

ESTUDO COMPARATIVO DAS VARIAÇÕES DA VISCOSIDADE CITOPLASMÁTICA ENTRE CÉLULAS SÃS E DOENTES COM VIRUS DO MOSAICO DO TABACO (FUMO)

DARCY MARTINS DA SILVA

Do "Centro de Debates e Estudos Agronômicos"

AGRADECIMENTO

E' com a mais profunda gratidão que abrimos aqui um espaço para agradecer ao Dr. Ruben de Souza Carvalho, que em nos dando inteira liberdade em sua Seção, permitiu-nos satisfazer em parte o entusiasmo pelos grandes problemas da Ciência, entusiasmo tão intenso quanto falho é o nosso cabedal de iniciante, nessa ordem de especulações. Acrescentamos ainda o nosso muito obrigado a quantos nos entusiasmaram de um modo ou de outro nesta pesquisa de somenos importância.

A VISCOSIDADE

A viscosidade como propriedade da célula é algo de suma importância, pois que concorre em muitos processos vitais. Assim portanto, são inúmeros os trabalhos que têm tratado dela, visando explicar fenômenos como o da viscosidade do protoplasma em relação à locomoção ameboide e à divisão celular. De outro lado, ela têm marcada influência sobre a Patologia, podendo até contribuir com seu quinhão no quadro clínico de certas doenças, tais como as mencionadas por Ludlum e Nugent (pág. 223, Protoplasm-apud W. Seifriz) referentes ao sôro do sangue humano. Outros chegaram a formular uma explicação para a hipertensão e hipotensão sanguíneas no homem como resultado direto da maior ou menor viscosidade do sangue ao nível dos capilares, onde oferece resistência ao impulso cardíaco e aórtico. (1).

Finalmente, queremos concluir que para a viscosidade se estende um vasto campo onde ela funciona ora como fator importante, ora como secundário, nos complicados processos da fisiologia vegetal e animal, pois na Biologia é sempre possível encontrá-la nas deformações externas ou internas: "Mais en même temps que ces variations de la forme externe, il se produit des changements de forme interne, aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasma. Il ya donc ici encore un travail qui s'effectue contre la viscosité et les forces capillaires intra-cytoplasmatiques". (2)

Cumprе portanto, ao estudioso surpreendê-la nas suas variadas atuações.

INTRODUÇÃO

Este trabalho visa tão somente contribuir com sua parcela para o estudo da viscosidade celular. O tema, por certo, é tão palpitante quão complexo. Assim pois, não pretendemos senão tecer aqui algumas considerações depois de assinalar resultados obtidos através do movimento browniano, isto que vimos aprendendo em uma série mais ou menos longa de tentativas, no afã de colhêr dados razoáveis e uniformes. Para tanto, mais de meia centena de determinações foram inutilizadas.

Apesar disso, teimávamos no emprêgo do método porque, plenamente justificado pela Física (dentro de limites) (3), era o único que conhecíamos como fácil de se manusear e capaz de dar resultados comparáveis, sem alterar a estrutura celular de modo comprometedor.

Mais. Víamos nêle um instrumento hábil a nos desvendar algo do mecanismo físico por que a célula passaria durante seu ciclo vital. Este último item ficou por fazer, porquanto, tal emprêsa demandaria maior traquejo, e, talvez mesmo alterações que, acreditamos, possam dar ao método acuidade e justeza suficientes para acompanhar as oscilações do "atrito interno" dos fluidos dos seres vivos.

Aquí planejámos apenas comprovar ou não aquela dúvida que tínhamos de que algo de anormal devia se passar com a viscosidade das células doentes. Esta suspeita nasceu em leitura

de um livro de Biofísica (4), quando topámos com a exigência de utilização, para o método em uso, de plantas comprovadamente sadias.

Que se passaria com a viscosidade nesse mundo vivo que é a célula? De fato, haveriam variações quando doentes? Se as houvessem, seriam para mais ou para menos?

Eis as interrogações que procuramos responder — bem ou mal — nesta modesta pesquisa.

O MÉTODO

A medição da viscosidade foi realizada através do movimento browniano. Sua descrição resumida pode ser encontrada em *Biophysical Research Methods-Uber* (1950). Todavia, podemos adiantar que êle derivou de estudos feitos por vários autores, entre os quais se destacou Einstein, que em uma de suas demonstrações físicas sôbre o movimento browniano obteve, no final, uma fórmula na qual se via incluído o fator viscosidade. Posteriormente, adaptada por Pekarek e Furth, deu aso ao processo usado por nós neste experimento.

A fórmula utilizada foi:

$$v = \frac{R T t}{3 \pi N r l^2 n} \quad \text{onde: } v = \text{viscosidade absoluta}$$

$R = \text{constante universal dos gases, cujo valor é: } 8,32 \times 10.000.000 \text{ ergs.}$

$T =$ temperatura do ambiente em graus Kelvin (temp. absoluta).

$N =$ número de Avogadro (= $6,06 \times 10$ a vigésima terceira potência).

$r =$ raio da partícula.

$l =$ distância entre os traços de referência.

$n =$ número de vezes que a partícula passa por um traço no tempo t .

Em suma, o pesquisador deve adaptar à ocular uma lâmina provida de traços para lhe servirem de ponto de referência ao

que chamamos de *passagem* (cada vez que a partícula acompanhada ao microscópio passa sob o traço), significando ter cobrido, em média, uma distância L conhecida para aquela combinação de lentes.

Deve, ainda, tomar as temperaturas de cada medição, o tempo, o número de passagens e determinar o raio r da partícula acompanhada.

Pelo que se vê, êsse processo exige muito da participação do pesquisador; entretanto, aceitámos os resultados só depois de terem ganho certa uniformidade.

Fixámos algumas variáveis da fórmula, o que redundou em maior facilidade, tanto nos cálculos, como no manuseio. Uma das nossas maiores dificuldades foi a determinação dos diâmetros e, conseqüentemente, dos raios das partículas em movimento browniano.

Procurámos aqui, após muitos exercícios, descobrir partículas que supúnhamos do mesmo diâmetro. Isso naturalmente pressupõe erros que, pensamos, seriam compensados pela generalização do critério para tôdas as partículas e células. Outro inconveniente seria, já agora mais geral, o da consideração da célula como um sistema de várias fases, o que diminui a exatidão do método. Acresce-se ainda o fato de que a idade, o ambiente, as várias regiões celulares poderiam alterar os resultados, ampliando a variação da viscosidade.

Bem, mas em verdade procurámos proporcionar ambientes análogos às células, assim como proceder, sob o mesmo critério, devidas comparações. Isto, por certo, há que atenuar as discrepâncias, dando resultados que, por sua vez, permitirão encetar estudos sob bases mais positivas.

Finalmente, queremos mencionar o fato de que os resultados são 4,5855 vezes menores que o estampado, para a água, no 1.º volume de Física de F. W. Sears, (5b), o que nada significa em vista do nosso intuito comparativo dentro do mesmo método.

Interessante ainda é assinalar que o 4,5855 que representa quantas vezes a viscosidade da água é menor que o dado de Sears, pode com aproximação ser generalizado para os valores conseguidos nas células medidas. Êsse número foi obtido após

levamos em conta a média das temperaturas com que trabalhamos e uma proporcionalidade aproximada. Sem dúvida, dentro dessa ordem de idéias, natural fôra supormos, que o 4,5855 poderia funcionar como *fator de correção* no caso de nos transportarmos ao método dos cilindros concêntricos citado por F. W. Sears em sua Física. Contudo, por desnecessária, tal conversão não foi realizada.

MATERIAL, DADOS E ANÁLISES

Serviram-nos de material "pêlos" tanto de fôlhas de fumo infeccionadas, como as não; tôdas do têrço médio. Em geral, retirados das nervuras com auxílio de um escalpêlo. Uma vez retirados, eram montados em água destilada. Aqui, tomámos por princípio examinar apenas células intermediárias para termos assegurada a certeza de que estavam íntegras. Para a água, tanto quanto nos foi possível, fizemos valer um só critério, afim de que tivéssemos um padrão a orientar-nos. Prosseguindo no plano que se nos afigura lógico, iniciaremos, agora, a citação dos valores conseguidos, assim como de suas respectivas análises estatísticas. Procurámos apresentar sob forma de tabelas, para maior facilidade de leitura e compreensão, os elementos em jôgo. Mais adiante pretendemos comentar alguns fatos, baseando-nos no veridictum das análises. E, conforme se verá, as conclusões confirmaram a hipótese de que a viscosidade é realmente maior nas células enfêrmas, assim como os números falaram expressivamente sôbre a oscilação dessa propriedade celular no estado doentio. Passemos pois, aos resultados do laboratório:

Tabela número I, relativa à viscosidade da água destilada à 31°, 32 C (média)
(Dados colhidos em laboratório)

Viscosidade :	
0,15500 cp.	0,15580 cp.
0,15550 cp.	0,15580 cp.
0,15550 cp.	0,15580 cp.
0,15550 cp.	0,15600 cp.
0,15530 cp.	0,20800 cp.
0,20740 cp.	0,18200 cp.
0,23370 cp.	0,23400 cp.

Soma = 2,46530
 Média = 0,17609 cp.
 Maior valor = 0,23400 cp.
 Menor valor = 0,15500 cp.
 Dif. — 0,07900 cp.

grama x segundo

* POISE. — Unidade da viscosidade = $\frac{\text{grama x segundo}}{\text{centímetro}}$

** cp. — centipoise = 1/100 do POISE E

*** Como se vê pelos resultados desta tabela, os valores são uniformes, isto é, de pouca oscilação.

Tabela número II, relativa à viscosidade das células das
 folhas de fumo sãs
 (Dados colhidos em laboratório)

Viscosidade em cp.	Dimensões das células	Observações :
0,23290	40 x 8 divisões	
0,31160	40 x 8	"
0,46730	40 x 8	* Má determinação
0,31160	35 x 6	"
0,31210	32 x 7	"
0,31210	32 x 7	"
0,46350	25 x 5	* Partícula pouca menor
0,31000	25 x 5	"
0,23370	60 x 7	* Partícula localizada no final de uma corrente
0,31210	23 x 5	"
0,31210	23 x 5	"
0,22940	23 x 5	"
0,25490	23 x 5	"
0,31000	40 x 8	"
0,31100	58 x 11	"
0,31160	31 x 10	"
0,31210	31 x 10	"
0,23405	32 x 6	"
0,31210	50 x 10	"
0,31210	50 x 10	"
0,23405	50 x 8	"
0,31240	38 x 9	"
0,23520	38 x 9	* Partícula pouca menor
0,31410	38 x 9	"

Soma = 6,09610 cp.	Maior valor = 0,31410 cp.
Valor médio = 0,29030 cp.	Menor valor = 0,22940 cp.
	Dif. — 0,08470 cp.

* Cada divisão mede 3,5715 micros, (divisões do micrômetro).

** Os valores assinalados não entram nos cálculos, pois não merecem fé.

Tabela número III, relativa à viscosidade das células das folhas doentes com virus do mosaico do fumo

Viscosidade em cp.	Observações	Viscosidade em cp.	Observações
0,38050		0,40790	
0,45660		0,43410	
0,45660		0,30900	* Célula basilar
0,50980		0,30950	
0,53720		0,33640	
0,53010		0,31150	
0,45735		0,46120	
0,53360	* Lâmina quasi	0,30850	20 minutos a
0,46040	sêca.	0,46270	pós a anterior
0,53720		0,30900	* Nos bordos da
0,53810		0,38625	célula. A se-
0,38500	* Em leve cor-	0,30900	guinte, no in-
0,46270	rente celular	0,00000	terior da mes-
			ma.

Soma = 10,59020 cp.

Valor médio = 0,423608 cp.

Maior valor = 0,53810 cp.

Menor valor = 0,30850 cp.

Dif. — 0,22960 cp.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

(*Testes de significância*)

Viscosidade da água em relação à das células das folhas de *Nicotiana sp. sãs*

X (H ₂ O) = 2,4653	\bar{x} = 0,17609	S (x 2) = 446618 x 1/1000.000
X (f. sã) = 6,0961	\bar{x} = 0,29030	S (x 2) = 1795518 x 1/1000.000

$$S(x - \bar{x}) = 0,446618 - 2,4653 \times 0,17609 = 0,012503 \quad \text{g. l.} = 13$$

$$S(x - \bar{x}) = 1,795518 - 6,0961 \times 0,29030 = 0,025821 \quad \text{g. l.} = 20$$

$$\text{TOTAL} [S(\text{H2O}) + S(\text{f. sã})] = 0,038324$$

$$0,038324$$

$$S^2 = \frac{0,038324}{33} = 0,0011613$$

33

$$0,0011613(1/21 + 1/14) = 0,00138249$$

$$S = \sqrt{0,00138249} = 0,03718$$

$$t(33) = \frac{0,29030 - 0,17609}{0,03718} = 3,72 \quad \text{altamente| significativa}$$

Viscosidade das células das folhas de *Nicotiana sp.* sãs em relação às doentes com virus do mosaico do fumo

$$X(\text{f. doentes}) = 10,5902 \quad \bar{x} = 0,423608$$

$$X(\text{f. sã}) = 6,0961 \quad x = 0,290300$$

$$S(x^2) = 465585186 \times 1/100\ 000\ 000$$

$$S(x^2) = 179551800 \times 1/100\ 000\ 000$$

$$S(x - \bar{x}) = 4,65585186 - 0,423608 \times 10,5902 = 0,16975842 \quad \text{g. l.} = 24$$

$$S(x - \bar{x}) = 1,795518 - 6,096000 \times 0,2903 = 0,02582100 \quad \text{g. l.} = 20$$

$$\text{TOTAL} [S(\text{F. d.}) + S(\text{F. s.})] = 0,19557942$$

$$0,0044449 (1/25 + 1/21) = 0,0003894576931$$

$$0,1955794$$

$$S^2 = \frac{0,1955794}{44} = 0,0044449$$

44

$$S = \sqrt{0,0003894577} = 0,0199$$

$$t(44) = \frac{0,423608 - 0,2903}{0,0199} = 6,19 \text{ (altamente significativa)}$$

Distribuição de Student (t): (De Fisher & Yates, Stat. Tables, apud Rodrigues de Carvalho, M. J.) (5a.)

Graus de Liberdade	P = 5%	P = 1%
30	2,042	3,646
40	2,021	3,551
60	2,000	3,460

CONCLUSÕES E ALGUMAS CONSIDERAÇÕES DO RESULTADO FINAL

Conforme o test (Student) tanto para um como para outro caso, a diferença é sempre altamente significativa, autorizando-nos, agora, a cogitar das causas que levaram as células a êsse estado de coisas.

Partindo das observações de que realmente a relação $\frac{C}{N}$ nas plantas doentes com virus é menor que nas sadias e de que o metabolismo celular é anormalmente acelerado, somos conduzidos a formular uma hipótese tentadora, em que a maior viscosidade seria função tanto do acréscimo de proteína virus, como da variação da pH.

Vejam os, agora, o mecanismo pelo qual procurámos interpretar aquela anormalidade.

Apoiado nas pesquisas de Wynd (6) onde ficou assentado o seguinte :

- 1.o — que a respiração cresce rapidamente com a infecção;
- 2.o — que a infecção altera a permeabilidade do protoplasma, tirámos logicamente a asserção acima de um potente aumento do metabolismo celular. De outro lado a afirmação de M. Meneghini e C. C. Delwische (7) em seu trabalho de que “os virus se comportam como uma substância estranha no equilíbrio dinâmico do metabolismo” levaram-nos a pensar num

acúmulo de proteína seguido de perto, conforme as asserções atrás de Wynd, de uma variação do metabolismo com muito provável variação do pH. A êste respeito podemos ainda dizer que várias substâncias têm sido descobertas após a enfermidade, com caráter alcaloide.

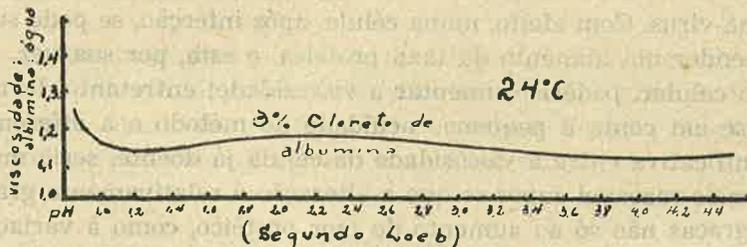
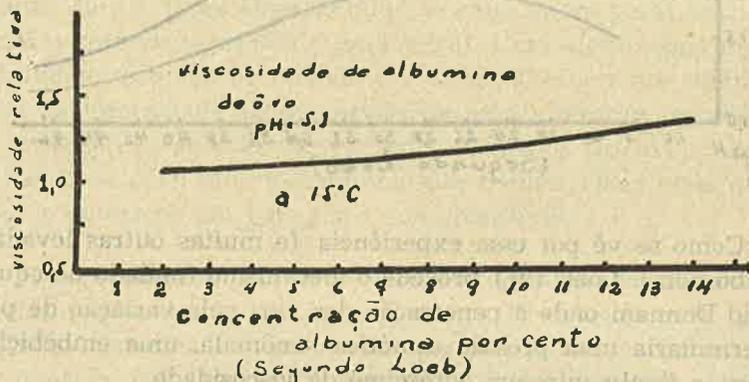
Bem, diante destes fatos restava-nos uma outra questão, qual seja a de que a proteína-virus estivesse de fato sob o estado cristaloidal, assim como em forma globular. Pôsto o problema dessa maneira foi-nos facil encontrar na literatura estudos cristalográficos realizados por Pirie e Bawden (11) sôbre cristais característicos das doenças viróticas e concluindo que as partículas de virus dentro dos mesmos seriam esféricas ou aproximadamente esféricas. Também Crick Hughes e outros (8) haviam sugerido para a proteína normal celular, nas baixas viscosidades, um estado globular. Assim pois, após estas considerações, já podemos apelar para a teoria de Loeb (9). Antes porém, queremos referir — muito de leve — à teoria de Pauli. Segundo Pauli a viscosidade seria devida a uma maior ou menor dissociação dos iônios que envolvidos de camadas de água e por serem em maior ou menor número dariam alta ou baixa viscosidade. Desse modo porém, conforme Loeb, nem tôdos fenômenos ficariam explicados, o que não sucedeu ou parece não suceder com a teoria deste último autor, após inúmeros dados de Laboratório. De acôrdo com Loeb a viscosidade pode ser cristaloidal e coloidal.

Esta última, devido ao seu estado, apresentar-se-ia intimamente relacionada com pressão osmótica, poder de embebição e diferença de potencial. E, essa interdependência, por sua vez, seria explicada pelo equilíbrio Donnam. Ademais, como nos explica N. Marinesco (10), admitido que um íon R de uma fase não possa difundir no seio de outra por uma questão de estrutura interna (tal como na proteína) a presença de uma membrana semi-permeavel deixa de ter significado. Bem, uma vez comentados êsses fatos, já podemos resumir a explicação de Loeb.

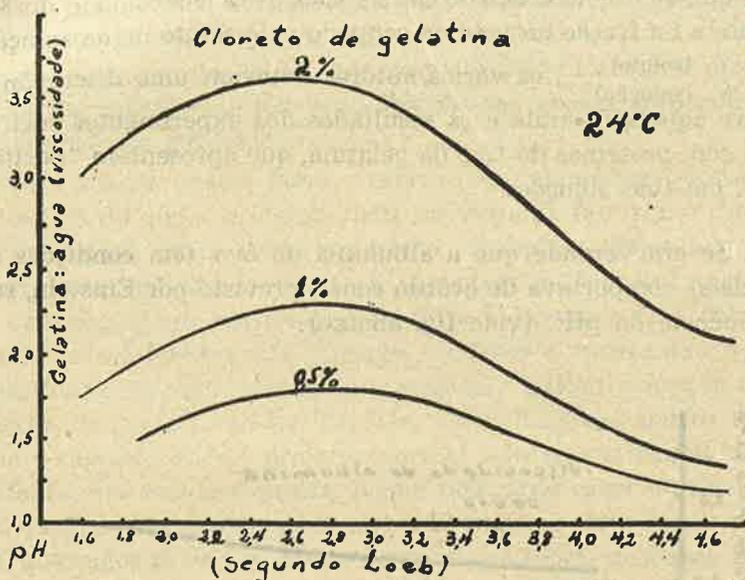
Muito embora Einstein (apud LOEB) tivesse proposto uma equação linear para as baixas viscosidades: $N = N' (1-2,5f)$

em que N é a viscosidade da solução, N' a viscosidade do solvente e f a fração do volume ocupado pelo soluto na solução:
 $f = \frac{V \text{ (soluto)}}{V \text{ (solução)}}$, os vários autores notavam uma discrepância entre aquela fórmula e os resultados dos experimentos realizados com proteínas do tipo da gelatina, que apresentam “partículas” em suas soluções.

Se era verdade que a albumina do ovo (em condições especiais) comportava de acordo com o previsto por Einstein, sem influência do pH: (vide fig. abaixo).



muita verdade também era que aquelas relações pareciam não dar conta do que sucedia à gelatina, e cujos fenômenos estão sintetizados na figura :



Como se vê por essa experiência (e muitas outras levadas a cabo por J. Loeb (9)) procede o mecanismo fundado no equilíbrio Donnam onde a penetração dos ions pela variação de pH determinaria uma pressão osmótica anômala, uma embebição maior, e finalmente, um acréscimo da viscosidade.

Posto isso, transportemo-nos, agora, ao nosso caso da proteina-virus. Com efeito, numa célula, após infecção, se pode surpreender um aumento da taxa protéica, e esta, por sua vez, no seio celular, poderia aumentar a viscosidade; entretanto, levando-se em conta a pequena acuidade do método e a diferença significativa entre a viscosidade da célula já doente, seria muito mais razoável supor-se que a alteração é relativamente grande, graças não só ao aumento do teor protéico, como à variação do pH determinada por substâncias básicas ou ácidas, o que não tem nada de impossível, visto terem os pesquisadores encontrado substâncias as mais diversas nas células doentes. Além do mais, a proteina-virus está sob a forma de partículas, tal como na gelatina.

Lícito e provável seria apelar para êsse mecanismo, que bem mereceria um veridictum dos resultados de laboratório, para o caso das células. Em suma, poderemos concluir que tal explicação cativou-nos deveras visto acreditarmos numa semelhança do comportamento coloidal (assegurados certos limites) entre um colóide celular e o colóide extra celular (colóides em si).

Mais: os estudos com microscópio eletrônico dos virus de bactérias (11) comprovaram para êsses microorganismos uma real penetração da água, o que não pode ser averiguado por Bernal e Fanckunchen talvez por não levarem em conta a variação do pH (pois êsses estudos ao raio X, em geral, são realizados com virus no ponto isoelétrico). Com efeito, dada a sensibilidade mediana do método e a variação altamente significativa da viscosidade acompanhada de uma alteração metabólica e produção de substâncias estranhas achámos razoavel invocar a teoria de Loeb afim de engrenarmos melhor tôdas essas questões e obtermos um todo mais compreensível.

Não aceitámos pois, uma variação apoiada apenas nas fórmulas de Einstein ou de Arrhenius ($\log N - \log N' = k f$, para altas viscosidades) porquanto elas nos pareciam falhas nesta questão, pelo motivo de terem sido deduzidas para os casos em que não levava em conta a variação do pH, que são uma realidade nas células.

Resta-nos portanto, esperar do laboratório dados confirmativos ou não de tal mecanismo, pois que, quanto fizemos, fizemo-lo no intento de um trabalho de síntese, de uma busca de verdade, imanentes no homem e na Ciência.

ABSTRACT

This paper deals with the viscosity of tobacco cells, normal or attacked by T. M. V. The method employed was that of brownian movements and the data, statistically analysed,

showed the highest viscosity of the diseased cells as well as the most considerable variation to the corresponding values.

After reporting the facts, the Author tries to interpret them, in accordance to Loeb's theory, based on Donnam's equilibrium.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1) ANGUERA, A. Oriol. 1932 — Físico química fisiológica.
- 2) FAURE', E-Fremiet. 1925 — La cinétique du Développement (Multiplication cellulaire et croissance).
- 3) PERRIN, Jean. 1924 — Les atomes.
- 4) UBER, Fred M. 1950 — Biophysical Research Methods.
- 5a) RODRIGUES de Carvalho, M. J. 1946 — A Estatística na Experimentação Agrícola.
- 5b) SEARS, F. W. 1947 — Física, 3 vol. (traduzida).
- 6) BAWDEN, F. C. 1950 — Plant Viruses and virus Diseases: Host plant physiology, pág. 277 e seguintes.
- 7) MENEGHINI, M. e C. C. Delwsche. 1951 — J. Biol. Chem., pág. 181 e seguintes.
- 8) BUTLER and Randal. 1951 — Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, vol. 2.
- 9) LOEB, J. 1924 — Proteins And The Theory of Colloidal Behavior: Viscosity, pág. 259 e seguintes.
- 10) MARINESCO, N. 1934 — Equilibre de Membrane.
- 11) PIRIE, N. W. 1946 — The state of viruses in the infected cell. Cold. Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, Vol. XI.