

**Programa, Conteúdo e Métodos de Ensino Teórico e Prático da
Unidade Curricular**

Fisiologia Celular

6º Semestre, 3º ano do 1º Ciclo em Biologia

AMÉLIA MARIA LOPES DIAS DA SILVA

Vila Real,

Fevereiro de 2021

**Programa, Conteúdo e Métodos de Ensino Teórico e Prático da
Unidade Curricular**

Fisiologia Celular

6º Semestre, 3º ano do 1º Ciclo em Biologia

AMÉLIA MARIA LOPES DIAS DA SILVA

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia e Ambiente, Escola de Ciências da
Vida e Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real,

Fevereiro de 2021

Relatório sobre o Programa, Conteúdo e Métodos de Ensino e Avaliação da Unidade Curricular de Fisiologia Celular, do curso de 1º Ciclo em Biologia, elaborado para efeitos de prestação de provas para obtenção do título académico de agregado em Ciências Químicas e Biológicas, na especialidade Ciências Biológicas, a que se refere a alínea d) do artigo 4º do Regulamento publicado em Diário da República, Série II, nº 133, em 13 de Julho de 2016, para a obtenção do título de Agregado pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, de acordo com o Decreto-Lei n.º 239/2007, de 19 de Junho.

CONTEÚDO

1. Introdução	1
1.1. Nota Prévia	1
1.2. 1º Ciclo em Biologia na UTAD.....	2
1.3. Enquadramento da Fisiologia Celular no 1º ciclo em Biologia.....	4
2. Funcionamento de Fisiologia Celular	6
2.1. Identificação e Alocação da UC de Fisiologia Celular.....	6
2.2. Atribuição de Créditos ECTS e Distribuição do Tempo Atribuído.....	6
2.3. Objetivos de Aprendizagem e Competências a Desenvolver.....	8
2.3.1. Objetivos de Aprendizagem	8
2.3.2. Competências a Desenvolver no Estudante	10
2.4. Conteúdos programáticos da UC	11
2.4.1. Programa Teórico	11
2.4.2. Programa Prático	14
2.5. Métodos de Ensino/Aprendizagem.....	16
2.5.1. Metodologias do Docente.....	16
2.5.2. Métodos de Docência	17
2.6. Normas e Métodos de Avaliação da UC	19
2.6.1. As normas de avaliação na UTAD	19
2.6.2. Instrumentos de Avaliação	19
2.6.3. Modos de Avaliação	20
2.6.3.1. Critérios mínimos de Admissão a Exame	23
2.6.3.2. Inscrições nos vários momentos de avaliação.....	24
2.6.3.3. Situações especiais:	24
3. Desenvolvimento dos Conteúdos Programáticos	25
3.1. Conteúdos do Programa Teórico	25
3.1.1. 1ª Aula: Apresentação e informações gerais sobre a UC e seu funcionamento	25
3.1.2. Módulo I: Membranas celulares: estrutura e função	26
Tema 1: Organização estrutural e propriedades das membranas celulares	26
Tema 2: Principais componentes membranares (lípidos, proteínas e hidratos de carbono membranares): estrutura, organização e função	27

Tema 3: Fluidez membranar, assimetria lipídica, <i>rafts</i> lipídicos e domínios membranares.....	29
Tema 4: Dinâmica membranar e sua relevância fisiológica.....	31
3.1.3. Módulo II: Transporte de substâncias através da membrana	32
Tema 5: Tipos de transporte, energia para o transporte, coeficiente de partição e potencial de membrana	32
Tema 6: Canais de água: Aquaporinas	33
Tema 7: Difusão de iões através de membranas: canais iónicos.....	34
Tema 8: Modulação farmacológica da atividade dos canais iónicos.....	36
Tema 9: Transporte facilitado e transporte ativo.....	37
Tema 10: Poros artificiais e ionóforos.....	39
Tema 11: Relevância fisiológica do transporte de iões: integração de conhecimentos	40
3.1.4. Módulo III: Citoesqueleto e Motores Moleculares Associados	41
Tema 12: Citoesqueleto: componentes, distribuição e função	41
Tema 13: Motores moleculares associados ao citoesqueleto	43
3.1.5. Módulo IV: Comunicação Celular: sinalização celular e transdução de sinais	44
Tema 14: Componentes essenciais na comunicação entre células: receptores e mensageiros	44
Tema 15: GPCRs: Transdução de sinais e mensageiros intracelulares	45
Tema 16: Receptores associados a canais iónicos.....	47
Tema 17: Receptores com atividade enzimática intrínseca (receptores tirosina cinase).....	48
Tema 18: Papel do ião Cálcio como segundo mensageiro intracelular.....	49
Tema 19: Papel do óxido nítrico (NO) como mensageiro celular.....	50
Tema 20: Acoplamento estímulo secreção: Transporte de vesículas e exocitose.....	51
3.1.6. Módulo V: Morte Celular Programada.....	53
Tema 21: Características e importância fisiológica da apoptose.....	53
Tema 22: Via extrínseca e via intrínseca da apoptose (papel das caspases) ..	54
Aula 30: Revisões.....	55
3.2. Conteúdos do programa prático.....	56
Aula 1 Informações gerais sobre funcionamento das aulas práticas	56
Aula 2 PL1: Esfingolípidos e grupos sanguíneos (sistema ABO).....	56

Aula 3 PL 2: Determinação da permeabilidade seletiva da membrana de eritrócitos a aniões	57
Aula 4 PL3: Alteração da permeabilidade celular em presença de detergentes	58
Aula 5 TP: Análise e discussão dos resultados dos protocolos anteriores	59
Aula 6 PL 4: Isolamento de <i>ghosts</i>	60
Aula 7 PL 5: Determinação da atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase em <i>ghosts</i>	60
Aula 8 TP: Análise e discussão dos resultados dos protocolos anteriores	61
Aula 9 TP: Introdução à cultura de células.....	62
Aula 10 TP: Métodos para identificação, marcação e quantificação relativa de proteínas: imunocitoquímica e western blot.....	62
Aula 11 PL 6: Detecção da libertação de ATP usando a técnica de luminescência da luciferina/luciferase	64
Aula 12 TP: Análise e discussão dos resultados do protocolo anterior	64
Aula 13 PL 7: Avaliação do dano celular através da atividade da enzima lactato desidrogenase.	65
Aula 14 PL 8: Quantificação do mensageiro celular óxido nítrico (NO)	66
Aula 15 TP: Análise e discussão dos resultados dos protocolos anteriores ..	67
3.2.1.1. Apresentações orais dos trabalhos de grupo.	67
4. Bibliografia Recomendada	69
4.1. Bibliografia Geral (por ordem alfabética)	69
4.1.1. Lista de livros de acesso livre on-line	70
4.2. Bibliografia Complementar	70
5. Desempenho pedagógico	75
5.1. Estatística de aproveitamento escolar.....	75
5.2. Questionário pedagógico para avaliação da UC e do Docente.....	78
5.2.1. Avaliação da UC.....	78
5.2.1. Avaliação do docente com base nos questionários pedagógicos.....	80
Anexo I: Protocolos práticos	83
PL 1: Esfingolípidos e grupos sanguíneos (Sistema ABO).....	85
PL 2: Determinação da permeabilidade seletiva da membrana de eritrócitos a aniões	91
PL 3: Alteração da permeabilidade da membrana plasmática em presença de detergentes	97
PL 4: Isolamento de <i>ghosts</i>	103

PL 5: Determinação da atividade da Na^+/K^+ ATPase em <i>ghosts</i>	109
PL 6: Detecção da libertação de ATP usando a técnica de luminescência da luciferina/luciferase	114
PL 6 – anexo A: Isolamento de células cromafins	121
PL 6 – anexo B: Isolamento de sinaptossomas	123
PL 7: Avaliação do dano celular através da atividade da enzima lactato desidrogenase.....	127
PL 8: Quantificação do mensageiro celular óxido nítrico (NO).....	133
Anexo II: Provas de avaliação teóricas e práticas	141
Anexo III: Resultados dos inquéritos pedagógicos	161

1. INTRODUÇÃO

1.1. NOTA PRÉVIA

O presente documento descreve o Programa, Conteúdo e Métodos de Ensino Teórico e Prático da Unidade Curricular Fisiologia Celular e foi elaborado com o objetivo de prestação de Provas de Agregação na área de Ciências Química e Biológicas, especialidade em Ciências Biológicas, da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente (ECVA), da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), a que se refere a alínea *d*, do Art. 4º, do Regulamento de Provas de Agregação (*Diário da República*, 2.^a série — N.º 133 — 13 de Julho de 2016).

A unidade curricular (UC) escolhida para elaborar o presente relatório designa-se **Fisiologia Celular** e pertence ao grupo das UCs afins da área de Ciências Biológicas (**Biologia e Bioquímica**; Área de Educação e Formação **421** (CNAEF 2004), Portaria N.º 256/2005, de 16 de Março). A UC Fisiologia Celular é lecionada no Departamento de Biologia e Ambiente (DeBA), ECVA, UTAD, fazendo parte dos planos curriculares dos cursos de 1º Ciclo em Biologia e de 1º Ciclo em Bioquímica, o primeiro ancorado no DeBA e o segundo ancorado no DeBA e no Departamento de Química (DQ) da ECVA. De acordo com os planos de estudo em vigor, a Fisiologia Celular está alocada no 6º semestre quer do 1º Ciclo em Biologia (Aviso n.º 14947/2017; *Diário da República*, 2.^a série, N.º 238, 13 de Dezembro 2017) quer do 1º Ciclo em Bioquímica (Aviso n.º 18697/2018; *Diário da República*, 2.^a série, N.º 240, 13 de Dezembro 2018). Apesar desta UC ser lecionada em simultâneo para os dois cursos de 1º Ciclo acima mencionados, o presente relatório da UC Fisiologia Celular é dirigido aos estudantes de Biologia (1º Ciclo), pelo facto deste curso estar ancorado no DeBA (departamento a que a candidata pertence), e pelo facto de a candidata ser a docente responsável (regente) da UC Fisiologia Celular do 1º Ciclo em Biologia.

1.2. 1º CICLO EM BIOLOGIA NA UTAD

A Licenciatura em Biologia (ramo científico) surge na UTAD, no ano letivo de 2002/2003 (Código: 1200/048), com 240 ECTS e quatro anos de duração (despacho n.º 7213/2003, *Diário da República*, 2.ª série, n.º 86, 11 de Abril de 2003). Com a adequação ao Processo de Bolonha (Despacho n.º 13977/2009; *Diário da República*, 2.ª série, N.º 116, 18 de Junho de 2009), este curso passa a designar-se Licenciatura em Biologia, sofre rearranjo curricular, passando a ter um esforço de 180 ECTS e três anos letivos (seis semestres) de duração. A UC de Fisiologia Celular, surge pela primeira vez na UTAD no plano curricular de Licenciatura em Biologia (ramo científico), alocado ao 4º semestre do curso (plano não apresentado neste relatório), com esforço de 5 ECTS. Posteriormente, mantendo a designação e o número total de ECTS do curso, em 2010, ocorreu novo ajuste curricular (Despacho n.º 5271/2010; *Diário da República*, 2.ª série, N.º 57, 23 de Março de 2010), com alterações pontuais de designações de UCs, alocação semestral e esforço em ECTS de UCs, tendo o plano de estudos de Fisiologia Celular transitado para o 6º semestre e passado a comportar 6 ECTS. O último ajuste curricular ocorreu em 2017 (*Diário da República*, 2.ª série, N.º 238, 13 de Dezembro 2017), contudo nem o plano curricular de Fisiologia Celular nem a sua alocação na estrutura do curso sofreu qualquer alteração, relativamente ao anterior. Na Tabela 1 apresenta-se o plano de estudos atualmente em vigor para o 1º Ciclo em Biologia.

Os estudantes de Biologia, ao longo de 6 semestres adquirem conhecimentos e competências em Ciências Biológicas e áreas afins, com destaque para a área de educação e formação em Biologia e Bioquímica (BB)¹, com um total de 126 (de 180) ECTS, em várias temáticas da área, tais como, Sistemática, Biologia Celular, Bioquímica, Genética, Ecologia, Biologia do Desenvolvimento, Ética, Histologia, Fisiologia, incluindo a **Fisiologia Celular**, entre outras; visando a sua preparação para analisar e avaliar problemas de natureza biológica, integrando as suas vertentes científicas, tecnológicas e éticas. Adicionalmente, o plano de estudos ainda visa fornecer um conjunto de competências de carácter transversal, fornecendo aptidões genéricas e aplicadas às Ciências Biológicas, como sejam a Matemática, a Física, e um conjunto de ofertas

¹ Classificação Nacional das Áreas de Educação e Formação, Portaria N° 256/2005, publicado em Diário da República I série-B, N°56 de 16 de Março de 2005.

complementares (na forma de seminários, conferências e workshops) que são oferecidas ao longo do percurso do estudante, visando aumentar e capacitar o estudante nas áreas de comunicação, gestão e trabalho em equipa.

Tabela 1: Plano curricular do 1º Ciclo em Biologia (Aviso n.º 14947/2017, *Diário da República*, 2.ª série — N.º 238 — 13 de dezembro de 2017).

1º Ciclo em Biologia				
1º Ano	1º Semestre	ECTS	2º Semestre	ECTS
	Biofísica	6	Bioestatística e Delineamento Experimental	6
	Biologia Celular	6	Biologia dos Anacordados	6
	Biomatemática	6	Embriologia e Histologia Animal	6
	Geologia.	6	Genética Geral	6
	Química	6	Morfogénese Vegetal	6
2º Ano	1º Semestre	ECTS	2º Semestre	ECTS
	Biologia dos Avasculares	6	Biologia dos Cordados	6
	Bioquímica Estrutural	6	Bioquímica e Metabolismo	6
	Ecologia	6	Fisiologia Vegetal	6
	Evolução e Biodiversidade	6	Genética Molecular	6
	Microbiologia	6	Plantas Vasculares	6
3º Ano	1º Semestre	ECTS	2º Semestre	ECTS
	Bioética e Biossegurança	6	Biologia das Adaptações em Traqueófitos	6
	Biologia e Bioquímica do Solo	6	Biologia das Adaptações em Vertebrados	6
	Fisiologia Animal	6	Fisiologia Celular	6
	Geobotânica	6	Estágio	12
	Opção	6		
OPÇÕES	Enzimologia			6
	Toxicologia			6
	Cultura <i>in vitro</i> de Células Vegetais			6
	Bioinformática e Análise Molecular			6
	Ecologia Aplicada			6
	Anatomia Humana			6
	Reprodução Animal			6

Neste plano curricular os ECTS estão distribuídos, pelas várias áreas científicas, da seguinte forma: Biologia e Bioquímica (BB, 126 ECTS obrigatórios); Ciências da Terra (CT, 6 ECTS obrigatórios); Ciências da Vida (CV, 12 ECTS obrigatórios), Ciências do Ambiente (CA, 12 ECTS obrigatórios), Estatística (E, 6 ECTS obrigatórios), Matemática (M, 6 ECTS obrigatórios), Química (Q, 6 ECTS obrigatórios), e 6 ECTS de Opção numa das áreas BB/CV/CA.

1.3. ENQUADRAMENTO DA FISIOLOGIA CELULAR NO 1º CICLO EM BIOLOGIA

A Fisiologia Celular surge no final da formação curricular do 1º Ciclo em Biologia, *i.e.*, no 6º semestre (2º Sem./3º ano) do curso (Tabela 1). A esta altura, o estudante já adquiriu conhecimentos e competências em Biologia Celular, Biofísica, Bioquímica, Microbiologia, Fisiologia Vegetal e Fisiologia Animal, que lhes servem de base para agora aprofundar e adquirir novos conhecimentos a nível mais específico, como seja o modo de funcionamento e regulação de processos e mecanismos celulares, a **Fisiologia Celular**. Para um estudante de Biologia (e cursos ou áreas afins) o conhecimento dos mecanismos e interações de uma célula com o seu ambiente são fundamentais, enquanto formação básica e avançada. Só conhecendo a normalidade das funções e mecanismos que ocorrem numa célula (fisiologia), bem como a sua regulação, se pode depois partir para estudos mais avançados como sejam as alterações à normalidade, suas causas e consequências e vias associadas; assuntos que já são do âmbito da patologia (patofisiologia), toxicologia, entre outros, a ser tratados em cursos de pós-graduação. Deste modo, na Fisiologia Celular fornecem-se conhecimentos base de estruturas funcionais da célula e interligam-se conhecimentos de forma a entender a célula como um todo, e de como se relaciona com o ambiente que a rodeia.

A Fisiologia Celular é uma unidade curricular transversal a vários domínios da Biologia (desde a Biologia Animal à Biologia Vegetal, e também a Microbiologia), dado que vários mecanismos, e ferramentas de estudo, são partilhados por células procariotas e eucariotas (*e.g.*, mecanismos de estabelecimento de gradientes e a sua utilização para produzir energia). E, também a um nível de organização superior, os conhecimentos adquiridos sobre adesão e comunicação intercelular para células animais podem, de um modo geral, ser transpostas para criar conhecimento e investigação em células vegetais, e vice-versa, como se tem verificado por publicações onde se comparam mecanismos idênticos em células de várias origens (*e.g.* (Sablowski 2010, Wilson, Vogel, and Somerville 1997, Kabbage et al. 2017))². Ainda, a nível da regulação e sinalização celular,

² Sablowski, R. (2004). Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? Trends in Cell Biology, 14(11), 605-611. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.011>
Wilson, I., Vogel, J., & Somerville, S. (1997). Signalling pathways: a common theme in plants and animals? Curr Biol, 7(3), R175-178. doi: 10.1016/s0960-9822(97)70082-4
Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., & Williams, B. (2017). The Life and Death of a Plant Cell. Annu Rev Plant Biol, 68,375-404. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111655

os vários grupos de seres vivos, apresentam vias, mecanismos e moléculas sinalizadoras similares, em modos de ação, funcionamento e, em muitos casos, em estrutura molecular (*e.g.*).

O ensino da Fisiologia Celular iniciou-se na UTAD no ano letivo de 2007/2008, para as Licenciaturas em Biologia e em Bioquímica. Desde a criação/implementação desta UC (na UTAD) até ao presente, a candidata tem sido docente desta UC e tem assumido a regência da UC de Fisiologia Celular lecionada ao 1º Ciclo em Biologia.

No âmbito do ensino desta UC, faz-se interface entre os vários temas propostos no programa e áreas de investigação afins (na UTAD ou fora da UTAD), visando por um lado distinguir a formação e os objetivos de aprendizagem de um estudante de 1º Ciclo em Biologia com a de outros estudantes de áreas afins, e por outro lado motivar os estudantes para a investigação e o ingresso em 2º Ciclos, onde poderão juntar-se a grupos de investigação nas diversas áreas.

Atendendo ao facto de que uma grande parte dos estudantes de 1º Ciclo em Biologia da UTAD procuram um 2º Ciclo em áreas afins, sendo os mais escolhidos, de entre os cursos de Mestrado oferecidos na UTAD, o 2º Ciclo em Biologia Clínica Laboratorial e o 2º Ciclo em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, a UC de Fisiologia Celular fornece os conhecimentos adequados e considerados basilares para algumas UCs destes 2ºs Ciclos, em particular as UCs de Dinâmica Celular e de Dinâmica Celular e Cultura de Células Animais, onde vários temas abordadas em Fisiologia Celular serão depois lecionadas com maior grau de profundidade e pormenor, tal como é exigido num segundo ciclo de estudos.

2. FUNCIONAMENTO DE FISIOLOGIA CELULAR

2.1. IDENTIFICAÇÃO E ALOCAÇÃO DA UC DE FISIOLOGIA CELULAR

Na **Tabela 2**, indica-se a identificação da UC de Fisiologia Celular lecionada ao 1º Ciclo em Biologia, a sua área científica (Biologia e Bioquímica) e número de ECTS, bem como a sua alocação em termos de estrutura orgânica na UTAD.

Tabela 2: Identificação e alocação de Fisiologia Celular na estrutura orgânica da UTAD

Unidade Curricular (UC):	FISIOLOGIA CELULAR
Curso:	Licenciatura em Biologia (1º Ciclo)
Código do curso:	11
Departamento:	Biologia e Ambiente
Escola:	Ciências da Vida e do Ambiente
Carácter:	Obrigatório
ECTS:	6
Área Científica	Biologia e Bioquímica
Duração:	Semestral
Ano/Semestre:	3º /2º (6º Semestre do curso)
Código da UC:	1870

2.2. ATRIBUIÇÃO DE CRÉDITOS ECTS E DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO ATRIBUÍDO

À Fisiologia Celular estão atribuídos 6 créditos ECTS (sigla de *European Credit Transfer and Accumulation System*). A unidade ECTS baseia-se no princípio de que o volume total de trabalho, de um estudante a tempo inteiro, no espaço Europeu, se situa entre 1500 e 1800 horas por ano, a que correspondem 60 créditos (60 ECTS). Pelo que, cada ECTS corresponde a um volume de trabalho entre 25 e 30 horas. Neste sentido, 30 créditos correspondem a um semestre e 20 créditos a um trimestre de estudos. Na UTAD, o cálculo da unidade ECTS considera 27 horas de trabalho do aluno (valor intermédio ao indicado em cima), incluindo horas de contacto com o docente de natureza coletiva e individual (orientação tutorial), horas de trabalho independente e horas dedicadas à avaliação.

Tendo o semestre de 18 a 20 semanas de duração (15 letivas e 3 a 5 de avaliações, incluindo a época especial), as horas de contacto atribuídas para a UC, 30 horas teóricas e 30 horas de práticas-laboratoriais, correspondem a uma carga horária semanal de 2 horas de aulas teóricas e 2 horas de aulas práticas. Segundo a filosofia do processo de Bolonha, o cálculo do esforço total realizado pelo estudante para a UC de Fisiologia Celular descreve-se na **Tabela 3**.

Tabela 3: Distribuição das horas creditadas ao aluno para obtenção de 6 ECTS na UC Fisiologia Celular, tendo em conta os resultados de aprendizagem (RA) nas várias tipologias.

Considerar, tendo em conta os resultados de aprendizagem (RA) nas várias tipologias:												
RA	Horas de contacto com o docente							Horas de Trabalho independente			Horas de Avaliação	Total
Listagem de RA	Coletivas		Lab.	T. de Campo	Seminário	Tutoria	Estágio	Estudo	Trabalho de Grupo	Trabalho de Projeto		
	T	TP										
Total	30		30	-	-	5	-	74	15	-	8	162

Legenda: T, ensino teórico; TP, ensino teórico-prático; PL, ensino prático e laboratorial; Lab., laboratorial

As horas de orientação tutorial envolvem um contacto mais próximo e individualizado com o estudante e são aproveitadas não só para ultrapassar dificuldades específicas de aprendizagem ou lacunas na formação, como também para aconselhar os estudantes relativamente ao método de estudo adequado para esta unidade curricular. Este tempo não é, na prática, limitado, estando o docente permanentemente disponível para atender os alunos, a qualquer hora do dia, excetuando os momentos das aulas, reuniões e atividades de investigação.

Nas atividades designadas por estudo, de trabalho independente, sem a presença do docente, inclui a preparação dos trabalhos práticos e seus relatórios, e o estudo mais refletido das matérias abordadas nas aulas teóricas. O tempo de trabalho independente, 74 horas, definido para esta unidade curricular ao abrigo do acordo de Bolonha, é meramente indicativo, e dependente das lacunas de aprendizagem e necessidades de aprendizagem de cada estudante.

Foram ainda previstas 8 horas para a realização de provas de avaliação contínua e/ou exame final, consideradas o tempo necessário para participar em todos os momentos de avaliação contínua, e a possibilidade/necessidade de ir a exame.

No âmbito do processo de Bolonha, surge um novo paradigma de ensino aprendizagem, em que os Descritores de Dublin aparecem como pontos de referência para

competências gerais e específicas, a adquirir pelo estudante, que para um estudante de 1º ciclo, inclui: i) a demonstração de conhecimentos e sua compreensão, estes na área de estudo/formação do secundária mas suplantando-a; ii) Ser capaz de aplicar conhecimentos e sua compreensão, de modo profissional, pela argumentação e resolução de problemas na sua área de estudo/formação; iii) Ter capacidade para interpretar dados, emitir juízos que incluam reflexão sobre assuntos relevantes de carácter social, científico ou ético; iv) ter capacidade de comunicação a públicos alvo (especializados e não especializados); v) Ter desenvolvido competências de aprendizagem autónoma que permita prosseguir estudos mais aprofundados e com elevado grau de autonomia.

O processo de Bolonha assenta assim em princípios e metodologias de ensino que visam o desenvolvimento de competências individuais, o incentivo e a promoção de autonomia intelectual subjacente ao desenvolvimento de competências que permitam ao estudante a resolução de problemas e o desenvolvimento dum espírito crítico assim como um dinamismo científico. Por outro lado, um ensino interativo que inclua a utilização de métodos de ensino dinâmico é fundamental para o desenvolvimento de competências necessárias para o trabalho em equipa, muito importantes também para a futura vida profissional.

2.3. OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM E COMPETÊNCIAS A DESENVOLVER

2.3.1. OBJETIVOS DE APRENDIZAGEM

O ensino da Fisiologia Celular ao 1º Ciclo em Biologia tem como **objetivos de aprendizagem gerais**:

- Criar no estudante uma imagem dinâmica dos processos que ocorrem a nível celular, centrada na compreensão do funcionamento da célula em ambiente normal (fisiológico) e na integração dos vários mecanismos.
- Criar no estudante o conceito de regulação celular e de que este processo é constante, cooperativo e dinâmico.

- Promover no estudante a aprendizagem de técnicas e metodologias laboratoriais fundamentais para a abordagem celular, associadas à prática de ensaios laboratoriais, através da transmissão de conhecimentos teórico-práticos.
- Criar no aluno espírito crítico de interpretação de situações, mecanismos e correlação entre os vários temas.
- Estimular o trabalho autónomo e o de equipa, colocando à disposição do estudante um conjunto de ferramentas didáticas e várias questões.

- **A nível de conteúdos programáticos**, são ainda objetivos gerais de aprendizagem, dotar o estudante com conhecimentos sobre:
 - Composição da membrana, estrutura dos componentes membranares e sua organização e função.
 - Fluidez membrana e sua regulação.
 - Os vários tipos de transporte membrana e sua relevância na fisiologia e regulação celular.
 - Propriedades elétricas da membrana e conceitos de eletrofisiologia básica.
 - Citoesqueleto, importância na estrutura e dinâmica celular e sua regulação.
 - Proteínas-motor associadas ao citoesqueleto.
 - Comunicação e sinalização celular; mensageiros extracelulares e seus receptores; transdução intracelular de sinais.
 - Relevância do cálcio intracelular e seu papel como segundo mensageiro.
 - Relevância do óxido nítrico na sinalização celular.
 - Transporte e fusão de vesículas (exocitose).
 - Morte celular programada (apoptose) como processo fisiológico.
- **A nível prático**, entre outros, é objetivo desta UC capacitar o estudante com um conjunto de ferramentas (métodos e metodologias), na área da Fisiologia Celular que auxiliem o estudo e compreensão dos conteúdos teóricos e também lhes permitam extrapolar para outras situações, nomeadamente, mais tarde, a nível de um segundo ciclo.

Os **objetivos específicos** dos vários temas serão expostos junto aos conteúdos programáticos.

2.3.2. COMPETÊNCIAS A DESENVOLVER NO ESTUDANTE

As **competências gerais**, que esta UC pretende desenvolver no estudante visam:

- Dotar o estudante de conhecimentos úteis a um Biólogo, independentemente da sua aptidão vocacional para alguma subárea específica da Biologia (*e.g.*, animal, vegetal ou microbiologia).
- Dotar o estudante de conhecimentos específicos a nível de mecanismos celulares proporcionando-lhe uma base sólida para futura abordagem destes temas a um nível de maior especialidade (*e.g.*, em 2º e 3º Ciclos).
- Dotar o estudante com capacidade para:
 - Análise crítica de resultados experimentais.
 - Comunicar, correta e efetivamente, dados e resultados experimentais.
 - Avaliar situações com espírito crítico.
 - Desenvolver o estímulo para trabalho em equipa.

Como **competências específicas**, salientam-se:

- Competências teóricas
 - Dotar o estudante de conhecimento num conjunto de temas da fisiologia celular que lhe permitam inter-relacionar assuntos, discuti-los e analisá-los em outros contextos.
- Competências laboratoriais
 - Obtenção e preparação de material biológico essencial à fisiologia celular.
 - Manuseio de alguns instrumentos/equipamentos laboratoriais.
 - Preparação e manuseio de soluções para ensaios biológicos.
- Competências de expressão escrita e oral
 - Apresentar e discutir dados experimentais.
 - Elaborar relatórios em formato de artigo científico
 - Comunicar ciência, elaborar meios de comunicação e sua apresentação oral.

2.4. CONTEÚDOS PROGRAMÁTICOS DA UC

De acordo com o Regulamento do 1º Ciclo em Biologia, a UC de Fisiologia Celular não exige precedências. Contudo, o programa proposto parte do pressuposto que a esta altura da sua formação o estudante já adquiriu competências e conhecimentos importantes em UCs anteriores (**Tabela 4**) para o sucesso da aprendizagem em Fisiologia Celular. Estes conhecimentos prévios incluem: i) Biofísica de Membranas, onde o estudante adquiriu conhecimento sobre gradientes químicos e eletroquímicos e equações que os definem, interação de solutos com a membrana e conceitos de permeabilidade, entre outros; ii) Organização estrutural da célula relacionando a estrutura dos vários organelos com a função desempenhada e sua contribuição para o funcionamento celular; iii) Estrutura química de biomoléculas, incluindo grupos funcionais e suas propriedades químicas e reatividade; iv) Conceitos básicos de cinética enzimática que inclui cinética de Michaelis-Menten e interpretação do significado das componentes da equação que a descrevem. Ao longo das aulas os estudantes serão lembrados da necessidade e importância em rever determinados assuntos de UCs lecionadas nos anos anteriores. Adicionalmente, é importante que o estudante tenha bons conhecimentos de inglês científico, atendendo a que grande parte da bibliografia, na forma de livros científicos e/ou de artigos científicos, é em inglês.

Tabela 4: Relação de algumas UCs com conhecimentos prévios necessários.

Unidade Curricular (UC):	CONHECIMENTOS PRÉVIOS
Biofísica	Biofísica de Membranas
Biologia Celular	Organização estrutural da célula
Bioquímica estrutural	Estrutura química de biomoléculas
Bioquímica e Metabolismo	Conceitos de cinética enzimática
Enzimologia	

2.4.1. PROGRAMA TEÓRICO

O programa teórico que se propõe para a UC Fisiologia Celular divide-se em cinco módulos, cada uma com vários temas, totalizando 22 temas (**Tabela 5**). Estes temas escolhidos visam fornecer conhecimento ou ferramentas transversais, relevantes para os diferentes tipos de células (animais, vegetais ou mesmo microrganismos) e para as várias funções celulares. Os temas propostos totalizam 28 horas letivas de contacto.

Adicionalmente inclui-se 1 hora destinada à 1ª aula, designada de aula de apresentação, e mais 1 hora destinada a revisões (30ª aula, no final do semestre). Coloca-se a hipótese da existência de um feriado durante o 2º semestre e atendendo a que o semestre tem 15 semanas letivas, caso aconteça a aula de revisão será dada como aula-extra.

Os módulos escolhidos, e a sua ordem de apresentação aos alunos, visam apresentar conceitos de Fisiologia Celular com um aumento de complexidade. No primeiro módulo (membranas celulares: estrutura e função), faz-se referência à estrutura, composição e função dos componentes membranares. Este 1º módulo prepara o estudante para o módulo II (transporte de substâncias através da membrana), fornecendo conceitos sobre a função (fisiologia) da membrana celular, posicionamento e função de proteínas membranares, entre elas a de transporte de substâncias, sobretudo o transporte de iões, muito importante para a função celular. No módulo II (transporte de substâncias através da membrana), abordam-se os vários mecanismos de transporte de iões, exemplificando com a sua função em vários tipos de células, e dão-se algumas noções sobre regulação dos mesmos. No módulo III (citoesqueleto e motores moleculares associados) aborda-se a função do citoesqueleto na integridade da membrana celular e no posicionamento de proteínas (e.g. envolvimento em domínios membranares, e *rafts* lipídicos), complementando e permitindo a integração da aprendizagem do módulo I e II, e fornecem-se bases para os próximos módulos. No módulo IV (comunicação celular), abordam-se mensageiros celular, seus receptores e principais vias de sinalização, este módulo beneficia da aprendizagem já adquirida nos módulos I e II (e em parte do III), pelo facto de requerer conhecimento prévio de proteínas membranares, transporte de iões, e metabolismo intracelular, transporte de vesículas (que requer proteínas motor e citoesqueleto), este módulo permite fazer uma integração de todos os conhecimentos adquiridos na UC, exemplificando com funções de células bem conhecidas pelos estudantes (e.g. neurónios e células secretoras). No módulo V (morte celular programada), tendo em conta vários conhecimentos adquiridos anteriormente na UC (receptores membranares, lípidos membranares, transporte de iões, proteínas cinases, etc.), visa transmitir que a morte celular programada é um processo fisiológico, regulado pela célula com objetivos bem específicos. Visa ainda distinguir a apoptose de outros processos de morte celular, vincando sempre a sua relevância em processos fisiológicos. Com os módulos propostos, os teus temas, e a ordem proposta para a sua apresentação crê-se que o aluno adquire os conceitos fundamentais para conhecer e entender a fisiologia da célula, podendo ser

aplicados a vários tipos de células, e que lhes servirão de base para entender e compreender conceitos mais avançados, em UCs de 2º Ciclo, como seja a Dinâmica Celular, entre outras.

Tabela 5: Programa teórico de Fisiologia Celular e sua planificação.

Aulas/temas:	Horas
Aula 1: Apresentação e informações gerais sobre a UC e seu funcionamento	1,0
Módulo I: Membranas celulares: estrutura e função	
Tema 1: Organização estrutural e propriedades das membranas	1,0
Tema 2: Principais componentes membranares (lípidos, proteínas e hidratos de carbono membranares): estrutura, organização e função	1,5
Tema 3: Fluidez membrana, assimetria lipídica, <i>rafts</i> lipídicos e domínios membranares	2,0
Tema 4: Dinâmica membrana e sua relevância fisiológica	0,5
Módulo II: Transporte de substâncias através da membrana	
Tema 5: Tipos de transporte, energia para o transporte, coeficiente de partição e potencial de membrana	0,5
Tema 6: Canais de água: Aquaporinas	0,5
Tema 7: Difusão de iões através de membranas: canais iónicos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-)	2,0
Tema 8: Modulação farmacológica da atividade dos canais iónicos	0,5
Tema 9: Transporte facilitado e transporte ativo	2,0
Tema 10: Poros artificiais e ionóforos	0,5
Tema 11: Relevância fisiológica do transporte de iões: integração de conhecimentos	1,0
Módulo III: Citoesqueleto e motores moleculares associados	
Tema 12: Citoesqueleto: componentes, distribuição e função	3,0

Tema 13: Motores moleculares associados ao citoesqueleto	1,0
Módulo IV: Comunicação celular	
Tema 14: Componentes essenciais na comunicação entre células: receptores e mensageiros	2,0
Tema 15: GPCRs: Transdução de sinais e mensageiros intracelulares	2,0
Tema 16: Receptores associados a canais iónicos	0,5
Tema 17: Receptores com atividade enzimática intrínseca (receptores tirosina cinase)	1,0
Tema 18: Papel do ião cálcio (Ca^{2+}) como segundo mensageiro intracelular	1,0
Tema 19: Papel do óxido nítrico (NO) como mensageiro celular	0,5
Tema 20: Acoplamento estímulo secreção: Transporte de vesículas e exocitose	1,0
Módulo V: Morte celular programada	
Tema 21: Características e importância fisiológica da apoptose	1,0
Tema 22: Via extrínseca e via intrínseca da apoptose (papel das caspases)	3,0
Aula 30: Revisões	1,0
TOTAL 30 horas	

2.4.2. PROGRAMA PRÁTICO

O programa prático proposto para a Fisiologia Celular inclui oito trabalhos experimentais (PL, de 2 h cada), e seis aulas teórico-práticas (TP, de 2 h cada) que totalizam 28 horas (**Tabela 6**). As 2 h adicionais serão usadas na 1ª aula onde serão dadas informações gerais sobre o funcionamento das aulas práticas, as regras e conduta a assumir pelo estudante na aula prática e indicação do material a trazer para as aulas.

As aulas práticas serão lecionadas a par com as aulas teóricas que, ao longo do semestre, serão essencialmente de carácter experimental/laboratorial (realização de protocolos experimentais, PL, executados pelo estudante com o apoio do docente),

alternando com algumas aulas de índole teórico-prático (6 no total). Estas últimas, serão dedicadas à análise e discussão de resultados obtidos nas aulas laboratoriais anteriores, e/ou serão dedicadas à: i) transmissão de conhecimentos de índole prática, necessários à compreensão da Fisiologia Celular, que pela sua complexidade não serão executados nas aulas práticas, ii) análise de artigos científicos (ou resultados experimentais) de assuntos relacionados com temas da disciplina, sempre que, por algum motivo o protocolo experimental não possa ser realizado. Estas aulas de índole teórico-prática constituem uma forma de estimular a atitude crítica (positiva), a análise/compreensão e interpretação de resultados e uma motivação para que o estudante se concentre durante a realização dos trabalhos práticos. A **Tabela 6** apresenta os temas e a planificação do programa prático proposto para Fisiologia Celular. No início do ano letivo, o estudante terá acesso aos protocolos práticos de cada tema. Estes protocolos, além da planificação experimental, incluem uma introdução teórica fazendo a ponte entre a componente teórica e a componente prática e um questionário, que será respondido pelo estudante durante as horas de estudo, como trabalho independente (ver **Tabela 3**). Os protocolos práticos encontram-se descritos de forma detalhada no Anexo I.

Tabela 6: Programa prático da UC de Fisiologia Celular e sua planificação.

Aulas/temas:		Horas
Aula 1:	Informações gerais sobre funcionamento das aulas práticas; regras condutas a ter nas aulas para a segurança	2
Aula 2	PL 1 - Esfingolípidos e grupos sanguíneos	2
Aula 3	PL 2 - Determinação da permeabilidade seletiva da membrana de eritrócitos a aniões	2
Aula 4	PL 3 - Alteração da permeabilidade celular em presença de detergentes	2
Aula 5	TP - Análise e discussão dos resultados dos protocolos anteriores	2
Aula 6:	PL 4 - Isolamento de <i>ghosts</i>	2
Aula 7	PL 5 - Determinação da atividade da Na^+/K^+ ATPase em <i>ghosts</i>	2
Aula 8:	TP - Análise e discussão dos resultados dos protocolos anteriores	2
Aula 9:	TP - Introdução à cultura de células	2
Aula 10:	TP – Técnica de imunocitoquímica para marcação de proteínas	2

Aula 11: PL 6 - Detecção da exocitose pela quantificação de ATP libertado usando a técnica de luminescência da luciferina/luciferase	2
Aula 12: TP - Análise e discussão dos resultados do protocolo anterior	2
Aula 13: PL 7 - Avaliação do dano celular através da atividade da enzima lactato desidrogenase	2
Aula 14: PL 8 - Quantificação do mensageiro celular óxido nítrico (NO)	2
Aula 15: TP - Análise e discussão de resultados	2
TOTAL 30 horas	

2.5. MÉTODOS DE ENSINO/APRENDIZAGEM

2.5.1. METODOLOGIAS DO DOCENTE

No início do semestre é dada a conhecer aos estudantes (é fornecida), pelo docente responsável da UC, via SIDE (Sistema de Informação de Apoio ao Ensino) a ficha da UC onde consta: i) designação, creditação e composição da equipa docente, ii) horas de contato e sua tipologia, iii) horários da UC bem como o horário de atendimento de cada docente (para ensino tutorial), iv) objetivos e/ou competências a desenvolver, v) conteúdos programáticos, vi) métodos de ensino, vii) modalidades de avaliação; viii) calendário de avaliação (a discutir e a acordar com os estudantes na 1ª aula); ix) a ponderação percentual das diferentes provas de avaliação (regra de cálculo da nota final); x) bibliografia recomendada (Art.º 8, Regulamento Pedagógico (RP) ³).

Os materiais de apoio à docência (*e.g.*, diapositivos das aulas, protocolos experimentais, bibliografia complementar (artigos científicos, em PDF)), são disponibilizados, com a devida antecedência, na zona dos *downloads* da página da UC (SIDE), permitindo ao estudante contactar com o assunto antes da aula de exposição e poder participar na aula de forma mais ativa/construtiva sem estar preocupado em

³ Regulamento Pedagógico em vigor na UTAD: Regulamento n.º 136/2018, *Diário da República*, 2.ª série — N.º 41 — 27 de Fevereiro de 2018.

“copiar” os diapositivos. Sempre que possível os materiais de apoio são disponibilizados na íntegra no início do semestre letivo.

No início do semestre, é indicado ao estudante o horário de atendimento do docente para apoio tutorial (OT) presencial (horário também disponível no SIDE, na página da UC). Este horário permite ao aluno o esclarecimento de dúvidas sobre a matéria e permite ao docente a averiguação da eficácia da aquisição de competências/conhecimentos por parte do aluno. Também é oferecido, ao aluno, apoio tutorial à distância, via correio eletrónico, para solução de pequenas dúvidas sobre a matéria ou qualquer assunto relacionado com a UC, permitindo o contínuo apoio do docente ao estudante.

Este modelo de ensino, recorrendo a um conjunto de meios e recursos, facilita o desenvolvimento de uma aprendizagem autónoma, centrada numa metodologia que se baseia num modelo ativo e colaborativo.

A assiduidade dos estudantes é monitorizada pelo registo de presenças em que: i) nas aulas teóricas, dependendo do número de alunos inscritos, o docente faz passar a lista de alunos inscritos para que estes a rubricarem (quando o número de alunos é elevado) ou o docente faz a chamada e registo de presenças diretamente no SIDE; ii) nas aulas práticas, por norma, o docente regista as presenças, dado que o número de alunos é geralmente inferior a 25 alunos por turma; dando assim cumprimento ao Art.º 11, RP.

2.5.2. MÉTODOS DE DOCÊNCIA

De modo a que, ao longo dos períodos letivos, os estudantes se sintam estimulados a participar ativamente na discussão dos temas apresentados, expondo também as suas ideias, formulando questões e apresentando hipóteses e participando nas aulas de forma ativa e interativa.

As **aulas teóricas**, essencialmente de natureza expositiva com interpelação constante, visam transmitir conhecimentos de uma forma interativa entre professor e estudante, promovendo-se o raciocínio em conjunto e, durante o processo de aprendizagem, espera-se que os estudantes se sintam incentivados a colocar questões

durante a exposição feita pelo professor. Nas situações em que os estudantes não questionam ou não interagem, o docente lança um conjunto de questões dirigidas ao conjunto de estudantes ou a algum em particular de forma a estimular a interação destes e o interesse destes pelas aulas expositivas.

O docente, no início da aula, indica os objetivos da aula. Além da exposição dos assuntos da aula teórica, sempre que for conveniente o docente apresenta também resultados de publicações científicas recentes sobre o assunto em questão e expressa também a sua experiência pessoal (quando aplicável). Estas aulas serão lecionadas com auxílio de meios informáticos e/ou audiovisuais. No final de cada aula teórica, que geralmente são de 2 horas, são deixados pelo menos 10 minutos para relacionar a matéria lecionada com outras UCs ou com temas de interesse para os estudantes, sendo-lhes sempre dada a palavra.

Aulas práticas, decorrem em laboratório, usando essencialmente o método participativo por parte do estudante, são maioritariamente do tipo prático-laboratorial e uma minoria do tipo teórico-prático para análise e discussão de resultados obtidos em aulas anteriores ou para aprendizagem de técnicas / métodos ou metodologias. Os trabalhos práticos a desenvolver são sempre precedidos de uma pequena introdução teórica ao protocolo experimental/laboratorial previamente fornecido aos estudantes e que estes devem ler antes da aula. Os trabalhos práticos decorrem sob a orientação contínua do(s) docente(s). As aulas laboratoriais são compostas por turmas de 16 a 24 alunos, sendo estes divididos em grupos de 4 a 5 alunos (sendo que o ideal seria de 3 alunos por grupo), dependendo do material/equipamento disponível. A organização dos grupos de trabalho estimula o trabalho em equipa e interativo entre estudantes. O estudante é estimulado a questionar e interpretar continuamente os resultados que vai obtendo, no decorrer da realização dos trabalhos experimentais, e a interpretar os resultados finais obtidos. Além disso, o docente assegura-se que todos os estudantes recolhem os dados experimentais obtidos durante as aulas práticas para poderem elaborar o relatório das mesmas e responder ao questionário, incluído no protocolo experimental, e terem material de estudo para as avaliações.

Duração das aulas: de acordo com o Art. 11º do RP, a duração das aulas teóricas é de 50 minutos, 2x por semana, ou de 50 + 50 minutos, 1x por semana; e a duração das aulas práticas é de 50 + 50 minutos, 1x por semana.

2.6. NORMAS E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA UC

2.6.1. AS NORMAS DE AVALIAÇÃO NA UTAD

Aplicam-se as normas em vigor na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), sendo o Regulamento Pedagógico (RP) em vigor o publicado em Fevereiro de 2018 (Publicado em *Diário da República*, 2.^a série — N.º 41 — 27 de fevereiro de 2018, pág.: 6324-6329), e que está acessível a alunos e docentes através da página web da UTAD, na secção dos Serviços Académicos: <https://www.utad.pt/sa/wp-content/uploads/sites/23/2018/02/RegulamentoPedagogico2018.pdf>. Este RP estabelece um conjunto de normas e procedimentos gerais que devem ser aplicados e seguidos de forma a promover a qualidade pedagógica e o aferimento dos resultados de aprendizagem. Nesta RP insere-se o estabelecimento de critérios e normas de avaliação que, dependendo das tipologias de aulas de cada UC, devem ser aplicadas.

2.6.2. INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

Segundo o Processo de Bolonha, a avaliação de cada UC deve ser realizada de forma a apurar os conhecimentos e competências adquiridas pelos estudantes, a capacidade de resolver e enunciar problemas em situações similares, o seu espírito crítico e o seu domínio da exposição escrita e oral. Deste modo, na UC de Fisiologia Celular, a avaliação dos conhecimentos e competências adquiridas pelos alunos usa dos seguintes instrumentos (provas) de avaliação:

- i) **Testes escritos presenciais**, a realizar nas instalações da UTAD, em sala e data previamente marcadas (estabelecidas no início do semestre com os alunos). Estes testes (duração máxima: 2 horas; tolerâncias incluídas) serão compostos por questões de resposta aberta, de interpretação, e de resposta rápida (e.g., tipo

V/F, escolha múltipla). A cotação de cada questão será indicada no teste (cumprindo o nº 4 e nº 8 do Art. 20º do RP).

- ii) **Relatórios das aulas PL**, feitos individualmente (RL-I) ou em grupo. Compreendem exposição dos resultados obtidos nas aulas PL, cálculos necessários, interpretação de resultados e análise crítica. Entrega ao docente na aula seguinte (tolerância de 1 semana, no caso de sobrecarga de trabalho), cada aluno escolhe 2 relatórios para entregar para avaliação individual. Contudo, estimula-se a realização de todos os relatórios como instrumentos de estudo.
- iii) **Elaboração de um trabalho escrito** (TG-E), realizado em grupo (ideal de 3 alunos por grupo), a partir de um dos temas das aulas PL, que pode ser um relatório de trabalho prático mais elaborado ou um tema à escolha do grupo, de entre os temas das aulas (PL ou TP). Este trabalho, com um máximo de 5 páginas A4, é elaborado em formato de artigo científico, deve ser entregue ao docente até à data estipulada (uma semana antes das apresentações orais), combinada entre docente e alunos no início do semestre.
- iv) **Apresentação oral do trabalho** (TG-O) descrito no ponto anterior. Todo o grupo deve apresentar uma parte do trabalho e estar apto a responder a eventuais questões (máximo 10 minutos, cada).

Os instrumentos indicados nos pontos ii, iii e iv, são adiante, conjuntamente designados por CAP, componente de avaliação prática. São de entrega obrigatória no decorrer das semanas letivas.

2.6.3. MODOS DE AVALIAÇÃO

Na UC Fisiologia Celular serão oferecidos aos estudantes os dois regimes de avaliação possíveis regulamentados no RP (Art.º 14, a) Avaliação contínua e b) Avaliação por exame; do N.º1)⁴; dada a tipologia de aulas lecionada, de forma independente e de modo a que o aluno tenha a possibilidade de aprovação à UC. As classificações são de 0

⁴ RP: Regimes de avaliação

¹ — Os estudantes são avaliados, de forma independente, através dos seguintes regimes, de maneira a que cada um deles contemple a possibilidade de aprovação à UC: a) Avaliação contínua; b) Avaliação por exame; c) Avaliação por projeto.

a 20 valores, considerando-se aprovados todos aqueles que tenham obtido classificação final ≥ 10 valores (arredondado à unidade).

A avaliação é composta por 3 modos de avaliação: **i) avaliação contínua**, realizada ao longo do período letivo, permite ao aluno a aprovação à UC, contudo caso não aconteça esta pode ser seguida de **ii) avaliação complementar**, realizado em época de exame, é o modo preferencial para avaliação dos alunos (Art. 15º do RP). A avaliação por **iii) exame final**, a realizar durante o período de avaliação previsto no calendário escolar para exames, numa das três épocas previstas (Art. 16º do RP). Independentemente do modo de avaliação escolhido pelo aluno, este, sendo de estatuto ordinário, tem de satisfazer as condições de frequência da UC (assistência a 70% das aulas sumariadas e nota mínima nos testes práticos (média) $> 8,5$ valores; ver secção 2.5.3.1, de acordo com o Art.º 13º e Art.º 15º do RP).

Modo 1 (avaliação contínua): O modo preferencial de avaliação, considerado como um modo obrigatório para avaliar o estudante (N.º 1, do Art.º 15 do RP). *Consiste* na avaliação de resultados obtidos ao longo do semestre:

- i) Da realização de 2 testes escritos sobre os conteúdos teóricos (T1 e T2, sem nota mínima; duração máxima 90 minutos, tolerância incluída). Cada teste engloba questões da matéria lecionada nas aulas teóricas. Estes são realizados ao longo do semestre letivo em data combinada com os alunos no início do semestre.
- ii) Da realização de 2 testes práticos (TPL1 e TPL2); cuja média deve ser igual ou superior a 8,5 valores (TPL $\geq 8,5$ valores); de 20 minutos, cada, dados em conjunto com o teste teórico), com questões relacionadas com os temas práticos e resultados experimentais obtidos nas aulas.
- iii) Da **componente de avaliação prática (CAP**, ver instrumentos de avaliação), que é composta por: i) trabalho escrito realizado em grupo (TG-E), ii) apresentação oral do trabalho (TG-O) e, iii) entrega de 2 relatórios das aulas PL (de trabalhos à escolha pelo aluno), feitos individualmente (RL-I). Nestes relatórios o estudante deve indicar o objetivo da aula, os principais resultados obtidos e uma breve discussão dos mesmos, e pode incluir a sua opinião sobre o trabalho e sugestões para os mesmos. (Nota: trabalhos plagiados terão nota de 0,0 valores).

Contribuição da CAP na nota final = 20%. Sendo: 7,5% (TG-E) + 7,5% (TG-O) + 5% (RL-I).

Fórmula de cálculo da avaliação do modo 1: (20% CAP + 30% T1 + 30 %T2 + 20% TPL).

Proposta de datas de avaliação do modo 1: T1 (final do Tema 11 ou final do Tema 13; dependendo do calendário), T2 (final do semestre).

Testes PL a realizar nas datas dos testes da teórica (sobre os temas lecionados até à data de teste).

Aprovação à UC no modo 1: quando classificação final $\geq 9,5$ valores (segundo o N.º 6, Art.º 13º do RP)⁵.

Caso o aluno não tenha obtido aprovação ao modo 1 (**avaliação contínua**), pode verificar-se:

- i) **Transição para modo 2 (avaliação contínua seguida de avaliação complementar):** exige cumprimento do N.º 5, Art.º15 do RP⁶, *i.e.*, aplica-se a estudantes que tenham tido aprovação a mais de 50% da UC (médias ponderadas $\geq 9,5$ valores, de pelo menos 50% da UC). A(s) componente(s) de avaliação em falta, de modo a conferir aprovação, serão indicadas pelo docente, após realizar a média ponderada das partes realizadas pelo estudante nos momentos de avaliação contínua e publicadas no SIDE na zona dos *downloads*. Cada componente de avaliação consiste num teste escrito, com conteúdos equivalente àqueles colocados nos testes de avaliação contínua (mesmos temas) de forma a

⁵ Art.º 13, N.º 6 — Consideram -se aprovados numa UC os estudantes cuja classificação final é igual ou superior a 10 valores, valor obtido após arredondamento à unidade mais próxima.

⁶ Art.º 15, N.º 5 — Salvo o disposto no número seguinte, o estudante tem direito a uma avaliação complementar que lhe possibilite a repetição de um ou mais elementos de avaliação previstos no n.º 3, quando: a) Não tenha obtido a classificação mínima referida no n.º 7 do artigo 13.º e desde que o seu peso conjunto não ultrapasse 50 % da fórmula de cálculo da avaliação da UC; b) No caso de não estar definida na FUC a classificação mínima referida no n.º 7 do artigo 13.º, ou quando apesar de ter obtido essa classificação mínima, não tenha atingido, no conjunto das componentes de avaliação, uma classificação que lhe garanta aprovação à UC.

complementar a avaliação em falta. A avaliação complementar é realizada na época normal de exames, de acordo com o RP (Nº 7, do Art.º 15º).

- ii) **Transição para modo 3 (avaliação por exame final):** para os estudantes que na avaliação contínua (modo 1) não tenham obtido aprovação a pelo menos 50% da fórmula de cálculo (por ponderação) ou que tenham reprovado ao modo 2, e que estejam admitidos a exame (Art.º17, RP). Consiste num teste escrito, único e com toda a matéria sumariada. Este exame pode ser realizado na Época Normal ou na Época de Recurso (Art.º 16º, RP).

Modo 2: Repetição das componentes teóricas (T1 ou T2) complementando a avaliação do modo 1. Relativamente à avaliação prática, caso a média seja $< 8,5$ valores, o estudante também pode realizar na avaliação complementar 1 dos testes TPL (o de classificação mais baixa, de forma a conseguir média $\geq 8,5$ valores). A nota final, seguindo a fórmula de cálculo: $(20\%CAP + 10\% TPL + 30\%T1 + 30\%T2)$. Caso o aluno não obtenha aprovação, transita para o modo 3.

Modo 3: Teste escrito com toda a matéria sumariada, desde que cumpram os critérios mínimos de acesso (admissão) a exame (Art.º17, RP).

Cálculo da nota final: $(20\%CAP + 20\% TPL + 60\% \text{ Teste teórico})$.

(Nota: as classificações da componente prática (CAP e TPL) serão guardadas e colocadas na fórmula de cálculo)

2.6.3.1. CRITÉRIOS MÍNIMOS DE ADMISSÃO A EXAME

Segundo o Nº 1 do Art.º 11º do RP, “a assistência às aulas é um direito e um dever dos estudantes”, (exceto casos de estudantes com estatuto, que devem ser comunicados aos docentes). Assim, nesta UC, a admissão às provas de avaliação, exige o cumprimento das duas condições previstas no Art.º17 do RP, que são:

a) Assistência a um mínimo de 70% das horas de contacto sumariadas (aulas T, TP e PL), dando-se preferência pela obrigatoriedade das aulas práticas;

b) Obtenção de classificação mínima de 8,5 na CAP, e a entrega de todos os elementos necessários à avaliação descritos anteriormente (a saber: TG-E, TG-O, RL-I).

2.6.3.2. INSCRIÇÕES NOS VÁRIOS MOMENTOS DE AVALIAÇÃO

A presença em qualquer dos momentos de avaliação requer a inscrição prévia no SIDE. As inscrições são abertas no mínimo com uma semana de antecedência e encerram, por norma, 48 h úteis antes da prova. Salvo para exames de melhoria de nota, além da inscrição no SIDE, o estudante deve requerer a prova nos serviços académicos mediante o pagamento dos emolumentos requeridos.

2.6.3.3. SITUAÇÕES ESPECIAIS:

Melhoria de nota: ocorre em exame, segundo RP (Art.º27), mediante inscrição do aluno nos Serviços Académicos. Consiste numa prova única com toda a matéria lecionada (exame global da T e da PL). A nota de exame é a nota da melhoria.

Alunos repetentes, com frequência às aulas práticas no ano letivo anterior estão dispensados da frequência das mesmas. Quando nota de CAP (nesse ano) tenha sido $\geq 9,5$ valores também estão dispensados da sua realização, e o mesmo se aplica para a nota de TPL (Art.º17, RP). Caso, estando dispensados, pretendam repeti-la(s) devem informar o docente dessa intenção, perdendo as classificações práticas (CAP e TPL) obtida no ano anterior.

Casos omissos: todos os casos omissos seguem o RP em vigor.

3. DESENVOLVIMENTO DOS CONTEÚDOS PROGRAMÁTICOS

3.1. CONTEÚDOS DO PROGRAMA TEÓRICO

3.1.1. 1ª AULA: APRESENTAÇÃO E INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A UC E SEU FUNCIONAMENTO

Na primeira aula faz-se a apresentação dos docentes e da unidade curricular aos estudantes. Expõem-se os objetivos da UC, o programa, a metodologia de ensino e a forma de trabalho aconselhada, a bibliografia recomendada e o método de avaliação. Refere-se também o horário das aulas (teóricas e práticas), o modo de funcionamento destas, o local e o horário de atendimento aos estudantes para o apoio tutorial por parte dos professores. E, faz-se também a marcação (agendamento) dos vários momentos de avaliação contínua (que depois são transmitidos ao diretor de curso), e refere-se que as datas de avaliação por exame são marcadas pela Direção de Curso e serão disponibilizadas no SIDE. Refere-se ainda a obrigatoriedade de inscrição nos vários momentos de avaliação e o modo de o fazerem

Nesta aula esclarecem-se os estudantes de que a frequência da UC de Fisiologia Celular não tem precedências mas que requer que os alunos tenham presentes conceitos de UCs anteriores, nomeadamente de Biologia Celular (conhecimento sobre organização estrutural da célula relacionando a estrutura dos vários organelos com a função desempenhada e sua contribuição para o funcionamento celular), Biofísica (conhecimento sobre gradientes químicos e eletroquímicos e equações que os definem, interação de solutos com a membrana e conceitos de permeabilidade, entre outros), Bioquímica Estrutural (conhecimento sobre estrutura química de biomoléculas, incluindo grupos funcionais e suas propriedades químicas e reatividade), Bioquímica e Metabolismo (conceitos básicos de cinética enzimática que inclui cinética de Michaelis-Menten e interpretação do significado das componentes da equação que a descrevem), entre outras. Recomenda-se também que, se estes conceitos não estiverem presentes, devem fazer uma revisão dos mesmos.

Para além do referido, salienta-se também a importância do conhecimento (e recomenda-se a aprendizagem) da Língua Inglesa para facilitar a aquisição de conhecimentos dos vários temas do programa, dado que a maioria dos livros e artigos científicos de periódicos recomendados na bibliografia estão redigidos em Inglês. Refere-se que o conhecimento básico de Informática e de navegação na Internet é também de grande importância para os estudantes poderem aceder a textos, imagens e vídeos em suporte informático (bases de dados – *ISI Web of Knowledge e PubMed*, artigos de periódicos, entre outros). Recomenda-se ainda, aos estudantes, que complementem o estudo com recurso a livros de texto que podem consultar na Biblioteca da UTAD e com recurso a artigos científicos através da B-on.

Introduz-se o conceito de fisiologia celular. Questionam-se os alunos sobre os seus objetivos de aprendizagem nesta UC, de forma a sondar a motivação dos mesmos. Pretende-se, desde a 1ª aula estimular o interesse do estudante pelos vários temas, evidenciando a transversalidade dos assuntos.

3.1.2. MÓDULO I: MEMBRANAS CELULARES: ESTRUTURA E FUNÇÃO

TEMA 1: ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES DAS MEMBRANAS CELULARES

Objetivos específicos:

- Contextualizar o estudante, fazendo a ponte com assuntos já lecionados em UCs anteriores.
- Relacionar a natureza química dos vários elementos que compõem as membranas biológicas (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) com a natureza das interações moleculares resultantes da sua associação e consequências na estrutura e função final.
- Perceber a constituição, arquitetura e natureza química da membrana e relacioná-la com as suas funções.

Conteúdos a desenvolver:

Breve revisão de conceitos prévios: estrutura das membranas, e historial dos vários modelos de membranas (*e.g.*, modelo de Davson e Danielli, modelo mosaico-fluido, de Singer e Nicolson), correlacionando-os com a instrumentação disponível, à data, que permitiu colocar a hipótese dos vários modelos, e como estes modelos evoluíram até ao modelo atual de membrana lipídica. Apresenta-se uma visão global das funções e da composição química das membranas celulares, salientando exemplos de vários organismos e vários tipos de células dentro de um organismo. Recordam-se as várias funções da membrana celular (*e.g.* compartimentalização, barreira seletiva, matriz (suporte) para atividades bioquímicas, etc.) e explicam-se, como forma de enquadramento no programa da Fisiologia Celular, e como forma de iniciar o mesmo.

TEMA 2: PRINCIPAIS COMPONENTES MEMBRANARES (LÍPIDOS, PROTEÍNAS E HIDRATOS DE CARBONO MEMBRANARES): ESTRUTURA, ORGANIZAÇÃO E FUNÇÃO**Objetivos específicos:**

- Conhecer e identificar os principais componentes membranares (lípidos, proteínas e hidratos de carbono membranares).
- Conhecer e identificar os principais lípidos membranares pela sua estrutura química.
- Relacionar a auto-associação de lípidos (e estruturas formadas) com as suas características moleculares.
- Relacionar a topologia e localização das proteínas membranares com a sua função.
- Entender as interações moleculares entre proteínas e lípidos e as restrições ao seu movimento.
- Entender que alguns processos de isolamento de proteínas alteram a sua estrutura tridimensional e consequentemente a sua função.
- Compreender o papel dos hidratos de carbono na membrana e sua relevância fisiológica, nomeadamente a interação com os lípidos e as proteínas membranares.
- Conhecer a topologia membranar pela presença de hidratos de carbono.

Conteúdos a desenvolver:**Lípidos membranares**

Classificação e estrutura química dos lípidos membranares: Glicerofosfolípidos; Esfingolípidos e Esteróis. Para cada um destes grupos apresentam-se as estruturas químicas dos principais lípidos. Destacam-se alguns lípidos membranares pelas suas topologias, função na membrana e relevância em temas posteriores (*e.g.* fosfatidilserina). Salientam-se os tipos de interação/ligação química entre estes componentes e relevância fisiológica das mesmas.

Natureza e importância da bicamada lipídica. Distribuição diferencial de lípidos por: reinos e espécies; tipo de tecidos; tipos de células, e de organelos ou compartimentos celulares (breve abordagem do tema recorrendo a exemplos, e relacionando essas diferenças com as funções das respetivas células).

Estruturas formadas pela auto-associação de lípidos: micelas, bicamadas, lipossomas e estruturas exagonais. Salientando a estrutura química dos tipos de lípidos associados a estas conformações e sua relevância para estudos de fisiologia celular.

Proteínas membranares

Esta secção inicia-se com uma breve revisão sobre a estrutura molecular das proteínas (ligação peptídica; natureza dos grupos laterais dos aminoácidos e repercussão na estrutura secundária das proteínas; breve alusão à estrutura secundária e terciária das proteínas, importante para explicar a topologia das mesmas na membrana).

Salienta-se a classificação das proteínas pela sua topologia: proteínas integrais (intrínsecas); proteínas periféricas (extrínsecas); proteínas ancoradas a lípidos da membrana (extrínsecas), salientando os tipos de ligação envolvidos com os outros componentes da membrana. Faz-se referência à função das várias proteínas membranares (*e.g.*, transporte de substâncias, receptores celulares, ou proteínas de regulação), fazendo a ponte para assuntos posteriores, focando a topologia das proteínas na membrana e relacionando-a com a função destas. Faz-se uma breve referência à definição de domínios proteicos, e uma breve alusão às suas propriedades/características. Referência a técnicas de isolamento de proteínas para estudo das suas funções (uso de diferentes tipos de detergentes; vantagens e desvantagens). Interações químicas entre proteínas e os outros

componentes da membrana. Breve referência a técnicas de separação de proteínas (e.g. eletroforese).

Hidratos de carbono

Indicar que os hidratos de carbono estão presentes nos folhetos externos das membranas celulares; que a natureza e complexidade destes dependem do tipo de célula e organismo (espécie) em causa. Referir (recordar) o tipo de ligação destes a lípidos e proteínas membranares, formando **glicolípidos** e **glicoproteínas**, respetivamente; salientando a natureza da ligação química formada (*O*- e *N*-glicosídica). Referir que as principais funções destes são a de reconhecimento e de adesão celular. Indicar ainda que, embora possam ser encontrados hidratos de carbono associados às membranas intracelulares, dado que são principalmente adicionados (ou a primeira adição ocorre) no retículo endoplasmático (ER), ficando localizados no lado da cisterna quando em organelos intracelulares (ER, Golgi, e vesículas), para que após fusão de vesículas fiquem no lado exoplasmático⁷. Fazer a ponte com os esfingolípidos, e a relevância dos mesmos no reconhecimento celular, refere-se como exemplo o sistema ABO de classificação de grupos sanguíneos. No sistema ABO faz-se a abordagem às enzimas (glicosil-transferases) responsáveis pelas adições de *N*-acetilgalactosamina e de galactose ao antígeno O, e que dão origem aos antígenos A e B, respetivamente (assunto depois explorado na aula PL1).

TEMA 3: FLUIDEZ MEMBRANAR, ASSIMETRIA LIPÍDICA, *RAFTS* LIPÍDICOS E DOMÍNIOS MEMBRANARES

Objetivos específicos:

- Entender as restrições ao movimento de lípidos na membrana, relacionado a estrutura química dos vários componentes (e.g. glicerofosfolípidos, esfingolípidos, colesterol, proteínas) com as ligações entre eles e com a sua topologia na membrana.
- Relacionar os diferentes graus de fluidez/rigidez membranar com fatores que os influenciam (e.g. estrutura das cadeias laterais dos lípidos membranares, temperatura, etc.).

⁷ A síntese e metabolismo de proteínas foi assunto de Bioquímica e Metabolismo (2º ano / 2º semestre)

- Perceber a regulação da fluidez membranar com a dependência de processos enzimáticos.
- Entender o papel e necessidade da regulação da fluidez membranar na manutenção de um estado fisiológico na célula, nomeadamente na manutenção da função das proteínas membranares e do transporte de solutos através da membrana.
- Relacionar conceitos de assimetria lipídica, domínios membranares, *rafts* lipídicos com polaridade celular.

Conteúdos a desenvolver:

Abordagem ao estado físico da membrana e focar a transição entre estados: cristal-líquido, gel-cristalino e sólido-cristalino; focando os graus de liberdade dos lípidos em cada um destes estados (rotação, difusão lateral...) e a temperatura de transição entre estados. Conceito de fluidez e viscosidade aplicados à membrana. Efeitos da fluidez membranar na fisiologia celular; transição entre estado gel-cristalino e cristal-líquido, dependente da composição lipídica.

Dependência da fluidez membranar com temperatura e composição lipídica da membrana, nomeadamente refere-se a estrutura dos ácidos gordos laterais dos lípidos membranares (tamanho e grau de insaturação) e a sua influência na fluidez membranar. Manutenção e regulação da fluidez membranar influenciada por regulação fisiológica e sinais extracelulares: i) função e atividade de desaturases e acil-transferases; ii) papel dos esteróis (colesterol, ergosterol e fitoesterol). Movimento de lípidos na membrana, lateral e transversal (flip-flop; ação e função de flipases, flopases e escramblases).

Assimetria lipídica (*e.g.*, membrana do eritrócito). Realça-se a posição de alguns lípidos membranares, como a fosfatidilserina (ponte para o módulo de apoptose e de como este lípido é um marcador para a destruição das células por macrófagos), a posição dos glicolípidos e de fosfatidil-inositol (importante na de sinalização celular).

Rafts lipídicos, papel de colesterol e de esfingolipídios. Restrições na mobilidade de proteínas. Conceito de domínio membranar. (este tema liga com o próximo). Domínios

membranares e polaridade celular (e.g., células epiteliais, sensoriais, espermatozoide e eritrócito).

TEMA 4: DINÂMICA MEMBRANAR E SUA RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA

Objetivos específicos:

- Fazer a integração dos conhecimentos adquiridos nos temas anteriores, focar a relevância fisiológica da natureza dinâmica da membrana plasmática.
- Ilustrar vários métodos, resultados de artigos científicos no tema, que demonstram a dinâmica membranar.

Conteúdos a desenvolver:

Nesta secção serão ilustrados resultados experimentais, com descrição sumária dos fundamentos metodológicos usados, que ilustram os conhecimentos adquiridos nos temas anteriores. A título de exemplo: i) a fusão de dois tipos de células, cada uma com suas proteínas marcadas com sondas fluorescentes de diferentes cores (com recurso a diferentes fluoróforos), e verificar o que acontece em vários pontos temporais após a fusão (ilustra mobilidade de proteínas na membrana; experiências de (Frye and Edidin 1970))⁸; ii) Demonstração experimental da difusão de lípidos em locais restritos da membrana (experiências de Fujiwara et al. (2002))⁹; Breve abordagem a técnicas que permitem investigar a natureza dinâmica da membrana plasmática (e.g. **FRAP**, *fluorescence recovery after photobleaching*)¹⁰; iii) barreiras físicas que causam impedimentos à difusão membranar de lípidos e proteínas (e.g. domínios membranares, citoesqueleto, etc.)¹¹.

⁸ Frye LD, Edidin M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci.* 1970;7(2):319-335.

⁹ Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., & Kusumi, A. (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Bio.* 157(6), 1071–1081.

¹⁰ Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. L., & Phair, R. D. (2018). The Development and Enhancement of FRAP as a Key Tool for Investigating Protein Dynamics. *Biophysical Journal*, 115(7), 1146-1155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.007>

¹¹ Trimble, W. S., & Grinstein, S. (2015). Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 208(3), 259-271. doi: 10.1083/jcb.201410071

3.1.3. MÓDULO II: TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS ATRAVÉS DA MEMBRANA

TEMA 5: TIPOS DE TRANSPORTE, ENERGIA PARA O TRANSPORTE, COEFICIENTE DE PARTIÇÃO E POTENCIAL DE MEMBRANA

Objetivos específicos:

- Compreender a estrutura e complexidade da membrana (módulo anterior) como barreira ao transporte de moléculas e iões. E, aprender e compreender as restrições físicas e químicas ao movimento de substâncias através da membrana.
- Rever conceitos de coeficiente de partição, energia livre e equação de difusão de solutos neutros, equações de potencial eletroquímico (de Nernst) e de potencial de membrana (Goldman-Hodgkin-Katz). Rever ainda os conceitos de permeabilidades e condutâncias, e salientar a importância destes fatores no transporte membranar.
- Relacionar as propriedades das membranas aprendidas nos temas anteriores com as suas propriedades elétricas.
- Aprender a distinguir e a caracterizar os vários tipos de transporte de substâncias.
- Reconhecer a diferença entre canais iónicos e transportadores, bem como as suas cinéticas de transporte e características.
- Reconhecer e entender as diferenças entre difusão passiva, transporte ativo primário e transporte ativo secundário.
- Reconhecer o efeito que os transporte de iões tem no potencial de membrana e no pH intracelular.

Conteúdos a desenvolver:

Breve revisão de conceitos dados em Biofísica de membranas (UC Biofísica) e que são necessários para a compreensão do tema 5, nomeadamente: distribuição de iões entre o espaço intracelular e extracelular; equilíbrio eletroquímico e potencial de reversão (equação de Nernst); potencial de membrana (V_m) e equação de Goldman-Hodgkin-Katz. Rever o conceito de coeficiente de partição, de polaridade de solutos, e tamanho de

moléculas e iões, como fatores que controlam o movimento de moléculas e iões através da membrana. Breve revisão dos conceitos: difusão, permeabilidade, hidrofiliicidade e lipofiliicidade, gradiente de concentração e densidades de corrente

Breve alusão aos conceitos de capacidade elétrica da membrana (C_m), baseados na composição e estrutura da bicamada lipídica. Resistência específica da membrana (R_m) e condutância (G_m) através de canais iónicos (essencialmente, condutâncias de K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} , *i.e.*, g_K , g_{Na} , g_{Cl} e g_{Ca}).

Fatores que determinam o potencial de repouso (V_{rep}): permeabilidades relativas (condutâncias), potenciais de reversão, bombas eletrogénicas. Potencial de membrana e potencial de ação.

Mecanismos de transporte de substâncias: transporte não mediado (difusão simples) e transporte mediado (difusão facilitada e transporte ativo). Difusão de água através de membranas: osmose. Serão ainda abordadas as fontes de energia requerida para estes movimentos.

Efeito do transporte de substâncias no potencial de membrana.

TEMA 6: CANAIS DE ÁGUA: AQUAPORINAS

Objetivos específicos:

- Relacionar estrutura química da bicamada lipídica com restrição à difusão de água através da mesma.
- Entender a necessidade de estruturas permeáveis a água.
- Relacionar a estrutura molecular do canal com a sua seletividade a água.
- Entender o papel e a função das aquaporinas em diferentes células.

Conteúdos a desenvolver:

Este tema inicia-se com uma breve revisão ao movimento de água através de membranas influenciado por gradientes de concentração de soluto (osmose), revisão dos conceitos de osmolaridade e tonicidade, turgor e plasmólise.

Aquaporinas: evidência experimental para a existência de canais seletivos a água (referência às experiências de Peter Agre em *Xenopus laevis*)¹². Caracterização da estrutura molecular e função das aquaporinas, focado na AQP1. Fatores moleculares determinantes para a seletividade da aquaporina a água. Classificação das aquaporinas (classes de aquaporinas e gliceroaquaporinas). Localização e função de algumas aquaporinas, por exemplo a nível do epitélio gastrointestinal, epitélio renal (exemplos); permeabilidade a gases (e.g., O₂ e CO₂) e relevância da sua função na fisiologia e patologia celular em mamíferos. Aquaporinas em plantas, relevância fisiológica das suas múltiplas funções.

TEMA 7: DIFUSÃO DE IÕES ATRAVÉS DE MEMBRANAS: CANAIS IÔNICOS

Objetivos específicos:

- Aprender a importância do potencial de membrana na regulação da atividade de canais iônicos, e o papel destes na regulação do potencial de membrana.
- Demonstrar a transversalidade de funcionamento de canais iônicos, comparando os conhecimentos obtidos sobre a estrutura molecular do canal de K⁺ de procariontes e transposição de conhecimento para eucariontes.
- Aprender semelhanças estruturais entre os vários canais iônicos e correlacioná-las com a função e regulação dos mesmos.
- Aprender os conceitos básicos sobre os principais tipos de canais iônicos, direção de fluxo de iões, e correlacionar com a sua função nos vários mecanismos celulares.
- Relacionar distribuição relativa de canais iônicos com a fisiologia da célula.

Conteúdos a desenvolver:

Este tema inicia-se com a demonstração da evidência experimental sobre a existência de canais iônicos (ensaios de Hodgkin, Hille, Sackman e Neher). Breve explicação sobre a técnica de *patch-clamp* (*single-channel recording*, *voltage-clamp*) e variações da técnica (*whole-cell*, *cell-attached patch*, *inside-out patch* e *outsider-out patch*), medições de canal único e potencialidades da técnica, desde a fisiologia do canal

¹² Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 1992;256(5055):385-387.

iónico até à sua modulação farmacológica. Aqui a docente apresenta vários registos, alguns obtidos pela própria, ilustrando: i) correntes iónicas e correlação com número de canais iónicos presentes no registo, e ii) como obter potenciais de reversão (potencial de Nernst).

Categorias de canais iónicos (breve abordagem): *Voltage-gated channels* (canais controlados pela voltagem), *Ligand-gated channels* (canais controlados por ligandos específicos, *e.g.*, neurotransmissores), *Mechano-gated channels* (canais controlados por ação mecânica), e outros, por exemplo formados por inserção de toxinas na membrana (*e.g.*, α -latrotoxina).

Canais de potássio (K^+): inicia-se este tema apresentando a estrutura tridimensional do canal KcsA (da bactéria: *Streptomyces lividans*), como canal de K^+ modelo, sua caracterização molecular (modelo do poro e filtro de seletividade) e mecanismo de seletividade para K^+ em relação ao Na^+ , combinado com elevada condutância. Interação com os lípidos de membrana e sua topologia.

Canais de potássio (K^+) em procariotas: i) canais de K^+ regulados pela voltagem (Kv): classificação hierárquica; constituição do canal e organização tridimensional na membrana; propriedades de *gating* e estados conformacionais; regulação da sua atividade e função fisiológica. Análise da estrutura proteica do canal de K^+ evidenciando os domínios proteicos responsáveis pelo poro e pelo sensor da voltagem. Estados conformacionais do canal (repouso, aberto, inativo, fechado). ii) Outros canais de K^+ : retificadores de entrada (*inward rectifiers*), canais de K^+ dependentes de ATP intracelular (K^+ -ATP) e *ligand-gated* (breve abordagem). Breve abordagem sobre distribuição tecidual e importância fisiológica (ex. músculo, neurónio).

Canais de sódio (Na^+) sensíveis à voltagem: classificação; constituição proteica (domínios) e organização estrutural do canal na membrana (evidenciando semelhanças e diferenças com o canal de K^+ , para facilitar a aprendizagem); regulação fisiológica. Ação do potencial de membrana na regulação da *gate* do canal (gate de inativação). Distribuição tecidual e importância fisiológica. Breve abordagem dos canais de Na^+ tipo *ligand-gated*.

Canais de cálcio (Ca^{2+}). Canais de cálcio sensíveis à voltagem (VSCCs): tipos de canais (nomenclatura: L, T, P/Q, R, N, e indicação de outras nomenclaturas com base no gene e estrutura proteica), constituição e estrutura proteica do canal (indicação dos vários domínios proteicos), topologia de subunidades na membrana e regulação da sua atividade (relacionar tipo com a modulação pela voltagem, refere-se regulação pelo Ca^{2+} e por proteínas cinase). Breve abordagem sobre localização e distribuição tecidual/celular dos diferentes tipos de VSCCs e sua função. Breve abordagem dos canais de Ca^{2+} tipo *ligand-gated*.

Canais de cloreto (Cl^-). Principais famílias de canais de cloreto (canais de Cl^- sensíveis à voltagem (VSCLC); condutância transmembranar reguladora da fibrose cística (CFTR); canais de cloreto regulados por ligandos). VSCLC: estrutura e topologia prevista para este canal, distribuição tecidual e importância fisiológica.

TEMA 8: MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ATIVIDADE DOS CANAIS IÔNICOS

Objetivos:

- Mostrar que além da regulação fisiológica, cada canal iónico (particularmente alguns domínios proteicos) é alvo de regulação pela ligação específica (ou não, dependendo do caso) de toxinas de origem natural (produzidas por animais, plantas, fungos...), ou outra, e também por fármacos.
- Mostrar a importância da modulação farmacológica no conhecimento do papel de cada canal iónico na fisiologia e na patologia da célula.

Conteúdos a desenvolver:

Este tema pretende somente fazer uma abordagem à regulação e à alteração da função de cada canal quando em presença de determinados fármacos ou toxinas. Não pretende ensinar conceitos de farmacologia. Este tema divide-se em:

- i) **Modulação farmacológica por ação de toxinas de origem natural.** Onde são apresentadas várias toxinas, sua origem e características moleculares, a sua ação em canais iónicos específicos (seletividade) e os efeitos na fisiologia da célula alvo quando os canais estão expostos a estas. São mostrados alguns registos

experimentais (alguns obtidos pela docente) de aplicação de tetrodotoxina (TTX) e sua ação em canais de Na^+ , entre outros.

- ii) **Modulação farmacológica por moléculas de síntese (fármacos) ou por iões (endógenos ou exógenos, como tóxicos resultantes de poluição).** São apresentados alguns fármacos de uso corrente, suas características moleculares, ação em canais iónicos e efeitos na fisiologia da célula alvo. Ainda, atendendo à seletividade dos canais e às suas condutâncias, como é que alguns iões podem atuar como bloqueadores de canais (*e.g.*, Ni^{2+} ; Cd^{2+} bloqueadores de CCSV, e tetraetilamónio permear uns canais de K^+ e bloquear outros). São mostrados registos experimentais, alguns obtidos pela docente da aplicação de nifedipina (ação em CCSV), tolbutamida (ação no K^+ -ATP) e DPC (ação em canais catiónicos não seletivos).

Serão comparados efeitos de toxinas e de fármacos no mesmo alvo farmacológico e explicadas como as constantes de afinidade destes agentes influenciam na ação temporal da modulação farmacológica e porque uns podem ser considerados fármacos e outros de tóxicos.

TEMA 9: TRANSPORTE FACILITADO E TRANSPORTE ATIVO.

Objetivos específicos:

- Conhecer, identificar e caracterizar os diferentes tipos de transportadores.
- Saber distinguir entre transporte ativo primário e secundário.
- Reconhecer transportadores eletrogénicos, eletroneutros, acidificantes e alcalinizantes.
- Saber relacionar a cinética dos transportadores com a cinética enzimática.

Conteúdos a desenvolver:

Transporte facilitado. Tipos de transportadores e suas características:

- i) **Uniporte** (características e distinção da difusão passiva). Este tipo de transporte é exemplificado com os transportadores de glicose (GLUTs), GLUT1 (eritrócito) e GLUT2 (célula beta pancreática e fígado), realçando diferenças de afinidade e

cinéticas (correlação com as curvas da cinética enzimática e identificação de $V_{\max}$ e K_m , e seus significados neste tipo de transporte).

- ii) **Co-transporte**: características gerais de co-transportadores (requisitos celulares e iónicos); será feita a distinção, com vários exemplos, entre: a) **simporte** (e.g., transporte de glicose dependente de sódio (SGLT)) e b) **anti-porte** (e.g., trocador Na^+/Ca^+ ; trocador Na^+/H^+). Conceito de transporte ativo secundário.

Serão exemplificados casos de células onde coexistem vários tipos de transporte (e.g., epitélio absorptivo do intestino, com SGLT e GLUT2, referência à polaridade celular). Relevância fisiológica dos anti-portes, a título de exemplo os de Na^+/H^+ ; $\text{Na}^+,\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, e de como a atividade destes é controlada pelo pH (curvas de atividade em função do pH) e como a atividade destes desempenha papel muito importante no controlo e manipulação do pH intracelular.

Nos vários exemplos, refere-se ainda o seu potencial efeito na modulação do potencial de membrana, efeito eletrogénico (ou eletroneutral), correlacionar com o efeito acidificante, alcalinizante ou neutral.

Transporte ativo primário (ATP-powered pumps). Características moleculares gerais das principais proteínas envolvidas; estrutura molecular e topologia na membrana, assim como tipos de iões transportados e contributo fisiológico. Será ainda abordada a sua distribuição por tecidos e compartimentos celulares, realçando sempre o transporte contra gradiente de concentração e o gasto de ATP (energia) no processo. Focar o papel deste tipo de transporte a gerar e manter gradientes iónicos através das membranas onde se encontram. Classificação e caracterização de:

- i) **ATPase tipo P**, onde serão dados vários exemplos, realçando a sua contribuição para o potencial de membrana, a acidificação/alcalinização dos compartimentos celulares, e função em mecanismos celulares específicos (exemplos).
- ii) **ATPase tipo V** (ATPase vacuolar), realçando a sua função fisiológica.
- iii) **ATP-powered pumps tipo F** (ATP-sintetase), mitocondrial e do cloroplasto, funcionamento da mesma como dissipadora de gradiente protónico e síntese de ATP (ponte para UCs anteriores).
- iv) **ATPases tipo ABC** (superfamília de transportadores ABC – *ATP-binding cassette*). Abordagem à sua função na célula, como proteínas com a função de

eliminação de moléculas tóxicas ao organismo (refere-se a elevada expressão destas em epitélios intestinais, renais e também no fígado), relação com a sua função na multirresistência.

Serão dados exemplos, para todos estes tipos de *ATP-powered pumps* bem como será ilustrada a sua relevância fisiológica, e modulação como fármacos (ponte com o tema anterior).

TEMA 10: POROS ARTIFICIAIS E IONÓFOROS.

Objetivos específicos:

- Compreender que além dos transportadores nativos, outras moléculas conseguem formar complexos, associar-se à membrana lipídica e promover o transporte de iões a favor dos seus gradientes de concentração (destruindo gradientes).
- Compreender que estes mecanismos, não naturais, são tóxicos para as células.
- Compreender que estes poros artificiais, formados para o transporte de iões por inserção de proteínas exógenas na membrana, constitui mecanismo de ação farmacológico, *e.g.*, antibióticos, antifúngicos e ou toxicológico (inserção de toxinas, exemplo alfa-latrotoxina).

Conteúdos a desenvolver:

Conceito de ionóforos e suas aplicações. Poros artificiais formados por antibióticos (*e.g.* valinomicina que transporta K^+), antifúngicos (*e.g.*, nistatina que se associa ao ergosterol, formando poros permeáveis a K^+ e Na^+), toxinas (*e.g.*, alfa-latrotoxina, formando poros com elevada seletividade par Ca^{2+}); e referindo os iões aos quais são permeáveis, e os efeitos fisiológicos. FCCP e CCCP¹³, como transportadores de protões, dissipando o gradiente de eletrões da mitocôndria. Ionóforos e sua utilização como ferramentas farmacológicas e de auxílio para estudar a fisiologia das células. Ilustra-se parte da aula com exemplos de ionóforos e suas aplicações.

¹³ FCCP, carbonilcianeto-4-trifluorometoxifenil-hidrazona; CCCP, carbonilcianeto-3-clorofenil-hidrazona

TEMA 11: RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA DO TRANSPORTE DE IÕES: INTEGRAÇÃO DE CONHECIMENTOS**Objetivos específicos:**

- Fazer a integração e interligação dos conhecimentos anteriores, usando como modelos:
 - i) Transmissão do potencial de ação ao longo de um axónio.
 - ii) Célula beta-pancreática como sensor metabólico.
- Perceber que os potenciais de ação não são exclusivos da célula neuronal, mas são dependentes das componentes da membrana e dos fluxos iónicos.
- Entender as consequências fisiológicas de alterações num transportador (ou canal iónico).

Conteúdos a desenvolver:

Transmissão do potencial de ação: Relevância do potencial de Nernst, assimetria iónica através da membrana, fluxos iónicos e V_m para a condução elétrica (nesta aula faz-se a ponte entre os conhecimentos adquiridos em UCs anteriores, como a Biofísica, com os conhecimentos agora transmitidos em Fisiologia Celular). Conceito de limiar de ativação na geração de potencial de ação e relação com canais sensíveis à voltagem. Escala temporal da ativação e inativação de canais de Na^+ e K^+ , suas cinéticas e condutâncias e correlação com os diferentes perfis de potenciais de ação. Papel dos canais de K^+ e da Na^+/K^+ ATPase na repolarização e no estabelecimento dos V_{rep} . Correlacionar período refratário com as *gates* de inativação dos canais iónicos envolvidos. Serão ilustrados também potenciais de ação em células musculares e o envolvimento de canais de Ca^{2+} . Nestes exemplos, comparam-se os potenciais de ação em ambiente fisiológico com os efeitos observados pela adição de toxinas (e.g. TTX, CTX) ou fármacos, ao meio, e as consequências na geração ou no perfil do potencial de ação resultante.

Acoplamento estímulos secreção em células que se comportam como sensores metabólicos: ilustra-se o exemplo da célula beta-pancreática como sensor da concentração de glicose plasmática. Relevância do GLUT2 na “percepção” da glicemia e captura de glicose (V_{max} e K_M). Metabolismo da glicose, geração de ATP, bloqueio de canais de K^+ (K^+ -ATP) e consequente alteração do V_m . Limiar de ativação dos CCSV do tipo-L presentes na célula beta, influxo de Ca^{2+} e exocitose de vesículas (tema ainda a

tratar). Serão mostrados registos onde se observa a correlação entre atividade elétrica, da concentração de Ca^{2+} intracelular e da secreção de insulina (sendo alguns destes registos obtidos pela docente). Será ainda ilustrada a ação de fármacos (e.g. de bloqueadores de canais de Ca^{2+} tipo-L e de canais K^{+} -ATP, em particular nifedipina e tolbutamida, respetivamente) e os efeitos observados na dinâmica iónica intracelular.

É ainda indicada a relevância deste módulo em UCs de segundos ciclos de estudos.

3.1.4. MÓDULO III: CITOESQUELETO E MOTORES MOLECULARES ASSOCIADOS

TEMA 12: CITOESQUELETO: COMPONENTES, DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÃO

Objetivos específicos:

- Reconhecer e identificar os vários elementos do citoesqueleto, várias populações e suas estruturas moleculares.
- Aprender e compreender a sua transversalidade a vários organismos e tipos de células.
- Reconhecer a dinâmica organizativa do citoesqueleto que compõe a maior parte das estruturas celulares.
- Aprender os fatores que regulam a dinâmica de associação/dissociação das várias populações de proteínas do citoesqueleto.
- Relacionar movimentos intracelulares, motilidade e movimento celular com a dinâmica ou dependência do citoesqueleto.
- Relacionar e perceber a sua relevância em vários processos fisiológicos.
- Reconhecer a dependência anatómica de células (e.g. neurónios) e estruturas celulares (e.g. cílios e flagelos de eucariotas) com a presença e organização dos microtúbulos.
- Nos filamentos intermédios, perceber a elevada estabilidade, a sua conservação e potencialidade como biomarcadores.

Conteúdos a desenvolver:

Este módulo inicia-se com uma **abordagem geral sobre as principais funções do citoesqueleto**. Referem-se as componentes proteicas do citoesqueleto em células eucariotas e as suas análogas em procariotas. Características gerais dos vários filamentos, semelhanças e diferenças. População de filamentos estáveis e duradouros e instáveis ou de vida curta e sua relevância nos processos fisiológicos da célula. Esta primeira parte visa recordar a abordagem ao citoesqueleto lecionada em Biologia Celular (1º ano, 1º semestre). De seguida, transmitem-se os novos conhecimentos no tema.

Microfilamentos ou filamentos de actina: Estrutura molecular da proteína actina (isoformas; localização e função). Evidência da sua polaridade molecular e influência na associação/dissociação de subunidades. Caracterização da atividade enzimática de actina (monoméricas: ATP-G-actina e ADP-G-Actina, ligadas a ATP e ADP, respetivamente; e polimerizada em filamento (F), ATP-F-actina e ADP-F-actina, zonas com ATP e ADP ligados, respetivamente). Dinâmica de organização de actina (equilíbrio dinâmico entre G-actina e F-actina); taxas e cinéticas de polimerização/despolimerização; nucleação e crescimento de filamentos; concentração crítica e *treadmilling*; efeito da força iónica e de algumas proteínas reguladoras no controlo da dinâmica de associação/dissociação. Proteínas ligantes e estruturas formadas. Estruturas dependentes de F-actina (*e.g.*, microvilosidades, junções aderentes, sarcómeros). Motilidade e movimento celular (exemplos). Foca-se a polaridade dos filamentos de actina formados.

Microtúbulos: Estrutura molecular das tubulinas (isoformas; localização e função). Dímero de alfa-beta-tubulina, polaridade molecular e influência na associação/dissociação de subunidades. Dinâmica de associação de microtúbulos, dependência de GTP. Cinética e fatores que influenciam a polimerização/despolimerização de microtúbulos (temperatura, concentração crítica, proteínas reguladoras). Centros organizadores de microtúbulos (MTOCS; corpo basal, centríolos). Centrossomas. Cílios e flagelos de eucariotas. Motilidade e movimento celular (exemplos). Estruturas dependentes de microtúbulos (*e.g.*, axónios e dendrites). Foca-se a polaridade dos microtúbulos formados.

Filamentos intermédios: Principais funções e características destes filamentos. Estrutura molecular das subunidades. Classificação de acordo com a homologia de

sequência. Dinâmica de associação e especificidade de associação entre classes. Equilíbrio dinâmico dos filamentos intermédios com as suas subunidades. Papel das proteínas associadas aos filamentos intermédios. Distribuição diferencial das várias classes de filamentos intermédios por diferentes células (e.g. células epiteliais, neuronais, musculares), e indicação da sua conservação e do seu potencial como marcador da origem celular (casos de metástases). Foca-se a ausência de polaridade dos filamentos intermédios.

TEMA 13: MOTORES MOLECULARES ASSOCIADOS AO CITOESQUELETO

Objetivos específicos:

- Entender o conceito de proteína-motor e de movimento direcionado.
- Relacionar o movimento da proteína motor com a sua atividade catalítica.
- Perceber a razão das proteínas-motores só se associarem a filamentos com polaridade e da sua especificidade.
- Distinguir algumas classes de miosinas e associá-las a funções específicas.
- Distinguir cinesinas e dineínas, quanto a estrutura e direção de movimento.
- Distinguir processos celulares executados pelas várias classes de proteínas-motor.
- Entender a sua relevância no movimento, motilidade e mobilidade celular.

Conteúdos a desenvolver:

Inicia-se este tema com o conceito de enzimas mecânico-químicas. Movimento direcionado (ponte com a polaridade dos microtúbulos e dos filamentos de actina). De seguida abordam-se as duas classes de proteínas-motor em separado.

Miosinas: estrutura molecular geral da proteína, enfatizando a função dos vários domínios proteicos. Classes de miosinas, distribuição e função (dando ênfase à miosina II (células musculares e citocinese), miosina I e V (transporte de vesículas). Dinâmica da interação entre miosina-actina. Ilustração da função específica destas proteínas-motor nos processos de: citocinese, transporte de vesículas, endocitose, e contração muscular. Breve abordagem à regulação da contração muscular por Ca^{2+} , focando a regulação da interação actina-miosina por processos dependentes de Ca^{2+} .

Cinesinas e dineínas: estrutura molecular geral das proteínas, enfatizando a função dos vários domínios (comparação da estrutura molecular com a da miosina). Classes de cinesinas e dineínas, localização e função. Exemplificação de algumas funções específicas destas proteínas, por exemplo na divisão celular (organização do fuso, posicionamento e segregação de cromossomas); transporte de vesículas e organelos; transporte axonal e papel na morfologia do neurónio, axonema (cílios e flagelos de eucariotas).

É ainda indicada a relevância deste módulo em UCs de segundos ciclos de estudos, nomeadamente na Dinâmica Celular (UC comum a vários 2ºs Ciclos da UTAD), onde este tema será aprofundado e necessário a outros módulos desta UC.

3.1.5. MÓDULO IV: COMUNICAÇÃO CELULAR: SINALIZAÇÃO CELULAR E TRANSDUÇÃO DE SINAIS

TEMA 14: COMPONENTES ESSENCIAIS NA COMUNICAÇÃO ENTRE CÉLULAS: RECEPTORES E MENSAGEIROS

Objetivos específicos:

- Distinguir sinalização autócrina, parácrina e endócrina.
- Conhecer alguns dos elementos básicos da comunicação celular, sua função e seus principais mecanismos de ação.
- Entender que sinais enviados por uma célula só são recebidos se a célula alvo tiver receptores específicos e funcionais para o seu reconhecimento.
- Conhecer vários tipos de receptores, sua localização e função.

Conteúdos a desenvolver:

Conceito de mensageiros extracelulares (ou primeiros mensageiros) na comunicação celular: distância de ação, conceitos de hormonas e de neurotransmissores; conceito de ligandos externos (fármacos e toxinas), e conceito de agonista e antagonista. Serão dados vários exemplos de mensageiros extracelulares, acompanhados pelas suas

estruturas químicas [e.g., neurotransmissores (acetilcolina, dopamina, GABA¹⁴), hormonas (insulina), fatores de crescimento (EGF, VEGF)¹⁵, esteroides (testosterona, estrogénio), gases (NO e CO)¹⁶ e outros].

Sinalização autócrina, parácrina e endócrina (conceitos, distinção e breve abordagem à principal função fisiológica destes tipos de sinalização).

Reconhecimento de sinais externos: receptores e a sua especificidade.

Conceito de receptores metabotrópicos e de receptores ionotrópicos. Receptores para mensageiros extracelulares que mediam transdução do sinal (abordagem geral, dado que será explorado nos próximos temas): i) receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G-protein coupled receptors*), ii) Canais iónicos acoplados a receptores (*ligand-gated channel*; faz-se a ponte para o módulo II); iii) receptores com atividade enzimática intrínseca (receptores proteína tirosina cinase (RTKs, *receptor protein-tyrosine kinase*)), iv) receptores para hormonas esteroides (receptores intracelulares).

Conceito de: i) segundo mensageiro (e.g. Ca²⁺, IP₃, AMPc, DAG)¹⁷; ii) proteínas alvo de segundos mensageiros; ditas de efetoras; iii) proteínas alvo das proteínas efetoras; iv) via de sinalização. (Todos estes conceitos serão ilustrados com exemplos).

TEMA 15: GPCRS: TRANSDUÇÃO DE SINAIS E MENSAGEIROS INTRACELULARES

Objetivos específicos:

- Perceber o arranjo estrutural e tridimensional dos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas.
- Entender o conceito GPCR.
- Perceber a mecanística destes receptores desde a sua ativação até à transdução do sinal via proteínas efetoras.
- Papel de proteínas G e sua importância na ligação a proteínas efetoras.
- Compreender mecanismos de ativação das proteínas efetoras (adenil ciclase e fosfolipase C) e relacioná-los com a geração de segundos mensageiros.

¹⁴ Ácido gama-aminobutírico (de *gamma-aminobutyric acid*).

¹⁵ EGF, fator de crescimento epidérmico (de *Epidermal Growth Factor*); VEGF, fator de crescimento endotelial vascular (de *Vascular Endothelial Growth Factor*)

¹⁶ Óxido nítrico, NO, e monóxido de carbono, CO.

¹⁷ IP₃, 1,4,5-trisfosfato de inositol; AMPc, adenosina monofosfato cíclica; DAG, diacil-glicerol.

- Relacionar a composição lipídica da membrana com a produção de segundos mensageiros (diacil-glicerol e 1,4,5 trisfosfato de inositol)

Conteúdos a desenvolver:

Abordagem geral sobre a estrutura molecular do receptor (receptores com sete segmentos trans-membranares, *7TM*), sua organização e topologia na membrana. Arranjo tridimensional com as proteínas G heterotriméricas, e sua topologia com proteínas efetoras. Mecanismos de ativação do receptor: ligação de ligandos, alterações conformacionais, interação com proteínas-G, difusão destas na membrana para moléculas efetoras. Breve indicação da transversalidade deste tipo de receptores nos vários organismos, indicando exemplos de funções: leveduras (*e.g.*, resposta a feromonas durante a reprodução), plantas (*e.g.*, mediação da resposta à hormona de stresse ácido absísico) e animais (mediação de respostas a várias hormonas e neurotransmissores).

Proteínas G heterotriméricas: i) subunidades alfa (α), beta (β) e gama (γ), sua disposição e interação com a membrana plasmática, especialmente com os componentes lipídicos; ii) ligação de nucleótidos de guanina (GDP ou GTP) à subunidade- α , importância no processo de transdução de sinal, iii) alterações conformacionais, afinidade entre subunidades, mobilidade das subunidades na membrana e ação em proteínas efetoras, mediante ativação de receptores (salientar aqui a importância da fluidez membranar).

Classificação simplificada das famílias de proteínas G, de acordo com o seu acoplamento a proteínas efetoras: G_{α_s} (acoplamento à adenil ciclase (AC), ativando-a), G_{α_q} (acoplamento e ativação da fosfolipase C β), G_{α_i} (acoplamento à AC, inibindo-a) e $G_{12/13}$ (estimulação de pequenas proteínas G intracelulares).

Proteínas efetoras: Adenil ciclase e Fosfolipase C (PLC), e sua atividade catalítica (substratos e regulação da atividade).

Segundos mensageiros: Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP₃), diacil-glicerol (DAG) e íon cálcio (Ca²⁺). Vias de produção (ligação ao ponto anterior), e breve abordagem da sua ação na célula.

Vias da proteína cinase A (PKA) e da proteína cinase C (PKC): modos de ativação destas vias e regulação (conceitos gerais).

Nesta secção serão ilustrados os mecanismos de transdução de sinal exemplificados com a ativação de GPCRs por:

- i) GLP-1 (*glucagon like peptide-1*): acoplamento do receptor à proteína $G\alpha_s$, ativação da via da AC com aumento de AMPc, ativação da proteína cinase A e seus alvos moleculares e efeitos celulares.
- ii) Acetilcolina (via receptor M3): acoplamento do receptor à proteína $G\alpha_q$ e ativação da via da PLC, com produção de DAG e IP_3 , como segundos mensageiros, alvos moleculares e efeitos celulares.
- iii) Acetilcolina (via receptor M2): acoplamento do receptor à proteína $G\alpha_i$ com inibição da via da AC, levando à redução dos níveis de AMPc, e ativação de canais de K^+ (efeitos na célula).

TEMA 16: RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS IÓNICOS

Objetivos específicos:

- Aprender e compreender que alguns receptores membranares são canais iónicos cuja atividade é modulada pela ação direta de ligandos.
- Aprender que a sua atividade, desencadeia processos rápidos e modula o V_m .

Conteúdos:

Breve alusão à estrutura molecular e topologia destes receptores. Processos de ativação, de condução de fluxos iónicos e efeitos na fisiologia celular (referência à escala temporal dos eventos, comparando com os GPCRs). Refere-se que os fluxos iónicos ocorrem de acordo com os gradientes de concentração dos iões em causa (relembrem-se os conceitos do módulo II).

Este tema é ilustrado com vários exemplos:

- i) Receptor P2X: receptor ionotrópico de ATP, papel deste receptor na modulação da atividade da célula beta-pancreática (extrapolação para outras células e efeitos fisiológicos).
- ii) Receptor nicotínico neuronal: receptor ionotrópico de acetilcolina, papel deste receptor na fisiologia do neurónio como resultado do aumento da permeabilidade a Ca^{2+} e a Na^+ .

- iii) Receptores de GABA e de Glicina: receptores ionotrópicos, seu papel na fisiologia do neurónio como resultado do aumento da permeabilidade a Cl^- .

TEMA 17: RECEPTORES COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA INTRÍNSECA (RECEPTORES TIROSINA CINASE)

Objetivos específicos:

- Compreender que estes receptores membranares são enzimas que fosforilam resíduos de tirosina específicos em substratos proteicos.
- Compreender o seu papel na regulação do crescimento, divisão, diferenciação, sobrevivência e migração celular (entre outras).
- Compreender as vias celulares inerentes à ativação destes receptores e a complexidade de regulação destas vias e respostas celulares.

Conteúdos a desenvolver:

Receptores proteína tirosina cinase (*receptor protein-tyrosin kinase* RTKs). Receptores com atividade enzimática intrínseca ou associada. Estrutura molecular e topologia. Ligandos específicos: fatores de crescimento, fatores de diferenciação ou reguladores metabólicos (*e.g.*, insulina) e sua relevância fisiológica. Mecanismos propostos de dimerização destes receptores.

Vias intracelulares desencadeadas pela ativação de RTKs por, *e.g.*, cascata da Ras-MAP cinase, e sua função na regulação da proliferação e diferenciação celular (via de sinalização ilustrada com a ativação por fator de crescimento, *e.g.* IGF).

Exemplificação também com *Insulin-receptor substrate* (IRS: IRS1 e IRS2): i) ativação por ligação de insulina e alterações conformacionais, ii) cascatas intracelulares desencadeadas pela ativação deste receptor, iii) papel na translocação dos transportadores de glicose para a membrana plasmática (regulação da captura de glicose por células musculares, adiposas, e célula beta-pancreática), na síntese de glicogénio e de novas proteínas. Nesta secção a docente exemplifica o papel do IRS1 na homeostasia da glicose.

TEMA 18: PAPEL DO IÃO CÁLCIO COMO SEGUNDO MENSAGEIRO INTRACELULAR.**Objetivos específicos:**

- Compreender o papel de um catião intracelular como segundo mensageiro (relacionar com os temas anteriores).
- Relacionar a eficácia do Ca^{2+} como segundo mensageiro com o controlo apertado da sua concentração.
- Elucidar como se podem medir concentrações de cálcio intracelular, recorrendo a sondas fluorescentes.
- Relacionar estes conceitos com os temas anteriores: i) estimulação de GPCRs (*e.g.*, receptores de ATP), seu efeito no cálcio intracelular, origem compartimentar do cálcio, e ii) papel de transportadores de Ca^{2+} .

Conteúdos a desenvolver:

Descrever o envolvimento do cálcio como modulador de várias atividades intracelulares (*e.g.*, contração muscular, secreção, transmissão sináptica, metabolismo).

Principais ações do ião cálcio como segundo mensageiro: i) regulação da PKC, ii) complexo Ca-calmodulina e locais de ação.

Mecanismos de regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$, papel de: canais de Ca^{2+} da membrana plasmática (*e.g.*, canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, canais acoplados a receptores e não-seletivos), ATP-powered pumps (da membrana plasmática, PMCA, e do retículo endoplasmáticos, SERCA), transportadores (*e.g.* trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), receptores de organelos intracelulares (receptores de IP_3 e de rianodina) e proteínas que ligam Ca^{2+} (*e.g.* calbindinD28k). Conceitos de influxo, efluxo, extrusão, captura e *buffering* de Ca^{2+} .

Visualização da variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em tempo real: i) sondas fluorescentes com afinidade para Ca^{2+} (*e.g.* fura-2), breve alusão às características destes compostos/fluoróforos (*e.g.*, constantes de dissociação), elucidando eficiência de deteção de pequenas variações e da rápida resolução temporal dos sinais.

Exemplificação (recorrendo a figuras extraídas de artigos)¹⁸:

¹⁸ Por exemplo: Silva, A. M. (2003). Receptores P2 e modulação da atividade secretora da célula β pancreática”. Tese de Doutoramento, FCTUC, Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

- i) Ativação de receptores de ATP (P2Y) e de ACh em presença e em ausência de Ca^{2+} extracelular (recorrendo a figuras de artigos), efeito na dinâmica de cálcio intracelular.
- ii) Ativação de receptores de ATP em ausência de Ca^{2+} extracelular e após inibição da SERCA (com BHQ), (figuras de artigos), origem compartimentar.
- iii) Efeito do bloqueio de vias de influxo de Ca^{2+} na célula beta pancreática (aplicação de nifedipina), efeitos fisiológicos.
- iv) Efeito do valor da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na exocitose de vesículas secretoras, com ênfase para a quantidade segregada (*e.g.* secreção de insulina) e para a dinâmica de secreção (exemplificado com várias figuras).

TEMA 19: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) COMO MENSAGEIRO CELULAR.

Objetivos específicos:

- Compreender o papel de um gás inorgânico, o óxido nítrico (NO), como mensageiro celular.
- Compreender como o NO atua como mensageiro extracelular e mensageiro intracelular (1º e 2º mensageiro, respetivamente).

Conteúdos a desenvolver:

Ação de NO no relaxamento vascular, via ativação da guanilato ciclase: inicia-se o tema, com a via de síntese de NO, a partir de L-arginina via óxido nítrico sintase. Ação conjunta de acetilcolina, via M1, ativação da síntese de NO em células endoteliais. Difusão de NO para as células musculares adjacentes onde se liga à enzima guanilato ciclase, ativando-a, e produzindo GMPc (segundo mensageiro, com estrutura idêntica a AMPc), que por sua vez se liga a uma proteína cinase dependente de GMPc (a PKG), que uma vez ativada vai fosforilar substratos específicos resultando em relaxamento muscular.

Silva, A.M.; et al. (1994). Background Ca^{2+} influx mediated by a dihydropyridine- and voltage insensitive channel in pancreatic b-cells: modulation by Ni^{2+} , diphenylamine-2-carboxylate and glucose metabolism. J. Biol. Chem. 269 (25):17095-17103

Misler, S., Silva, A.M.; et al. (2009). Phasic and tonic modes of depolarization-exocytosis coupling in β -cells of porcine islets of Langerhans. Channels 3(2):101-109.

Abordagem do papel do NO em outras ações, *e.g.* produzido e libertado por macrófagos como mediador inflamatório; NO como espécie reativa de nitrogénio, muito reativa com o radical superóxido, implicação no stress oxidativo. Neste ponto faz-se a ponte para a relevância deste tópico em UCs de 2ºs ciclos (*e.g.* Bioquímica Celular).

TEMA 20: ACOPLAMENTO ESTÍMULO SECREÇÃO: TRANSPORTE DE VESÍCULAS E EXOCITOSE.

Objetivos específicos:

- Este tópico visa essencialmente fazer a integração de conhecimentos adquiridos anteriormente e demonstrar ao estudante a ligação entre os vários tópicos dos diferentes módulos.
- Apreender os conceitos base inerentes aos mecanismos de transporte intracelular de vesículas secretoras.
- Conhecer métodos para visualizar/quantificar a exocitose.

Conteúdos a desenvolver:

Neste tema será feita uma breve abordagem ao acoplamento estímulo secreção, com o objetivo de integração dos vários conhecimentos adquiridos anteriormente. Pelo que, voltamos a abordar a secreção de insulina a partir da célula beta-pancreática, como uma continuação do tema 11, mas onde agora se vai dar ênfase a:

- i) Papel do Ca^{2+} intracelular como 2º mensageiro na regulação dos vários processos.
- ii) Mecanismos de regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular.
- iii) Regulação autócrina (por insulina libertada atuando no seu próprio receptor na célula beta-pancreática), parácrina (por hormonas libertadas pela célula alfa-pancreática) e endócrina (ex. ACh, no recetor M3, já abordado anteriormente) da secreção de insulina. Será somente uma breve abordagem, para mostrar a interligação de conhecimentos.
- iv) Será abordado o papel do Ca^{2+} intracelular na organização do citoesqueleto de actina, necessário para o transporte de vesículas (ponte para o módulo III), desde o citoplasma até junto à membrana. Movimento e direcionamento de vesículas para o compartimento membranal. Mecanismos moleculares do transporte

vesicular para exocitose, direcionamento para membrana plasmática (*docking*): papel de v-SNAREs e de t-SNAREs na fusão correta de vesículas com a membrana alvo, sua regulação por proteínas G intracelulares (família Rab). Durante o *priming*, formação do complexo entre *Syntaxin* e SNAP-25 (membrana plasmática) e Synaptobrevin (vesícula secretora). Papel do Ca^{2+} na regulação de synaptotagmin, proteína que compete com SNAP-25 pelo local de ligação de SNARE.

- v) Será ainda abordada a fusão de vesículas, salientado a topologia lipídica que favorece estes mecanismos (módulo I).

De forma a mostrar o funcionamento global de uma célula, usam-se modelos celulares para fazer uma breve abordagem ao papel da endocitose no término da sinalização, via receptores membranares, ou para a internalização de transportadores (e.g. GLUT2).

Neste tema serão também abordadas algumas técnicas que permitem a visualização, em tempo real, da:

1. Exocitose: i) por fluorescência, recorrendo à *green fluorescent protein* (GFP) e à sua manipulação direcionando-a para vesículas secretoras; ii) por alteração da área de membrana plasmática, medição da capacidade elétrica (C_m), e iii) por microamperometria, *i.e.*, marcando o conteúdo das vesículas com moléculas dadoras de eletrões, e medir a corrente desenvolvida aquando a sua secreção.
2. Endocitose: i) alteração C_m ; ii) fluorescência via marcação de receptores/transportadores que sofrem internalização.

3.1.6. MÓDULO V: MORTE CELULAR PROGRAMADA

TEMA 21: CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DA APOPTOSE

Objetivos específicos:

- Saber distinguir entre morte celular programada e morte celular acidental.
- Compreender que há processos de morte celular que são regulados e são essenciais para a fisiologia do organismo.
- Saber distinguir apoptose de outros tipos de morte celular pelas características moleculares de morfológicas da célula.

Conteúdos a desenvolver:

Aqui serão referidos conceitos base de morte celular programada (apoptose) sua importância nos seres vivos, em processos tais como: i) desenvolvimento embrionário; ii) controlo de células excedentárias; iii) controlo de células com “defeito” (e.g. linfócitos T imaturos).

Serão apresentadas as principais características bioquímicas (e.g. alteração da topologia da fosfatidilserina) e morfológicas (e.g. fragmentação da cromatina; encolhimento celular com formação de “blebs” que se desprendem da célula para serem fagocitados) de células em apoptose. Será focada a importância da inversão da fosfatidilserina para o reconhecimento celular por parte de células fagocíticas.

Será também feita uma distinção entre apoptose e morte celular acidental ou descontrolada (necrose), onde serão abordadas as diferenças bioquímicas e morfológicas entre ambos os processos.

Serão ainda referidas as experiências em *Caenorhabditis elegans* (nematóide transparente onde é possível seguir o destino celular durante o desenvolvimento embrionário) que foram essenciais para a descrição dos processos de apoptose.

TEMA 22: VIA EXTRÍNSECA E VIA INTRÍNSECA DA APOPTOSE (PAPEL DAS CASPASES)**Objetivos específicos:**

- Compreender que a morte celular programada pode ter início em fatores intracelulares (*e.g.* anomalias genéticas) ou em fatores extracelulares (*e.g.* ativação de receptores extracelulares por citocinas).
- Compreender as diferenças dos mecanismos associados à via intrínseca (ativada por sinais internos) dos associados à via extrínseca (ativada por sinais externos).
- Compreender que estas vias não são completamente independentes, mas que se cruzam e que a ativação da via extrínseca pode levar à ativação da via intrínseca.

Conteúdos a desenvolver:

Este tema inicia-se pela definição de caspases, características proteicas, função principal (endoproteases) e seus alvos moleculares. Apresenta-se a classificação das caspases com base na sua função no processo de apoptose (iniciadoras e executoras) e menciona-se também a função de caspases nas vias inflamatórias e a classificação de caspases inflamatórias. Refere-se que na célula as caspases existem numa forma inativa (pró-caspases) e que a sua ativação é regulada intracelularmente, requerendo dimerização (na caspase-8 e -9) ou clivagem (*e.g.* caspase-3), e que os mecanismos de ativação são diferentes entre elas. Refere-se a família de proteínas BCL-2, e as várias proteínas da família (anti-apoptóticas e pró-apoptóticas) e a sua importância na regulação da apoptose, nomeadamente a sua ação na regulação da permeabilidade da mitocôndria e na ativação de caspases. E distinguem-se as duas vias de apoptose, evidenciando os diferentes mecanismos de ativação e suas vias celulares.

Via extrínseca (apoptose por estímulos externos). Mensageiros externos que iniciam a via, como a proteína TNF (*tumor necrosis factor*) que é produzida por algumas células do sistema imunitário, e que se liga a um receptor membranar (TNFR), e o modo como se ativam os domínios de morte associados a este receptor (localizados intracelularmente). Descreve-se o envolvimento da caspase-8 (iniciadora) e a subsequente ativação das caspases executoras da apoptose. Dão-se exemplos de células e situações em que esta via pode ser ativada.

Via intrínseca (apoptose por estímulos internos). Também designada de apoptose mitocondrial pelo facto de ter origem em fatores libertados pela mitocôndria. Mensageiros ou sinais internos que iniciam a apoptose. Sinais, tais como exposição a hipoxia, toxinas, radiação, espécies reativas de oxigénio (ROS), vírus, entre outros, podem iniciar a apoptose. Caspase-9, como a caspase iniciadora da apoptose intrínseca, forma de ativação e, uma vez ativada, seus alvos moleculares. Alterações na permeabilidade mitocondrial: causas, consequências e fatores libertados para o citoplasma. Apoptossoma. Forma de ativação da procaspase-3 (executora). Esta aula é ilustrada com esquemas da via completa, de forma que os estudantes correlacionem as várias etapas do processo.

Indicação de que, por regra, não há danos nos tecidos laterais. Após o processo, todos os “restos” celulares serão fagocitados.

Será ainda feita uma breve alusão a outras formas de morte celular: i) **piroptosis**, como apoptose causada por microrganismos (*e.g. Salmonella*) em macrófagos, que também gera sinais inflamatórios libertados para o meio exterior. ii) **autofagia**, como processo destinado a proteger e matar células sob stresse; onde os seus componentes internos são sequestrados nos lisossomas para serem digeridos. iii) **necroptosis**, mecanismo de necrose regulada por fatores celulares; mediada por ativação do receptor de morte (ativado também por TNF). Nestes mecanismos, será dada unicamente uma breve abordagem ao tema, com a indicação da sua relevância em UCs de segundo ciclo (dependendo do qual ingressem).

AULA 30: REVISÕES

Esta aula fica reservada para o caso de haver, ao longo do semestre letivo, algum feriado coincidente com a aula T. Caso não haja será para fazer uma revisão e integração dos vários temas teóricos.

3.2. CONTEÚDOS DO PROGRAMA PRÁTICO

AULA 1| INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE FUNCIONAMENTO DAS AULAS PRÁTICAS

Na primeira aula laboratorial, os alunos familiarizam-se com o espaço do laboratório, sendo-lhes indicadas as normas de segurança e procedimentos a tomar caso haja necessidade. Alertam-se os alunos para a necessidade de trazerem sempre bata, como modo de proteção. Relembra-se todas as regras de conduta a ter no espaço laboratorial.

Faz-se um resumo dos vários protocolos experimentais a realizar ao longo do semestre, e indicam-se as componentes de avaliação prática (relembrar, dado o assunto já ter sido abordado na 1ª aula teórica), com os vários pesos relativos na classificação final. Constituem-se os grupos de trabalho (ideal 3 alunos por grupo), e sorteiam-se os temas para os trabalhos escritos (TG-E) e apresentações orais (TG-O), indicam-se as regras de elaboração e apresentação dos mesmos. É dada a oportunidade a cada grupo, caso o tema não seja do seu agrado, de escolher outro tema (dentro do programa da UC), ou de escolher um protocolo experimental para o apresentar de forma mais detalhada, os estudantes têm 15 dias para indicar ao docente a sua decisão sobre o tema de trabalho de grupo. Ensinam-se os alunos a pesquisar temas e material de estudo, nas páginas web (*e.g.*, *ISI web of Knowledge* e *PUBMed*), e dão-se noções básicas sobre citação de fontes bibliográficas.

AULA 2| PL1: ESFINGOLÍPIDOS E GRUPOS SANGUÍNEOS (SISTEMA ABO)

Objetivos da aula PL:

- Entender que alguns esfingolípido funcionam como moléculas de reconhecimento celular (antígenes).
- Entender que os diferentes esfingolípidos, responsáveis pelos antígenos H, A e B, dependem da existência de enzimas específicas.
- Determinar/relacionar os grupos sanguíneos da população da turma e comparar a amostra com a distribuição de grupos sanguíneos na população nacional.
- Relacionar com o tipo de glicolípidos presentes nos eritrócitos.

Resumo: Nesta aula prática, após um resumo do que foi dado na aula teórica sobre glicolípidos (em particular esfingolípidos) sua estrutura e função, os alunos que não saibam e que queiram saber o seu grupo sanguíneo são convidados a fazê-lo. Este primeiro trabalho prático é opcional (na sua realização), contudo todos os alunos têm de assistir a toda a aula, de visualizar os resultados e de os interpretar. Assim, pretende-se avaliar de forma simples o grupo sanguíneo de cada aluno (voluntários), recorrendo a soros anti-A, anti-B e anti-D (fator *Rhesus*), e a três gotas de sangue de cada voluntário. Cada estudante (voluntário) manuseia todo o seu material, desde o início (picada no dedo indicador) até à eliminação, para contentor apropriado, de todo o material usado. Após esta parte experimental, constroem-se tabelas com os resultados obtidos na amostra da turma, e faz-se a análise e discussão dos mesmos.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 1**).

AULA 3| PL 2: DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE SELETIVA DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS A ANIÕES

Objetivo:

- Aprender a isolar eritrócitos a partir de uma amostra de sangue, mantendo a sua integridade física.
- Observar a seletividade da membrana a diferentes iões, pela capacidade destes em produzir transição da oxi-hemoglobina em meta-hemoglobina, recorrendo a espectrofotometria.
- Avaliar as alterações na integridade dos eritrócitos, por exposição a diferentes iões.

Resumo: Esta aula inicia-se com a preparação de uma suspensão de eritrócitos (origem canina ou caprina, a partir de uma amostra de sangue fornecida pelo HV-UTAD¹⁹), livre de proteínas plasmáticas (lavagem da amostra de sangue usando solução isotónica, seguida de centrifugação). A suspensão de eritrócitos é exposta a iões (aniões mono-, di- e trivalentes). Após incubação, faz-se o estudo da seletividade do transporte de aniões mono-, di- e trivalentes através da membrana do eritrócito, registando alterações de cor

¹⁹ HV-UTAD – Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

da suspensão (observação visual); e pelo registo de absorvência a 406 e a 500 nm (picos de absorção da meta-hemoglobina) e 413 e 577 nm (picos de absorção da oxi-hemoglobina), durante 15 minutos.

Este protocolo é baseado em: Adans, P. Black, D. (1990). Selective ion transport across biological membranes. *J. Chem. Educ.* 67(6):526-527.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 2**).

AULA 4| PL3: ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE CELULAR EM PRESENÇA DE DETERGENTES

Objetivo:

- Pretende-se que o estudante adquira conhecimento prático sobre a relação entre estrutura molecular de um dado detergente e a sua capacidade/facilidade em interagir com membranas biológicas.
- Determinar, e entender o significado de concentração mínima de detergente necessária para induzir lise celular, correlacionar com a estrutura química do detergente e sua interação com as membranas.
- Entender o conceito de concentração micelar crítica.
- Identificar detergentes desnaturantes e não-desnaturantes.

Resumo: Esta aula inicia-se com a preparação da suspensão de eritrócitos (lavagem em solução isotónica, centrifugação e diluição). Avaliação da atividade de diferentes concentrações de detergente sobre a membrana de eritrócitos, usando os detergentes: Triton X-100 (não-iónico); dodecilsulfato de sódio (SDS; aniónico) e CHAPS²⁰ (zwitteriónico), através da lise celular, medida pela libertação de hemoglobina (análise espectrofotométrica a 540 nm, após centrifugação). Avaliação do efeito desnaturante ou não do detergente, pela alteração de cor da suspensão (e do centrifugado).

²⁰ CHAPS, IUPAC: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamónio]-1-propanosulfonato, (do inglês 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate).

No final da aula o estudante tem de saber avaliar o efeito da concentração de detergente e do tipo de detergente sobre a membrana dos eritrócitos.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 3**).

AULA 5| TP: ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS PROTOCOLOS ANTERIORES

Objetivo:

- Estimular à discussão de resultados obtidos nas aulas anteriores, entre os vários estudantes.
- Permitir aos estudantes aferirem sobre a reprodutibilidade de resultados entre os vários grupos feitos nas aulas, e quando não há estimular à análise das principais razões para que não tenha havido (erros inerentes a medição temporal, de pipetagem, de manuseio, etc...)
- Assegurar que todos os estudantes resolveram os questionários que constam no final do protocolo e que entenderam os procedimentos experimentais bem como os resultados obtidos.

Resumo: Dado que os protocolos 2 e 3 (PL 2 e PL3) são extensos devido às várias centrifugações necessárias, as 2 h de aula são à justa para a elaboração do trabalho prático, não sobrando tempo para a completa análise e interpretação dos resultados, que se considera ser o mais importante dos trabalhos práticos bem como a familiarização com os métodos e metodologias experimentais. Assim, esta aula é destinada à análise de todos os resultados obtidos nos protocolos 1 a 3, à discussão e interpretação dos mesmos, dando sempre a palavra aos estudantes e motivando a discussão entre estes.

Estas aulas são sempre muito produtivas para os estudantes dado que lhes garantem ter material de estudo para os testes práticos, e ao mesmo tempo motiva-os para o trabalho experimental e para a interpretação de resultados.

AULA 6| PL 4: ISOLAMENTO DE *GHOSTS***Objetivo:**

- Aprender a obter material biológico para estudo de atividade de transportadores.
- Aprender a avaliar os passos críticos da obtenção de material biológico.
- Entender que o processo de auto-associação da membrana celular (após rutura da mesma com esvaziamento do conteúdo celular), conduz à obtenção de estruturas que preservam gradientes eletroquímico e transporte iónico.

Resumo: Este trabalho inicia-se com a preparação de uma suspensão de eritrócitos (a partir de sangue bovino), de modo idêntico ao realizado nos protocolos anteriores, com a diferença de agora manusearem um volume maior. Após a obtenção de uma suspensão de eritrócitos, procede-se à lise destes num meio hiposmótico para a obtenção dos *ghosts* (membranas plasmáticas de eritrócitos). Remoção de toda a hemoglobina (lavagem e centrifugação). Ressuspensão dos *ghosts* na solução isosmótica. Determinação da quantidade de proteína, usando o método de Biureto. Congelar para utilizar na aula seguinte.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 4**).

AULA 7| PL 5: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na^+/K^+ ATPASE EM *GHOSTS*.**Objetivo:**

- Avaliar a atividade da Na^+/K^+ -ATPase em *ghosts*
- Estudar a dependência da atividade com substratos.
- Estudar o efeito de inibidores.

Resumo: Nesta aula usam-se os *ghosts* preparados na aula anterior. A atividade da Na^+/K^+ -ATPase é medida pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) produzido no meio de reação, como resultado da hidrólise de ATP (substrato da Na^+/K^+ -ATPase). A quantificação de Pi é realizada por espectrofotometria, com recurso a uma reta padrão, e

usando molibdato de amônio, que em presença de Pi forma fosfomolibdato, que após redução por ação de sulfato ferroso apresenta cor azul, permitindo a quantificação a 660 nm. Neste trabalho a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e sua modulação, será feita usando meios de reação com (ou sem): ATP, TCA (ácido tricloro-acético), Ouabaína, e outros.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 5**).

AULA 8| TP: ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS PROTOCOLOS ANTERIORES

Objetivo:

- Estimular à discussão de resultados obtidos nas duas aulas anteriores.
- Permitir aos estudantes aferirem sobre a reprodutibilidade de resultados obtidos pelos vários grupos de alunos. Estimular à análise das principais razões para o caso de não ter havido resultados idênticos (erros inerentes a medição temporal, de pipetagem, de manuseio, etc...).
- Assegurar que todos os estudantes resolveram os questionários que constam no final do protocolo e que entenderam os procedimentos experimentais bem como os resultados obtidos.

Resumo: Dado que os protocolos 4 e 5 (PL 4 e PL5) são extensos devido às várias centrifugações necessárias (PL 4) e aos tempos de reação necessários (PL 5), as 2 h de aula são à justa para a elaboração do trabalho prático, não sobrando tempo para a completa análise e interpretação dos resultados, que se considera ser o mais importante dos trabalhos práticos bem como a familiarização com os métodos e metodologias experimentais. Assim, esta aula é destinada à análise de todos os resultados obtidos nos protocolos 4 a 5, à discussão e interpretação dos mesmos, dando sempre a palavra aos estudantes e motivando a discussão entre estes.

AULA 9| TP: INTRODUÇÃO À CULTURA DE CÉLULAS.**Objetivo:**

- Fornecer os conceitos básicos de cultura de células animais.
- Apresentar as potencialidades da cultura celular em estudos de Fisiologia Celular.
- Apresentar as vantagens e desvantagens da utilização da cultura celular.

Resumo: Esta aula é de índole teórico-prática com recurso a apresentação em PowerPoint, com imagens de todos os tópicos abordados. **Tópicos a abordar:** i) Instrumentos e equipamentos necessários; ii) Cuidados no manuseio de meios e utensílios; iii) Culturas primárias e linhas celulares, modos de obtenção e de manutenção; iv) Culturas aderentes e em suspensão; v) Passagem de células; vi) Contagem de células e métodos de viabilidade; exemplificar com a câmara de Neubauer e a coloração com azul de tripano (*Trypan Blue*). Esta aula termina com a exibição de fotos de várias culturas celulares para que os alunos se apercebam das diferenças de crescimento (monocamada vs agregados; cultura aderente vs em suspensão). Nesta aula dá-se oportunidade aos alunos para se pronunciarem sobre as vantagens e desvantagens do uso de culturas celulares para o estudo de Fisiologia Celular.

AULA 10| TP: MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO, MARCAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE PROTEÍNAS: IMUNOCITOQUÍMICA E WESTERN BLOT**Objetivo:**

- Apresentar aos estudantes métodos para a extração, marcação e quantificação relativa de proteínas, que pela sua morosidade não se conseguem realizar no espaço de 2 h.
- Apresentar os procedimentos base da técnica de western blot.
- Apresentar os procedimentos base da técnica de imunocitoquímica.

- Ilustrar estes métodos, com resultados extraídos da literatura, mostrando imagens de imunocitoquímica de proteínas estudadas nas aulas teóricas (e.g. citoesqueleto de actina, receptores) e de imagens de resultados de western blot.

Resumo: Dada a importância da imunocitoquímica e da eletroforese com transferência e marcação de proteínas com anticorpos (western blot) em Fisiologia Celular, e pelo facto de estas técnicas além de dispendiosas também serem muito demoradas, opta-se por introduzir estas metodologias de forma teórico-prática, onde se mostram os equipamentos/instrumentos e materiais necessários para as realizar e se explicam os procedimentos base dos mesmos, desde a exposição de células a agentes moduladores da Fisiologia Celular até à obtenção dos resultados, sem que seja necessário o aluno realizar o procedimento experimental.

Demonstração da realização de todos os passos de imunocitoquímica, usando células em cultura aderidas a lâminas (sem usar anticorpo). Visualização de imagens obtidas usando o microscópio de fluorescência de lâminas previamente realizadas (resultados de trabalho de investigação).

Indicação de todos os passos necessários para o western blot, usando células em cultura. Visualização de resultados previamente realizados (resultados de trabalho de investigação).

O material de apoio a esta aula inclui o PowerPoint preparado para aula, artigos científicos e capítulos de livros.²¹

²¹ Exemplo de material de apoio a esta aula:

i) Carlos Martins-Gomes & Amélia M. Silva (2018). Western blot methodologies for analysis of *in vitro* protein expression induced by teratogenic agents *In: Teratogenicity Testing. Methods and Protocols* (Series), Volume 1797 (Series Title: *Methods in Molecular Biology*). Ed. Luís Félix. Publisher: Humana Press-Springer Science Business Media; N.Y., USA. Chap. 9, pp. 191-213. Hardcover ISBN: 978-1-4939-7882-3. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_9.

ii) Silva, A.M.; Rodrigues, R.J.; Tomé, A.R.; Cunha, R.A.; Mislér, S.; Rosário, L.M. & Santos, R.M. (2008). Electrophysiological and immunocytochemical evidence for P2X purinergic receptors in pancreatic β -cells. *Pancreas* **36(3)**: 279-283. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31815a8473

AULA 11| PL 6: DETECÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ATP USANDO A TÉCNICA DE LUMINESCÊNCIA DA LUCIFERINA/LUCIFERASE**Objetivo:**

- Detetar a exocitose usando a quantificação de ATP pela técnica de luminescência da luciferina/luciferase;
- Avaliação do papel do Ca^{2+} extracelular no processo de exocitose.

Resumo: Este trabalho recorre à utilização de células em cultura (e.g. células cromafins, células PC12) ou sinaptossomas (caso haja disponibilidade desse material biológico). As células cromafins da glândula supra-renal são células muito usadas como modelo de neurosecreção. Nestas células os grânulos secretores contêm, além de catecolaminas, ATP. Neste trabalho as células serão estimuladas com acetilcolina, na presença e na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular. Está também prevista a avaliação da contribuição de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem para as respostas secretoras mediadas por este estímulo. O ATP libertado é quantificado por luminescência como resultado da oxidação de luciferina por luciferase, usando um luminómetro. Em alternativa à luminescência podem colher-se os sobrenadantes para análise do conteúdo em catecolaminas por HPLC.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 6**).

AULA 12| TP: ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DO PROTOCOLO ANTERIOR**Objetivo:**

- Estimular à discussão de resultados obtidos na aula prática anterior.
- Auxiliar nos vários cálculos solicitados no final do protocolo.
- Permitir aos estudantes aferirem sobre a reprodutibilidade de resultados obtidos pelos vários grupos de alunos. Estimular à análise das principais razões para o caso de não ter havido resultados idênticos (erros inerentes a medição temporal, de manuseio, etc...).

- Assegurar que todos os estudantes resolveram os questionários que constam no final do protocolo e que entenderam os procedimentos experimentais bem como os resultados obtidos.

Resumo: Dado que o protocolo 6 (PL 6) é extenso, as 2 h de aula são à justa para a elaboração de todo o trabalho prático, não sobrando tempo para a completa análise e interpretação dos resultados, que se considera ser uma das mais-valias dos trabalhos práticos. Assim, esta aula é destinada à análise dos resultados obtidos no protocolo 6, à discussão e interpretação dos mesmos, dando sempre a palavra aos estudantes e motivando a discussão entre estes.

AULA 13| PL 7: AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR ATRAVÉS DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE.

Objetivo:

- Avaliar o dano celular pela medição da atividade de enzimas citosólicas libertadas para o sobrenadante.
- Compreender a versatilidade e transversalidade deste método, para uso em vários tipos de células.
- Correlacionar extensão de dano celular com a atividade da enzima Lactado Desidrogenase (LDH).

Resumo: Este protocolo experimental é realizado com recurso a sinaptossomas²², ou a células em cultura (e.g. células aderentes, como Caco-2, HepG2, etc.), e foi baseado na publicação de Cunha (2001)²³. Usar-se-á etanol como indutor de dano, pela exposição das células (em caixas de cultura de 12 poços) ou de sinaptossomas (distribuídos por vários tubos de ensaio; ver PL 7) a várias concentrações de etanol. Após incubação (durante 15 minutos), avalia-se a atividade da LDH nos vários sobrenadantes, que resulta de dano celular. Esta atividade é expressa em função da LDH total (a LDH do

²² Somente no caso de haverem trabalhos de investigação em curso que utilizem animais de laboratório (ratos ou murganhos) em que não se utilizem os cérebros desses animais. Caso não aconteça, não serão sacrificados animais para as aulas práticas e esta aula será realizada com recurso a células em cultura.

²³ Cunha, R. A. (2001). Bringing the brain into the test tube: an experiment illustrating the effect of ethanol on nerve terminal viability. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29 (2001) 105-109.

sobrenadante + LDH das células que não sofreram dano (no final do ensaio as células que não sofreram dano serão lizadas por ação de detergente). Nesta aula faz-se a quantificação da proteína usando o método de Bradford de forma a normalizar os resultados.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 7**).

AULA 14 | PL 8: QUANTIFICAÇÃO DO MENSAGEIRO CELULAR ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Objetivo:

- Neste trabalho pretende demonstrar-se que é possível determinar a quantidade de óxido nítrico libertado por macrófagos, dado que este é espontaneamente convertido em nitrito e este último pode ser detetado através do reagente de Griess, com um simples teste colorimétrico.

Resumo: Neste protocolo prático faz-se a quantificação de NO libertado por células RAW 264.7, linha celular de macrófagos de murganho, quando expostas a lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Testa-se também a capacidade de alguns agentes (e.g. polifenóis) em reduzir a ação de LPS na estimulação da libertação de NO. A quantificação de NO, para cada condição testada, será realizada com base numa reta de calibração usando o reagente de Griess. Neste trabalho, o mais importante é a análise e interpretação de resultados, assim, dada a extensão do trabalho este pode ser dividido em duas partes, e realizado em dias contínuos por turmas distintas, sendo que todos terão acesso aos resultados finais.

Nota: o protocolo prático desta aula encontra-se em anexo (Anexo 1: **PL 8**).

AULA 15| TP: ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DOS PROTOCOLOS ANTERIORES**Objetivo:**

- Estimular à discussão de resultados obtidos na aula prática anterior.
- Permitir aos estudantes aferirem sobre a reprodutibilidade de resultados obtidos pelos vários grupos de alunos. Estimular à análise das principais razões para o caso de não ter havido resultados idênticos (erros inerentes a medição temporal, de pipetagem, de manuseio, etc...).
- Assegurar que todos os estudantes resolveram os questionários que constam no final do protocolo e que entenderam os procedimentos experimentais bem como os resultados obtidos.

Resumo: Dado que a componente experimental dos dois protocolos anteriores é extensa e a análise dos resultados obtidos compreendem vários cálculos, de alguma complexidade, esta aula destina-se a ensinar a auxiliar nos cálculos e na interpretação dos resultados.

3.2.1.1. APRESENTAÇÕES ORAIS DOS TRABALHOS DE GRUPO.

Conteúdo: Apresentações orais dos alunos com discussão dos temas entre alunos e docentes. No final do semestre letivo, serão agendadas duas ou três tardes, de acordo com o número de grupos, para apresentação e discussão dos trabalhos de grupo. Os alunos, de cada grupo, terão igual tempo para apresentar uma parte do trabalho (todos devem expor oralmente). No final da apresentação, os estudantes são sujeitos a questões sobre o trabalho, feitas quer pelo(s) docente(s) da UC quer pelos outros estudantes.

4. BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

A Bibliografia geral engloba vários livros de texto (a maioria disponível na biblioteca da UTAD), onde vários dos seus capítulos englobam os vários temas lecionados nas aulas. A Bibliografia específica, engloba artigos científicos, sobre assuntos específicos das aulas e que a docente coloca na área dos *downloads* do SIDE, para consulta complementar, não sendo necessária a leitura completa dos mesmos, mas somente das partes indicadas durante as aulas (teóricas e práticas).

4.1. BIBLIOGRAFIA GERAL (POR ORDEM ALFABÉTICA)

(*) ALBERTS, (E OUTROS), 2014. **Molecular Biology of the cell**. Garland Science, New York. 6th edition. ISBN-10: 0815345240

ASHCROFT, F.M. (2000). **Ion Channels and Diseases**. Academic Press. ISBN-10: 0120653109

(*) COOPER, G.M. (2018). **The Cell: a molecular approach**. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press. 8th edition. ISBN-10: 1605357073

FINDLAY, J.B.C, Evans, W.H. (1987). **Biological Membranes. A practical approach**. Oxford University Press, Oxford. ISBN-10: 0947946845

(*) KARP, G., IWASA, J., MARSHALL, W. (2015). **Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments**. Wiley, 8th Edition. ISBN-10: 1118886143

(*) KARP, G., IWASA, J., MARSHALL, W. (2020). **Karp's Cell and Molecular Biology**. Wiley, 9th Edition. ISBN-10: 1119598281

(*) LODISH, H. (2016). **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman. 8th edition. ISBN-10: 1464183392

SPERELAKIS, N. (2011). **Cell Physiology Sourcebook. A molecular Approach**. Academic Press; 4th Edition. ASIN: B0074666E2

(*) – Os mais relevantes.

4.1.1. LISTA DE LIVROS DE ACESSO LIVRE ON-LINE

Da bibliografia geral apresentada aos estudantes, é também indicado que versões anteriores de alguns livros estão acessíveis on-line o que lhes facilita a consulta.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, And Peter Walter. Molecular Biology Of The Cell, 4th Edition

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>

Geoffrey M Cooper- The Cell: A Molecular Approach; 2nd edition. Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. Molecular Cell Biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. ISBN-10: 0-7167-3136-3

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>

4.2. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Para a componente teórica:

Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., (...) Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, **542**(Pt 1), 3-16. doi: 10.1113/jphysiol.2002.020818

Astier, J., Gross, I., & Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update. *J Exp Bot*, **69**(14), 3401-3411. doi: 10.1093/jxb/erx420

Barbosa, R. M., Silva, A. M., Tomé, A. R., Stamford, J. A., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (1996). Real time electrochemical detection of 5-HT/insulin secretion from single pancreatic islets: effect of glucose and K⁺ depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**(1), 100-104. doi: 10.1006/bbrc.1996.1622

Barbosa, R. M., Silva, A. M., Tomé, A. R., Stamford, J. A., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J Physiol*, **510**(Pt 1)(Pt 1), 135-143. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.135bz.x

Dedman, J. R., & Kaetzel, M. A. (2001). 10 - Calcium as an Intracellular Second Messenger: Mediation by Calcium-Binding Proteins. In N. Sperelakis (Ed.), *Cell Physiology Source Book* (Third Edition) (pp. 167-177). San Diego: Academic Press.

- Erlandson, S. C., McMahon, C., & Kruse, A. C. (2018). Structural Basis for G Protein–Coupled Receptor Signalling. *Annual Review of Biophysics*, **47**(1), 1-18. doi: 10.1146/annurev-biophys-070317-032931
- Frye, L. D., & Edidin, M. (1970). The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons. *Journal of Cell Science*, **7**(2), 319.
- Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., & Kusumi, A. (2002). Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *The Journal of Cell Biology*, **157**(6), 1071-1081. doi: 10.1083/jcb.200202050
- Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B. L., Philippsen, A., Grubmüller, H., Agre, P., & Engel, A. (2002). Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol*, **12**(4), 509-515. doi: 10.1016/s0959-440x(02)00355-x
- Gáborik, Z., & Hunyady, L. (2004). Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*, **15**(6), 286-293. doi: 10.1016/j.tem.2004.06.009
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, **25**(3), 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, **391**(2), 85-100. doi: 10.1007/BF00656997
- Heidstra, R., & Sabatini, S. (2014). Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**(5), 301-312. doi: 10.1038/nrm3790
- Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., & Williams, B. (2017). The Life and Death of a Plant Cell. *Annu Rev Plant Biol*, **68**, 375-404. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111655
- Kaushik, V., Yakisich, J. S., Kumar, A., Azad, N., & Iyer, A. K. V. (2018). Ionophores: Potential Use as Anticancer Drugs and Chemosensitizers. *Cancers*, **10**(10), 360. doi: 10.3390/cancers10100360
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*, **1768**(4), 794-807. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.10.021
- Laranjinha, J., Nunes, C., Ledo, A., Lourenço, C., Rocha, B., & Barbosa, R. M. (2020). The Peculiar Facets of Nitric Oxide as a Cellular Messenger: From Disease-Associated Signaling to the Regulation of Brain Bioenergetics and Neurovascular Coupling. *Neurochemical Research*. doi: 10.1007/s11064-020-03015-0
- Lengger, B., & Jensen, M. K. (2020). Engineering G protein-coupled receptor signalling in yeast for biotechnological and medical purposes. *FEMS Yeast Research*, **20**(1). doi: 10.1093/femsyr/foz087

- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. L., & Phair, R. D. (2018). The Development and Enhancement of FRAP as a Key Tool for Investigating Protein Dynamics. *Biophysical Journal*, 115(7), 1146-1155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.007>
- Ma, L., Bindokas, V. P., Kuznetsov, A., Rhodes, C., Hays, L., Edwardson, J. M., . . . Philipson, L. H. (2004). Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(25), 9266. doi: 10.1073/pnas.0403201101
- Misler, S., Silva, A. M., Barnett, D., & Dickey, A. S. (2009). Phasic and tonic modes of depolarization-exocytosis coupling in beta-cells of porcine islets of Langerhans. *Channels (Austin)*, **3**(2), 101-109. doi: 10.4161/chan.3.2.7866
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 1992;256(5055):385-387.
- Rosário, L. M., Barbosa, R. M., Antunes, C. M., Baldeiras, I. E., Silva, A. M., Tomé, A. R., & Santos, R. M. (2008). Regulation by glucose of oscillatory electrical activity and 5-HT/insulin release from single mouse pancreatic islets in absence of functional K(ATP) channels. *Endocr J*, **55**(4), 639-650. doi: 10.1507/endocrj.k07e-131
- Sablowski, R. (2004). Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends in Cell Biology*, **14**(11), 605-611. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.011>
- Silva, A. M. (2003). Receptores P2 e modulação da atividade secretora da célula β pancreática”. Tese de Doutoramento, FCTUC, Universidade de Coimbra, Portugal, (300 páginas).
- Silva, A. M., Dickey, A. S., Barnett, D. W., & Misler, S. (2009). Ion channels underlying stimulus-exocytosis coupling and its cell-to-cell heterogeneity in beta-cells of transplantable porcine islets of Langerhans. *Channels (Austin)*, **3**(2), 91-100. doi: 10.4161/chan.3.2.7865
- Silva, A. M., Liu-Gentry, J., Dickey, A. S., Barnett, D. W., & Misler, S. (2005). alpha-Latrotoxin increases spontaneous and depolarization-evoked exocytosis from pancreatic islet beta-cells. *J Physiol*, **565**(Pt 3), 783-799. doi: 10.1113/jphysiol.2005.082586
- Silva, A.M.; Pedroso de Lima, J.J. (2005). Biofísica de Membranas: I-Exercícios Teórico Práticos. Série Didáctica-Ciências Aplicadas Nº275, UTAD, ISBN 972-669-685-2.
- Silva, A. M., Rodrigues, R. J., Tomé, A. R., Cunha, R. A., Misler, S., Rosário, L. M., & Santos, R. M. (2008). Electrophysiological and immunocytochemical evidence for P2X purinergic receptors in pancreatic beta cells. *Pancreas*, **36**(3), 279-283. doi: 10.1097/MPA.0b013e31815a8473
- Silva, A. M., Rosário, L. M., & Santos, R. M. (1994). Background Ca^{2+} influx mediated by a dihydropyridine- and voltage-insensitive channel in pancreatic beta-cells. Modulation by Ni^{2+} , diphenylamine-2-carboxylate, and glucose metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(25), 17095-17103. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32525-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32525-5)

- Sleight, R.G. & Lieberman, M.A. (2001). Signal Transduction. In Cell Physiology Sourcebook: A molecular Approach. 3ª Edição, Sperelakis, Academic Press. Cap.9. Pp.153–165.
- Trimble, W. S., & Grinstein, S. (2015). Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, **208**(3), 259-271. doi: 10.1083/jcb.201410071
- Tuteja, N. (2009). Signalling through G protein coupled receptors. *Plant Signalling & Behaviour*, **4**(10), 942-947. doi: 10.4161/psb.4.10.9530
- Westbrook, G.L. (2001). Ligand-Gated Ion Channels. In Cell Physiology Sourcebook: A molecular Approach. 3ª Edição, Sperelakis, Academic Press. Cap.40. Pp.675–687.
- Wilson, I., Vogel, J., & Somerville, S. (1997). Signalling pathways: a common theme in plants and animals? *Curr Biol*, **7**(3), R175-178. doi: 10.1016/s0960-9822(97)70082-4

Para a componente prática:

- Adams, P. & Black, D. (1990). Selective Ion Transport across Biological Membranes. *Journal of Chemical Education* **67**(6): 526-527.
- Albillos, A., & McIntosh, J.M. (2018). Human nicotinic receptors in chromaffin cells: characterization and pharmacology. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, **470**(1), 21–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2073-0>
- Antosova, M., Plevkova, J., Strapkova, A. & Buday, T. (2012) Nitric oxide—Important messenger in human body. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, **2**, 98-106. doi: 10.4236/ojmip.2012.23014.
- Boldyrev, A. & E. Kurella (1996). Mechanism of oxidative damage of dog kidney Na,K-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **222**: 483 48
- Burton, G.W., Ingold, K.U. & Thompson, K.E. (1981). An improved procedure for the isolation of ghost membranes from human red blood cells. *Lipids*. **16**(12):946. doi: 10.1007/BF02535005. PMID: 7329217.
- Martins-Gomes, C. & Silva, A. M. (2018). Western blot methodologies for analysis of in vitro protein expression induced by teratogenic agents. *In: Teratogenicity Testing. Methods and Protocols (Series)*, Vol. 1797 (Series Title: Methods in Molecular Biology). Ed. L. Félix. Publisher: Humana Press-Springer Science Business Media; N.Y., USA. Chap. 9, pp. 191-213. Hardcover ISBN: 978-1-4939-7882-3. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_9.
- Cooper, Terrance G. (1977). The tools of Biochemistry. Ed John Wiley and Sons, New York
- Cunha, R.A. (2001), Bringing the brain into the test tube: an experiment illustrating the effect of ethanol on nerve terminal viability. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **29**: 105-109. <https://doi.org/10.1111/j.1539-3429.2001.tb00087.x>
- Duarte, C.B., Rosario, L.M., Sena, C.M. & Carvalho, A.P. (1993), A Toxin Fraction (FTX) from the Funnel-Web Spider Poison Inhibits Dihydropyridine-Insensitive Ca²⁺ Channels

- Coupled to Catecholamine Release in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 60: 908-913. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03236.x>
- Erdman, E., Boltz H. & Lüderitz B. (1971). The Na,K-ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency. *Arch. Bioch. Biol.*, 145: 121 -125.
- Findlay, J.B.C & Evans, W.H. (1987) Biological Membranes - a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Kumar P, Nagarajan A. & Uchil P.D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018 Jun 1;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095497. PMID: 29858337.
- Layne E. (1957). Methods in Enzymology (Colowick S.P. and Kaplan N. O., Eds). Academic Press, New York, Vol. 3, 447441
- Leone, F.A., Lucena, M. N., Fabri, L. M., Garçon, D. P., Fontes, C. F. L., Faleiros, R. O., Moraes, C. M. & McNamara, J. C. (2020). Osmotic and ionic regulation, and modulation by protein kinases, FXD2 peptide and ATP of gill (Na⁺, K⁺)-ATPase activity, in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **250**: 110507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110507>
- Plummer, D.T. (1978) An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd edition. McGraw-Hill, London.
- Shehadul Islam, M.; Aryasomayajula, A. & Selvaganapathy, P.R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* **2017**, 8, 83.
- Silva AM, Martins-Gomes C, Souto EB, Schäfer J, Santos JA, Bunzel M & Nunes FM. (2020). *Thymus zygis* subsp. *zygis* an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities. *Antioxidants*. 2020; **9**(6):482. doi:10.3390/antiox9060482
- Silva, A.M.; Rodrigues, R.J.; Tomé, A.R.; Cunha, R.A.; Misler, S.; Rosário, L.M. & Santos, R.M. (2008). Electrophysiological and immunocytochemical evidence for P2X purinergic receptors in pancreatic b-cells. *Pancreas* **36**(3): 279-283. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31815a8473
- Taussky, B.H. & P. Shorr (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **202**: 675-685.
- Teow, SY., Liew, K., Che Mat, M. *et al.* (2019). Development of a luciferase/luciferin cell proliferation (XenoLuc) assay for real-time measurements of Gfp-Luc2-modified cells in a co-culture system. *BMC Biotechnol* **19**, 34 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0528-4>

5. DESEMPENHO PEDAGÓGICO

Nesta secção do relatório, apresentam-se alguns indicadores sobre o desempenho dos alunos na UC de Fisiologia Celular, no que diz respeito a aproveitamento, e também alguns resultados dos questionários pedagógicos que são realizados ao estudante, via plataforma do SIDE, onde estes expressam a sua opinião sobre o programa, conteúdos e métodos de avaliação desta UC e do respetivo docente.

A análise dos resultados de aproveitamento dos estudantes foi realizada com base na informação alocada no portal de apoio ao ensino, o SIDE, da respetiva UC (<https://side.utad.pt/cursos/biologia/>), e que aí foi colocada pela regente da UC. E, a análise dos inquéritos pedagógicos é realizado pelo Gabinete de Gestão da Qualidade da UTAD, cujos resultados são enviados ao docente, ou alocados no SIDE, na página do docente. Estas informações são de grande relevância, dado que nos permitem reajustar as estratégias de ensino/aprendizagem com o objetivo de melhorar o sucesso escolar, sem prejuízo do rigor e da exigência que é reconhecida pela maioria dos estudantes que frequentam esta UC.

5.1. ESTATÍSTICA DE APROVEITAMENTO ESCOLAR

No Tabela 7 e apresentam-se os dados relativos ao aproveitamento escolar dos estudantes de Biologia, na UC de Fisiologia Celular, dos sete últimos anos letivos (de 2019/2020 a 2013/2014). E, na Figura 1, apresentam-se alguns rácios (em %) que refletem a estatística de aproveitamento, nos últimos sete anos letivos. De acordo os valores apresentados na Figura 1, constata-se que há uma elevada percentagem de alunos aprovados (rácio de aprovados/avaliados), que nestes 7 anos letivos foi sempre acima dos 65%, e em 4 dos 7 anos letivos foi acima de 90%, tendo sido de 100% no ano letivo 2015/2016. Por outro lado, no ano letivo 2015/2016 foi onde se verificou a maior % de estudantes que não cumpriram os requisitos mínimos de admissão a exame, tendo 16% dos estudantes sido não-admitidos. Contudo, verifica-se que a percentagem de estudantes não admitidos é baixa, nos vários anos letivos, a não admissão a exame prende-se com

assiduidade às aulas, em particular às de índole prática, ou falta de entrega dos elementos de avaliação prática.

Tabela 7: Desempenho pedagógico dos estudantes de Biologia na UC de Fisiologia Celular, nos últimos 7 anos letivos. Para cada categoria, faz-se referencia ao número absoluto de estudantes. Fonte: SIDE (estatística de aproveitamento).

Alunos (nº)	Ano letivo						
	2019/2020	2018/2019	2017/2018	2016/2017	2015/2016	2014/2015	2013/2014
Inscritos	30	29	30	30	30	45	35
Admitidos	27	27	26	26	25	40	30
Avaliados	26	26	26	26	21	40	26
Aprovados	21	24	24	20	21	39	18
Reprovados	5	2	2	6	0	1	8
Faltou	1	1	0	0	0	0	4

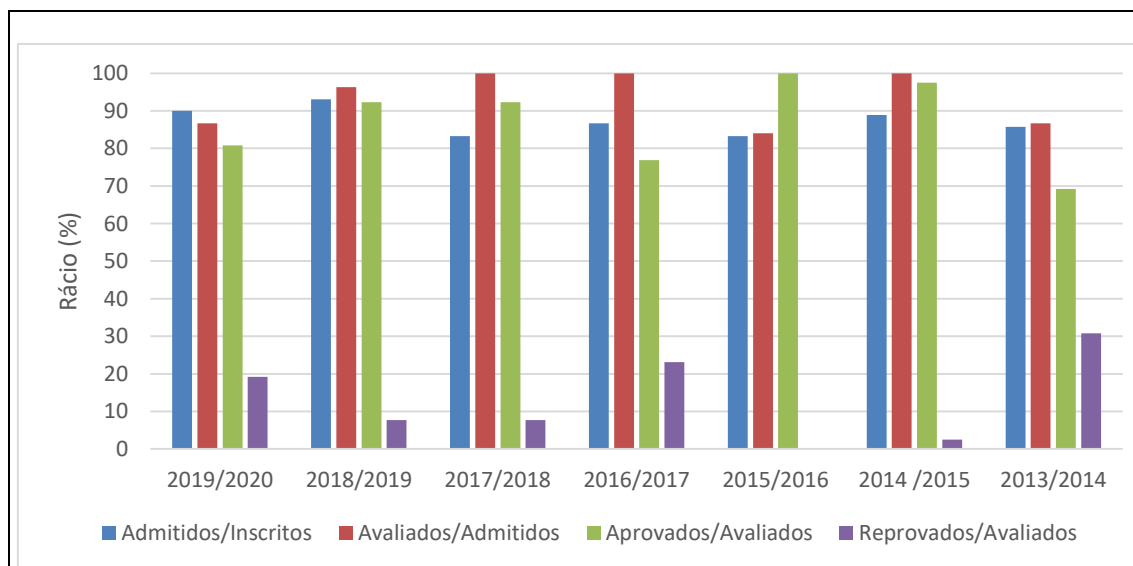


Figura 1: Rácio (em %) de vários indicadores que refletem o desempenho pedagógico dos estudantes do 1º Ciclo em Biologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro na UC de Fisiologia Celular. Fonte: SIDE (estatística de aproveitamento).

Embora não conste nesta informação estatística, é da nossa experiência que a maioria dos estudantes obtém, mais facilmente, aprovação a esta UC, em avaliação contínua, ou em avaliação contínua seguida de avaliação complementar, provavelmente pelo facto de o estudo dos conteúdos ser repartido, permitindo uma melhor assimilação de conhecimentos, e também se constata que os alunos aprovados em avaliação contínua são aqueles que apresentam maior assiduidade e pontualidade, na frequência das aulas de todas as tipologias.

Apesar da elevada taxa de aprovação, a média das classificações obtidas ao longo dos últimos 7 anos letivos situou-se no intervalo entre 10,9 e 13,2 valores (Figura 2), e a classificação máxima entre 13 e 17 valores, no ano letivo 2019/2020 e 2014/2015, respetivamente. Estes valores são, do meu ponto de vista, modestos tendo em conta a importância das competências que se pretendiam que os alunos adquirissem nesta unidade curricular para o seu futuro profissional.

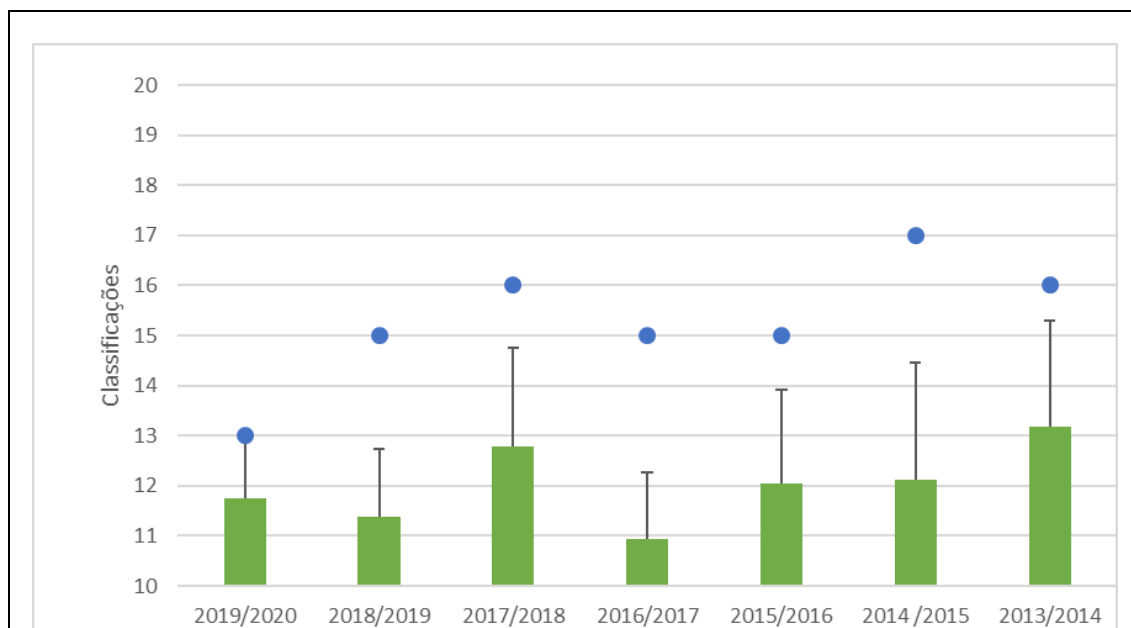


Figura 2: Classificações dos estudantes aprovados na UC de Fisiologia Celular, do curso de 1º Ciclo em Biologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Valores apresentados como média de classificação $\pm$ S.D. (barras a verde), por ano letivo, ao longo dos últimos 7 anos letivos, e a classificação máxima obtido (● a azul). Fonte: SIDE (classificação final) e documentos da docente.

5.2. QUESTIONÁRIO PEDAGÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA UC E DO DOCENTE

Na UTAD, desde 2014/2015, o Gabinete de Gestão da Qualidade (GESQUA) tem vindo a implementar um novo modelo de avaliação das unidades curriculares e dos respetivos docentes. Este consiste na resposta obrigatória a um conjunto de questões por parte dos estudantes. Nos anos letivos anteriores a 2014/2015, a resposta aos inquéritos era facultativa, contudo a amostra de respostas na UC era considerada insuficiente (número de respostas inferior a 4 e/ou a taxa de amostragem inferior 20%), pelo que os inquéritos foram tornados obrigatórios. Os inquéritos são disponibilizados no SIDE. E, após resposta (anónima), o GESQUA faz o tratamento dos resultados e disponibiliza-os aos docentes também na zona do SIDE (resultados da avaliação da UC) ou envia-os por email para os docentes (resultados de avaliação do docente).

5.2.1. AVALIAÇÃO DA UC

No que diz respeito à avaliação das Unidades Curriculares um conjunto de questões são colocadas aos alunos (Quadro 1), onde estes escolhem 1 de 6 opções, numa escala de 1 a 5, onde 1 – Muito Baixa; 2 – Baixa; 3 – Média; 4 – Elevada; 5 – Muito Elevada; e “Sem opinião / Não aplicável.

Quadro 1. Questionário aplicado aos estudantes para avaliação da UC.

Módulo II - Avaliação das Unidades Curriculares
4. Adequação da localização da UC no plano curricular (Ano/Semestre)
5. Articulação entre as várias tipologias (teórica, prática, teórico-prática, seminários) da UC
6. Repetição de conteúdos programáticos com outras UC do mesmo ciclo de estudos ou de outros ciclos de estudo
8. Adequação dos métodos de avaliação utilizados na UC relativamente aos objetivos de aprendizagem definidos para a UC
9. Adequação dos elementos de estudo e bibliografia da UC recomendados
10. Adequação das instalações/equipamentos utilizados para a lecionação da UC. Disponibilização da informação da UC no SIDE (programa, método de avaliação, bibliografia) em tempo útil
11. Grau de satisfação com o funcionamento global da UC

De acordo com o dossier publicado pelo GESQUA, para a avaliação das UCs do 2º Semestre do ano letivo de 2019/2020, o 1º Ciclo em Biologia apresentou 92,86% das UCs com classificação de “médio”, tendo também sido esse o resultado obtido na avaliação de Fisiologia Celular. O ano letivo de 2019/2020 foi um ano atípico devido à pandemia COVID-19, onde foi necessária uma grande adaptação quer por parte dos docentes quer por parte dos alunos, e os resultados nem sempre são os mais favoráveis para ambas as partes. Neste ano letivo, a UC de Fisiologia Celular contou com três docentes na sua leçãoção.

Deste inquérito, realço que, com a exceção do Estágio, o entendimento dos alunos sobre “4. Adequação da localização da UC no plano curricular (Ano/Semestre)” Fisiologia Celular é a UC considera melhor posicionada. Contudo, na apreciação global “11. Grau de satisfação com o funcionamento global da UC”, de certeza que houve coisas que não agradaram a todos os alunos, pela classificação atribuída. Contudo, não estava disponível a percentagem de alunos que respondeu em cada parâmetro.

Quadro 2. Resultados do questionário pedagógico das UCs do 2º Semestre do ano letivo de 2019/2020 do 1º Ciclo em Biologia (dados do GESQUA, obtidos da plataforma do mesmo)

Contagem de nomeDisciplina				classif UC		
Escola	Ciclo	cod_curso	nomeCurso	critica	medio	Excelente
ECVA	1º Ciclo	11	LICENCIATURA EM BIOLOGIA	0,00%	92,86%	7,14%

cod_UC	nomeDisciplina	classif UC	Pontos p4	Pontos p5	Pontos p6	Pontos p7	Pontos p8	Pontos p9	Pontos p10	Pontos p11
1061	MORFOGÉNESE VEGETAL	medio	3,54	3,44	3,71	3,19	3,52	3,13	3,63	3,16
13696	BIOESTATÍSTICA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	medio	3,22	3,76	3,52	3,29	3,61	3,39	3,78	3,41
13670	EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA ANIMAL	medio	3,78	3,88	3,50	3,73	3,83	3,35	3,88	3,79
248	GENÉTICA GERAL	medio	4,00	3,62	3,42	3,44	3,31	3,48	3,70	3,63
1864	BIOLOGIA DOS ANACORDADOS	medio	3,91	3,69	3,39	3,65	3,80	3,46	3,88	3,69
35	FISIOLOGIA VEGETAL	medio	3,53	2,95	2,94	3,18	3,50	3,05	3,90	2,57
990	PLANTAS VASCULARES	medio	3,67	2,92	3,55	3,21	3,45	3,64	3,50	3,20
1103	BIOQUÍMICA E METABOLISMO	medio	3,77	3,00	3,67	3,13	3,82	2,67	4,07	2,75
1898	BIOLOGIA DOS CORDADOS	medio	3,91	2,85	4,18	3,40	3,75	3,00	4,07	3,27
2776	GENÉTICA MOLECULAR	medio	4,08	3,77	3,73	3,40	3,50	3,43	3,93	3,73
1870	FISIOLOGIA CELULAR	medio	4,21	3,57	3,42	3,43	3,85	3,25	4,15	2,93
1948	BIOLOGIA DAS ADAPTAÇÕES EM TRAQUEÓFITAS	medio	4,18	3,29	2,87	3,72	3,71	3,63	4,19	3,89
1899	BIOLOGIA DAS ADAPTAÇÕES EM VERTEBRADOS	medio	3,42	3,07	2,08	3,23	2,85	3,18	3,58	3,07
810	ESTÁGIO	Excelente	4,79	4,50	4,50	4,20	4,20	3,25	4,00	4,00

Não foi possível obter os resultados para os anos letivos de 2018/2019 a 2016/2017; somente estavam disponíveis os resultados dos inquéritos do ano letivo 2015/2016 e que se encontram no Quadro 3. Neste ano letivo, também foram três docentes a lecionar esta UC.

Quadro 3. Resultados do questionário pedagógico de algumas UCs do 2º Semestre do ano letivo de 2015/2016 do 1º Ciclo em Biologia (dados do GESQUA, obtidos da plataforma do mesmo)

cod curso	uc	cod uc	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11
11	BIOQUÍMICA E METABOLISMO	1103	3,95	3,68	3,53	3,61	3,63	3,84	3,65	3,63
11	EMBRIOLOGIA E HISTOLOGIA ANIMAL	987	3,93	3,86	3,50	3,74	3,76	3,60	4,17	3,73
11	ESTÁGIO	810	3,92	0,00	0,00	3,89	4,00	4,08	0,00	4,08
11	FISIOLOGIA CELULAR	1870	3,72	4,06	3,00	3,75	3,94	3,67	4,00	3,80

O GESQUA encontra-se a mudar o sistema de avaliação de UCs e a modificar os questionários pedagógicos, razão pela qual removeu os inquéritos do SIDE, e razão pela qual não foram disponibilizados à candidata.

5.2.1. AVALIAÇÃO DO DOCENTE COM BASE NOS QUESTIONÁRIOS PEDAGÓGICOS

No que diz respeito à avaliação do docente, os estudantes respondem a um conjunto de questões (Quadro 4), na mesma escala (1 a 5, onde 1 – Muito Baixa; 2 – Baixa; 3 – Média; 4 – Elevada; 5 – Muito Elevada; e “Sem opinião / Não aplicável), por cada docente da UC.

Quadro 4. Questionário aplicado aos estudantes para avaliação do docente.

Módulo III – Avaliação dos Docentes
Q12 – Capacidade do docente para motivar os estudantes para a UC;
Q13 – Disponibilidade do docente para esclarecer/atender os estudantes;
Q14 – Utilização adequada das ferramentas digitais para informar e comunicar com os estudantes nas atividades letivas síncronas e assíncronas;
Q15 – Capacidade do docente para transmitir os conhecimentos;

Q16 Grau de cumprimento das regras de avaliação definidas e publicadas na Ficha da Unidade Curricular/SIDE;

Q17 – Grau de cumprimento dos prazos de publicação, em tempo útil, dos resultados das avaliações;

Q18 – Grau de satisfação com o desempenho global do docente.

Notas: **1.** As perguntas do questionário pedagógico do 2^a semestre de 2019/2020 foram adaptadas ao ensino à distância. **2.** Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Crítica quando pelo menos 4 das 7 questões (Q12 a Q18) apresentam médias <3; **3.** Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Excelente quando pelo menos 6 das 7 questões apresentam médias ≥4 e não se registam questões em situação crítica. **4.** Inquéritos a um par docente/curso/UC com a participação de 4 estudantes ou menos não são válidos, pelo que não constam na tabela.

Os dados de avaliação de cada docente são tratados pelo GESQUA que depois os aloca no SIDE, sendo acessíveis unicamente para o respetivo docente. Contudo, nos anos letivos de 2019/2020 e de 2018/2019, os resultados foram enviados diretamente para o email do respetivo docente (Quadro 5). Os inquéritos de anos anteriores que foram colocados no SIDE, na página da UC, já não estão acessíveis. Assim, somente serão apresentados os resultados de avaliação do docente dos dois últimos anos letivos (Quadro 5).

Quadro 5. Resultados dos inquéritos pedagógicos no 2º semestre do ano letivo de 2019/2019 e 2018/2019 relativo ao par docente/curso/UC. Docente Amélia M. Silva (Anexo III). Quadros não editados, colados tal como foram enviados por email.

2º semestre do ano letivo 2019/2020

nomecurso	nomeDisciplina	classif Docente	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	Q17	Q18
LICENCIATURA EM BIOLOGIA	FISIOLOGIA CELULAR	Excelente	4,3	4,5	4,2	4,1	4,5	2,6	4,3
LICENCIATURA EM BIOQUÍMICA		Médio	3,5	4,1	3,9	4,1	4,3	2,9	3,8
MESTRADO EM BIOQUÍMICA	BIOQUÍMICA CELULAR	Excelente	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3

2º semestre do ano letivo 2018/2019

nomecurso	nomeDisciplina	classif Docente	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	Q17	Q18
LICENCIATURA EM BIOLOGIA	FISIOLOGIA CELULAR	Médio	2,3	4,1	4,4	3,3	4,3	4	3,1
LICENCIATURA EM BIOQUÍMICA		Médio	3,4	3,9	4,1	3,7	4	3,7	3,8
MESTRADO EM BIOQUÍMICA	BIOQUÍMICA CELULAR	Médio	3,5	4,3	4,5	4	4,3	4,3	3,8

No quadro 5, apresenta-se os resultados dos inquéritos pedagógicos no 2º semestre do ano letivo de 2019/2020 relativos ao par docente/curso/UC. Neste ano letivo, a UC de Fisiologia Celular, na componente teórica, foi lecionada em simultâneo para o 1º Ciclo em Biologia e 1º Ciclo em Bioquímica (como é habitual). De salientar que os estudantes do 1º Ciclo em Biologia consideram o desempenho da docente no ano letivo 2019/2020 como *excelente* e no ano letivo de 2018/2019 de como *médio*.

ANEXO I: PROTOCOLOS PRÁTICOS

PL 1: Esfingolípidos e grupos sanguíneos (sistema ABO)

PL 2: Determinação da permeabilidade seletiva da membrana de eritrócitos a aniões

PL 3: Alteração da permeabilidade da membrana plasmática em presença de detergentes

PL 4: Isolamento de *ghosts*

PL 5: Determinação da atividade da Na^+/K^+ ATPase em *ghosts*

PL 6: Detecção da libertação de ATP usando a técnica de luminescência da luciferina/luciferase

anexo A: Isolamento de células cromafins

anexo B: Isolamento de sinaptossomas

PL 7 Avaliação do dano celular através da atividade da enzima lactato desidrogenase

PL 8 Quantificação do mensageiro celular óxido nítrico (NO)

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 1: ESFINGOLÍPIDOS E GRUPOS SANGUÍNEOS (SISTEMA ABO)**

OBJETIVOS: Pretende-se que os alunos no final da aula saibam responder a um conjunto de questões relacionadas com a distribuição de esfingolípídeos específicos, enzimas responsáveis pela sua produção, de acordo com os grupos sanguíneos, sistema de classificação ABO e de classificação de acordo com o fator Rhesus. Pretende que os alunos saibam discutir a compatibilidade, entre grupos sanguíneos, de soro (plasma), eritrócitos e de sangue inteiro, relacionando antígenos e anticorpos e tendo consciência da localização tecidual destes.

Pretende-se ainda que, de forma voluntária, os alunos interessados possam determinar o seu grupo sanguíneo e comparar os vários resultados na turma e discutir a existência de (in)compatibilidades.

INTRODUÇÃO:

A introdução a este tema é realizada pelo estudante. Deve estudar a aula teórica relativa à composição lipídica da membrana, recordar a estrutura molecular de esfingolípídeos, nomeadamente os globósidos (ou globosídeos), e entender o seu posicionamento nas membranas celulares, topologia e função. Para orientação do estudante na preparação desta introdução, deverá responder às seguintes questões.

- i) Qual a estrutura molecular que determina os grupos sanguíneos, no sistema de classificação ABO?
- ii) Em que tecidos e/ou células ocorre? Se só nos eritrócitos ou também em outros tipos de células (indicar quais, se for o caso).
- iii) Que enzimas (ou sistemas enzimáticos) estão envolvidos na síntese das diferentes estruturas moleculares? E como é que estas enzimas se distribuem pelos diferentes indivíduos de grupos sanguíneos distintos?

- iv) Relacione antígenos (A, B e H) com as estruturas moleculares que os formam (relacionar com i) e iii)) e com a presença de anticorpos no soro dos indivíduos dos diferentes grupos sanguíneos?
- v) Verificar quais as compatibilidades ou incompatibilidades sanguíneas entre os vários grupos? Faça uma tabela resumo que ilustre as várias possibilidades, considere doadores de eritrócitos, doadores de plasma, e doadores de sangue completo.
- vi) Qual a estrutura molecular que determina o fator Rhesus? A que estrutura molecular está associada e qual a função desta?

A componente experimental deste protocolo é voluntária, baseia-se na determinação do grupo sanguíneo (do aluno voluntário) usando como procedimento um teste de aglutinação, em que os glóbulos vermelhos que possuem o antígeno tipo aglutinam na presença do anticorpo correspondente no reagente de teste, indicando a presença do antígeno testado. Ausência de aglutinação indica a ausência do antígeno testado.

REAGENTES E MATERIAL:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| • Solução de anticorpos: | • Lâminas de microscópio (ou |
| • Anticorpo monoclonal Anti-A | dispositivos específicos); |
| • Anticorpo monoclonal Anti-B | • Palitos (para misturar); |
| • Anticorpo monoclonal Anti-D | • Lancetas esterilizadas; |
| • Microscópios | • Etanol e algodão; |
-

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

No procedimento experimental deste protocolo prático, cada aluno deve manipular todos os componentes relativos à sua amostra sanguínea desde a altura em que pica o dedo até descartar todos os materiais em contentor apropriado.

1. Lavar muito bem as mãos, usando água corrente e detergente, e desinfetar (com etanol) o dedo a picar.
2. Abrir, com cuidado, a embalagem da lanceta estéril e picar (com um pulso rápido) a zona desinfetada/esterilizada do dedo. Pressionar a zona em volta até aparecer

uma gota de sangue. (Nota: se tiver as mãos frias massajar primeiro para que estas aqueçam e se ative a corrente sanguínea periférica, na zona a picar).

3. Colocar uma gota de sangue, em cada um dos compartimentos do dispositivo ou, da lâmina, marcado previamente com as letras A e B (para posterior adição do anticorpo anti-A e anti-B), e na zona Rh (para adição do anticorpo anti-D), como ilustrado na Fig.1.

4. Adicione de imediato uma pequena gota da solução com o anticorpo anti-A, na zona indicada com A, do anticorpo Anti-B, na zona indicada com B, o mesmo para o anticorpo Anti-D, na zona Rh. Com um palito misturar de imediato as soluções dos anticorpos com cada uma das gotas de sangue.²⁴ Atenção para não misturar os vários anticorpos, evitar reações cruzadas.

5. Após 3 a 4 minutos observe as lâminas, e veja se tem ou não aglutinação. Caso não seja perceptível a olho nu, examine as amostras ao microscópio (apesar de a aglutinação ser quase sempre observável a olho nu). A aglutinação indica teste positivo.

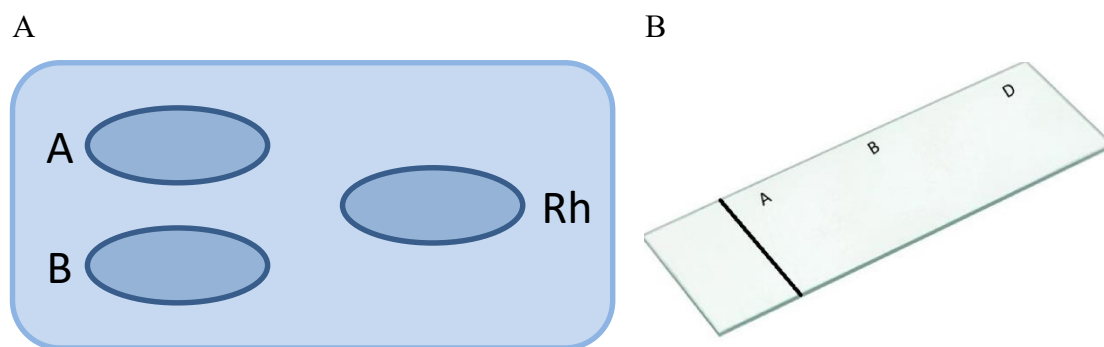


Figura 1. Esquema de marcação das lâminas para deposição da gota de sangue e respetivos anticorpos. A: Dispositivo próprio. B: Lâmina comum de histologia.

²⁴ Nota: Neste passo é muito importante não deixar secar as gotas de sangue para não observar falsos positivos; pelo que a colocação das gotas de sangue e dos anticorpos deve ser rápida assim como a sua mistura, para que haja (ou não) a reação de aglutinação.

RESULTADOS:

1. Registe todos os resultados obtidos na turma, com base no que observou. Use a tabela seguinte; assinale com + ou – a presença ou ausência de reatividade (aglutinação).

Dador:	Anti-A	Anti-B	Grupo sanguíneo	Anti-Rh
1) _____				
2) _____				
3) _____				
4) _____				
5) _____				
6) _____				

Nota: anote também os grupos sanguíneos de outros colegas que embora não tenham feito o teste na aula o possam saber.

2. Com base nos resultados obtidos indique a percentagem de tipos de sangue da amostragem da turma. Compare-os com a população portuguesa (pesquisar e elaborar tabela de distribuição), e diga a relevância da representatividade da turma.

3. Que pode concluir sobre os glicolípidos das membranas dos eritrócitos dos vários dadores? E das enzimas que lhes deram origem?

4. Entre os vários dadores (da aula) existem incompatibilidades sanguíneas? De que tipo?

5. Elaborar tabelas de compatibilidades para doação de eritrócitos, plasma e sangue completo. Discutir com base nos resultados da turma.

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 2: DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE SELETIVA DA MEMBRANA DE ERITRÓCITOS A ANIÕES**

OBJETIVOS: Observar a seletividade da membrana do eritrócito para a entrada de aniões mono-, di- e trivalentes. Os iões escolhidos para este estudo foram o periodato, o metabissulfito e o ferricianeto, por terem tamanhos semelhantes. Assim sendo, as principais diferenças resultantes da permeabilidade seletiva da membrana do eritrócito devem-se à carga destes iões.

INTRODUÇÃO:

Estes aniões (periodato, o metabissulfito e o ferricianeto) têm características oxidantes, pelo que a sua entrada no eritrócito promove a oxidação da oxi-hemoglobina ($O_2Fe^{2+}Hb$) a meta-hemoglobina ($Fe^{3+}Hb$). Esta reação é possível de seguir espectrofotometricamente, uma vez que as duas formas de hemoglobina apresentam espectros de absorção característicos (recordar aulas práticas de Bioquímica). Será assim possível inferir acerca da seletividade da membrana do eritrócito e também do processo de transporte através da mesma.

A oxidação da oxi- a meta-hemoglobina pode ser seguida num espectrofotómetro dado que cada estrutura tem espectros de absorção distintos com valores de absorvência máxima característicos, como pode verificar na seguinte tabela:

Tabela 1. Picos de absorção da oxi-hemoglobina e da meta-hemoglobina.

	Picos de absorção máxima
Oxi-hemoglobina	577 nm; 541 nm; 413 nm
Meta-hemoglobina	630 nm; 500 nm; 406 nm

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• 6 Tubos de ensaio (pequenos) • Micropipetas P100 e P1000 • 1 pipeta graduadas de 10 cm³ (mL) • 1 pipeta graduada de 5 cm³ (mL) • 5 pipetas de Pasteur • Parafilm • Células de espectrofotómetro de quartzo • Espectrofotómetro UV-Vis • Centrífuga	• Solução NaCl, 0,9% • Tampão HEPES, 5 mM em solução de NaCl 0,9%, pH 6,5. • Soluções a 50 mM dos seguintes sais (preparadas em tampão HEPES): - Periodato de sódio, NaIO₄ - Metabissulfito de potássio, K₂S₂O₅ - Ferricianeto de potássio, K₃Fe(CN)₆ • Triton-X, 10% • Sangue fresco de porco (ou outro).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:**A: PREPARAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS**

Nesta primeira parte pretende-se obter uma suspensão de eritrócitos isenta de proteínas de soro que podem atuar sobre as amostras adsorvendo os aniões e mascarando os resultados. Assim, a partir da amostra de sangue fresca obtida no hospital veterinário da UTAD, realize os seguintes passos:

1. Adicionar 0,5 mL de sangue fresco a 5 mL de NaCl 0,9%
2. Centrifugar a 1700 g (~3000 rpm), durante 5 minutos.
3. Desprezar o sobrenadante, retirando-o cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur.
4. Lavar o sedimento, adicione 5 mL de NaCl 0,9%, ressuspenda os eritrócitos suavemente. Repetir a centrifugação.
5. Fazer uma segunda lavagem ao sedimento, repetindo o procedimento anterior.
6. Desprezar o sobrenadante resultante da última lavagem.
7. Ressuspender o sedimento final em 3 mL de tampão HEPES (ou NaCl a 0,9%).

8. Preparar a suspensão de eritrócitos de trabalho, diluindo 100 μL da solução anterior em 10 mL de tampão HEPES.

B: ESTUDO DA SELETIVIDADE DO TRANSPORTE DE ANIÕES MONO-, DI- E TRIVALENTES ATRAVÉS DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO

Esta parte do procedimento experimental exige coordenação entre todos os elementos do grupo de trabalho de forma que as leituras de absorvência ocorram nos tempos corretos e de forma que não decorra muito tempo entre a adição da solução de iões aos eritrócitos e a leitura de absorvência (incubação).

1. Preparar uma série de 4 tubos de ensaio, etiquetando-os apropriadamente:
 - Controlo
 - NaIO_4
 - $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$
 - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
2. Adicionar a cada tubo 2 mL da suspensão de **eritrócitos de trabalho** e 0,5 mL de cada uma das soluções salinas (no controlo é adicionado tampão HEPES).
3. Registrar o tempo decorrido entre o início da reação e a realização da primeira medição da absorvência. (Tempo de incubação).
4. Observar a variação de cor nos tubos de ensaio (registar na tabela de resultados), ao longo de todo o ensaio.
5. Traçar os espectros de absorção de cada uma das suspensões, entre 300 e 700 nm ou registar a absorvência nos valores de absorvência indicados e aos tempos indicados (registar na tabela de resultados).
6. Caso não observe formação de meta-hemoglobina, adicionar na célula de espectrofotómetro 40 μL de solução Triton X (10%). Este reagente é um poderoso detergente, que destruirá a membrana das células (lise celular), permitindo assim que a oxi-hemoglobina se liberte, e fique disponível para o agente oxidante.
7. Analise os resultados obtidos.

RESULTADOS:

1. Registrar a alteração de cor da solução de eritrócitos, com o tempo. Quando não houver alteração de cor coloque (-), se houver indique qual a cor:

	Início	1'	5'	10'	15'	***	+ Triton X
Controlo							
NaIO ₄							
K ₂ S ₂ O ₅							
K ₃ Fe(CN) ₆							

*** Se não observou registo de alteração de cor, centrifugue, veja a cor do sobrenadante (registre) e depois, coloque Triton X, homogeneizando.

2. Que conclusões é que se podem tirar do que observou visualmente?

3. Registrar as absorvências a **406 nm**

	Início	1'	3'	5'	8'	10'
Controlo						
NaIO ₄						
K ₂ S ₂ O ₅						
K ₃ Fe(CN) ₆						

4. Registrar as absorvências a **413 nm**

	Início	1'	3'	5'	8'	10'
Controlo						
NaIO ₄						
K ₂ S ₂ O ₅						
K ₃ Fe(CN) ₆						

5. Registrar as absorvências a **500 nm**

	Início	1'	3'	5'	8'	10'
Controlo						
NaIO ₄						
K ₂ S ₂ O ₅						
K ₃ Fe(CN) ₆						

6. Registrar as absorvências a **577 nm**

	Início	1'	3'	5'	8'	10'
Controlo						
NaIO ₄						
K ₂ S ₂ O ₅						
K ₃ Fe(CN) ₆						

7. Traçar gráficos, para cada valor de absorvência, onde regista a variação de absorvência com o tempo. Pode usar o Excel para desenhar os gráficos ou usar papel milimétrico.

8. Do que observou e dos gráficos que fez, qual o melhor comprimento de onda para seguir a entrada de iões no eritrócito e porquê?

9. Que iões atravessam a membrana? Fundamente a sua resposta

10. Que mecanismo(s) prevê para a entrada de iões no eritrócito?

11. Que iões atravessam a membrana sem romper a célula? Responda com base nas observações experimentais.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

Adams, P. & Black, D. (1990). Selective Ion Transport across Biological Membranes. *Journal of Chemical Education* **67** (6): 526-527.

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 3: ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM PRESENÇA DE DETERGENTES**

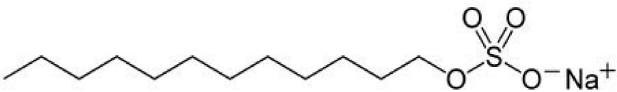
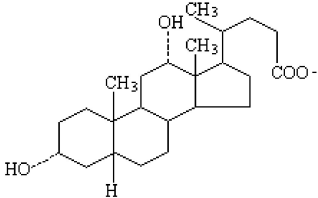
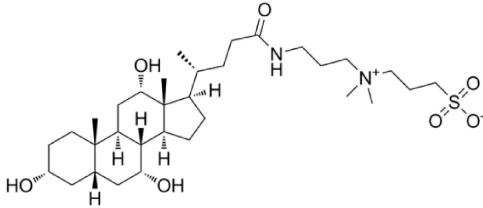
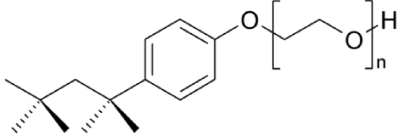
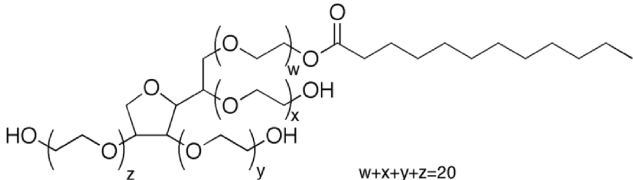
OBJETIVOS: Pretende-se que o aluno adquira conhecimentos sobre ação de detergentes em membranas biológicas e sua dependência da concentração micelar crítica (CMC). Que consolide os conhecimentos da teórica sobre detergentes e sua ação nas componentes celulares, essencialmente a noção de detergentes desnaturantes e não desnaturantes e da dependência desta propriedade com a natureza química do detergente e a sua CMC.

INTRODUÇÃO:

Os detergentes são compostos orgânicos, geralmente com longas cadeias de hidrocarbonetos (zona apolar) e com uma zona polar, conferindo-lhes propriedades anfipáticas. Estruturalmente, apresentam, por norma, regiões (zonas) distintas com características hidrofóbicas e hidrofílicas, podendo ser classificados em iónicos ou não iónicos de acordo com a natureza da zona polar (hidrofílica). Os detergentes iónicos podem ser aniónicos (e.g. dodecilsulfato de sódio - SDS, colato e desoxicolato, que são sais biliares), cationicos (e.g. sais de amónio quaternários) ou zwitteriónicos (e.g. CHAPS), ver Tabela 1. No grupo dos detergentes não iónicos estão incluídos compostos como Triton X-100 e Tween (e.g. Tween-20, Tween-80). Os detergentes não iónicos possuem grande capacidade para romper as interações lípido-lípido e lípido-proteína, mas têm pouca capacidade para romper interações lípido-proteína, daí que sejam designados de não desnaturantes. Por outro lado os detergentes iónicos interagem com as proteínas mascarando as suas cargas naturais e consequentemente podem alterar a sua estrutura terciária, desnaturando-as, daí muitos serem designados de detergentes desnaturantes.

Assim, atendendo a que os detergentes atuam nas membranas biológicas interagindo com as componentes lipídica e proteica, provocando a sua desagregação. Esse efeito pode ser seguido utilizando eritrócitos e monitorizando a libertação da hemoglobina quando as células são colocadas na presença de detergentes.

Tabela 1. Estrutura e nomenclatura de alguns detergentes utilizados em laboratório.

	SDS - DODECIL SULFATO DE SÓDIO <i>sodium dodecyl sulfate</i>
	DESOXICOLATO (DOC)
	CHAPS <i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
	TRITON X-100 <i>polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether</i>
	TWEEN <i>polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>

REAGENTES E MATERIAL:

- | | |
|--|---|
| • Tubos de ensaio (10 mL) | • Parafilme |
| • Tubos de centrífuga (2 mL; tipo eppendorf) | • Pontas para micropipetas |
| • Micropipetas P100, P1000 e P5000 | • Pipetas descartáveis (3 mL) |
| • Pipeta de vidro (20 mL) | • Solução NaCl, 0,9% |
| • Pompets | • Detergentes (soluções a 1 %): |
| • Vórtex | Aniônicos - dodecilsulfato de sódio (SDS) ou deoxicolato de sódio (DOC) |
| • Células de espectrofotômetro (1,5 mL) | Zwiteriônicos - CHAPS |
| • Espectrofotômetro UV-Vis | Neutros - Triton X-100 |
| • Centrífuga de eppendorf | • Sangue fresco de porco (ou outro). |

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:**A: PREPARAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS**

Nesta primeira parte pretende-se obter uma suspensão de eritrócitos isenta de proteínas de soro que podem atuar sobre as amostras adsorvendo os aniões e mascarando os resultados.

1. Coloque 0,5 mL de sangue num tubo de centrífuga com tampa (tipo eppendorf, com capacidade 2 mL), adicione 1 mL de NaCl 0,9 % (solução salina) e centrifugue a 4000 rpm, durante 5 minutos. Em alternativa, coloque 0,5 mL de sangue num tubo de ensaio de capacidade de 10 mL e adicione 5 mL de NaCl 0,9 % (otimiza a lavagem que ficará pronta em 2 passos; ponto A do protocolo anterior).
2. Remova e elimine o sobrenadante (plasma) e adicione igual volume de NaCl 0,9 % (veja ponto 1.). Ressuspensa gentilmente o sedimento contendo os eritrócitos, utilizando uma pipeta descartável.
3. Repita os dois passos anteriores duas vezes e no final ressuspensa gentilmente o sobrenadante de células em 1,5 mL de solução NaCl 0,9%.²⁵

B – ESTUDO DA ATIVIDADE DE DETERGENTES SOBRE A MEMBRANA DE ERITRÓCITOS.

4. Prepare uma solução diluída de eritrócitos: a 10 mL de solução NaCl 0,9 % adicione 0,4 mL da suspensão de eritrócitos obtidas no ponto anterior (3).

Notas:

a) Para o estudo com:

Um detergente - 20 mL de solução NaCl 0,9 % adicione 0,8 mL da suspensão de eritrócitos.

Dois detergentes: 40 mL de solução NaCl 0,9 % adicione 1,6 mL da suspensão de eritrócitos.

Três detergentes: 60 mL de solução NaCl 0,9 % adicione 2,4 mL da suspensão de eritrócitos.

- b) A diluição efetuada deve ser realizada de maneira que: ao misturar 0,1 mL de Triton X-100, 0,4 mL de NaCl 0,9% e 4,5 mL da solução diluída de eritrócitos, e após centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos, a absorvência (a 540 nm) do sobrenadante se encontre entre 0,5 e 1,0. Este valor corresponde à situação extrema (100% de lise). Todos os valores dos outros ensaios serão expressos em % de lise.

²⁵ Se usou o tubo de ensaio só precisa lavar no total de duas vezes. Contudo este procedimento (tubo de ensaio ou tubo de centrífuga tipo eppendorf depende do material disponível para a aula)

5. Prepare os seguintes tubos:

TUBO	Suspensão Eritrócitos (mL)	NaCl 0,9% (mL)	Detergente	
			Volume (mL)	Nome
1	4,5	0,500	0	SDS
2	4,5	0,475	0,025	
3	4,5	0,450	0,050	
4	4,5	0,400	0,100	
5	4,5	0,500	0	TritonX-100
6	4,5	0,475	0,025	
7	4,5	0,450	0,050	
8	4,5	0,400	0,100	
9	4,5	0,500	0	CHAPS
10	4,5	0,475	0,025	
11	4,5	0,450	0,050	
12	4,5	0,400	0,100	

6. Misture a solução de NaCl 0,9 % e a suspensão de eritrócitos e, após homogeneizar gentilmente, tapando com parafilme e invertendo suavemente o tubo (ou utilizando um vórtex na velocidade mais baixa), adicione a solução de detergente, homogeneizando novamente.

7. Após a homogeneização gentil, incube durante 10 minutos num banho regulado a 37 ° C. Observe os tubos periodicamente e anote alterações de cor ou de opacidade dos tubos.

8. Transfira 1,5 mL cada tubo para tubos de centrífuga (2 mL de capacidade) e centrifugue a 10 000 rpm durante 10 minutos, de forma a sedimentar eritrócitos e/ou membranas de eritrócitos lisados.

9. Utilizando células de espectrofotómetro de volume reduzido (1,5 mL), determine a absorvência dos sobrenadantes a 540 nm, utilizando como branco uma célula contendo solução de NaCl 0,9%.

RESULTADOS:

1. Registrar as absorvências a **540 nm** e anotar os resultados na seguinte tabela:

TUBO	Detergente			Absorvência (540 nm)
	Nome	Volume (mL)	Concentração (%)	
1	SDS	0	0	
2		0,025		
3		0,050		
4		0,100		
5	TritonX-100	0	0	
6		0,025		
7		0,050		
8		0,100		
9	CHAPS	0	0	
10		0,025		
11		0,050		
12		0,100		

2. Calcule a percentagem de lise em cada tubo.

3. Construa os seguintes gráficos relacionando:

a) Absorvência (A_{540}) *versus* concentração de detergente (em %).

b) Concentração de detergente (em %) *versus* % de lise.

Pode usar o Excel ou papel milimétrico.

CONCLUSÕES:

1. Analise os gráficos que construiu e compare os resultados obtidos para os dois detergentes. Que conclusões podem ser retiradas desta análise?

Responda às seguintes questões?

- a) A análise espectrofotométrica foi realizada a 540 nm. Porquê?
- b) Qual o possível mecanismo de ação de cada um dos detergentes? Compare lise, permeabilização, desnaturação etc.
- c) Para concentrações reduzidas de detergentes estará a ocorrer lise dos eritrócitos ou permeabilização da membrana plasmática? Como pode comprovar experimentalmente a sua hipótese?

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

- Findlay, J.B.C and Evans, W.H.. (1987) Biological Membranes - a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Plummer, D.T. (1978) An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd edition. McGraw-Hill, London.

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 4: ISOLAMENTO DE *GHOSTS***

OBJETIVOS: Obtenção de material biológico para elaboração de ensaios de atividade de transportadores (aula seguinte). Neste caso pretende-se obter *ghosts* a partir de eritrócitos, e pretende-se que o estudante saiba descrever quais são os passos fundamentais no processo e faça a posterior descrição do método.

Nota: Tome atenção a todos os passos, anote tudo o que achar necessário, dado que uma parte do método vai ser descrita por vós.

INTRODUÇÃO:

O sangue, frequentemente designado por tecido sanguíneo, é constituído por plasma e elementos figurados, nomeadamente, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A utilização de eritrócitos em ensaios de laboratório é frequente porque estas células são modelos celulares anucleados (na maioria das espécies) e sem mitocôndrias. Por outro lado, é fácil obter estas células em grandes quantidades. Para estudos relacionados com as características e funções de elementos da membrana plasmática, recorre-se frequentemente ao uso de membranas eritrocitárias isoladas, designadas por *ghosts*. A sua utilização como modelo de membrana plasmática deve-se ao fato de essa membrana ser a mais conhecida em termos de estrutura e função.

O isolamento de *ghosts* pressupõe o conhecimento de que as membranas eritrocitárias são semipermeáveis. Quando os eritrócitos são colocados em meio hipotónico (baixa concentração de soluto), a água tende a entrar e verifica-se lise celular. Em meio hipertónico (maior concentração de soluto), a água sai da célula e ocorre a plasmólise. Por fim, em meio isotónico, não há alterações de volume observadas. Quando ocorre a lise celular, a hemoglobina é liberada no meio, permanecendo apenas as membranas eritrocitárias – *ghosts*. Pelas propriedades das membranas, como auto-associação, após a lise celular com a libertação da hemoglobina as membranas celulares voltam a associar-se formando um “saco” fechado, retendo as propriedades de seletividade e transporte.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• Tubos de ensaio (pequenos) para centrífuga • Tubos de ensaio (7 por grupo) • Tubo de plástico de centrífuga (45 mL de capacidade) • Micropipetas P1000 (+ pontas) • Pipeta graduadas: de 10 mL • Pipetas de Pasteur • Parafilm • Centrífuga refrigerada • Células de leitura para espectrofotómetro	• Solução NaCl, 0,9% • Solução NaCl, 0,09% • Tampão Fosfato Hiposmótico: 20 mOSM a pH 6,8 • Tampão Fosfato Isosmótico: 310 mOSM a pH 6,8 • Sangue fresco de porco (ou outro) • Solução de BSA 0,4% (m/v) • Reagente de Biureto

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

NOTA IMPORTANTE: Todos os procedimentos para a obtenção de eritrócitos e membranas plasmáticas de eritrócitos (*ghosts*) necessitam de **utilização de material arrefecido**, para evitar degradar os componentes celulares. Assim, as centrifugações devem ser realizadas com o rotor e a **câmara da centrífuga reguladas a 4°C**, e os **recipientes contendo as soluções e os tubos de centrífuga devem ser sempre mantidos em recipiente contendo gelo**.

A: SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

O primeiro passo consiste em isolar os eritrócitos a partir do sangue total, eliminando o soro.

1. Pipetar para um tubo de centrífuga 20 mL de sangue e 10 mL do Tampão Fosfato Isosmótico (ou solução NaCl 0,9%);
2. Homogeneizar cuidadosamente, por inversão do tubo (rolhado ou tapado com parafilme);
3. Centrifugar a 1000 ×g durante 5 minutos;
4. Remover o sobrenadante (use uma pipeta de Pasteur associada a um sistema de aspiração, e.g. trompa de água; ou use uma pipeta e aspire cuidadosamente);

5. Ressuspender os eritrócitos em 20 mL de Tampão Fosfato Isosmótico (ou solução NaCl 0,9%);
6. Homogeneizar cuidadosamente, por inversão dos tubos;
7. Centrifugar a 1000 $\times g$ durante 5 minutos;
8. Remover o sobrenadante, como anteriormente;

B: LISE DOS ERITRÓCITOS NUM MEIO HIPOSMÓTICO E OBTENÇÃO DOS *GHOSTS*

1. Ressuspender os eritrócitos obtidos na parte A, em 30 mL de Tampão Fosfato Hiposmótico (ou solução de NaCl 0,09%);
2. Manter o tubo em gelo, com agitação frequente, durante 15 minutos;
3. Centrifugar a 22000 $\times g$ durante 15 minutos;
4. Eliminar o sobrenadante e adicionar 30 mL de solução de NaCl 0,09% e ressuspender as membranas dos eritrócitos;
5. Voltar a centrifugar a 22000 $\times g$ durante 15 minutos;
6. Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimentado (*ghosts*), na solução isosmótica, com a ajuda de um pincel.
7. Transferir para tubos tipo eppendorf, utilizando uma pipeta automática P1000.
8. Reservar 300 μ L para quantificar a concentração de proteína pelo método de Biureto.
8. Proceder ao congelamento rápido em azoto líquido e ao armazenamento em ultracongelador a -80°C , da restante quantidade de amostra, para posteriormente utilização dos *ghosts* em futuros trabalhos.

C: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO O MÉTODO DE BIURETO

1. Preparar uma série de tubos 1 a 7, para realização da reta padrão e quantificação da amostra (segundo a Tabela 1).
2. Utilize albumina do soro bovino (BSA) a 0,4 % (m/v), para construir a reta padrão.

3. Proceda de acordo com o indicado na Tabela 1, ordem de adição água, BSA (ou amostra), homogeneíze e adicione o reagente de Biureto. Homogeneíze cada tubo, novamente, usando um vórtex, e deixe incubar durante 10 minutos.
4. Após incubação, transfira parte do conteúdo para células de leitura (cuvetes) e registre a absorvência a 540 nm,

Tabela 1. Esquema de preparação dos tubos para realizar a reta padrão e para a quantificação da proteína na amostra de sinaptossomas.

Tubo	Solução de BSA (mL)	H ₂ O (mL)	Reagente de Biureto (mL)	[proteína] mg/mL	A ₅₄₀
1	-	2,0	4,0		
2	0,5	1,5	4,0		
3	1,0	1,0	4,0		
4	2,0	-	4,0		
Amostra diluída 10x					
5	1,0	1,0	4,0		
6	1,0	1,0	4,0		
7	1,0	1,0	4,0		

5. Construir uma reta padrão (gráfico XY), relacionando a absorvência lida nos tubos 1 a 4 com a concentração de proteína (mg/mL) em cada tubo. Use o Excel para o efeito.
6. Com base na reta padrão, e nas absorvências medidas nos tubos 5 a 7 (absorvência média) determine:
 - a. A concentração de proteína na amostra (tubos).
 - b. A concentração de proteína na amostra original, tendo em atenção as diluições que realizou.
7. Guarde os valores para a próxima aula.

Notas e Comentários e passos críticos na execução do método (do ponto A e B):

Questionário:

No final desta aula deve saber responder às seguintes questões.

1. O que são *ghosts*?
2. Quais são os princípios básicos e laboratoriais para o seu isolamento?
3. Como é que se pode verificar experimentalmente que o que obtiveram é unicamente constituído por *ghosts*?

4. Como pode verificar que estes são viáveis?

5. Que utilidade daria ao material biológico que obteve? Dê um ou dois exemplos de títulos para hipotéticos protocolos experimentais a realizar, no âmbito do Fisiologia Celular, utilizando a amostra que preparou. Descreva sucintamente (5 a 10 linhas para cada exemplo).

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

Burton GW, Ingold KU, Thompson KE. An improved procedure for the isolation of ghost membranes from human red blood cells. *Lipids*. 1981 Dec;16(12):946. doi: 10.1007/BF02535005. PMID: 7329217.

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 5: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA Na^+/K^+ ATPASE EM *GHOSTS***

OBJETIVOS: Determinar a atividade enzimática das ATPases, utilizando *ghosts* previamente preparados. Observar o efeito da inibição seletiva da Na^+/K^+ -ATPase por uabaína.

INTRODUÇÃO:

A maioria das células animais mantém, no seu interior (citoplasma) a concentração de potássio elevada e a concentrações de sódio baixa, relativamente ao exterior. Esta diferença de concentrações é mantida através dum transporte ativo efetuado pela Na^+/K^+ ATPase, utilizando para o efeito a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar Na^+ para o exterior e K^+ para o interior de acordo com o seguinte esquema:

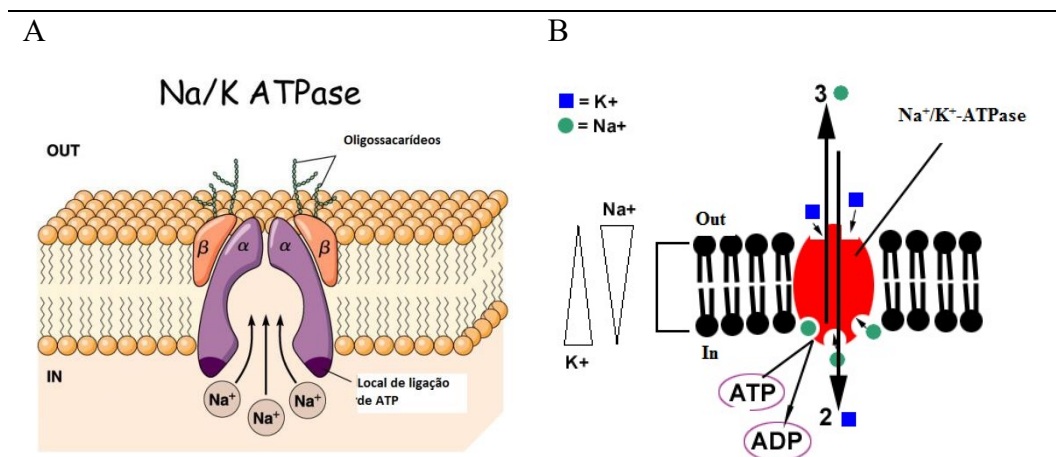


Figura 1. Na^+/K^+ ATPase. **A:** Estrutura molecular simplificada da Na^+/K^+ ATPase, ilustrando a disposição das subunidades. **B:** Gradientes de Na^+ e do K^+ , entre o exterior (ou) e o interior (in) da células. Direção do transporte de Na^+ e do K^+ , e estequiometria.

A Na^+/K^+ ATPase é electrogénica, uma vez que transporta 3Na^+ para o exterior e 2K^+ para o interior produzindo deste modo um gradiente de potencial eléctrico, em parte responsável pelo potencial de membrana, para além do gradiente químico. Assim sendo, a Na^+/K^+ ATPase é hiperpolarizante.

Nesta aula iremos detectar a actividade da Na^+/K^+ ATPase em *ghosts*²⁶. A actividade da enzima será observada através da análise do fosfato inorgânico (P_i) resultante da hidrólise de ATP. Na presença de molibdato de amónio o P_i libertado forma um complexo de fosfomolibdato, que depois de reduzido pela acção de sulfato ferroso apresenta uma cor azul e pode ser detectado e quantificado espectrofotometricamente a 660 nm.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	REAGENTES:
• Espectrofotómetro • Tubos de espectrofotometria • Centrífuga de bancada • Recipiente com gelo • Tubos de ensaio de 10 mL • Micropipetas P20 e P200 • Pontas amarelas • Pipeta de vidro de 0,5 mL • Pipeta de vidro de 1 mL • Pipeta de vidro de 5 mL	• TCA (ácido tricloroacético) a 40% • ATP 100 mM • Ouabaína 20 mM • KH_2PO_4 0,5 mM • Água desionizada • Meio de experiências (em mM): 100 NaCl, 25 KCl, 5 MgCl_2, 20 Tris a pH 7,4 • Molibdato de amónio a 10%, preparado em H_2SO_4 10 N

REAGENTE DE MOLIBDATO: 1) dissolver 7,5 gramas de sulfato ferroso em 120 mL de água desionizada; 2) adicione 15 mL de solução de molibdato de amónio a 10%; 3) ajustar o volume a 150 mL.

²⁶ Este estudo, em alternativa aos *ghosts*, poderia ser efetuado em sinaptossomas (que irão ser preparados nas próximas aulas).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

1. Marque com caneta de escrever em vidro, os tubos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Esquema de ensaio.

Tubo	Meio de Reação (mL)	Ouabaína (μL)	Proteína Membranar (μL)*	ATP (μL)
1	2	0	0	50
2	2	0	50	0
3	2	0	50	50
4	2	50	50	50
5	2	0	50	50

* *ghosts* preparados na aula anterior com concentração de proteína equivalente a 10 mg/mL.

2. Adicione o meio de reação, a ouabaína (concentração final de 0,5 mM) e os *ghosts* (quantidade por ensaio igual a ~0,25 mg de proteína).
3. Em seguida adicione, de minuto a minuto, o ATP que iniciará a reação (o intervalo de minuto é para permitir a leitura de cada tubo no final do tempo).
4. Coloque os tubos 1 a 4 no banho a 37°C (à medida que vai adicionando o ATP) e deixe a reação a decorrer durante 15 min.
5. Coloque o tubo 5 no gelo a 4°C (iniciando a reação com ATP) e deixe a reação a decorrer durante 15 min.
6. Pare a reação adicionando 0,5 mL de ácido tricloroacético a 40% (TCA) e coloque em gelo.
7. Centrifugar todos os tubos a 3000 rpm durante 5 min.
8. Recolher 1 mL do sobrenadante para outro tubo de ensaio e adicionar 2 mL de reagente de molibdato e 1 mL de água.
9. Deixar reagir durante 10 min.
10. Ler a absorvência a 660 nm. Anote os resultados na Tabela 3, apresentada na secção de **Resultados**.
11. Para quantificar o fosfato (Pi) prepare os tubos indicados na tabela 2, que lhe permitirão construir uma curva com quantidades bem conhecidas de Pi (usando KH₂PO₄), para relacionar a absorvência A₆₆₀ com a quantidade de Pi.

Tabela 2. Esquema de ensaio para preparar a reta de calibração de Pi.

Tubo	KH₂PO₄ (mL)	Água (mL)	Reagente de Molibdato (mL)
6	0	2,00	2
7	0,25	1,75	2
8	0,50	1,50	2
9	1,00	1,00	2

RESULTADOS:

1. Preencha a seguinte tabela (coluna A₆₆₀) com os resultados obtidos.

Tabela 3. Resultados obtidos no ensaio da atividade da Na/K-ATPase.

Tubo	Proteína Membranar (mg)	KH₂PO₄ (nmol)	A₆₆₀
1	0	-	
2	0,25	-	
3	0,25	-	
4	0,25	-	
5	0,25	-	
6	-	0	
7	-	125	
8	-	250	
9	-	500	

- Com os valores obtidos nos tubos 6-9 construa uma reta padrão e indique qual a equação da reta que relaciona a quantidade (nmol) de Pi com os valores de A₆₆₀.
- Determine, com base na equação da reta indicada no ponto anterior, e os valores de A₆₆₀ lidas para os tubos 1-5, a quantidade de Pi libertado nesses tubos durante os 15 minutos de reação.

4. Determine a atividade da Na^+/K^+ -ATPase nos tubos 1-5, em nmol Pi/mg proteína/hora (e anote na Tabela 4).

Tabela 4. Atividade da Na/K-ATPase.

Tubo	Atividade da Na/K ATPase (nmol Pi/mg proteína/hora)
1	
2	
3	
4	
5	

5. Discuta os resultados.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

- Boldyrev, A. and E. Kurella (1996). Mechanism of oxidative damage of dog kidney Na,KATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 222: 483 48
- Cooper, Terrance G. (1977). The tools of Biochemistry. Ed Jonh Wiley and Sons, New York
- Erdman, E., H. Boltz and B. Lüderitz (1971). The Na,K-ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency. *Arch. Bioch. Biol.*, 145: 121 125.
- Layne E. (1957). Methods in Enzymology (Colowick S.P. and Kaplan N. O., Eds). Academic Press, New York, Vol. 3, 447441
- Taussky, B.H. and P. Shorr (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202: 675 685.
- Leone, F. A., *et al* (2020). Osmotic and ionic regulation, and modulation by protein kinases, FXYD2 peptide and ATP of gill $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase activity, in the swamp ghost crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 250: 110507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110507>

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 6: DETECÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ATP USANDO A TÉCNICA DE LUMINESCÊNCIA DA LUCIFERINA/LUCIFERASE**

OBJETIVOS: Detetar a exocitose usando a quantificação de ATP pela técnica de luminescência da luciferina/luciferase. Avaliar o papel do Ca^{2+} extracelular no processo de exocitose. Avaliar a contribuição dos canais de cálcio sensíveis à voltagem e do secretagogo acetilcolina no processo de secreção.

INTRODUÇÃO:

As células cromafins da glândula suprarrenal são especializadas na produção e secreção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Tal como verificado noutras células (e.g. célula beta-pancreática, neurónios), os grânulos secretores da célula cromafim contêm, além das catecolaminas, ATP que é co-libertado por exocitose dos grânulos, quando a célula é estimulada por agentes colinérgicos (e.g. acetilcolina, nicotina) ou por despolarização com uma solução com elevada concentração de K^+ .

A secreção de catecolaminas, em resposta à estimulação colinérgica, é um processo rápido que se desenvolve completamente em poucos minutos, pelo que o método para a sua deteção deve ter uma elevada resolução temporal. A técnica de luminescência, baseada na reação de oxidação de luciferina catalisada por luciferase, permite quantificar o ATP libertado a partir de uma população de células, com elevada resolução temporal (Figura 1).

A reação (Figura 1) processa-se com emissão de energia sob a forma de fotões, com comprimento de onda correspondendo ao máximo de emissão de luminescência próximo de 560 nm. A eficiência máxima da reação verifica-se para $\text{pH} = 7,75$ e temperatura de 25 °C.

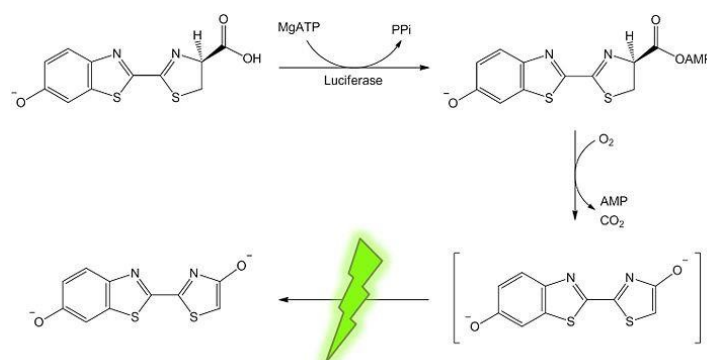


Figura 1. Reação de oxidação de luciferina em oxiluciferina catalisada por luciferase, consumindo uma molécula de ATP e produzindo um fóton ($h\nu$).

Em alternativa às células cromafins, este protocolo também pode ser realizado usando sinaptossomas (homogeneizado de cérebro rico em terminais sinápticos, purificado por centrifugação, ver PL 6 – Anexo B).

REAGENTES E MATERIAL:

- | | |
|--|---|
| • Luciferina – luciferase (mistura purificada de luciferase, albumina de soro bovino e luciferina) ²⁷ | • Centrifuga de bancada |
| • Brometo de hexametónio | • Tubos cónicos de plástico (1,6 mL; 8x50 mm): câmara de reação |
| • Iodeto de 1,4-dimetilfenol piperazínio (DMPP) | • Pipetas microvolumétricas (Gilson); |
| • Acetilcolina (ACh) | • Registador de papel; |
| • ATP | • Luminómetro ²⁸ |
| • Verapamil | |
| • Cloreto de gadolínio | |
| • Triton X-100 (2 % em MSB) | |

²⁷ Adquirida a Analytical Luminescence Laboratory

²⁸ O luminómetro consiste numa câmara de reação montada verticalmente e situada próxima do cátodo do fotomultiplicador.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:**A: PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE TRABALHO**

- Meio salino basal (MSB; em mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 glicose e 10 HEPES ácido; pH 7,35.
- Meio salino basal sem cálcio (MSB-0Ca; em mM): 142 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 5 glicose e 10 HEPES ácido; pH 7,35.
- Solução de luciferina – luciferase (LL): o preparado enzimático, contido num frasco selado, é diluído em 5 mL de MSB e mantido ni frigorífico.
- Meio de cultura para as células: DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 26 mM NaHCO₃, soro fetal bovino (SFB, 5%) e antibióticos (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 250 ng/mL anfotericina).
- Triton X-100 a 2% (em MSB).

B: ISOLAMENTO DE CÉLULAS (OU DE SINAPTOSSOMAS)

Ver PL 6 – Anexo A (isolamento de células cromafins) e PL 6 – Anexo B (isolamento de sinaptossomas).

C: MEDIÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ATP

1. As células cromafins (aproximadamente 10×10^6 células), previamente cultivadas em suspensão em frascos de cultura (densidade 1×10^6 células/mL), são centrifugadas (5 minutos, 800 rpm) e ressuspensas em MSB à densidade de 8×10^6 células/mL.
2. Adicionar à câmara de reação 50 µL de solução LL, 50 µL de suspensão de células (4×10^5 células) e 80 µL de MSB. As células devem repousar na câmara de reação durante aproximadamente 15 minutos antes do início das experiências, de modo a permitir a adaptação das células às novas condições. (Repetir este passo por cada ensaio diferente).

3. Os secretagogos são adicionados à câmara em volumes de 20 μL (a câmara já deve estar no luminómetro e o secretagogo adiciona-se com o auxílio de uma pipeta Gilson de 100 μL , através de um orifício que comunica com a câmara de reação). Após a adição de todos os reagentes o volume final deve ser de 200 μL .

Nota: os secretagogos (agonistas) e inibidores utilizados encontram-se diluídos em MSN a uma concentração 10x superior à desejada.

4. Iniciar a monitorização da luminescência antes da estimulação das células, para obter uma linha de base. Após a estimulação deve observar uma inflexão da agulha do registador, proporcional à luminescência produzida e, portanto, à quantidade de ATP. A quantidade de ATP libertada por ação dos secretagogos é expressa em percentagem do conteúdo total de ATP das células. Este último determina-se após rutura das células usando um detergente (o Triton X-100).

5. No final adicione 20 μL da solução de Triton X-100 à câmara de reação e registe a luminescência.

Atenção: De modo a evitar a eventual danificação do fotomultiplicador este deve estar desligado sempre que abrir a câmara de reação.

D: EXPERIÊNCIAS A EFETUAR

D1: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A REAÇÃO DA LUCIFERINA-LUCIFERASE

Prepare uma curva de calibração para a reação da LL com ATP, no intervalo entre 0 e 100 pmoles de ATP (0, 25, 50, 75 e 100 pmoles). Para tal:

1. Coloque em cada câmara de reação 50 μL de solução LL e 130 μL de MSB.
2. Adicione a cada câmara 20 μL de cada uma das seguintes soluções padrão de ATP: 125, 250, 375 e 500 nM.

D2: EFEITO DE AGONISTAS

A estimulação do receptor de acetilcolina é feita usando um agonista nicotínico, o DMPP. Para tal, proceda de acordo com o indicado em C (1, 2 e 3), e:

1. Construa uma curva dose-resposta da libertação de ATP em função da concentração de DMPP, usando as seguintes concentrações finais de agonista: 1, 5, 10 e 20 μM .

D3: EFEITO DE ANTAGONISTAS DO RECEPTOR NICOTÍNICO NA LIBERTAÇÃO DE ATP INDUZIDA POR ACETILCOLINA

As respostas colinérgicas podem ser mediadas pelo receptor de acetilcolina nicotínico, pelo receptor de acetilcolina muscarínico ou por ambos.

1. Use o bloqueador específico do receptor nicotínico, hexametônio (200 μM), para determinar a contribuição deste receptor na resposta secretora à acetilcolina.
2. Adicione 20 μL de solução de acetilcolina.

D4: EFEITO DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS À VOLTAGEM NA LIBERTAÇÃO DE ATP INDUZIDA POR AGONISTA DO RECEPTOR NICOTÍNICO

Determine a contribuição dos CCSV no processo de secreção induzido por 20 μM DMPP, usando um dos bloqueadores específicos destes canais de cálcio (verapamil ou Gd^{3+}).

D5: EFEITO DO CÁLCIO EXTRACELULAR NA LIBERTAÇÃO DE ATP INDUZIDA POR AGONISTA DO RECEPTOR NICOTÍNICO

Determine a contribuição do cálcio extracelular no processo de secreção induzido por 20 μM DMPP, usando 80 μL de MSB-0Ca (em vez de 80 μL de MSB; ponto 2 de C).

RESULTADOS:**A: Análise os resultados em termos de pmoles de ATP libertado**

Tendo em conta a curva de calibração obtida em D1, determine a quantidade de ATP libertada nas experiências (em pmoles) e apresente os resultados na forma de gráfico de resposta em função da concentração (caso de D2) ou de gráfico de barras (caso de D3, D4 e D5).

B: Análise em termos de percentagem de ATP libertado em relação ao conteúdo total em ATP

No fim de cada experiência adicionou-se às células Triton X-100 de forma a provocar a lise celular e a libertação de todo o ATP presente nas células. determine para cada experiência a extensão de libertação de ATP e, termos percentuais (percentagem de ATP libertado em relação ao conteúdo total). Expresse então os resultados na forma de gráficos como mencionado em A.

QUESTÕES:

1. Apresente a curva de calibração para a reação da LL (obtida em D1) e comente os resultados.
2. Apresente a curva de dose resposta (ATP libertado em função da concentração de DMPP), seguindo as sugestões de análise indicadas anteriormente. Comente os resultados.
3. Apresente os efeitos do hexametónio na libertação de ATP induzida por acetilcolina (secção D3), seguindo as sugestões de análise indicadas anteriormente (gráfico de barras). Comente os resultados.
4. Apresente o efeito do Verapamil (ou Gd^{3+}) na libertação de ATP induzida por DMPP (secção D4), seguindo as sugestões de análise indicadas anteriormente (gráfico de barras). Comente os resultados.
5. Apresente o efeito do Cálcio extracelular na libertação de ATP induzida por DMPP (secção D4), seguindo as sugestões de análise indicadas anteriormente (gráfico de barras). Comente os resultados

6. Qual a sua opinião sobre o método usado para a determinação da secreção de catecolaminas. Aponte eventuais vantagens e desvantagens do método / técnica usado.
7. Apresente sugestões que possam melhorar o sistema de detecção de ATP usado na aula e/ou a conceção do trabalho prático.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

Albillos, A., & McIntosh, J. M. (2018). Human nicotinic receptors in chromaffin cells: characterization and pharmacology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 470(1), 21–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2073-0>

Teow, SY., Liew, K., Che Mat, M. et al. Development of a luciferase/luciferin cell proliferation (XenoLuc) assay for real-time measurements of Gfp-Luc2-modified cells in a co-culture system. *BMC Biotechnol* 19, 34 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0528-4>

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 6 – ANEXO A: ISOLAMENTO DE CÉLULAS CROMAFINS**

OBJETIVOS: Aprender a preparar material biológico para avaliar processos de interesse para a fisiologia celular. Ou, adquirir os conhecimentos teórico-práticos inerentes ao isolamento de células a partir de um tecido.

INTRODUÇÃO:

As células cromafins, também designadas por feocromócitos, são células de natureza neuro-endócrinas que se encontram na medula das glândulas supra-renais de mamíferos. Estas células libertam catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) em resposta a vários estímulos, destacando-se a acetilcolina. A acetilcolina atua nos receptores colinérgicos, presentes na membrana plasmática destas células, que são de dois tipos, nicotínicos e muscarínicos. Neste trabalho o isolamento de células cromafins é feito a partir de glândulas supra-renais, por ação enzimática, usando collagenase.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• Material de dissecação (tesoura, bisturi, pinças...) • Malha de nylon 100 µm • Centrífuga refrigerada • Tubos de centrífuga • Seringas • Placas de cultura de 24 poços	• Collagenase B (Boehringer Mannheim Biochemicals) • Solução de Locke • BSA (albumina do soro bovino) • Sais • Antibióticos • DMEM/F-12

Soluções:

- Solução de Locke: (em mM) 154 NaCl, 5,6 KCl, 5 NaHCO₃, 5,6 glicose e 5 HEPES-Na, pH 7,2. Suplementada com estreptomicina (200 pg/mL), penicilina (200 U/mL), e anfotericina B (2,5 pg/mL).
- Solução de lavagem (perfusão): Solução de Locke suplementada com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA).

- Solução de dissociação: Solução de Locke suplementada com 0,5% BSA, 0,13% colagenase B e 0,02% de inibidor de tripsina.
- Meio de cultura para as células: DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 26 mM NaHCO₃, soro fetal bovino (SFB, 5%) e antibióticos (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 250 ng/mL anfotericina).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

1. Obter 2 glândulas suprarrenais bovinas do matadouro, acondicionar em solução de Locke gelada (mantida em gelo).
2. Lavar as glândulas por perfusão retrógrada com solução de lavagem (perfusão), usando uma seringa, lavar até remover todos os eritrócitos do interior da glândula.
3. Dissociar as células por perfusão das glândulas com solução de dissociação, 3x (15 minutos cada).
4. Abrir as glândulas, dissecar as medulas do córtex; picar o tecido (com auxílio de um bisturi) usando solução de Locke suplementada com 0,5% de BSA.
5. Passar todo o material obtido por uma malha de nylon 100 µm.
6. Lavar as células filtradas, duas vezes, em solução de Locke (se necessário, posteriormente purificar as frações celulares usando um gradiente de *Percoll*).
7. Colocar as células em cultura, usando a solução de meio de cultura.
8. Espalhar (semear) as células placas de cultura de 24 poços a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/mL (1,5 mL/poço).
9. Deixar as células em cultura numa incubadora de CO₂, a 37 °C em ambiente com uma atmosfera umidificada de 95% ar / 5% CO₂, durante 2-3 dias, antes de usar.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

Duarte, C.B., Rosario, L.M., Sena, C.M. and Carvalho, A.P. (1993), A Toxin Fraction (FTX) from the Funnel-Web Spider Poison Inhibits Dihydropyridine-Insensitive Ca²⁺ Channels Coupled to Catecholamine Release in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 60: 908-913. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03236.x>

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 6 – ANEXO B: ISOLAMENTO DE SINAPTOSSOMAS**

OBJETIVOS: Aprender a preparar material biológico para avaliar processos de interesse para a fisiologia celular. Ou, adquirir os conhecimentos teórico-práticos inerentes ao isolamento de células a partir de um tecido.

INTRODUÇÃO:

O tecido nervoso é constituído por neurónios (constituídos por longos axónios e dendrites) e por células da glia. Por homogeneização, as células da glia não sobrevivem durante muito tempo, e os neurónios não permanecem intactos. Assim, os neurónios quando sujeitos a homogeneização fragmentam, os corpos celulares dissociam-se dos prolongamentos, sendo ambos fragmentados em estruturas mais pequenas. Devido às propriedades de auto-associação, as estruturas mais simples assim formadas voltam a selar as membranas plasmáticas formando partículas osmoticamente ativas. Aquelas resultantes a partir dos terminais nervosos contêm os organelos presentes nessa região pré-sináptica; e são designadas por **sinaptossomas**. Os sinaptossomas podem também possuir pedaços da membrana pós-sináptica ainda associada.

A partir do córtex cerebral de pequenos roedores (ou de peixes) é possível obter uma preparação de sinaptossomas relativamente homogénea. Ainda, a contaminação por mielina pode ser facilmente eliminada através de repetidas centrifugações.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• Homogeneizador (Potter-Elvehjem)	• sacarose, glicose, EDTA, HEPES.
• Material de dissecação	• Tris-HCl
• Centrífuga refrigerada	• Percoll
• Tubos de centrífuga	• BSA 0,5 mg/mL (em água)
• Espectrofotómetro	• Reagente de de Biureto
	• Sais: NaCl, KCl, NaH ₂ PO ₄ , CaCl ₂ , MgCl ₂

SOLUÇÕES:

- Solução de isolamento: 0,32 M sacarose, EDTA 1 mM, 5 mM HEPES, pH 7,4.
- Solução Tris-HCl 50 mM, pH 7,5
- Solução Percoll (45% v/v), 11 mM NaCl, 5 mM glicose e 10 mM HEPES, pH 7,4.
- Solução BSA 0,5 mg/mL (em água)
- Solução Krebs/HEPES (em mM): 110 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glicose e 25 HEPES, pH 7,4

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

1. Sacrifício do animal, por decapitação.
2. Dissecar o cérebro e colocá-lo num copo contendo solução de isolamento fria (mantida em gelo pelo menos 30 minutos antes de usar) para o lavar.
3. Secar o órgão com papel de filtro e pesar.
4. Colocar o órgão numa caixa de Petri, adiciona 5 mL de solução de isolamento fria e cortar o tecido em pequenos pedaços, usando um bisturi ou tesoura.
5. Transferir o conteúdo para o copo do homogeneizador (*Potter-Elvehjem*).
6. Ajustar o volume de solução de solução de isolamento para 20 volumes (relativamente à massa).
7. Homogeneizar o tecido, tendo o cuidado de manter a amostra fria (0 a 4°C).
8. Centrifugar o homogeneizado, em centrífuga refrigerada, a 3000 ×g durante 5 minutos.
9. Recolher cuidadosamente o sobrenadante.
10. Voltar a centrifugar (12000 ×g; 20 min; 4 °C) o sobrenadante, a fim de obter, como sedimento, a fração mitocondrial rica em sinaptossomas.
11. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 20 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM (relativamente à massa do tecido fresco).
12. Manter os sinaptossomas em gelo até ao momento de iniciar as experiências.

Em alternativa aos pontos 11 e 12, pode purificar a fração de sinaptossomas obtido como sedimento no ponto 10. Assim, deve proceder do seguinte modo:

- 11.b. O sedimento resultante é ressuspensão em 1 mL de solução Percoll gelada (ajustar o volume consoante a quantidade do sedimento).
- 12.b. Centrifugar esta mistura (12000 xg, 2 min) numa centrífuga de bancada e colher a fração sinaptosomal, presente como uma camada superior.
- 13.b. Lavar, usando 1 mL de solução Krebs/HEPES gelada.
- 14.b. Centrifugar novamente (12000 xg, 2 min), descartar sobrenadante.
- 15.b. Ressuspender o sedimento em 1,7 mL Solução Krebs/HEPES (ou um volume ajustado para realizar o ensaio por quatro grupos).
- 16.b. Manter os sinaptossomas em gelo até ao momento de iniciar as experiências.

Determine a quantidade de proteína na amostra final (usando o método de Biureto (PL 4) ou o método de Bradford).

Nota: A manipulação e ressuspensão da fração sinaptosomal requer a utilização de pontas de pipeta de plástico de 1 mL, tendo todo o cuidado para evitar fazer bolhas de ar, dado que estas podem promover a rutura sinaptosomal, e introduzir erros experimentais.

BIBLIOGRAFIA ESPECÍFICA:

Cunha, R.A. (2001), Bringing the brain into the test tube: an experiment illustrating the effect of ethanol on nerve terminal viability. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29: 105-109. <https://doi.org/10.1111/j.1539-3429.2001.tb00087.x>

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 7: AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR ATRAVÉS DA ATIVIDADE DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE**

OBJETIVOS: Avaliar de forma simples e rápida a lise celular provocada por agentes externos. Aprender a correlacionar toxicidade com lise celular.

INTRODUÇÃO:

A lactato desidrogenase LDH é uma enzima plasmática que é libertada para o meio extracelular aquando da lise celular (ou lise de sinaptossomas), daí que pode ser usada como indicador da integridade celular e/ou da toxicidade de vários agentes que induzem a perda de integridade membranar. Esta enzima converte piruvato em lactato em presença de NADH, sendo este consumido na reação e convertido em NAD^+ (Figura 1). Dado que o NADH absorve luz a um comprimento de onda de 340 nm, a reação pode ser seguida, medindo o decréscimo da absorvência a 340 nm, que é proporcional ao consumo de NADH e portanto, à atividade enzimática.

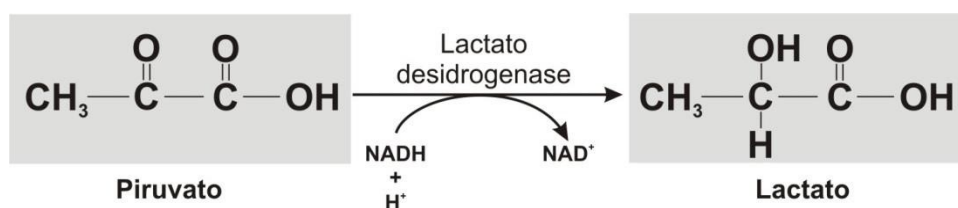


Figura 1: Reação promovida pela LDH em presença de NADH e de piruvato.

Este trabalho prático pode ser realizado em sinaptossomas (PL 6, anexo B) ou em células em cultura, dependendo da disponibilidade de material biológico.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• Pipetas automáticas (vários volumes) • Pontas de pipeta, • Pipetas de Pasteur, • Caixas de cultura, • Tubos de centrifuga de 1,5 mL e de 15 mL • Incubadora • Centrifuga de bancada • Espectrofotômetro ou leitor de microplacas	• Etanol absoluto; • Tampão PBS; • Tampão Krebs/HEPES • Sais: NaCl, KCl, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, MgCl₂ • Glicose, HEPES, • Reagente de Bradford • Piruvato • Tris • Triton X-100

SOLUÇÕES:

- Solução salina de fosfato (**PBS**; em mM): 137,0 NaCl, 2,7 KCl, 1,75 KH₂PO₄, 10,0 Na₂HPO₄, pH 7,4.
- Solução Krebs/HEPES (em mM): 110 NaCl, 3 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glicose e 25 HEPES, pH 7,4
- Meio de reação: Tris 84 mM, piruvato 5 mM, pH 7,3

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

Neste trabalho pode usar uma caixa de células de 12 poços, contendo células aderentes (para facilitar o trabalho), como por exemplo células Caco-2 ou HepG2, e que tenham sido semeadas à mesma densidade (mesmo número de células/poço). Opcionalmente pode usar sinaptossomas, que são um material fácil e rápido de preparar (segundo o protocolo PL6 - Anexo B).

A1: exposição de sinaptossomas a diferentes concentrações de etanol

1. Prepare 3 soluções de etanol em PBS (ou em Krebs/HEPES), a 55, 110 e 220 mM.
2. Dividir a preparação de sinaptossomas por 4 tubos (identifique os tubos); 90 µL de suspensão de sinaptossomas por tubo. De Seguida adicionar 900 µL de:

- a. (1) PBS (controlo)
 - b. (2) Etanol a 55 mM
 - c. (3) Etanol 110 mM
 - d. (4) Etanol 220 mM
3. Ressuspender, cuidadosamente e incubar durante 15 minutos a 37°C.
4. Centrifugar a 12,000 rpm numa mini-centrifuga de bancada.
5. Colher os sobrenadantes para tubos devidamente marcados.
6. Aos sedimentos adicionar 1 mL de PBS com Triton X-100 a 2% (v/v). Esperar 2 a 3 minutos e agitar em vórtex durante 15 s (ou, sem fazer muita espuma, homogeneizar muito bem com uma ponta de pipeta).
7. Colocar todos os tubos no gelo até análise (ou congelar).

A2: exposição de células a diferentes concentrações de etanol

1. Prepare 3 soluções de etanol em PBS (ou em Krebs/HEPES), a 55, 110 e 220 mM.
2. Remover o meio de cultura e a lavar as células com PBS (tenha atenção para nunca deixar as células secar).
3. Remover o PBS e adicionar em cada poço (fazendo triplicados), 1 mL/poço de:
 - a. (1) PBS (controlo)
 - b. (2) Etanol a 55 mM
 - c. (3) Etanol 110 mM
 - d. (4) Etanol 220 mM
4. Incubar durante 15 minutos a 37°C.
5. Colher os sobrenadantes para tubos devidamente marcados.
6. Aos sedimentos adicionar 1 mL de PBS com Triton X-100 a 2% (v/v), por poço. Esperar 2 a 3 minutos e raspar, usando um raspador de células, ou, sem fazer muita espuma, homogeneizar muito bem com uma ponta de pipeta.
7. Colher para tubos devidamente marcados.
8. Colocar todos os tubos no gelo até análise (ou congelar).

B: determinação da LDH

1. Descongele os tubos com os sobrenadantes e com os sedimentos celulares obtidos na aula anterior (caso tenham sido congelados).
2. Marque adequadamente uma placa de 96-poços, considere fazer a análise em triplicados (caso utilize os extratos de sinaptossomas, dado que só usou 1 tubo por condição). Deve analisar os sobrenadantes e os sedimentos lizados com detergente.
3. A cada poço das placas de cultura de 96 poços adicionar:
 - 176 μL de meio de reação (Tris + piruvato),
 - 10 μL de proteína (conteúdo dos tubos),
 - 14 μL de NADH (0,1 M).

} Volume total = 200 μL

NOTA: O NADH só se adiciona no início da reação, quando já estiverem para ler!

4. Registe a absorvência a 340 nm durante 3 minutos, ou faça 2 leituras a $t = 0$ e a $t = 3$ minutos, de forma a poder determinar o consumo de NADH pela variação da absorvência a 340 nm.

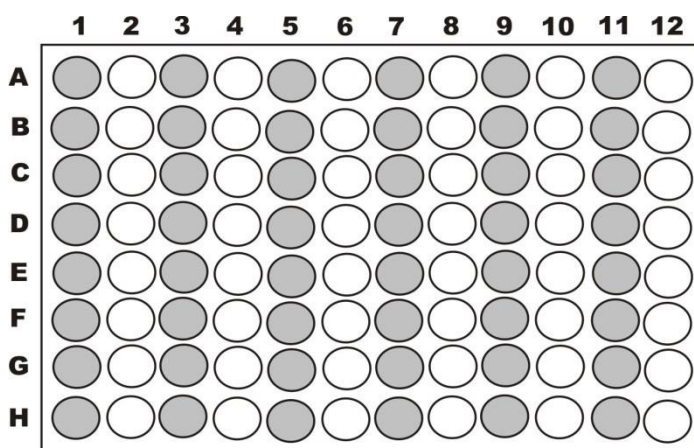


Figura 2. Placa de 96-poços, para efetuarem a marcação, de acordo com o que vai ser aplicado a cada poço.

5. Calcular a atividade da LDH, para cada um dos ensaios, considerando o decréscimo da absorvência (declive) em cada ensaio, e que o coeficiente de extinção molar (ϵ), a 340 nm, de NADH = $6,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

C: Determinação da proteína na amostra

1. Construa uma reta padrão, partindo duma solução de albumina (BSA) a 1 mg/mL.
2. Prepare uma placa de 96-poços, pipetando a água e a proteína segundo as quantidades indicadas na Tabela 1 (faça a marcação adequada da placa, usando um esquema como representado na Figura 2):

Tabela 1: quantidades necessárias para a realização de uma reta padrão.

Quantidade de proteína (μL)	0	2	6	10	15	20
Quantidade de H_2O (μL)	100	98	94	90	85	80
Quantidade de reagente de Bradford (μL)	100	100	100	100	100	100

3. Quantifique também a proteína das suas amostras (sobrenadantes e sedimentos).
4. Adicione as suas amostras à placa de 96-poços, em duplicados.
 - a) Para os sobrenadantes, adicione (em μL): 80 de H_2O , 20 de amostra e 100 de reagente de Bradford.
 - b) Para os sobrenadantes, adicione (em μL): 95 de H_2O , 5 de amostra e 100 de reagente de Bradford.

Nota: O reagente de Bradford é adicionado no fim a todos os poços (usando uma pipeta multicanal, caso tenham disponível, ou o mais rapidamente possível, para não haver um grande intervalo de tempo entre a adição à primeira amostra e à última.

5. Após a adição do reagente de Bradford, aguarde 15 minutos e depois leia a placa a 590 nm.

C. Quantificação da atividade da LDH

1. Comece por construir a reta padrão, para a quantidade de proteína.
2. Partindo desta calcule a concentração de proteína em cada uma das amostras.
3. Determine a atividade da LDH em função do tempo de reação e da quantidade de proteína presente em cada ensaio.
4. Calcule a atividade da LDH dos sobrenadantes em percentagem da LDH total por ensaio.

5. Faça gráficos para representar os resultados, pode usar ferramentas do Excel.

RESULTADOS:

Após análise de todos os resultados, e construção dos respetivos gráficos, responda às seguintes questões.

1. Compare a atividade da LDH do controlo com a atividade da LDH em presença de etanol, compare as diferentes concentrações. Que conclusões tira?

2. Compare a atividade da LDH do controlo com a atividade da LDH em presença das diferentes concentrações de etanol. Que conclusões tira?

3. Que pode concluir sobre o efeito do etanol nos sinaptossomas (ou nas células)?

Cunha, R.A. (2001), Bringing the brain into the test tube: an experiment illustrating the effect of ethanol on nerve terminal viability. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29: 105-109. <https://doi.org/10.1111/j.1539-3429.2001.tb00087.x>

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095497. PMID: 29858337.

UC: Fisiologia Celular – Protocolos práticos**PL 8: QUANTIFICAÇÃO DO MENSAGEIRO CELULAR ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

OBJETIVOS: Neste trabalho pretende demonstrar-se que é possível determinar a quantidade de óxido nítrico libertado por macrófagos, dado que este é espontaneamente convertido em nitrito e este último pode ser detetado através do reagente de Griess, com um simples teste colorimétrico.

Introdução: O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora importante em vários órgãos, com um papel na construção de conexões do sistema nervoso que contribuem para aprendizagem e a memória, atua como mensageiro no sistema cardiovascular, imunitário, respiratório, entre outros. O NO quando presente em baixas concentrações regula consideravelmente as funções fisiológicas, mas em elevadas concentrações pode contribuir para processos patogénéticos. O NO é produzido pela sintetase do óxido nítrico (NOS), a partir de arginina (Figura 1). Após a produção de NO dentro das células, este é libertado, difundindo através da membrana plasmática, para a sua vizinhança e difunde principalmente através das membranas celulares das células-alvo como um sinal modulador dos processos biológicos.

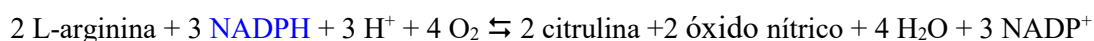
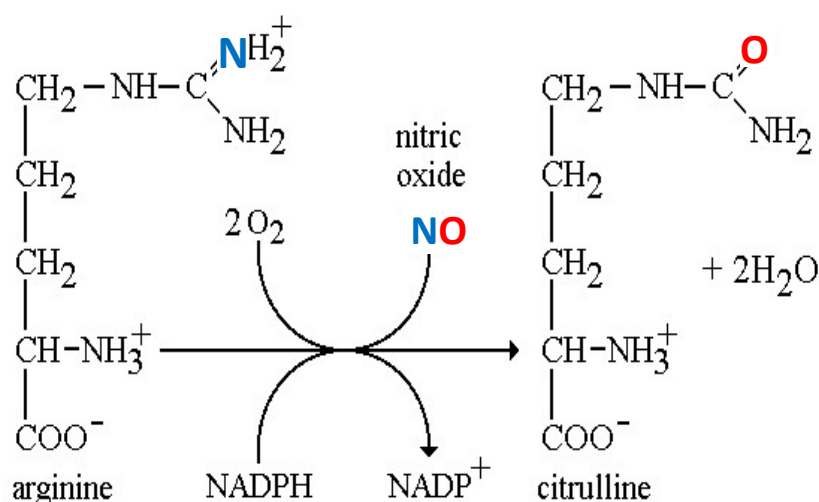


Figura 1. Síntese de óxido nítrico

O NO é libertados por células do sistema imunitário, por estimulação destas com lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, sendo neste caso designado como molécula pro-inflamatória. As células RAW 264.7, linha celular de macrófagos de murganho, quando exposta a LPS produzem NO que libertam para o meio de cultura, como sinal oró-inflamatório. Moléculas com ação anti-inflamatória vão reduzir a produção de NO. O NO libertado, em condições fisiológicas, após algum tempo é convertido em nitrito e nitrato, por oxidação espontânea. O nitrito pode ser quantificado usando o reagente de Griess.

REAGENTES E MATERIAL:

MATERIAL:	Reagentes:
• Placas de cultura de 96 poços • Células RAW 264.7 cultivadas em placas de cultura de 96 poços • Pipetas automáticas de vários volumes • Pontas de pipeta estéreis e não-estéreis. • Câmara de Neubauer • Incubadora de CO₂ • Leitor de microplacas	• Sulfanilamida • <i>N</i>-(1-naftil)dicloridrato • Lipopolissacarídeo (LPS) a 1 mg/mL. • Sais para soluções • Meios de culturas • NaNO₂

SOLUÇÕES:

- Reagente de Griess, composto por partes iguais (v/v) de: solução de 1% (w/v) sulfanilamida de preparada em solução aquosa de 5% H₃PO₄ (v/v) e solução de 0,1% (w / v) *N*-(1-naftil)dicloridrato de etilenodiamina em água].
- Solução aquosa de NaNO₂ (1 mM).
- Meio de cultura completo: Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), suplementado com 1 mM de L-glutamina, 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL).
- Meio de cultura sem soro: DMEM, suplementado com 1 mM de L-glutamina e antibióticos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:**A. Preparação das placas de cultura com células RAW 264.7**

1. Raspar células RAW 264.7 de um frasco de crescimento, homogeneizar, ressuspender.
2. Colher uma porção das células ressuspensas, contar (usando câmara de Neubauer ou contador automático de célula), e diluir em meio de cultura completo para a densidade de 5×10^4 células/mL,
2. Semear em placas de 96 poços, (100 μ L/poço),
3. Deixar na incubadora de CO₂, por 48 h, para estabilização e crescimento;

B. Incubação das células

Neste passo, as células vão ser incubadas com compostos indutores da produção de óxido nítrico (NO), como o Lipopolissacarídeo (LPS), e supressores/inibidores da produção de NO, como alguns flavonoides (e.g. quercetinas) e ácidos fenólicos (e.g. ácido rosmarínico).

1. Preparar 5 mL de solução 1,0 μ g/mL LPS em meio de cultura sem soro estéril (solução stock de LPS a 1 mg/mL).
2. A partir da solução anterior prepare 0,5 mL de soluções de quercetina e de ácido rosmarínico a 5, 10 e 20 μ M.
3. Prepare também soluções de quercetina e de ácido rosmarínico a 5, 10 e 20 μ M em meio de cultura sem soro estéril.
4. Marque a placa de cultura, e faça um esquema das adições para depois facilitar a análise dos resultados. Use as linhas A a D, para adicionar os compostos nas soluções sem LPS, e as linhas E a H, para adicionar os compostos nas soluções com LPS. Reserve a coluna 1 para o controlo (0 μ M compostos).
5. Cuidadosamente, remova o meio de cultura da 1ª coluna, usando uma pipeta multicanal, adicione 100 μ L de meio de cultura sem soro a cada poço (A a D) e 100 μ L de solução 1,0 μ g/mL LPS, controlo negativo e positivo, respetivamente.
6. Proceda de igual modo para a coluna 2, aplicando 100 μ L / poço de solução de quercetina (5 μ M), em meio sem soro (poços A a D) e 100 μ L /poço de solução de quercetina (5 μ M), em meio sem soro com LPS (poços E a H).

7. Proceda de igual modo para as restantes soluções.
8. Deixe a incubar, na incubadora de CO₂, durante 24 h.

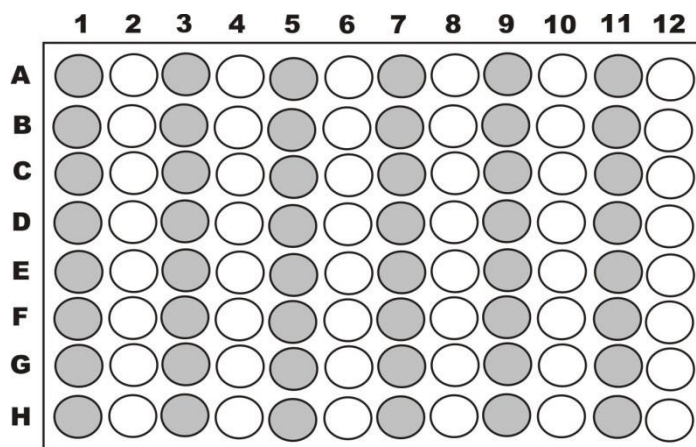


Figura 2. Placa de 96-poços, para efetuarem a marcação, de acordo com o que vai ser aplicado a cada poço.

C. Construção da reta padrão

1. Prepare 500 µL uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) a 100 µM (a partir de uma solução 1 mM).
2. Numa placa de cultura adicione 50 µL de água aos poços B a H de 3 colunas.
3. Na linha A (coluna 1 a 3), adicione 100 µL de NaNO₂ a 100 µM.
4. Faça diluições sucessivas, pipetando 50 µL de NaNO₂ da linha A (coluna 1 a 3), misturando com a água da linha B; remova 50 µL desta solução e misture com a água da linha C, repita sucessivamente até chegar à linha G. Aí elimine os 50 µL de solução, ficando na linha H apenas água (0 µM NaNO₂).
5. Adicione, a cada poço, 50 µL de reagente de Griess, usando uma pipeta multicanal.
6. Deixe incubar, 15 minutos, no escuro à temperatura ambiente.
7. Ler a absorvência a 550 nm, usando um leitor de microplacas.
8. Construa a reta padrão.

D. Quantificação do NO produzido

1. Faça o esquema da placa de cultura e marque uma placa nova seguindo o mesmo esquema.

2. Após 24 h de incubação (ponto 8, de B), remova 50 μL de cada poço, usando uma pipeta multicanal e transfira para uma placa de cultura nova (ou limpa).
3. Adicione, a cada poço, 50 μL de reagente de Griess.
4. Incubar durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente.
5. Ler a absorvência a 550 nm, usando um leitor de microplacas.
6. Para a análise de dados, subtração dos brancos (controlo negativo);
7. Calcular a quantidade de nitrito em cada poço, usando a equação da reta calculada anteriormente.
8. Calcular a média da concentração de nitrito em cada condição.
9. Expressar os resultados como percentagem de controlo.

RESULTADOS:

1. Construa a reta padrão (Intensidade de absorvência vs. Concentração de NaNO_2), use o Excel para este efeito. Determine a equação de calibração, por regressão linear.

2. Com base na equação da reta padrão, e nas absorvências obtidas em D, calcule a quantidade de NO produzido em cada condição, em μM . (preencha os quadros)

a) Quantidade de NO no controlo positivo (após correção do branco):

--

 μM

- b) Quantidade de NO produzido por exposição a ácido rosmarínico (AR) e quercetina (Q):

Células expostas a:	[NO], μM
AR 5 μM	
AR 10 μM	
AR 20 μM	

Células expostas a:	[NO], μM
Q 5 μM	
Q 10 μM	
AQ 20 μM	

c) Interprete os resultados obtidos:

3. Calcule a quantidade de NO produzido expresso em função do controlo positivo, represente graficamente em percentagem do controlo (Use o Excel para os gráficos).

ANEXO II: PROVAS DE AVALIAÇÃO TEÓRICAS E PRÁTICAS

A título de exemplo, de seguida adicionam-se algumas provas de avaliação contínua, da componente teórica e prática que foram utilizadas em anos letivos anteriores para aferição dos conhecimentos adquiridos pelos estudantes.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

☐ 1º Ciclo em Biologia☐ 1º Ciclo em Bioquímica

Unidade Curricular: Fisiologia Celular



Teste 1

2º Semestre ____/____

Nome: _____ Nº _____

1. [1,2 valores] Faça a legenda da figura, não use abreviaturas:

1: _____

2: _____

3: _____

4: _____

5: _____

6: _____

2. [1,0 valores] Enuncie 5 **funções** das membranas celulares:

3. [1,6 valores] Faça corresponder **a(s)** categoria(s) (coluna à esquerda) a cada elemento (colunas à direita).

Categoria	Elemento	
Glicerofosfolípidos (1)	Colesterol:	Esfingomielina:
Esfingolípidos (2)	Fosfatidilcolina:	Ácido araquidónico:
Lípidos (3)	Ceramida:	Cefalina (PE):
Proteína (4)	Cerebrósido:	Ácido fosfatídico:
Nenhuma das anteriores (5)	Canal de cloreto:	Galactose:

4. [1,0 valores] Comente a seguinte afirmação: “O colesterol é um regulador da fluidez membranar que apresenta propriedades (a este nível) dualistas”.

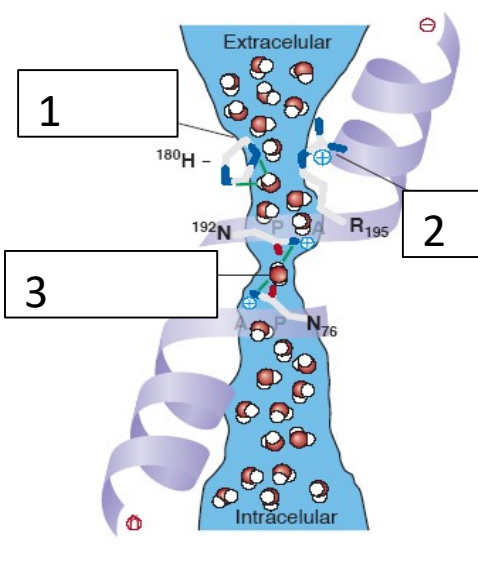
5. [1,6 valores] Os ácidos gordos dos glicerofosfolípidos influenciam a fluidez membranar. Dos ácidos gordos mais comuns destacam-se: o ácido esteárico (18:0), o ácido oleico (18:1 (Δ^9)) e o ácido linolénico (18:3($\Delta^{9,12,15}$))

a) Represente, esquematicamente, a estrutura química do ácido oleico e do ácido linolénico.

b) Diga, sucintamente, de que forma é que a composição lipídica relativa nestes três ácidos gordos vai influenciar a fluidez membranar e como é que isso pode afetar a fisiologia da célula.

6. [1,5 valores] Diga o que entende por transporte facilitado e caracterize (sucintamente) cada um dos 3 tipos de transportadores incluídos nesta categoria.

7. [1,2 valores] As aquaporinas apresentam várias isoformas com diferentes seletividades. Na figura representa-se uma subunidade da AQP1 que é seletiva para água, estando as 3 principais razões para a seletividade assinaladas por 1, 2 e 3, caracterize-as sucintamente

	
---	---

8. [5,0 valores] Diga se são verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações. Nas afirmações falsas sublinhe a(s) palavra(s) errada(s) e indique a palavra correta. **NOTA:** as falsas quando não justificadas mantêm a cotação respetiva, contudo quando a justificação estiver errada a questão é considerada toda errada, tendo cotação zero. Tolerância de 4 questões erradas.

- ___ a) Os canais iónicos, em geral, são constituídos por proteínas periféricas.
- ___ b) As aquaporinas são canais de H_2O mas também são permeados por H_3O^+ .
- ___ c) O glicerol é uma molécula capaz de permear canais aquosos.
- ___ d) Bombas tipo P são assim designadas porque apresentam um local de ligação para protões.
- ___ e) Os canais iónicos medeiam transporte passivo logo a favor do gradiente de concentração.
- ___ f) Os canais iónicos sensíveis a voltagem contêm na sua estrutura um segmento transmembranar (geralmente o segmento S6) que funciona como sensor de voltagem.
- ___ g) Os glicerofosfolípidos contêm um esqueleto de colesterol.
- ___ h) O colesterol encontra-se nas membranas de representantes dos reinos: animal, vegetal e protista
- ___ i) Nas bicamadas lipídicas as interações lípido - lípido e lípido - proteína são tipo covalente.
- ___ j) Os hidratos de carbono das membranas estão ligados a lípidos e ou a proteínas por ligações que são tipo covalente.
- ___ l) Os hidratos de carbono da membrana plasmática estão voltados para o citossol.
- ___ m) O dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente capaz de remover proteínas integrais sem alterar a sua estrutura terciária.
- ___ n) O movimento de *flip-flop* é um movimento lateral de lípidos que pode levar cerca de 10^5 segundos para ocorrer.
- ___ a) “Bombas” da classe F transportam H^+ ao longo do gradiente de protões com gasto de ATP.
- ___ b) Os ionóforos são agentes que destroem os gradientes iónicos transmembranares.
- ___ c) Na sua maioria, os ionóforos são de origem natural, sintetizados por microrganismos, com vista à defesa contra outros microrganismos.
- ___ d) A gramicidina A (ionóforo, antibiótico) forma poros na membrana seletivos para aniões.
- ___ e) A adição de TTX (bloqueador de canais de Na^+) ao meio extracelular de um neurónio provoca uma rápida repolarização do mesmo
- ___ f) A célula beta pancreática funciona como um sensor metabólico, traduzindo variações na concentração plasmática de glicose em variações (diretas) da sua taxa metabólica.
- ___ g) A secreção de insulina estimulada por glicose é um processo independente de Ca^{2+} intracelular.

9. [1,8 valores] Preencha o quadro, colocando em cada coluna 3 características de cada tipo de estrutura indicada (MFs, FIs e MTs), **de modo que cada característica distinga essa estrutura das outras duas** (olhando para uma característica permite-lhe saber de que estrutura estamos a falar).

Microfilamentos	Filamentos intermédios	Microtúbulos
1) _____ _____	1) _____ _____	1) _____ _____
2) _____ _____	2) _____ _____	2) _____ _____
3) _____ _____	3) _____ _____	3) _____ _____

10. [0,4 valores] Comente a afirmação: “as proteínas motor também podem ser designadas por enzimas mecânico-químicas”

11. [1,2 valores] Das questões que se seguem, escolha a (ou as) opção correta.

a) As miosinas são motores moleculares direccionados, na maioria movimentam-se ao longo de:

- i) F-actina, do pólo (-) para o pólo (+). ii) F-actina, do pólo (+) para o pólo (-).
iii) MTs, do pólo (-) para o pólo (+). ii) MTs, do pólo (+) para o pólo (-).

b) As cinesinas são motores moleculares presentes em células:

- i) eucariotas, ii) procariotas iii) ambas

c) As dineínas geralmente são motores direccionados para:

- i) o pólo (+). ii) o pólo (-).

d) O grupo de FIs onde se inserem as laminas nucleares forma associações na forma de:

- i) homopolímeros (entre si), ii) de heteropolímeros (com outros grupos de FIs)
iii) de ambos i) e ii)

e) Relativamente ao dímero alfa, beta-tubulina:

- i) é uma GTPase, ii) é uma ATPase, iii) apresenta polaridade,
iv) não apresenta polaridade,

12. [2,5 valores] Diga se são verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações. Nas afirmações falsas sublinhe a(s) palavra(s) errada(s) e indique a palavra correcta. **NOTA:** as falsas quando não justificadas mantêm a cotação respectiva, contudo quando a justificação estiver errada a questão é considerada toda errada, tendo cotação zero. Tolerância de 4 questões erradas, a partir daí as erradas descontam nas certas.

_____ a) As proteínas motor associam-se a proteínas do citosequeleto (MFs; FIs; MTs).

_____ b) Os filamentos de actina são homopolímeros.

_____ c) A polimerização de FIs depende da T, e apresenta uma elevada taxa de despolimerização para T próximo dos 4°C.

_____ d) A proteína CapZ, é uma proteína tampa associada a MFs (F-actina).

_____ e) Os processos de mitose e meiose dependem da T.

_____ f) Os cílios e os flagelos são estruturas formadas por arranjos de MTs.

_____ g) O citoesqueleto serve de ancoragem de várias proteínas membranares.

_____ h) Um desmossoma encontra-se associado a MTs.

_____ i) A γ -tubulina é fundamental para o processo de salvamento dos MTs.

_____ j) As proteínas motor, Kinesina e Dineína, requerem GTP para a sua actividade.

_____ l) Durante o processo de citocinese, feixes de actina e proteínas motor (a Miosina II) desempenham um papel relevante.

_____ m) A organização de um dímero de FI é paralela enquanto a de 2 dímeros num tetrâmero é anti-paralela.

_____ n) As queratinas, acídicas e as queratinas alcalinas, encontram-se em células epiteliais e associam-se formando homopolímeros.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro☐ 1º Ciclo em Biologia☐ 1º Ciclo em Bioquímica**Unidade Curricular: Fisiologia Celular**Teste 2
2º Semestre ____/____

Nome: _____ N.º _____

Perguntas 1-15: assinale a sua opção, com um círculo [0,5 x 12 = 6,0 valores].

1. Os receptores de IP_3 são encontrados:
 - a) na membrana plasmática
 - b) na mitocôndria
 - c) no retículo endoplasmático
 - d) no núcleo
2. O mensageiro que participa na regulação da pressão sanguínea:
 - a) monóxido de carbono (CO)
 - b) óxido nítrico (NO)
 - c) IP_3
 - d) AMPc
3. Qual das seguintes enzimas é responsável pela síntese do primeiro mensageiro NO:
 - a) NO fosfatase
 - b) NO sintetase
 - c) NO sintase
 - d) NO cinase
4. Função das proteínas cinase, importantes nos processos de sinalização celular:
 - a) activar proteínas G
 - b) servir de receptor de mensageiros hidrofóbicos
 - c) fosforilar proteínas
 - d) converter ATP em AMPc
5. A adenilil ciclase:
 - a) converte ATP em AMPc
 - b) é um receptor que liga hormonas
 - c) é activada directamente por ligação a um receptor membranar
 - d) encontra-se localizada no citoplasma
6. Os receptores associados a proteínas tirosina cinase (RTK):
 - a) localizam-se no citoplasma
 - b) são monoméricos quando se encontram activados
 - c) sofrem fosforilação quando a eles se liga um ligante/mensageiro
 - d) participam no modo de acção do glucagon

7. Calmodulina:

- a) proteína que participa na via JAK-STAT
- b) a sua estrutura tridimensional é alterada após ligar Ca^{2+}
- c) associa-se a GPCR
- d) funciona como receptor nuclear de esteróides

8. Qual das seguintes enzimas é responsável pela síntese dos segundos mensageiros, DAG e IP_3 :

- a) fosfatase
- b) fosfolipase
- c) hidrolase
- d) cinase

9. O sinal que permite um macrófago correctamente detectar e fagocitar uma célula em apoptose:

- a) fosfatidilcolina na monocamada externa da membrana plasmática da célula que esta a sofrer apoptose
- b) fosfatidilinositol libertado para o exterior da célula que esta a sofrer apoptose
- c) DAG na membrana da célula que esta a sofrer apoptose
- d) fosfatidilserina na monocamada externa da membrana plasmática da célula que esta a sofrer apoptose

10. A via de sinalização JAK-STAT:

- a) necessita que participe a proteína Ras
- b) exige a participação de proteínas G
- c) é activada nos processos apoptóticos
- d) tem uma acção nuclear promovendo a transcrição de genes

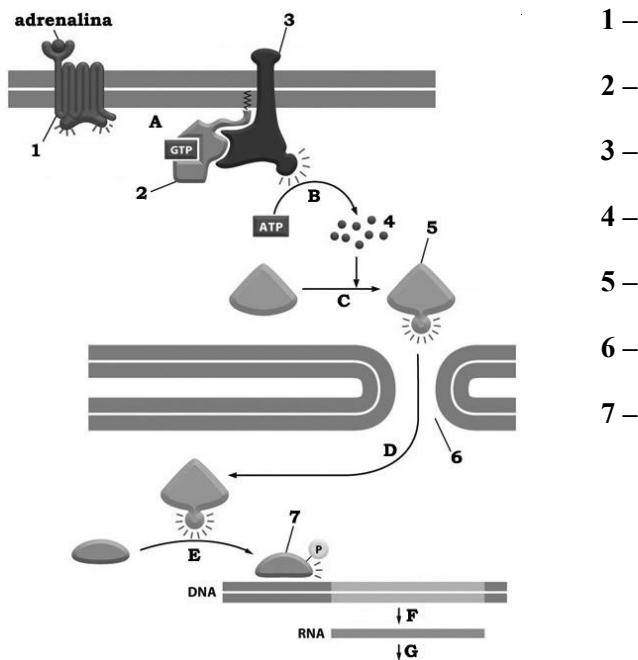
11. Na apoptose:

- a) ocorre um aumento do volume da célula
- b) verificasse activação de enzimas CAD
- c) as proteínas Bim são anti-apoptóticas
- d) ocorre com libertação dos conteúdos celulares da célula em apoptose

12. Sinalização celular em que participa a eritropoietina, a afirmação INCORRECTA é:

- a) a eritropoietina liga-se a um GPCR
- b) é uma via importante para estimular a eritropoiese nas células da medula óssea
- c) o receptor da eritropoietina é do tipo que apresenta actividade intrínseca (RTK)
- d) uma das vias que participa na sinalização com eritropoietina é a JAK-STAT

13. [4 valores]: O seguinte esquema representa a via de sinalização iniciada pela adrenalina numa célula alvo (por exemplo, adipócitos). Faça a legenda (1-7) da figura seguinte e explique de **forma sintética**, o mecanismo de ação dessa hormona, utilizando as letras A, B, C, D, E, F e G.



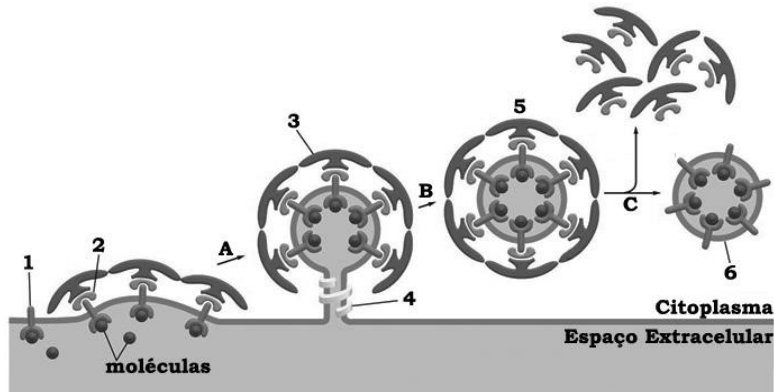
14. [4,0 valores]. A apoptose é um processo celular de ocorrência vulgar em Sistemas Biológicos

- a. Explique o papel da apoptose durante o processo embrionário, especificamente no desenvolvimento do sistema nervoso

b. Explique de forma sintética e recorrendo a um esquema, como ocorre o processo apoptótico por via intrínseca.

c. Como poderia verificar em laboratório que uma célula esta a morrer por apoptose por via intrínseca? E por via extrínseca? Justifique.

15. [3 valores]. A formação de vesículas revestidas com proteínas é um processo complexo. Faça a legenda (1-6) da figura seguinte e explique de **forma sintética**, o mecanismo de formação dessas vesículas, utilizando as letras A, B e C



1 -

2 -

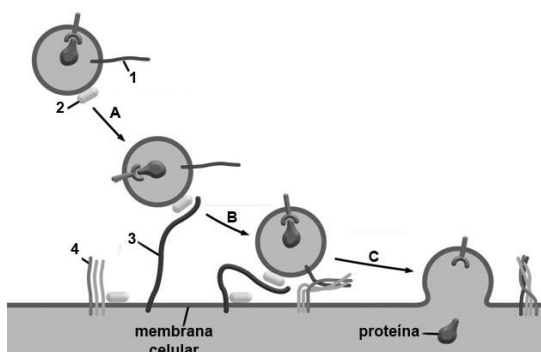
3 -

4 -

5 -

6 -

16. [3 valores]. A fusão de vesículas com membranas-alvo é um processo complexo. Faça a legenda da seguinte figura (1, 2, 3, 4) e seguidamente explique de **forma sintética** como ocorre essa fusão utilizando as letras A, B e C.



1 -

2 -

3 -

4 -

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

☐ 1º Ciclo em Biologia☐ 1º Ciclo em Bioquímica

2º Semestre 2014/15

Unidade Curricular: Fisiologia Celular

Mini-teste 1 - Prática

Nome Completo: _____ N.º _____**Parte prática (Parte 1):**

1. Relativamente ao trabalho prático da determinação dos grupos sanguíneos, responda às seguintes questões:

a) (1 valor) Os grupos sanguíneos do sistema ABO são determinados por antígenos que são (assinale a opção correta):

- | | |
|----------------------|----------------------------|
| i) Glicolípidos | ii) Proteínas; |
| iii) Glicoproteínas; | iv) Lípidos) |
| v) Ambos i) e ii) | vi) Nenhum dos anteriores, |
| vii) Ambos iv) e v | |

b) (1 valor) Neste sistema de grupos sanguíneos (ABO), os antígenos que estamos a falar, encontram-se:

- i) Somente na membrana plasmática do glóbulo vermelho;
- ii) Em glóbulos vermelhos, plaquetas e outras células;
- iii) Em nenhum dos anteriores

c) (2 valores) O precursor do antígeno A e do antígeno B é o antígeno H. Responda ao seguinte:

A antigen B antigen	C1) Que moléculas estão indicadas pelas setas: 1: _____ 2: _____ C2) Como se designam, no geral, as enzimas que adicionam estas moléculas ao antígeno H: R: _____ _____ _____
-----------------------------------	--

d) (1 valor) O antígeno H está presente em:

- | | | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| i) Indivíduos do grupo O, | ii) Indivíduos do grupo A, | iii) Indivíduos do grupo B, |
| iv) Indivíduos do grupo AB, | v) todos os anteriores, | vi) nenhum dos anteriores |

c) (3 valores) Termine de preencher a tabela adequadamente:

Tipo de Grupo de sangue	Antígenos nos glóbulos vermelhos	Anticorpos no soro	Pode receber sangue completo de:	Pode dar eritrócitos ao tipo
A	A		A e O	
B	B		B e O	
AB	A e B			
O	(nem A nem B)			

2. (3 valores) Relativamente ao fator Rh

a) Indivíduos Rh^+ expressam o antígeno H na membrana dos seus eritrócitos. (☐ V ou ☐ F). Justifique:

b) Os indivíduos designados por Rh^- , produzem algum anticorpo? (☐ Sim ou ☐ Não).

Se respondeu sim, como se designam-se: _____

Estes anticorpos são produzidos:

i) Sempre ii) Nunca iii) Somente se entrarem em contato com sangue Rh^+

c) Qual é a estrutura molecular que está associada ao fator Rhesus? Escolha as opções corretas (escolhas erradas descontam nas certas):

- | | |
|--|---|
| i. Glicerofosfolípidos, com função de receptor | v. Glicoproteínas; com função de receptor |
| ii. Glicerofosfolípidos, associados a canal iónico | Glicoproteínas; associados a canal iónico |
| iii. Esfingolípidos; com função de receptor | vi. Todas as anteriores |
| iv. Esfingolípidos; associados a canal iónico | vii. Nenhum das anteriores, |

Justifique brevemente a(s) sua(s) escolha(s)

3. Relativamente ao protocolo sobre a ação dos detergentes na membrana do eritrócito, responda às seguintes questões.

a) (1 valor) Qual dos 2 detergentes usados, SDS ou Triton-X100, é desnaturante.

Que dado experimental lhe permite fundamentar a sua afirmação: _____

b) (3 valores) Indique se são verdadeiras ou falsas as seguintes afirmações, corrigindo as falas (sublinhe a(s) palavra(s) que considera errada e escreva por cima a(s) palavra(s) corretas, de forma a tornar a afirmação verdadeira.

	O SDS tem uma ação mais eficaz na lise membranar que o Triton-X
	A eficácia da ação dos detergentes foi averiguada seguindo a integridade dos eritrócitos
	A quantificação da hemoglobina foi efetuada registando a absorvência a 340 nm.
	A lise total de eritrócitos é verificada no final, pela presença de um sedimento depois de centrifugar os tubos.
	Diluindo 50x uma solução 1% obtenho uma solução de concentração final 0,05%.
	O cálculo do fator de diluição (FD) pressupõe o seguinte cálculo: $FD = \frac{[final]}{[inicial]}$
	O Triton-X é um detergente aniónico
	O Triton-X é um detergente desnaturante, por isso no tubo de maior concentração a hemoglobina adquiriu uma coloração rosa amarelada
	Para calibrar o espectrofotómetro, usou-se para branco uma solução de hemoglobina 1 M.
	Pequenas concentrações de Triton-X são mais prováveis de produzir lise celular que pequenas concentrações de SDS

4. (1 valores) Relativamente à permeabilidade da membrana do eritrócito aos aniões periodato, metabissulfito e ferricianeto (trabalho realizado na aula prática), verificou o seguinte:

a) (escolha a opção correta e justifique):

i) Maior permeabilidade para monovalentes, porque _____

ii) Maior permeabilidade para divalente, porque _____

iii) Igual permeabilidade para monovalentes, e divalentes _____

b) (2 valores) A entrada destes iões no eritrócito pode ser seguida espectrofotometricamente, porque (escolha a opção correta).

i) São iões corados, e segue-se o aumento de absorvência relativamente à sua cor.

ii) Têm características oxidantes e promovem a oxidação da oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina.

iii) Têm características redutoras e promovem a redução da oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina.

iv) Têm características quelantes e reduzem o valor da absorbência da oxi-hemoglobina.

v) Têm características quelantes e reduzem o valor da absorbência da meta-hemoglobina.

vi) Duas das anteriores: _____

vii) Nenhuma das razões apresentadas.

Justifique brevemente a(s) sua(s) escolha(s)

c) (2 valores) Prevê que este transporte esteja a ocorrer por:

i) Difusão simples através da bicamada, ii) via canal iónico

iii) via transporte facilitado

iv) outro tipo de transporte. Qual? _____

Justifique brevemente a(s) sua(s) escolha(s)

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

☐ 1º Ciclo em Biologia☐ 1º Ciclo em Bioquímica

Unidade Curricular: Fisiologia Celular



2º Semestre 2014/15

Mini-teste 2 - Prática

Nome completo: _____

Nº _____

Nota: Não escrever nas margens esquerdas**LEIA ATENTAMENTE O TESTE. Resposta unicamente às questões colocadas**

1. (4,0 valores). Diga se são verdadeiras (V) ou falsas (F) as seguintes afirmações. **Corrija** as falsas de modo a torná-las verdadeiras. Nas falsas sublinhe a(s) palavra(s) que considera incorreta(s) e escreva por cima (ou por baixo) a(s) palavra(s) correta(s). (**Não reescreva as frases completas**).

NOTAS: i) quando assinala, V ou F, corretamente, tem igual cotação (X). ii) Nas falsas a justificação correta, acresce uma cotação de Y, quando esta estiver correta, MAS quando a justificação estiver errada anula a classificação X, a resposta é considerada toda errada (total da alínea = 0 valores). As falsas quando não justificadas mantêm a cotação respetiva (X valores). iii) se não responder a cotação é 0 valores.

ATENÇÃO: NÃO RESPONDA DE MODO ALEATÓRIO – Leia as notas anteriores

	As células animais cultivadas em cultura geralmente mantêm suas funções mesmo que estejam crescendo <i>in vitro</i>
	Na cultura celular, é preciso adicionar (ou mudar o meio) somente quando as células tiverem atingido a confluência
	A L-glutamina é um antibiótico muito usado em cultura celular
	O Azul de tripano é um indicador de viabilidade celular
	A quantificação do óxido nítrico foi realizada recorrendo a um método fluorimétrico
	A estimulação da produção de óxido nítrico (NO), foi realizada na aula prática por adição de um polifenol à cultura celular
	A LDH é uma enzima extracelular
	Na oxidação da luciferina por luciferase emite-se radiação ultravioleta

2. Nas aulas práticas de Fisiologia Celular isolou membranas plasmáticas de eritrócitos (*ghosts*).
- a. [2,0 valores] Nos passos iniciais do método de isolamento utilizou uma solução isosmótica de NaCl. Nas fases posteriores, utilizou uma solução hiposmótica. Justifique porque utilizou estas duas soluções.
- b. [2,0 valores] Na aula prática realizou a determinação da actividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ em *ghosts*. Qual foi a metodologia utilizada para visualizar a actividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$? Justifique o procedimento.
- c. [2,0 valores] Na aula prática realizou a determinação da actividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ em *ghosts*. Explique, justificando, porque no ensaio que realizou na aula tinha um:
- tubo 1: contendo meio de reacção e ATP (sem *ghosts*)
 - tubo 2: contendo meio de reacção e *ghosts* (sem ATP)
- d. [2,0 valores] Porque realizou a preparação de um conjunto de tubos (os quatro últimos), contendo concentrações crescentes de fosfato?

3. [3,0 valores] Os métodos utilizados para isolar os constituintes celulares exigem a ruptura celular e obtenção de uma suspensão dos seus constituintes num meio de homogeneização. O meio utilizado para esta finalidade apresenta constituintes com função bem definida. Justifique a utilização dos seguintes constituintes no meio de homogenização:

Sacarose

Tris

EDTA

4. (3 valores). Num ensaio celular onde se pretende avaliar o efeito dose-resposta do fármaco A, foram preparadas várias soluções desse fármaco. A concentração da solução stock do fármaco A é de 2 mM. Preparou-se um volume de 900 μL , de soluções a 50, 20, 10 e 1 μM . Complete o quadro com os volumes a adicionar. Apresente todos os cálculos.

	Volume total = 900 μL	
Concentração final	Volume de meio de cultura (μL)	Volume de solução stock de fármaco (μL)
5 μM		
10 μM		
20 μM		
50 μM		

3. (2 valores). Na aula prática avaliou a ação anti-inflamatória usando a quantificação do óxido nítrico (NO). E obteve os seguintes resultados para NO produzido na condição controlo e na presença de 3 concentrações diferentes (C1, C2 e C3) de um composto que se supõe ser anti-inflamatório. Com base nos seguintes dados responda às questões.

	Controlo	C1	C2	C3
Média	2,408046	2,33908	2,028736	1,758621
SD	0,154069	0,234719	0,304037	0,689783

a) Na sua opinião o composto adicionado é um agente anti-inflamatório? Sim ou Não: ____

Justifique adequadamente:

ANEXO III: RESULTADOS DOS INQUÉRITOS PEDAGÓGICOS

Ano 2019/2020 – 1º Semestre

Amélia M. L. Dias da Silva

De: Questionários Pedagógicos
 Enviado: sexta-feira, 29 de maio de 2020 16:22
 Para: Amélia M. L. Dias da Silva
 Assunto: Inquéritos Pedagógicos - 1º Semestre 2019/2020

Exm.o(a) Sr.(a) Prfessor(a)
 Amélia Maria Lopes Dias Da Silva

Enviamos informação sobre os resultados dos inquéritos pedagógicos no 1º semestre do ano 2019/2020 relativo ao par docente/curso/UC

A tabela apresenta médias na escala 1 a 5 (1=Muito baixa, 2=Baixa, 3=Média, 4=Elevada e 5=Muito elevada), das respostas dos estudantes a cada questão do Módulo III – Avaliação dos Docentes.

Q12 – Capacidade do docente para motivar os estudantes para a UC;
 Q13 – Disponibilidade do docente para receber os estudantes no horário de atendimento estabelecido;
 Q14 – Pontualidade do docente às aulas;
 Q15 – Capacidade do docente de transmitir os conhecimentos;
 Q16 – Grau de cumprimento das regras de avaliação definidas no início do ano letivo e publicadas no SIDE;
 Q17 – Grau de cumprimento dos prazos de publicação, em tempo útil, dos resultados das avaliações;
 Q18 – Grau de satisfação com o desempenho global do docente

1. Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Crítica quando pelo menos 4 das 7 questões (Q12 a Q18) apresentam médias <3;
2. Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Excelente quando pelo menos 6 das 7 questões apresentam médias ≥4 e não se registam questões em situação crítica.
3. Inquéritos a um par docente/curso/UC com a participação de 4 estudantes ou menos não são válidos, pelo que não constam na tabela

nomecurso	nomeDisciplina	classif Docente	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	Q17	Q18
LICENCIATURA EM ENFERMAGEM	FUNDAMENTOS BIOLOGIA HUMANA I	Médio	3,41	4,11	4,33	3,97	4,33	3,63	3,74
	FUNDAMENTOS DE BIOLOGIA HUMANA I	Excelente	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

1

LICENCIATURA EM ENGENHARIA BIOMÉDICA	BIOQUÍMICA	Excelente	4,33	4,50	4,50	4,33	4,65	4,11	4,17
MESTRADO EM BIOLOGIA CLÍNICA LABORATORIAL	DINÂMICA CELULAR	Médio	3,89	4,75	4,56	4,33	5,00	4,78	4,33
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA PARA AS CIÊNCIAS DA SAÚDE	DINÂMICA CELULAR E CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS	Excelente	4,00	4,67	4,78	4,33	4,78	4,60	4,33
MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA	DINÂMICA CELULAR	Excelente	4,50	4,33	5,00	4,75	5,00	4,75	4,75
MESTRADO EM GERONTOLOGIA: ACTIVIDADE FÍSICA E SAÚDE NO IDOSO	NEUROBIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO	Médio	3,50	3,50	4,25	4,00	4,25	4,00	3,50
MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR COMPARATIVA E TECNOLÓGICA	DINÂMICA CELULAR	Médio	3,00	3,00	4,00	3,00	3,00	4,50	5,00

Com os melhores cumprimentos

GESQUA

Ano 2019/2020 – 2º Semestre

Amélia M. L. Dias da Silva

De: Questionários Pedagógicos
Enviado: terça-feira, 28 de julho de 2020 18:52
Para: Amélia M. L. Dias da Silva
Assunto: Inquéritos Pedagógicos - 2º Semestre 2019/2020

Sinal. de seguimento: Dar seguimento
Estado do sinalizador: Sinalizado

Exmo.(a) Sr.(a) Professor(a)
 Amélia Maria Lopes Dias Da Silva

Enviamos informação sobre os resultados dos inquéritos pedagógicos no 2º semestre do ano letivo de 2019/2020 relativos ao par docente/curso/UC.

A tabela abaixo apresenta médias, na escala 1 a 5 (1=Muito baixa, 2=Baixa, 3=Média, 4=Elevada e 5=Muito elevada), das respostas dos estudantes a cada questão do Módulo III – Avaliação dos Docentes.

Q12 – Capacidade do docente para motivar os estudantes para a UC;

Q13 – Disponibilidade do docente para esclarecer/atender os estudantes;

Q14 – Utilização adequada das ferramentas digitais para informar e comunicar com os estudantes nas atividades letivas síncronas e assíncronas;

Q15 – Capacidade do docente para transmitir os conhecimentos;

Q16 Grau de cumprimento das regras de avaliação definidas e publicadas na Ficha da Unidade Curricular/SIDE;

Q17 – Grau de cumprimento dos prazos de publicação, em tempo útil, dos resultados das avaliações;

Q18 – Grau de satisfação com o desempenho global do docente.

Notas:

1. As perguntas do questionário pedagógico do 2º semestre de 2019/2020 foram adaptadas ao ensino à distância.
2. Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Crítica quando pelo menos 4 das 7 questões (Q12 a Q18) apresentam médias <3;
3. Um par docente/curso/UC é considerado em Situação Excelente quando pelo menos 6 das 7 questões apresentam médias ≥4 e não se registam questões em situação crítica.
4. Inquéritos a um par docente/curso/UC com a participação de 4 estudantes ou menos não são válidos, pelo que não constam na tabela.

nomecurso	nomeDisciplina	classif Docente	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	Q17	Q18
☒ LICENCIATURA EM BIOLOGIA	☐ FISILOGIA CELULAR	Excelente	4,3	4,5	4,2	4,1	4,5	2,6	4,3
☒ LICENCIATURA EM BIOQUÍMICA		Médio	3,5	4,1	3,9	4,1	4,3	2,9	3,8
☐ MESTRADO EM BIOQUÍMICA	☒ BIOQUÍMICA CELULAR	Excelente	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3

Com os melhores cumprimentos

GESQUA

Ano 2018/2019 – 1º Semestre

Resultados não disponibilizados ao docente.

Ano 2018/2019 – 2º Semestre

Amélia M. L. Dias da Silva

De: Questionários Pedagógicos
Enviado: segunda-feira, 30 de setembro de 2019 12:08
Para: Amélia M. L. Dias da Silva
Assunto: Inquéritos Pedagógicos - 2º Semestre 2018/2019

Sinal. de seguimento: Dar seguimento
Estado do sinalizador: Sinalizado

"Exm.o(a) Sr.(a) Professor(a)
 Amélia Maria Lopes Dias Da Silva

Enviamos informação sobre os resultados dos inquéritos pedagógicos no 2º semestre do ano letivo de 2019/2019 relativo ao par docente/cursos/UC

A tabela abaixo apresenta médias, na escala 1 a 5 (1=Muito baixa, 2=Baixa, 3=Média, 4=Elevada e 5=Muito elevada), das respostas dos estudantes a cada questão do Módulo III – Avaliação dos Docentes.

Q12 – Capacidade do docente para motivar os estudantes para a UC;
 Q13 – Disponibilidade do docente para receber os estudantes no horário de atendimento estabelecido;
 Q14 – Pontualidade do docente às aulas;
 Q15 – Capacidade do docente de transmitir os conhecimentos;
 Q16 – Grau de cumprimento das regras de avaliação definidas no início do ano letivo e publicadas no SÍDE;
 Q17 – Grau de cumprimento dos prazos de publicação, em tempo útil, dos resultados das avaliações;
 Q18 – Grau de satisfação com o desempenho global do docente

1. Um par docente/cursos/UC é considerado em Situação Crítica quando pelo menos 4 das 7 questões (Q12 a Q18) apresentam médias <3;
2. Um par docente/cursos/UC é considerado em Situação Excelente quando pelo menos 6 das 7 questões apresentam médias ≥4 e não se registam questões em situação crítica.
3. Inquéritos a um par docente/cursos/UC com a participação de 4 estudantes ou menos não são válidos, pelo que não constam na tabela

1

nomecurso	nomeDisciplina	Classif. Docente	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16	Q17	Q18
LICENCIATURA EM BIOLOGIA	FISIOLOGIA CELULAR	Médio	3,8	4,1	4,4	3,8	4,8	4	3,1
LICENCIATURA EM BIOCQUÍMICA	FISIOLOGIA CELULAR	Muito	3,4	3,9	4,1	3,7	4	3,7	3,8
MESTRADO EM BIOCQUÍMICA	BIOCQUÍMICA CELULAR	Médio	3,3	4,8	4,9	4	4,8	4,8	3,8

Com os melhores cumprimentos

GESQUA"

Vila Real, Fevereiro de 2021

Amélia M. Lopes Dias da Silva