

O EFEITO DO EDTA SÔBRE O FLUXO DE ÁGUA DE CÉLULAS DE *Nitella cernua* BRAUN.

ANTONIA LÉLIA G. PICCOLO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro

Revisando a bibliografia, verifica-se que muitos pesquisadores observaram a importância do Ca^{++} em diferentes mecanismos fisiológicos (STRUGGER, 1931; WEBER, 1931, 1934; HEILBRUNN, 1956; e outros). Em relação à fisiologia celular, a conclusão geral é que íons bivalentes como o Ca^{++} , influem de modo a aumentar a resistência mecânica da membrana citoplasmática e diminuem a sua permeabilidade.

Normalmente, as células de *Nitella* possuem Ca^{++} na sua membrana, devido ao $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ existente na água em que vivem. Assim, admitimos que o tratamento unilateral da célula de *Nitella* com uma substância que retirasse o Ca^{++} da membrana, aumentaria a permeabilidade da mesma e poderia causar a saída de água pela área afetada. Esta foi a hipótese de trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

A planta escolhida para as experiências foi *Nitella cernua* Braun, uma alga verde da família Characeae.

As células entrenodais isoladas possuíam em média 12cm de comprimento, 1mm de diâmetro e 110mg de peso.

O ácido etileno diamino tetracético ou EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) é um ácido orgânico complexador de cátions plurivalentes, notadamente do Ca^{++} . Essa substância foi usada para se retirar o Ca^{++} das membranas da célula.

Usamos solução 0,0005M de EDTA, pH = 4,5 a 5,0.

O método desenvolvido no presente trabalho, só recentemente tem sido aplicado em estudos de permeabilidade (ARENS, 1951; DAINITY & HOPE, 1959; DAINITY & GINZBURG, 1963; FENSON & DAINITY, 1963; e outros). Sabemos pela literatura que a maioria dos estudos de permeabilidade foram feitos em tecidos e nos poucos trabalhos onde células isoladas foram usadas, a célula toda sofreu tratamento. Aqui foi feito o estudo da permeabilidade em áreas diferentes de uma mesma célula: comparamos um lado da célula de **Nitella** tratada com EDTA, com o outro lado, não tratado, esperando que porventura houvesse saída ou entrada de água nas duas partes.

Existem poucos estudos desse tipo relativamente à permeabilidade e sobre a ação específica dos agentes usados não existe nenhum.

A extremidade da célula de **Nitella** era tratada com solução 0,0005 M de EDTA (pH = 4,5 a 5,0) durante 5 a 10 minutos.

A célula a ser tratada era colocada verticalmente num tubo de ensaio contendo 4ml de EDTA. Os dois últimos centímetros celulares ficavam na solução. O resto da célula ficava exposto ao ar saturado de água, pois o conjunto permanecia numa câmara úmida para evitar a perda de água da célula. Para delimitar a porção tratada da não tratada, foi enrolado ao redor da célula um fio passado por lanolina; este separava as duas porções e impedia a subida da solução pela superfície da célula. Passados os minutos de tratamento, a célula era retirada e a porção tratada era enxugada cuidadosamente com papel de filtro. Em seguida passava para um conjunto de medição: era formado por um tubo de vidro com saída lateral; este tubo ficava com água de torneira, preso num suporte na posição vertical. Comunicando com a saída lateral havia um tubo fino (3mm de diâmetro) preso em posição horizontal e ficava vazio. A célula era colocada aí, de modo que a porção não tratada ficava no tubo com água e a porção tratada era enfiada no tubo vazio. A porção da célula que ficava entre os dois tubos era bem protegida com lanolina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro cuidado foi o de verificar o comportamento da célula contrôle.

Em oito experiências o resultado obtido foi sempre o mesmo: a célula contrôle nunca perdia água.

Em seguida realizaram-se experiências, tratando a extremidade celular com EDTA: 16 experiências com 10 minutos de tratamento e 4 experiências com 5 minutos de tratamento; o resultado foi, invariavelmente, o seguinte: a célula perdia água unilateralmente pela extremidade tratada e o líquido se deslocava no tubo de vidro.

N.º de Experiências	Minutos de tratamento com EDTA	Resultado	Perda em ml (\bar{x})
4	0	—	—
14	10	+	0,104ml
4	5	+	0,019ml

Tabela I — Efeito do tratamento unilateral da célula de *Nitella cernua* Braun com EDTA, durante tempo variável.

— não saiu líquido.

+ saiu líquido.

Demonstra que a célula não tratada com EDTA, não perde líquido, enquanto que a tratada, sem exceção, o elimina. Nos primeiros experimentos não medimos o volume de líquido excretado da célula, só o fazendo nos últimos experimentos. Consideramos êsses resultados uma prova cabal de nossa hipótese acima formulada.

Admitindo que a saída de líquido era devido a um efeito reversível, podia-se admitir a volta da permeabilidade ao estado normal,

pela substituição dos íons de Ca^{++} . Para provar a nossa hipótese, as extremidades celulares tratadas com EDTA sofreram pós-tratamento com soluções de CaCl_2 . Nessas experiências as extremidades da célula eram tratadas durante 10 minutos com EDTA; e em seguida, a mesma extremidade sofria tratamento com solução de CaCl_2 , 0,0005 M durante 30 ou 60 minutos. Com 30 minutos de permanência na solução de Ca^{++} , ainda saía líquido da célula. Com 60 minutos de tratamento, não notamos eliminação de líquido.

Os resultados demonstram que o efeito da quelação do Ca^{++} pelo EDTA é reversível quando este íon for de novo administrado à célula. Também YOSHIDA, KENICHI & FUJISAWA (1962) conseguiram reverter o efeito do EDTA em cortes de cérebro, através do Ca^{++} . A extremidade celular volta à sua permeabilidade normal e em consequência não perde mais líquido, embora as células contiuem túrgidas.

N.o de experiências	Minutos de tratamento com EDTA	Minutos de tratamento posterior com CaCl_2	Resultado	Perda em ml (\bar{x})
4	10	30	+	0,017
4	10	60	—	—
4	5	50	—	—

Tabela II — Efeito do tratamento unilateral da célula de *Nitella* com EDTA e pós-tratamento com solução de CaCl_2 , durante tempo variável.

— não saiu líquido.

+ saiu líquido.

Segundo a teoria de DANIELLI a membrana citoplasmática ou plasmalema é formada por duas camadas monomoleculares de lipídeos. Esses filmes de ácidos graxos, quando de carga negativa, podem ser alterados antagonicamente por cátions mono e bivalentes como K^+ e Ca^{++} . Estes cátions podem ligar-se a fosfolipídeos ou

ácidos graxos da membrana formando sais: os sais de K^+ são solúveis em água e se encontram dissociados, aumentando a permeabilidade da membrana. Os sais de Ca^{++} são insolúveis em água e tornam a membrana mais hidrófoba, mecânicamente mais resistente, diminuindo a permeabilidade.

Tratando as células com EDTA, retira-se o Ca^{++} das suas ligações na membrana citoplasmática. Segundo as leis das massas, a retirada do Ca^{++} da membrana implica na substituição por outros cationtes existentes em maiores concentrações na célula, provavelmente pelo K^+ . Assim há um aumento da permeabilidade para a água e íons, o que explica a saída de água da célula.

BIBLIOGRAFIA

- ARENS, K., 1951 — Contribuição para o conhecimento da absorção e da condução de água nas células de *Nitella cernua* Braun, Tese, Univ. do Brasil, Rio de Janeiro.
- DAINTY, J. & B. Z. GINZBURG, 1963 — *J. Theoret. Biol.* 5: 256.
- DAINTY, J. & A. B. HOPE, 1959 — The water permeability of cells of *Chara australis* R. Br. *Australian J. Biol. Sci.* 12: 136-45.
- FENSON, D. S. & J. DAINY, 1963 — Electro-osmosis in *Nitella*. *Canadian J. of Botany* 41: 685-691.
- HEILBRUNN, L. V., 1956 — *An outline of General Physiology*, 3rd Edition, Philadelphia.
- STRUGGER, S., 1931 — Zur Analyse der Vitalfaerbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. *Ber. D. Deutsch. Bot. Ges.* 49-453.
- YOSHIDA, H., KENICHI & H. FUJISAWA, 1962 — Studies on the change in ionic permeability of brain slices. *Japanese Jour. Pharmacol.* 12(2): 146-55. Illus.
- WEBEL, F. R., 1931 — Plasmolyse und "Surface precipitation reaction": *Protoplasma* 15: 522.
- WEBEL, F. R., 1934 — Plasmalema Zerstoerung und Tonoplastenbildung. *Protoplasma* 21: 424.