SÉRIE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIOLOGIA CELULAR E TRÁFEGO DE VESÍCULAS Copyright © by Fiocruz, 2014 Todos os direitos desta edição reservados à Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 Proibida a reprodução total ou parcial deste conteúdo

EDITORES Helene Santos Barbosa Milton Ozorio Moraes Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Organizadora Helene Santos Barbosa

Autores

Cynthia Machado Cascabulho Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira Jr José Raimundo Corrêa Patrícia Elaine de Almeida Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Revisores

Andrea Henriques-Pons Erick Vaz Guimarães Lais de Carvalho Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni Luize Gonçalves Lima Marcelo Pelajo Machado Maria de Nazaré Correia Soeiro Patricia Martins Rodrigues e Silva Renato Augusto DaMatta Ricardo de Mattos Santa-Rita Suzana Côrte-Real Faria Tecia Maria Ulisses de Carvalho Thiago Moreno Lopes e Souza Wendell Girard-Dias

Projeto Gráfico, capa e diagramação Simone Oliveira

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT/Fiocruz - RJ

B615	Biologia celular e tráfego de vesículas / Cynthia Machado Cascabulho [et al.] Rio de Janeiro: IOC, 2014.
	108 p. : il (Série em biologia celular e molecular) ISBN: 978-85-99974-09-4
	1. Biologia celular. 2. Tráfego de vesículas. 3. Morfologia. 4. Microscopia óptica. 5. Microscopia eletrônica. I. Cascabulho, Cynthia Machado. II. Título. III. Série.

CDD 571.655

Cynthia M. Cascabulho Francisco O. R. de Oliveira Jr José R. Corrêa Patrícia E. de Almeida Rubem F. S. Menna-Barreto

SÉRIE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BIOLOGIA CELULAR E TRÁFEGO DE VESÍCULAS

1ª edição Rio de Janeiro IOC - Instituto Oswaldo Cruz

Apresentação à coleção

Os cursos de férias no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) surgiram com o objetivo de oferecer aos estudantes de graduação a oportunidade de estudar em uma Instituição de Pesquisa de excelência, abordando em profundidade temas incomuns à grade curricular da universidade. Agregado a este objetivo principal, a formatação desse curso permitiria o trânsito e vivência dos estudantes no ambientes científico dos diferentes laboratórios do IOC. Além disso, a possibilidade de estimular os estudantes de pós-graduação do IOC a desenvolvem atividades didáticas teórico-práticas, preencheria também uma lacuna importante na formação dos mestres e doutores da novssa instituição que não possui cursos de graduação.

A ideia surgiu em 2007, e desde sua primeira edição, os cursos de férias do IOC versam sobre temas relevantes da área de pesquisa em saúde no Brasil. De 2007 a 2012, foram realizadas 11 edições dos Cursos de Férias, nas versões verão e inverno, tendo sido oferecidas as mais variadas disciplinas, corrdenadas por mais de 50 pesquisadores do IOC, envolvendo centenas de mestrandos e doutorandos e mais de 1.000 alunos oriundos de dezenas de universidades de todo o país.

Desde o início, um estímulo adicional aos professores do curso foi o desenvolvimento de material didático original para servir de apoio às aulas teóricas e práticas. O resultado desse esforço coletivo se traduz nesta coleção. Os textos foram desenvolvidos em linguagem simples e objetiva e conteúdo inovador, abordando temas tranversais em biociências. Assim, desenvolvemos fascílulos para a formação de jovens cientistas na vanguarda do conhecimento em áreas que apresentam hibridismo e multidisciplinaridades absolutamente crusciais para o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Estamos convencidos de que este material permitirá aos leitores acesso rápido e fácil a conteúdos não abordados durante a graduação, além de possibilitar a integração de atividades didáticas e o estímulo à redação científica entre pós-graduandos do IOC.

Boa leitura.

Helene S. Barbosa Milton O. Moraes Rubem F. S. Menna-Barreto

Nota da organizadora

As publicações da Série em Biologia Celular e Molecular não obedecem estritamente a ordem das edições dos respectivos cursos, mas retratam o desafio que foi agregar nossos estudantes de mestrado e doutorado na missão de transformar uma ideia em realidade.

A primeira edição do Curso de Férias tinha como missão atrair doze estudantes num balão de ensaio, para a concepção do Curso de Biologia Celular e Tráfego de Vesículas, e não foi tarefa simples. A complexidade da logística que acreditávamos garantiria a qualidade do curso envolvia a definição da escolha do tema até a atuação de cada participante nas aulas. A proposta era contemplar atividades didáticas teóricas e práticas no ambiente dos nossos laboratórios de pesquisa. Não se cogitava oferecer aulas-práticas demonstrativas e sim, validar hipóteses por meio de atividades experimentais. Esse grupo então, motivado e comprometido com a divulgação da ciência que se faz no Instituto Oswaldo Cruz, foi um dos alicerces que transformou nossos cursos atrativos pelo Brasil afora, envolvendo a participação nesses 7 anos de mais de 1400 alunos.

Assim, o curso de Biologia Celular e Tráfego de Vesículas que integrou a primeira versão do Curso de Férias teve duas edições. Estes estudantes, hoje egressos do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, são atualmente pesquisadores nos laboratórios do IOC, professores na Universidade de Brasília e na Federal de Juiz de Fora, ou ainda pós-doutorandos na nossa Instituição. O pioneirismo desse grupo foi, sem dúvida, o motor propulsor para o sucesso desta proposta. Ter estado à frente como coordenadora deste curso, integrado por essa equipe, gerando esta publicação de alta qualidade em conteúdo, técnica e em ilustrações inéditas, abre a oportunidade de dizer "muito obrigada". Obrigada por terem acreditado neste projeto, pela dedicação, capricho e responsabilidade nesta empreitada! Eis aqui o produto final que traduz o compromisso de cada um! Podem se orgulhar!

Helene S. Barbosa

Sumário

1. ESTRUTURAS CELULARES	
1.1. Histórico	9
1.2. Células procariótica e eucariótica	9
1.2.1. Membrana celular	10
1.2.2. Citoplasma	11
1.2.3. Núcleo	12
1.2.4. Retículo endoplasmático	13
1.2.5. Litoesqueleto	15 16
1.2.8. Millocollalia	10 17
1.2.7. Complexo de Golgi	,17 10
1.2.9. Peroxissomos	
1.2.10. Depósitos citoplasmáticos	20
2. ENDOCITOSE	22
2.1. Endocitose em células eucarióticas	23
2.2. Fagocitose	24
2.3. Pinocitose	25
2.3.1. Macropinocitose	26
2.4. A hipótese das "lipids rafts"	27
2.5. Endocitose mediada por cavéola	29
2.6. Endocitose mediada por clatrina	
2.7. Organização dos elementos básicos das vias endocíticas	38
2.8. Formação de vesículas dependente de dinamina	40
2.9. A captação e o processamento de macromoléculas via lisossomos em células de mamíferos	41
3. EXOCITOSE EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	
3.1. Introdução	45
3.2. Interações entre os compartimentos	45
3.3. Quais são os mecanismos moleculares que controlam o transporte de vesículas?	
3.4. O transporte do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi	
3.5. Exocitose: destinos para as vesículas que brotam da face Trans do complexo de Golgi	50
4. MICROSCOPIA DE LUZ	
4.1. Histórico	53
4.2. Microscópio	54
4.3. Ajuste de iluminação segundo Koehler	59

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
7.5.3. Aplicações de anticorpos no estudo de tráfego de vesículas	
7.5.1. Produção de anticorpos policlonais 7.5.2. Produção de anticorpos monoclonais	
7.5. Anticorpos como uma ferramenta na pesquisa científica	
7.4. Estrutura dos anticorpos	
7.3. Localização dos anticorpos	
7.2. Linfócitos B	
7.1. Anticorpos	93
7. ANEXO	
6.6. Aplicações da microscopia eletrônica na biociência e saúde	
6.5.5. Criofratura	89 89
6.5.3. Varredura de alta resolução	88 מח
6.5.2. Microanálise	
6.5.1. Transmissão de alta voltagem	
6.5. Outros tipos de microscopia eletrônica	
6.4.1. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura	
6.4. Microscópio eletrônico de varredura	
6.3.1. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de transmissão	
6.2 Microscónio eletrônico de transmissão	2
6.2 Princínio	וס גא
6.1 Histórico	ðU 21
	00
5.6. Aplicações da citometria de fluxo no estudo do tráfego de vesículas	
5.5. Separação celular por citometria de fluxo: "Cell Sorting"	
5.4. Fluorocromos	
5.3. Lasers e filtros ópticos	, 74
- 5.2. Princípio	
5.1. Histórico	
5. CITOMETRIA DE FLUXO	
4.4.3. Aplicações no estudo do tráfego de vesículas	69
4.4.2. 0 princípio	
4.4. Microscopia contocal de varredura a laser	65 65
4.4.3. A fluorescência	63
4.4.2. O princípio	61
4.4.1 Histórico	61
4.4. Microscopia de fluorescência	61

1. ESTRUTURAS CELULARES

FRANCISCO O. R. DE OLIVEIRA JR

1.1. Histórico

A maioria das células apresenta dimensões muito pequenas, tornando-se impossível a sua observação a olho nu. Assim, o conceito de célula como unidade fundamental dos seres vivos só pode ser estabelecido após a invenção do microscópio. Dessa forma, utilizando-se de um microscópio composto rudimentar, Robert Hooke (1665) analisou cortes finos de cortiça obtidos da casca do sombreiro, e verificou que estes eram constituídos por pequenas cavidades (no latim *cella*) poliédricas, chamando-as pela primeira vez de células. Na verdade, estes compartimentos representavam as paredes das células vegetais mortas.

Em 1838, o botânico alemão Matthias Schleiden descreveu que a célula era a unidade básica de todas as plantas. Um ano mais tarde (1839), o zoólogo alemão Theodor Schwann chegou à mesma conclusão para os animais. Com base nestes conhecimentos elaborou-se a teoria celular proposta por Schleiden e Schwann.

1.2. Células procariótica e eucariótica

As células procarióticas (*pro*, primitivo *e cario*, núcleo) são relativamente simples e se caracterizam por não apresentarem membrana separando o material genético no citoplasma. Além disso, a maioria destas células apresenta uma parede celular externa à membrana plasmática. As células eucarióticas (*eu*, verdadeiro, *e cario*, núcleo) são estruturalmente complexas, ricas em membranas formando compartimentos, designadas como organelas que desempenham funções específicas e que segregam os diversos processos metabólicos e ainda, o núcleo circundado pelo envoltório nuclear, onde está contido todo seu material genético nuclear. Algumas características morfológicas e fisiológicas das principais estruturas encontradas nas células eucarióticas serão apresentadas a seguir:

1.2.1. Membrana celular

Todos os tipos celulares sejam bactérias, fungos, plantas ou animais apresentam uma estrutura laminar organizada, muito delgada que delimita a porção intracelular e o ambiente extracelular. A membrana plasmática ou a membrana das diferentes organelas celulares mede cerca de 7,5 a 10 nm de espessura, sendo a sua organização em bicamada visível somente ao microscópio eletrônico. Todas as membranas apresentam a mesma estrutura básica, constituída por uma bicamada fluída de fosfolipídios (fosfoglicerídeos e esfingolipídios) e colesterol onde estão inseridas moléculas de proteínas (Fig. 1.1). Outro constituinte importante das membranas celulares são os glicolipídios e os mais abundantes são os glicoesfingolipídios funcionando como receptores graças aos hidratos de carbono, com ou sem radicais fosfato, como por exemplo, glicose, manose, fucose e galactose.



Fig. 1.1

10

Dois aspectos da membrana celular. (A) Micrografia eletrônica de transmissão da membrana plasmática de epimastigota de *Trypanosoma cruzi*; (B) Esquema mostrando a organização da membrana celular.

Imagens: (A) Rubem F. S. Menna-Barreto; (B) Francisco O. R. Oliveira Jr.

A membrana apresenta uma propriedade imprescindível para manutenção da viabilidade celular, que é a permeabilidade seletiva, controlando a entrada e saída de substâncias da célula, além de possuir moléculas na sua face externa que possibilitam a interação célula-célula e célula substrato.

1.2.2. Citoplasma

O citoplasma das células eucariotas contém diversas organelas, como por exemplo: mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e peroxissomos (Fig. 1.2), podendo ainda apresentar depósitos de substâncias, como corpúsculos lipídicos e grânulos de glicogênio. Os espaços entre essas estruturas são preenchidos pela matriz citoplasmática ou citosol que contém água, íons diversos, precursores dos ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas. No citosol estão também localizados os elementos do citoesqueleto, responsáveis por várias atividades dinâmicas das células.



Fig. 1.2

Estruturas celulares da célula eucariótica. Complexo de Golgi (G); mitocôndria (M); membrana plasmática (MP); núcleo (N); retículo endoplasmático (RE). Imagem: Helene S. Barbosa

1.2.3. Núcleo

Uma das principais características da célula eucariótica é a existência do núcleo, onde se encontra o genoma da espécie (Fig. 1.3). O material genético nos eucariotos está na forma de cromatina, que é constituída de DNA associado a proteínas histonas e outras proteínas. O envoltório nuclear é composto por duas membranas que delimitam um espaço perinuclear. A membrana interna está associada à lâmina nuclear que é uma rede fibrosa formada por proteínas. A lâmina nuclear, por sua vez, está ligada à cromatina. Este conjunto dá suporte estrutural no momento da reestruturação do núcleo, ao término da divisão celular, estabelecendo a ligação entre a cromatina e o envoltório. A membrana nuclear externa circunda a membrana interna e é contígua à membrana do retículo endoplasmático (RE) que apresenta ribossomos aderidos envolvidos na síntese protéica. O espaço inter-membranar, formado pela membrana externa e interna do envoltório nuclear, é contínuo ao RE. Assim como a membrana do RE, o envoltório nuclear também apresenta ribossomos aderidos na face externa.

O envoltório nuclear, diferente das demais membranas celulares, apresenta poros. Estes são grandes complexos de proteínas (nucleoporinas) que atravessam as membranas nucleares, externa e interna, permitindo o trânsito seletivo de moléculas hidrossolúveis entre o núcleo e o citoplasma.

No interior do núcleo são observadas estruturas esféricas filamentosas, denominadas de nucléolos. Os nucléolos são estruturas densas compostas principalmente de proteínas e RNA ribossômico (rRNA). Além disso, esta região associa-se a porções do DNA nuclear, responsáveis pela codificação do rRNA. Neles são encontrados, além das proteínas e rRNA que vão compor os ribossomos, proteínas e RNAs que participam da transcrição e das modificações póstranscricionais dos rRNAs.

A cromatina e o nucléolo se encontram mergulhados em uma solução aquosa contendo proteínas, RNAs, nucleosídeos, nucleotídeos e íons denominada nucleoplasma.

Outra estrutura observada no interior do núcleo é a matriz nuclear. Esta consiste de uma estrutura protéica fibrogranular, que alicerça o núcleo. Ela se associa ao DNA durante os processos de duplicação e regula a transcrição nos eucariotos, juntamente com as histonas. O núcleo pode ser visualizado por microscopia eletrônica de transmissão, por microscopia de campo claro, com a utilização, por exemplo, do corante Giemsa e por microscopia de fluorescência, empregando o corante fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol).



Fig. 1.3Ultraestrutura do núcleo. Em detalhe o poro nuclear (cabeça de seta).Imagem: Helene S. Barbosa

1.2.4. Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é formado por um sistema de membranas interconectadas na forma de tubos ou cisternas que delimitam uma cavidade interna única denominada de luz do retículo endoplasmático. O RE se estende a partir do envoltório nuclear e percorre uma grande área do citoplasma e é formado por duas regiões distintas interligadas constituindo o RE rugoso e liso que apresenta características morfológicas e funcionais diferentes. A transição entre essas regiões é gradual, partindo do retículo rugoso em direção ao liso, com diminuição do tamanho das cisternas e a redução progressiva do número de ribossomos aderidos, até sua ausência completa se constituindo então, no RE liso.

O RE rugoso ou granular apresenta ribossomos aderidos a sua membrana (Fig. 1.4) e tem um importante papel na síntese e exportação de proteínas. Logo, assim que começam a serem sintetizadas no citoplasma, as proteínas são importadas para o RE. Essa classe de proteínas apresenta uma determinada sequência de aminoácidos (sequência sinalizadora) e se liga a uma partícula de reconhecimento de sinal presente em sua membrana. Estas podem ser proteínas residentes do RE ou ainda serem destinadas à membrana plasmática ou à membrana de outras organelas. Além disso, podem ser proteínas hidrosolúveis, as quais serão destinadas ao lúmen de alguma organela ou secretadas no meio extracelular. Sendo assim, todas as proteínas transmembranares são sintetizadas no RE rugoso.

O RE liso é caracterizado pela ausência da ligação com ribossomos aderidos à sua membrana e formado geralmente por vesículas globulares ou estruturas predominantemente tubulares. Ele é responsável pela síntese integral da maioria dos lipídios que compõem as membranas celulares, incluindo fosfolipídios e o colesterol. No entanto, alguns lipídios (esfingomielina e os glicolipídios) são produzidos inicialmente no RE liso e finalizados pelo complexo de Golgi, onde ocorre a glicosilação. Outra função importante do RE liso é a desintoxicação, que é a conversão de substâncias tóxicas como conservantes, corantes alimentares e medicamentos em substâncias de fácil excreção. O RE liso atua como um reservatório de cálcio. Em células musculares recebe o nome de retículo sarcoplasmático, armazenando cálcio em seu lúmen, regulando a concentração deste íon no citoplasma. Ao receber um estímulo, o cálcio é liberado promovendo desta forma a contração muscular.

O RE pode ser observado por microscopia eletrônica de transmissão ou por microscopia de fluorescência quando é empregado um marcador fluorescente específico, como por exemplo, o ER-Tracker.



Fig. 1.4

14

Micrografia eletrônica de transmissão do retículo endoplasmático rugoso (setas) de tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Detalhe de ribossomos aderidos à membrana (cabeça de seta).

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

1.2.5. Citoesqueleto

Células eucarióticas podem apresentar diferentes formas e realizar movimentos coordenados e direcionados. Para exercer esta função, são estruturadas internamente por uma complexa rede de filamentos de proteínas que se estende por todo citoplasma chamada citoesqueleto (Fig. 1.5). O citoesqueleto é constituído por três principais tipos de filamentos:

Filamentos de actina ou microfilamentos (5 nm de diâmetro) – Formados pela actina, uma proteína globular, que por ser codificada por diferentes genes apresentam 3 isoformas: actinas α , $\beta \in \gamma$. Os monômeros de actina são assimétricos e se associam de maneira regular, orientando-se no mesmo sentido, dando origem a um filamento helicoidal denominado actina filamentosa. Filamentos de actina encontram-se organizados em fibras paralelas à porção basal da membrana plasmática, mantendo a célula ancorada ao substrato. Microfilamentos de actina, associados às junções aderentes, têm um papel importante na manutenção da integridade e organização do epitélio. Um dos métodos para visualização dos filamentos de actina é a marcação com faloidina conjugada a um fluorocromo para análise por microscopia de fluorescência.

Filamentos intermediários (10 nm de diâmetro) – São assim denominados por apresentarem um diâmetro intermediário entre filamentos de actina e microtúbulos. Eles compõem um sistema de estruturas filamentosas, extremamente insolúveis, de composição protéica, formando uma rede estrutural que conecta as membranas celulares, organelas citoplasmáticas e o núcleo. Os filamentos intermediários podem ser formados por diversas proteínas fibrosas como: queratina, desmina, vimentina, lamina, dentre outras. Estes podem ser detectados pela marcação com anticorpos contra a proteína que os constitui e quando conjugados a um fluorocromo, podem ser visualizados por microscopia de fluorescência.

Microtúbulos (25 nm de diâmetro) – São estruturas cilíndricas que se estendem por todo o citoplasma. Eles são formados por heterodímeros de β -tubulina e α -tubulina que vão se associando uns aos outros, o que lhes confere a estrutura cilíndrica. Os microtúbulos participam da manutenção da morfologia e do processo de divisão celular. Além disso, eles desempenham um importante papel no transporte de vesículas intracelulares por meio de proteínas motoras, tais como cinesinas e dineínas. Os microtúbulos podem ser detectados pela marcação com anticorpos anti-tubulina conjugados a um fluorocromo e observados por microscopia de fluorescência.



Fig. 1.5

Micrografias de fluorescência dos filamentos do citoesqueleto. (A) Filamentos de actina de células musculares cardíacas marcadas com Faloidina-FITC (verde); (B) Filamentos intermediários de células musculares esqueléticas marcadas com anti-desmina–FITC (verde) e marcação do núcleo com DAPI (azul); (C) Microtúbulos de células musculares cardíacas marcadas com anti β-tubulina-FITC (verde).
Imagens: (A, C) Mirian C. S. Pereira; (B) Helene S. Barbosa e Alessandra F. Gomes

1.2.6. Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas que apresentam uma grande diversidade de tamanhos e formas, podendo ser: esféricas, ovóides ou filamentosas. Esta organela apresenta duas membranas estruturalmente e funcionalmente distintas, as quais segregam dois espaços: o intermembranar delimitado pelas membranas interna e externa e a matriz mitocondrial delimitado apenas pela membrana interna (Fig. 1.6). A membrana externa é composta de proteínas e fosfolipídios apresentando uma pequena quantidade de outros lipídios, rica em colesterol. Esta apresenta uma permeabilidade alta, que é conferida pela presença de proteínas transportadoras na membrana, as porinas. A membrana interna diferentemente da externa não apresenta colesterol e é rica em cardiolipina (fosfolipídio com quatro ácidos graxos), o que contribui para torná-la impermeável aos íons. No entanto, ela apresenta uma variedade de proteínas transportadoras que a torna seletivamente permeável a pequenas moléculas. A membrana mitocondrial interna apresenta uma série de invaginações gerando as cristas mitocondriais, o que aumenta muito a sua área de superfície. Nesta membrana estão presentes os componentes da cadeia respiratória responsáveis pela síntese de ATP.

A matriz mitocondrial é constituída por substância finamente granulosa, apresentando uma mistura de centenas de enzimas que irão participar de diversos processos, como por exemplo, a oxidação do piruvato e dos ácidos graxos. Essa matriz apresenta uma molécula de DNA circular, sendo esta semelhante àquelas encontradas nas bactérias. Ainda, a mitocôndria possui o mecanismo necessário para replicação, transcrição do DNA e tradução de proteínas, sendo uma pequena quantidade de proteínas codificada pelo DNA mitocondrial. Dessa forma, essas evidências corroboram a teoria endossimbiótica.

A mitocôndria é considerada a usina da célula, pois é capaz de processar oxigênio e glicose e os converter em energia na forma de ATP, através do Ciclo de Krebs e da cadeia respiratória.

As mitocôndrias podem ser visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão ou por microscopia de florescência utilizando-se marcadores fluorescentes específicos, como MitoTracker e Rodamina 123.



Fig. 1.6Micrografia eletrônica de transmissão de uma mitocôndria em corte longitudinal.Imagem: José R. Corrêa

1.2.7. Complexo de Golgi

O complexo ou aparato de Golgi é formado por um conjunto de vesículas e sáculos achatados empilhados e organizados (cerca de 4 a 8 cisternas podendo variar de célula para célula), chamados de cisternas (Fig. 1.7). As cisternas não apresentam comunicação entre si. A pilha de sacos frequentemente se apresenta curva. As cisternas são divididas em três regiões diferentes: cisternas *Cis*, cisternas Trans e cisternas medianas. As cisternas *Cis* são as mais próximas ao retículo endoplasmático e possuem forma convexa, enquanto as cisternas *Trans* são as mais próximas ao sítio de secreção e possuem forma côncava. As cisternas medianas se encontram na região central, entre as cisternas *Cis* e *Trans*. Além disso, compartimentos formados por estruturas membranosas interconectadas, as *redes Golgi Cis* e a *Golgi Trans*, são localizados antes da *cisterna Cis* e posterior a *cisterna Trans*, respectivamente. Uma série de vesículas esféricas transfere material do RE para o Golgi e estão envolvidas com o transporte entre as cisternas do Golgi ou do Golgi para outras organelas.

O complexo de Golgi é responsável por realizar uma série de modificações póstraducionais como glicosilação, fosforilação ou sulfatação de proteínas e lipídios. As modificações realizadas nas proteínas são imprescindíveis para que estas assumam sua conformação estrutural e funcional. Como já foi mencionado anteriormente, o complexo de Golgi participa também do metabolismo de lipídios, como esfingomielina e glicolipídios, além de estar diretamente envolvido no tráfego de proteínas, polissacarídeos e lipídios. Estas macromoléculas são empacotadas em diferentes vesículas de transporte originadas da rede *Trans* do Golgi que poderão seguir diferentes caminhos por meio da via secretora. Se estas não apresentarem nenhuma sinalização, elas serão enviadas para a membrana plasmática ou para a superfície celular em uma via não seletiva, a via de fluxo contínuo. Para seguirem um caminho diferente do fluxo contínuo estas macromoléculas deverão ser marcadas e assim serão endereçadas para seu destino específico.



Fig. 1.7

18

Micrografia eletrônica de transmissão do complexo de Golgi. (A) Trypanosoma cruzi; (B) Leishmania lainsoni.

Imagens: (A) Helene S. Barbosa; (B) José R. Corrêa

1.2.8. Lisossomo

Os lisossomos são formados no Complexo de Golgi e são estruturas, geralmente esféricas, delimitados por membranas, apresentando uma grande variação no seu tamanho. Em seu interior se encontram enzimas hidrolíticas (nucleases, proteases, glicosidases, lipases, fosfolipases e sulfatases), as quais são capazes de digerir uma diversidade de substratos. Em pH neutro (pH do citoplasma) as enzimas lisossômicas não apresentam atividade, sendo esta uma característica importante. Se um lisossomo se rompe acidentalmente no citoplasma, estas enzimas não terão atividade evitando assim, a destruição da célula. Para que estas enzimas tenham atividade, o pH do lisossomo deve ser ácido, em torno de 5. Esta acidificação é conferida por bombas de próton (H*) presentes na membrana do lisossomo, as quais promovem o influxo de H⁺, gerando e mantendo o seu pH ácido. A principal função do lisossomo é a digestão intracelular permitindo assim que a célula seja capaz de degradar estruturas e/ ou partículas provenientes da endocitose, tais como: macromoléculas ou células. Além disso, através de um processo denominado autofagia, os lisossomos permitem que a célula elimine organelas ou partes danificadas.

Esta estrutura pode ser observada utilizando-se o marcador fluorescente *Lysotracker* que é visualizado por microscopia de fluorescência.

1.2.9. Peroxissomos

Peroxissomos são organelas presentes em todas as células eucarióticas. Estes são geralmente esféricos medindo cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, delimitados por uma única membrana, não apresentando DNA ou ribossomo. Por não possuir genoma todas as suas proteínas são importadas do citoplasma. Estas organelas apresentam em seu interior uma alta concentração de enzimas oxidativas, as quais em algumas células formam um núcleo cristalino, podendo ser observadas por microscopia eletrônica devido a sua alta densidade eletrônica. Os peroxissomos se caracterizam por apresentar dois tipos de enzimas: as oxidases, que catalisam a oxidação de substratos a partir do oxigênio molecular, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e as catalases que decompõem este peróxido formando água e também catalisam a peroxidação de substratos hidrogenados. Apesar de possuírem sempre oxidases e catalases, estes podem apresentar diferentes conjuntos de enzimas. Como função, os peroxissomos realizam a β-oxidação de ácidos graxos, gerando acetil CoA. Esta molécula pode por sua vez, ser transferida para a mitocôndria onde vai participar do ciclo de Krebs ou ainda permitir a síntese de glicídios, a partir de lipídios. Nas células vegetais, os peroxissomos participam da oxidação do glicolato durante a fotorespiração.

1.2.10. Depósitos citoplasmáticos

São acúmulos de diversas substâncias no citoplasma, variável de acordo com o tipo celular e a sua função. Dentre os mais comuns, estão os depósitos de glicogênio, formando grânulos que podem ser encontrados separados ou agrupados (Fig. 1.8). O glicogênio estocado é um depósito de energia acessível à célula. Muitas células apresentam gotículas de lipídios que variam em seu tamanho e em sua constituição química (Fig. 1.9). Também são observados depósitos de pigmentos como a melanina e a lipofuscina, que são em parte responsáveis pela cor dos seres vivos. Estes estão envolvidos na proteção contra a radiação ultravioleta e nos processos de mimetismo.



Fig 1.8

20

Micrografia eletrônica de transmissão da célula muscular apresentando grânulos de glicogênio (setas).

Imagem: Helene S. Barbosa



lmagem: Kelly G. Magalhães

2. ENDOCITOSE

JOSÉ R. CORRÊA

2.1. Endocitose em células eucarióticas

Células eucarióticas possuem um extenso sistema de membranas que compartimentaliza vias bioquímicas e processos biossintéticos. As condições impostas durante a seleção natural às células levaram a um incremento da complexidade e especialização subcelular, resultando em sistemas de comunicação do citoplasma com o meio extracelular e no tráfego de vesículas entre os diversos compartimentos celulares. Os eventos de captação de macromoléculas através de um variado conjunto de mecanismos desempenham um papel chave na manutenção das células. Moléculas essenciais como íons, açúcares e aminoácidos atravessam a membrana plasmática por meio de canais ou bombas constituídos por proteínas integrais de membrana. No entanto, determinadas macromoléculas devem ser interiorizadas pelas células, por meio de receptores específicos, presentes na membrana plasmática, da qual vesículas são geradas e projetadas para o citoplasma, em um processo que é conhecido como endocitose.

Endocitose é um dos fenômenos mais ancestrais na fisiologia celular, podendo ser classificada em duas grandes categorias: fagocitose e pinocitose. A fagocitose é um evento realizado por células especializadas de organismos multicelulares, e que depende da projeção da membrana plasmática para englobamento de material externo, incluindo restos celulares, microorganismos ou materiais diversos capazes de desencadear esta via. Já a pinocitose por sua vez, reúne os eventos ligados à captação de moléculas solúveis. A depender do tipo celular e/ou do material a ser interiorizado bem como, dos receptores específicos requeridos, muitos modelos morfológicos e funcionais diferentes de endocitose já foram descritos.

Da mesma forma, diferentes mecanismos básicos foram propostos para a pinocitose: macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por cavéola e endocitose independente de clatrina e cavéola (Fig. 2.1).



Representação esquemática dos mecanismos endocíticos iniciais de captação de macromoléculas observados na maioria das células eucarióticas. VI: vesículas formadas de forma independente de clatrina, caveolina e dinamina; EP: endossoma inicial rico em proteínas ancoradas à membrana via GPI.

Imagem: José R. Corrêa

2.2. Fagocitose

24

A fagocitose em células de mamíferos é um evento associado primariamente às células especializadas, denominadas fagócitos profissionais, como macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, podendo ocorrer em menor frequência em células não fagocíticas profissionais, incluindo células epiteliais, perivasculares, dentre outras. A fagocitose é capaz de remover grandes patógenos, como bactérias e leveduras ou alternativamente, corpos apoptóticos e/ou debris celulares decorrentes de morte celular por necrose ou ainda, na remoção de lipídio de artérias. Estes eventos são altamente regulados e envolvem receptores de membrana específicos, além de serem dependentes de cascatas de sinalização mediadas por diversos tipos de proteínas. Em células fagocíticas profissionais, a captura de patógenos pode ser guiada pela associação de diversos sistemas de reconhecimento celular, incluindo anticorpos e unidades do sistema do complemento que se associam à superfície do patógeno, seguida pelo reconhecimento dessas moléculas por receptores presentes na superfície da célula hospedeira. Esta série de eventos resultará na projeção da membrana da célula hospedeira por uma via dependente de actina que culminará com o englobamento do patógeno (Fig. 2.2).



Fig. 2.2 (A-C) Exibe três momentos distintos: um momento inicial, um intermediário e um final da fagocitose de uma partícula *in vitro* por macrófago. Imagem: José R. Corrêa

2.3. Pinocitose

O termo pinocitose agrega os mecanismos celulares de captação de moléculas via invaginação da membrana plasmática. A interiorização de moléculas ocorre por empacotamento em vesículas que brotam da membrana plasmática, com transporte deste conteúdo para compartimentos endossomais específicos. A natureza da molécula-carga, o envolvimento ou não de receptores específicos e o tipo de receptor determinam a via pinocítica utilizada.

Dentre as alternativas de incorporação de macromoléculas, o tráfego mediado por receptores é o fenômeno que proporciona maior eficiência na aquisição destas moléculas. Está normalmente associado à captação de nutrientes essenciais e é conservado nos mais divergentes organismos eucarióticos. A endocitose mediada por receptor tem início a partir de uma extensa associação de moléculas. Esta modalidade de captação requer especificidade de interação, envolvendo primeiramente o reconhecimento e a interação entre estruturas específicas das moléculas carga e das moléculas receptoras (que se encontram na superfície da membrana plasmática do fagócito). Estas moléculas

receptoras possuem a propriedade de identificar uma porção definida na arquitetura da molécula sinal (carga) e se ligar a esta estrutura. Em seguida, no sítio da membrana plasmática onde ocorrem estas interações, se iniciam os processos de invaginação da membrana plasmática, com consequente formação de uma vesícula endocítica, que conterá em seu interior as moléculas carga.

2.3.1. Macropinocitose

Esta modalidade de captação de macromoléculas foi descrita morfologicamente pela primeira vez por Warren Lewis (1931), sendo caracterizada pela protrusão da membrana plasmática. É observada em muitos tipos celulares, quando estes estão sob estímulo de fatores de crescimento, tais como fator-1 estimulante de colônias de macrófagos (CSF-1), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas. A macropinocitose também pode ser estimulada pelos fatores promotores de tumor, como por exemplo, o acetato meristato de forbol. Diferente da fagocitose estas protrusões não se associam a nenhum tipo de ligante. A extremidade deste prolongamento da membrana plasmática simplesmente colapsa e se funde novamente na superfície da membrana gerando uma grande vesícula denominada macropinossoma. Esta vesícula conterá um grande volume de moléculas oriundas do meio extracelular (Fig. 2.1). Macropinossomas são estruturas dinâmicas, havendo correlata reciclagem de membranas e seus componentes a partir de organelas internas da célula, na mesma escala de tempo do evento de interiorização. Não há evidências diretas de que a composição dos macropinossomas seja diferente daquela da membrana onde as protrusões são formadas, mas as protrusões propriamente ditas podem apresentar composição diferente em relação à membrana plasmática total. Específicos fosfolipídios e marcadores de "lipid raft" (microdomínios lipídicos detergente insolúveis) foram identificados enriquecendo regiões da membrana relacionadas às protrusões observadas na macropinocitose.

Pouco se conhece a respeito do que gera e controla os processos de fusão de membrana neste evento. Em células dendríticas ocorrem longos eventos de macropinocitose, após a ativação destas células, mediada pela apresentação de antígenos. Desta forma, a célula é capaz de internalizar grande quantidade de material extracelular contribuindo para sua atividade imunológica. Embora ocorra interiorização de grandes volumes de material extracelular, não há seletividade do material endocitado e qualquer molécula que se encontre nas imediações do prolongamento da membrana, no momento de sua fusão com a superfície da célula, será interiorizada.

Macropinossomas são formados por extensa porção da membrana plasmática, sob o efeito secundário de uma intensa atividade de citoesqueleto em associação com a membrana, para a formação das protrusões e posterior fusão de suas extremidades.

2.4. A hipótese das "lipids rafts"

Um aspecto novo da estrutura da membrana celular foi apresentado na década de 80 com base no agrupamento e organização dinâmica de seus elementos lipídicos, incluindo uma fase ordenada rica em colesterol (microdomínios resistentes a detergente) e uma fase desordenada majoritariamente constituída de glicerofosfolipídios. Microdomínios de composição similar também foram identificados no complexo de Golgi.

O termo "lipids rafts" foi definido operacionalmente por processos usados para o isolamento de populações de membranas celulares. Desta forma, "lipids rafts" conhecidas também como jangadas lipídicas são coleções de membranas caracterizadas pela insolubilidade a detergentes não iônicos a 4°C, com uma especial composição de lipídios rica em colesterol, esfingomielina e glicolipídios, semelhante ao gangliosídeo GM1. Agregados de colesterol formam estruturas menos fluídas que flutuariam e se deslocariam pela bicamada lipídica mais fluída, composta majoritariamente por fosfolipídios (Fig. 2.3). Estas estruturas atuam ainda como plataformas de ligação a proteínas específicas e estariam associadas também à transdução de sinais mediada pela sua interiorização.



Desenho esquemático da plataforma de lipídio na membrana plasmática. As diferentes classes de lipídios estão representadas.

Imagem: José R. Corrêa

Contrário a indubitável utilidade teórica das "lipids rafts" para muitos processos biológicos, a hipótese básica da existência de uma plataforma estável de lipídio nas membranas biológicas, inicialmente foi tema de intenso debate. Embora a membrana plasmática seja uma estrutura complexa, sua constituição básica consiste de uma simples bicamada de fosfolipídios hidratados. Neste contexto, a mobilidade lateral das moléculas de lipídio na membrana está condicionada a dois fatores principais: temperatura e níveis de colesterol.

Um dos requerimentos cruciais da hipótese das "lipids rafts" é que estes domínios sejam capazes de segregar proteínas lateralmente. Proteínas ancoradas à membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI), fornecem clara evidência desta segregação, embora possa não ser total. Proteínas com domínios transmembrana também podem ser encontradas segregadas e concentradas em "lipids rafts", através de suas porções específicas de ligação a lipídios, localizadas no núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica. Esta localização pode inclusive favorecer interações laterais com outros domínios protéicos encontrados na mesma região de membrana.

Sugere-se ainda, que "lipids rafts" possam ser formadas em torno de uma âncora de lipídio que serviria de estrutura alvo, permitindo a associação de proteínas que apresentam sítios de interação específicos com as classes de lipídios que são abundantes nas "lipids rafts".

Levando-se em consideração as hipóteses apresentadas para explicar as "lipids rafts", há consenso de que apenas proteínas específicas, que contenham regiões com afinidade para esta fração de membrana, ali permaneçam segregadas. Diversos tipos de proteínas vem sendo identificados e localizados nestas microrregiões de membrana. Dentre as proteínas mais estudadas estão os receptores para macromoléculas essenciais para o metabolismo celular, adquiridas via endocitose e neste caso, endocitose mediada por plataformas de lipídios. Este evento permitiria a criação de regiões de concentração na superfície da membrana plasmática para determinados receptores. Quando estes receptores estiverem envolvidos na captura de macromoléculas, então teremos a associação das "lipids rafts" ao fenômeno da endocitose. Esse padrão é observado em diversos tipos celulares para uma grande variedade de moléculas ligantes, como por exemplo, os receptores para albumina (gp 60) em células endoteliais, interiorização de holotransferrina em *Trypanosoma cruzi* e na captação de quimiocinas induzidas por ligantes através dos receptores CCR5.

28

2.5. Endocitose mediada por cavéola

Cavéola é a denominação dada ao aspecto morfológico da invaginação de membrana que apresenta a forma da letra grega ômega e que fora primeiramente observada (na década de 50) na superfície de células endoteliais, onde são extremamente abundantes. A composição lipídica/protéica das cavéolas é diferente de outros domínios da membrana plasmática apresentando como núcleo, uma região de membrana menos fluída, enriquecida em colesterol, gangliosídeos, esfingolipídios, proteínas de membrana ancoradas via glicosil-fosfatidil-inositol, receptores inositol 1,4,5-trifosfato e a proteína caveolina.

Inicialmente foi proposto que a forma e organização estrutural das cavéolas fossem dadas pela presença da proteína caveolina. A associação das caveolinas nas plataformas lipídicas é feita pela inserção de uma região desta proteína no interior do folheto interno da membrana plasmática da célula. A região de inserção apresenta a forma de uma alça, e as extremidades da caveolina ficam livres e voltadas para o citoplasma. Esta configuração define o revestimento de caveolina na face citoplasmática das vesículas que brotam nas regiões de plataforma de lipídios (Fig. 2.4).



Imagem: José R. Corrêa.

Este revestimento apresenta-se composto por filamentos concêntricos formados por caveolinas, sendo dificilmente observado através da microscopia eletrônica de transmissão de rotina. Por esta razão, as vesículas observadas no momento de seu brotamento apresentam a sua superfície citoplasmática lisa, se diferenciando do que é observado nos brotamentos de vesículas revestidas por clatrina.

Caveolinas são proteínas integrais de membrana que congregam uma família de proteínas com massa molecular de 20-24 KDa. Foram identificados três diferentes genes para caveolinas (Cav-1, Cav-2 e Cav-3), que codificam quatro diferentes subtipos da proteína (caveolina-1α, caveolina-1β, caveolina-2 e caveolina-3). Caveolinas não são proteínas de localização exclusiva na membrana plasmática das células, e já foram identificadas no complexo de Golgi em sua região trans e em caveossomos. Os caveossomos são estruturas membranosas (semelhantes aos endossomos) originadas a partir da fusão de vesículas endocíticas formadas nas plataformas de lipídio. Distinguem-se dos endossomas iniciais pelo seu pH neutro, sua composição lipídica e pela expressão de caveolina-1.

A formação das cavéolas é inibida quando se submete as células a tratamentos que promovam a depleção de colesterol ou ainda através da interferência da expressão dos genes da caveolina. Foi ainda proposto que a manutenção da forma típica e o perfil estacionário das cavéolas estão diretamente relacionados com a presença de um citoesqueleto cortical de actina.

Em 1997 uma nova família de proteínas foi identificada em frações de membrana purificadas e altamente enriquecidas em caveolinas. Esta proteína com cerca de 45 kDa de massa molecular, levou inicialmente a se acreditar que se tratava de mais uma família de proteínas integrais de membrana, com alta homologia em sequência linear de aminoácidos ao <u>a</u>ntígeno <u>e</u>pidermal de <u>s</u>uperfície (ESA). Esta nova família de proteínas residentes em cavéolas foi denominada de flotilina. A grande homologia encontrada entre flotilinas e ESA sugere que possam ser membros da mesma família de genes. O fato de ESA ser purificado de diferentes células como queratinócitos, adipócitos e células endoteliais, levou a se sugerir que: (1) ESA fosse considerado como membro da família gênica das flotilinas; (2) que ESA seja reconhecido como flotilina-2 (enquanto a primeira proteína identificada recebeu a denominação flotilina-1).

Estudos a cerca da topologia da flotilina, revelaram que o tipo de inserção na membrana plasmática não a classifica como uma proteína integral (Fig. 2.3). A associação de flotilina com a membrana plasmática ocorre de forma restrita à camada lipídica interna da membrana, o que faz com que esta proteína adote uma orientação citoplasmática.

A presença de RNA mensageiro para caveolinas e flotilinas apresenta uma distribuição similar nos tecidos. No entanto, uma importante exceção foi observada em tecido cerebral, enquanto flotilina é facilmente identificada, os membros da família das caveolinas estão ausentes.

Recentemente foi descrita a cooperação entre as vias de endocitose dependente e independente de cavéolas. Vesículas caveolares foram encontradas fundindo-se com endossomas tardios, que são compartimentos da via endocítica clássica e que foram inicialmente não relacionados à endocitose mediada por cavéolas. Flotilina-1 já foi também identificada em lisossomos, sendo observada através de co-localização com o marcador lisossomal LAMP 1.

Cavéolas são regiões frequentemente associadas aos eventos de potocitose na membrana celular. O termo potocitose foi inicialmente usado para denominar o processo de alta afinidade de captação de moléculas de baixa massa molecular e íons essenciais ao metabolismo das células. Proteínas ancoradas à membrana celular via glicosilfosfatidilinositol (GPI) promovem a concentração das moléculas nas cavéolas e uma vez contidas no espaço caveolar, elas se difundem para o citoplasma através de proteínas carreadoras presentes na membrana. Este evento foi primeiramente observado na endocitose mediada por receptor do 5-metil tetrahidrofolato, e é usado para explicar a captação de adenosina pelas células.

Posteriormente foi proposto que o termo potocitose fosse estendido para definir todos os mecanismos pelos quais as células capturam e transportam pequenas e grandes moléculas (ou até mesmo complexos macromoleculares) através de cavéolas. Desta forma, em células endoteliais observou-se que as cavéolas medeiam, por potocitose, a transcitose de macromoléculas do lúmen vascular para o espaço subendotelial. Uma distinção marcante entre a potocitose e a endocitose dependente de clatrina está nas diferentes possibilidades de endereçamento das moléculas capturadas (Fig. 2.5).



Fig. 2.5

32

Esquema das distintas possibilidades de endereçamento para os receptores e moléculas na potocitose. (A) O ligante é entregue diretamente ao citoplasma e o receptor é reciclado para a membrana da célula. (B) O ligante é entregue ao retículo endoplasmático. (C) Tanto o receptor quanto o ligante são transportados para a extremidade oposta da célula. (D) Ligante e receptor são interiorizados e mantidos em vesículas até ambos retornarem à superfície da célula.

Imagem: José R. Corrêa

Regiões identificadas como cavéolas são primariamente inseridas em plataformas de lipídio, nas quais se encontram as proteínas caveolina e/ou flotilinas. Embora algumas vesículas sem revestimento sejam derivadas de plataformas de lipídio, o uso generalizado destas terminologias estaria unindo em uma mesma classe todas as vesículas sem revestimento, derivadas de plataformas de lipídio. Isto não corresponde à realidade, uma vez que estas vesículas sem revestimento medeiam diferentes processos de endocitose, incluindo aqueles que não se enquadram na denominação da endocitose mediada por cavéola.

O termo caveolar foi proposto como descritor morfológico para vesículas endocíticas derivadas de plataformas de lipídio. Desta forma, este termo contempla tanto as cavéolas na endocitose em regiões em que a proteína caveolina está presente, como as vesículas transitórias de formas equivalentes às cavéolas, oriundas de plataformas de lipídio, porém sem a presença de caveolina. Esta nomenclatura reflete a morfologia similar da invaginação, a composição de lipídios do domínio de membrana e o papel destes domínios na endocitose.

2.6. Endocitose mediada por clatrina

Clatrina é uma proteína estrutural de expressão constitutiva, encontrada em todas as células de mamíferos. A endocitose mediada por clatrina atua na captação de moléculas e íons essenciais, tais como colesterol, através do receptor para LDL ("low density lipoprotein", lipoproteína de baixa densidade) e ferro, através do receptor para transferrina (molécula transportadora de átomos de ferro). Endocitose mediada por clatrina foi inicialmente denominada de endocitose mediada por receptor, por não se conhecer na época outros eventos de endocitose envolvendo interações específicas entre ligantes e receptores.

A biogênese das vesículas endocíticas é regulada por proteínas e cofatores que controlam diferentes passos neste evento. Distintas proteínas podem estar associadas à membrana na região de formação da vesícula endocítica sem, no entanto, formar um revestimento externo visível por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A associação da clatrina à membrana é que promove o revestimento externo das vesículas detectável por MET. Além disso, a associação da clatrina desencadeia um rápido brotamento da vesícula endocítica. À medida que clatrina vai se associando à membrana plasmática, o revestimento formado gera a força necessária para dobrar a membrana plana constituindo a vesícula.

A clatrina está organizada estruturalmente como um trímero de polipeptídeos que se irradia de um ponto focal (Fig. 2.6). Este esqueleto é composto de três cadeias pesadas (~180 kDa) associadas a três cadeias leves (~25 kDa).



Fig. 2.6

Esqueleto trimérico da clatrina com os respectivos segmentos. A região C-terminal corresponde ao vértice da molécula e a região N-terminal ao domínio terminal. *Imagem: José R. Corrêa*

Vol. 3 BIOLOGIA CELULAR E TRÁFEGO DE VESÍCULAS

A clatrina apresenta em condições não-fisiológicas (*in vitro*), a propriedade de autoassociação, dando origem a gaiolas fechadas formadas por diversos esqueletos triméricos da proteína. Nestes arranjos os segmentos da proteína se interdigitam formando uma rede de faces abertas pentagonais e hexagonais. Dependendo da quantidade de esqueletos triméricos envolvidos (26, 28 ou 60 esqueletos), ocorre a montagem de estruturas com distintas conformações espaciais como: "minirevestimento", "barril hexagonal" ou "bola de futebol" (Fig. 2.7), sendo o "barril hexagonal" e a "bola de futebol" os poliedros capazes de acomodar uma vesícula de transporte.





Imagem: José R. Corrêa

A clatrina não se associa diretamente à membrana das vesículas endocíticas: esta molécula é recrutada por proteínas intermediárias adaptadoras (adaptinas), que se ligam diretamente à cauda citoplasmática de receptores transmembrana específicos. Essa associação determina sua inclusão de forma seletiva na vesícula e forma uma interface entre a clatrina na face interna da membrana e a carga incorporada na face extracelular da bicamada lipídica. O termo adaptina abrange diversas proteínas de massa molecular aproximada a 100 KDa, inicialmente isoladas de vesículas com revestimento de clatrina. Duas classes de adaptinas com grandes diferenças estruturais e funcionais estão descritas com base na sua capacidade de associação à clatrina: a proteína monomérica AP180 e os complexos multifuncionais heterotetraméricos de proteínas adaptadoras (AP).

A proteína monomérica AP180 não está relacionada com reconhecimento de ligantes na membrana plasmática. É uma proteína diretamente envolvida na reciclagem de vesículas nas regiões de sinapse de neurônios. Entretanto, a identificação de uma isoforma expressa ubiquamente em mamíferos denominada CALM ("clathrin-assembly lymphoi-

34

d-myeloid leukemia", proteína de montagem de clatrina na leucemia linfóide-mielóide), levou a se considerar uma função bem mais abrangente do que inicialmente se havia proposto para esta proteína. Foram identificados quatro complexos heterotetraméricos de proteínas adaptadoras (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4) que medeiam o brotamento e a formação de vesículas em diferentes localizações subcelulares. No entanto, apenas as AP-2 estão envolvidas com a formação de vesículas a partir da membrana plasmática, sendo marcadoras de endocitose mediada por clatrina em células eucaróticas superiores.

As AP-2 contêm quatro subunidades: duas maiores e estruturalmente relacionadas, denominadas subunidades de adaptina α e β 2 (aproximadamente 105 a 115 kDa), uma subunidade média µ2 (aproximadamente 50 kDa) e uma subunidade pequena σ 2 (aproximadamente 17 kDa). O complexo AP-2 está organizado em um núcleo em forma de barril constituído pelas porções amino-terminais das grandes subunidades de adaptina (α e β 2) e mais as duas subunidades menores (µ2 e σ 2). Este núcleo expõe dois apêndices protuberantes formados pelas porções carboxi-terminais das subunidades α e β 2 do complexo adaptador (Fig. 2.8). Pela forma típica da protuberância ele é amplamente citado na literatura como "orelha".



2.8 Esquema geral do complexo heterotetramérico adaptador 2 (AP2). A subunidade β2 conecta-se diretamente à clatrina, enquanto a interação com a face citoplasmática do receptor de membrana ocorre através da subunidade µ2.

Imagem: José R. Corrêa

As subunidades α- e β2-adaptina especificam o local de formação do arranjo de clatrina, direcionando a associação do complexo AP-2 à membrana plasmática. Atuam também como uma plataforma recrutando outras proteínas acessórias (anfifisina, Eps15, epsina). A fosforilação do complexo AP-2 regula seu recrutamento para a membrana plasmática, sua interação com o receptor transmembrana e sua associação com a clatrina.

O fator chave da endocitose mediada por clatrina é a ligação entre a maquinaria endocítica e a molécula-carga (Fig. 2.9). Interação direta de estruturas protéicas ricas em tirosina ou di-leucinas em domínios citoplasmáticos dos receptores transmembrana é mediada pela subunidade μ 2-adaptina, influenciando assim a concentração de receptores na invaginação de membrana. A subunidade σ 2-adaptina estaria relacionada à manutenção da estabilidade do núcleo do complexo adaptador, enquanto a associação direta com a clatrina é feita pela subunidade β 2-adaptina.



Fig. 2.9

36

Conjunto de moléculas interagindo de forma coordenada durante a endocitose mediada por clatrina. Os complexos adaptadores fazem a ligação entre a molécula carga (presa em seu receptor) e a clatrina na face citoplasmática da membrana. *Imagem: José R. Corrêa*

Outras subunidades de adaptinas (γ -, σ -, ϵ -), presentes nos complexos AP-1, AP-3 e AP-4 respectivamente, estão relacionadas a outras organelas celulares. O adaptador AP-1 participa do brotamento de vesículas a partir da região Trans do Complexo
de Golgi. Os adaptadores AP-3 e AP-4 estão localizados próximos a endossomas e à região Trans do Golgi, respectivamente, mas pouco se conhece ainda sobre suas funções. Embora mais de um tipo de molécula adaptadora esteja relacionado com brotamento de vesículas a partir do complexo de Golgi, propôs-se que o complexo de proteína de revestimento COP-I regulado por uma pequena GTPase (Arf) é necessário e suficiente para promover o brotamento de vesículas a partir desta organela. Diferentes cinases estão associadas à fosforilação das subunidades do complexo AP-2, sugerindo que a interação entre AP-2 e clatrina seja mediada por ciclos de fosforilação e desfosforilação. Ensaios in vitro demonstraram que a fosforilação da subunidade µ2 aumenta em até 25 vezes a afinidade do complexo AP-2 por estruturas ricas em tirosina de receptores transmembrana. Esta adaptina permite o recrutamento seletivo e aumenta a concentração de moléculas-carga na vesícula revestida por clatrina, otimizando assim a eficiência da endocitose. Entretanto, demonstrou-se que a presença da AP-2 não é pré-requisito para a associação e funcionalidade da clatrina na membrana plasmática. O revestimento de clatrina foi observado mesmo em modelos desprovidos de todas as proteínas adaptadoras conhecidas. Assim, AP-2 pode estar mais relacionada com reconhecimento e recrutamento de carga, pela sua associação seletiva a domínios citoplasmáticos de receptores transmembrana específicos. No estágio final da formação da vesícula ocorre associação da proteína dinamina à membrana plasmática, promovendo o estrangulamento da membrana, resultando na liberação da vesícula.

Após o desprendimento da vesícula endocítica da membrana plasmática e sua localização no citoplasma, ocorre a associação de proteínas HSC-70 ("heat shock cognate", equivalentes à proteína de choque térmico, 70 kDa) ao revestimento de clatrina. Estas proteínas tem atividade ATPásica, desativando a cinase AKK1 e permitindo assim a desfosforilação do complexo AP-2 por fosfatases endógenas, desligando o complexo AP-2 da vesícula endocítica e simultaneamente do esqueleto trimérico de clatrina. Desta forma ocorre a dissociação do revestimento de clatrina da vesícula.

Após a incorporação das vesículas e da perda de seu revestimento de clatrina, estas estruturas fundem-se a endossomas iniciais. Estes compartimentos (endossomas iniciais) apresentam sua membrana composta majoritariamente por fosfatidil-inositol-3-fosfato, e como componente protéico, proteínas com domínio de ligação a fosfatidil-inositol-3-fosfato (Fab1, YOTB, Vac1). Os endossomas iniciais desempenham papel chave na seleção de receptores, os quais podem ser reciclados para a membrana plasmática ou direcionados para endossomas multivesiculares, endossomas tardios ou lisossomos para degradação.

2.7. Organização dos elementos básicos das vias endocíticas

As vias endocíticas, embora sejam altamente reguladas e essenciais para o equilíbrio fisiológico das células, são representadas por poucos elementos. Podemos demonstrar a sua funcionalidade representando seus circuitos por apenas três grandes elementos: (1) circuito de reciclagem de membrana plasmática e de seus ligantes; (2) um circuito de degradação de macromoléculas e, (3) um circuito de conexão unidirecional que mantém um intenso tráfego de vesículas para o transporte de fluídos e componentes especializados de membranas celulares. Os circuitos de conexão ligam o circuito de reciclagem ao sistema de degradação. Os endossomos tardios são organelas intermediárias neste sistema, contribuindo tanto para o circuito de conexão quanto mediando o transporte de componentes lisossomais oriundos da rede trans do Golgi (TGN) para formar os lisossomos. Esta organização permite a manutenção, diversificação e expansão tanto do sistema de reciclagem quanto do sistema de degradação, possibilitando que a endocitose esteja envolvida em muitas vias com distintas implicações fisiológicas. Fechando o sistema encontra-se a membrana plasmática a qual mantêm, sob condições constantes e controladas, o citosol que é o último elemento essencial deste complexo sistema. O citosol apresenta as condições físico-químicas necessárias para o estabelecimento das associações entre os diversos componentes da via endocítica, por meio da manutenção da atividade de seus elementos e moléculas e é também a sede do tráfego vesicular que caracteriza a via de endocitose nas células eucarióticas (Fig. 2.10).



Fig. 2.10

Esquema dos elementos que integram a via endocítica em células eucarióticas. A membrana plasmática está conectada ao circuito de reciclagem e ao sistema de degradação (lisossomo) através do elemento intermediário denominado endossoma tardio ou secundário. Esta conexão é estabelecida através de um vasto número de vesículas de transporte. O Golgi é o elemento responsável pela formação dos lisossomos e se relaciona com todos os circuitos. O circuito de reciclagem e o sistema de degradação operam de forma independente, sendo o citosol parte central onde são mantidas funcionais todas as moléculas dos compartimentos membranosos. Exemplo de funções essenciais para a endocitose: a seleção molecular, a fusão e fissão de membrana, a identificação de compartimentos e o deslocamento de vesículas.

Imagem: José R. Corrêa

Em células de mamíferos, ocorre uma massiva reciclagem da superfície total celular durante eventos fagocíticos/endocíticos. Fagócitos profissionais, como macrófagos, interiorizam cerca de 30% do seu volume total por hora, dos quais dois terços são reciclados para o meio extracelular em cerca de 10 a 15 minutos. Estes exemplos demonstram a gigantesca manobra mantida constantemente pelas células para garantir a entrada de nutrientes e moléculas essenciais às suas vias metabólicas.

2.8. Formação de vesículas dependente de dinamina

Dinamina é uma GTPase multifuncional envolvida na liberação de vesículas nas endocitoses independentes ou mediadas por cavéolas e por clatrina, atuando ainda durante a fagocitose. Assim, é a principal proteína reguladora do tráfego de vesículas a partir da membrana plasmática. A dinamina apresenta um domínio de ligação com fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato (PtdIns (4,5) P2), dois domínios efetores que permitem sua automontagem, o domínio efetor de GTPase (GED: "GTPAse effector domain"), o domínio médio de GTPase, e um domínio que promove a interação da dinamina com outros componentes endocíticos (PRD "proline/arginine-rich domain": domínio rico em prolina e arginina).

Há pelo menos três dinaminas presentes em células de mamíferos (dinaminas I, II e III, as dinaminas clássicas) com 79% de identidade entre si, produto de edição alternativa pós-transcricional. As suas diferentes isoformas estão amplamente distribuídas nas células eucarióticas. Dinamina II é expressa em todos os tecidos, enquando dinamina I é expressa majoritariamente em células do sistema nervoso. Já dinamina III é encontrada principalmente nos testículos, mas também no cérebro, em vesículas pós-sinápticas.

Outras isoformas da dinamina que não se enquadram na família das dinaminas clássicas são denominadas de "semelhantes à dinamina", estando envolvidas na divisão de organelas como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Uma das funções mais estudadas da dinamina é aquela relacionada com a liberação de vesículas da membrana plasmática na endocitose mediada por clatrina.

No estágio final de formação das vesículas há a autoassociação de diversas unidades de dinamina na região entre o segmento plano da membrana e a membrana da vesícula. Em seguida ocorre a constrição desta região, permitindo a liberação da vesícula para o citoplasma.

O modelo proposto para a atividade da dinamina estabelece que esta proteína, diferentemente dos outros membros da família das GTPases, atue como enzima químicomecânica induzindo a formação da vesícula. Esta hipótese se sustenta na observação de que hélices de dinamina tornam-se mais contraídas sob a hidrólise de GTP, sugerindo que a associação da dinamina à membrana estaria exercendo a função de um "torniquete molecular". Estudos da estrutura da dinamina indicam que o intervalo entre as espirais de dinamina formadas na presença de GTP é menor do que o observado após a hidrólise do GTP. Desta forma, sugere-se que a dinamina atue como uma "mola" em torno da porção da invaginação de membrana, que ainda permanece associada à porção plana da mem-

40

brana plasmática. A contração de seu diâmetro interno e o afastamento de suas espirais promovem a liberação da vesícula para o citoplasma da célula.

De forma geral as vias endocíticas são altamente conservadas nos organismos eucarióticos, sendo dependentes das mesmas proteínas chaves para a maioria dos tipos celulares. No entanto, alguns protozoários apresentam profundas modificações em sua estrutura celular, ausência da expressão de proteínas acessórias e baixa homologia entre proteínas com mesma função. Neste contexto, a endocitose apresenta algumas variações quanto à região celular de entrada e o destino citoplasmático das moléculas captadas. Protozoários também podem não apresentar organelas membranosas típicas da via endocítica presentes nas células de mamíferos. Como exemplo clássico deste fenômeno, podemos citar a endocitose no protozoário patogênico *Trypanosoma cruzi* que apresenta um tráfego de vesículas dividido entre o citóstoma e a bolsa flagelar e uma organela específica de estoque de macromoléculas captadas via endocitose denomina-da reservossomo.

2.9. A captação e o processamento de macromoléculas via lisossomos em células de mamíferos

A membrana plasmática é uma estrutura de contenção que segrega o conteúdo interno do citoplasma das células do ambiente extracelular. No entanto, a manutenção dos processos metabólicos celulares requer um constante tráfego de moléculas para ambas as direções da membrana plasmática e este processo é constituído por uma grande variedade de mecanismos. As diferentes modalidades de endocitose visam a captação de macromoléculas e íons do espaço extracelular e endereçamento destas substâncias para o citoplasma ou para compartimentos alvos no interior da célula. Estas vias trabalham para manter funções vitais da célula e do organismo como captação de nutrientes, regulação da presença de receptores na superfície celular e captação de antígenos para processamento e apresentação. A desregulação destas atividades está relacionada com um grande número de doenças de diferentes prognósticos.

Embora esta atividade seja essencial para as células, diversos organismos e moléculas nocivas à vida das células apresentam a capacidade de utilizar estes mesmos mecanismos para acessar o citoplasma celular, como por exemplo, vírus, bactérias e toxinas. Desta mesma forma são estabelecidos os eventos de endossimbiose, nos quais uma célula passa a coabitar o citoplasma da outra sem prejuízo para o metabolismo da célula hospedeira.

Na via endocítica as moléculas interiorizadas pelas células podem ser endereçadas para dois tipos principais de compartimentos, os endossomas iniciais ou os caveossomos. Por outro lado, determinadas moléculas e íons presentes nas vesículas endocíticas podem ainda serem transferidos diretamente para o citoplasma sem que sejam acumulados no endossoma inicial ou no caveossomo.

Acoplado à captação de macromoléculas ocorre também de forma específica, a reciclagem de receptores, que são rapidamente enviados de volta para a membrana plasmática para serem reutilizados. A presença de receptores na membrana pode ser regulada e neste caso, estes receptores e suas cargas são endereçados aos endossomas tardios e aos lisossomas onde serão degradados.

As macromoléculas endocitadas com estoque temporário nos endossomas iniciais, após desligadas de seus receptores sob ação da mudança do pH destes compartimentos, são transportadas para endossomas tardios e em seguida para os lisossomos, onde também serão degradadas. Estes compartimentos membranosos se diferenciam basicamente pela sua morfologia, pH interno e conteúdo enzimático. Desta forma, temos o endossoma inicial como um compartimento livre de enzimas, constituído pela fusão das diversas vesículas endocíticas provenientes da membrana plasmática e com pH 6,5 interno. Este compartimento ainda apresenta uma região tubular especializada na reciclagem de componentes da membrana plasmática e contêm em sua membrana a proteína RAB 5A. Devido a presença de uma bomba de próton do tipo V-ATPase (ATPase vesicular) em sua membrana que mantêm o influxo de H⁺, reduzindo o pH interno destas organelas, os endossomas iniciais se convertem em endossomas tardios, os quais perdem a região tubular de reciclagem de vesículas. Novos endossomas iniciais serão formados pelo constante brotamento de vesículas da membrana plasmática.

Os endossomas tardios apresentam o pH interno de 6,0 e recebem enzimas lisossomais diretamente do Complexo de Golgi. Os endossomas tardios apresentam ainda um lúmen multivesicular, devido ao processo de seleção de moléculas no citoplasma em pequenas vesículas oriundas de sua própria membrana que brotam para o seu lúmen. Estas organelas perdem a proteína RAB 5A e recebem a proteína RAB 7A, o que as torna competentes para a fusão com os lisossomos. Os lisossomos são organelas com pH 5,0, sede da degradação de macromoléculas, patógenos e debris celulares nas células de mamíferos. Os lisossomos contêm basicamente uma mistura de hidrolases ácidas, nucleases, proteases, glicosidades, lipases, fosfatases, sulfatases e fosfolipases, sendo tais enzimas, oriundas diretamente do Complexo de Golgi. Após a fusão entre os endossomos tardios e os lisossomos surge um novo compartimento com propriedades intermediárias destas duas organelas.

O tráfego de vesículas entre os compartimentos da via endocítica se dá a partir de complexos processos envolvendo determinados elementos do citoesqueleto (microfilamentos de actina e microtúbulos), proteínas motoras (cinesinas e dinaminas), proteínas de endereçamento pertencentes à família das proteínas RAB e seus receptores, associadas tanto aos compartimentos como as próprias vesículas.

Outros elementos fundamentais envolvidos com a fusão das vesículas aos compartimentos alvos e que também estão presentes na superfície das próprias vesículas e de seus compartimentos alvos, são as proteínas pertencentes à superfamília SNARE.

As proteínas da família RABs, seus receptores e as proteínas da superfamília SNARE exercem suas atividades em conjunto garantindo o correto endereçamento das vesículas, a sua ancoragem ao compartimento alvo e finalmente a fusão destas vesículas com consequente liberação de seus conteúdos no lúmen dos compartimentos alvos.

Classicamente na endocitose mediada por cavéolas, as vesículas que brotam da membrana plasmática não seguem a rota dos endossomos iniciais, endossomos tardios e lisossomos, sendo endereçadas diretamente para o retículo endoplasmático ou para o Complexo de Golgi. No entanto, o seu endereçamento e a fusão destas vesículas às organelas alvos são dependentes das proteínas da família da RAB e seus receptores e da superfamília da SNARE.

3. EXOCITOSE EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

PATRÍCIA E. DE ALMEIDA

3.1. Introdução

As células eucarióticas desenvolveram um sistema de endomembranas que permite a captação, digestão, síntese, processamento e secreção de macromoléculas. Além disso, o sistema interno de endomembranas permite dentre outras funções, que as células regulem a distribuição de produtos sintetizados em organelas para o meio extracelular, como proteínas, lipídios e carboidratos.

Os compartimentos intracelulares relacionados com a via biossintética secretória são classificados de acordo com sua morfologia e função, desta forma temos:

- o retículo endoplasmático (RE) que é contínuo com o envoltório nuclear;
- o complexo de Golgi ou aparelho de Golgi;
- vesículas secretórias.

Estes compartimentos estão em constante comunicação através de um fluxo de vesículas. As vesículas brotam de um compartimento doador carreando componentes da membrana doadora e moléculas solúveis até o compartimento receptor onde se fundem. Neste estudo, focaremos na via biossintética-secretória, onde o tráfego de vesículas inicia-se no retículo endoplasmático, passa pelo complexo de Golgi até chegar à superfície celular. É importante considerar que o fluxo de membranas entre os compartimentos é equilibrado, ou seja, existe uma equivalência entre as rotas de captação e secreção.

3.2. Interações entre os compartimentos

Devemos considerar que cada vesícula que brota de um compartimento e funde-se a outro possui uma seletividade e um endereçamento próprios. O primeiro conceito importante a saber é que todo compartimento apresenta uma composição específica de membrana, bem como a presença de marcadores moleculares (de natureza proteica, na maioria dos casos) que estão voltados para o citosol. É importante considerar também que alguns compartimentos apresentam marcadores de membrana em comum. Assim, deve haver uma combinação entre estas moléculas especificamente, ou a ação de outras moléculas acessórias de forma a determinar a fusão das vesículas com o compartimento correto.

3.3. Quais são os mecanismos moleculares que controlam o transporte de vesículas?

Para responder esta questão, devemos considerar que uma série de interações proteína-proteína atue no direcionamento, ancoragem e fusão de vesículas. Desta maneira, devemos destacar dois eventos principais:

- a) O transporte e revestimento das vesículas, com destino à membrana plasmática - exocitose
- b) A ancoragem e a fusão das vesículas: o complexo RAB e o complexo SNARE

a) Transporte e revestimento das vesículas, com destino à membrana plasmática - exocitose

A montagem do revestimento de uma vesícula ajuda a selecionar proteínas, lipídios e outras macromoléculas ligadas em domínios de membrana, assim como moléculas solúveis para o transporte em direção à membrana-alvo. Da mesma forma que na endocitose, o brotamento de vesículas revestidas é dependente da força mecânica provida por proteínas associadas à membrana, que dobram a membrana dos compartimentos (RE e aparelho de Golgi) levando à formação da vesícula. Existem vários tipos de proteínas que recobrem as vesículas, destinadas a exocitose, mas dois tipos estão mais bem caracterizados, são elas: CLATRINA e COP e cada uma está relacionada a uma forma de transporte diferente (Fig. 3.1).



Fig. 3.1

Revestimentos no tráfego de vesículas destinadas à exocitose. As proteínas de revestimento carreiam diferentes cargas e medeiam as diferentes etapas da via biossintética secretora. Cada revestimento funciona em distintos locais das células; as setas indicam a direção dos destinos das vesículas de acordo com cada tipo de revestimento. COP II: RE em direção ao complexo de Golgi; COP I: transporte retrógrado do complexo de Golgi para o RE; Clatrina: vesículas que deixam a rede Trans do aparelho de Golgi.

Imagem: Patrícia E. de Almeida

As vesículas revestidas por COP estão envolvidas com o transporte entre o RE e o aparelho de Golgi (COPII) e entre as cisternas do Golgi (COPI). Esse tipo de revestimento também precisa de proteínas adaptadoras, no caso uma GTPase monomérica (ARF para COPI e Sar 1 para COPII). Assim que o revestimento é removido, as vesículas que brotam do RE, se fundem umas às outras, formando agrupamentos tubulares de vesículas que se movimentam através dos microtúbulos em direção ao aparelho de Golgi. É interessante ressaltar aqui, que muitas proteínas residentes no RE podem escapar e migrar para o aparelho de Golgi, mas são devolvidas ao RE a partir do transporte vesicular. Há um receptor chamado KDEL presente nos agrupamentos tubulares de vesículas e no aparelho de Golgi, que capturam as proteínas solúveis residentes do RE e as transportam

em vesículas revestidas por COPI de volta ao RE, pois estas proteínas apresentam na região carboxi-terminal a sequência de aminoácidos KDEL (lys-asp-glu-leu). Dessa forma, o receptor liga-se a estas proteínas e juntos voltam em direção ao RE em vesículas revestidas por COPI. Este transporte é chamado de transporte retrógrado e no ambiente propício do RE estas proteínas se dissociam dos receptores KDEL, os quais são devolvidos ao aparelho de Golgi para sua reutilização.

Por outro lado, as vesículas revestidas por CLATRINA estão relacionadas ao transporte a partir da membrana plasmática e da face *trans* do complexo de Golgi. Acreditase que a montagem do revestimento, induza uma curvatura para dentro da membrana, facilitando a formação da vesícula, como discutido no capítulo de endocitose. Neste processo de formação de vesículas revestidas por clatrina existe um segundo grupo de proteínas, as ADAPTINAS, que são responsáveis por conectar a clatrina à membrana da vesícula. O revestimento de clatrina na região trans do Golgi também conta com a participação de adaptinas, porém essas são diferentes das presentes no processo de endocitose mediada por receptor: sendo o complexo AP1 para o Golgi, e complexo AP2 na endocitose mediada por receptor.

O brotamento de vesículas exocíticas envolve a participação de uma terceira proteína, a DINAMINA, a qual se liga à membrana da vesícula em forma de anel ao redor ao pescoço do brotamento, promovendo um "estrangulamento" na base da vesícula, permitindo sua liberação (detalhada no capítulo de endocitose). Após o brotamento da vesícula, o revestimento de Clatrina é rapidamente removido, para que a vesícula possa se fundir especificamente à sua membrana-alvo.

b) A ancoragem e a fusão das vesículas: o complexo RAB e o complexo SNARE

No mecanismo de ancoragem das vesículas que brotam de um compartimento e se fundem a outro compartimento, ocorre a interação de proteínas e a formação de complexos. Estes complexos formados ajudam a explicar porque as membranas não se fundem indiscriminadamente. Para assegurar que o tráfego de vesículas ocorra de maneira ordenada, este transporte deve ser altamente seletivo. Para que a vesícula encontre e funda-se com a membrana alvo, deve haver marcadores de superfície específicos, que as identifiquem de acordo com a sua origem e seu tipo de carga, enquanto as membranas-alvo apresentam receptores complementares que reconhecem os marcadores especificamente. Estão descritas na literatura duas classes de proteínas relacionadas a este processo:

48

- as SNAREs e as GTPases (RABs): marcadores de vesículas

As RABs são GTPases monoméricas, com aproximadamente 60 tipos conhecidos. As Rabs se distribuem de forma característica nas membranas celulares, e tem papel central na especificidade do transporte vesicular. Elas podem ser encontradas ligadas a GDP quando estão inativas no citosol, ou ligadas a GTP quando estão ativas e/ou associadas às membranas de organelas ou às vesículas de transporte.

Quando uma vesícula se aproxima da membrana-alvo, a Rab presente na membrana desta vesícula é reconhecida por uma outra proteína – chamada de *efetor de RAB* - que está na membrana-alvo, efetivando a ancoragem.

A seletividade do processo é aumentada por um outro conjunto de proteínas: as SNAREs.

As SNAREs (da sigla em inglês: <u>soluble NSF attachment receptor</u>) são responsáveis pela ancoragem da vesícula à membrana alvo, mas seu papel principal é o de promover a fusão entre membranas. Existem, pelo menos, 35 tipos, cada um associado a uma organela específica. Estas proteínas transmembranas existem como conjuntos complementares: as SNAREs presentes nas vesículas de origem são chamadas de v-SNAREs e as da membrana-alvo são as t-SNAREs. Quando uma vesícula encontra sua membrana-alvo pelo reconhecimento de uma Rab específica (e o seu efetor de Rab), as v-SNAREs e t-S-NAREs interagem formando complexos estáveis, que se aproximam e prendem as duas membranas dos dois compartimentos envolvidos no processo, facilitando o processo de fusão e troca de conteúdo. Uma terceira proteína, a NSF (da sigla em inglês: <u>N</u>-ethylma-leimide <u>s</u>ensitive factor), liga-se ao complexo de SNAREs, e através da hidrólise de ATP desfaz a interação e afasta as SNAREs, disponibilizando os complexos v-SNARE e t-S-NARE para um novo ciclo de fusão.

3.4. O transporte do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi

Uma vez formadas no RE, as proteínas podem ser empacotadas em vesículas revestidas por COPII e brotam da membrana do RE. Logo após, este revestimento é removido proporcionando assim a fusão das vesículas, formando grupamentos tubulares que migram em direção ao complexo de Golgi.

As proteínas e lipídios incorporados na face *cis* do complexo de Golgi movem-se através das cisternas em direção à face *trans*. Atualmente existem três hipóteses: o transporte ocorre através de vesículas, onde as moléculas transportadas são carreadas por vesículas revestidas de COPI que brotam de uma cisterna em direção a cisterna seguinte; uma outra hipótese é que ocorra a maturação progressiva das cisternas *cis* ou então, que este transporte possa ser determinado pela combinação dos dois mecanismos.

A partir da face *trans*, o complexo de Golgi processa e distribui as proteínas e lipídios que recebe do RE direcionando-os para três destinos diferentes: a membrana celular, os lisossomos ou através das vesículas secretórias destinadas a exocitose.

3.5. Exocitose: destinos para as vesículas que brotam da face Trans do complexo de Golgi

As proteínas, lipídios, hormônios ou neurotransmissores podem ser secretadas das células pelo processo de exocitose. Isto pode ocorrer de duas maneiras: de modo regulado ou constitutivamente.

Na via regulada as moléculas ficam estocadas nas vesículas secretoras até que a célula receba um sinal para sua liberação. Este processo acontece somente em células secretoras especializadas, como os mastócitos, neurônios e células β do pâncreas, por exemplo. Já a via constitutiva que funciona em todas as células, o transporte de vesículas ocorre de modo contínuo, através do brotamento da face *trans* do complexo de Golgi em vesículas revestidas por clatrina, em direção à membrana plasmática.

Em organismos metazoários, as células de maneira individual irão contribuir para diversos mecanismos fisiológicos através de seus produtos de secreção, promovendo comunicação e regulação celular. No contexto de uma única célula, os processos exocíticos estão envolvidos em mecanismos fundamentais, como a remoção de catabólitos citoplasmáticos, na liberação de enzimas digestivas que auxiliam na quebra de macromoléculas presentes no meio extracelular para posterior captação, manutenção da área das membranas e volume celular, e de todo o conjunto de moléculas requeridas pelas células de forma que a vida sustente-se.

50

4. MICROSCOPIA DE LUZ

FRANCISCO O. R. OLIVEIRA JR RUBEM F. S. MENNA-BARRETO

4.1. Histórico

Não se sabe ao certo quando as lentes foram inventadas, entretanto, há relatos de que tenha ocorrido em 721 a.C., pois foi encontrado um cristal de rocha lapidado com propriedade de ampliação da imagem datado desta época. Apenas no século XIII as lentes passaram a ser realmente conhecidas e utilizadas para confecção de óculos na Itália. Devido aos benefícios trazidos pelas lentes, estas foram rapidamente popularizadas. Assim, a sua utilização com a finalidade de ampliação de imagens resultou no desenvolvimento do microscópio.

Hans e Zacharias Janssen foram fabricantes de óculos que viveram na Holanda no século XVI. A eles é atribuída a invenção do microscópio. Embora tenham conseguido ampliar imagens associando lentes, permitindo assim a visualização de corpúsculos invisíveis a olho nu, não existem registros de que eles tenham utilizado este equipamento para fins científicos. Posteriormente, Galileu Galilei construiu o primeiro aparelho razo-avelmente prático para a ampliação de imagens em 1624, batizando-o de occhialini. Sua pretensão era investigar a Natureza diretamente, com base na observação e na experiência empírica. Por outro lado, considerava que, para observar a Natureza era necessário conhecer e entender a matemática. Assim, Galileu revolucionou a ciência adotando e mostrando a importância do método experimental.

Em 1665, o inglês Robert Hooke aprimorou o processo de fabricação das lentes, gerando o desenvolvimento de um microscópio com maior qualidade. Esta inovação possibilitou que Hooke realizasse importantes descobertas na área biológica. Dentre elas podemos citar a visualização de estruturas periódicas, cheias de ar, de uma delgada lâmina de cortiça, denominadas "célula".

Antonie van Leeuwenhoek também teve grande participação no desenvolvimento dos microscópios. Além de comerciante e cientista, Leeuwenhoek fabricava seus próprios microscópios. Seu microscópio possuía uma única lente (microscópio simples) e já era capaz de gerar um aumento de aproximadamente 200 vezes. Com este equipamento ele observou e relatou as formas e o comportamento de diversos microorganismos, fato este que lhe rendeu o título de pai da microbiologia.

No século XVIII, devido ao grande avanço científico, ocorreram melhorias nas lentes e aprimoramentos dos componentes dos microscópios, resultando em microscópios com maior estabilidade, precisão de foco e facilidades de uso. Podemos ressaltar que no final do século XIX, a contribuição mais importante foi o alcance da resolução dos microscópios ópticos se aproximando de 200 nm, a qual permanece até os dias de hoje. Vale definir aqui, o que é resolução: é a menor distância entre dois pontos, onde ainda conseguimos distingui-los separadamente. O limite da resolução está relacionado com a abertura numérica da objetiva e o comprimento da onda luminosa, sendo calculado pela fórmula:

$$LR = 0,61 \times \lambda$$
NA

Substituindo λ por 480 nm (comprimento de onda próximo ao início do espectro visível) e NA por 1,46 (maior abertura numérica dos microscópios de luz atuais), teremos um LR de cerca de 200 nm (0,2 µm).

O grande avanço tecnológico na área de microscopia e suas diferentes modalidades tem proporcionado um sensível aumento na qualidade da informação gerada. Hoje não é possível apenas observar estruturas microscópicas ao microscópio, mas também realizar uma série de análises como: marcar e identificar moléculas específicas e organelas, pelos diferentes métodos de microscopia de fluorescência; analisar materiais, na microscopia de luz polarizada; visualizar células vivas, utilizando os métodos de contraste; dentre outras possíveis aplicações da microscopia de luz na ciência.

4.2. Microscópio

Microscópios são equipamentos dotados de um conjunto de lentes de vidro (microscópios ópticos) ou eletromagnéticas (microscópio eletrônico) que tem a capacidade de gerar imagens ampliadas e detalhadas de diferentes materiais, biológicos ou não biológicos. Na microscopia de luz o conjunto de lentes é formado pelas objetivas, oculares e condensador. Na microscopia eletrônica de transmissão o conjunto de lentes é formado por bobinas eletromagnéticas.

O microscópio de luz é constituído basicamente por uma fonte luminosa (lâmpada) que se encontra na base do microscópio (microscópio convencional) ou na parte superior (microscópio invertido), uma platina, filtros e três sistemas de lentes: condensadora, objetiva e ocular (Fig. 4.1). A platina é a região onde fica o material a ser observado, a qual é móvel nos eixos x, y e z. O condensador está localizado entre a fonte de luz e o objeto a ser observado e tem como função concentrar o feixe luminoso. A objetiva, assim denominada por estar mais próxima ao objeto, capta a luz concentrada pelo condensador que passou pelo plano da amostra e projeta uma imagem aumentada real e invertida do objeto que está sendo analisado, em direção a ocular. A lente ocular por sua vez amplia a imagem formada pela objetiva, e a projeta sobre a retina, sobre uma tela, sobre uma câmera analógica ou digital ou ainda sobre chapa fotográfica. No percurso seguido pela luz no microscópio, podem ser inseridos filtros, anéis ou prismas os quais caracterizarão diferentes modalidades de microscopia de luz.



Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr

A seguir destacaremos as modalidades de microscopia mais utilizadas. A microscopia de campo claro é a modalidade de microscopia mais simples (configuração mais básica do microscópio). É uma técnica com muito pouco contraste e para melhorar a visualização os espécimes devem ser normalmente corados (Fig. 4.2).



 Fig. 4.2
 Cultura primária de cardiomiócitos infectadas com Trypanosoma cruzi. Imagem de microscopia de campo claro com o feixe de luz alinhado.

 Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr

A coloração é essencial para observação em microscopia de campo claro. Entretanto, durante o processo de fixação e coloração as células podem se soltar do substrato e/ou apresentar alterações na sua morfologia, um fato que sempre preocupou os microscopistas. Assim foram desenvolvidas diferentes modalidades de microscopia de luz para aumentar o contraste das amostras e assim permitir a visualização das células vivas sem a necessidade de utilizar corante.

A microscopia de Contraste de Fase é uma modalidade utilizada para aumentar o contraste das amostras e assim possibilitar melhor observação de microorganismos vivos. Este efeito é obtido com a colocação de anéis de fase no trajeto da luz, especificamente no condensador e na objetiva. Dessa forma, as diferenças de fase dos raios luminosos que atravessam a amostra são aumentadas pela presença dos anéis e se tornam perceptivas ao olho humano. De acordo com a configuração dos anéis de fase, o microscópio de contraste de fase pode ser utilizado de modo que as estruturas celulares apareçam escuras (fase positiva) ou claras (fase negativa). (Figs. 4.3 e 4.4A).



de fase no trajeto seguido pela luz.

Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr



Cistos de *Toxoplasma gondii*. Observado por: (**A**) microscopia de contraste de fase e (**B**) microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC). Imagens: Helene S. Barbosa e Erick Vaz Guimarães

A microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC), assim como a modalidade de contraste de fase, possibilita uma boa visualização das células vivas sem a necessidade de coloração. No entanto, esta técnica é um pouco mais complexa que a descrita acima e exige componentes diferenciados, além dos básicos da microscopia de campo claro. Estes são: um par de filtros polarizadores (polarizador e analisador) e um par de prismas de Normarski. Brevemente, a combinação destes componentes tem a finalidade de separar e recombinar a luz polarizada, permitindo a interferência entre os feixes de luz após passar pelo espécime, gerando desta forma uma aparência tridimensional (Figs. 4.4 B e 4.5).



Microscópio invertido de contraste de interferência diferencial demonstrando a disposição do prisma de Normarski.

Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr e Rubem F. S. Menna-Barreto

4.3. Ajuste de iluminação segundo Koehler

O primeiro procedimento para que se tenha uma imagem de qualidade é verificar o alinhamento do feixe de luz. O feixe é alinhado da seguinte forma:

- 1. Coloque uma lâmina no microscópio e utilize a objetiva de 10X.
- 2. Ajuste o nível de iluminação a uma intensidade confortável para os olhos.
- 3. Focalize o espécime.



Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr e Rubem F. S. Menna-Barreto

4. Ajuste a distância interpupilar do tubo ocular e a dioptria de cada olho girando o anel externo de cada ocular.



Imagens: Francisco O. R. Oliveira Jr

5. Feche o Diafragma de Campo (base do iluminador) e observe um pequeno ponto luminoso. Focalize a borda do ponto luminoso movendo a altura do condensador.



Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr

6. Posicione a imagem do diafragma (polígono) no centro do campo, utilizando os parafusos de centralização do condensador.



Imagem: Francisco O. R. Oliveira Jr

7. Ajuste a abertura do diafragma até obter o campo completamente iluminado.

A Fig. 4.6 apresenta o efeito do desalinhamento do feixe de luz na imagem. Além da iluminação não estar homogênea é possível observar redução no contraste dificultando a visualização das células.



Fig. 4.6 Cultura primária de cardiomiócitos. Imagem com feixe de luz alinhado (A) e desalinhado (B).

Imagens: Francisco O. R. Oliveira Jr

4.4. Microscopia de fluorescência

4.4.1 Histórico

Em 1852, o inglês George Stokes descreveu a primeira fluorescência observando minerais excitados com luz ultravioleta. Anos mais tarde, estudos mais apurados apontaram que os mais variados materiais como cristais, clorofila e drogas podiam fluorescer quando estimulados com a luz ultravioleta. Apenas em 1930, os fluorocromos foram utilizados na área biológica para corar tecidos e células. Com o advento dessas marcações surgiram então, os primeiros microscópios de fluorescência.

4.4.2. O princípio

Esta modalidade de microscopia óptica utiliza uma fonte luminosa diferente da luz visível (550 nm): a ultravioleta que apresenta comprimento de onda variável (Figs. 4.7 e 4.8). Assim como em outras modalidades, a microscopia de fluorescência requer a utilização de substâncias fluorescentes, sejam elas anticorpos acoplados à fluorocromos, ou fluorocromos puros, permitindo evidenciar estruturas específicas no interior das células. Na maioria das situações as células precisam de preparação especial para a observação, porém alguns marcadores possibilitam a análise de células vivas. É interessante dizer que na natureza ocorre um fenômeno chamado "*autofluorescência*" onde moléculas biológicas apresentam capacidade de fluorescer, sem a necessidade da adição de fluorocromos, tornando algumas células e/ou tecidos fluorescentes quando excitados com o comprimento de onda adequado (por exemplo, o nosso fígado).



Fig. 4.7 Microscópio de fluorescência. Em detalhe: oculares, filtros de fluorescência, condensador e as objetivas.

Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto.



Fig. 4.8 Localização da lâmpada HBO no microscópio de fluorescência. Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto.

4.4.3. A fluorescência

Fluorescência é parte de um processo de luminescência que algumas moléculas são suscetíveis. Estas moléculas por sua vez, emitem luz de estados eletronicamente excitados através de mecanismos químicos, físicos ou mecânicos. No processo chamado de fotoluminescência, a fluorescência é gerada a partir da excitação de moléculas por fótons de luz visível ou ultravioleta (Fig. 4.9). A essas moléculas chamamos de *fluorocromos ou fluorófilos*. Em linhas gerais a definição simplificada de fluorescência é: propriedade de alguns átomos e moléculas tem de absorver luz em comprimentos de onda específicos, emitindo consequentemente luz de comprimento de onda maior.

Na microscopia de fluorescência esta luz emitida é a que chegará aos olhos do observador, resultando em imagens de estruturas subcelulares fluorescentes, contrastando com o fundo escuro (Figs. 4.10 e 4.11). A análise da fluorescência no interior das células nos permite avaliar não só estruturas e macromoléculas, como também a sua dinâmica e interação com os demais elementos celulares. Importantes funções celulares, como endocitose e a transdução de

sinal, têm sido exaustivamente estudadas por citometria de fluxo e microscopia de luz que utilizam a fluorescência como conceito básico. É importante ressaltar que essas moléculas fluorescentes apresentam características físico-químicas peculiares: absorvem ou são excitados em determinados comprimentos de onda (UV, por exemplo), emitindo outro comprimento de onda completamente diferente e sempre maior (como o verde, por exemplo).





64

Esquema do mecanismo de excitação x emissão dos fluorocromos.

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

Fig. 4.10 Miofibroblastos de células musculares esqueléticas em microscopia de fluorescência revelando em vermelho os filamentos de actina e em azul os núcleos das células.

20 µm

Imagem: Helene S. Barbosa e Alessandra F. Gomes



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

Fluorocromo	Pico de Excitação (nm)	Pico de Emissão (nm)
DAPI	359	461
Lucifer Yellow	428	533
Ficoeritrina (PE)	480	578
Laranja de Acridina	487	520
FITC	494	520
Rodamina 123	505	533
Brometo de Etídio	510	595
CY3	550	565
CY5	650	670
TRITC	554	576
Texas Red	596	615

Tabela 5.1. Fluorocromos mais utilizados em biologia celular

4.4. Microscopia confocal de varredura a laser

4.4.1. Histórico

A microscopia confocal foi desenvolvida por Marvin Minsky durante a década de 1950, observando células nervosas não coradas em sistemas muitas vezes vivos. Entretanto, sua invenção passou despercebida por muitos, uma vez que não apresentava os recursos luminosos e de armazenamento de dados adequados. Em 1979, o físico Brakenhoff desenvolveu o primeiro confocal de varredura, mas apenas em 1987 é que esses equipamentos foram comercializados. Na década de 1990, com os avanços na tecnologia da óptica, computadores e lasers, os microscópios confocais se desenvolveram bastante. Atualmente, os microscópios confocais modernos são sistemas ópticos e eletrônicos completamente integrados, combinando vários detectores com seus diferentes lasers, gerando impressionantes imagens de altíssima resolução.

4.4.2. O princípio

A microscopia confocal (Fig. 4.12) oferece inúmeras vantagens sobre as demais modalidades, dentre as quais podemos destacar a capacidade de eliminar ou reduzir as informações contidas no meio onde a amostra se encontra, além da capacidade de analisar cortes ópticos seriados para reconstrução em 3D. O grande advento da técnica está na possibilidade de eliminar todo o sinal luminoso fora de foco, permitindo um foco perfeito, mesmo em amostras mais espessas (maiores que 2 µm). O princípio da microscopia confocal baseia-se na utilização de um laser como fonte luminosa, gerando maior resolução em relação aos outros tipos de microscopia óptica (Figs. 4.13 e 4.14). A luz coerente emitida pelo sistema do laser (excitação) atravessa a abertura de um "pinhole" e as lentes e atingem a amostra que será varrida. O sinal óptico gerado a partir da amostra passa pela abertura de um segundo "pinhole" posicionado na frente do detector fotomultiplicador. Essa organização, associada ao fato do laser ser refletido por um espelho dicromático e do espécime ser varrido em um plano focal definido (aberturas dos "pinholes" pré-determinadas), determina a ótima qualidade da imagem gerada. É importante dizer que toda a captura e análise dos dados obtidos na microscopia confocal é informatizada dependendo de poderosos computadores para o desenvolvimento da técnica em sua plenitude, como por exemplo, a reconstrução 3D.

66



Fig. 4.12

Microscópio confocal (**a**). Em detalhe: charriot automático (**b**), platina (**c**), lasers (**d**) e a bancada especial contra impacto (**e**).

Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto



Fig. 4.14Cisto de Toxoplasma gondii em microscopia confocal de varredura a laser. Corte
óptico (a) e reconstrução 3D (b).

Imagens: Helene S. Barbosa e Mariana Acquarone

68

4.4.3. Aplicações no estudo do tráfego de vesículas

A microscopia de luz, sobretudo técnicas como a microscopia de fluorescência e confocal, são imprescindíveis nos mais variados tipos de estudos em biologia celular, destacando-se na caracterização e localização de moléculas em compartimentos celulares específicos. Graças à utilização de anticorpos e/ou moléculas acopladas a fluorocromos, conseguimos avaliar e entender melhor os mecanismos essenciais do metabolismo celular, como por exemplo, o tráfego de vesículas (Fig. 4.15).

A microscopia confocal apresenta diversas vantagens sobre a microscopia de fluorescência convencional, incluindo a habilidade de controlar a profundidade do campo, podendo ou não eliminar informações fora do plano de foco. Fazendo os chamados *cortes ópticos*, podemos fazer reconstrução em três dimensões do material. Análises utilizando o eixo z (profundidade) são de grande importância em estudos de colocalização moleculares, onde existe a real necessidade de garantirmos que duas moléculas encontram-se na mesma estrutura e/ou em organelas.

Assim como na microscopia eletrônica, podem ser utilizados traçadores como proteínas tipo LDL ou transferrina associadas também a fluorocromos durante as análises de endocitose. Apesar dessas técnicas serem muito úteis, devemos ter em mente que precisamos de mais de uma ferramenta para ter uma visão mais detalhada do fenômeno biológico alvo da investigação. Não existe técnica absoluta, sendo então, as microscopias de luz (contraste de fase, DIC, confocal e fluorescência) e microscopia eletrônica, técnicas complementares.



Fig. 4.15

Endocitose em diferentes modelos celulares. Células musculares cardíacas marcadas para actina (Faloidina-FITC) e Rab11-TRITC (setas) (**a**). Cisto de *Toxoplasma gondii* marcado com BSA-FITC (**b**).

Imagens: (a) Maria de Nazaré Soeiro e Denise Batista; (b) Helene S. Barbosa e Marialice F. Ferreira-da-Silva

5. CITOMETRIA DEFLUXO

RUBEM F. S. MENNA-BARRETO

5.1. Histórico

Em 1934, foi desenvolvido o primeiro contador de células por Moldavan, que na verdade era um capilar pelo qual células coradas atravessavam, sendo quantificadas. Este equipamento foi aprimorado por Coulter em 1949. Mais tarde, em 1953, Crosland e Taylor com o objetivo de evitar entupimentos e analisar amostras com dimensões maiores criaram um sistema mais complexo, que representaria o primórdio da citometria de fluxo. No mesmo ano, Parker e Horst elaboraram o primeiro contador diferencial hematológico, capaz de distinguir as células pela sua coloração azulada (leucócitos) ou avermelhada (eritrócitos).

No final da década de 60, Herzenberg idealizou um equipamento para separar tipos de células diferentes presentes em uma mesma amostra, processo esse chamado de *"cell sorting"*. Foi criado então, o primeiro citômetro de fluxo como conhecemos atualmente, que avaliava tamanho, complexidade celular interna, além do parâmetro fluorescência. Foi a partir deste equipamento que surgiu o termo **FACS** (*"fluorescence activated cell sorting"*). Já nos anos 70, com a escalada da infecção pelo vírus HIV, a evolução nos estudos da imunologia e consequentemente na produção de anticorpos, ampliaram-se as aplicações da citometria de fluxo, possibilitando análises múltiplas e variadas de uma mesma amostra.

5.2. Princípio

A citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada no estudo da expressão de moléculas intracelulares e de membrana (fenotipagem), atividade de organelas, fagocitose, morte celular, sinais de cálcio, etc. As células têm que estar em suspensão e, ao serem interceptadas por um ou mais feixes de lasers todos os sinais em estudo são gerados. Para isso, as células marcadas com indicadores fluorescentes, são excitados pelo(s) laser(s) e os sinais gerados são registrados por detectores. As amostras biológicas passíveis de análise são os mais diversos tipos celulares, como macrófagos, linfócitos, bactérias ou protozoários, dentre outros.

Além da avaliação dos sinais de fluorescência, este equipamento também avalia parâmetros como tamanho e granulosidade. Através da reflexão e refração da luz, é que o aparelho calcula tamanho ("Forward Scatter" ou FSC) e granulosidade ("Side Scatter" ou SSC) de cada célula da amostra (Fig. 5.1). Os índices de reflexão e refração da luz frontais (FSC) e laterais (SSC) são detectados por sensores posicionados na linha do feixe de luz (detector FSC) ou perpendiculares a esse (detector SSC). Através da determinação de tais valores de dispersão de luz, podemos inferir tamanho e granulosidade de cada célula da amostra, uma vez que FSC está relacionado ao volume celular, enquanto SSC correlacionase à complexidade intracelular. Logo, o espalhamento frontal e lateral do laser determina a morfologia dos eventos da amostra e os marcadores fluorescentes usados indicam os parâmetros em estudo. Todos esses dados são gerados em tempo real para cada evento que é interceptado pelo(s) laser(s) em uma taxa que pode chegar a várias centenas por segundo. Atualmente, há citômetros que avaliam 14 canais de fluorescência gerando uma quantidade enorme de informações de células individuais em populações celulares complexas.

Cada fluorescência é capturada por detectores separadamente, a depender da marcação. Fluorocromos puros e/ou anticorpos acoplados aos fluorocromos podem ser utilizados para análises por citometria de fluxo, sendo possível a avaliação de células vivas ou fixadas. Na trajetória entre a "flow cell" (câmara onde o(s) laser(s) incide(m) e intercepta(m) as células) e os detectores de fluorescência, existem diversos filtros ópticos capazes de limitar os comprimentos de onda que chegarão a cada um dos detectores. Graças a este sistema óptico complexo, é possível avaliar simultaneamente fluorescências com comprimentos de onda variados (Fig. 5.2). Todas essas informações são convertidas em dados digitais que são armazenados e analisados em computadores (Fig. 5.1 e 5.2). Então, em poucas palavras, o conceito fundamental da citometria de fluxo seria: "Células alinhadas e em suspensão são interceptadas por um ou mais lasers gerando sinais ópticos. O citômetro detecta estes sinais ópticos e os transforma em sinais eletrônicos que são digitalizados para uma central computadorizada."

72


Fig. 5.1 Imagem de um citômetro de fluxo e exemplos de gráficos construídos a partir dos dados gerados de FSC (correspondente ao tamanho), SSC (correspondente à granulosidade) e fluorescência.

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto



Comparação entre os diferentes parâmetros citométricos: granulosidade (SSC), tamanho (FSC) e fluorescência.

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

5.3. Lasers e filtros ópticos

De modo geral, os citômetros de fluxo atualmente disponíveis no mercado apresentam lasers estáveis de alta potência, sendo o laser de argônio ("laser azul") o mais amplamente empregado, devido ao seu comprimento de onda (488 nm) excitar uma grande quantidade de fluorocromos hoje comercializados. Alguns fluorocromos como a aloficocianina (APC) são excitados por outros comprimentos de onda, requerendo outro tipo de laser, como por exemplo, o laser vermelho (635 nm). Em linhas gerais, marcações múltiplas, onde são utilizados muitos fluorocromos em uma mesma amostra, geralmente necessitarão de mais de um laser, de modo a excitar todos os fluorocromos empregados. Vale ressaltar que um conhecimento prévio do fluorocromo com o qual irá se trabalhar é fundamental, uma vez que é necessária a certificação se o laser presente no equipamento é realmente capaz de excitá-lo.

Dentre os componentes hidráulicos, ópticos e digitais que constituem o citômetro propriamente dito (Fig. 5.3), os filtros ópticos possuem funções essenciais para a eficiência do equipamento: estes absorvem alguns comprimentos de onda, permitindo a passagem apenas daqueles que irão gerar o sinal desejado (Fig. 5.4). Dessa forma, a qualidade e o estado desses filtros devem ser sempre verificados.



Componentes hidráulicos, ópticos e digitais do citômetro de fluxo. Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto



cores de fluorescência são geradas ao mesmo tempo, note que os filtros ópticos separam e direcionam cada cor de fluorescência para o detector pertinente. Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

5.4. Fluorocromos

Fluorocromos ou fluoróforos (Fig. 5.5) são moléculas que, quando excitadas pelo comprimento de onda adequado, emitem fluorescência (Fig. 5.6). Cada fluorocromo é excitado por um comprimento de onda específico, absorvendo energia e emitindo essa enegia em outro comprimento de onda, maior (ou seja, com menor energia) e também específico. Isso gera uma coloração e intensidade particulares. Graças à larga utilização dessas moléculas, conseguimos evidenciar as mais diversas estruturas celulares, além de mapear de maneira mais precisa vias bioquímicas e moleculares nas células.



Fig. 5.5 Exemplo de uma molécula de fluorocromo: fórmula estrutural do isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

Atualmente, existe uma ampla variedade de fluorocromos com propriedades essenciais para o desenvolvimento das aplicações em citometria de fluxo (Tabela 5.1). Porém, cabe destacar o problema da utilização conjunta de fluorocromos que emitam o mesmo comprimento de onda (nesse caso, não seria possível separar o que seria a marcação específica de cada fluorocromo). Como alguns citômetros conseguem avaliar várias fluorescências simultaneamente, grandes esforços têm sido dirigidos à pesquisa de novos fluorocromos que possuam espectro de emissão diferente dos habituais, gerando nos últimos anos avanços consideráveis nesse campo.

Molécula	Pico de Excitação (nm)	Pico de Emissão (nm)
FITC	490	520
TRITC	580	604
TR	596	620
Ficoeritrina (PE)	480-565	578
APC	650	660
Hoestch 33342	340	450
DAPI	350	470
Brometo de etídio	510	595
lodeto de propídio	536	623

Tabela 5.1. Alguns dos principais fluorocromos utilizados em citometria de fluxo

5.5. Separação celular por citometria de fluxo: "Cell Sorting"

Além de analisar a morfologia e a fluorescência das células, alguns citômetros são capazes de separar fisicamente subpopulações celulares, utilizando qualquer um desses parâmetros como critério de seleção. A separação celular (*cell sorting*) depende de características bioquímicas e/ou morfológicas das células. Uma vez purificadas, estas células podem ser até re-cultivadas. O princípio físico do *sorting* se baseia em vibrações na *"flow cell"* que geram gotas a partir da suspensão contendo células (Fig. 5.7). No interior de cada gota, encontra-se uma célula que recebe a carga elétrica (positiva ou negativa) conforme os critérios de seleção, previamente estabelecidos. Por fim, essas gotas são defletidas para diferentes tubos ao passar entre duas placas carregadas eletricamente.



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

5.6. Aplicações da citometria de fluxo no estudo do tráfego de vesículas

A citometria de fluxo é uma ferramenta fundamental para o estudo de biologia celular, sobretudo no âmbito da análise fenotípica subpopulacional. Como exemplo, temos uma ampla gama de ensaios que podem ser realizados para caracterização da modulação de proteínas, receptores ou enzimas, dentre tantas outras moléculas.

Estudos do tráfego de vesículas por citometria de fluxo têm sido largamente desenvolvidos, a fim de caracterizar a dinâmica molecular de proteínas, tais como, a clatrina ou caveolina, importantes para a formação de vesículas endocíticas. Outros estudos utilizando inibidores de citoesqueleto têm sido amplamente difundidos para a compreensão da cinética e dos mecanismos de formação de vesículas intracelulares. Caracterização de moléculas previamente descritas em vesículas, em modelos como células de mamíferos ou de organismos ainda pouco estudados (p. ex. protozoários e fungos), representa outro importante exemplo da aplicação da técnica de citometria.

Finalmente, são muitas as perspectivas da utilização da citometria de fluxo no estudo de biologia celular. Em estudos de sistemas complexos, como a via endocítica, faz-se imprescindível o uso de uma ferramenta quantitativa populacional tão poderosa como esta.

CITOMETRIA DE FLUXO | Cap. 5

6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

RUBEM F. S. MENNA-BARRETO

6.1. Histórico

Há vários séculos (a partir do século IV a.C.), o ser humano anseia por conhecer o invisível, por enxergar além do alcance do olho nu. Com esse intuito, surgiram os primeiros microscópios ópticos. Entretanto, ainda apresentavam grandes limitações. O Homem continuou querendo ver o detalhe mais de perto. Com o advento da microscopia eletrônica, na primeira metade do século XX, essa busca pelo invisível deu um grande salto.

No início do século XX, cientistas estudavam o comportamento ondulatório dos elétrons, culminando na invenção da televisão, e dentre outros equipamentos, o microscópio eletrônico. Depois de inúmeras tentativas, Bush conseguiu no ano de 1926, alinhar um feixe de elétrons em uma lente especial, eletromagnética. Dando continuidade às experiências de Bush, um cientista alemão chamado Ernst Ruska (1906-1988) construiu o primeiro microscópio eletrônico em 1931, recebendo o Prêmio Nobel por sua contribuição à ciência na década de 80. Algum tempo depois, já era possível encontrar esses microscópios comercialmente.

Entretanto, existem duas modalidades principais de microscópios que utilizam feixes de elétrons para produzir imagens ampliadas dos mais diversos materiais: os microscópios eletrônicos de transmissão (MET) que dependem do feixe eletrônico atravessar as amostras, e os microscópios eletrônicos de varredura (MEV) onde o feixe "varre" a superfície das amostras, assim como um escaner comum de computador. O grande poder de resolução dos microscópios eletrônicos, é que permite avaliar estruturas sub-celulares, representando uma vantagem sobre a microscopia óptica (Fig. 6.1).



Fig. 6.1 Imagens do MET (A) e MEV (B). Imagens: Wendell Girard-Dias

6.2. Princípio

Assim como existe um tamanho mínimo dos objetos que podemos ver a olho nu, essa mesma condição se repete para os diversos tipos de microscópios. A variável determinante de qualquer modalidade de microscopia é o seu limite de resolução. Por resolução entende-se a menor distância entre dois pontos, onde conseguimos distingui-los separadamente. O cálculo da resolução eletrônica é baseado na seguinte fórmula:

$$d = \frac{0.61 \times \lambda}{\alpha}$$

d = limite de resolução λ = comprimento de onda da radiação (0,37 Å para elétrons) α = abertura da objetiva em radianos (0,5 = 0,01 rad)

Dessa forma, a resolução dos microscópios eletrônicos é bem superior a dos microscópios ópticos, devido ao menor comprimento de onda dos elétrons. Após calcular matematicamente, observa-se que o limite de resolução dos microscópios eletrônicos é de 2,2 Å, bem superior ao limite da microscopia de luz que é de 0,2 mm, cerca de 100.000 vezes maior. Ao compararmos os microscópios óptico e eletrônico, observamos que são muito parecidos em seus componentes básicos, sendo ambos constituídos por uma fonte de energia e um conjunto de lentes que levarão à formação da imagem. Dentre as diferenças, podemos destacar principalmente: (**a**) A *fonte* de energia que na microscopia óptica é luz visível e na microscopia eletrônica é o elétron; (**b**) A maioria dos microscópios eletrônicos trabalha com alto *vácuo* no interior das suas colunas; (**c**) As *lentes* na microscopia de luz são de vidro, e são eletromagnéticas na microscopia eletrônica; (**d**) A *espessura do material* é muito maior na microscopia de luz (da ordem de micrômetros - µm), e de nanômetros (nm) na microscopia eletrônica.

Com relação à microscopia eletrônica, outra característica importante refere-se ao *feixe de elétrons*. Quando se aquece o filamento de tungstênio, os elétrons são liberados formando um feixe, que é concentrado por lentes eletromagnéticas. Esse feixe, presente tanto no MET quanto no MEV, após interagir com o espécime é responsável pela geração da imagem (Figs. 7.1, 7.2).



Fig. 6.2

Esquema comparativo da formação da imagem nas microscopias óptica e eletrônica de transmissão.

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

6.3. Microscópio eletrônico de transmissão

Nesse tipo de microscópio, a imagem formada deriva da passagem do feixe de elétrons através da amostra. As aplicações da microscopia eletrônica de transmissão em amostras biológicas são diversas permitido, dentre várias possibilidades, as análises de pequenas estruturas celulares, como organelas, por exemplo (Fig. 6.3).





6.3.1. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de transmissão

Os microscópios eletrônicos tanto o de transmissão quanto o de varredura, geralmente funcionam sob alto vácuo dentro de suas colunas. O vácuo é fundamental nesses equipamentos para que os elétrons não sofram desvio e se mantenham em feixe. Entretanto, para que amostras biológicas permaneçam no vácuo, é necessária a realização de toda uma preparação especial desse material, objetivando a preservação das estruturas celulares. A preparação das amostras pode ser realizada por métodos físicos, como o congelamento ultrarrápido, ou químicos, que empregam reagentes químicos geralmente à temperatura ambiente, sendo a metodologia comumente mais utilizada, a qual será abordada neste capítulo.

Na fixação química, as células precisam ser tratadas com substâncias que estabilizem as membranas bem como, todos os demais componentes celula-

res. Essas substâncias são chamadas de fixadores sendo os mais utilizados o paraformaldeído e glutaraldeído. Após a incubação com um desses fixadores primários, a amostra deve ser tratada com um segundo tipo de fixador, o tetróxido de ósmio, que preserva e proporciona contraste aos lipídios das células, em uma etapa chamada pós-fixação (Fig. 6.4). Terminada esta etapa de pós-fixação, a água no interior das amostras é substituída por solventes orgânicos, como o etanol e a acetona, durante a desidratação. A desidratação permite que as amostras sejam impregnadas lentamente em resina plástica, que resistam ao bombardeamento do feixe eletrônico, e posteriormente possam seguir para a etapa de emblocamento em pequenas formas. Após o endurecimento da resina (polimerização), esses blocos são fatiados em equipamentos chamados de ultra-micrótomos. Como não é possível colocar os cortes tão finos (cerca de 100 nm de espessura) diretamente no equipamento, estes são recolhidos em pequenas grades de metal (Fig. 6.5) para que sejam analisados no microscópio eletrônico de transmissão. Os cortes ultrafinos depositadas nas grades são submetidos a um processo chamado de contrastação, onde metais pesados como o chumbo (afinidade por membranas) e o urânio (afinidade por DNA), permitem a melhor visualização das estruturas celulares.



transmissão.

Imagem: Wendell Girard-Dias



6.4. Microscópio eletrônico de varredura

Como já foi discutido, nesse microscópio o feixe de elétrons percorre toda a superfície da amostra, como o escâner acoplado ao computador. É diferente a interação dos elétrons com as diferentes amostras ou regiões da amostra, originando pontos mais ou menos brilhantes que formarão a imagem. Quando comparamos os componentes dos microscópios eletrônicos de transmissão e varredura, observamos que em ambos o feixe de elétrons é formado a partir de um filamento de tungstênio aquecido. A diferença básica é que no MET, os elétrons precisam atravessar a amostra, enquanto no MEV, a superfície do material é varrida completamente, extraindo elétrons secundários, gerando um sinal luminoso que é convertido na imagem (Fig. 6.6).



6.6 Imagem do protozoário Trypanosoma cruzi em MEV. Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

6.4.1. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura

A grande maioria dos estudos por microscopia eletrônica de varredura visa a análise detalhada na superfície da amostra, seja esta um fio de cabelo, um inseto ou uma célula, ou qualquer tipo de amostra biológica. O material a ser observado no MEV não precisa ser fatiado, sendo o procedimento de preparo das amostras diferente do procedimento para o MET, a partir da desidratação do material. O processamento inicial envolve incubações em fixador e pós-fixador, a remoção da água (desidratação) uma vez que estes equipamentos funcionam em alto vácuo o que não permite o contato com materiais hidratados (Fig. 6.7). Para isso, as amostras passam por série crescente de agentes desidratantes como a acetona, etanol ou metanol, e depois esses solventes orgânicos são substituídos no interior das células por gás carbônico. Esta substituição é realizada em um equipamento chamado de ponto crítico. Por fim, a amostra é transferida para outro aparelho chamado de metalizador, onde será feito um revestimento da amostra com uma fina camada de um elemento condutor, geralmente ouro ou carbono, para a geração do sinal a ser captado pelos detectores do microscópio. É interessante dizer ainda que veremos a seguir, um tipo de microscópio eletrônico que foge a regra, não trabalhando em alto vácuo, o que caracteriza assim uma exceção.



Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto e Wendell Girard-Dias

6.5. Outros tipos de microscopia eletrônica

Existem também outros tipos de microscópios eletrônicos, fundamentais para a realização de estudos específicos. Dependendo do preparo da amostra, ou mesmo de acessórios especiais acoplados, esses microscópios nos permitem a obtenção e análise de diferentes tipos de informação. Dentre essas modalidades de microscopia eletrônica, acessórios e técnicas, podemos destacar:

6.5.1. Transmissão de alta voltagem

Microscópio eletrônico de transmissão que possui um feixe de elétrons cuja aceleração é muito superior a do microscópio convencional, chegando até 1000 kV. Esse "super feixe" permite a análise de cortes muito espessos, até 2 µm, cerca de 20x mais grossos que os cortes convencionais.

6.5.2. Microanálise

Esse acessório pode ser acoplado tanto ao microscópio eletrônico de transmissão quanto ao de varredura, permitindo a análise química qualitativa e quantitativa das amostras, através da perda de energia dos elétrons ou por detecção de raios-X da amostra. A localização, bem como a detecção de elementos químicos fundamentais para as células, é muito importante para o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos.

6.5.3. Varredura de alta resolução

Nessa modalidade de microscopia eletrônica de varredura (Fig. 6.8), o feixe de elétrons é bem mais concentrado que o convencional, o que acarreta em uma varredura muito mais precisa da amostra. Dessa forma, apresenta uma resolução superior ao do microscópio tradicional. Muito importante para o estudo de estruturas celulares de difícil visualização, como os filamentos do citoesqueleto, por exemplo.



Imagem: Wendell Girard-Dias

6.5.4. Varredura de pressão variável (ambiental)

Essa modalidade, não trabalha com o alto vácuo, como as demais técnicas. A pressão variável no interior da coluna permite a análise de células vivas, sem nenhum preparo químico ou físico prévio. Até o momento, estes microscópios ainda apresentam baixo poder de resolução.

6.5.5. Criofratura

Técnica utilizada para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, que permite estudos mais aprofundados sobre a distribuição de macromoléculas por exemplo, proteínas e lipídios presentes nas membranas biológicas. A criofratura, desenvolvida na década de 60, se baseia no congelamento ultrarrápido das células, interrompendo o metabolismo celular instantaneamente, preservando melhor a distribuição espacial das suas estruturas. Depois de congeladas, as células são "fraturadas ao acaso". Desses fragmentos são feitos moldes em platina, que irão ser observados no microscópio de transmissão (Fig. 6.9).



6.6. Aplicações da microscopia eletrônica na biociência e saúde

As microscopias eletrônicas de transmissão e varredura apresentam uma enorme gama de aplicações na área da biologia celular e saúde. Especificamente no estudo do tráfego de vesículas, a microscopia eletrônica de transmissão se mostra uma ferramenta importante, sobretudo para estudos morfológicos descritivos e/ou de localização molecular. Destacam-se para este tipo de estudo, a utilização de traçadores da via endocítica como a albumina sérica bovina (BSA), a transferrina e a lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de imunomarcações objetivando a detecção de moléculas bem como, as suas co-localizações em determinadas estruturas dinâmicas (Fig. 6.10).

Vários estudos de componentes do citoesqueleto têm sido realizados por microscopia eletrônica de transmissão, visando sugerir a possível cinética de interação dessas estruturas com vesículas no interior nas células. Análises por MEV da interação patógenos-hospedeiro, como *Trypanosoma cruzi* e células cardíacas por exemplo, também são frequentes.

Apesar da microscopia eletrônica representar uma importante ferramenta nos estudos de endocitose e do tráfego de vesículas é fundamental termos a noção de que na maioria das vezes é necessária a associação de diferentes técnicas para se comprovar uma hipótese, sendo que essas várias metodologias devem ser complementares, aplicando-se assim, a microscopia correlativa.



Fig. 6.10 Imagens de endocitose de transferrina acoplada a partículas de ouro coloidal (seta).

Imagens: Rubem F. S. Menna-Barreto

7. ANEXO

CYNTHIA M. CASCABULHO

7.1. Anticorpos

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas que se ligam especificamente aos antígenos. Essas moléculas são produzidas pelos linfócitos B e têm papel fundamental na proteção contra patógenos, atuando na homeostasia e no seu desbalanço, como por exemplo, em processos alérgicos e doenças auto-imunes. Além disso, pelas suas propriedades, que serão descritas mais a frente nesse capítulo, podem ser utilizadas como ferramentas de extrema importância na pesquisa científica.

7.2. Linfócitos B

Os linfócitos B são células do sistema imune, apresentando papel importante na imunidade adquirida e recebem esse nome por terem sido descritos inicialmente em um órgão presente nas aves chamado *Bursa de Fabrícius*. Em humanos, a produção dessas células inicia-se ainda no período fetal. Durante a 8º e 14º semanas de gestação, os responsáveis pela fabricação desses linfócitos são o fígado fetal e o omento. Posteriormente, a medula óssea assume esse papel que se mantém por toda a vida do indivíduo.

A medula óssea localiza-se nos ossos chatos e extremidade de ossos longos, e consiste de uma estrutura reticular encontrada entre trabéculas. Essas trabéculas são preenchidas com células gordurosas, células estromais e precursores de células sanguíneas. Dentre esses precursores, encontram-se as células progenitoras linfóides que darão origem as diferentes subpopulações de linfócitos, incluindo os linfócitos B. Os linfócitos B, diferentemente dos linfócitos T, que migram para o timo ainda imaturos, saem da medula óssea completamente maduros e migram para os órgãos linfóides periféricos ou secundários. Os principais órgãos linfóides periféricos são o baço, linfonodos e tecidos linfóides associados às mucosas (MALT). O baço é um local de extrema importância para as respostas imunes aos antígenos transportados pelo sangue. Esse órgão é dividido em polpa branca, constituída por tecido linfóide, e polpa vermelha, constituída por células de origem mielóide e eritróide. Os linfonodos são responsáveis pelas respostas imunes aos antígenos transportados pelo longo dos vasos linfáticos por todo corpo e possuem áreas ricas em linfócitos B, chamadas de folículos. Os folículos primários contêm inúmeros linfócitos B virgens, ou seja, que nunca entraram em contato com o antígeno. Já os folículos secundários aparecem em resposta à estimulação antigênica e são ricos em células B ativadas, produtoras de anticorpos. As placas de Peyer localizam-se na mucosa do trato gastrointestinal e também possuem regiões ricas em linfócitos B.

Os linfócitos B nos órgãos linfóides periféricos são capazes de interagir com antígenos. Cada linfócito B apresenta especificidade para um determinado epítopo de um antígeno. O epítopo é a porção do antígeno capaz de desencadear uma resposta imune. Um mesmo antígeno pode ser composto por vários epítopos distintos, assim como pode apresentar vários epítopos idênticos. Caso esse linfócito encontre o epítopo do antígeno pelo qual apresenta especificidade, inicia-se uma fase de proliferação ou expansão clonal, na qual cada linfócito origina muitos outros com a mesma especificidade. Após essa etapa, inicia-se a fase de diferenciação, na qual esses linfócitos B ativados darão origem a células secretoras de anticorpos, os plasmócitos. Esses plasmócitos produzirão anticorpos com afinidade pelo epítopo do antígeno responsável pela sua ativação. Dessa forma, em uma resposta imune, há geração de diferentes clones de linfócitos B com produção de anticorpos com diferentes especificidades.

7.3. Localização dos anticorpos

Nas células B, os anticorpos são encontrados no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e na superfície celular onde atuam como receptores de antígeno. Os anticorpos secretados são localizados no plasma e fluidos extracelulares, como secreções mucosas e líquidos intersticiais.

7.4. Estrutura dos anticorpos

94

As moléculas de anticorpo apresentam características estruturais comuns, mas exibem uma grande variabilidade na porção que se liga ao antígeno. Os anticorpos são

constituídos por quatro cadeias polipeptídicas. Duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas (Fig. 7.1). Uma cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por pontes dissulfeto e as duas cadeias pesadas são também ligadas entre si pelo mesmo tipo de ligação. Essas cadeias leves e pesadas apresentam unidades homólogas repetidas com aproximadamente 110 aminoácidos que formam um domínio globular chamado de domínio da imunoglobulina (domínio Ig) (Fig. 7.2). Inúmeras proteínas importantes para o sistema imune possuem domínios semelhantes aos da imunoglobulina e por isso são pertencentes à superfamília das imunoglobulinas. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas dos anticorpos possuem regiões variáveis e regiões constantes (Fig. 7.1). A região variável de uma cadeia leve se une à região variável de uma cadeia pesada para formar o sítio de ligação ao antígeno. Cada clone de linfócito B produz anticorpos com a mesma região variável e, sendo assim, reconhecem a mesma sequência antigênica (epítopo). As regiões constantes não participam da ligação ao antígeno. Elas interagem com outros elementos do sistema imune, tendo um importante papel na função biológica do anticorpo, como por exemplo, fagocitose e ativação do sistema complemento. De acordo com as estruturas das regiões constantes da cadeia pesada, os anticorpos podem ser divididos em isotipos. As imunoglobulinas são atualmente classificadas em 5 isotipos: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Em humanos, encontramos ainda 4 subtipos de IgG e 2 subtipos de IgA. Um isotipo apresenta sempre a mesma região constante na cadeia pesada, independente do clone de linfócito B que o produziu. Os 5 isotipos apresentam diferentes estruturas. A IgM é pentamérica, a IgA é dimérica e os isotipos IgG, IgE e IgD são monoméricas. Além disso, IgM e IgD são encontrados na forma associada a membrana celular do linfócito B onde atuam como receptores de antígeno. O isotipo IgD, ao contrário dos demais isotipos, raramente é encontrado sob a forma secretada.



das por pontes dissulfeto.

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

A molécula de anticorpo pode ainda ser dividida em porção Fab e porção Fc (Fig. 7.3). A região Fab consiste das cadeias leves e parte das cadeias pesadas. É essa porção que interage com o antígeno. Já a porção Fc consiste apenas de uma parte da região constante das cadeias pesadas e não interage com o antígeno, mas sim com outras células e moléculas efetoras do sistema imune.



Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

7.5. Anticorpos como uma ferramenta na pesquisa científica

A habilidade dos anticorpos de se ligar a epítopos de diversas moléculas biológicas constitui uma ferramenta de grande importância na pesquisa. Três características dos anticorpos estão envolvidas com o reconhecimento do antígeno: especificidade, afinidade e avidez. A especificidade refere-se à capacidade do anticorpo de reconhecer um epítopo específico, distinguindo diferenças na sua estrutura, mesmo que pequenas. Anticorpos com alta especificidade apresentam menor probabilidade de reação cruzada com outros antígenos. Afinidade e avidez são características referentes à força de ligação do anticorpo ao antígeno. A afinidade refere-se à força de ligação do anticorpo a um único epítopo do antígeno e a avidez refere-se à intensidade de ligação entre anticorpos e um antígeno multivalente, ou seja, apresentando múltiplos epítopos. A avidez é influenciada pela afinidade do anticorpo, pelo número de sítios de ligação do anticorpo ao antígeno e pela geometria resultante da interação antígeno-anticorpo. A IgM, por ser um anticorpo pentavalente, apresenta maior avidez pelo antígeno do que a IgG que é monovalente. Além das características descritas acima, também é de grande importância o conhecimento se um dado anticorpo é proveniente de uma resposta policlonal ou monoclonal. Como descrito anteriormente, cada clone de linfócito B produz anticorpos com a mesma especificidade, ou seja, que reconhecem o mesmo epítopo do antígeno. Porém, a maioria dos antígenos apresenta múltiplos epítopos e são capazes de ativar linfócitos B com diferentes especificidades, gerando inúmeros clones de linfócitos B. Cada clone apresenta especificidade para um epítopo distinto. Os anticorpos produzidos por esses vários clones de linfócitos B são chamados policlonais, pois são provenientes de uma resposta policlonal. Sendo assim, anticorpos policlonais são aqueles que se ligam a diferentes epítopos de um mesmo antígeno. Por outro lado, os anticorpos monoclonais são aqueles produzidos por um único clone de linfócitos B, logo reconhecem um único epítopo do antígeno.

Abaixo descreveremos o processo de produção desses anticorpos para utilização na pesquisa científica.

7.5.1. Produção de anticorpos policlonais

A produção de anticorpos policionais requer a imunização de animais, normalmente mamíferos, com o antígeno de interesse. A escolha da espécie de animal que será imunizada é relevante e deve ser feita com cautela. Quanto maior o animal, maior será a quantidade de anticorpo obtida, uma vez que uma maior guantidade de soro poderá ser obtida devido a maior volemia do animal. Os animais mais utilizados são o coelho, a cabra e o carneiro. A qualidade da resposta imune e a produção de anticorpos também variam com a espécie utilizada e pode requerer diversas imunizações com o antígeno de interesse. Após a estimulação com o antígeno, o animal irá desenvolver uma resposta imune e produzirá plasmócitos que secretam anticorpos contra o antígeno alvo. O soro desses animais será coletado e os anticorpos purificados. Nesse caso, obtemos anticorpos policionais, ou seja, um conjunto de anticorpos com diferentes especificidades. Ainda que o antígeno que serviu para inocular o animal de laboratório seja bastante puro (ex. proteína purificada), o soro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra as diferentes porções daquela proteína, uma vez que uma única proteína pode possuir diversos determinantes antigênicos (epítopos).

7.5.2. Produção de anticorpos monoclonais

Assim como descrito para os anticorpos policlonais, a produção de anticorpos monoclonais também requer a imunização de animais, normalmente mamíferos, com o antígeno de interesse. Porém, para a produção de anticorpos monoclonais o tamanho do animal não influencia na quantidade de anticorpo obtida. Nesse caso, o camundongo é o animal mais comumente utilizado. Para a produção desse tipo de anticorpo, imuniza-se um animal de laboratório com o antígeno de interesse e isola-se seus linfócitos B de órgãos linfóides periféricos. O órgão mais frequentemente utilizado é o baço. Uma vez que linfócitos B não proliferam indefinidamente, precisam ser fusionados com células que tenham a capacidade de proliferação infinita e por isso são chamadas de linhagens celulares imortalizadas. A linhagem celular imortalizada de escolha para a produção de anticorpos monoclonais é a de células de mieloma, uma neoplasia de plasmócitos. A fusão dos linfócitos B obtidos do baço de animais imunizados com o antígeno de interesse com as células de mieloma formará os hibridomas. Os hibridomas, neste caso, são células secretoras de anticorpos que proliferam indefinidamente. Em seguida, faz-se então a seleção de hibridomas que secretem anticorpos com a especificidade desejada. Há duas formas de crescer esses hibridomas secretores dos anticorpos de interesse: injetando essas células na cavidade peritoneal de camundongos ou utilizando técnicas de cultura celular in vitro. As células de hibridoma injetadas na cavidade peritoneal de camundongos se multiplicam e produzem um fluído na cavidade abdominal do animal. Esse fluído é chamado ascite e contém uma grande concentração de anticorpos com a especificidade desejada (monoclonais). Uma alternativa a técnica de ascite é o cultivo dos hibridomas em placas com meio de cultura. O crescimento dos hibridomas in vitro apresenta benefícios como uma menor utilização de camundongos, porém é uma técnica que requer grande conhecimento, consome mais tempo e gera mais custos.

7.5.3. Aplicações de anticorpos no estudo de tráfego de vesículas

Esses anticorpos monoclonais ou policlonais, após purificação, podem ser acoplados a outras moléculas como fluorocromos, enzimas ou ouro coloidal. São essas moléculas acopladas aos anticorpos que permitirão a detecção da proteína ou antígeno de interesse em diversos modelos experimentais. Um anticorpo acoplado a fluorocromo, por exemplo, pode ser empregado em técnicas como imunofluorescência e citometria de fluxo. O anticorpo acoplado a ouro coloidal é de grande importância em técnicas como imunocitoquímica ultraestrutural. Já o acoplado a enzima é utilizado em técnicas como imunohistoquímica, *Western blotting* e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). A utilização de fluorocromos e ouro coloidal acoplados a anticorpos foi descrita nos capítulos 4, 5 e 6. Com relação às enzimas conjugadas aos anticorpos, as mais utilizadas são a peroxidase e a fosfatase alcalina. A detecção do antígeno nesse caso, se faz pela adição do substrato específico da enzima, que será degradado por ela, gerando um precipitado colorido. No local onde o precipitado se formou está o antígeno de interesse.

A técnica para revelação de antígenos mais utilizada é um sistema composto por dois anticorpos, um primário e um secundário: o primeiro anticorpo se liga à proteína de interesse e o segundo anticorpo se liga ao primeiro. Isso permite a detecção da proteína alvo nos diversos sistemas de estudo (Fig. 7.4). Neste caso, o segundo anticorpo é acoplado a um fluorocromo, ouro coloidal ou enzima. Para o estudo do tráfego de vesículas, podemos utilizar, por exemplo, um anticorpo contra clatrina acoplado a ouro coloidal, fluorocromo ou peroxidase. Dessa forma podemos detectar a formação de vesículas endocíticas revestidas por essa proteína utilizando técnicas como microscopia de fluorescência ou eletrônica de transmissão.



plado a fluorocromo.

100

Imagem: Rubem F. S. Menna-Barreto

8. Referências Bibliográficas

Abbas AK (2003). Imunologia Celular e Molecular 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Revinter.

Abedin M, King N (2008). The premetazoan ancestry of cadherins. Science 319: 946–948.

Aderem A, Underhill DM (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 17: 593-623.

Aguilar, R.C., Boehm, M., Gorshkova, I., Crouch, R.J., Tomita, K., Saito, T., Ohno, H., Bonifacino, J.S (2001). Signal-binding specificity of the m4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. J Biol Chem 276: 13145–13152.

Aguilar, R.C., Ohno, H., Roche, K.W., Bonifacino, J.S (1997). Functional domain mapping of the clathrin-associated adaptor medium chains m1and m2. J Biol Chem 272: 27160–27166.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2004). Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre Editor Artes Médicas Sul Ltda, 4ª ed.

Anderson RG (1998). The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem 67: 199-225.

Anderson RG, Jacobson K (2002). A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-1825.

Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255: 410-411.

Aridor M, Traub LM (2002). Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic* 3: 537-546.

Babuke T, Ruonala M, Meister M, Amaddii M, Genzler C, Esposito A, Tikkanen R (2009). Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. *Cell Signal* 21:1287-1297.

BalusÏka F, Barlow PW, Hauskrecht M, Kubica S Ï, Parker JS, Volkmann D (1995). Microtubule arrays in maize root cells. Interplay between the cytoskeleton, nuclear organization and postmitotic cellular growth patterns. *New Phytologist* 130: 177-192.

Ben Nichols (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. J Cell Sci 116: 4707-4714.

Beningo KA, Wang YL (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* 115: 849–856.

Benlimame N, Le PU, Nabi IR (1998). Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 9: 1773-1786.

Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG (2000). Flow Cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 429-433.

Besterman JM, Low RB, 1983. Endocytosis: a review of mechanisms and lasma membrane dynamics. *Biochem J* 210:1–13.

Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272 (21): 13793–802.

Botos E, Klumperman J, Oorschot V (2008). Caveolin-1 is transported to multivesicular bodies after albumin-induced endocytosis of caveolae in HepG2 cells. *J Cell Mol Med* 12: 1–9.

Bozzola JJ, Russell LD (1973). Electron microscopy. Principles and techniques for biologists. Boston, Jones and Bartlett Publishers Inc., 1992 CLARK, G. Staining Procedures. Baltimore, The Williams Wilkins Company, 3ª ed.

Brewer JM, Pollock KG, Tetley L, Russell DG (2004). Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol* 173: 6143–6150.

Brodsky FM (2012). Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 309-336.

Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 517-568.

Brown DA, London EJ (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 23: 17221-17224.

Butterfield NJ (2000). Bangiomorpha pubescens n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiol* 26: 386–404.

Cai X (2012). Evolutionary genomics reveals the premetazoan origin of opposite gating polarity in animal-type voltage-gated ion channels. *Genomics* 99 (4): 241-245.

Cao H, Thompson HM, Krueger EW, McNiven MA (2000). Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *J Cell Sci* 113: 1993–2002.

Cardaba CM, Kerr JS, Mueller A (2008). CCR5 internalisation and signalling have different dependence on membrane lipid raft integrity. *Cell Signal* 20 (9): 1687-1694.

Carvalho HF, Recco-Pimentel SM (2001). A Célula. Editora Manole Ltda, 1ª ed.

Chadda R, Howes MT, Plowman SJ, Hancock JF, Parton RG, Mayor S (2007). Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic* 8(6): 702-717.

Chadda R, Vishwakarma R, Rao M, Mayor S (2008). Nanoclusters of GPI anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* 135 (6): 1085-1097.

Chichili GR, Rodgers W (2009). Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66 (14): 2319-2328.

Chimini G, Chavrier P (2000). Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nature Cell Biol* 2: E191–E196.

Conner SD, Schmid SL (2003). Regulated portals of entry into the cell. Nature 422: 37-44.

Corrêa JR, Atella GC, Batista MM, Soares MJ (2008). Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytostome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. *Exp Parasitol* 119 (1): 58-66.

Corrêa JR, Atella GC, Vargas C, Soares MJ (2007). Transferrin uptake may occur through detergent-resistant membrane domains at the cytopharynx of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (7): 871-876.

Cotta-de-Almeida V, Bertho AL, Vila-Verde DMS, Savino W (1997). Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Immunol Immunopathol* 82: 125-132.

Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127: 915–934.

Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM (2000). Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell* 11: 3341–3352.

Doherty GJ, McMahon HT (2009). Mechanisms of endocytosis. Ann Rev Biochem 78:857.

Dolan MF, Melnitsky H, Margulis L, Kolnicki R (2002). Motility proteins and the origin of the nucleus. *Anat Rec* 268: 290–301.

Doshi N, Mitragotri S (2010). Macrophages recognize size and shape of their targets. PLoS ONE 5, e10051.

Fadok VA, Chimini G (2001). The phagocytosis of apoptotic cells. Semin Immunol 13: 365-372.

Falcon-Perez JM, Nazarian R, Sabatti C, Dell'Angelica EC (2005). Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3. J Cell Sci 118: 5243–5255.

Feron O, Kelly RA (2001). The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ Res* 2; 88 (2): 129-131.

Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361-366.

Fotin A, Cheng Y, Sliz P, Grigorieff N, Harrison SC, Kirchhausen T, Walz T (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432: 573-579.

Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. J Cell Biol 132 (6): 1011–1023.

Galleti SR (2003). Introdução à microscopia eletrônica. Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35.

Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006). Flotillin-1 defines a clathrinindependent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8: 46-54.

Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849–857.

Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 83: 82–90.

Harder T, Simons K (1997). Caveolae, DIGs and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.

Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* 124: 689–703.

Hinshaw JE (2000). Dynamin and its role in membrane fission. Ann Rev Cell Dev Biol 16: 483–519.

Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A (2004). Analysis of clathrin mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 279:16657–16661.

Ira Mellman (1996). Endocytosis and molecular sorting. Ann Rev Cell Dev Biol 12: 575-625.

Jacobson K, Sheets ED, Simson R (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268 (5216): 1441-1442.

James RC, Whyte, Sean Munro (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* 1;115 (Pt 13):2627-37.

James KD, Ellington AD (1997) Surprising fidelity of template-directed chemical ligation of oligonucleotides. Chem Biol 4: 595–605

Janeway AC (2004). Imunobiology 6^a ed.

Jatta Huotari and Ari Helenius (2011). Endosome maturation. The EMBO Journal 30: 3481–3500

Jaumouille V, Grinstein S (2011). Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 23: 22–29.

Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA (1998). Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* 279: 573–577.

Junqueira LC, Carneiro J (2000). Biologia Celular e Molecular. Guanabara Koogan, 7ª ed.

Kasting JF (1982). J Geophys Res 87: 3091–3098.

Kirchhausen T (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. Ann Rev Cell Dev Biol 15: 705–732.

Kirk DL (2005). A twelve-step program for evolving multicellularity and a division of labor. *BioEssays* 27: 299–310.

Kiss AL, Botos E (2009). Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13 (7): 1228-1237.

Klumperman J (2011). Architecture of the mammalian Golgi. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a005181.

Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision andautocyclization of the ribosomal RNA interveningsequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31:147–57.

Kuhn WR, Atreya SK (1979). Ammonia photolysis and the greenhouse effect in the primordial atmosphere of the earth. *Icarus* 37: 207–213.

Kyrpides NC, Woese CR (1998) Universally conserved translation initiation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 224–228.

Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG (2008). Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS ONE* 3 (7): e2758.

Lanzavecchia A (1996). Mechanisms of antigen uptake for presentation. Curr Opin Immunol 8: 348-354.

Lee E, Knecht DA (2002). Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic* 3: 186–192.

Levental I, Grzybek M, Simons K (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochem* 49 (30): 6305-6316.

Lim JP, Gleeson PA (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* 89 (8): 836-843.

Lindahl T (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362 (6422): 709-715.

Lindner R, Naim HY (2009). Domains in biological membranes. Exp Cell Res 315 (17): 2871-2878.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (1999) Molecular Cell Biology WH Freeman and Company, 4^a ed.

Londei P (2007) Translation. In: Cavicchioli R (ed) Archaea: cellular and molecular biology. ASM Press Washington, pp 175–208.

Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113: 1515–1524.

Machleidt T, Li WP, Liu P, Anderson RG (2000). Multiple domains in caveolin-1 control its intracellular traffic. *J Cell Biol* 148: 17–28.

Malys N, McCarthy JEG (2010). Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell and Mol Life Sci* 68 (6): 991–1003.

Mansy SS, Schrum JP, Krishnamurthy M, Tobée 'S, Treco DA, Szostak JW (2008). Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature* 454: 122–125.

Mansy SS, Szostak JW (2009). Reconstructing the emergence of cellular life through the synthesis of model protocells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 74: 47-54.

Marsh M, McMahon HT (1999). The structural era of endocytosis. Science 9; 285 (5425): 215-220.

Masserini M, Freire E (1986). Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length. *Biochem* 25 (5): 1043-1049.

Mayor S, Pagano RE (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol 8 (8): 603-612.

McGinness KE, Wright MC, Joyce GF (2002). Continuous in vitro evolution of a ribozyme that catalyzes three successive nucleotidyl addition reactions. *Chem Biol* 9: 585–596.

McMahon HT, Gallop JL (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature* 438: 590-596

Melamed MR, Mullaney PF, Mendelson ML (1979). Flow cytometry and sorting. John Wilwy & sons.

Mellman I, Steinman RM (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255-258.

Mesaki K, Tanabe K, Obayashi M, Oe N, Takei K (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* 6: e19764.

Mineo C, Anderson RG (2001). Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. Histochem Cell Biol 116: 109-118.

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150: 1057-1070.

Morlot S, Roux A (2013). Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. Ann Rev Biophys 6; 42: 629-649.

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997). Endocytosis. Physiol Rev 77 (3): 759-803.

Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140 (3): 591–601.

Murata M, Peranen J, Schreiner R (1995). VIP 21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:10339–10343.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10339-10343.

Nakahata N, Ohkubo S (2003). [Lipid rafts and their analytical methods]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122: 419-425.

Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A (1999). Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant m2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J* 18: 2489–2499.

Nicols BJ (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 4: 374–378.

Nakahata N, Ohkubo S (2003). Lipid rafts and their analytical methods. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 122: 419-425.

Orlandi PA, Fishman PH (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141: 905-915.

Palade GE (1953). Fine structure of blood capillaries. J Appl Physiol 24: 1424.

Panse VG, Johnson AW (2010). Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci* 35: 260–266.

Pelkmans L, Bürli T, Zerial M, Helenius A (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118:767–80.

Pelkmans L, Helenius A (2002). Endocytosis via caveolae. Traffic 3: 311–320.

Praefcke GJ, McMahon HT (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133-147.

Prinetti A, Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem* 275 (16): 11658-11665.

Pucadyil TJ, Schmid SL (2009). Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* 325: 1217–1220.

Racoosin EL, Swanson JA (1989). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J Exp Med* 170: 1635–1648.

Racoosin EL, Swanson JA (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. J Cell Biol 121: 1011–1020.

Ricotta D, Hansen J, Preiss C, Teichert D, Honing S (2008). Characterization of a protein phosphatase 2A holoenzyme that dephosphorylates the clathrin adaptors AP-1 and AP-2. *J Biol Chem* 283: 5510–5517.

Ridley AJ (2001). Rho proteins: Linking signaling with membrane trafficking. Traffic 2: 303-310.

Riento K, Frick M, Schafer I, Nichols BJ (2009). Endocytosis of flotillin-1and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J Cell Sci* 122: 912-918.

Riley RS, Mahin EJ (1988). Clinical applications of flow cytometry. ASCP National Meeting. Las Vegas, Nevada.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122 (5): 735–749.

Rohatgi R, Bartel D, Szostak JW (1996). Non-enzymatic, template-directed ligation of oligoribonucleotides is highly regioselective for the formation of 30–50 phosphodiester bonds. *J Am Chem Soc* 118: 3340–3344.

Roitt I, Brostoff J, Male D (2003). Imunologia 6ª ed. Manole.

Rus H, Cudrici C, Niculescu F (2005). The role of complement system in innate immunity. *Immunol Res* 33: 103-112.

Russell MR, Nickerson DP, Odorizzi G (2006). Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 18 (4): 422–8.

Saffarian S, Cocucci E, Kirchhausen T (2009). Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol* 7:e1000191.

Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Cunha e Silva NL (2008). New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microsc Res Tech* 71 (8): 599-605.

Semerdjieva S, Shortt B, Maxwell E, Singh S, Fonarev P (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol* 183: 499–511.

Shapiro HM (1985). Pratical flow cytometry. Alan R. Liss, Inc.

Shock EL, Schulte M (1998). Organic synthesis during fluid mixing in hydrothermal systems. *J Geophys Res* 103: 28513–28528.

Simionescu M, Popov D, Sima A (2009). Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res* 335 (1): 27-40.

Simionescu M, Simionescu N (1991). Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 25: 1–78.

Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. Nature 387 569-572.

Simons K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1 (1): 31-39.

Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex. AP-3. *J Cell Biol* 137: 835–845.

Singer SJ, Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 18;175 (4023): 720-731.

Siv AGE, Kurland CG (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes. Curr Opin Microbiol 2: 535–541.

Sjörtrand FS (1971). Electron microscopy of cells and tissues. Volume I - Instrumentation and techniques. New York, Academic Press Inc. 4^a ed.

Slepnev VI, De Camilli P (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161–172.

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304.

Soares, M.J. & De Souza, W (1988). Cytoplasmic organelles of trypanosomatids. A cytochemical and stereological study. J Submicrosc Cytol Pathol 20: 349–363.

Sonnino S, Prinetti A (2013). Membrane domains and the "lipid raft" concept. Curr Med Chem 20 (1): 4-21.

Sonnino S, Mauri L., Chigorno V, Prinetti A (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiol* 17 (1), 1R-13R.

Steinman RM, Brodie SE, Cohn ZA (1976). Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J Cell Biol* 68: 665–687.

Stenmark, H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol 10 (8): 513–25.

Stuermer CA, Lang DM, Kirsch F, Wiechers M, Deininger SO, Plattner H (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* 2: 3031-3045.

Swanson JA (1989). Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci* 94(Part 1): 135–142.

Swanson JA, Watts C (1995). Macropinocytosis. Trends Cell Biol 5: 424-428.

Swanson JA (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 639–649.

Takemura R, Stenberg PE, Bainton DF, Werb Z (1986). Rapid redistribution of clathrin onto macrophage plasma membranes in response to Fc receptor-ligand interaction during frustrated phagocytosis. *J Cell Biol* 102:55–69.

Tang Z, Scherer PE, Okamoto T (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271: 2255–2261.

Thomsen P, Roepstooff K, Stahlhut M, van Deurs B (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13: 238–250.

Underhill DM, Goodridge HS (2012).Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 15;12 (7): 492-502.

Walde P, Wick R, Fresta M, Mangone A, Luisi PL (1994). Autopoietic self-reproduction of fatty acid vesicles. J Am Chem Soc 116: 11649–11654.

Watts C (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. Ann Rev Immunol 15: 821–850.

Wieffer M, Maritzen, Haucke V (2009). SnapShot: endocytic trafficking. Cell 137 382.e381-382.e383.

Websites:

http://www.microscopyu.com/

http://www.nikoninstruments.com/products.php?n=Microscope_Systems

http://www.olympusconfocal.com/

http://www.olympusmicro.com/

http://www.zeiss.de/micro

http://www.wikipedia.org