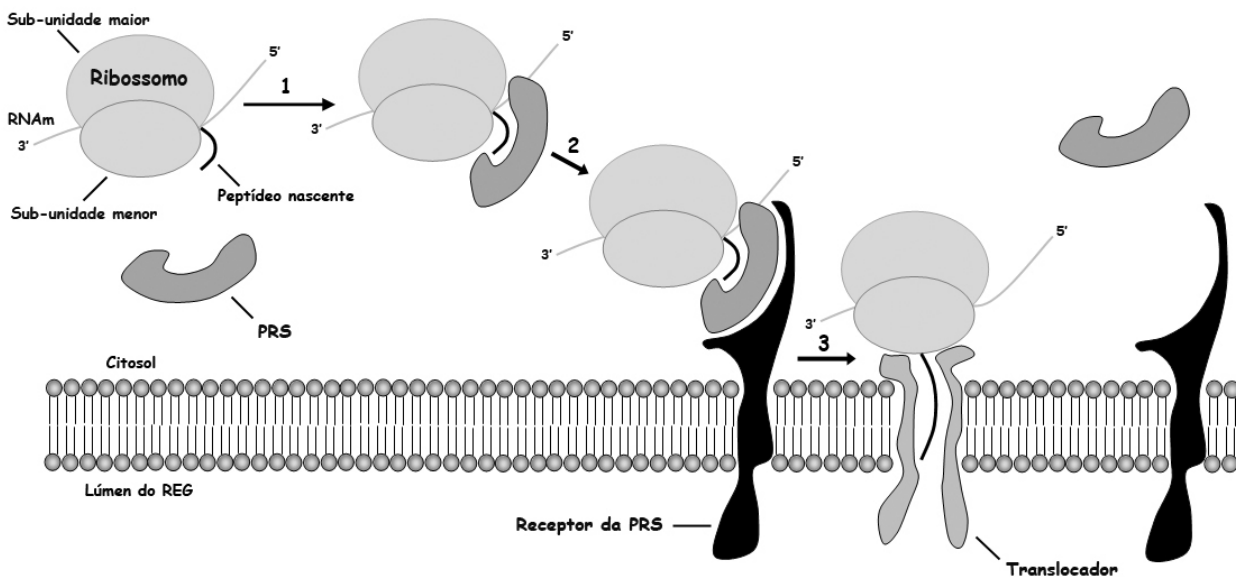


Figura 3.3 – Endereçamento de proteínas para o retículo endoplasmático.

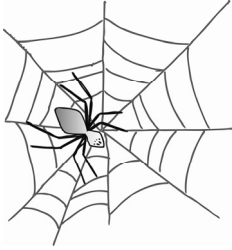
A grande maioria das proteínas sintetizadas no REG são proteínas integrais transmembrana. Como vimos na unidade 2, estas proteínas podem ser unipasso ou multipasso.

Nas proteínas integrais unipasso a sequência sinal pode estar localizada tanto na extremidade amino-terminal quanto no interior da cadeia polipeptídica. No primeiro caso, a sequência sinal é clivada e uma região predominantemente lipofílica, rica em resíduos de aminoácidos com cadeia lateral hidrofóbica e conhecida como sequência de parada de transferência (SPT), constituirá o domínio transmembrana da proteína. Nestas proteínas, a porção carboxi-terminal ficará exposta no citosol. Quando a proteína apresentar uma sequência sinal interna (SSI), esta sequência, além de direcionar o transporte do complexo traducional para o REG, atuará, também, como uma SPT, sendo que a porção carboxi-terminal da proteína pode ficar voltada para o lúmen do retículo ou para o citosol.

A síntese das proteínas integrais multipasso segue a mesma lógica das proteínas integrais unipasso. Os domínios transmembrana de tais proteínas são formados pela intercalação de SSI com SPT.

As proteínas integrais unipasso ou multipasso podem seguir os mesmos destinos das proteínas solúveis sintetizadas no REG. É desta forma que são sintetizadas, por exemplo, todas as proteínas integrais transmembrana, que constituem, por exemplo, os receptores de superfície celular e os canais iônicos.

:: TA NA WEB!!! ::



Nos endereços abaixo você encontrará ilustrações mostrando a forma de inserções destas proteínas na membrana do REG.

Proteína unipasso com sequência sinal clivável

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2202&rendertype=figure&id=A2224>

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=mboc4&part=A2202&blobname=ch12f47.jpg>

Proteína unipasso com sequência sinal interna

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2202&rendertype=figure&id=A2225>

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=mboc4&part=A2202&blobname=ch12f48.jpg>

Proteína multipasso

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2202&rendertype=figure&id=A2227>

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=mboc4&part=A2202&blobname=ch12f49.jpg>

4.3. TRANSPORTE VESICULAR

O terceiro mecanismo envolvido no endereçamento de proteínas é o transporte vesicular. As proteínas que são sintetizadas nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático, sejam integrais da membrana ou solúveis do lúmen do retículo, podem ter diferentes destinos celulares. A figura 3.4 representa um diagrama com as possíveis rotas para estas proteínas. Independente da destinação celular (ou mesmo extracelular), tais proteínas são transportadas de um compartimento para o outro através de vesículas especializadas. Três vias de transporte vesicular são encontradas nos organismos eucariotos: via de exportação, via de recuperação e via endocítica.

A via de exportação tem início no retículo endoplasmático e pode seguir três destinos: a formação dos lisossomos, a secreção constitutiva (SC) e a secreção regulada (SR). As enzimas lisossomais (hidrolases ácidas) são endereçadas aos endossomos tardios (vesículas que recebem o material endocitado do meio extracelular) para constituírem os lisossomos. Na secreção constitutiva, as vesículas, contendo as proteínas sintetizadas no REG, são direcionadas imediatamente para a membrana plasmática, sendo este processo fundamental para manutenção das funções primordiais desta membrana (transporte, sinalização, adesão ou reconhecimento). As vesículas envolvidas na secreção regulada, no entanto, necessitam de sinais extracelulares para liberarem os seus conteúdos no meio extracelular. O aumento dos níveis de cálcio intracelular é responsável pela fusão destas vesículas com a membrana plasmática e conseqüente liberação do conteúdo vesicular no meio extracelular. É através da secreção regulada, por exemplo, que a

insulina é liberada pelas células das Ilhotas de Langerhans em resposta ao aumento da glicose na corrente sanguínea.

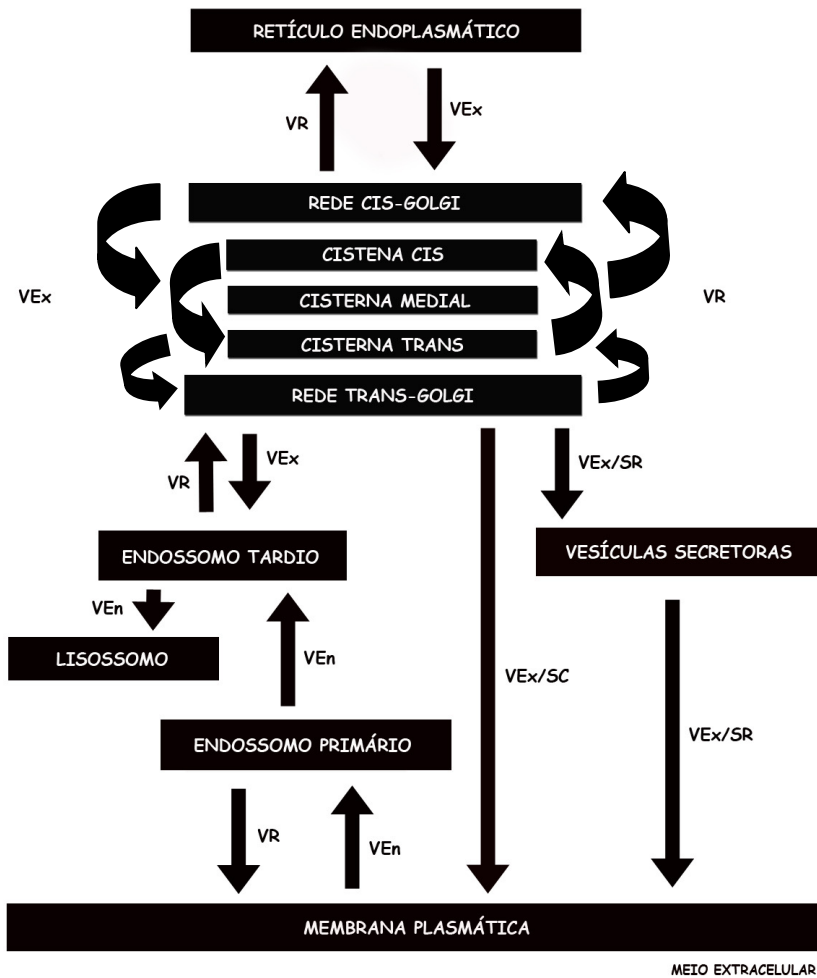
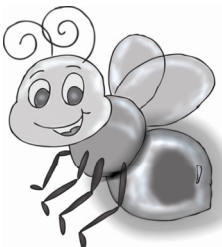


Figura 3.4 – Diagrama ilustrativo do tráfego vesicular. VEx = via de exportação. VR = via de recuperação. VEn = via endocítica. SC = secreção constitutiva. SR = secreção regulada.

:: FIQUE LIGADO!! ::



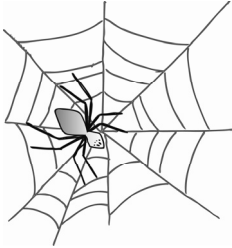
Os lisossomos são organelas ricas em enzimas responsáveis pela degradação de uma série de substratos de origem extracelular. Entre as enzimas lisossomais podemos destacar as nucleases, proteases, glicosidases, lipases, fosfatases, fosfolipases e sulfatases. Estas enzimas são conhecidas como hidrolases ácidas, uma vez que as reações catalisadas por estas enzimas são reações de hidrólise que ocorrem em meio ácido. A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por uma enzima que utiliza a molécula de água para clivar outra molécula. O pH ácido dos lisossomos é mantido por uma bomba de prótons que transporta, ativamente, prótons H^+ para o lúmen lisossomal. As hidrolases ácidas são sintetizadas no REG e transportadas, por vesículas, até os endossomos tardios, vindo a constituir os lisossomos.

:: FIQUE DE OLHO!! ::



Diversos processos fisiológicos dependem da fusão das vesículas de secreção regulada com a membrana plasmática, entre os quais podemos destacar a secreção de insulina, a neurotransmissão e a fertilização. Em todos os casos, o aumento da concentração de íons cálcio é diretamente responsável pela fusão das vesículas secretoras com a membrana plasmática.

:: TA NA WEB!!! ::



No endereço <http://www.johnkyrk.com/golgiAlone.pt.html> você irá encontrar uma animação sobre endereçamento de proteínas e tráfego vesicular.

:: PERGUNTAS?? ::



Tanto o retículo endoplasmático quanto o complexo golgiense possuem proteínas que desempenham suas atividades nestas organelas, sendo conhecidas como proteínas residentes do retículo ou do complexo golgiense. Faça uma pesquisa e descubra quais são os mecanismos responsáveis pela retenção destas proteínas nestas organelas.

UNIDADE 4

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E COMPLEXO GOLGIENSE

1. INTRODUÇÃO

Grande parte das proteínas sintetizadas nos ribossomos aderidos à face citosólica da membrana do retículo sofrem alterações estruturais durante ou após a síntese. A modificação mais marcante é a adição de resíduos de açúcares, em um processo conhecido como glicosilação. A adição dos carboidratos pode ocorrer tanto no retículo endoplasmático quanto no complexo golgiense. Além da glicosilação de proteínas outros processos biológicos relevantes ocorrem nestas duas organelas. Nesta unidade vamos conhecer um pouco mais sobre o papel biológico e a organização estrutural destes compartimentos celulares.

2. RETÍCULO ENDOPLAMÁTICO

O retículo endoplasmático pode ou não apresentar ribossomos aderidos à face citosólica de sua membrana. Quando os ribossomos estão presentes, o retículo é nomeado retículo endoplasmático granuloso (REG). Na ausência dos ribossomos, o retículo é denominado retículo endoplasmático não-granuloso (RENG). Esta feição estrutural é facilmente visualizada através da microscopia eletrônica de transmissão e apresenta uma relação direta com o papel biológico desta organela. O retículo endoplasmático, seja granuloso ou não, é constituído por uma extensa rede de membranas, em formato de sacos achatados, dispostos em forma paralela, como pode ser visualizado na figura 4.1.

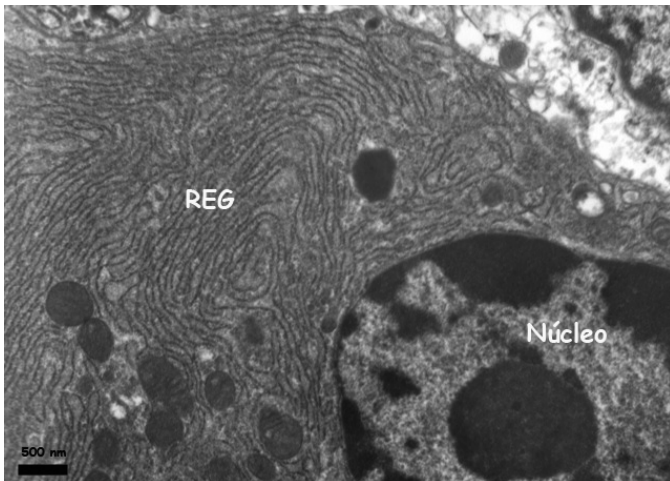


Figura 4.1 - Fotomicrografia eletrônica de uma célula do tecido pulmonar evidenciando o retículo endoplasmático granuloso. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Clara_cell_lung_-_TEM.jpg

3. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO GRANULOSO

A membrana do retículo endoplasmático granuloso é contínua à membrana externa do envelope nuclear, sendo caracterizada pela presença de polirribossomos na sua face citosólica. Os polirribossomos são formados pela associação de vários ribossomos a uma única fita de RNAm. O interior do REG é denominado lúmen reticular e é o local onde ocorre tanto a glicosilação de proteínas, quanto a ancoragem de proteínas integrais por meio da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). O REG é notavelmente presente em células secretoras de peptídeos e proteínas, tais como hepatócitos, linfócitos B, fibroblastos e células pancreáticas. Nestes tipos celulares o REG ocupa uma grande área do citoplasma.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::

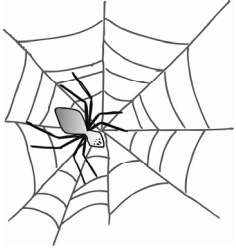
Faça uma pesquisa e descubra quais são as moléculas secretadas pelos tipos celulares citados no parágrafo anterior e a sua relevância biológica.

3.1. GLICOSILAÇÃO NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A glicosilação de proteínas é um processo fundamental para o enovelamento correto das proteínas no lúmen reticular. Uma vez glicosiladas, as proteínas são denominadas glicoproteínas. Estas glicoproteínas desempenham papéis biológicos variados na superfície celular, atuando como receptores, moléculas de adesão e reconhecimento celular, entre outros. Além disto, a porção glicídica das glicoproteínas contribui para a formação do glicocálice. O glicocálice é o conjunto de açúcares expostos na superfície celular e que estão associados com uma série de eventos celulares, tais como adesão e reconhecimento celular e proteção da membrana contra ação de proteases e fosfolipases.

A glicosilação - adição de resíduos de açúcar a uma proteína - no retículo endoplasmático granuloso é mediada por enzimas presentes no lúmen reticular e ocorre de forma co-traducional, ou seja, durante a síntese da proteína pelos ribossomos aderidos à membrana reticular. A glicosilação reticular ocorre em bloco, onde um oligossacarídeo precursor, constituído por 14 resíduos de açúcar, é adicionado, covalentemente, pela enzima oligossacaril-transferase, à proteína alvo. Este oligossacarídeo precursor é formado por 2 resíduos de N-acetilglicosamina, 3 resíduos de glicose e 9 resíduos de manose e se encontra ligado, de forma covalente, à molécula de dolicol-fosfato, um lipídio presente na face luminal da membrana reticular, e que atua como âncora do oligossacarídeo precursor. A enzima oligossacaril-transferase, como o próprio nome sugere, transfere o oligossacarídeo precursor da molécula de dolicol-fosfato para a proteína alvo, estabelecendo uma ligação covalente entre um resíduo de N-acetilglicosamina e o grupamento amino da cadeia lateral de um resíduo do aminoácido asparagina, sendo, por este motivo, a glicosilação denominada *N*-ligada (o "*N*" refere-se ao nitrogênio do grupamento amino da cadeia lateral da asparagina). Entretanto, não são todos os resíduos de asparagina de uma proteína que são glicosilados. Apenas os resíduos de asparagina que estão presentes em uma sequência específica, compostas por 3 resíduos de aminoácidos (Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina ou ácido aspártico), e que permitem uma interação com a enzima oligossacaril-transferase, recebem o oligossacarídeo precursor. Uma glicoproteína pode apresentar mais de um sítio de glicosilação.

Após o término da síntese protéica, o oligossacarídeo precursor é processado no lúmen do retículo endoplasmático, sofrendo a ação das enzimas glicosidase e manosidase reticulares. Estas enzimas são responsáveis pela retirada de três resíduos de glicose e um resíduo de manose. A redução no número de resíduos de açúcar funciona como um controle de qualidade do processo de enovelamento, permitindo, assim, que a glicoproteína seja exportada para o complexo golgiense somente após o seu correto dobramento. O processamento do oligossacarídeo continuará, então, no complexo golgiense, como veremos em seguida.

:: TA NA WEB!!! ::

No endereço abaixo você encontrará uma animação mostrando, de forma esquemática, como ocorre a glicosilação de proteínas no retículo endoplasmático granuloso e sua subsequente exportação para o complexo golgiense.

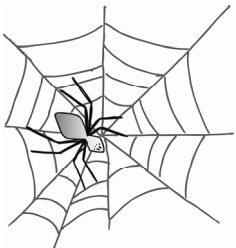
Protein Glycosylation Animation → <http://www.cdgs.com/popupbasic.html>

4. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NÃO-GRANULOSO

O retículo endoplasmático não-granuloso é caracterizado, estruturalmente, pela ausência de ribossomos em sua membrana, que, na grande maioria das células, é contínua à membrana do REG.

O RENG é responsável pela síntese de ácidos graxos e dos fosfolípidos que constituem as biomembranas. Esta organela é bastante evidente em tipos celulares envolvidos na síntese maciça de lípidos, tais como: as células que constituem o córtex da glândula supra-renal e que são responsáveis pela síntese e secreção de corticosteróides; as células de Leydig (células intersticiais do testículo), responsáveis pela síntese e secreção de testosterona; e os hepatócitos.

A síntese dos fosfolípidos de membrana ocorre na face citosólica da membrana do RENG, tendo como lípido precursor o ácido fosfatídico, que é formado pela união de uma molécula de glicerol com duas moléculas de ácido graxo. Uma vez que as enzimas responsáveis pela síntese dos fosfolípidos estão presentes na face citosólica da membrana do RENG, torna-se necessária a transferência de parte destes fosfolípidos, recém sintetizados, para a face luminal da membrana do RENG, de forma a manter a estabilidade da bicamada lipídica. A translocação destes fosfolípidos é mediada por proteínas denominadas flipases, que catalisam, ativamente, a transferência destes fosfolípidos da monocamada citosólica para a monocamada luminal, permitindo, deste modo, um crescimento uniforme da membrana. O RENG é, também, o principal local de síntese de dois outros importantes lípidos de membrana: o colesterol e a ceramida. Como vimos na unidade 2, a ceramida é composta pela esfingosina e um ácido graxo, sendo a base estrutural da esfingomielina, o único fosfolípido de membrana que não é sintetizado no RENG, mas no complexo golgiense.

:: TA NA WEB!!! ::

No endereço abaixo você encontrará uma ilustração demonstrando a síntese dos fosfolípidos no retículo endoplasmático não-granuloso.

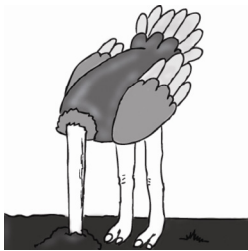
→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A1466&rendertype=figure&id=A1488>

:: SAIBA MAIS... ::



Nos hepatócitos, em especial, o RENG está envolvido em processos de destoxificação celular, transformando substâncias hidrofóbicas em compostos com caráter mais hidrossolúvel, permitindo, assim, a sua excreção, principalmente por via renal. O complexo enzimático responsável por esse processo é conhecido como citocromo P450 (CYP). Apesar do fígado ser o principal local de destoxificação celular mediada pelo citocromo P450, outros órgãos também expressam o complexo (pulmão, rins, pele, cérebro e intestino). O complexo citocromo P450 catalisa a oxidação de substratos orgânicos, tais como intermediários metabólicos de lipídeos e esteróides, assim como substâncias exógenas (xenobióticos) potencialmente tóxicas. O CYP está envolvido na biotransformação de uma série de fármacos. Em alguns casos, as reações enzimáticas mediadas pelo CYP levam à inativação e excreção de um fármaco, em outros casos, o CYP é responsável pela bioativação do fármaco a partir da sua conversão em um metabólito ativo.

:: FIQUE POR DENTRO!! ::



O composto cetoconazol, um derivado do alcalóide imidazol, é um inibidor do complexo CYP51 (14 α -desmetilase) bastante utilizado no tratamento de infecções provocadas por fungos. O princípio de sua atividade antifúngica se baseia na inibição da conversão do lanosterol em ergosterol, um importante lipídeo que compõe a membrana celular dos fungos. O ergosterol desempenha o mesmo papel biológico que o colesterol desempenha nas células animais.

:: FIQUE DE OLHO!! ::



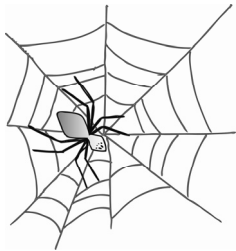
Em alguns tipos celulares, como as células musculares da musculatura lisa ou estriada, o RENG é denominado retículo sarcoplasmático. Nestas células o RENG é responsável pelo armazenamento e eventual liberação de íons cálcio. A membrana do retículo sarcoplasmático é rica em bombas de cálcio (SERCA ou Ca²⁺-ATPase do retículo sarco/endoplasmático) que promovem o transporte dos íons cálcio do citosol para o interior do retículo. Quando as células musculares são estimuladas, canais de cálcio são abertos na membrana do retículo sarcoplasmático, promovendo o aumento da concentração de íons cálcio no citosol e a conseqüente contração muscular. É importante ressaltar que o armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático não é uma exclusividade das células musculares, pois também se faz presente nos mais diversos tipos celulares.

5. COMPLEXO GOLGIENSE

5.1 UM POUCO DE HISTÓRIA...

O complexo golgiense foi identificado, no ano de 1898, pelo médico e pesquisador italiano Camilo Golgi. Golgi estava interessado no estudo da morfologia do tecido nervoso e as técnicas de coloração, vigentes na época, eram insatisfatórias para uma adequada visualização tecidual. Assim, Camilo desenvolveu uma série de técnicas de impregnação destes tecidos com metais. Uma destas técnicas, denominada reação negra, onde o tecido era tratado com dicromato de potássio e posteriormente impregnado com nitrato de prata, formando cromato de prata, permitiu, ao pesquisador, a identificação de uma rede intracelular que ele denominou aparato reticular interno. “Nascia” o complexo de Golgi, conhecido, hoje, como complexo golgiense (CG).

:: TA NA WEB!!! ::



Conheça um pouco mais da vida e da história de Camilo Golgi e de suas contribuições para as ciências biológicas →
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/golgi/

5.2. ESTRUTURA DO COMPLEXO GOLGIENSE

O complexo de Golgi é composto por um sistema de vesículas achatadas, denominadas cisterna, que podem variar em número e tamanho. Estas cisternas são circundadas por diversas vesículas esféricas que são responsáveis pelo transporte de moléculas entre os compartimentos do CG. Na maioria das células animais e vegetais, o CG é constituído por 5 a 8 cisternas, que são mantidas próximas por meio de iterações com uma matriz protéica presente no citosol. O CG mantém uma estreita relação funcional e estrutural com o retículo endoplasmático. A face do CG voltada para o retículo (e conseqüentemente, para o núcleo celular) é, geralmente, convexa e denominada rede cis. Já a face voltada para a membrana plasmática, é côncava, e denominada rede trans. Entre as redes cis e trans, encontram-se as demais cisternas que compõem o CG (figura 4.2).

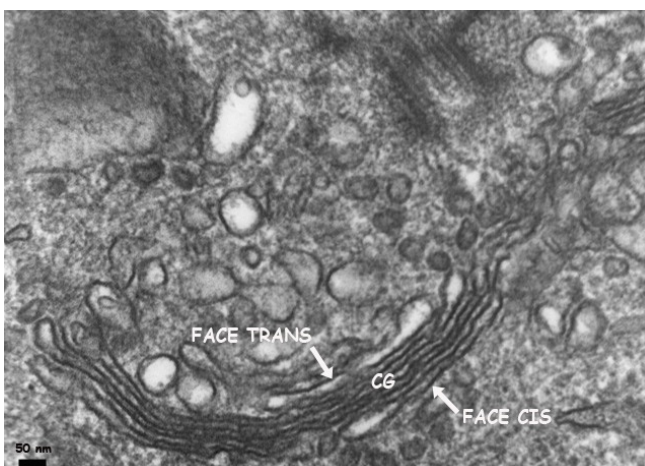


Figura 4.2 - Fotomicrografia eletrônica de um leucócito humano evidenciando o complexo golgiense. Modificado de [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Human leukocyte, showing golgi - TEM.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Human_leukocyte,_showing_golgi_-_TEM.jpg)

5.3. O COMPLEXO GOLGIENSE E O PROCESSAMENTO DE PROTEÍNAS

As glicoproteínas sintetizadas no REG, e que são direcionadas para o complexo golgiense por meio de transporte vesicular, sofrem uma série de modificações, na sua porção glicídica, à medida que são transportadas pelos compartimentos que constituem o CG. Estas proteínas são transportadas para a rede cis através de vesículas que brotam da membrana do retículo endoplasmático (figura 4.3). Ao se fusionarem com a membrana das cisternas que compreendem a rede cis, estas vesículas passam a integrar o CG.

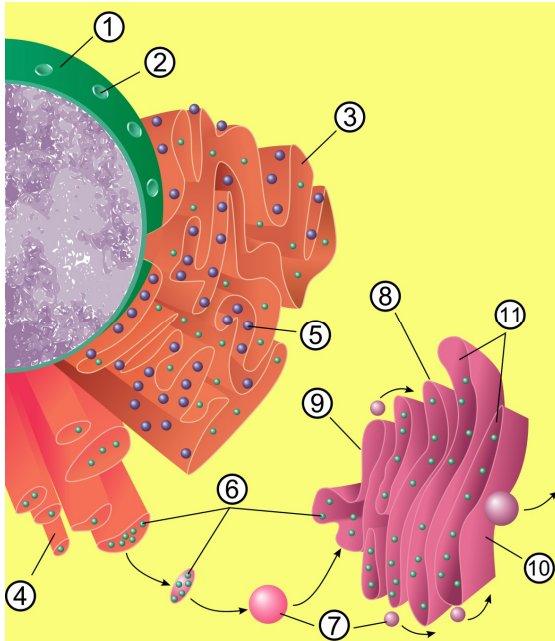


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do tráfego de vesículas e transporte de proteínas entre o retículo endoplasmático e o complexo golgiense. Envelope nuclear (1); Complexo de poros nucleares (2); Retículo endoplasmático granuloso (3); Retículo endoplasmático não-granuloso (4); Ribossomos aderidos ao REG (5); Proteínas (6); Vesículas de transporte (7); Complexo Golgiense (8); Face cis do complexo golgiense (9); Face trans do complexo golgiense; Cisternas do complexo golgiense (10).

Fonte:

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nucleus_ER_golgi.svg

Os oligossacarídeos *N*-ligados são processados no CG por uma série de enzimas que modificam sobremaneira estes grupamentos. Após o processamento no CG podemos encontrar duas classes de oligossacarídeos *N*-ligados: oligossacarídeos ricos em manose e oligossacarídeos complexos. Os oligossacarídeos ricos em manose são constituídos por 2 resíduos de *N*-acetilglicosamina e 5 resíduos de manose. Os oligossacarídeos complexos apresentam uma maior diversidade na composição dos resíduos de açúcar, como pode ser observado na figura 4.4C. Os oligossacarídeos presentes nas glicoproteínas chegam à rede cis do CG com 10 resíduos de açúcar (figura 4.4A). Manosidases presentes na cisterna cis do CG removem 3 resíduos de manose do oligossacarídeo, formando, assim os oligossacarídeos ricos em manose (figura 4.4B). Entretanto, em alguns casos, os oligossacarídeos sofrem uma série de adições de novos resíduos de açúcar, dando origem aos oligossacarídeos complexos.

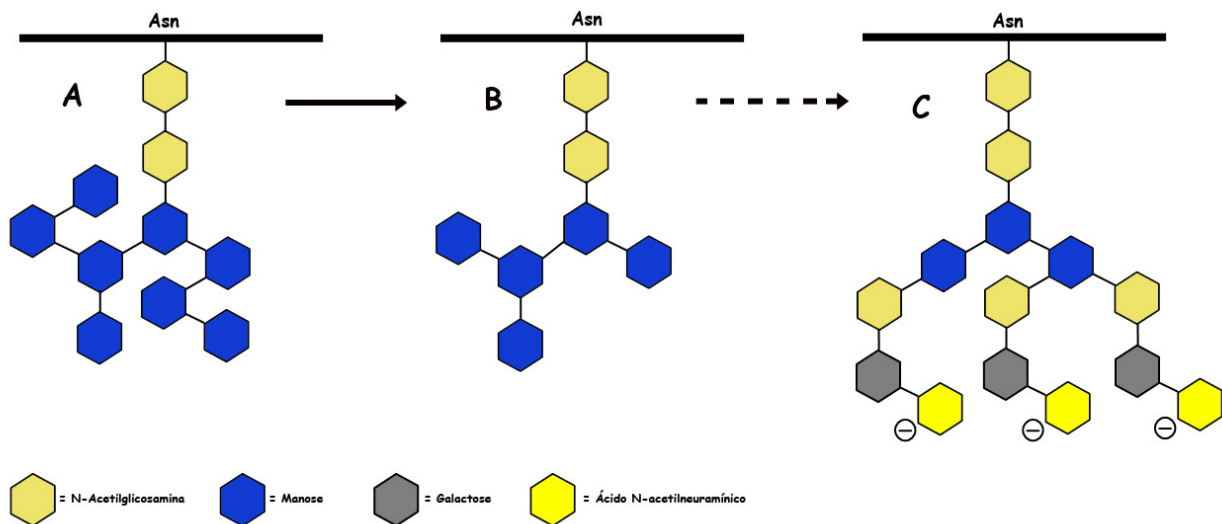


Figura 4.4 - Processamento de oligossacarídeos N-ligados no complexo golgiense. A - oligossacarídeo com 10 resíduos de açúcar (retículo endoplasmático). B - oligossacarídeo rico em manose (complexo golgiense). C - oligossacarídeo complexo (complexo golgiense). Asn - resíduo de asparagina da glicoproteína alvo. A linha negra contínua representa a cadeia polipeptídica da glicoproteína.

As glicoproteínas podem apresentar os dois tipos de glicosilação *N*-ligada em diferentes porções da cadeia polipeptídica. A definição quanto tipo de oligossacarídeo (rico em manose ou complexo) depende, fundamentalmente, da acessibilidade das enzimas responsáveis pela adição dos resíduos de açúcar ao sítio de glicosilação. A diversidade composicional dos oligossacarídeos complexos é responsável pela especificidade nos processos de reconhecimento celular mediados pela interação entre proteínas que se ligam a carboidratos, conhecidas como lectinas, com as glicoproteínas expressas na superfície celular.

Além do processamento dos oligossacarídeos *N*-ligados provenientes do REG, o CG também é responsável pela glicosilação de proteínas. A glicosilação que ocorre no CG apresenta algumas características que a distinguem da glicosilação que ocorre no REG. No CG, a adição dos resíduos de açúcares ocorre de forma seriada, ou seja, em contraste com a adição em bloco que ocorre no REG, a adição dos resíduos, no CG, ocorre passo-a-passo por ação de glicosiltransferases golgienses. O primeiro resíduo a ser adicionado a uma proteína é sempre a N-acetilgalactosamina. Dois resíduos de aminoácidos podem ser glicosilados: a serina ou a treonina; dando origem, assim, ao que denominamos de oligossacarídeos *O*-ligados (o “*O*” refere-se ao oxigênio do grupamento hidroxila da cadeia lateral da serina ou da treonina). A glicosilação *O*-ligada é responsável pela formação das proteoglicanas - glicoproteínas altamente glicosiladas, ricas em glicosaminoglicanas e de caráter aniônico. As proteoglicanas podem ser secretadas para o meio extracelular, onde desempenham um importante papel na composição da matriz extracelular, ou permanecerem na membrana plasmática como proteínas integrais da membrana. As proteoglicanas são os principais componentes do muco que reveste diversos epitélios e das cartilagens. Células especializadas na secreção de mucopolissacarídeos costumam apresentar uma extensa área do citoplasma ocupada pelo complexo golgiense, como, por exemplo, as células de Goblet que constituem o epitélio intestinal. Entre as principais proteoglicanas podemos citar o condroitim sulfato, o dermatam sulfato, a heparina, o heparam sulfato e o queratam sulfato.

Outras reações bioquímicas importantes também ocorrem no CG, como a fosforilação de proteínas destinadas aos lisossomos e a sulfatação e síntese de carboidratos. Nas células vegetais, o complexo golgiense é o local da síntese de pectinas (um heteropolissacarídeo) e da hemicelulose, moléculas que fazem parte da parede celular.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Faça uma pesquisa na internet e aprenda sobre o uso da heparina na indústria farmacêutica e da pectina na indústria alimentícia.

UNIDADE 5 MITOCÔNDRIA

1. UM POUCO DE HISTÓRIA

A mitocôndria (do grego, *mitos*, linha + *chondros*, grânulo) entrou para a história da ciência em 1857, quando foi descrita pela primeira vez por Albert von Kölliker, que relatou a presença de 'grânulos' em células musculares. A primeira denominação da organela, no entanto, foi cunhada pelo histologista alemão Richard Altmann em 1894. Ao observar que os 'grânulos' presentes em alguns tipos celulares; se assemelhavam a bactérias, Altmann denominou-os de 'bioblastos', considerando-os como a unidade básica da atividade celular (figura 5.1). O termo *mitochondrion* foi atribuído pelo médico e pesquisador alemão Carl Benda, em 1898. A organela, contudo, só recebeu um destaque maior a partir da metade do século XX. A Bioquímica foi a grande responsável pelo crescente interesse na mitocôndria, uma vez que o estudo do metabolismo aeróbico convergia para a organela.

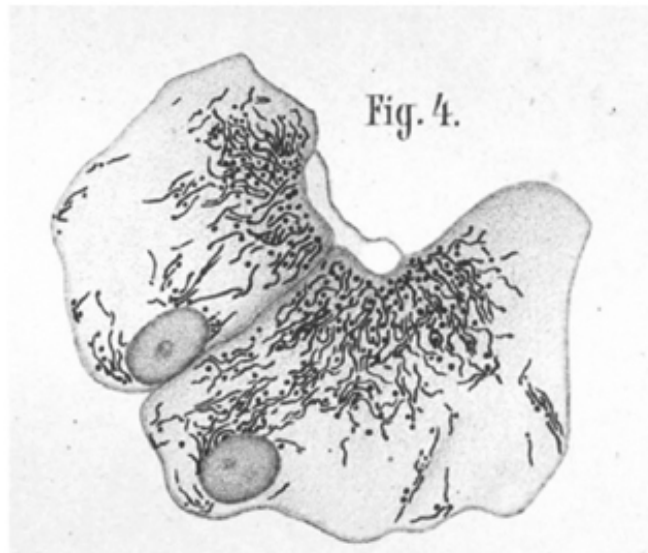


Figura 5.1 – Ilustração de células de fígado de anfíbio ricas em bioblastos. “Die elementarorganismen und ihre beziehungen zu den zellen”. Altmann, 1890.

No final do século XIX, os trabalhos de Louis Pasteur e Eduard Buchner davam início ao estudo do metabolismo glicídico, estudando o processo de fermentação em microorganismos e extratos celulares. Franz Knoop, no início do século XX, apresentava seus estudos sobre a oxidação de ácidos graxos. Estava pavimentada, assim, a estrada que levaria a bioquímica de encontro à mitocôndria. Os anos 1930 e 1940 foram fundamentais para o desenvolvimento da bioquímica. Os trabalhos de Gustav Embden, Otto Meyerhoff, e Jacob Parnas (via glicolítica, 1930-40); Hans Krebs (ciclo da uréia, 1932 - ciclo do ácido tricarboxílico, 1937); Nathan Kaplan e Fritz Lipmann (coenzima-A, 1945); e Severo Ochoa e Feodor Lynen (síntese do citrato, 1951) conferiram uma nova dimensão ao estudo do metabolismo celular. A história da mitocôndria caminhava de mãos dadas com as vias metabólicas: na medida em que se desvendavam etapas nos processos de oxidação de substratos energéticos, a mitocôndria ia sendo revelada.

A mitocôndria foi isolada pela primeira vez em 1934, por Robert Bensley e Normand Hoerr. Entretanto, somente com o estabelecimento da técnica de centrifugação diferencial, por Martin Behrens, a partir de 1938, é que foi possível obter preparações mais purificadas da organela. Os trabalhos do biólogo belga Albert Claude, no início dos anos 40, foram de suma importância para o desenvolvimento de técnicas que permitiriam o isolamento de mitocôndrias e demais componentes intracelulares. George Hogeboom, Walter Schneider e George Emil Palade, no final da mesma década, refinaram as técnicas desenvolvidas inicialmente por Claude, permitindo, enfim, os estudos com mitocôndrias bioquimicamente ativas. Com a mitocôndria 'em mãos', Eugene Kennedy e Albert Lehninger dariam o passo decisivo. Os trabalhos desenvolvidos por estes autores, entre os anos de 1948 e 1950, demonstrando que o ciclo do ácido tricarboxílico, a β -oxidação e a fosforilação oxidativa ocorrem na mitocôndria, foram cruciais para que a organela fosse abraçada, definitivamente, por todos aqueles que estudavam o metabolismo celular, tornando-se um domínio quase exclusivo da bioquímica. A avalanche de estudos bioquímicos com a organela culminaria, anos mais tarde, na formulação da Hipótese Quimiosmótica, pelo cientista britânico Peter Mitchell, que correlacionava a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna com o transporte de prótons (H^+), a geração de um gradiente eletroquímico, e a síntese de ATP. Mitchell, a bioquímica, e a mitocôndria foram contemplados, no ano de 1978, com o Prêmio Nobel em Química.

Contudo, a mitocôndria não era estudada somente sob o ponto de vista energético. Em 1957 o grupo do pesquisador belga Chèvremont identificou a presença de ácidos nucleicos em mitocôndrias de células musculares, o que levantou suspeita sobre a existência de um DNA mitocondrial (DNAm). As suspeitas iniciais de Chèvremont seriam confirmadas seis anos depois. Em 1963, dez anos após a descrição da estrutura molecular do DNA por James Watson e Francis Crick, Margit Nass e Sylvian Nass, através da microscopia eletrônica, observam em mitocôndrias de células embrionárias de aves, filamentos que julgavam ser de uma molécula de DNA. A confirmação veio logo em seguida, a partir do isolamento de DNAm de diversos tipos celulares, dando início a uma nova fase no estudo da organela.

2. VISUALIZANDO A MITOCÔNDRIA

A microscopia óptica comum apresenta uma série de limitações para a observação da mitocôndria. Apesar das restrições impostas, foi esta técnica que revelou ao mundo essa fantástica organela. O primeiro método empregado na coloração da mitocôndria, utilizando o corante fucsina, foi desenvolvido por Altmann em 1890. Os estudos de Altmann possibilitaram a identificação da organela em diversos tipos celulares. Hoje sabemos que a mitocôndria é encontrada em praticamente todas as células eucariotas. Desde os primeiros e elegantes estudos microscópicos da organela, realizados pelo casal norte-americano Warren Harmon Lewis e Margaret Reed Lewis em 1914, utilizando o corante básico verde janus, até os dias de hoje, a visão da mitocôndria sofreu várias transformações.

Com o desenvolvimento de métodos adequados de fixação, e de cortes ultrafinos para a microscopia eletrônica, George Palade e Fritiof Sjöstrand descreveram, de forma independente, no ano de 1953, o perfil estrutural básico da organela (figura 5.2). Ambos os modelos descreviam a existência de uma membrana mitocondrial externa e de uma membrana mitocondrial interna, esta, altamente dobrada e convoluta. Os modelos propostos por Palade e Sjöstrand divergiam apenas na interpretação das cristas mitocondriais, que Palade descreveu como "*baffle-like*", e

Sjöstrand, como “*septa-like*”. Porém, foi o modelo proposto por Palade que acabou prevalecendo e sendo incorporado por toda a literatura científica.

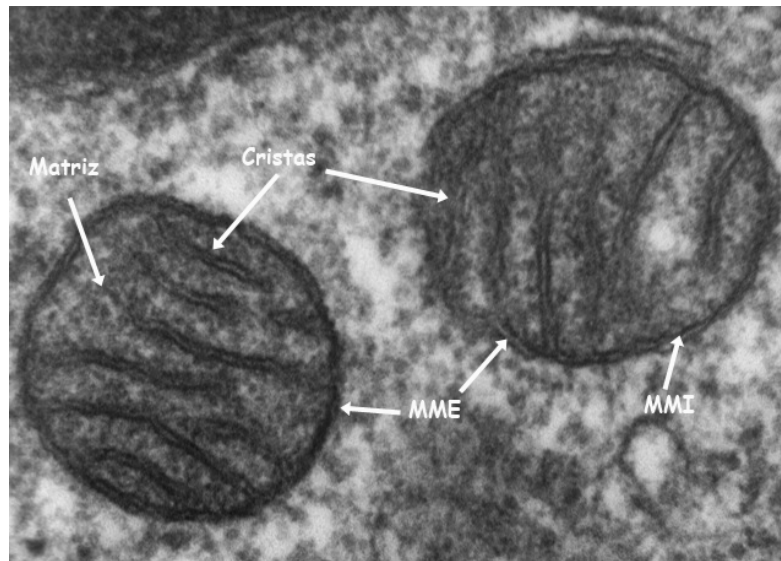


Figura 5.2 – Fotomicrografia eletrônica de uma célula pulmonar de mamífero revelando a ultraestrutura mitocondrial. Fonte:

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mitochondria,_mammalian_lung_-_TEM.jpg

O desenvolvimento de novas tecnologias vem modificando o perfil clássico e solitário da organela (“*cigar-shaped*”) difundido nos livros didáticos. Estudos mais recentes apontam novas configurações morfológicas para a organela, sugerindo uma interpretação estrutural onde a mitocôndria é vista como uma rede dinâmica e não mais como um aglomerado de organelas isoladas. A elaboração de novas técnicas de cortes ultrafinos, o desenvolvimento da microscopia eletrônica de alta voltagem, o surgimento da microscopia de fluorescência e confocal associadas ao desenvolvimento de fluorocromos com especificidade mitocondrial e, por fim, a associação da microscopia eletrônica com a tomografia computadorizada, foram fundamentais para a elaboração de um novo perfil estrutural e funcional para a organela. A visão que temos acerca da mitocôndria no dias de hoje, apesar de diferir em alguns pontos do modelo proposto por George Palade nos anos 1950, está muito próxima da clareza descritiva de George Altman e dos trabalhos pioneiros do casal Lewis.

A mitocôndria, todavia, ainda reservava algumas surpresas para a comunidade científica, algo além da já clássica formação de ligações fosfato de alta energia amplamente estudada pelos bioquímicos. A grande transformação ocorreria com a associação da mitocôndria com um tipo de morte celular programada, denominado apoptose, em meados da década de 1990. A organela, até então associada exclusivamente à conversão de energia, passaria também a ser relacionada a um processo de morte celular. A mudança de paradigma, da casa-de-força à cadeira-elétrica, levou quase 50 anos e alterou, marcadamente, o rumo dos estudos sobre o papel fisiológico da organela, colocando, novamente, os holofotes da ciência sobre a organela.

3. ESTRUTURA E FISILOGIA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é constituída por uma matriz envolta por duas membranas, denominadas membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME). Tanto a

membrana interna quanto a externa são bicamadas lipídicas, diferindo, entretanto, nas suas composições lipídicas e protéicas. Entre as duas membranas encontramos o espaço intermembrana (figura 5.3).

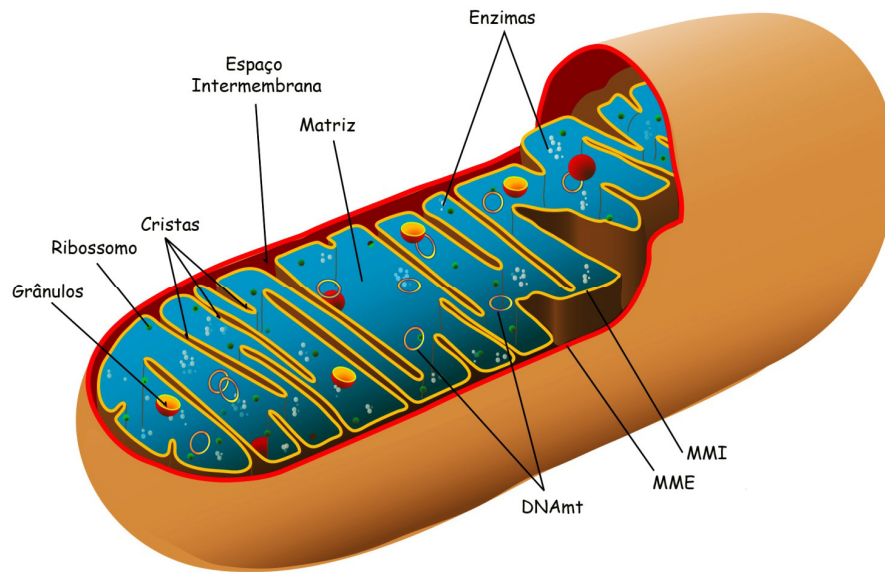


Figura 5.3 – Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Animal_mitochondrion_diagram_en_%28edit%29.svg

A organela é comumente descrita como cilindros alongados ou elipsóides, com dimensões aproximadas de 0,5 a 1 μm de diâmetro, constituindo, aproximadamente, 20 % do volume celular total. Recentemente, a mitocôndria vem sendo tratada como uma entidade única (rede mitocondrial). Independe de estar representada por centenas de unidades isoladas (fragmentos mitocondriais) ou por uma única estrutura contínua (retículo contínuo), a organela está deixando de ser tratada no plural (mitocôndrias; em inglês, *mitochondria*), passando a ser tratada no singular (mitocôndria celular ou rede mitocondrial). A mitocôndria celular é capaz de se dividir em unidades menores ou ser ampliada pela fusão destas unidades, espelhando a atividade celular em um determinado momento. Além destas alterações morfológicas, a sua distribuição celular também reflete a sua integração com a fisiologia da célula. A mitocôndria há muito deixou de ser vista como uma organela estática, assumindo, definitivamente, uma posição dinâmica. A mitocôndria pode se deslocar pela célula através de mecanismos que envolvem várias estruturas do citoesqueleto (filamentos de actina e microtúbulos) e diversas proteínas motoras, como as miosinas, as dineínas e as cinesinas.

3.1 MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA

A membrana mitocondrial externa é caracterizada por uma alta permeabilidade à íons e moléculas de até 5.000 daltons, onde podemos incluir, além dos íons, metabólitos e pequenas proteínas. A permeabilidade da MME é conferida pela expressão de uma proteína de 30 KDa, denominada VDAC (do inglês, *voltage-dependent anion channel*), também conhecida como porina, e que vem a ser a proteína mais abundante na MME. Cada canal é constituído por apenas uma única proteína, apresentando uma estrutura assimétrica e associações com esteróides e/ou fosfolípídios da membrana. Além da porina, encontramos na MME uma série de outras proteínas,

muitas das quais ligadas ao metabolismo celular, tais como a colina-fosfotransferase, a glicerofosfato-acil-transferase, a acil-CoA-graxo-sintase, a monoamino oxidase e a fosfolipase A; proteínas envolvidas na importação de proteínas mitocondriais, como as que compõem o complexo TOM; e proteínas envolvidas na apoptose, como as proteínas BCL-2 e BCL-XL.

3.2 ESPAÇO INTERMEMBRANA

O espaço intermembrana, como o próprio termo sugere, é delimitado pelas duas membranas mitocondriais (MME e MMI). Neste espaço são encontradas algumas proteínas associadas à apoptose, como as caspases 2, 3, 8 e 9, a Smac/DIABLO, a HtrA2/Omi, a AIF, a Endo G, e o citocromo c, este último também associado à cadeia de transporte de elétrons e à síntese de ATP. Além destas, também estão localizadas no espaço intermembrana, a adenilato cinase, a nucleosídeo-difosfocinase, e a creatina-cinase.

3.3 MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

A membrana mitocondrial interna, vista pela microscopia eletrônica, se caracteriza por apresentar uma série de dobras ou invaginações sobre a matriz mitocondrial. Essas invaginações recebem o nome de cristas mitocondriais e refletem a atividade respiratória da célula, uma vez que as proteínas que participam do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa encontram-se localizadas na MMI. A membrana interna encontra-se justaposta à MME, criando diversos pontos de contato com esta. As cristas têm sido vistas não apenas como simples convoluções da membrana interna, mas como um compartimento distinto, de formato lamelar ou tubular, e conectado à membrana interna por estruturas especializadas, denominadas *cristae junction*.

A MMI é impermeável a íons, sendo o transporte destes regulado por diversos canais, tais como: o antiporte K^+/H^+ , o canal de K^+ sensível à ATP (mitoKATP), o antiporte Na^+/H^+ , o uniporte de Ca^{2+} sensível ao vermelho de rutênio, o antiporte $3 Na^+/Ca^{2+}$, e o uniporte $3 H^+/Ca^{2+}$. Além destes transportadores seletivos de íons, encontramos na MMI o translocador de ADP-ATP, denominado ANT, que catalisa a troca de ADP^{3-} citosólico por ATP^{4-} matricial, e que constitui a proteína mais abundante da MMI. São encontradas, ainda, proteínas especializadas no transporte de carboxilatos, como o malato, succinato e citrato; e aminoácidos, como o aspartato e glutamato.

A reduzida permeabilidade da MMI aos íons ou moléculas carregadas é à presença da cardiolipina, um difosfatidil-glicerol formado por 4 cadeias de ácidos graxos de 18 carbonos (normalmente, o ácido linoléico), e que pode corresponder a até 20% dos fosfolipídios da membrana mitocondrial interna. A ocorrência da cardiolipina em animais e plantas superiores é restrita à MMI, uma vez que a expressão da cardiolipina-sintase, enzima responsável pela síntese da cardiolipina, é exclusivamente mitocondrial. Estudos mais recentes têm atribuído um papel importante para a cardiolipina na manutenção estrutural e funcional de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, tais como o ANT, a ATP-sintase e a citocromo oxidase, entre outras.

A maioria das proteínas que constituem a cadeia de transporte de elétrons, e que estão associadas à fosforilação oxidativa e síntese de ATP, também está expressa na membrana mitocondrial interna.

:: SAIBA MAIS... ::



Outra classe de proteínas presente na MMI é representada pelas proteínas desacopladoras (UCP, do inglês *uncoupling protein*). Essas proteínas, ao promoverem o influxo de prótons através da MMI, por uma via alternativa a da ATP-sintase, levam ao desacoplamento da cadeia respiratória, dissociando o transporte de elétrons, na MMI, da fosforilação do ADP. Desta forma, parte da energia gerada pelo influxo de prótons para a matriz é convertida em calor. Ou seja, estas proteínas são termogênicas. Cinco proteínas desta família já foram descritas: UCP1, expressa no tecido adiposo marrom e relacionada à termogênese; UCP2, de ampla expressão fisiológica; UCP3, expressa no tecido adiposo marrom e na musculatura esquelética, e também relacionada à termogênese; e UCP4 e UCP5, expressas no cérebro, e associadas tanto à termogênese quanto à regulação de espécies reativas de oxigênio. A UCP3 tem ganhado algum destaque na literatura pela suspeita de seu envolvimento no mecanismo de ação do hormônio tireoidiano T3 na elevação da taxa metabólica basal.

3.4. MATRIZ MITOCONDRIAL

A matriz mitocondrial é bastante rica em enzimas solúveis. Enzimas-chave do metabolismo oxidativo estão localizadas na matriz mitocondrial, entre as quais podemos destacar: enzimas envolvidas na oxidação do piruvato (piruvato desidrogenase) e dos ácidos graxos; enzimas constituintes do ciclo do ácido cítrico (com exceção da succinato-desidrogenase, que se localiza na MMI); e algumas enzimas do ciclo da uréia (carbamoil-fosfato-sintetase e ornitina-transcarbamoilase). Enzimas envolvidas na depuração de espécies reativas de oxigênio, tais como a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase também são encontradas na matriz mitocondrial. Estas enzimas são fundamentais por prevenirem danos estruturais e funcionais em lipídeos e proteínas mitocondriais.

3.4.1. DNA MITOCONDRIAL

As mitocôndrias, juntamente com os cloroplastos, são as únicas organelas que contêm um genoma próprio. Entretanto, a grande maioria das proteínas mitocondriais (aproximadamente 1000) é codificada pelo genoma nuclear. O DNAm_t é responsável pela síntese de apenas 13 cadeias polipeptídicas, além de conter dois genes codificadores para rRNA (12S e 16S) e 22 genes para tRNA. As proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial são: sete subunidades da NADH-ubiquinona-oxireductase; uma subunidade da ubiquinona-citocromo c-oxireductase (complexo III); três subunidades da citocromo-oxidase (complexo IV) e duas subunidades da ATP-sintase (Complexo V). Todas estas proteínas são proteínas integrais da MMI, que em associação com outras subunidades, codificadas pelo genoma nuclear, constituem a cadeia de transporte de elétrons.

O DNAm_t humano foi completamente seqüenciado em 1981. Exceto para o genoma de algumas algas e protozoários, o DNAm_t é circular, e se assemelha, estruturalmente, ao DNA bacteriano. Cada mitocôndria possui múltiplas cópias de DNA em sua matriz. Em células de mamíferos, o DNAm_t representa menos de 1% do DNA celular total, podendo ser encontradas até

1000 cópias em uma única célula. O processo de replicação do DNA, transcrição do DNA, e síntese protéica realizada a partir do DNAm_t é feito na própria organela; no entanto, esse processo é controlado por proteínas codificadas pelo DNA nuclear.

O genoma mitocondrial apresenta um número variado de pares de bases nucleícas de acordo com a espécie. Em humanos, o DNAm_t é constituído por 16.569 pares de base, ao passo que em algumas plantas superiores, o DNAm_t chega a ter até 2.500.000 pares de base. Não é somente no número de nucleotídeos que o DNAm_t varia entre as espécies. O próprio código genético mitocondrial apresenta algumas diferenças entre organismos distintos. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos AUA, que codifica o aminoácido isoleucina, no DNA nuclear, codifica o aminoácido metionina em mamíferos; o aminoácido serina, em *Drosophila*; e o aminoácido arginina em fungos e vegetais superiores. O código genético mitocondrial também se apresenta bastante variado entre as espécies com relação à sua capacidade de codificar proteínas. O DNA mitocondrial da *Reclinomonas americana* é capaz de codificar 67 proteínas, enquanto que o genoma mitocondrial do *Plasmodium falciparum* responde por apenas 3 proteínas. Entretanto, independentemente da sua capacidade de codificação, o genoma mitocondrial codifica, essencialmente, componentes envolvidos na conversão de energia pela célula. Durante a evolução, algumas espécies, como *Saccharomyces cerevisiae* perderam parte do conteúdo do genoma mitocondrial, uma vez que nem o DNA mitocondrial, nem o DNA nuclear, contêm o gene que codifica o complexo I da cadeia respiratória.

4. TEORIA ENDOSSIMBIÓTICA

As primeiras idéias sobre uma origem simbiótica para uma organela surgiram no final do século XIX, nos trabalhos do botânico alemão Andreas Franz Wilhelm Schimper, ao estudar a divisão dos cloroplastos em plantas verdes. No entanto, foi o cientista russo Konstantin Mereschkowsky o primeiro a conceber a teoria simbiótica, ao publicar, em 1905, um artigo onde discorria sobre a natureza e a origem dos cromatóforos (plastídeos) no Reino Plantae. Mereschkowsky expos com extrema clareza a hipótese de que os plastídeos seriam derivados de uma cianobactéria endossimbiótica. Nos anos de 1923 e 1927, o cientista norte-americano Ivan Emanuel Wallin publica dois trabalhos fundamentais: “*The Mitochondria Problem*” e “*Symbiogenesis and the origin of species*”; onde sugere uma origem simbiótica bacteriana para a mitocôndria, em contrapartida para uma origem citosólica proposta por alguns pesquisadores da época. Mais ainda, Wallin sugeria que o surgimento de novas espécies poderiam estar associado à infecções repetidas de um protoplasma primitivo por uma bactéria e que esta teria se tornado parte do próprio protoplasma com um simbiote. As propostas simbióticas de Mereschkowsky e Wallin foram fortemente criticadas na época. Sem bases moleculares para darem suporte à teoria proposta por estes brilhantes cientistas, a simbiose ficou esquecida por algumas décadas, até que a pesquisadora norte-americana Lynn Margulis ressuscitou a idéia da simbiose no ano de 1967, ao também propor que a mitocôndria teria se originado de uma bactéria ancestral de vida livre. As idéias de Margulis sobre a teoria simbiótica foram amadurecendo e culminaram com a publicação do livro “*Symbiosis in Cell Evolution*”, no ano de 1981, onde a cientista expõe definitivamente as bases celulares e moleculares que suportam a teoria endossimbiótica.

A teoria endossimbiótica postula que a mitocôndria teria se originado da endocitose de procariotos heterotróficos por células eucarióticas. Tais procariotos seriam organismos aeróbicos, que utilizam o oxigênio para a conversão energética a partir de substratos orgânicos. A teoria

postula que os procariotos teriam passado a viver no citoplasma dos eucariotos, tornado-se, ao poucos, dependentes, metabolicamente, da célula hospedeira. Por outro lado, a simbiose teria proporcionado à célula eucariótica hospedeira um incremento na disponibilidade de ATP para a realização das suas atividades fisiológicas, refletindo, posteriormente, em um aumento do grau de complexidade estrutural e funcional da mesma, e que culminaria com a formação dos primeiros organismos eucariotos multicelulares. Acredita-se que grande parte do genoma do organismo procarioto foi transferida para o genoma nuclear da célula eucariótica, o que é notável pela dependência da transcrição e tradução efetivadas a partir do DNA nuclear para a constituição da organela, e conseqüente perda da redundância genética. Tal fato justificaria a perda de autonomia das mitocôndrias nos dias de hoje.

Diversas evidências estruturais e funcionais suportam a teoria endossimbiótica. Entre estas, podemos destacar:

- a) A presença de duas membranas com composições lipídicas e protéicas distintas na mitocôndria.
- b) A presença de um DNA circular, como o encontrado nas bactérias.
- c) A semelhança estrutural entre os ribossomos presentes nas organelas e nas bactérias (ambos possuem o mesmo coeficiente de sedimentação: 70S).
- d) O fosfolípido cardiolipina é encontrado somente na membrana mitocondrial interna dos organismos eucariotos e na membrana plasmática de organismos procariotos.
- e) A N-formilmetionina é o aminoácido iniciador da síntese protéica tanto no processo traducional que ocorre nas mitocôndrias, quanto no que ocorre nas bactérias. Na síntese protéica que ocorre nos ribossomos presentes no citosol das células eucarióticas, a metionina, ao invés da N-formilmetionina, é o aminoácido iniciador do processo traducional.
- f) A homologia entre algumas proteínas mitocondriais e bacterianas. A estrutura primária da catalase mitocondrial de alguns organismos eucarióticos apresenta uma maior semelhança (homologia) com catalases bacterianas do que com a catalase citosólica da própria célula eucariótica.
- g) Os antibióticos eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol inibem tanto a síntese protéica bacteriana quanto a síntese protéica mitocondrial, sem, no entanto, afetarem a síntese protéica que ocorre no citosol das células eucarióticas. O mecanismo de ação destes antibióticos evidencia a conservação do processo traducional que ocorre entre as mitocôndrias e certos organismos procariotos.
- h) Análises filogenéticas demonstram uma forte correlação entre o genoma da bactéria *Rickettsia prowazekii*, um parasita intracelular obrigatório, e o genoma mitocondrial do protozoário *Reclinomonas americana*. Ambos os genomas não contêm os genes necessários para a realização da glicólise anaeróbica. Por outro lado, a *R. prowazekii* possui os genes necessários para a síntese das proteínas envolvidas no ciclo do ácido tri-carboxílico e da cadeia respiratória, de forma que a produção de ATP neste organismo ocorre de forma semelhante à mitocondrial.
- i) Alguns protozoários, como as Giardias ou as Amebas, são organismos eucarióticos anaeróbicos que não possuem mitocôndria, o que leva alguns pesquisadores a proporem que tais organismos sejam semelhantes aos primeiros eucariotos anaeróbicos, anteriores ao evento endossimbiótico.

5. MITOCONDRIA E O METABOLISMO ENERGÉTICO

A mitocôndria é o local de convergência do metabolismo energético nas células eucarióticas, se destacando por ser o sítio da síntese do trifosfato de adenosina (ATP). Os produtos do metabolismo de glicídeos, protídeos ou lipídeos são transportados para a matriz mitocôndria onde são completamente oxidados em uma série de reações enzimáticas. As enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia de transporte de elétrons são as responsáveis pela conversão da energia química, presente nas ligações covalentes entre os átomos de carbono dos substratos energéticos, e conseqüente síntese do ATP. As etapas reacionais envolvidas na síntese de ATP é objeto de estudo da bioquímica metabólica e serão abordadas em outro capítulo.

:: SAIBA MAIS... ::



Uma série de patologias associadas às alterações funcionais na mitocôndria já foram descritas na literatura. Mutações deletérias, que afetam genes que codificam para proteínas mitocondriais, são encontradas tanto no genoma nuclear quanto no genoma mitocondrial. Mais de 60% destas mutações, no entanto, estão relacionadas a genes que codificam RNAs transportadores mitocondriais, comprometendo, assim, a síntese das subunidades protéicas que constituem a cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, a síntese de ATP. Os tecidos mais afetados por estas mutações são aqueles que demandam um maior aporte energético, como os que constituem o sistema nervoso central, a retina, o aparelho auditivo e a musculatura lisa e esquelética. Uma série de síndromes que afetam estes tecidos e órgãos são conhecidas como doenças mitocondriais. Além destas patologias, a mitocôndria também tem sido correlacionada com uma série de outras patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, cânceres e até mesmo com o processo natural de envelhecimento humano.

6. O OUTRO LADO DA MITOCONDRIA

Além da consagrada síntese de ATP, a mitocôndria participa de uma série de processos fisiológicos essenciais. Dependendo do tipo celular, a mitocôndria pode estar envolvida desde a manutenção da homeostasia celular até na resposta a estímulos extracelulares ou no desenvolvimento dos organismos multicelulares. Sabemos, hoje, que a mitocôndria é fundamental no processo de morte celular por apoptose, na sinalização mediada pelos íons cálcio, por regular o metabolismo e a proliferação celular, na síntese de alguns hormônios esteróides, na termogênese, na destoxificação de amônia e na síntese parcial de grupamentos heme.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Você já ouviu falar no termo 'Eva Mitocondrial'? Quais são as bases científicas que levaram à proposição deste termo? Faça uma pesquisa e elabore um resumo, com uma visão crítica sobre o assunto.

UNIDADE 6 NÚCLEO

1. VISÃO GERAL

O núcleo foi a primeira organela a ser descrita. Antonie van Leeuwenhoek ao descrever a presença de “lumens”, em hemácias de salmão, no século XVII, foi o primeiro cientista a notar a presença do núcleo (figura 6.1A). Entretanto, foi o botânico escocês Robert Brown, na primeira metade do século XIX, quem nomeou a organela ao estudar os órgãos e a forma de fecundação em orquídeas. Outro cientista que foi fundamental para a descrição da estrutura nuclear foi o biólogo alemão Walther Flemming com os seus estudos sobre a divisão celular em diversas espécies, onde apresentava belíssimas ilustrações revelando os cromossomos e o nucléolo (figura 6.1B).

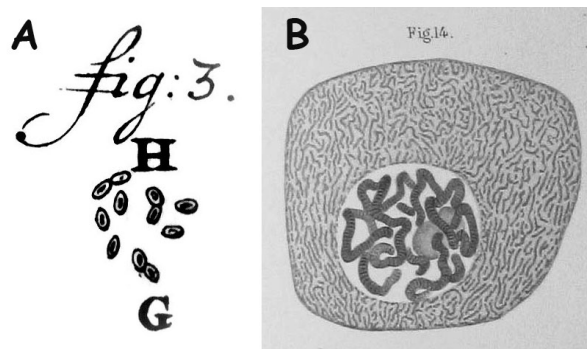


Figura 6.1 – Ilustrações originais dos trabalhos de Antonie van Leeuwenhoek (1719) e Walther Flemming (1882). A – Eritrócitos de Salmão; B – Célula da Glândula Salivar de Larvas de Chironomidae.

O núcleo é uma organela delimitada por um sistema de dupla membrana, disposta, geralmente, de forma concêntrica, e cujo diâmetro varia entre 5 e 10 μm (figura 6.2). No seu interior, denominado nucleoplasma, encontram-se, além do material genético, proteínas envolvidas na expressão gênica (síntese e processamento de RNAs) e no transporte de proteínas, RNAs e subunidades ribossomais entre o nucleoplasma e o citoplasma. A compartimentalização nuclear do material genético, característica exclusiva das células eucarióticas, confere uma série de vantagens em relação ao material genético disperso no citoplasma das células procarióticas, permitindo, por exemplo, um controle mais rigoroso da expressão gênica.

O núcleo não está presente em todas as células eucarióticas. Os eritrócitos humanos, por exemplo, não possuem núcleo, que é eliminado durante o processo de diferenciação celular (hematopoiese) que gera tais células a partir de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea. Por outro lado, algumas células, como os osteoclastos, são polinucleadas. Os osteoclastos são células importantes no processo de reabsorção e remodelagem óssea.

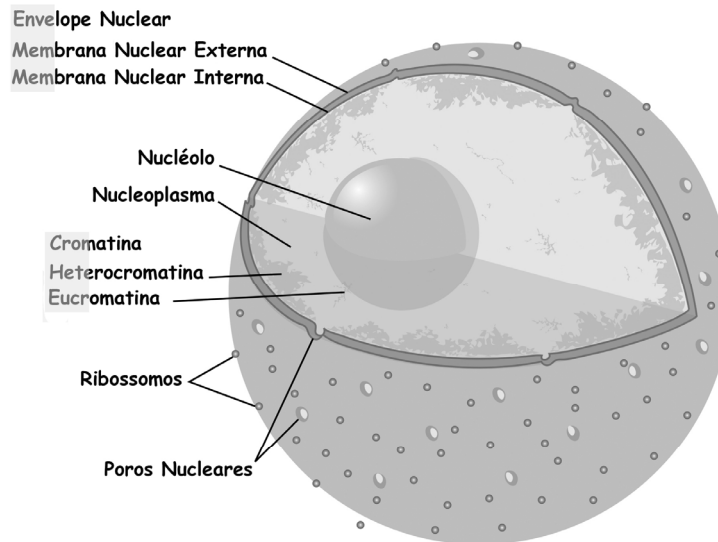


Figura 6.2 – Esquema ilustrativo da estrutura nuclear. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Diagram_human_cell_nucleus.svg

2. ENVELOPE NUCLEAR

O núcleo é limitado por um sistema de duas membranas denominado envelope nuclear, que é formado pela membrana nuclear interna e pela membrana nuclear externa, sendo esta última contínua à membrana no retículo endoplasmático granuloso. A face nucleoplasmática da membrana nuclear interna é recoberta por proteínas filamentosas denominadas laminas nucleares. No envelope nuclear estão presentes os poros nucleares, estruturas protéicas responsáveis pelo transporte de proteínas e RNAs entre o nucleoplasma e o citoplasma (figura 6.3).

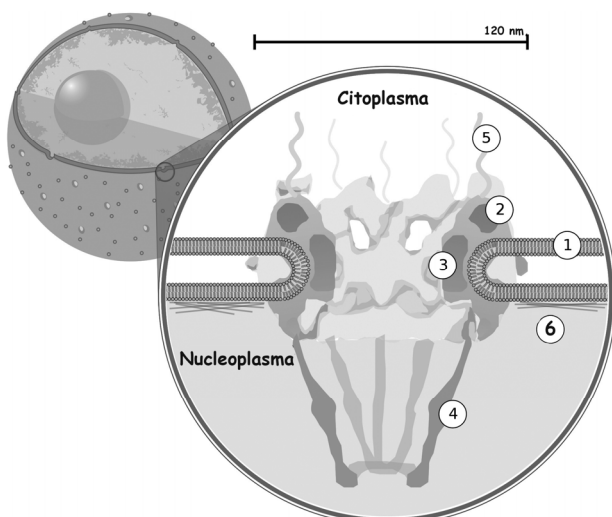


Figura 6.3 – Esquema ilustrativo do envelope nuclear (visão lateral). 1 – Envelope nuclear; 2 – Anel citoplasmático; 3 – Anéis do raio; 4 – Cesta nuclear; 5 – Fibrilas citoplasmáticas; 6 – Lâmina nuclear. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:NuclearPore_crop.svg

2.1. LÂMINA NUCLEAR

A lâmina nuclear é uma estrutura protéica responsável pela organização estrutural do envelope nuclear (figura 6.3). A lâmina é constituída por filamentos intermediários do citoesqueleto, denominados laminas nucleares. São conhecidas três tipos distintos de laminas

nucleares: lamina do tipo A, lamina do tipo B e lamina do tipo C. A lamina nuclear do tipo B é uma proteína integral da membrana nuclear interna, ancorada por lipídeo. As lamina do tipo A e C são proteínas periféricas que se associam, por meio de ligações não-covalentes, às lamina do tipo B. A lâmina nuclear é formada pela polimerização das lamina nucleares. A interação entre as lamina que constituem a lâmina nuclear é fundamental para a estruturação do envelope nuclear. Durante o processo de mitose, as lamina nucleares são fosforiladas em resíduos específicos de aminoácidos. Essa fosforilação reduz a interação entre as lamina nucleares, desfazendo a lâmina nuclear e, por sua vez, o envelope nuclear. Este processo permite que o material genético, com o auxílio das proteínas que constituem o microtúbulo, migre para os pólos da célula.

2.2. COMPLEXO DE POROS NUCLEARES

Os complexos de poros nucleares, ou simplesmente poros nucleares, são estruturas protéicas responsáveis pelo transporte bidirecional de íons e moléculas entre o nucleoplasma e o citoplasma. Cada poro é constituído por cerca de 100 proteínas, possuindo uma massa molecular estimada de aproximadamente 125 milhões de daltons. As proteínas que constituem os poros são denominadas nucleoporinas. De forma geral, uma célula de mamífero contém entre 3.000 e 4.000 poros nucleares. No entanto, o número de poros presentes no envelope nuclear pode variar conforme o tipo celular ou o estado fisiológico do mesmo. Quanto mais ativo for o processo de transcrição gênica em uma determinada célula, maior é o número de poros presentes no envelope nuclear.

Os poros nucleares medem cerca de 120 nm. No entanto, o diâmetro do canal formado pelo poro pode variar entre 9 e 50 nm. Pequenas moléculas, com até 5.000 daltons, são transportadas livremente pelos poros nucleares. Por outro lado, o transporte de proteínas ou subunidades ribossomais, requer mudanças conformacionais no poro, de forma a aumentar o diâmetro da luz do canal, permitindo o transporte de moléculas de até 26 nm. Como vimos na unidade 3, o transporte de proteínas através do poro nuclear é mediado por proteínas denominadas importinas ou exportinas. A interação das importinas com as fibrilas citoplasmáticas dos poros nucleares é que vai promover as mudanças conformacionais no poro de forma a permitir a abertura da luz do canal e o transporte das macromoléculas para o nucleoplasma.

:: PERGUNTAS?? ::



Quais são as proteínas que são importadas para o núcleo? Qual é o papel biológico de cada uma destas proteínas?

3. NUCLEOPLASMA

O nucleoplasma é a região delimitada pelo envelope nuclear que contém o material genético e as macromoléculas associadas ao controle da expressão gênica. Vamos, agora, conhecer um pouco sobre as principais estruturas presentes no nucleoplasma.

3.1. CROMATINA E CROMOSSOMOS

A cromatina é uma estrutura formada pela associação não covalente entre o DNA e as proteínas histonas. Essa associação é responsável pela condensação (compactação) do material genético. A formação da cromatina permite que uma molécula de DNA, cuja extensão linear é de quase 2 metros, possa ser armazenada em uma organela cujo diâmetro é de aproximadamente 10 μm . Este incrível grau de compactação possui um papel extremamente importante para as células eucarióticas, uma vez que um volume muito maior de informação genética pode ser armazenado, refletindo, assim, em um grau de complexidade biológica extremamente prolífico. A condensação da cromatina, além de reduzir o volume da molécula de DNA e permitir que a mesma seja armazenada no interior do núcleo, também é importante por controlar a expressão gênica. É importante ressaltar que o DNA nuclear das células eucarióticas é linear, em oposição ao DNA dos procariotos ou do DNA presente nas mitocôndrias das células eucarióticas, que possui uma estrutura circular.

A cromatina é formada por unidades repetidas de 146 pares de bases de nucleotídeos que envolvem um octâmero de histonas. Essas unidades são denominadas nucleossomos e a união entre elas forma a fibra de cromatina, uma estrutura que se assemelha a um colar de pérolas, onde as contas são os nucleossomos (figura 6.4). O DNA localizado entre dois nucleossomos é denominado DNA de ligação.

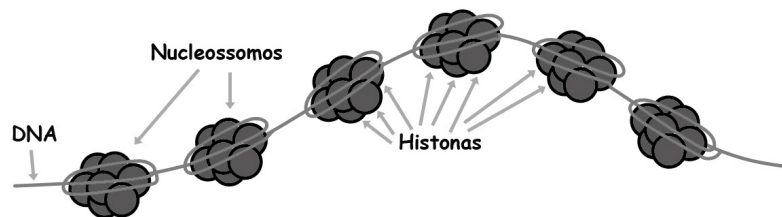


Figura 6.4 – Esquema representando uma fibra de cromatina.

As histonas são proteínas ricas em resíduos de aminoácidos básicos na sua região amino-terminal. As histonas que constituem o nucleossomos são denominadas histonas nucleossomais e incluem as histonas H2, H3A, H3B e H4. A compactação da molécula de DNA deve-se à interação entre as cadeias laterais carregadas positivamente das histonas e os grupamentos fosfatos da molécula de DNA. Apesar de não constituir os nucleossomos, a histona H1 também é importante para a configuração estrutural da cromatina, ao se associar à fibra de cromatina e aos próprios nucleossomos.

O grau de condensação da cromatina pode ser regulado de diversas formas. A regulação da condensação da cromatina é uma das formas que as células eucarióticas possuem para controlar a expressão gênica. A condensação da cromatina é inversamente proporcional à capacidade de transcrição gênica, ou seja, os genes só podem ser transcritos quando localizados em regiões menos condensadas da cromatina. Duas enzimas são fundamentais no controle do grau de condensação da cromatina. A histona acetiltransferase (HAT) é a enzima responsável pela adição de grupamentos acetila à cadeia lateral de resíduos de lisinas nas histonas, diminuindo a interação destas proteínas com a molécula de DNA, e promovendo, assim, a descondensação da cromatina. A enzima histona desacetilase (HDAC), por sua vez, é

responsável pela remoção dos grupamentos acetila, portanto, pelo aumento da interação das histonas com a molécula de DNA e pela condensação da cromatina.

Sob o ponto de vista estrutural e funcional, a cromatina pode ser classificada em eucromatina e heterocromatina. A eucromatina é caracterizada, morfológicamente, sob microscopia eletrônica de transmissão, como a região mais clara e menos densa da cromatina. Por outro lado, a heterocromatina é a região mais eletrodensa sob microscopia eletrônica, refletindo um maior grau de condensação da cromatina.

Os cromossomos são formados pela compactação da cromatina, e são encontrados somente na fase de mitose do ciclo celular. O grau de compactação observado entre a fibra de DNA e os cromossomos é de cerca de 10.000 vezes. Essa compactação é fundamental para que o material genético seja distribuído de forma homogênea e íntegra, após a devida duplicação, para as células filhas durante a divisão celular. A análise do padrão cromossômico de uma dada espécie gera um perfil específico que denominamos cariótipo, que inclui o número de cromossomos, o tamanho dos cromossomos, bem como a localização dos centrômeros (região de união das cromátides irmãs e onde ocorre a ligação das proteínas que compõem o fuso mitótico) (figura 6.5).

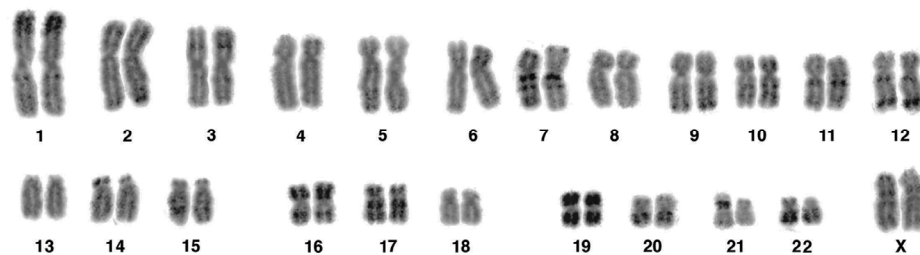
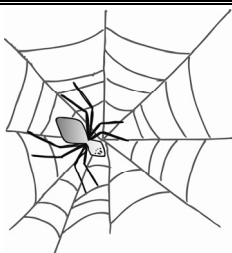


Figura 6.5 – Cariótipo de um linfócito humano (fêmea). Modificado de <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PLoSBIol3.5.Fig7ChromosomesAluFish.jpg>

:: TA NA WEB!!! ::



No endereço abaixo você encontrará uma tabela com o número de cromossomos em diferentes espécies

→ http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_organisms_by_chromosome_count

3.2 NUCLÉOLO

O nucléolo é a região do nucleoplasma onde se localizam os genes que codificam para o RNA ribossomal (RNAr), sendo, ainda, o local da biogênese dos ribossomos. Após transcrição destes genes, pela enzima RNA Polimerase I, o RNAr é processado e as subunidades ribossomais montadas no próprio nucléolo. O nucléolo aparece, sob microscopia eletrônica de transmissão, como uma região bastante eletrodensa (figura 6.6). Apesar de parecer homogêneo, uma análise mais detalhada do nucléolo revela que este apresenta regiões bem definidas sob o ponto de vista estrutural e funcional. A estrutura nucleolar pode ser dividida em: centros fibrilares (local de concentração de genes e RNA Polimerase I); componente fibrilar denso (local de síntese

do RNAr); e componente granular ou nucleolema (local de montagem das subunidades ribossômica).

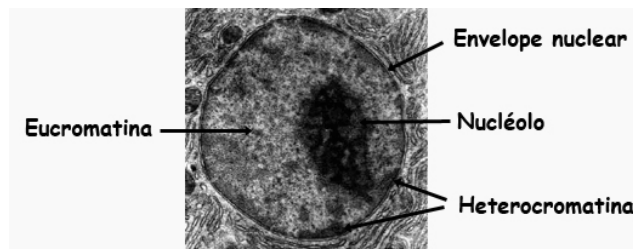


Figura 6.6 – Fotomicrografia de um núcleo evidenciando o nucléolo, a eucromatina e a heterocromatina. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Micrograph_of_a_cell_nucleus.png

:: PERGUNTAS?? ::



- ✓ O que é o Corpúsculo de Barr, ou cromatina sexual, e qual é a sua relevância biológica?
- ✓ Quantas RNA Polimerases são conhecidas? Em quais processos biológicos estas enzimas estão envolvidas?

UNIDADE 7 SINALIZAÇÃO CELULAR

1. VISÃO GERAL

A sinalização celular é um mecanismo de comunicação entre as células que se encontra presente nas mais diversas formas de vida, desde organismos unicelulares, como bactérias, fungos e protozoários, até seres multicelulares. Em organismos procaríotos, a sinalização extra e intracelular é crucial para o controle de diversos processos, tais como a formação do biofilme e a virulência. Já em organismos eucariotos unicelulares, a sinalização celular pode ser responsável pelo controle da reprodução sexual ou dos mecanismos de diferenciação celular, sendo geralmente controlada por fatores ambientais. A complexidade dos organismos multicelulares exibe um elevado grau de sofisticação extremamente dos sistemas de sinalização celular, que estão presentes na fertilização, desenvolvimento embrionário, morfogênese e organogênese, crescimento, regulação do período reprodutivo, resposta aos estímulos ambientais, manutenção da homeostasia e outros processos vitais.

O mecanismo de sinalização celular envolve a participação de uma célula sinalizadora, responsável pela produção e, na maioria dos casos, liberação de uma molécula sinalizadora, denominada ligante, e uma célula-alvo, que apresenta receptores (proteínas que reconhecem especificamente o ligante) que serão responsáveis pela propagação do sinal e conseqüente resposta celular. A natureza química dos ligantes é bastante diversa, incluindo desde gases, como o óxido nítrico, até pequenas moléculas hidrofóbicas, como lipídeos e esteróides, ou mesmo peptídeos e proteínas. Por outro lado, os receptores celulares são proteínas específicas que podem estar localizadas nas membranas celulares ou solúveis no citosol ou núcleo celular.

Vamos, a partir da próxima seção, conhecer melhor estes mecanismos de sinalização celular.

2. FORMAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

Existem diferentes formas de comunicação celular (figura 7.1). Cada forma de sinalização está presente em um diferente sistema biológico ou microambiente, sendo o tipo de sinalização determinante para o sucesso da resposta ao estímulo. As formas de sinalização celular são:

- a) Sinalização Dependente de Contato. Neste tipo de sinalização tanto os ligantes quanto os receptor são proteínas integrais da membrana plasmática. Não ocorre liberação do ligante para o meio extracelular. Em alguns casos, um segundo mensageiro é transmitido de uma célula para outra, através de canais protéicos (junções comunicantes) presentes nas membranas das duas células.
- b) Sinalização Parácrina. A molécula sinalizadora é liberada no meio extracelular, ativando somente células vizinhas e que expressam o receptor para o ligante, presentes no mesmo microambiente. Este tipo de sinalização é muito comum nos processos alérgicos e inflamatórios. Como exemplos de ligantes envolvidos na sinalização parácrina podem citar a histamina e as citocinas.

- c) Sinalização Autócrina. Neste tipo de sinalização, a molécula sinalizadora é liberada no meio extracelular, através de exocitose, ativando a própria célula que liberou o ligante. Esta forma de sinalização celular é comumente encontrada em células do sistema imunológico, onde podemos destacar a citocina IL-2, que controla, entre outros fatores, a proliferação celular em resposta a um estímulo antigênico.
- d) Sinalização Sináptica. A molécula sinalizadora é liberada no meio extracelular, ativando somente uma única célula, que se encontra presente na junção sináptica. Neste caso, a molécula sinalizadora é denominada neurotransmissor. A célula sinalizadora é sempre uma célula nervosa, e a célula-alvo pode ser outra célula nervosa, uma célula muscular ou uma célula de uma glândula endócrina, por exemplo. São diversos os neurotransmissores envolvidos na sinalização sináptica, entre os quais podemos destacar: a acetilcolina, a dopamina, a serotonina, a histamina, o glutamato, o ácido γ -aminobutírico (GABA), a adrenalina e a melatonina.
- e) Sinalização Endócrina. Nesta forma de sinalização, a molécula sinalizadora é liberada no meio extracelular, atingindo a corrente sanguínea. As células-alvo encontram-se em tecidos ou mesmo órgão e sistemas distantes da célula sinalizadora, que recebe o nome de célula endócrina. Neste caso, a molécula sinalizadora é conhecida como hormônio.

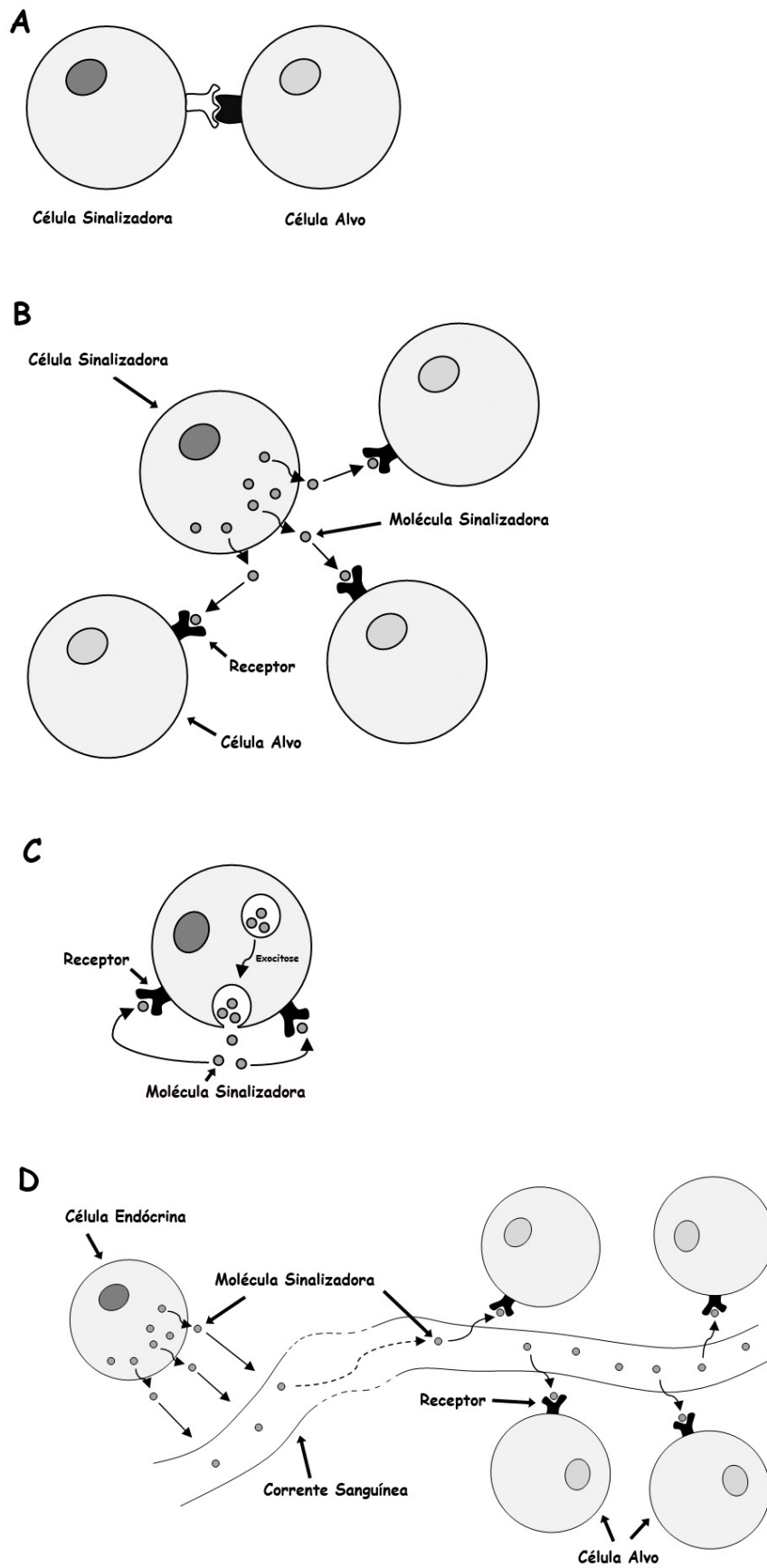
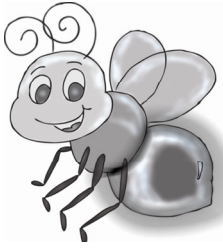


Figura 7.1 – Esquema ilustrativo das formas de sinalização celular . (A) – De contato; (B) – Parácrina; (C) – Autócrina; (D) – Endócrina.

:: FIQUE LIGADO!! ::



A diapedese (figura 7.2) é um processo fisiológico onde os glóbulos brancos deixam a circulação sanguínea em direção a um tecido danificado ou infectado. O processo começa com a expressão de proteínas na superfície da célula endotelial que revestem internamente os vasos sanguíneos. Estas proteínas, denominadas Selectinas, são reconhecidas por proteínas integrais da membrana plasmática de certos leucócitos, conhecidas como Integrinas, que, em uma sinalização do tipo dependente de contato, promove a adesão do leucócito à parede vascular do vaso e uma profunda alteração morfológica no glóbulo branco, permitindo assim, que o mesmo atravesse o endotélio capilar e chegue ao local da infecção ou do dano tecidual.

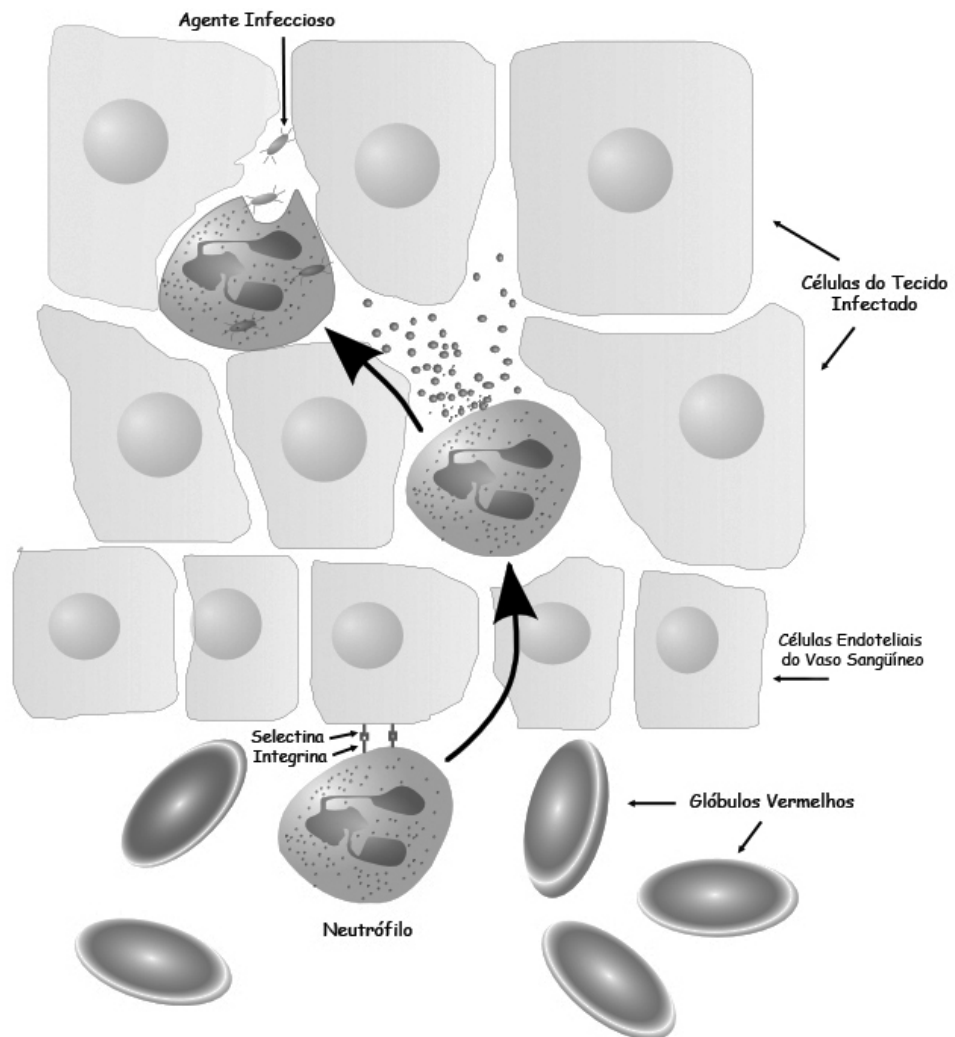


Figura 7.2 – Esquema ilustrativo da diapedese.

Modificado de

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/41/NeutrophilerAktion.png>

3. ESPECIFICIDADE E MULTIPLICIDADE DE SINAIS

A molécula sinalizadora (ligante) só é capaz de induzir uma resposta nas células que expressam o receptor específico para aquela molécula sinalizadora. Assim, células que não expressam o receptor não respondem ao sinal mediado pela molécula sinalizadora. Isso permite com que os organismos multicelulares controlem qual(ou quais) tipo(s) celular(es) irá(ão) responder a um determinado estímulo, permitindo uma coordenação adequada do status fisiológico do organismo.

Uma mesma molécula sinalizadora é capaz de induzir a resposta em diferentes tipos celulares, desde que eles apresentem receptores específicos para a molécula sinalizadora, que podem ou não ser do mesmo tipo (ou família). O tipo de resposta, em cada célula-alvo, neste caso, irá depender da especificidade da célula-alvo. Um dos exemplos mais marcantes é a resposta à acetilcolina pelas células musculares cardíacas, células musculares esqueléticas e células das glândulas salivares. As células musculares cardíacas e as células musculares esqueléticas possuem um tipo distinto de receptor da acetilcolina. Assim, enquanto que nas células musculares cardíacas, a acetilcolina promove o relaxamento muscular, nas células musculares esqueléticas, o estímulo pelo mesmo ligante promove a contração da musculatura. Por outro lado, as células das glândulas salivares possuem o mesmo tipo de receptor das células musculares cardíacas, e quando estimuladas pela acetilcolina respondem com a secreção salivar.

Sob o ponto de vista fisiológico, geralmente, a resposta celular depende de um conjunto de sinais múltiplos e não de apenas um único sinal mediado por uma única molécula. Ou seja, a resposta final é o somatório de estímulos ao qual uma determinada célula está submetida. Em alguns casos, a ausência de um estímulo modifica completamente a fisiologia celular, podendo, inclusive, levar a célula à morte.

:: FIQUE DE OLHO!! ::



A velocidade de resposta de uma célula a um determinado estímulo depende da presença (expressão), ou não, da(s) proteína(s) envolvida(s) na efetivação da resposta. A resposta pode ser imediata quando requerer apenas a alteração da função de uma determinada proteína (proteína envolvida na resposta celular e que já se encontra expressa na célula). Por outro lado, a resposta pode ser lenta quando o estímulo extracelular requerer a alteração da expressão gênica, e conseqüente síntese da(s) proteína(s) envolvida(s) na resposta celular. Na resposta imediata, a célula responde ao estímulo em questão de segundos ou minutos, já na resposta lenta, o estímulo só se tornará efetivo após minutos ou horas após a ativação do receptor e disparo da sinalização.

4. RECEPTORES CELULARES

Os receptores celulares são classificados com relação à sua localização celular, podendo ser receptores de superfície celular ou receptores intracelulares.

4.1. RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

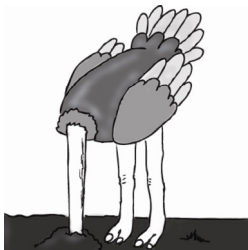
Os receptores de superfície celular são proteínas integrais transmembrana, presentes na membrana citoplasmática. O domínio exoplasmático é responsável pela interação com o ligante extracelular, que normalmente é uma molécula de caráter hidrofílico. A interação do ligante com este domínio promove alterações conformacionais na proteína que se refletem no domínio citosólico. São tais mudanças conformacionais que serão responsáveis pela propagação do sinal para o meio intracelular, permitindo, assim, que a célula responda ao estímulo externo. Existem três grandes classes de receptores de superfície celular:

- a) Receptores acoplados à canais iônicos. Neste caso, os próprios receptores atuam como canais iônicos e a sua interação com os ligantes extracelulares é que regula o fluxo iônico através do canal. Dois exemplos deste tipo de receptores são os receptores de acetilcolina da célula muscular esquelética, que atuam como um canal de sódio, e os receptores gabaérgicos expressos nos neurônios, que ao se ligarem ao neurotransmissor inibitório GABA, promovem o influxo de íons cloreto e a conseqüente hiperpolarização da membrana plasmática da célula neuronal.
- b) Receptores acoplados à Proteína G. Estes receptores constituem a maior família de receptores de superfície celular, sendo agrupados em seis classes distintas. São proteínas integrais multipasso, com sete domínios transmembranares. A ligação do ligante com estes receptores promove uma mudança conformacional no receptor e conseqüente ativação de uma proteína intracelular trimérica, denominada Proteína G. Esta proteína é responsável pela propagação do sinal dentro da célula, que pode ser feito pela ativação de enzimas específicas, tais como a Fosfolipase-C ou a Ciclase de Adenilil, ou pela indução da abertura de canais iônicos na membrana plasmática.
- c) Receptores com Atividade Enzimática. Esta classe de receptores inclui receptores com atividades enzimáticas intrínsecas, ou seja, cuja cadeia polipeptídica do receptor possui um domínio de localização citosólica com atividade enzimática, e receptores com atividade enzimática extrínseca, onde a atividade enzimática encontra-se em uma proteína periférica associada ao receptor pelo lado citosólico da membrana. Os receptores com atividade enzimática intrínseca são divididos em: receptores tirosina-cinase; receptores serina-treonina-cinase; receptores histidina-cinase; receptores tirosina-fosfatase; e receptores guanilil-ciclase. Essa divisão baseia-se na atividade catalítica presente no receptor. Os receptores que apresentam atividade cinase (ou quinase) promovem a fosforilação da proteína alvo (adição de um grupamento fosfato a um resíduo de aminoácido de uma proteína). Os receptores com atividade fosfatase removem um grupamento fosfato da proteína-alvo e os receptores guanilil-ciclase convertem GTP (trifosfato de guanossina) em GTPc (trifosfato cíclico de guanossina). Já os receptores com atividade extrínseca estão associados à enzimas com atividade tirosina-cinase.

:: SAIBA MAIS... ::

A propagação do sinal no interior da célula tem por objetivo final a alteração da atividade de proteínas responsáveis pela resposta ao estímulo externo, ativando-as ou inibindo-as. Na sinalização mediada por receptores com atividade enzimática do tipo cinase ou fosfatase, a alteração conformacional das proteínas finais da cascata de sinalização (proteínas da resposta) ocorre por ação direta das enzimas da via de sinalização (fosforilação ou desfosforilação), levando à modificação do estado fisiológico da célula.

Em alguns casos, entretanto, a ativação de proteínas da cascata de sinalização ou mesmo da proteína envolvida na resposta celular é mediada por moléculas que são geradas pela ativação do receptor pelo estímulo extracelular ou por íons que tem a sua concentração citosólica aumentada em resposta ao estímulo do receptor e das proteínas da cascata de sinalização. Essas moléculas ou íons são denominados segundo mensageiros e incluem: carboidratos (trifosfato de inositol ou IP3), lipídeos (ceramida, eicosanóides, diacilglicerol ou DAG), nucleotídeos cíclicos (monofosfato de adenosina ou AMPc e monofosfato de guanosina ou GPMc) e íons (cálcio). O cálcio se destaca entre os segundo mensageiros, sendo seu papel relevante em diversas atividades celulares, tais como: contração muscular, proliferação celular e fertilização, entre dezenas de outras. O aumento da concentração citosólica do íon cálcio ativa diversas enzimas, diretamente, ou mediante a interação destas enzimas com uma proteína intracelular denominada Calmodulina. A ligação do íon cálcio com a Calmodulina, forma o complexo Ca^{2+} -Calmodulina, que é responsável pela ativação uma série de proteínas com atividade cinase ou fosfatases.

:: FIQUE POR DENTRO!! ::

O bioquímico americano Earl Wilbur Sutherland Jr., ao estudar o mecanismo de ação da adrenalina (epinefrina), foi o primeiro pesquisador a identificar um segundo mensageiro celular, o AMPc. Em 1971, Earl Sutherland Jr. foi contemplado com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pelas suas contribuições para a ciência.

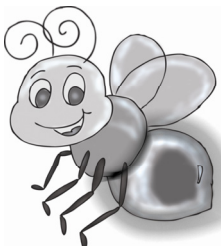
4.2 RECEPTORES INTRACELULARES

Os receptores intracelulares podem estar localizados tanto no citoplasma quanto no nucleoplasma. Estes receptores são ativados pela interação com ligantes de caráter hidrofóbico, entre os quais podemos destacar: o cortisol, o estrogênio, a testosterona, o hormônio tireoidiano, a vitamina D, e o ácido retinóico, entre outros. Os receptores intracelulares são fatores de transcrição, ou seja, são proteínas que controlam a expressão gênica, estando, portanto, obrigatoriamente envolvidos na resposta lenta ao estímulo extracelular.

Os receptores intracelulares possuem quatro domínios funcionais muito importantes: o domínio de ligação ao ligante, o domínio de ligação à proteína inibitória; o domínio de ligação ao DNA; e o domínio de ativação da transcrição. Tais receptores formam heterodímeros com

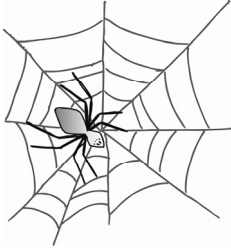
proteínas inibidoras, que impedem a interação do receptor com o DNA ou impedem o deslocamento do receptor, do citosol para o interior do núcleo, e a sua subsequente interação com o DNA. A interação entre o ligante e o receptor ocorre através do domínio de ligação ao ligante, que promove uma mudança conformacional no receptor, liberando a proteína inibidora. Uma vez no núcleo, o receptor passa a interagir diretamente com o DNA através do seu domínio de ligação ao DNA e uma vez ligado ao DNA passa a recrutar diversas proteínas, conhecidas como Fatores Gerais da Transcrição, que serão responsáveis pela expressão do gene alvo. Estas proteínas são recrutadas para o gene alvo pelo domínio de ativação da transcrição. A resposta segue, então, com a síntese do RNAm e a conseqüente tradução deste RNAm no citosol, gerando a proteína responsável pela resposta celular ao estímulo extracelular.

:: FIQUE LIGADO!! ::



Existe uma série de proteínas integrais de membrana, presentes no sistema de endomembranas, que também atuam como receptores. O receptor de IP3 expresso na membrana do retículo endoplasmático, e que é responsável pela mobilização do cálcio reticular e conseqüente elevação dos níveis citosólicos deste íon, é um exemplo destes receptores. O IP3 é gerado em respostas celulares mediadas por receptores de superfície celular que envolvem a ativação da enzima fosfolipase-C. Esta enzima promove a clivagem do fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), gerando dois subprodutos, o DAG e o IP3. O DAG é um lipídeo que permanece na membrana e ativa a enzima PKC (Proteína Cinase-C), enquanto que o IP3 é um carboidrato que se difunde no citosol e se liga m receptores presentes na face citosólica da membrana reticular. Tais receptores são receptores atuam como canais de cálcio e permitem o efluxo do cálcio reticular e conseqüente aumento da concentração deste íon no citosol. Apesar da localização intracelular, tais receptores não são incluídos na categoria de receptores intracelulares, uma vez que somente os receptores que se ligam a ligantes extracelulares são classificados como tal.

:: TA NA WEB!!! ::



Nos endereços abaixo você vai encontrar ótimas animações sobre sinalização celular. Aproveite e exercite um pouco sobre o seu conhecimento sobre a língua inglesa.

Receptores Acoplados à Proteína G:

→http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072507470/student_view0/chapter17/animation__membrane-bound_receptors_that_activate_g_proteins.html

Receptores Acoplados à Proteína G e Canais de Cálcio

→http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072507470/student_view0/chapter17/animation__membrane-bound_receptors__g_proteins__and_ca2__channels.html

O Segundo Mensageiro AMPc

→http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072507470/student_view0/chapter17/animation__second_messenger__camp.html

Receptores Intracelulares e Controle da Expressão Gênica

→http://glencoe.mcgraw-hill.com/sites/9834092339/student_view0/chapter9/how_intracellular_receptors_regulate_gene_transcription.html

Comunicação Hormonal

→http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072507470/student_view0/chapter17/animation__hormonal_communication.html

UNIDADE 8 CICLO CELULAR

1. VISÃO GERAL

Os eventos celulares e bioquímicos responsáveis pela geração de duas células filhas, a partir de uma célula-mãe, são conhecidos como ciclo celular. A divisão celular e a geração de novas células são fundamentais para diversos processos celulares, tais como: o desenvolvimento embrionário; o crescimento do organismo; a regeneração ou a renovação tecidual; a reprodução assexuada, e a formação de gametas.

O ciclo celular da maioria das células eucarióticas passa por uma sequência comum de eventos: crescimento celular; replicação do material genético (DNA); distribuição do material genético para as células filhas (cromossomos); e divisão celular (citocinese). O ciclo celular é dividido em duas fases distintas: intérfase e mitose. Cada uma destas fases apresenta características morfológicas e bioquímicas típicas. Tanto a interfase quanto a mitose são divididas em subfases. A intérfase é dividida em três subfases: G1, S e G2. A mitose é dividida em prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase (figura 8.1). O estado quiescente, no qual uma célula não está em processo de divisão celular, é denominado G0.

A duração do ciclo celular depende, essencialmente, do tipo celular. Células embrionárias possuem um ciclo celular extremamente curto, que em alguns casos pode levar apenas 30 minutos. Por outro lado, uma célula de mamífero em cultura pode levar até 24 horas para completar o ciclo celular. A fase mais demorada do ciclo celular é a fase S (Síntese), onde ocorre a duplicação do material genético. As fases G1 e G2 recebem este nome por representarem um intervalo (em inglês, *gap*) entre a fase S e a fase M (Mitose).

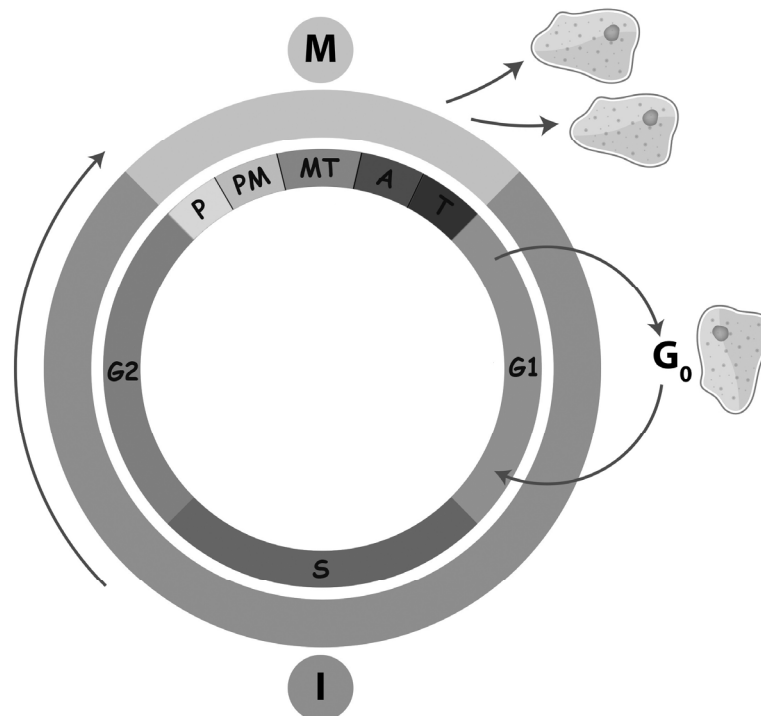


Figura 8.1 – Fases e subfases do ciclo celular. I - Intérfase; M - Mitose; P - Prófase; PM - Pró-metáfase; MT - Metáfase; A - Anáfase; T – Telófase. Modificado de

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cell_Cycle_2.svg

A divisão celular de organismos procariotos segue outro padrão, tendo em vista que tais organismos não possuem um sistema de endomembranas, e, portanto, não apresentam núcleo. Nestes organismos, a divisão celular é conhecida como fissão binária (uma forma de reprodução assexuada), sendo caracterizada pela duplicação do material genético, crescimento celular, e divisão celular.

2. DIVIDIR OU NÃO DIVIDIR? EIS A QUESTÃO!

Em condições fisiológicas, a entrada no ciclo celular depende, fundamentalmente, de sinais extracelulares. Em organismos multicelulares, a divisão celular requer sinais extracelulares que promovam alterações bioquímicas e fisiológicas na célula alvo. Estes sinais, conhecidos como fatores de crescimento, através da sua interação com receptores de superfície celular, disparam uma cascata de sinalização intracelular, que responderá pelas mudanças morfofisiológicas responsáveis pela divisão celular. Entre os mais diversos fatores de crescimento, podemos citar: fator de crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento de fibroblasto (FGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); e fator de crescimento neuronal (NGF), entre outros.

Em organismos unicelulares, além de sinais extracelulares, as condições do meio também são determinantes para a entrada de uma célula no processo de divisão celular, principalmente a disponibilidade de nutrientes, como no caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde até mesmo o tamanho da célula determina a sua entrada no ciclo celular.

Ao receber o sinal extracelular a célula alvo altera o seu perfil de expressão gênica, dando início ao que chamamos de ciclo celular. Os sinais extracelulares, normalmente são responsáveis pela entrada da célula na fase G1 da intérfase, fazendo com que a mesma prossiga para a fase S. O prosseguimento da fase G1 para a fase S requer que uma série de requisitos seja satisfeita, tais como integridade do DNA, tamanho celular e conteúdo protéico, por exemplo. O conjunto destes requisitos é conhecido como ponto de restrição. Assim, o sinal extracelular deve propiciar, à célula alvo, condições necessárias para que a mesma preencha todos os requisitos exigidos no ponto de restrição de G1 para S.

A necessidade de sinais extracelulares não é restrita somente à entrada na fase G1. Oócitos de vertebrados podem permanecer em repouso na fase G2 por longos períodos de tempo, até que a progressão para a fase M seja disparada por estímulos hormonais, como no caso de oócitos humanos.

3. O CONTROLE BIOQUÍMICO: CICLINAS E CINASES DEPENDENTES DE CICLINAS

As mudanças fisiológicas que determinam a entrada na fase G1 dependem da expressão da proteína ciclina D, que é ativada pela cascata de sinalização mediada pelos fatores de crescimento (via de sinalização da proteína ras). As ciclinas são proteínas fundamentais na regulação do ciclo celular das células eucarióticas, tendo sido descritas, pela primeira vez, no ano de 1982 em células embrionárias de ouriços-do-mar. Essa descoberta valeu o Prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia para o pesquisador Tim Hunt, no ano de 1991.

As ciclinas sofrem um ciclo de síntese e degradação durante as diferentes fases do ciclo celular. Assim, temos ciclinas presentes em diferentes fases do ciclo celular. Estas ciclinas são

divididas em duas classes: ciclinas G1/S, que inclui as ciclinas D, A e E; e a ciclina G2/M, que inclui a ciclina B.

As ciclinas formam dímeros funcionais com proteínas cinases específicas, conhecidas como “cinases dependentes de ciclina” (cdks). A formação do dímero ativa as proteínas cdk que passam a adicionar grupamentos fosfato em seus substratos (fosforilação). A adição destes grupamentos, em proteínas-alvo específicas, é responsável pela progressão do ciclo celular, regulando desde a replicação do DNA, na fase S, até a condensação da cromatina, o desarranjo do envelope nuclear e a formação do fuso mitótico na fase M.

Já foram descritas mais de 10 ciclinas diferentes em células animais. A figura 8.2 ilustra a expressão e formação dos dímeros ciclina-cdk nas diferentes fases do ciclo celular de mamíferos.

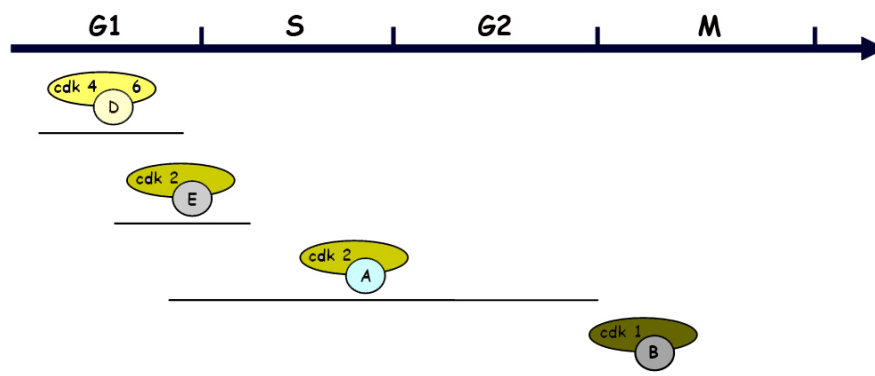


Figura 8.2 – Esquema representando a expressão das ciclinas e a dimerização dos complexos ciclina-Cdk durante as fases do ciclo celular de mamíferos. Em G1, a ciclina D pode se associar tanto com a cdk 4 ou a cdk 6.

4. INTÉRFASE

A intérfase começa com a fase G1, que é caracterizada, morfológicamente, por um crescimento celular. Nesta fase ocorre uma intensa atividade biossintética, com geração de novas organelas e a síntese de proteínas que serão fundamentais para a replicação do DNA que ocorrerá na fase subsequente do ciclo. A progressão para a fase S só ocorre após a verificação da integridade do DNA (primeiro ponto de restrição ou verificação). Esta verificação é de suma importância para o sucesso do ciclo celular, pois a célula filha precisa apresentar as mesmas características genotípicas e fenotípicas da célula mãe, garantindo o exercício de todas as atividades fisiológicas inerentes ao tipo celular original.

Em casos de danos no DNA, proteínas responsáveis pelo sistema de reparo do DNA irão promover a ativação de uma proteína denominada p53. A p53 atua como um fator de transcrição (proteína responsável por induzir a expressão de um determinado gene), levando à expressão da proteína p21. Esta proteína forma um trímero com o complexo ciclina D/cdk 4 ou 6, inibindo a atividade cinase da cdk. Desta forma, o ciclo celular é interrompido até que o dano possa ser reparado. Caso o dano não seja passível de reparo, a proteína p53 irá induzir a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a proteína bax ou NOXA, que serão responsáveis pela indução da morte celular daquela célula.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::

Faça uma pesquisa e descubra a relação entre mutações nas proteínas p53, Rb e ras e o desenvolvimento de tumores humanos!

Após a verificação da integridade do DNA, a célula progride para a fase S, onde o DNA será, finalmente, replicado. Diversas enzimas são importantes nesta etapa, com destaque para a DNA polimerase, enzima responsável pela catálise da polimerização dos dextrorribonucleotídeos em uma fita de DNA. Durante a fase S, a taxa de transcrição e tradução é drasticamente reduzida, mantendo-se apenas a síntese de proteínas (histonas) que serão importantes para a montagem da cromatina a partir do DNA recém sintetizado.

Ao entrar na fase G₂, a célula verifica, através de um sistema enzimático extremamente qualificado, a integridade do DNA recém-sintetizado (segundo ponto de restrição ou verificação). Nesta fase inicia-se a síntese de proteínas que serão fundamentais para a mitose, como as tubulinas, que constituem o microtúbulo, estrutura responsável pela formação do fuso mitótico.

5. MITOSE

Apesar de ser a fase mais curta do ciclo celular, a mitose é um das fases mais fascinantes do processo de divisão celular, tendo em vista as evidentes alterações morfológicas que representam esta fase. As diversas fases da mitose podem ser visualizadas, com o auxílio de corantes, sob microscopia óptica comum. Uma das preparações mais usuais é feita a partir do esmagamento da raiz de *Allium cepa* (cebola) e posterior coloração com azul de metileno. Como vimos anteriormente, a mitose é sub-dividada em diversas fases, que passaremos a estudar agora.

5.1 PRÓFASE

A entrada na mitose é marcada pelo início da condensação da cromatina, dando origem aos cromossomos, e pela duplicação dos centrossomos, que serão responsáveis pela organização do fuso mitótico. Os cromossomos duplicados são unidos por estruturas protéicas (complexo de coesão) em uma região denominada centrômero. As proteínas envolvidas na união das cromátides irmãs (como são chamados os cromossomos após a formação dos pares) são as coesinas. Já a condensação da cromatina é regulada pelas proteínas chamadas condensinas.

É importante ressaltarmos, aqui, que todas as feições morfológicas da mitose dependem diretamente, ou indiretamente, da atividade do complexo ciclina B/cdk1, que também é conhecido como fator promotor da maturação (MPF) por ter sido descoberto na maturação de oócitos de anfíbios durante a meiose.

5.2 PRÓ-METÁFASE

A entrada na pró-metáfase é caracterizada pelo desarranjo do envelope nuclear, fruto da fosforilação das lamínas nucleares pelo complexo ciclina B/cdk1. Assim, o material genético tem acesso ao citoplasma, onde os cromossomos poderão se unir aos polímeros do microtúbulo, em uma região localizada no centrômero e denominada cinetócoro, para dar início à formação do fuso mitótico. Em alguns eucariotos unicelulares, como as leveduras, por exemplo, o envelope nuclear permanece íntegro durante a mitose. Neste caso, os cromossomos migram para os pólos opostos do núcleo, onde se ligam à porção interna do envelope nuclear. Este tipo de mitose é denominado mitose fechada em contraposição à mitose aberta, onde o envelope nuclear é desfeito.

5.3 METÁFASE

A metáfase é marcada pela localização dos centrossomos nos pólos da célula e pelo alinhamento das cromátides irmãs no plano equatorial da mesma. O alinhamento das cromátides na placa metafásica, através do fuso mitótico, garante, ao processo de divisão celular, que o conteúdo genético, duplicado na intérfase, seja distribuído de forma homogênea para ambas as células filhas. O alinhamento das cromátides irmãs no plano equatorial é uma condição essencial para o prosseguimento do ciclo celular. Este requisito é considerado o terceiro ponto de restrição (ou verificação) do ciclo.

5.4 ANÁFASE

Caso as cromátides irmãs estejam devidamente alinhadas no plano equatorial da célula, um complexo protéico, denominado Complexo Promotor da Anáfase, será ativado. Este complexo é responsável pela degradação das coesinas, e conseqüente separação das cromátides irmãs, além de induzir a degradação proteolítica da ciclina B, dando início ao processo de inativação do complexo ciclina B/cdk1.

A separação das cromátides irmãs marca o início da anáfase. Logo em seguida, tem-se início o processo de encurtamento dos microtúbulos ligados aos cinetócoros. Este encurtamento, alvo da instabilidade dos microtúbulos e que parece estar associado à inativação parcial dos complexos ciclina B/cdk1, é responsável pela movimentação dos cromossomos em direção aos pólos da célula, o que é reforçado, ainda mais, pelo movimento dos centrossomos em direção às extremidades celulares por meio dos microtúbulos astrais, que o conectam à membrana plasmática. Assim, no final da anáfase, os cromossomos duplicados na fase S estão dispostos nos pólos opostos da célula. Cada extremidade celular, contém, assim, uma cópia idêntica do material genético da célula mãe.

5.5 TELÓFASE

Podemos conceber a telófase como um processo reverso àquele iniciado na mitose: o envelope nuclear é reorganizado, o fuso mitótico é desfeito e os cromossomos são descondensados. O envelope nuclear é reorganizado a partir da fusão das vesículas originadas do seu desarranjo durante a pró-metáfase. Acredita-se que estas vesículas se liguem aos cromossomos através das lamínas nucleares, dando início a um processo de fusão vesicular que

culmina com a regeneração do envelope nuclear e o confinamento do material genético no interior do núcleo recém formado. A inativação das condensinas promove a descondensação dos cromossomos e o retorno da cromatina como a configuração estrutural do material genético. Por fim, o nucléolo é reorganizado, restabelecendo as feições originais do núcleo interfásico.

A divisão celular termina, no entanto, com a divisão do citoplasma em um processo conhecido como citocinese. A citocinese tem início na anáfase, terminando na telófase. Em células animais, um anel contráctil formado por filamentos de actina e miosina é responsável pela compressão da membrana plasmática de forma a gerar as duas células filhas. Em plantas superiores, a citocinese é resultado da formação de uma nova membrana e parede celular por uma estrutura denominada fragmoplasto, um complexo formado pelo microtúbulo, microfilamentos e elementos do retículo endoplasmático. Inicialmente, vesículas oriundas do complexo golgiense se alinham no meio da célula formando uma estrutura denominada placa celular, que com o auxílio do fragmoplasto se projeta em direção à superfície celular, levando à divisão da célula e à formação das duas células filhas. A figura 8.3 ilustra as fases da mitose.

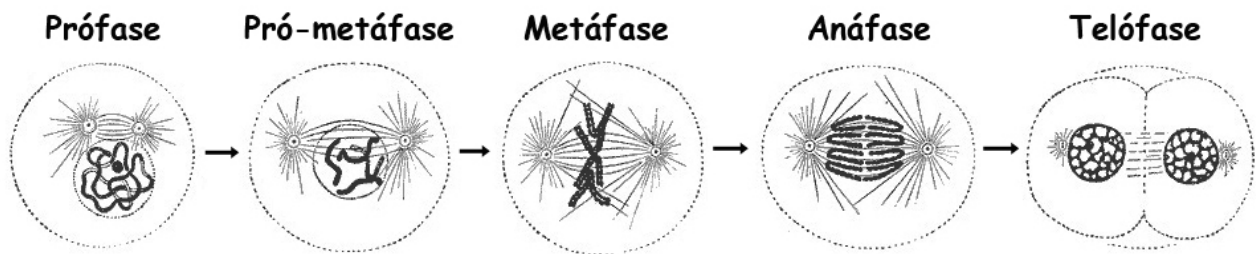


Figura 8.3 – Fases da Mitose. Modificado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitosis>.

:: SAIBA MAIS... ::



Uma das formas mais comuns de anormalidade cromossômica é a aneuploidia, onde o número de cromossomos de um indivíduo não corresponde ao encontrado na sua espécie. Na aneuploidia pode ocorrer tanto uma subtração quanto uma adição no número de cromossomos originais. A aneuploidia é gerada durante o processo de divisão celular meiótica do zigoto, quando as cromátides irmãs não são corretamente segregadas para os polos da célula. Dois motivos principais parecem estar correlacionados com a geração da aneuploidia: a preservação do centrômero no início da anáfase ou ausência de ligação de algum cromossomo ao fuso mitótico. A aneuploidia mais comum em humanos é a trissomia do cromossomo 21, que é encontrada na Síndrome de Down. A aneuploidia também é encontrada em algumas patologias humanas, como em determinados tipos de cânceres, onde os tumores são aneuplóides.

Se você quer conhecer mais sobre a Síndrome de Down visite o endereço <http://www.fsdn.org.br>

6. MEIOSE

A meiose é um tipo especial de divisão celular, essencial para a reprodução sexuada, e que ocorre apenas nas células germinativas. A meiose é responsável pela formação de gametas haplóides, ou seja, com a metade do conteúdo cromossômico das células somáticas. Ao final da

meiose, quatro células filhas haplóides são geradas a partir de uma única célula mãe, em duas divisões celulares seqüenciais (figura 8.4).

A meiose é dividida em duas fases distintas: meiose I e meiose II. A meiose I tem início logo após a duplicação do material genético na fase S da intérfase, e é dividida em quatro fases: prófase I, metáfase I, anáfase I e telófase I. Durante a prófase I, os cromossomos homólogos são pareados, ocorrendo a permuta de material genético (recombinação ou '*crossing-over*') entre estes cromossomos. Essa permuta é responsável pela diversidade genética proporcionada pela reprodução sexuada. Ao fim da meiose I, cada uma das duas células filhas contém um membro de cada par de cromossomos homólogos, consistindo, estes, de duas cromátides irmãs.

A entrada na meiose II ocorre sem que as células geradas pela meiose I entrem na intérfase, ou seja, não ocorre uma nova duplicação do material genético. Ao término da telófase I, as células entram diretamente na prófase II, seguindo então para a metáfase II, anáfase II, e, finalmente, para a telófase II.

Na anáfase II, as cromátides irmãs são segregadas para os pólos da célula. Assim, cada célula deverá conter apenas uma cópia de cada cromossomo homólogo, ou seja, ao término da meiose teremos 4 células haplóides. A exceção fica por conta da formação dos oócitos, durante a oogênese, onde apenas 3 células são geradas. A diploidia é restaurada por ocasião da fertilização e formação de um novo indivíduo.

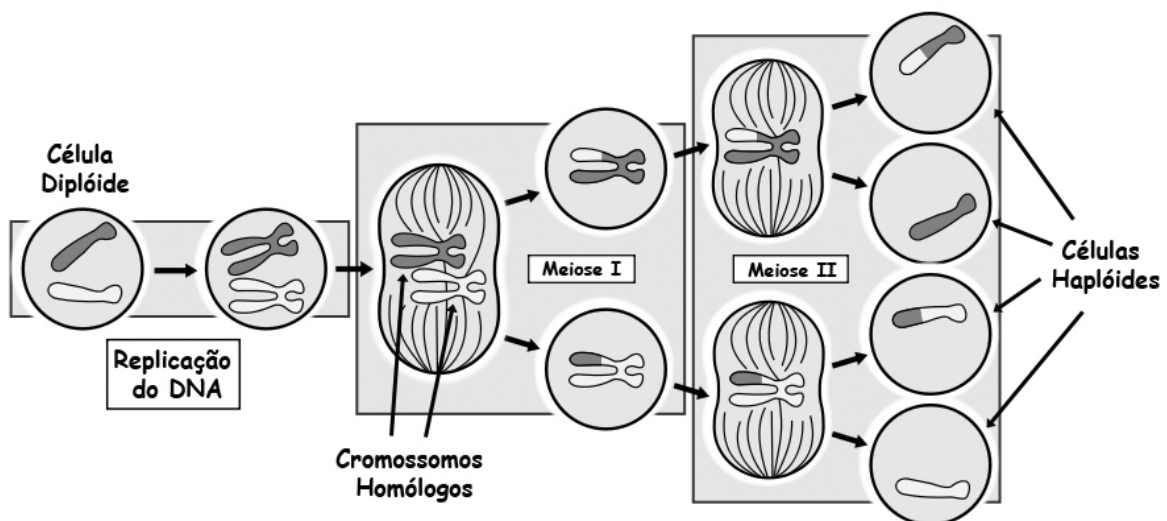
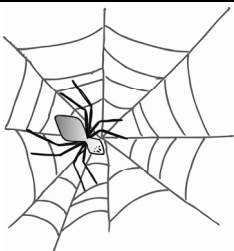


Figura 8.4 – Meiose. Modificado de

http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:MajorEventsInMeiosis_variant_pt.svg

:: TA NA WEB!!! ::



Nos endereços abaixo você irá encontrar uma série de animações sobre o ciclo celular:

→ <http://www.johnkyrk.com/mitosis.pt.html> (em português)

→ http://www.cellsalive.com/cell_cycle.htm

→ <http://nobelprize.org/educational/medicine/2001/>

UNIDADE 9 CITOESQUELETO

1. VISÃO GERAL

O citoesqueleto é um sistema de proteínas filamentosas presente tanto em organismos eucariotos quanto em organismos procariotos. O termo citoesqueleto (originalmente, *cytosquelette*) foi cunhado pelo embriologista e zoologista francês Paul Wintrebert, no ano de 1931, ao acreditar na existência de uma rede intracelular resistente e elástica.

O citoesqueleto é constituído por três sistemas filamentosos: microfilamentos (filamentos de actina), microtúbulos e filamentos intermediários. O citoesqueleto participa de uma série de eventos celulares dinâmicos, tais como: a divisão celular; o transporte intracelular de vesículas; o movimento flagelar ou ciliar; mobilidade celular, e a fagocitose. Sendo importante, ainda, para a determinação do formato celular e por conferir proteção contra estresses mecânicos. Veremos, agora, as principais características estruturais e funcionais de cada tipo de filamento que compõe o citoesqueleto.

2. MICROFILAMENTOS OU FILAMENTOS DE ACTINA

Os filamentos de actina também são conhecidos por microfilamentos por apresentarem o menor diâmetro (entre 6 e 8 nm) entre os componentes do citoesqueleto. Os microfilamentos são formados pela polimerização da proteína globular actina G. A associação dos monômeros de actina G formam dois protofilamentos polarizados dispostos de maneira paralela em uma dupla hélice e unidos por interações laterais não-covalentes (figura 9.1). O filamento formado pela união de dois protofilamentos também é conhecido como actina F. A adição das subunidades monoméricas de actina G ocorre na extremidade mais (+), e a despolimerização, na extremidade menos (-). A polimerização da actina G nos filamentos depende de sua ligação com a molécula de ATP, ao passo que o desligamento das subunidades de actina G depende da hidrólise do ATP, formando ADP e fosfato inorgânico.

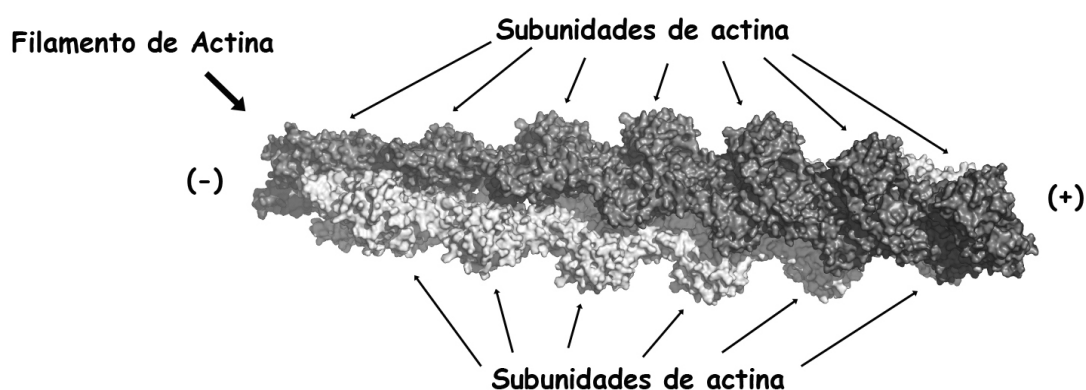


Figura 9.1 – Representação superficial da estrutura atômica de um filamento de actina com 14 subunidades. (+) – extremidade mais; (-) – extremidade menos. Modificado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Actin_filament_atomic_model.png

Os filamentos de actina podem estar associados a diversas proteínas, que promovem, por exemplo, a sua interação com a membrana plasmática, a formação de malhas ou feixes de filamentos, o deslocamento de um filamento sobre outro, ou o aumento ou diminuição da estabilidade do polímero.

Os filamentos de actina são responsáveis pela formação de projeções da membrana plasmática em processos de migração celular e fagocitose, além da estruturação das microvilosidades presentes em células epiteliais. A actina F também importante na determinação do formato celular e no processo de clivagem celular que ocorre durante a citocinese.

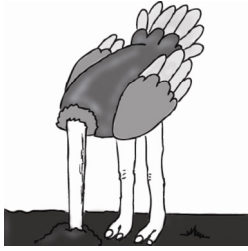
3. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários possuem um diâmetro de cerca de 8 a 10 nm, situando-se entre os filamentos de actina e os microtúbulos. Estes filamentos são importantes na sustentação e estruturação do envelope nuclear, na coesão entre células epiteliais (junções célula-célula) e na resistência mecânica contra estresses físicos. Os filamentos intermediários são formados por uma grande e diversa família de proteínas fibrosas, que são classificadas em 6 tipos diferentes de acordo com as homologias das sequências de DNA e resíduos de aminoácidos (tabela 9.1). Existem pelo menos 65 genes codificantes para proteínas que constituem os filamentos intermediários em humanos. As proteínas que formam os filamentos intermediários não apresentam sítios de ligação a nucleotídeos, como as proteínas relacionadas aos microfilamentos ou aos microtúbulos. A formação do polímero ocorre a partir de uma associação antiparalela retorcida do tipo cabeça-cauda, onde o domínio amino-terminal de uma cadeia polipeptídica encontra-se justaposto ao domínio carboxi-terminal da outra cadeia.

TIPO	Proteínas	Expressão
I	Queratinas ácidas	Células epiteliais
II	Queratinas neutras e básicas	Células epiteliais
III	Vimentina	Fibroblastos e glóbulos brancos
	Desmina	Células musculares
	Periferina	Neurônios periféricos
	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	Células da glia
IV	α -Internexina	Neurônios
	NF-H, NF-L & NF-M	Neurônios
	Nestina	Células-tronco de diversos tecidos (nervoso, muscular, polpa dentária e epitélio olfatório)
	Sincoilina	Neurônios
	Sinemina α & Sinemina β /Desmulina	Células musculares
V	Laminas nucleares	Expressão ubíqua
VI	Filesina	Células fibrosas do cristalino
	Faquinina	Células fibrosas do cristalino

Tabela 9.1: Classificação das proteínas formadoras de filamentos intermediários.

:: FIQUE POR DENTRO!! ::



Você já deve ter ouvido falar em queratina, não? Calma, não perca seus fios de cabelo por causa disto. Vamos saber um pouco mais sobre essa intrigante proteína!

A queratina é uma proteína formadora dos filamentos intermediários nas células epiteliais, podendo ser dividida, quanto à sua característica química, em queratinas ácidas ou queratinas básicas. A interação entre estas duas formas de queratinas produz o heterodímero responsável pela formação do filamento de queratina, que vem a ser um dos filamentos intermediários mais rígidos. Análises recentes do genoma humano revelaram um total de 54 genes funcionais para a queratina, sendo 28 genes correlacionados ao tipo I e 26 genes correlacionados ao tipo II, o que faz desta proteína a mais diversificada entre todas as que compõem os filamentos intermediários.

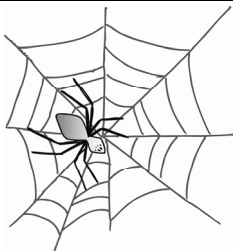
Os queratinócitos da epiderme são as células responsáveis pela síntese da queratina e a conseqüente formação da camada de queratina que protege a pele contra os danos ambientais, tais como: o calor; a perda de água; ou a incidência de radiações ultravioleta. A formação da camada de queratina é denominada queratinização, sendo bastante evidente em répteis, aves e mamíferos, onde, neste último, é encontrada, também, na formação dos pelos e das unhas.

:: ARREGAÇANDO AS MANGAS!! ::



Existem mais de 30 patologias associadas a mutações em genes que codificam para proteínas que constituem os filamentos intermediários. Faça uma pesquisa e descubra quais são as conseqüências do comprometimento funcional destas proteínas.

:: TA NA WEB!!! ::



No endereço abaixo você encontrará ilustrações sobre o modelo organizacional dos filamentos intermediários:

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cooper&part=A1808&rendertype=figure&id=A1813>

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2957&rendertype=figure&id=A2984>

4. MICROTÚBULOS

Os microtúbulos são a terceira classe de proteínas que constituem o citoesqueleto. O diâmetro médio de um filamento de microtúbulo é de aproximadamente 25 nm, sendo o mais espesso de todos os filamentos que compõem o citoesqueleto. Os microtúbulos estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, o

tráfego intracelular de vesículas e organelas, e a formação dos cílios e flagelos das células eucarióticas.

Assim como nos filamentos de actina, o microtúbulo também é formado pela polimerização de proteínas globulares. Estas proteínas, denominadas tubulinas α e β , formam os heterodímero responsáveis pelo alongamento do filamento. Os microtúbulos, da mesma forma que a actina F, também apresentam uma estrutura polarizada, onde a adição das subunidades de tubulina ocorre na extremidade mais (+), e a dissociação destas subunidades, na extremidade menos (-). A adição do heterotrímero ao polímero é mediada pela ligação das subunidades de tubulina com o trifosfato de guanosina (GTP). Após a incorporação do heterotrímero no filamento, o GTP é hidrolisado em difosfato de guanosina (GDP), o que afeta a estabilidade do heterodímero no filamento e permite uma eventual separação do mesmo. Este processo é conhecido como instabilidade dinâmica e é fundamental para todos os processos biológicos regulados pelos microtúbulos.

A nucleação e organização dos microtúbulos ocorrem em regiões especializadas no citoplasma, denominadas centros organizadores dos microtúbulos, e inclui os centrossomos, estrutura supramolecular composta por um par de centríolos e os corpúsculos basais. A proteína responsável pela na nucleação dos microtúbulos, nos centrossomos, é a tubulina γ .

:: SAIBA MAIS... ::



Os microtúbulos são o alvo farmacológico de uma série de fármacos utilizados no tratamento de tumores humanos, entre os quais podemos citar a vimblastina, a vincristina e o taxol. Faça uma pesquisa e descubra as bases moleculares da utilização destes compostos no tratamento do câncer.

5. CITOESQUELETO EM PROCARIOTOS

Os elementos do citoesqueleto presentes nos procariotos são importantes para a divisão celular, e para a determinação do formato e da polaridade celular. Os componentes do citoesqueleto dos organismos procariotos são semelhantes aos encontrados nas células eucarióticas. A proteína FtsZ, por exemplo, é responsável pela formação do anel contráctil durante a divisão celular, de forma semelhante ao anel de actina e miosina presente nas células eucarióticas. Duas outras proteínas, denominadas MreB e crescentina, são responsáveis pelo formato celular não-esferoidal de algumas bactérias. A MreB se assemelham, estruturalmente, à actina, enquanto que a crescentina assemelha-se aos filamentos intermediários, sendo encontrada nas espécies *Caulobacter crescentus* e *Helicobacter pylori*.

5.1 PROTEÍNAS MOTORAS

As proteínas motoras são proteínas associadas aos microtúbulos ou aos filamentos de actina, e que ao interagirem com outras proteínas, organelas ou vesículas, permitem a movimentação estas estruturas pela célula.

A proteína miosina é a proteína motora associada aos filamentos de actina. Inicialmente descrita em células musculares, sabemos, hoje, que a miosina é encontrada nos mais variados

tipos celulares, participando de fenômenos tão diversos como a contração muscular e o transporte vesicular.

Duas proteínas motoras encontram-se associadas aos microtúbulos: a dineína, envolvida no movimento dos cílios e flagelos; e a cinesina, relacionada ao movimento dos cromossomos e de vesículas e organelas. Ambas as proteínas utilizam a hidrólise da molécula de ATP para proporcionarem mobilidade aos componentes celulares. A cinesina se movimenta em direção à extremidade mais (+) (figura 9.2) e a dineína em direção à extremidade menos (-).

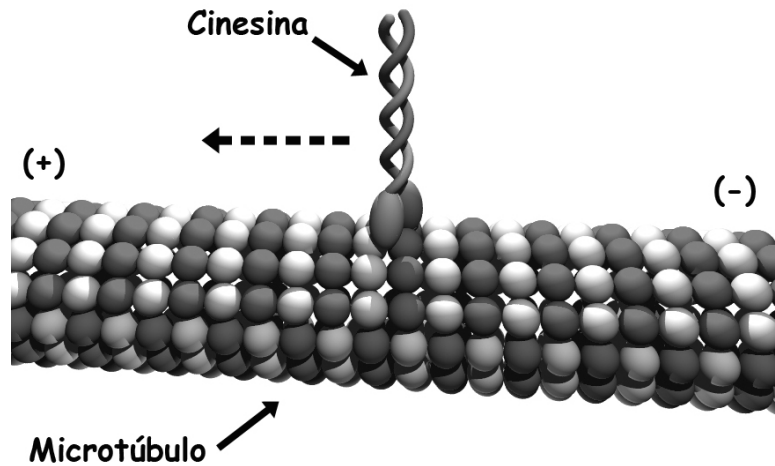


Figura 9.2 – Esquema ilustrativo demonstrando a associação da cinesina com o microtúbulo. Modificado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Kinesin_cartoon.png



Homenagem ao Pólo de Apoio Presencial
de São Bento, Paraíba.