

BIOQUÍMICA DAS MEMBRANAS

M. Carlota Proença
Cadeira de Bioquímica
Faculdade de Medicina
1600 Lisboa

Introdução

A célula viva é uma entidade dinâmica onde ocorrem alterações físicas e químicas, que vão desde a auto-reprodução até à auto-degradação. Para que a célula viva possa realizar as suas funções deverá estar, aparentemente, envolvida por uma membrana que permita a separação entre os meios intra e extra-celulares.

O estudo das membranas celulares pode ser abordado de três maneiras diferentes mas convergentes:

- 1 — Em termos da sua anatomia ou estrutura pelo microscópio electrónico.
- 2 — Em termos da sua fisiologia ou funções, isto é como entram e saem substâncias, metabolitos e iões, utilizando ou não energia.
- 3 — Em termos de composição química, ou seja, como é constituída e como essas moléculas se dispõem entre si de modo a realizar diferentes funções.

Qualquer conhecimento científico processa-se através de três passos fundamentais: colecção, classificação e explicação. No caso da química das membranas, ainda se está no estado de colecção.

Nas membranas é possível identificarmos grandes quantidades de substâncias; no entanto, a classificação está sujeita a alterações, dependentes do completo esclarecimento dos factores estruturais funcionalmente significantes. p. ex. porque são constituídas por certas substâncias e não por outras, ou porque estão esses constituintes presentes em determinados tipos de membranas e não em outras.

A química das membranas é complexa, visto que as membranas são estruturas dinâmicas e não estáticas, cuja composição química e arranjo molecular podem ser alterados em determinadas situações.

As células mais complexas dos procariotas apenas têm membranas plasmáticas; em contrapartida, as células dos eucariotas, além de membrana plasmática, apresentam grande variedade de membranas internas, que envolvem e definem os compartimentos subcelulares designados por organelos. No entanto a estrutura básica de todas as membranas é semelhante.

No seu conjunto, as membranas celulares têm a função de protecção, mantendo a integridade do meio interno e, desse modo, permitindo a compartição e regulação dos processos metabólicos; possibilitam ainda o movimento dos metabolitos (comunicação selectiva) entre os dois meios, externo e interno; contribuem para a existência dum equilíbrio interno activo, que responda a todos os tipos de solicitações interiores ou exteriores.

Na membrana plasmática encontram-se receptores de hormonas e outros grupos químicos que, comportando-se como marcadores, permitem a identificação e comunicação das células entre si. Assim, a informação transportada pelas moléculas exteriores chega ao interior celular, através dum sistema de reconhecimento da membrana plasmática.

Depois desta introdução podemos concluir que existem vários «mundos» dentro do grande «mundo» que são as membranas biológicas. Neste trabalho pretende-se rever sumariamente a estrutura e composição químicas das membranas plasmáticas.

1 — Estrutura

O modelo hoje em dia aceite para explicar a estrutura da membrana, isto é a disposição tridimensional dos seus constituintes, baseia-se no mosaico fluído (Fig. 1) proposto por Singer e Nicolson.

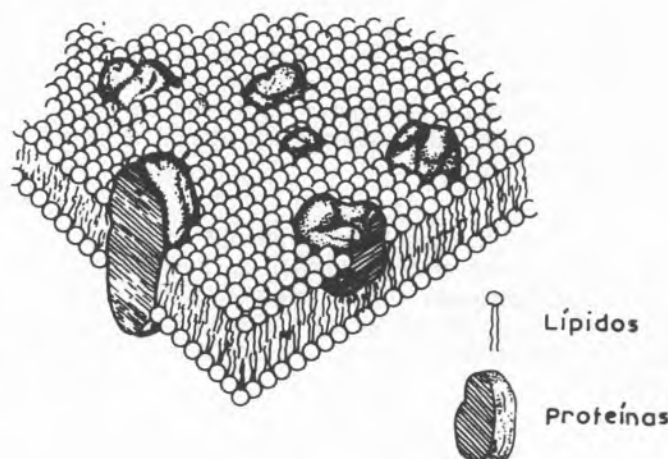


Fig. 1

Representação esquemática tri-dimensional do modelo do mosaico fluído de Singer e Nicolson que traduz a estrutura da membrana celular (Singer e Nicolson, 1972)

Esse modelo considera uma matriz fluída de fosfolípidos organizada na forma de dupla camada descontínua, na qual estão embebidas as proteínas globulares, que mais parecem «icebergs» flutuando num mar de lípidos.

Há no entanto certos postulados desta teoria que convém salientar.

- 1 — As proteínas globulares são estruturalmente assimétricas e anfipáticas. Os resíduos de aminoácidos iónicos, que constituem a zona polar, estão em contacto quer com o citoplasma quer com o meio extracelular, eventualmente ligados a oligossacáridos. As partes apolares das proteínas ficam embebidas no interior hidrofóbico da dupla camada lipídica. A extensão com que esta estrutura anfipática penetra na membrana está sob controlo termodinâmico, determinado pela sequência de aminoácidos e estrutura covalente, de tal modo que a energia livre do sistema, como um todo, é mínima. Poderá haver proteínas que atravessem a membrana de lado a lado. Tudo depende da sequência de aminoácidos e estrutura covalente, de tal modo que a energia livre do sistema, como um todo, é mínima. Poderá haver proteínas que atravessem a membrana de lado a lado. Tudo depende da sequência de aminoácidos, que justifica a existência de proteínas solúveis em meio aquoso e outras ligadas à membrana. As moléculas proteicas que dependem intrinsecamente da disposição, ou melhor, da se-

quência dos aminoácidos, tendem a estar num estado de energia mínima.

No entanto, devemos salientar que a hipótese das proteínas da membrana serem globulares e anfipáticas se aplica restritamente às proteínas que existem em estado monométrico dentro da membrana.

Uma proteína pode constituir um agregado específico dentro da membrana; as subunidades proteicas envolvidas em tais agregados podem não ser anfipáticas unidimensionais.

- 2 — Os fosfolípidos dispõem-se na forma de uma dupla camada com as extremidades polares em contacto com os meios aquoso e citoplasma. As partes não-polares estão orientadas para o interior da dupla camada, fora do contacto da água, constituindo um meio extremamente desfavorável aos compostos hidrossolúveis. A área hidrofílica (constituída pelas extremidades polares dos fosfolípidos), deverá ser constante para cada lípido.

A região dos hidrocarbonetos, no estado fluido, pode assumir conformações diferentes. Todavia, não deve afastar-se da extremidade polar além de determinada distância (comprimento crítico) grosseiramente igual ou menor ao comprimento da cadeia distendida do hidrocarboneto.

- 3 — Considere-se uma dada proteína embebida na massa lípida (Fig. 2a). Esta disposição é termodinamicamente improvável, pois apresenta regiões vazias. Assim, os lípidos terão que se deformar de modo a ocupar essas regiões, em disposição concordante com os postulados atrás mencionados (Fig. 2b).

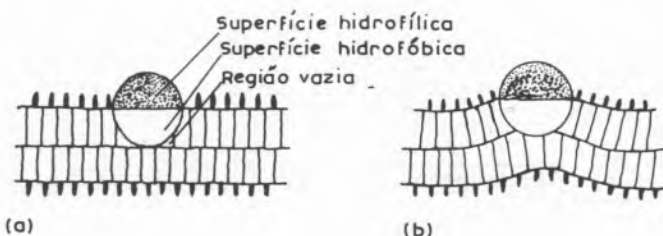


Fig. 2

(a) O esquema representa uma proteína embebida na dupla camada. Esta estrutura não é termodinamicamente possível porque contém regiões vazias. (b) Para evitar as regiões vazias, os lípidos deformam-se de modo a obedecerem às restrições termodinâmicas e de empacotamento (Israelachvili, 1977)

As proteínas não estão livremente embebidas no fluido lípido mas em contacto com as cadeias de hidrocarbonetos dos lípidos adjacentes, com configurações e mobilidades diferentes das restantes cadeias da dupla camada.

A disposição condensada afecta os lípidos das duas camadas de diferentes formas, sendo acompanhadas por entropia configuracional diferentes: os lípidos e as respectivas cadeias de hidrocarbonetos, devido à presença das proteínas, são desviadas das suas posições naturais, ficando com menor entropia configuracional e no estado menos «líquido» (Fig. 3a.). Tal efeito poderá conduzir à interacção entre proteínas vizinhas, induzindo a ejeção dos lípidos para sectores da dupla camada com maior valor da entropia configuracional (Fig. 3b).

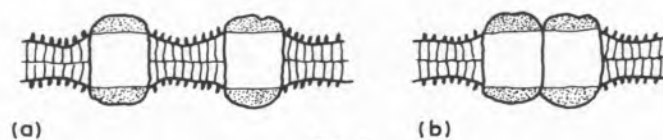


Fig. 3

(a) A presença de proteínas na dupla camada lípida baixa a energia configuracional dos lípidos adjacentes. (b) Tal efeito conduz a uma interacção atractiva entre as proteínas, sendo os lípidos ejectados para zonas da dupla camada onde a entropia configuracional é maior (Israelachvili J. N., 1977)

Para Kruijff e Cols as membranas biológicas seriam compostas por grande variedade de lípidos, sendo difícil conjugar essa diversidade com a disposição em dupla camada; para tal seria suficientemente apenas uma variedade de lípidos. Os fenómenos de fusão e de flip-flop (Fig. 4) também não seriam explicados se todos os lípidos permanecessem em dupla camada.

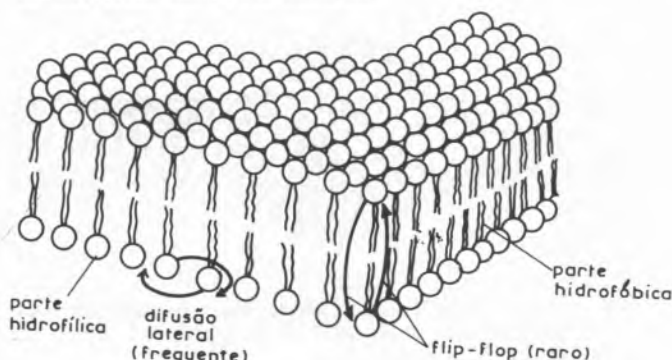


Fig. 4

Dupla camada de fosfolípidos que constituem a matriz estrutural da membrana celular. Cada monocamada é um fluido a duas dimensões na qual os fosfolípidos são livres de difundir lateralmente. A transição dos fosfolípidos de uma camada para a outra (flip-flop) é um processo muito menos frequente que o anterior (Lodis e Rothman 1979)

Os lípidos da membrana quando hidratados podem agrupar-se de diferentes maneiras, constituindo fases distintas.

No diagrama de fase dos sistemas lípidos observa-se, na zona de altas concentrações e altas temperaturas, a fase hexagonal (H_{II}) muitas vezes em equilíbrio com a fase lamelar.

A fase hexagonal é uma estrutura em cilindros infinitamente longos e paralelos uns aos outros, organizados numa rede hexagonal e duas dimensões (Fig. 5).

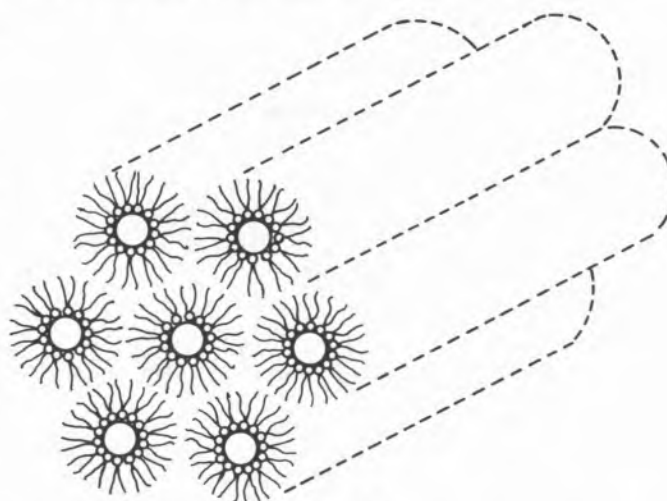


Fig. 5

Representação esquemática da fase hexagonal dos lípidos (H_{II}) constituintes das membranas (Kruijff, Cullis e Verkleij, 1980)

Com o auxílio das técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) com ^{31}P e Raios X, Kruijff e Col defendem a possibilidade de ocorrência de transição, da fase hexagonal (H_{II}) para a dupla camada, quer por variação de temperatura quer por alteração de concentração catiónica. Por exemplo, no caso da fosfatidiletanolamina insaturada pode ocorrer, por aumento de temperatura, uma transição entre a fase de dupla camada a H_{II} , passando por um valor característico da temperatura (T_{BH}), sensível à composição em ácidos gordos.

Uma estrutura em fase hexagonal para os lípidos também não explicará algumas das propriedades das membranas biológicas, tais como a permeabilidade selectiva e a integridade celular. Em alternativa, Kruijff sugere uma estrutura composta pela dupla camada, onde existiriam **partículas lipídicas**, como micelas invertidas (Fig. 6) compatíveis com os fenómenos de fusão e de flip-flop.

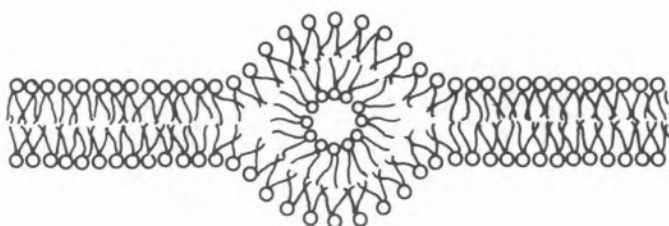


Fig. 6

Modelo de dupla camada lipídica com micelas invertidas (partículas lipídicas), proposto por Kruijff B. e colaboradores, 1980

2 — Composição

A composição das membranas celulares varia com a sua origem; em geral, contém 40% de lípidos/peso seco e

60% de proteínas/peso seco, água, colesterol e iões metálicos.

O colesterol não se encontra em todas as membranas e a proporção lípidos/proteínas varia de membrana para membrana. Por exemplo, na membrana mitocondrial a proporção lípidos/proteínas é 1/1 enquanto nas membranas da mielina atinge a proporção de 9/1.

A explicação mais aceitável é que a membrana da mielina actua como isolador, de forma a excluir substâncias hidrossolúveis que possam interferir com a transmissão dos impulsos nervosos; no caso das membranas mitocondriais admite-se que tenham a função de organizar, no espaço e no tempo, a acção das enzimas associadas ao sistema mitocondrial. Essas enzimas, presentes em grandes quantidades nas mitocondrias, equilibrariam a relação lípido/proteína.

Lípidos

Entre a grande variedade de lípidos habitualmente existentes na membrana celular, os fosfolípidos são os que se encontram com maior frequência. Devido principalmente à sua constituição química, existe grande variedade de fosfolípidos, que diferem entre si no tipo de ácidos gordos e composição da extremidade polar. Em geral, contêm um ácido gordo saturado e outro insaturado que, estando esterificado à molécula de glicerol, forma a parte hidrofóbica do fosfolípido. O terceiro grupo hidroxilo do glicerol liga-se a um grupo fosfato, associado ou não a outras moléculas com carácter hidrofílico. Por exemplo na lecitina, o grupo fosfato une-se a um grupo colina. Outros exemplos encontram-se esquematizados na Fig. 7.

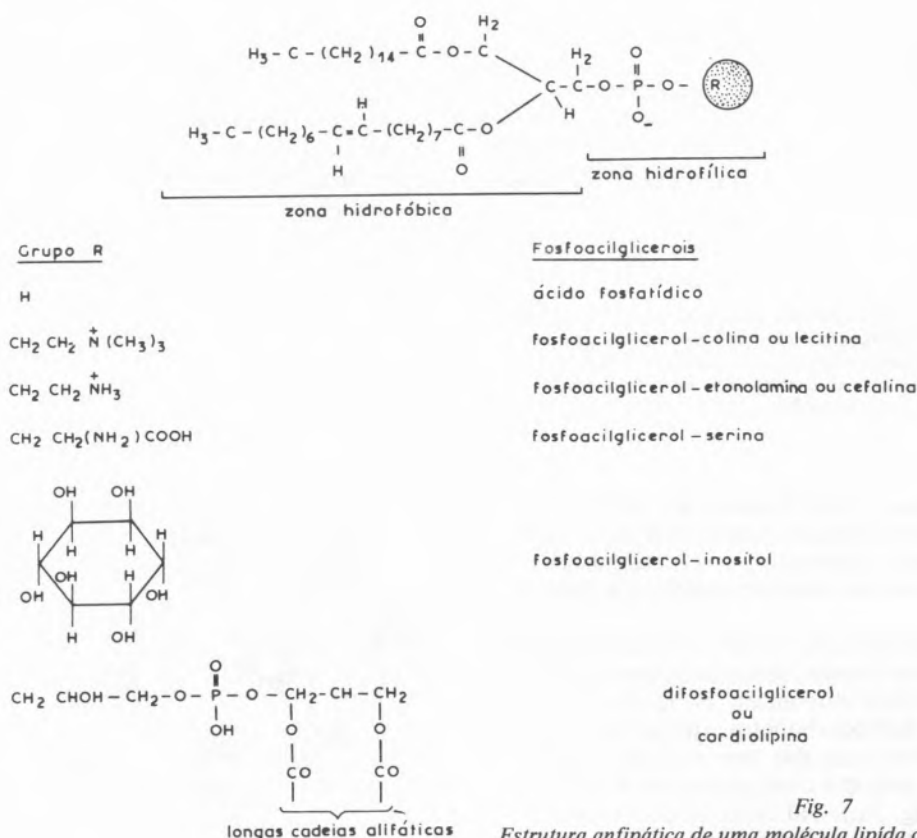
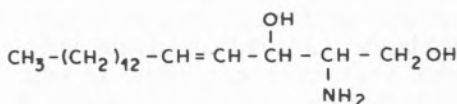


Fig. 7

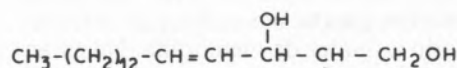
Estrutura anfipática de uma molécula lipídica com a extremidade hidrofílica constituída pela molécula de fosfato e pelo grupo R. Consoante o tipo deste obtêm-se os diferentes fosfo-acilgliceróis. A parte hidrofóbica da molécula lipídica é constituída pelas cadeias dos ácidos gordos

Outra classe de lipídios da membrana são os esfingolípídios, derivados da molécula de esfingosina. De modo geral, a esta molécula liga-se um ácido gordo resultando a molécula de ceramida (Fig. 8).



esfingosina

ácido gordo



ácido gordo



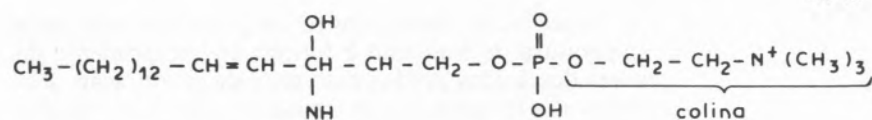
galactose

ácido gordo

Ceramida

ácido gordo

colina



ácido gordo

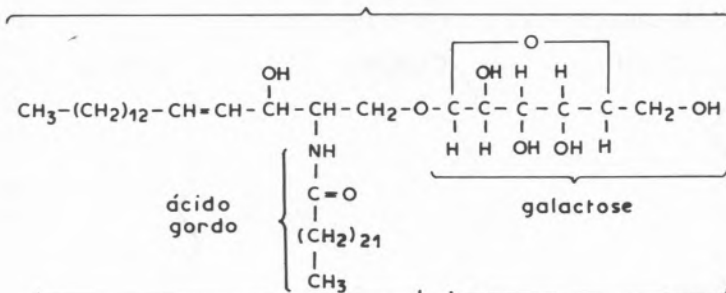


zona hidrofóbica

zona hidrofílica

Esfingomielina

Cerebrósido



zona hidrofóbica

zona hidrofílica

Fig. 8

Esquema que traduz a formação de um esfingolípido (esfingomielina) e de um glicolípido (cerebrósido)

A maior parte das membranas celulares contém grande variedade de lipídios.

Na membrana de mielina predominam os cerebrósidos, fosfatidilenolamina, colesterol e, em menor proporção, a lecitina, esfingomielina e fosfatidilserina. A parte lipídica da membrana eritrocitária é constituída, quase inteiramente, por lecitina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina e, em menor concentração, por colesterol, não contendo esfingomielina nem cerebrósidos.

A (Fig. 9) ilustra os componentes da fração lipídica de várias membranas subcelulares do fígado de rato. Uma explicação para esta distribuição é que os fosfolípidos fazem parte integrante das membranas, não existindo na forma livre, em circulação.

Na mesma espécie animal a composição em ácidos gordos difere marcadamente de tecido para tecido, sendo semelhante para o mesmo tipo de tecido em todas as da espécie consideradas. Por exemplo, as diferenças de proporção dos ácidos gordos entre a membrana do cérebro e pulmões reflectem funções fisiológicas diferentes, inalteráveis dum mamífero para o outro.

Pelo exposto conclui-se que a composição lipídica caracteriza as membranas de determinação órgão. As diferenças encontradas nas várias membranas reflectem funções biológicas bem determinadas.

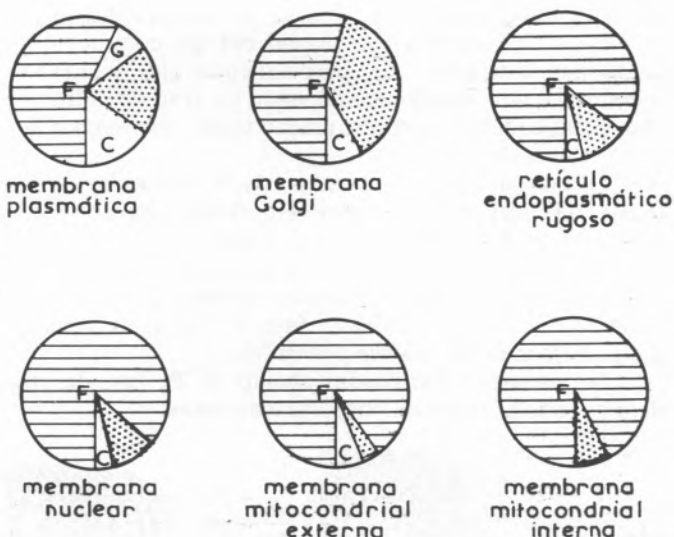


Fig. 9

Composição lipídica em peso das membranas subcelulares do fígado de rato. F = fosfolípido; C = colesterol; G = glicolípido. A zona pontilhada corresponde aos lipídios neutros (Biological Membranes R. Mawson, G. Lunt, ed. Bladric)

Ácidos gordos

Nos ácidos gordos saturados é possibilitada a rotação a nível da ligação simples carbono-carbono, sendo a conformação em «zig-zag» a que apresenta energia mínima.

A Fig. 10 evidencia as conformações de menor energia para o caso das cadeias de ácidos gordos (saturados e insaturados) com uma dupla ligação **trans** ou **cis**. A presença da ligação **trans** na cadeia não provoca grandes alterações quanto ao arranjo espacial da molécula e posterior incorporação na dupla camada lipídica. Em contraste, a ligação **cis** provoca uma alteração na conformação da molécula, com uma curvatura de 30° em relação à posição linear. A incorporação deste tipo de cadeias numa dupla camada tende a torná-la mais fluída.

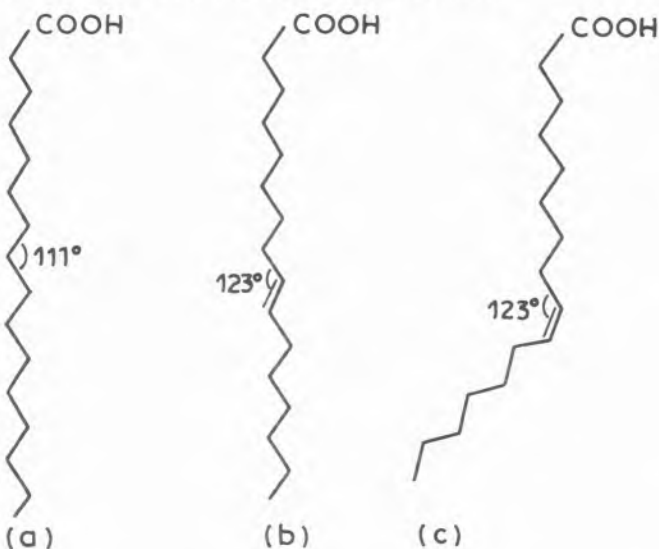


Fig. 10

Conformações de energia mínima de (a) ácido gordo saturado; (b) ácido gordo contendo uma dupla ligação **trans**; (c) ácido gordo contendo uma dupla ligação **cis**.

As cadeias de hidrocarbonetos exibem grande mobilidade a temperaturas fisiológicas; a temperatura mais baixa, os fosfolípidos constituem em gel com regiões cristalinas emergindo da perpendicular do plano da membrana, sob ângulo que depende do grau de hidratação. Estas cadeias, na conformação **trans**, apresentam ligeiras oscilações torcionais.

Quando a temperatura aumenta, o movimento molecular da cadeia de hidrocarbonetos tende a elevar-se até à temperatura de transição (T_i); a este nível ocorre um aumento abrupto do calor de absorção, que dá lugar ao estado líquido cristalino, também chamado fase desordenada ou fluída (Fig. 11). Nesta fase ($T > T_i$) há, em média, duas conformações *gauche* por cadeia.

Em camadas não-fluídas abaixo de T_i , fase de ordem as cadeias estão na conformação **trans**.

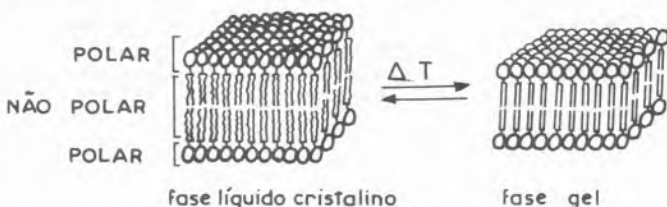


Fig. 11

O esquema representa o comportamento de uma dupla camada homogênea de fosfolípidos numa transição térmica da fase líquido cristalino para a fase de gel

No entanto, mesmo à temperatura fisiológica, é possível que certas regiões da membrana se apresentem no estado líquido cristalino, o que está dependente da natureza dos ácidos gordos e presença de colesterol.

As membranas de mielina e mitocondriais encontram-se ambas no estado líquido cristalino à temperatura fisiológica. Na membrana mitocondrial existem ácidos gordos relativamente insaturados que, como se sabe, apresentam pontos de fusão inferiores aos saturados. A membrana de mielina contém grandes quantidades de colesterol que, aparentemente, mantêm os lípidos no estado fluído e bloqueia a transmissão dos movimentos entre as cadeias dos ácidos gordos.

A introdução de colesterol em camadas não fluídas ($T < T_i$) provoca rotações *gauche* nas cadeias de hidrocarbonetos, aumentando a fluidez da membrana. No entanto, a introdução de colesterol nas duplas camadas lipídicas fluídas ($T > T_i$) diminui a probabilidade de conformação *gauche* até todos se tornarem rígidas na conformação **trans**.

Em certas espécies vivas assiste-se ao reajustamento de composição dos lípidos das membranas, consoante as alterações de temperatura verificadas. Por exemplo, se a temperatura de crescimento da *Escherichia Coli* baixar tende a aumentar a quantidade dos ácidos gordos insaturados na membrana, de forma a manter a fluidez original.

Experiências com vários fosfolípidos mostram que a temperatura de transição é função do comprimento da cadeia dos ácidos gordos e do grau de insaturação. Por exemplo, a temperatura de transição da lecitina hidratada, pode ser superior a 60°C , quando aumenta o comprimento das cadeias de ácidos gordos, ou ser inferior a 0°C , por encurtamento e insaturação das mesmas cadeias. A dipalmitoil-lecitina em condições anidridas funde a 100°C , isto é, passa do estado gel para o de líquido cristalino.

Os lípidos contendo fosfatidiletanolamina têm temperaturas de transição superiores aos que contêm fosfatidilcolina; esta diferença deve-se ao grupo polar mais volumoso (trimetilamónio) da fosfatidilcolina, que, ao provocar o afastamento relativo das cadeias, origina menor interação e, portanto, menor temperatura de transição (Fig. 12).

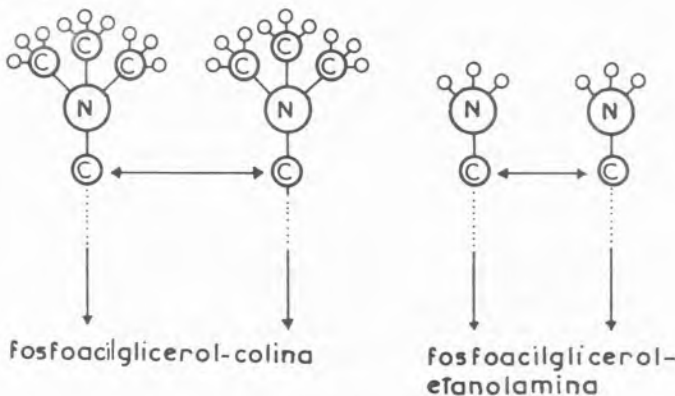


Fig. 12

Modelo esquemático dos grupos terminais do fosfoacilglicerol-colina e fosfoacilglicerol-etanolamina. A distância intercadeias é superior no caso do fosfoacilglicerol-colina, devido à presença do grupo trimetilamónio

No estado líquido cristalino, o glicerol e as extremidades polares dos fosfolípidos, embora tenham mobilidade considerável, permanecem relativamente organizados entre si; todavia, sendo $r = \frac{1}{2}$ a possibilidade de mo-

vimento, o interior da dupla camada torna-se mais fluida que as duas faces expostas ao meio aquoso.

Por aquecimento de misturas binárias de fosfolípidos observam-se dois estados de transição; das duas fases na dupla camada uma, mais sólida e que contém o componente com superior temperatura de transição, coexiste com outra, mais fluida, constituída por fosfolípidos, com menor temperatura de transição (Fig. 13). A separação das duas fases é induzida não só por alterações de temperatura mas também por variações de pH, força iónica ou pela adição de iões, tais como o cálcio.



Fig. 13

O esquema representa uma mistura binária de fosfolípidos com diferentes temperaturas de transição. Como consequência da variação de temperatura ocorre uma separação de fases. (●) Extremidades polares do componente com superior temperatura de transição

Do que foi dito poder-se-á concluir que:

- a temperatura em que as transições e separações de fase ocorrem depende da natureza das cadeias dos ácidos gordos e das extremidades polares;
- a presença de colesterol induz modificações, quer na temperatura de transição quer no grau de fluidez do meio; o colesterol elimina a transição de fase por eliminação do processo cooperativo de fusão;
- apesar de os lípidos no estado líquido cristalino serem bastante móveis e terem difusão lateral rápida, o processo de «flip-flop» permanece muito lento.

Pela interacção de ácidos gordos livres com membranas celulares e com duplas camadas lipídicas, observadas por polarização de fluorescência, foi verificado que os ácidos gordos livres intercalam-se rapidamente naquelas estruturas, produzindo alterações significativas no ordenamento e distribuição das moléculas lipídicas.

Essas alterações podem ser divididas em 2 grupos:

- Grupo A — Os ácidos gordos **cis** insaturados desarranjam o interior das membranas e ordenam as regiões dos grupos polares.
- Grupo B — Os ácidos gordos **trans** insaturados ou saturados, não alteram o interior da dupla camada mas ordenam a região dos grupos polares.

As alterações provocadas na temperatura de transição em função dos tipos dos ácidos gordos permitem concluir que os do grupo A existem no domínio fluido enquanto os do grupo B predominam no domínio do gel; por conseguinte, nas membranas coexistem sectores com natureza fluida e de gel.

Função dos lípidos

As propriedades e fenómenos das membranas, tais como a permeabilidade selectiva, transporte activo ou

passivo, processos de fusão (movimento celular, pinocitose, divisão, adesão e secreção celular) ou de ligação aos receptores estão relacionados, determinados e dependentes da composição e estrutura lipídica.

Os lípidos da membrana funcionam como um solvente muito peculiar, cujas propriedades químicas e físicas (tais como a polaridade vectorial e a fluidez) são determinantes das suas funções. Estas podem ser divididas em dois tipos, um relacionado com as suas propriedades e outro com as interacções específicas lipídico-proteicas.

Os lípidos são os responsáveis pela manutenção da integridade estrutural da membrana; ao adoptarem uma estrutura própria, permitem que as proteínas se encontrem na conformação de energia mínima, estabelecendo óptimas interacções hidrofóbicas com as cadeias alifáticas dos lípidos. Com efeito os lípidos têm dimensões comparáveis às proteínas e as interacções entre ambas as macromoléculas, resultantes da associação das diferentes partes da superfície, influenciam as respectivas funções.

Os lípidos da membrana afectam a actividade de certas enzimas isto é, a sua presença é necessária para a função catalítica. Por exemplo, a ATPase- Na^+K^+ -dependente eritrocitária inactiva-se quando no processo de solubilização se utilizam solventes orgânicos. Estes provocam a hemólise dos eritrócitos alterando-se assim as interacções lípido-enzimas. Também a presença dos fosfolípidos da matriz lipídica na membrana mitocondrial é importante para a realização da transferência electrónica na cadeia respiratória.

Os grupos polares dos fosfolípidos actuam como efectores alostéricos positivos permitindo uma melhor aproximação do ligando (substrato ou cofactor). Tal é o caso da apo- β -hidroxibutirato desidrogenase que necessita de fosfatidilcolina: o cofactor NADH só se liga ao enzima na presença do lípido.

A actividade da actilcolinesterase também depende do conteúdo em fosfolípidos. Consoante a concentração de deoxicolato usado na solubilização, assim haverá maior ou menor remoção de fosfolípidos e, consequentemente, menor ou maior actividade da referida esterase. A matriz lípido-proteica de estrutura micelar favorece o encontro entre o substrato, cofactor (es) e enzimas, menos eficaz num meio unicamente lipídico ou proteico.

Uma outra função celular importante, implícita em tudo quanto se disse, é a compartição imposta pelos lípidos entre o meio extra-celular e o citoplasma.

Em resumo:

- Os lípidos representam uma superfície de ligação para as proteínas, e como tal, podem modular a sua actividade.
- Os lípidos separam dois compartimentos aquosos, permitindo a coexistência de processos que envolvem transferência de iões, como a translocação de Ca^{++} e a fosforilação oxidativa.
- Os lípidos constituem um meio hidrofóbico ou uma interfase de ligações, necessárias para as enzimas do metabolismo lipídico e para as enzimas que difundem na membrana. Os lípidos são ainda necessários para dissolver cofactores, tais como o coenzima Q na mitocondria.
- Os lípidos permitem que as proteínas estejam na conformação própria ou que a adquiram durante o processo catalítico, sendo necessários para a manutenção da vectorialidade proteica.

Efeito dos lípidos na permeabilidade

A difusão passiva de solutos não electrolíticos através da dupla camada lipídica (investigada pela saída de

solutos dos liposomas ou pelo comportamento osmótico dos liposomas após a adição do composto a ser testado) depende sobretudo dos lípidos constituintes. Estes efeitos estão relacionados com a fluidez dos lípidos, dependente do grau de insaturação das cadeias dos ácidos gordos e da presença de colesterol. Para o esclarecimento do modo de acção do colesterol sobre os lípidos vizinhos têm sido feitos estudos abaixo e acima das temperaturas de transição, utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear e fluorescência. Acima das temperaturas de transição, a presença do colesterol modula negativamente a fluidez dos lípidos.

Por aumento da concentração de colesterol e ensaiando abaixo da temperatura de transição, removem-se os principais lípidos endotérmicos.

A natureza estrutural do sistema fosfolípido/colesterol ainda está em discussão, pensando-se que um modelo desordenado (Fig. 14b), em substituição dum complexo 2:1 fosfolípido-colesterol (Fig. 14a), é suficiente para racionalizar os dados existentes.

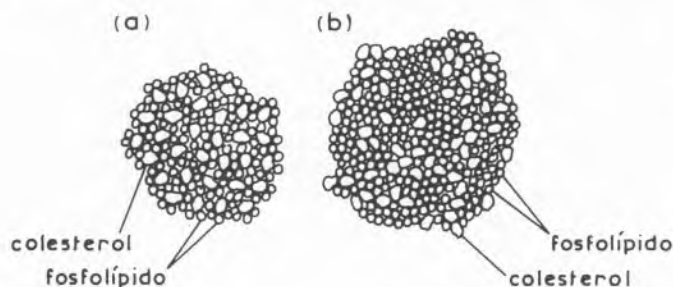


Fig. 14

(a) Arranjo ordenado das moléculas do complexo 2:1 fosfolípido-colesterol. (b) Modelo desordenado ao acaso das moléculas de colesterol e fosfolípidos (Chapman D., Fernandez J. C. G. Gioni F. M., 1979)

Quando em experiências com liposomas, os níveis de colesterol aumentam, a permeabilidade ao glicerol, ascorbato e catiões monovalentes tende a diminuir devido à formação dos complexos fosfolípido-colesterol.

Perto da temperatura de transição de fase dos lípidos verifica-se um aumento dos solutos contidos nos liposomas.

O aumento da permeabilidade perto da temperatura de transição revela alguma selectividade, relativamente às dimensões moleculares do composto penetrante. O grau de permeabilidade depende fortemente do comprimento da cadeia de carbonos das lecitinas saturadas.

O aumento da permeabilidade está relacionada com a separação da fase quando coexistem, na membrana, lípidos sólidos e fluidos. Da perturbação no equilíbrio por variações de temperatura resulta um aumento da saída de soluto; este facto acentua a importância do equilíbrio dinâmico na fronteira das duas fases coexistentes, com vista à formação de poros estatísticos* através dos quais os solutos possam passar.

3 — Proteínas

As proteínas da membrana localizam-se na interfase da dupla camada de fosfolípidos ou nas fases exterior (em contacto com o meio extramolecular) e interior (em contacto com o citoplasma) daquela estrutura.

A concentração e variedades proteicas presentes em cada membrana dependerá da célula onde se encontra. As membranas plasmáticas de muitas células animais podem conter cerca de 10 a 20 proteínas diferentes.

No entanto, outras membranas apresentam composições muito específicas, como, por exemplo, a membrana retinal, que contém uma única proteína, a rodopsina.

As proteínas de membrana são classificadas, geralmente como extrínsecas ou intrínsecas, com base na maior ou menor facilidade com que se dissociam da membrana.

As proteínas extrínsecas são facilmente removidas por solutos com baixa ou alta força iónica. Em contrapartida, as proteínas intrínsecas necessitam dum tratamento mais forte, isto é, as membranas têm que ser submetidas à acção de detergentes ou de agentes caotrópicos para que as proteínas sejam removidas. Mesmo assim, os lípidos aparecem ligados às proteínas intrínsecas neste processo de solubilização, formando os proteolípidos. Estes complexos formam uma classe de proteínas intrínsecas definidas por Folch em 1951 como lipoproteínas hidrofóbicas, solúveis em misturas de clorofórmio/metanol mas insolúveis em água.

Os proteolípidos encontram-se nas membranas mitocondrial, eritrocitária e da mielina e actuam como receptores, iónoforos ou transportadores.

As proteínas intrínsecas penetram, e por vezes atravessam lado a lado, a matriz lipídica. As proteínas extrínsecas estão associadas com as extremidades polares dos lípidos da dupla camada e nalguns casos com as proteínas intrínsecas (Fig. 15). Em consequência desta disposição, será de esperar que os resíduos polares dos respectivos aminoácidos entrem em contacto com as extremidades polares dos lípidos ou com os meios aquosos e citoplasmáticos; entretanto, os resíduos hidrofóbicos dos aminoácidos permaneceriam adjacentes às cadeias de ácidos gordos na dupla camada lipídica.

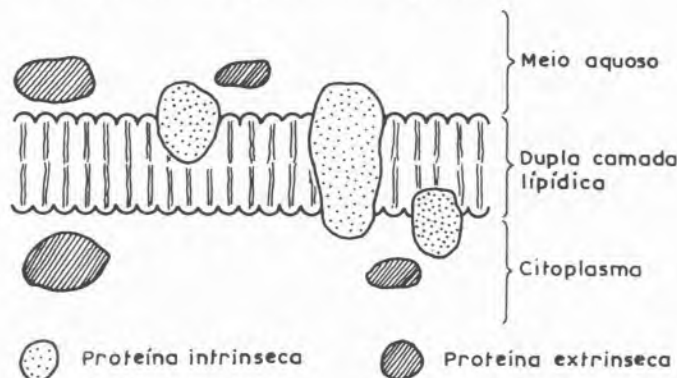


Fig. 15

Representação esquemática da localização das proteínas extrínsecas e intrínsecas na dupla camada lipídica da membrana

As proteínas das membranas dispõem-se frequentemente como complexos. Os mais conhecidos são os da membrana interna mitocondrial, especialmente a citocromo-oxidase e a ATPase. O complexo Citocromo-oxidase consiste em seis ou sete proteínas, quatro das quais são consideradas extrínsecas, de acordo com o critério de solubilidade em água e a reactividade observada como reagentes não penetrantes. Os restantes componentes são hidrofóbicos, localizando-se no interior da membrana.

O complexo ATPase apresenta um componente extrínseco (F₁) saliente para o espaço da matriz, ligado por

(*) Os poros estatísticos são estruturas transitórias resultantes do estado fluido lipídico e do movimento ao acaso das cadeias dos hidrocarbonetos.

uma proteína intermediária a um factor da membrana, composta de quatro subunidades intrínsecas. As subunidades intrínsecas e extrínsecas parecem ser entidades separadas. De facto, os componentes intrínsecos são sintetizados pelo aparelho genético de síntese proteica intramitocondrial, enquanto a síntese das proteínas extrínsecas depende da informação transmitida dos genes nucleares para os ribossomas do citosol.

As proteínas intrínsecas podem difundir lateralmente, rodar ou no plano da membrana (rotação horizontal) ou num plano perpendicular (rotação vertical) (Fig. 16).

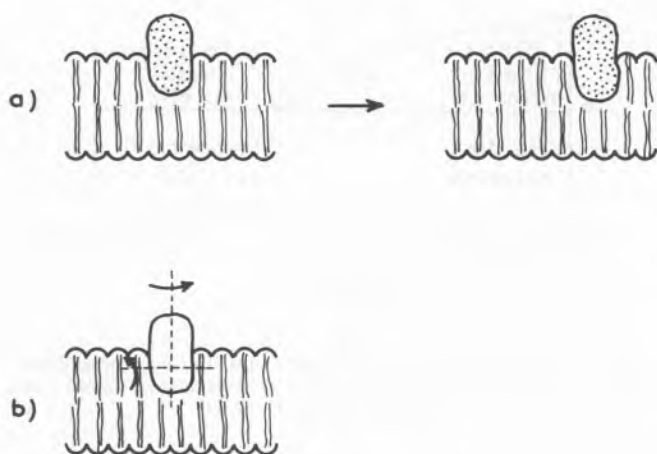


Fig. 16

O diagrama representa os movimentos possíveis de uma proteína intrínseca a) difusão lateral b) rotação horizontal; rotação vertical

Proteínas da membrana eritrocitária

Tendo como base a classificação anterior, é possível distribuir as proteínas da membrana eritrocitária em quatro tipos (Fig. 17).

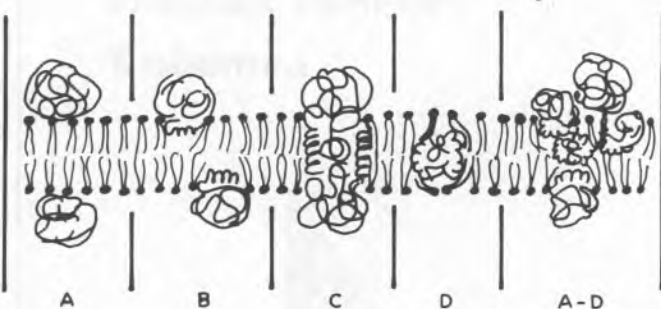


Fig. 17

Esquema mais detalhado da localização das proteínas da membrana que o apresentado na figura 15. A — Proteína extrínseca que interage com os lipídios por ligações polares. B — Proteína intrínseca que apresenta interações polares e hidrofóbicas com os lipídios da membrana. C — Proteína intrínseca que atravessa lado a lado a membrana. D — Proteína incluída na membrana, com interações hidrofóbicas com os lipídios. A-D — Complexo proteico

O tipo A representa as proteínas extrínsecas, de associação fraca à membrana e solúveis em água. As interações com os lipídios são essencialmente polares. A espectrina e a gliceraldeído desidrogenase fazem parte deste tipo.

As proteínas do tipo B são intrínsecas, fortemente ligadas à membrana, não são solúveis em água e apresentam ligações polares e hidrofóbicas com os lipídios. Co-

mo exemplos temos a acetilcolinesterase e a ATPase- Na^+/K^+ -dependente.

O tipo C engloba as proteínas intrínsecas que atravessam a membrana de lado a lado, fortemente ligadas, são também, como no caso anterior, insolúveis em água. As interações com os lipídios são predominantemente hidrofóbicas. Deste grupo fazem parte a glicoporina e a sialoglicoproteína.

O tipo D engloba as proteínas incluídas na membrana (completamente hidrofóbicas) e os proteolípídios.

Esta classificação é um esquema simplificado; na realidade a maior parte das proteínas só parcialmente corresponde a um daqueles tipos, revelando características comuns aos quatro tipos.

Função das proteínas

A diversidade funcional das proteínas confere a cada membrana um carácter particular e distinto.

As proteínas extrínsecas, distribuídas assimetricamente, representam um apoio importante para a fixação das proteínas intrínsecas. Por exemplo, a espectrina forma uma malha na face interna da membrana eritrocitária e está em contacto com a extremidade carboxilica da glicoporina, comportando-se como um elemento limitante do movimento e difusão desta proteína. Dum modo geral as proteínas exercem funções estruturais, catalíticas, transporte, comunicação e transdução de energia.

Sabe-se muito pouco acerca do modo como as proteínas são inseridas na membrana após a síntese intracelular. Um dos processos será a formação de «proteínas pré-membrana» solúveis no citoplasma; após a síntese no citosol, aquelas fracções seriam encaminhadas para a membrana plasmática, onde se fixariam e seriam sujeitas a modificações químicas adequadas. Na sequência dessas alterações determinantes da conformação final, as partes hidrofóbicas da fracção proteica ficariam expostas aos lipídios da membrana. Um outro processo será a formação no local da síntese de vesículas de membrana, posteriormente transportadas até à superfície da membrana, onde difundem. No entanto, este último processo entra em conflito com a assimetria lipídica da membrana.

Interações das proteínas com os lipídios

Como foi referido, as proteínas da membrana estão localizadas de vários modos na dupla camada lipídica. Com excepção das proteínas extrínsecas, as interações lípido-proteínas ocorrem nas áreas hidrofóbicas da membrana, implicando que as proteínas da membrana apresentem regiões hidrofóbicas na sua superfície, de forma a permitir interações apropriadas com as porções dos hidrocarbonetos da molécula lipídica.

Existem três maneiras pelas quais as proteínas podem satisfazer estas necessidades:

- As proteínas da membrana, podem conter uma alta proporção de aminoácidos com cadeias hidrofóbicas.
- As proteínas da membrana, embora mostrando uma composição semelhante às outras proteínas não-associadas à membrana, podem conter segmentos predominantemente hidrofóbicos e outros hidrofílicos, adquirindo características anfipáticas próprias (por exemplo, as glicoproteínas do glóbulo vermelho). O tratamento com enzimas proteolíticas, tais como a tripsina e a papaína, retiram a parte hidrofílica da proteína, deixando um segmento hidrofóbico na membrana.

- A terceira possibilidade poderá ser uma cadeia polipeptídica normal que se enrola formando uma estrutura terciária, com as cadeias hidrofóbicas expostas para o exterior e regiões hidrofílicas no interior.

A fim de considerarmos os efeitos físicos, provocados pelas proteínas intrínsecas na estrutura da dupla camada lipídica, temos que assinalar três pontos importantes. O primeiro relaciona-se com a escala de tempo duma determinada técnica física; assim uma molécula que parece ser rígida numa escala de tempo 10^{-8} s quando ensaiando com ESR, é móvel usando o método de NMR na escala 10^{-5} s. O segundo ponto a ter em conta diz respeito à concentração de proteínas e disposição dentro da dupla camada em estudo. Ao observarmos o plano da dupla camada lipídica concluímos que o aumento da concentração proteica eleva o número de contactos lípido-proteínas. A baixas concentrações proteicas predominam pequenos e simples contactos lípido-proteínas. Em terceiro lugar há que considerar se o sistema lipídico está abaixo ou acima de temperatura de transição; quando os lípidos estão abaixo da temperatura de transição e ocorre uma cristalização, as proteínas são empurradas para fora da rede cristalina.

A forma e tamanho da proteína provoca arranjos falsos na rede, ocorrendo densificações para altos conteúdos da razão preteína-lípido, formando-se misturas eutéticas (Fig. 18).

Os lípidos que se encontram dentro destas densificações não cristalizam, podendo no entanto estar em movimento a temperaturas inferiores às de transição devido à fusão da rede cristalina e consequentemente desagregação das densificações.

Os estudos efectuados com espectroscopia de Laser-Raman revelam que as proteínas intrínsecas provocam

uma redução (na escala de tempo 10^{-4} s) dos isómeros «gauche» das cadeias dos hidrocarbonatos na concentração de 1 polipeptido/200 moléculas lipídicas.

Estudos com sondas fluorescentes indicam que o movimento de sonda é inibido por aumento da concentração proteica, sugerindo que a fluidez do lípido diminui ou que a microviscosidade aumenta.

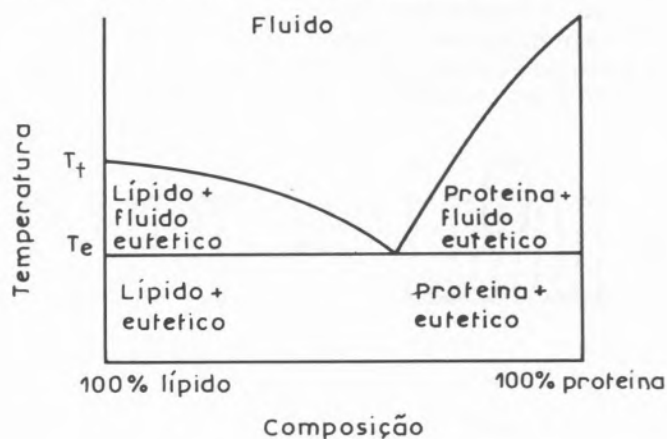


Fig. 18

Diagrama de fase, de misturas lípido-proteínas. T_e é a temperatura eutética e T_t corresponde à temperatura de transição do lípido puro (Chapman D. e Col., 1979)

As interações da proteína com os grupos polares dos lípidos afectam a permeabilidade da membrana. Se considerarmos um fosfolípido adjacente a uma proteína isolada, o efeito de um sobre o outro pode ser grande devido à existência de numerosos grupos polares associados com os outros lípidos, que se encontram em contacto com o lípido. O efeito da proteína no lípido adjacente é assim um efeito a «dois corpos». Neste caso, a fluidez di-

**espectrofotometro
duplo-feixe UV-VIS**

**PERKIN-ELMER
Lambda 3**



REPRESENTADO POR:

instrumentos de laboratório e científicos lda
LISBOA PORTO PONTA DELGADA

minui com o aumento da concentração proteica considerando o estado fluido. Se a concentração proteica aumenta, as proteínas aderem ao lípido, de forma a que o grupo polar deste não fica em contacto com os grupos polares dos outros fosfolípidos mas sim próximo das secções polares das proteínas. Nesta situação o efeito chama-se efeito a «**três corpos**», o que significa que a qualquer temperatura a cadeia lipídica torna-se mais fluida que num sistema puro lípido/água.

Na membrana, os lípidos, proteínas e outros constituintes encontram-se num estado de actividade dinâmica. As cadeias de ácidos gordos estão em movimento rotativo que se transmite cooperativamente. No entanto, esse movimento é diminuído ou bloqueado na presença de colesterol, de tal modo que uma alteração provocada na membrana fica restringida ao local onde ocorre.

As moléculas lipídicas, também em movimento lateral dum lado para o outro (Fig. 4), estabelecem interacções dinâmicas com os iões e moléculas de dentro e fora da célula. A natureza destas acções depende dum certo número de factores, especialmente a natureza de substâncias indutoras e respectivas capacidades de ligação às proteínas da membrana ou a grupos polares dos lípidos. Esse movimento, ao repercutir-se nos lípidos adjacentes, pode baixar a permeabilidade da membrana.

As perturbações provocadas nas forças de ligação entre os vários componentes da membrana podem conduzir à completa ou parcial solubilização da membrana. Através dessas perturbações, provocadas por agentes externos físicos, é possível inferir do modo como se processam as interacções entre os vários constituintes da membrana.

Existe um determinado número de lípidos, de «**fronteira**», que envolvem as proteínas intrínsecas e a elas permanecem ligados no processo de solubilização. A troca entre os fosfolípidos da camada de «**fronteira**» com os da dupla camada livre é muito lenta.

Numa transição térmica, os lípidos de **fronteira** não apresentam variações do estado estrutural, enquanto que os da dupla camada apresentam uma mudança de fase (Fig. 19).

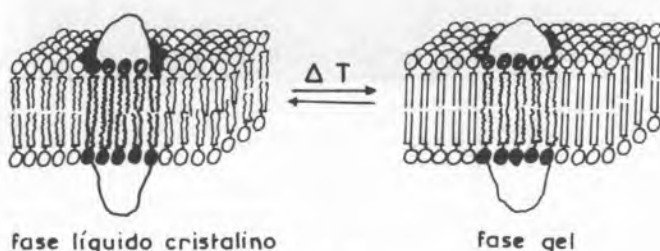


Fig. 19

As camadas lipídicas, que envolvem a proteína intrínseca, estão num estado imobilizado e viscoso, não apresentando uma transição térmica normal. Estes lípidos não têm as mesmas propriedades dos restantes da dupla camada e designam-se por lípidos de fronteira

As proteínas também são capazes de difundir e rodar no meio lipídico fluido (Fig. 16). As demonstrações qualitativas dos movimentos laterais das proteínas provêm de estudos feitos com certos agentes que provocam a agregação das proteínas das membranas.

De acordo com certos autores, a alteração na ordem das moléculas lipídicas tende a provocar a agregação da proteína envolvente.

Cada molécula proteica interfere com a estrutura dos lípidos adjacentes; no entanto, esta perturbação é pequena, provocando uma atracção entre as diferentes proteínas. A agregação proteica resulta do comportamento

termotrópico dos lípidos mas, no entanto, as transições nem sempre causam agregação proteica. A presença de ácidos gordos ramificados e de colesterol evita a agregação das proteínas.

Efeito das proteínas na fluidez dos lípidos

A fluidez dos lípidos é afectada pela presença das proteínas, bem como pelo tipo de interacções estabelecidas entre os dois tipos de macromoléculas.

As proteínas básicas estabelecem fortes ligações electrostáticas com os lípidos, aumentam a entalpia de transição e alteram (ou não) a temperatura de transição. O seu comportamento pode ser mascarado por catiões inorgânicos, tais como o Ca^{++} , devido à imobilização das extremidades polares dos lípidos.

Proteínas, tais como o citocromio C, que promovem ligações iónicas com a dupla camada lipídica, provocam decréscimos da entalpia e da temperatura de transição. Estas proteínas penetram ligeiramente na dupla camada, deformando-se ligeiramente. A alteração de transição está provavelmente relacionada com a reorganização dos grupos polares, por interacções iónicas com os grupos com carga das proteínas em posições fixas, conduzindo a uma menor eficiência na condensação das cadeias lipídicas.

Outras proteínas diminuem a variação de entalpia mas não alteram a temperatura de transição. Estas proteínas penetram completamente na membrana; no entanto, apenas entram em contacto, por ligações hidrofóbicas, com um número restrito de moléculas lipídicas, deixando imperturbável o resto da membrana.

4 — Assimetria dos componentes da membrana

As proteínas extrínsecas e intrínsecas estão distribuídas assimetricamente. As proteínas extrínsecas estão ligadas apenas a uma das faces da membrana; as proteínas intrínsecas estão emersas assimetricamente ou atravessam a membrana de lado a lado, como a glicoporina, cuja extremidade aminada está orientada para o exterior, ligando-se a unidades de glícidos, enquanto a extremidade de carboxilica se projecta para o citoplasma.

Os lípidos da membrana estão também dispostos assimetricamente. Por exemplo nos eritrócitos, existem fosfolípidos de colina, e colesterol na fase externa da membrana e, na fase interna, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina; a lecitina é trocada na monocamada da membrana externa pelos lipoproteínas séricas.

A assimetria dos lípidos está bem demonstrada tanto em trabalhos com vesículas como em membranas naturais.

A razão da assimetria pode ser explicada pela necessidade de acomodar fosfolípidos volumosos e/ou ionizados na face externa da membrana quando esta tem um pequeno raio de curvatura. Pode também haver razões biossintéticas, ou metabólicas que conduzam à assimetria.

Em todas as membranas, a assimetria pode ser devido às propriedades das proteínas permutadoras de fosfolípidos, necessários à distribuição dos mesmos ao longo da membrana celular, após a biossíntese. A troca extremamente lenta dos fosfolípidos entre as duas camadas permite manter a assimetria.

É razoável pensar que a presença assimétrica dos lípidos possa afectar a distribuição das proteínas de dois modos. Pode dar-se o caso de haver afinidade entre uma dada proteína e determinado tipo de lípido. Por exemplo

a β -hidroxibutirato-desidrogenase necessita de lecitina. A ATPase do retículo-endoplasmico, dispensa a presença do colesterol e dos lípidos ácidos, enquanto a mielina tem grande afinidade para o colesterol.

Devido à assimetria química, os lípidos podem estar em diferentes estruturas nas duas metades de membrana e daí a preferência de certas proteínas para certos lípidos. Quando a dupla camada lipídica passa por uma separação de fase, as proteínas são como que expelidas das regiões que se tornaram sólidas para as monocamadas mais fluidas.

A existência e manutenção da assimetria química e estrutural entre as monocamadas das membranas é necessária para a realização das funções celulares e, ao mesmo tempo, uma consequência termodinâmica do modelo de Singer Nicolson.

5 — Glicoproteínas e glicolípídeos

As membranas plasmáticas dos mamíferos contêm glicoproteínas e glicolípídeos.

As glicoproteínas são geralmente proteínas intrínsecas e, como tal, necessitam de solventes orgânicos, detergentes ou agentes caotrópicos para serem solubilizados. Os glicolípídeos podem ser extraídos usando solventes polares e, tal como os fosfolípídeos, movem-se por difusão lateral. Tanto as glicoproteínas como os glicolípídeos dispõem os resíduos glicídicos para o exterior da face externa das membranas celulares.

Não se sabe até ao momento se algumas glicoproteínas da superfície celular actuam como componentes estruturais, aumentando a estabilidade da membrana.

Bretscher sugeriu que a glicoporina da membrana eritrocitária tinha a função de aumentar a rigidez do eritrócito.

O maior obstáculo encontrado para a demonstração do papel estrutural desempenhado pelas glicoproteínas é que estas possam estar envolvidas em interacções dinâmicas com os componentes do cito-esqueleto. Assim, a capacidade da deformação celular poderá ser atribuída a alterações do cito-esqueleto.

Os glicídios estão envolvidos em fenómenos de reconhecimento celular, funções celulares relacionadas com a superfície celular conferindo especificidade a essa estrutura. A existência de glicídios na superfície da membrana eritrocitária permite a classificação dos grupos sanguíneos. O envelhecimento dos eritrócitos é acompanhado pela diminuição do conteúdo em glicídios, mais concretamente em ácidos siálicos. Concomitantemente, ocorre um aumento de D galactose e de N-acetilgalactosamina, que actuam como um sinal de reconhecimento e de eliminação dos eritrócitos semelhantes da circulação. A fracção de ácidos siálicos na superfície celular é importante para a manutenção dos eritrócitos em circulação. Verificou-se também que a remoção do ácido siálico da superfície celular aumentava a deformabilidade da membrana do sarcoma 37. Esta alteração pode ser interpretada como uma rotura das interacções entre as unidades glicídicas, embora se atribua também a uma diminuição da carga total negativa na superfície celular.

Agradecimentos

O autor expressa o seu reconhecimento ao Senhor Chim W. San pelas ilustrações aqui apresentadas.

Este trabalho encontra-se incluído no projecto de linha 2 do CMEL do Instituto Nacional de Investigação Científica.

BIBLIOGRAFIA

- Bretscher, M. S. — Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes *Nature New Biol.* 236:11, 1972.
- Bretscher M. S. — Membrane structure: Some general principles *Science*, 181:622, 1973.
- Chapman D., Gómez-Fernandez J. C., and Goni F. M. — *Febs letters* 98:211, 1979.
- Choy Y. M., Wong S. L., Lee C. T. — Changes in surface carbohydrates of erythrocytes. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 91:2, 1979.
- Harrison, R. M. A. e Lunt, G. G. — «Biological membranes» Blackie e Son LTD, Glasgow 1975.
- Israelachvili J. N. — Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure *Biochem. Biophys. Acta*, 469:221, 1977.
- Karnovsky M. J. — Lipid domains in biological membranes *Amer. J. Pathol.* 92:212, 1979.
- Kruijff B., Cullis P. R. e Verkleij A. J. Non-bioayer lipid structures in model and biological membranes. *Tibs.*, 5:79, 1980.
- Lodish H. F. and Rothman J. E. — The assembly of cell membranes *Sci. Amer.* 240:38, 1979.
- Overath P., Thilo L. e Trauble H. Lipid phase transition and membrane function. *Tibs August*:187, 1976.
- Singer S. J. e Nicolson G. L. — The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720, 1972.
- Singer S. J. — Model of membranes structure. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 195:18, 1972.
- Smith I. C. P. — Organization and dynamics of membrane lipid as determined by magnetic resonance spectroscopy. *Can. J. Biochem* 57:1, 1979.
- Zwaal, R. F. A., Demel R. A., Roeliffsen B. and van Deenen L. L. M. — The lipid bilayer concept of cell membranes. *Tibs*, 5:112, 1976.

À VENDA:



EQUILÍBRIO QUÍMICO E CINÉTICA QUÍMICA

ANA MARIA NETO SIMÕES
RAQUEL MARIA DA CRUZ GONÇALVES

SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA

1983

Preço:

250\$00 sócios — 350\$00 não sócios