

**Disciplina de BIOQUÍMICA do Curso de MEDICINA da  
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
1º Ano**

**2007/2008**

**SEMINÁRIOS ORIENTADOS**

**APOIO SO10**

**VÍDEO I**

**“Estrutura da célula e isolamento dos organelos celulares”**

- Homogeneização de tecido animal**
- Fraccionamento subcelular**

## ISOLAMENTO DOS ORGANELOS CELULARES

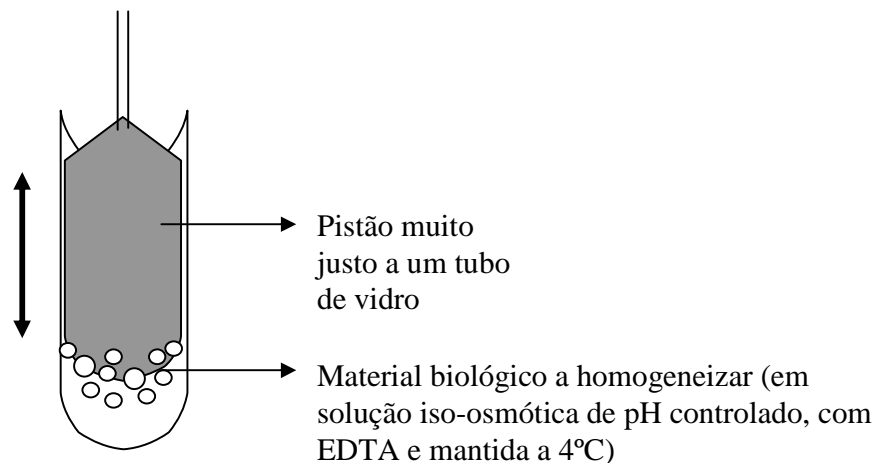
A partir de 1945 foi possível separar e isolar os vários componentes (organitos) da célula: núcleos, mitocôndrias, lisossomas, membranas.

O processo de separação inclui 2 etapas principais:

### 1. Homogeneização de tecidos

Consiste em "esmagar" e romper as membranas plasmáticas das células de modo a que se libertem os seus conteúdos. Para este efeito utilizam-se homogeneizadores. Há vários tipos de homogeneizadores:

- De lâminas ou "Waring blender" – utilizam-se para tecidos duros (ex. músculo, folhas, pele);
- Tipo "Potter-Elvehjem" – o tecido é esmagado ao passar entre o pistão e a parede de um tubo; usa-se para homogeneizar tecidos mais moles (ex. fígado, pâncreas, cérebro);
- Polytron-Ultrassons – produzem sons de frequência muito elevada (não audíveis para o Homem) que causam um efeito desintegrador; usam-se para desintegrar células com parede dura (ex. bactérias, leveduras) e também para organitos celulares (ex. mitocôndrias, retículo).



**Fig. 1-** Representação esquemática de um homogeneizador de êmbolo ou pistão, tipo "Potter—Elvehjem".

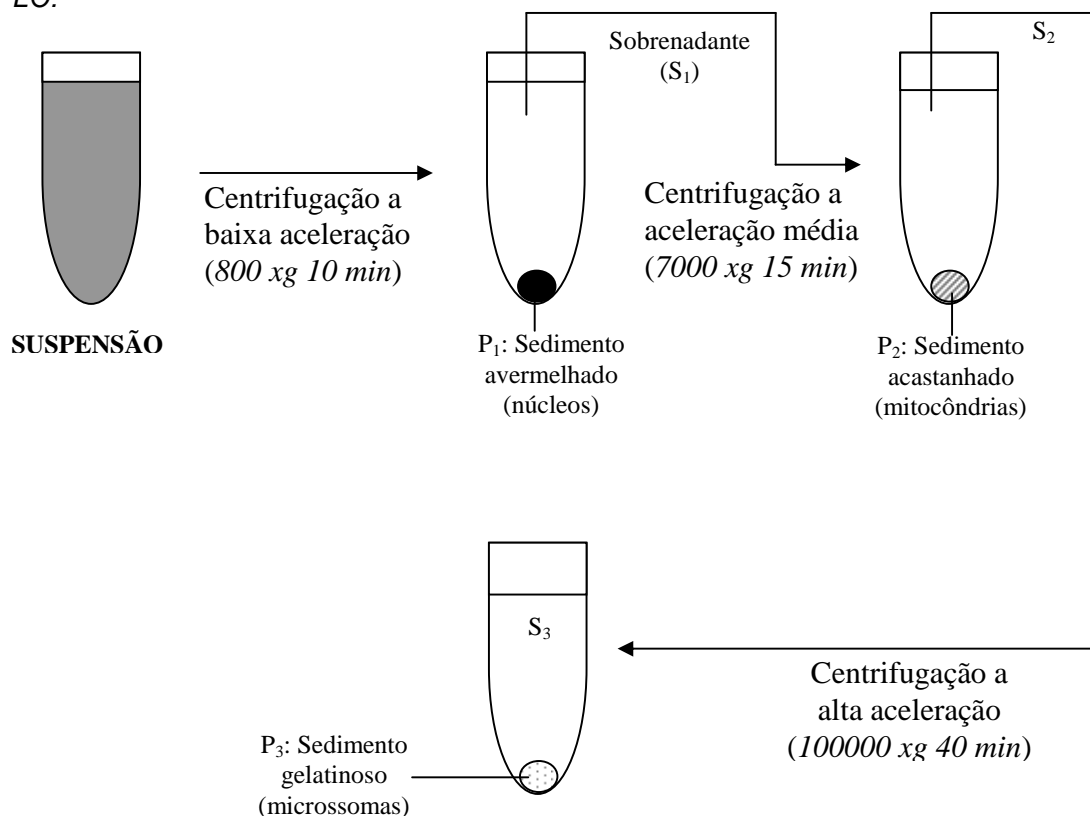
## 2. Fraccionamento celular – Centrifugação

A homogeneização dos tecidos pelos processos indicados produz uma suspensão, que contém, para além de algumas células intactas, os organelos celulares, tais como, núcleos, mitocôndrias, lisossomas, etc.

Estes organelos, fragmentos celulares e partículas intracelulares, possuem tamanhos, formas e composição diferentes. A diferente composição e volume determinam que tenham densidades diferentes.

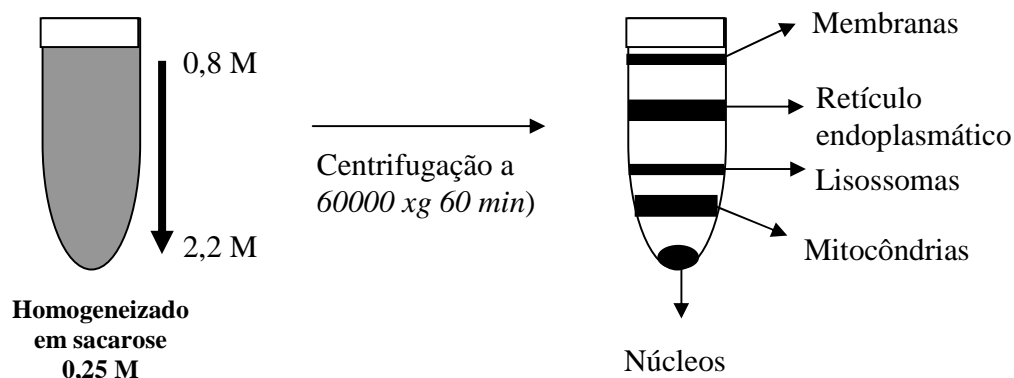
Assim, quando submetemos o homogeneizado à acção de forças centrífugas (acelerações) de intensidade crescente, vamos removendo primeiro os componentes celulares mais densos e, subsequentemente, os menos densos. Esta técnica designa-se por **Centrifugação Diferencial**.

EXEMPLO:



**Fig. 2-** Representação esquemática da técnica de centrifugação diferencial.

Porém, esta técnica não nos permite separar partículas ou organitos cujas densidades sejam semelhantes (exemplo: lisossomas e mitocôndrias, presentes na fracção P<sub>2</sub>). Neste caso usa-se outra técnica de centrifugação a **Centrifugação em Gradiente de Densidade** (contínuo ou descontínuo).



**Fig. 3-** Representação esquemática da técnica de centrifugação em gradiente de densidade.

### 3. Aparelhos - Centrífugas e Rotores

#### • Centrífugas

Tipo de Centrífuga	r.p.m.	Refrigeração	Vácuo	Travão	x g (máx)
De mesa	4-6000 (10000)	-	-	±	4000 a 6000
Preparativas	20000	+	±	+	40000 a 50000
Ultracentrífugas	60000	+	+	+	100000 a 500000

#### • Rotores ou cabeças:

- *Horizontais* – os tubos de centrifugação ficam horizontais apenas em rotação;
- *Angulares* – os tubos de centrifugação mantêm uma posição angular fixa mesmo durante a rotação.

#### 4. Força centrífuga

A força centrífuga a que uma partícula é sujeita é normalmente expressa em **g**.

**g** = Força gravitacional ou aceleração da gravidade que actua na massa de 1 g à distância **r** do eixo de rotação.

De modo a converter **rpm** (nº de rotações/minuto) em **g**, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\boxed{g = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times n^2}$$
, onde

**r** = raio do rotor (cm) e

**n** = velocidade de rotação ou r.p.m.

Uma partícula de uma dada densidade sedimenta num meio de densidade inferior à sua, mas não sedimenta se a densidade do meio em que está suspensa for superior à densidade da partícula, qualquer que seja a força centrífuga aplicada.

Deduz-se da seguinte equação derivada da lei de Stokes:

$$t = 4050 \eta / \pi^2 S^2 r^2 (d_p - d_m) \times \ln (x / x_0)$$

**t** = tempo necessário para uma partícula de densidade **d<sub>p</sub>** sedimentar da posição **x<sub>0</sub>** para a posição **x**, num meio de densidade **d<sub>m</sub>** e viscosidade **η** (em poises), sendo **S** a velocidade de rotação em r.p.m. e **r** o raio de rotação (cm).

## “ESTRUTURA DA CÉLULA E ISOLAMENTO DOS ORGANELOS CELULARES”

A **microscopia electrónica (ME)** permite ver a **estrutura** detalhada da célula, com vários milhões de vezes de aumento, mas não se consegue identificar a organização molecular ou as reacções químicas.

Distingue-se bem o **núcleo** (grande, forma definida), mas não é possível visualizar a dupla hélice de DNA; a **mitocôndria** também se vê muito bem, mas não é possível ver as enzimas que lá se encontram.

Por outro lado, o facto de o tecido ter sido fixado inviabiliza qualquer estudo de actividade ou dinâmica molecular, em particular de cinética enzimática ou de regulação bioquímica. Para levar a cabo estes estudos, recorre-se a técnicas de fraccionamento celular que permitem primeiro separar diferentes compartimentos celulares que podem depois ser individualmente analisados do ponto de vista bioquímico.

### **Fraccionamento subcelular**

Núcleos, mitocôndrias, lisossomas, ribossomas, citoplasma podem ser fraccionados por: **Centrifugação diferencial e Centrifugação em gradiente de densidade.**

Cada organelo é separado dos outros de acordo com o seu tamanho e densidade, sendo sempre necessário aferir a eficiência da separação levada a cabo. Além das estruturas óbvias como núcleos e mitocôndrias, o citoplasma tem outros componentes: lisossomas, peroxissomas, ribossomas e outros organelos pequenos, de difícil identificação. Além disso, existem o retículo endoplasmático (RE), o aparelho de Golgi (fracção microssomal) e a membrana plasmática.

### **FRACCIONAMENTO:**

Começa-se por romper as células, cortando o órgão em pequenos fragmentos, em gelo, de modo a conservar as estruturas. Um dos principais problemas resultantes da homogenização de tecido biológico é o potencial aumento da actividades de hidrolases. Estas encontram-se confinadas nos lisossomas, podem ser activadas por aumento da concentração de cálcio livre e possuem um pH óptimo de actividade normalmente em

regiões acídicas. Assim o meio de homogenização deve ser mantido a 4 °C e deve incluir um tampão e um quelante de cálcio (EDTA ou EGTA) para preservar a actividade enzimática.

Obtenção do fígado de rato, morto por decapitação.

1. O fígado é colocado em tampão isotónico de sacarose 4% contendo EDTA e mantido a 4 °C - mantém a pressão osmótica da mitocôndria e preserva a estrutura da mitocôndria. O tampão também evita grandes diferenças de pH, preservando a actividade enzimática.
2. Homogeneização (rompimento das células); o espaçamento entre o “potter” e o pistão é suficientemente pequeno para romper as células, mas mantém intactas as estruturas subcelulares. Deve ser feito em gelo para impedir o aumento da temperatura resultante do processo de fricção durante a homogenização.
3. Centrifugação em tubos adequados, a 4 °C (permite preservar as estruturas subcelulares e diminuir a actividade das hidrolases).

Os organelos mais densos sedimentam primeiro:

I) Núcleo – sedimento, após centrifugação a 1000 x *g*

II) Mitocôndrias/Lisossomas/Peroxissomas - sedimento acastanhado (presença de citocromos), após centrifugação a 10000 x *g*, é fundamentalmente constituído por mitocôndrias, enquanto no sobrenadante se encontram os organelos menos densos.

A pureza das mitocôndrias pode ser verificada por ME, que, no entanto, não permite aferir a sua integridade **bioquímica**.

Para se avaliar a integridade funcional da mitocôndria, podemos analisar o consumo de oxigénio (O<sub>2</sub>) e determinar a actividade de enzimas características da mitocôndria.

A determinação da actividade da **succinato desidrogenase**, uma enzima mitocondrial, permite avaliar a pureza relativa da fracção mitocondrial obtida por centrifugação diferencial. Esta enzima pode assim ser considerada um marcador enzimático da fracção mitocondrial.

Determinação da % de actividade da succinato desidrogenase em todas as fracções após o processo de centrifugação:

<b>Fracção:</b>	<b>% esperada:</b>	<b>% após o isolamento:</b>
Homogeneizado	100%	100%
Núcleo	0%	45%
Mitocôndria	100%	<b>50%</b>
Outros	0%	5%

Assim, podem também identificar-se os organelos responsáveis pelas diferentes reacções químicas que se processam nas células.

Em resumo, a identificação da fracção mitocondrial pode ser feita por:

**a) CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA** – pode incidir sobre as diferentes biomoléculas:

- Lípidos – ex. a cardiolipina é um fosfolípido característico da mitocôndria;
- Proteínas ou enzimas específicas;
- Ácidos nucleicos – para além do núcleo, o DNA e RNA estão presentes nas mitocôndrias.

**b) CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL** – através da avaliação do consumo de  $O_2$  pela mitocôndria; os substratos da cadeia de fosforilação oxidativa são directamente oxidados na mitocôndria, através das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (CRM), transferindo electrões para o  $O_2$ . Durante esta transferência ocorre a fosforilação do ADP em ATP. Este processo denominado por **fosforilativa oxidação** ocorre exclusivamente nas mitocôndrias, permitindo distinguir a fracção mitocondrial da fracção microssomal.

**c) CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA** – é possível distinguir estruturalmente a fracção mitocondrial da fracção microssomal por observação morfológica recorrendo à microscópica electrónica. A observação microscópica mostra que a grande maioria das partículas na fracção mitocondrial apresenta a estrutura típica das mitocôndrias com uma dupla membrana, apresentando a membrana



mitocondrial interna numerosas cristas correspondentes a invaginações da membrana mitocondrial interna. Morfologicamente a fracção microsomal é maioritariamente constituída por partículas ou vesículas com uma membrana simples, algumas das quais apresentam ribossomas associados à sua superfície, obtidas a partir do RE (retículo endoplasmático).

Depois de purificar uma fracção celular é muitas vezes necessário refinar o seu processamento para obter o enriquecimento de diferentes grupos de moléculas. Por exemplo, se se pretender estudar a composição lipídica de fracções mitocondrial e microsomal, é necessário proceder à extracção de lípidos de ambas as fracções utilizando solventes orgânicos não miscíveis com a água.

Também, se se pretender estudar o DNA, seja da fracção nuclear ou mitocondrial, é necessário proceder a uma extracção (separação) do DNA, normalmente tirando partido da sua precipitação quando exposto a baixas concentrações de solventes orgânicos.