

Bio**sinalização**

A habilidade das células de receber e reagir a sinais vindos do outro lado da membrana plasmática é fundamental para a vida. As células bacterianas recebem informações constantes dos seus receptores de membrana que sensoriam o meio circundante para o pH; a pressão osmótica; a disponibilidade de alimentos, oxigênio e luz; e a presença de químicos nocivos, de predadores ou de competidores para o alimento. Esses sinais induzem respostas apropriadas, tais como a movimentação em direção ao alimento ou o afastamento de substâncias tóxicas ou ainda a formação de esporos dormentes em um meio desprovido de nutrientes. Em organismos multicelulares, células com funções diferentes trocam uma variedade de sinais. As células das plantas respondem a hormônios de crescimento e a variações da luz solar. As células animais trocam informações sobre o seu posicionamento correto em um embrião em desenvolvimento, a concentração de íons e glicose nos fluidos extracelulares e as atividades metabólicas interdependentes que ocorrem em tecidos diferentes. Os sinais nos animais podem ser autócrinos (agindo na mesma célula que o produz), parácrinos (agindo em um vizinho próximo) ou endócrinos (transportados na corrente sanguínea da célula produtora até uma célula-alvo distante). Em todos os três casos, o sinal é detectado por um receptor específico e convertido em uma resposta celular.

Embora o número de sinais biológicos seja enorme (Tabela 13-1), como o é a variedade de respostas biológicas a esses sinais, os organismos usam apenas alguns poucos mecanismos evolucionários para detectar sinais extracelulares e transformá-los em alterações intracelulares. Neste capítulo examinaremos alguns exemplos das principais classes de mecanismos de sinalização e veremos como eles são integrados em funções biológicas específicas como a transmissão de sinais nervosos, a resposta a hormônios e a fatores de crescimento, o sensoriamento da visão, do cheiro e do sabor, e o controle do ciclo celular. Frequentemente, o resultado final de uma via de sinalização é a fosforilação de algumas poucas proteínas celulares alvos específicas, que alteram suas atividades e, em consequência, as atividades da célula. Ao longo de nossa discussão, enfatizaremos a conservação

dos mecanismos fundamentais para a transdução dos sinais biológicos e a adaptação desses processos básicos ligados à membrana, a uma grande variedade de vias de sinalização.

Mecanismos Moleculares da Transdução de Sinal

As transduções de sinais são extraordinariamente específicas e delicadamente sensíveis. A especificidade é conseguida pela complementaridade molecular precisa entre o sinal e as moléculas receptoras (Fig. 13-1a), mediada pelas mesmas espécies de forças fracas (não-covalentes) que ocorrem nas interações enzima-substrato e antígeno-anticorpo. Nos organismos multicelulares, a especificidade é mais desenvolvida porque receptores para um dado sinal ou os alvos intracelulares de uma dada via de sinalização estão presentes apenas em certos tipos celulares. O hormônio liberador da tireotrofina, por exemplo, desencadeia respostas nas células da hipófise anterior mas não nos hepatócitos, os quais não possuem receptores para esse hormônio. A adrenalina altera o metabolismo do glicogênio nos hepatócitos mas não nos eritrócitos, embora, nesse caso, ambos os tipos celulares possuam receptores para o hormônio; entretanto, os hepatócitos possuem a enzima metabolizadora do glicogênio, a qual é estimulada pela adrenalina, e os eritrócitos não.

Três fatores são responsáveis pela extraordinária sensibilidade da transdução do sinal: a alta afinidade dos receptores para as moléculas do sinal, a cooperatividade na interação ligante-receptor e a amplificação do sinal pelas cascatas de enzimas. A afinidade entre o sinal (ligante) e o receptor pode ser expressa como a constante de dissociação K_d , freqüentemente $10^{-10}M$ ou menor, significando que o receptor pode detectar concentrações picomolares de uma molécula sinal. As interações receptor-ligante podem ser quantificadas pela análise de Scatchard, que, nos melhores casos, produz uma medida quantitativa da afinidade (K_d) e o número de sítios de ligação do ligante em uma amostra do receptor (Adendo 13-1). A cooperatividade nas interações receptor-ligante leva a grandes alterações na ativação do receptor, com pequenas alterações na concentração do ligante (relembre o efeito da cooperatividade na ligação do oxigênio com a hemoglobina; veja Fig. 7-12). A amplificação pelas cascatas de enzimas ocorre quando uma enzima associada com um sinal receptor é ativada e, por sua vez, catalisa a ativação de muitas moléculas de uma segunda enzima, cada uma das quais ativa muitas moléculas de uma terceira enzima, e assim por diante (Fig. 13-1b). Amplificações de várias ordens de grandeza são produzidas em milissegundos por tais cascatas.

A sensibilidade dos sistemas de receptores está sujeita à modificação. Quando um sinal está presente continuamente, ocorre uma dessensibilização do sistema do receptor (Fig. 13-1c); quando o estímulo cai abaixo de um certo limiar, o sistema

Tabela 13-1 – Alguns sinais aos quais as células respondem

Antígenos
Glicoproteínas/oligossacarídeos da superfície celular
Sinais do desenvolvimento
Componentes da matriz extracelular
Fatores de crescimento
Hormônios
Luz
Toque mecânico
Neurotransmissores
Odorantes
Feromônios
Gustativos

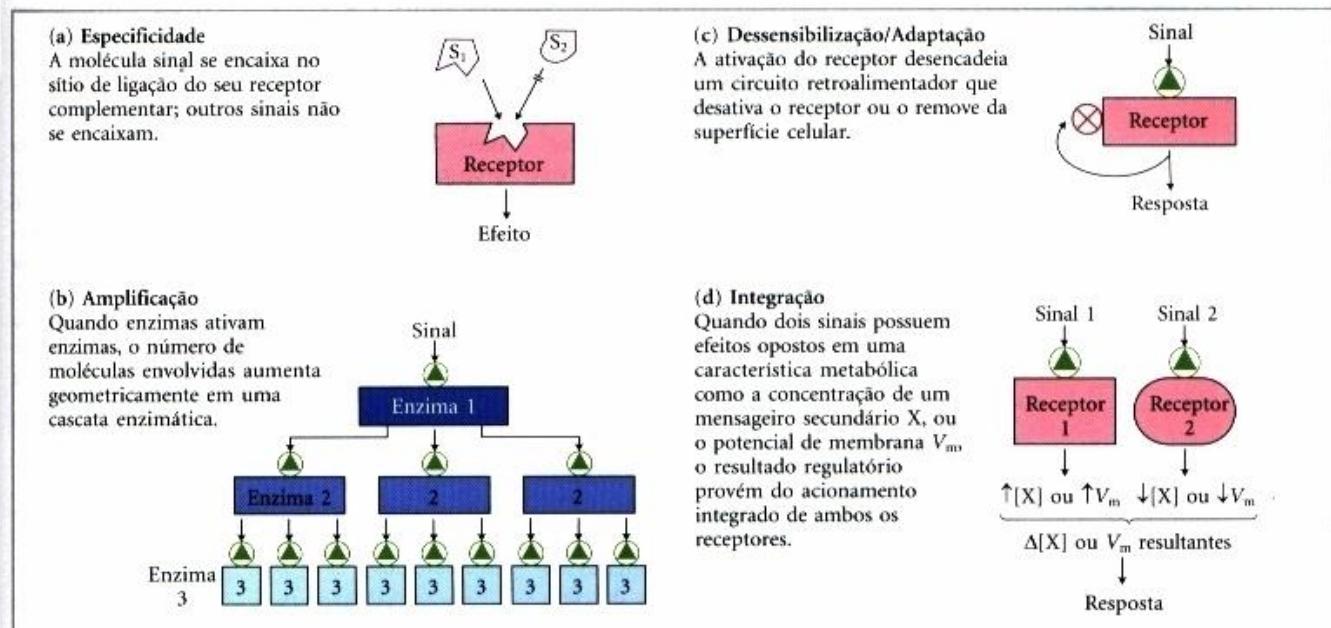


Figura 13-1 – Quatro características dos sistemas de transdução de sinais.

novamente se torna sensível. Pense no que acontece a seu sistema de transdução visual quando você caminha da luz solar brilhante para um quarto escuro ou vice-versa.

Uma característica final marcante dos sistemas de transdução de sinal é a **integração** (Fig. 13-1d), a habilidade do sistema de receber sinais múltiplos e produzir uma resposta unificada apropriada às necessidades da célula ou do organismo. Diferentes vias de sinalização “conversam” umas com as outras, em vários níveis, gerando uma riqueza de interações que mantêm a homeostase na célula e no organismo.

Consideraremos os detalhes moleculares de vários sistemas representativos da transdução de sinal. O gatilho para cada sistema é diferente, mas as etapas da transdução do sinal são comuns a todos: um sinal interage com um receptor; o receptor ativado interage com a maquinaria celular produzindo um segundo sinal ou uma mudança na atividade de uma proteína celular; a atividade metabólica da célula-alvo sofre uma alteração; e finalmente o evento da transdução é terminado e a célula retorna ao seu estado pré-estímulo. Para ilustrar essas características gerais dos sistemas de sinalização fornecemos exemplos de cada um dos quatro mecanismos básicos de sinalização (Fig. 13-2).

Os mais simples transdutores de sinais são os canais iônicos da membrana plasmática, os quais se abrem e fecham em resposta à ligação de ligantes químicos ou a alterações no potencial transmembrana. O receptor-canal iônico da acetilcolina é um exemplo desse mecanismo. O segundo mecanismo básico de sinalização envolve receptores da membrana plasmática que são enzimas (receptores enzimáticos). Quando um desses receptores é ativado pelo seu ligante extracelular, ele catalisa a produção de um segundo mensageiro intracelular. Esse mecanismo é exemplificado pelo receptor da insulina. O terceiro mecanismo de transdução, ilustrado pelo sistema do receptor β -adrenérgico que detecta a adrenalina (epinefrina), é mediado por proteínas receptoras da membrana plasmática que *indiretamente* ativam enzimas (por meio de proteínas de ligação ao GTP) que produzem mensageiros secundários intracelulares. Finalmente, o núcleo possui uma grande classe de receptores que, quando ligados ao seu ligante específico (como o hormônio esteróide estrógeno), alteram a freqüência com que genes específicos são

transcritos e traduzidos em proteínas celulares. Pelo fato de os hormônios esteróides funcionarem por meio de mecanismos intimamente relacionados à regulação da expressão gênica, considerá-lo-emos aqui apenas resumidamente e adiaremos uma discussão detalhada da sua ação para o Capítulo 28.

Antes de continuarmos nossa discussão sobre os canais iônicos, precisamos considerar alguma informação básica sobre canais iônicos e potenciais de membrana.

Canais iônicos

Os canais iônicos estão sujeitos à sinalização elétrica nas células excitáveis

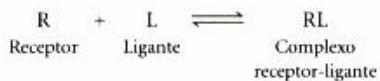
A excitabilidade de células sensoriais, neurônios e miócitos depende dos canais iônicos, transdutores de sinais que fornecem uma via regulada para a movimentação de íons inorgânicos, tais como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , através da membrana plasmática, em resposta a vários estímulos. Lembre-se de que esses canais iônicos são “reguláveis” (Capítulo 12); eles podem ser abertos ou fechados, dependendo se o receptor associado foi ativado pela ligação com seu ligante específico (um neurotransmissor, por exemplo) ou por uma mudança no potencial elétrico transmembrana, V_m . A ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ cria um desequilíbrio através da membrana plasmática transportando 3 Na^+ para fora da célula para cada 2 K^+ transportados para dentro (Fig. 13-3a), tornando o interior negativo em relação ao exterior. Diz-se que a membrana está agora polarizada. Por convenção, V_m é negativo quando o interior das células está negativo em relação ao exterior. Para uma célula animal típica, $V_m = -60$ a -70mV .

Pelo fato de os canais iônicos geralmente permitirem a passagem tanto de ânions quanto de cátions, mas não de ambos, o fluxo de íons através de um canal produz uma redistribuição de carga nos dois lados da membrana, alterando o V_m . O influxo de uma carga positiva, como o Na^+ , ou o efluxo de uma carga negativa, como o Cl^- , despolariza a membrana e leva o V_m próximo a zero. Contrariamente, o efluxo do íon positivo K^+ hiperpolariza a membrana, e o V_m torna-se mais negativo. Esses fluxos iônicos através dos canais são passivos, diferentemente do transporte ativo da ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$.

Adendo 13-1**A análise de Scatchard quantifica a interação receptor-ligante**

As ações celulares de um hormônio começam quando o hormônio (ligante), L, liga-se específica e fortemente à sua proteína receptora R, na célula-alvo. A ligação é mediada por interações não-covalentes (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas) entre as superfícies complementares do ligante e do receptor. A interação receptor-ligante leva a uma mudança conformacional que altera a atividade biológica do receptor, que pode ser uma enzima, um regulador enzimático, um canal iônico ou um regulador da expressão gênica.

A ligação receptor-ligante é descrita pela equação



Esta ligação, à semelhança da de uma enzima ao seu substrato, é dependente da concentração dos seus componentes interagentes e pode ser descrita por uma constante de equilíbrio:

$$K_a = \frac{[\text{RL}]}{[\text{R}][\text{L}]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = 1/K_d$$

onde K_a é a constante de associação e K_d a constante de dissociação.

Como no caso da ligação enzima-substrato, a ligação receptor-ligante é saturável. À medida que mais ligante é adicionado a uma quantidade fixa de receptor, uma fração crescente das moléculas do receptor é ocupada pelo ligante (Fig. 1a). Uma medida grosseira da afinidade receptor-ligante é dada pela concentração do ligante necessária para se obter a meia-saturação do receptor. A análise de Scatchard da ligação receptor-ligante permite uma estimativa

tanto da constante de dissociação K_d como do número de sítios de ligação do receptor numa dada preparação. Quando a ligação atinge o equilíbrio, o número total de possíveis sítios de ligação, B_{\max} , é igual ao número de sítios não ocupados, representado por $[\text{R}]$, mas o número de sítios ocupados ou ligados ao ligante, $[\text{RL}]$, ou seja, $B_{\max} = [\text{R}] + [\text{RL}]$. O número de sítios não ligados pode ser expresso pelo total de sítios menos os sítios ocupados: $[\text{R}] = B_{\max} - [\text{RL}]$. A expressão do equilíbrio pode ser agora escrita

$$K_d = \frac{[\text{RL}]}{[\text{L}](B_{\max} - [\text{RL}])}$$

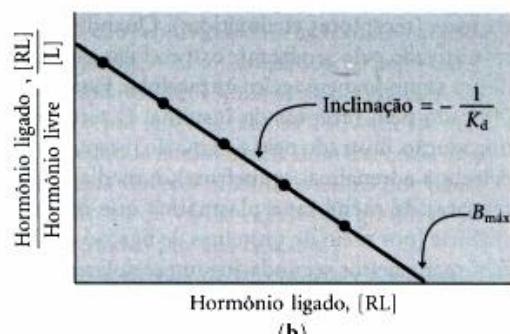
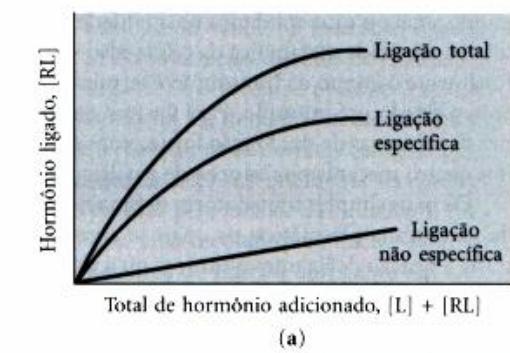
Rearranjando para se obter o quociente entre o ligante ligado ao receptor e o ligante livre (não ligado), obtemos

$$\begin{aligned} \frac{[\text{Ligado}]}{[\text{Livre}]} &= \frac{[\text{RL}]}{[\text{L}]} = K_a(B_{\max} - [\text{RL}]) \\ &= \frac{1}{K_d}(B_{\max} - [\text{RL}]) \end{aligned}$$

Esta forma de equação, inclinação-intercepto, mostra que uma representação de $[\text{ligante ligado}]/[\text{ligante livre}]$ versus $[\text{ligante ligado}]$ deveria fornecer uma linha reta com uma inclinação de $-K_d$ (ou $-1/K_d$) e um intercepto na abscissa de B_{\max} , o número total de sítios de ligação (Fig. 1b). A análise de Scatchard de várias interações hormônio-ligante de diferentes forneceu valores K_d de cerca de 10^{-9} a 10^{-11}M , correspondendo a ligações muito fortes do ligante pelo receptor.

A análise de Scatchard é segura para os casos mais simples, mas da mesma forma que a representação Lineweaver-Burk para as enzimas, quando o receptor for uma enzima alostérica, a representação mostrará desvios da linearidade.

Figura 1 – A análise de Scatchard da interação receptor-ligante. Um ligante radioativamente marcado (L) — por exemplo, um hormônio — é adicionado em várias concentrações a uma quantidade fixa do receptor (R), e a fração do hormônio ligada ao receptor é determinada separando o complexo receptor-hormônio (RL) do hormônio livre. (a) Um diagrama da $[\text{RL}]$ versus a quantidade total do hormônio, $[\text{L}] + [\text{RL}]$, é uma hipérbole, elevando-se em direção a um máximo para $[\text{RL}]$ à medida que os sítios receptores se tornem saturados. Para controlar os sítios de ligação inespecíficos, não saturáveis (os hormônios eicosanoides se ligam não especificamente à bicamada de lipídios, por exemplo), numa série separada de experimentos de ligação, um grande excesso de hormônios não marcados é adicionado junto com uma solução diluída do hormônio marcado. As moléculas não marcadas competem com as moléculas marcadas para os sítios de ligação específicos do sítio saturável no receptor, mas não para a ligação não específica. O valor real da ligação específica é obtido pela subtração das ligações não específicas das ligações totais. (b) Um diagrama linear da $[\text{RL}]/[\text{L}]$ versus $[\text{RL}]$ oferece o K_d e o B_{\max} para o complexo receptor-hormônio. Compare estes diagramas com aqueles da V_0 versus $[S]$ (veja Fig. 8-12) e $1/V_0$ versus $1/[S]$ para o complexo enzima-substrato (veja Adendo 8-1).



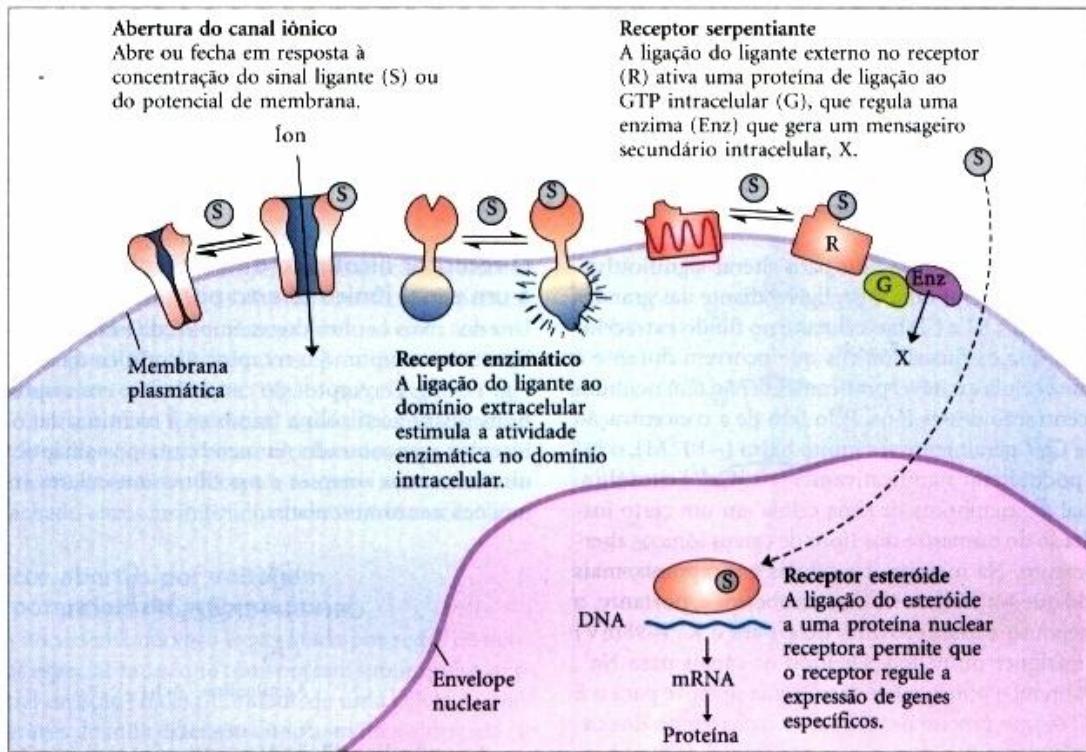
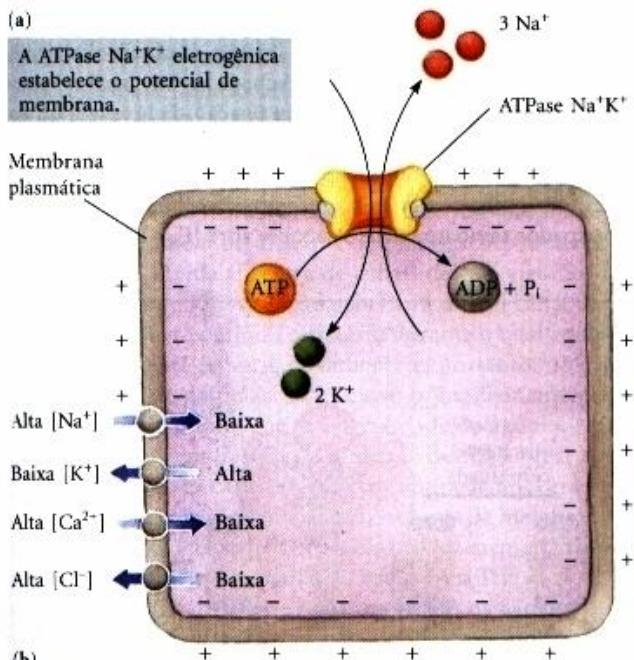


Figura 13-2 – Quatro tipos gerais de transdutores de sinais.



(b)

Os íons tendem a se mover espontaneamente através da membrana polarizada.

Figura 13-3 – Potencial elétrico transmembrana. (a) A ATPase Na^+K^+ eletrogênica produz um potencial elétrico transmembrana de -60mV (negativo internamente). (b) As setas azuis mostram a direção em que os íons tendem a se mover espontaneamente através da membrana plasmática em uma célula animal, direcionados pela combinação dos gradientes químicos e elétricos. O gradiente químico direciona o Na^+ e o Ca^{2+} para dentro (produzindo a despolarização) e o K^+ para fora (produzindo a hiperpolarização). O gradiente elétrico direciona o Cl^- para fora, contra seu gradiente de concentração (produzindo a despolarização).

A direção de um fluxo iônico espontâneo através de uma membrana polarizada é ditada pelo potencial eletroquímico dos íons através da membrana. A força (ΔG) que faz um certo íon passar espontaneamente através de um canal iônico é uma função do quociente das suas concentrações nos dois lados da membrana (C_2/C_1) e da diferença no potencial elétrico ($\Delta\psi$ ou V_m):

$$\Delta G = RT \ln(C_{\text{fora}}/C_{\text{dentro}}) + Z\mathcal{F} V_m \quad (13-1)$$

onde R é a constante de gases, T a temperatura absoluta, Z a carga do íons e \mathcal{F} a constante de Faraday. Em um neurônio ou miócito típico, as concentrações de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- no citosol são muito diferentes das no fluido extracelular (Tabela 13-2). Diante dessas diferenças de concentração, o V_m de repouso de -60mV e as relações mostradas na Equação 13-1, a abertura de um canal de Na^+ ou Ca^{2+} levará a um fluxo espontâneo do Na^+ ou Ca^{2+} para dentro (e despolarização), enquanto a abertura de um canal de K^+ levará a um fluxo espontâneo do K^+ para fora (e hiperpolarização) (Fig. 13-3b).

Uma dada espécie iônica continua a fluir através de um canal apenas enquanto a combinação do gradiente de concentração e do potencial elétrico fornecer uma força diretiva, de acordo com a Equação 13-1. Por exemplo, à medida que o Na^+ flui na direção do seu gradiente de concentração, ele despolariza a membrana. Quando o potencial da membrana atinge $+70\text{mV}$, o efeito desse potencial de membrana (de resistir às entradas adicionais de Na^+) iguala o efeito do gradiente de concentração do Na^+ (de induzir que mais Na^+ entre para dentro). Nesse ponto de equilíbrio (E), a força diretiva tendente a mover um íon (ΔG) é zero, e a Equação 13-1 pode ser rearranjada levando à equação de Nernst:

$$E = - (RT/Z\mathcal{F}) \ln(C_{\text{fora}}/C_{\text{dentro}})$$

O potencial de equilíbrio é diferente para cada espécie iônica porque o gradiente de concentração difere para cada íon.

Tabela 13-2 – Concentrações iônicas nas células e fluidos extracelulares (mM)

Tipo celular	K ⁺		Na ⁺		Ca ²⁺		Cl ⁻	
	dentro	fora	dentro	fora	dentro	fora	dentro	fora
Axônio da lula	400	20	50	440	≤0,4	10	40-150	560
Músculo do sapo	124	2,3	10,4	109	<0,1	2,1	1,5	78

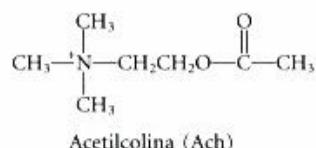
O número de íons que deve fluir para alterar significativamente o potencial de membrana é negligível diante das grandes concentrações de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ nas células e no fluido extracelular, de tal forma que os fluxos iônicos que ocorrem durante a sinalização numa célula excitável praticamente não têm nenhum efeito na concentração desses íons. Pelo fato de a concentração intracelular de Ca²⁺ geralmente ser muito baixa (~10⁻⁷M), o influxo de Ca²⁺ pode alterar significativamente a [Ca²⁺] citosólica.

O potencial de membrana de uma célula em um certo instante é o resultado do número e dos tipos de canais iônicos abertos nesse momento. Na maioria das células em repouso, mais canais de K⁺ do que Na⁺, Cl⁻ ou Ca²⁺ estão abertos e, portanto, o potencial de repouso é mais próximo do E para o K⁺ (-98mV) do que para qualquer outro íon. Quando os canais para Na⁺, Ca²⁺ ou Cl⁻ se abrem, o potencial de membrana se move para o E daquele íon. O tempo preciso de abertura e fechamento dos canais iônicos e as resultantes alterações no potencial de membrana são a base da sinalização elétrica pelas quais o sistema nervoso sinaliza o músculo esquelético a contrair, o coração a bater ou as células secretórias a liberar os seus conteúdos. Além disso, muitos hormônios exercem seus efeitos alterando os potenciais de membrana das células-alvo. Esses mecanismos não estão limitados aos organismos complexos: canais iônicos desempenham papéis importantes nas respostas das bactérias e de outros organismos unicelulares aos sinais ambientais.

Para ilustrar a ação dos canais iônicos na sinalização célula a célula, descreveremos agora os mecanismos pelos quais um neurônio passa um sinal ao longo de sua extensão, através de uma sinapse, para o próximo neurônio (ou para um miócito), num circuito celular, usando a acetilcolina como neurotransmissor.

O receptor nicotínico da acetilcolina é um canal iônico aberto por um ligante

Um dos mais conhecidos exemplos de um canal aberto por um ligante ao receptor é o receptor nicotínico da acetilcolina (veja Fig. 12-39). O receptor do canal abre-se em resposta ao neurotransmissor acetilcolina (também à nicotina, daí o nome). Esse receptor é encontrado na membrana pós-sináptica dos neurônios em certas sinapses e nas fibras musculares (miócitos) nas junções neuromusculares.



A acetilcolina, liberada por um neurônio excitado, difunde-se alguns micrômetros através da fenda sináptica, ou junção neuromuscular, até ao neurônio pós-sináptico ou ao miócito, onde interage com o receptor da acetilcolina e desencadeia a excitação elétrica (despolarização) da célula. O receptor da acetilcolina é uma proteína alostérica, situada a cerca de 3nm da entrada do íon, com dois sítios de ligação de alta afinidade para a acetilcolina nas suas duas subunidades α . A ligação da acetilcolina produz uma alteração da conformação fechada para a aberta. O processo é positivamente cooperativo: a ligação da acetilcolina ao primeiro sítio aumenta a afinidade da ligação da acetilcolina ao segundo sítio. Quando a célula pré-sináptica libera um pulso de acetilcolina, ambos os sítios no receptor da célula pós-sináptica são ocupados rapidamente e o canal se abre (Fig. 13-4). Tanto o

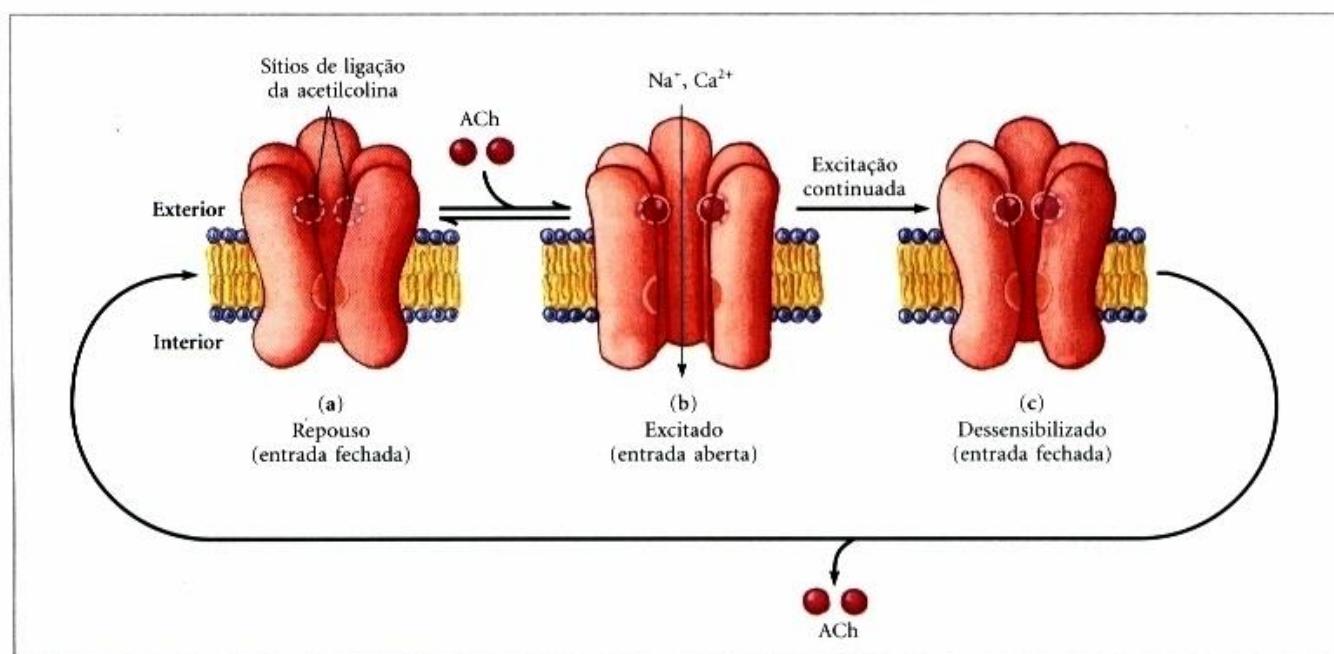


Figura 13-4 – Três estados do receptor da acetilcolina. Uma breve exposição do canal iônico em repouso (fechado) (a) à acetilcolina produz o estado excitado (aberto) (b). Uma exposição longa leva à dessensibilização e ao fechamento do canal (c).

Na^+ quanto o Ca^{2+} podem, agora, passar e o fluxo desses íons para dentro da célula despolariza a membrana plasmática iniciando os eventos subsequentes que variam com o tipo de tecido. Em um neurônio pós-sináptico, a despolarização inicia um potencial de ação (veja a seguir); em uma junção neuromuscular, a despolarização da fibra muscular desencadeia a contração muscular.

Normalmente, a concentração da acetilcolina na fenda sináptica é rapidamente diminuída pela enzima acetilcolinesterase, presente na fenda. Quando os níveis de acetilcolina permanecem altos por mais de alguns milissegundos, ocorre a dessensibilização do receptor (Fig. 13-1c). O receptor do canal é convertido a uma terceira conformação (Fig. 13-4c), na qual o canal está fechado e a acetilcolina fortemente ligada. A lenta liberação (em dezenas de milissegundos) da acetilcolina dos seus sítios de ligação, finalmente, permite ao receptor retornar a seu estado de repouso — fechado e resensibilizado aos níveis de acetilcolina.

Canais iônicos abertos por voltagem produzem potenciais de ação neurais

A sinalização no sistema nervoso é executada por redes de neurônios, células especializadas que transportam um impulso nervoso (potencial de ação) da extremidade de uma célula (o corpo celular) através de uma extensão citoplasmática alongada (o axônio). O sinal elétrico desencadeia a liberação de moléculas do neurotransmissor na sinapse, transportando o sinal para a próxima célula no circuito. Três tipos de canais iônicos dependentes de voltagem são essenciais para esse mecanismo de sinalização. Ao longo de toda a extensão do axônio estão os canais de Na^+ dependentes de voltagem (Fig. 13-5; veja também Fig. 12-40), que estão fechados quando a membrana está em repouso ($V_m = -60\text{mV}$), mas se abrem rapidamente quando a membrana é despolarizada localmente, em resposta à acetilcolina (ou algum outro neurotransmissor). A despolarização induzida pela abertura dos canais de Na^+ força os canais de K^+ dependentes de voltagem a se abrirem, e o efluxo de K^+ resultante repolariza a membrana localmente. Um rápido pulso de despolarização atravessa o axônio à medida que despolarizações locais desencadeiam uma rápida abertura de canais de Na^+ vizinhos e depois de canais de K^+ . Após cada abertura de um canal de Na^+ , segue-se um curto período refratário durante o qual aquele canal não consegue se abrir novamente e, portanto, uma onda unidirecional de despolarização move-se rapidamente do corpo celular do neurônio para a extremidade do axônio. A sensibilidade à voltagem dos canais iônicos é devida à presença, em posições críticas, de cadeias laterais de aminoácidos carregados, que interagem com o campo elétrico através da membrana. Alterações no potencial transmembrana produzem mudanças conformacionais sutis na proteína do canal (veja Fig. 12-40).

Na extremidade distal do axônio estão os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Quando a onda de despolarização os atinge, eles se abrem e o Ca^{2+} entra, vindo do espaço extracelular. Agindo como um mensageiro intracelular secundário, o Ca^{2+} desencadeia então a liberação de acetilcolina por exocitose na fenda sináptica (veja ③ na Fig. 13-5). A acetilcolina se difunde à célula pós-sináptica (um outro neurônio ou miócito), onde ela se liga ao receptor de acetilcolina e desencadeia a despolarização. Dessa forma, a mensagem é passada para a próxima célula do circuito.

Notamos, então, que os canais iônicos transmitem sinais de duas maneiras: alterando a concentração citosólica de um íon (como o Ca^{2+}), que funciona como um mensageiro intracelular secundário, ou alterando o V_m e afetando outras proteínas de

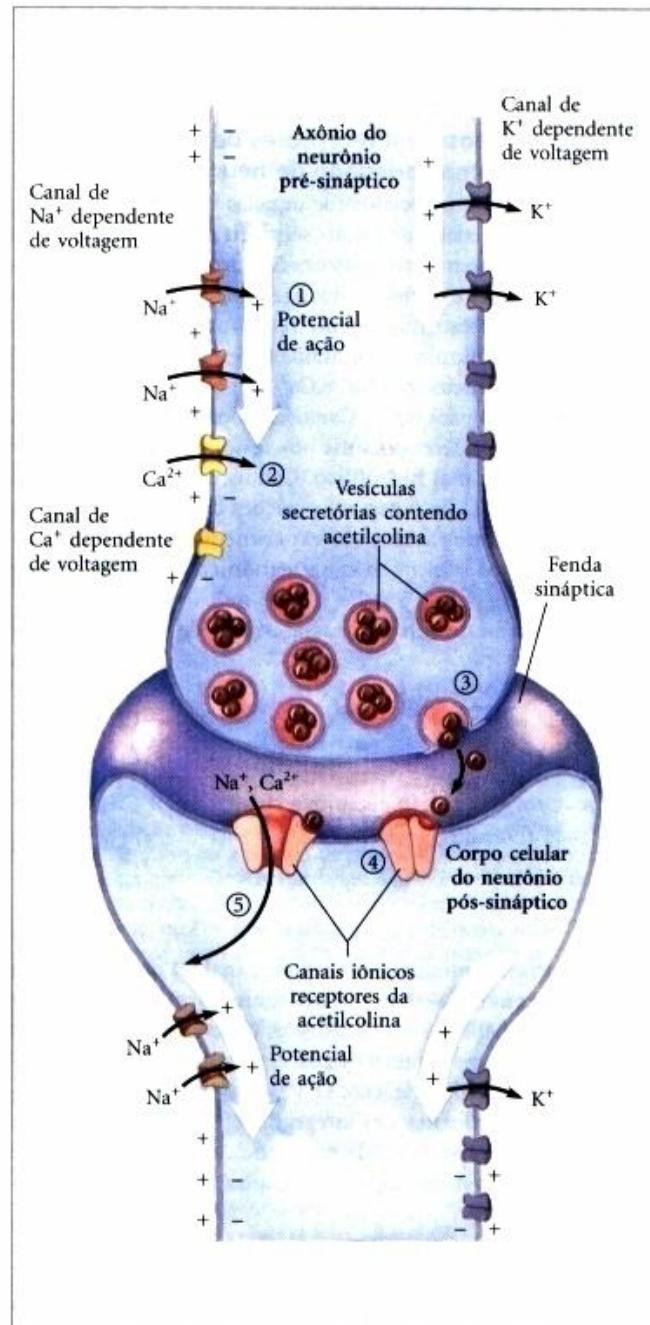


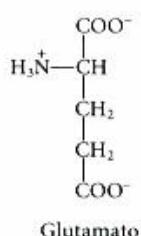
Figura 13-5 – Papel dos canais iônicos abertos por voltagem e por ligantes na transmissão neural. Inicialmente, a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico é polarizada (interior negativo) por meio da ação da ATPase Na^+K^+ eletrogênica que bombeia 3 Na^+ para fora para cada 2 K^+ bombeados para dentro do neurônio (veja Fig. 12-33). ① Um estímulo a esse neurônio produz um potencial de ação que se move ao longo do axônio (seta branca), distante do corpo celular. A abertura de um canal de Na^+ dependente de voltagem permite que o Na^+ entre e a resultante despolarização local induz à abertura dos canais de Na^+ adjacentes, e assim por diante. A direcionalidade do movimento do potencial de ação é garantida pelo breve período refratário que se segue à abertura de cada canal de Na^+ aberto por voltagem. ② Quando a onda de despolarização alcança a extremidade do axônio, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem se abrem, permitindo a entrada de Ca^{2+} no neurônio pré-sináptico. ③ O resultante aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ interna desencadeia a liberação exocítica do neurotransmissor acetilcolina dentro da fenda pré-sináptica. ④ A acetilcolina se liga a um receptor no neurônio pós-sináptico, induzindo à abertura do canal iônico dependente de ligante. ⑤ O Na^+ e o Ca^{2+} extracelulares entram através desse canal, despolarizando a célula pós-sináptica. O sinal elétrico passou, dessa forma, para o corpo celular do neurônio pós-sináptico e se moverá ao longo do seu axônio para um terceiro neurônio, por meio da mesma seqüência de eventos.

membrana que são sensíveis ao V_m . A passagem de um sinal elétrico através de um neurônio para o próximo ilustra ambos os tipos de mecanismos.

Os neurônios possuem receptores de canais que respondem a uma variedade de neurotransmissores

As células animais, especialmente aquelas do sistema nervoso, contêm uma variedade de canais sensíveis a ligantes, voltagem ou a ambos. Os neurotransmissores 5-hidroxitriptamina (serotonina), glutamato e glicina, todos agem por meio de receptores de canais que são estruturalmente relacionados ao receptor da acetilcolina. A serotonina e o glutamato desencadeiam a abertura de canais catiônicos (K^+ , Na^+ e Ca^{2+}), enquanto a glicina abre canais específicos para o Cl^- . Canais catiônicos e aniónicos são distinguíveis por diferenças sutis nos resíduos de aminoácidos que revestem o canal hidrofílico. Canais catiônicos possuem cadeias laterais de Glu e Asp em posições cruciais. Quando alguns desses resíduos ácidos são experimentalmente substituídos por resíduos básicos, o canal catiônico é convertido em canal aniónico.

Dependendo do ion que passa através de um canal, o li-



gante (neurotransmissor) para aquele canal ou despolariza ou hiperpolariza a célula-alvo. Um neurônio normalmente recebe impulsos de vários outros neurônios, cada um liberando seus neurotransmissores característicos, com seus efeitos de despolarização ou hiperpolarização. O V_m de uma célula-alvo, portanto, reflete as informações integradas (Fig. 13-1d) vindas de múltiplos neurônios. A célula responde com um potencial de ação apenas se as informações integradas levarem a uma despolarização.

Os receptores de canais para a acetilcolina, a glicina, o glutamato e o γ -aminobutírico (GABA) são abertos por ligantes extracelulares. Mensageiros intracelulares secundários — como cAMP, cGMP (3',5'-GMP cíclico, um análogo próximo do cAMP), IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato), Ca^{2+} e ATP — regulam os canais iônicos de uma outra classe que, como veremos adiante, participa na transdução sensorial da visão, olfato e gustação.

Receptores Enzimáticos

Um mecanismo fundamentalmente diferente de transdução de sinais é realizado pelos receptores enzimáticos. Essas proteínas possuem um domínio de ligação a um ligante na superfície extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo de uma enzima no lado citosólico, com os dois domínios conectados por um único segmento transmembrana. Mais comumente, o receptor enzimático é uma proteína quinase que fosforila resíduos de tirosina em proteínas-alvo específicas; o receptor da insulina é o protótipo desse grupo. Outros receptores enzimáticos sintetizam o mensageiro intracelular secundário cGMP em resposta a sinais extracelulares. O receptor para o fator atrial natriurético é típico deste tipo.

O receptor da insulina é uma proteína tirosina quinase específica

A insulina regula tanto o metabolismo quanto a expressão genética: o sinal da insulina passa do receptor da membrana plasmática para as enzimas do metabolismo sensíveis à insulina e ao núcleo, onde estimula a transcrição de genes específicos. O receptor ativo da insulina consiste de duas cadeias α idênticas projetando-se para a face externa da membrana plasmática e duas subunidades β transmembrana com sua carboxiterminal projetando-se dentro do citosol (Fig. 13-6). As cadeias α contêm o domínio de ligação da insulina e os domínios intracelulares das cadeias β contêm a atividade da proteína quinase que transfere um grupo fosforila do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas. A sinalização por meio do receptor da insulina está ilustrada na Figura 13-7. Ela começa (etapa ①) quando a ligação da insulina às cadeias α ativa as cadeias β da tirosina quinase e cada monômero $\alpha\beta$ fosforila resíduos Tyr críticos próximos do carboxiterminal da cadeia β do seu parceiro no dímero. Essa autofosforilação abre o sítio ativo, permitindo que a enzima fosforelle resíduos de Tyr de outras proteínas-alvo.

Uma dessas proteínas-alvo (etapa ②) é o substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1 — “insulin receptor substrate”). Assim que fosforilado nos resíduos de Tyr, IRS-1 torna-se o ponto de nucleação de um complexo de proteínas (etapa ③) que transporta a mensagem do receptor da insulina aos alvos finais no citosol e no núcleo, através de uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiro, um resíduo de P_i -Tyr na IRS-1 é ligado

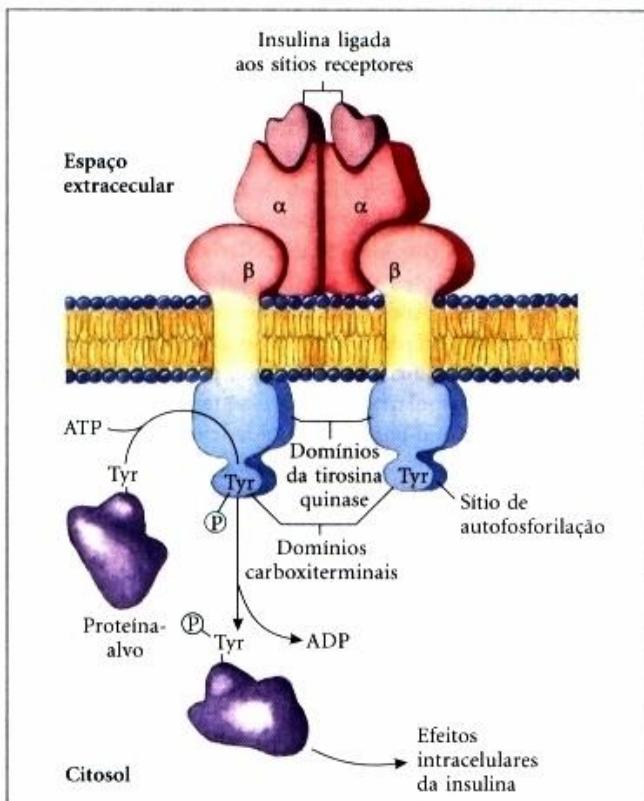


Figura 13-6 – Receptor da insulina. Quando ativado pela insulina, o receptor consiste de duas cadeias α na superfície externa da membrana plasmática e duas cadeias β que atravessam a membrana e se lançam na face citosólica. A ligação da insulina às cadeias α desencadeia a dimerização de ambas as unidades $\alpha\beta$ para formar o complexo $\alpha_2\beta_2$ e autofosforilar os resíduos Tyr no domínio carboxiterminal das subunidades β . A autofosforilação ativa o domínio da tirosina quinase, que então catalisa a fosforilação de outras proteínas-alvo.

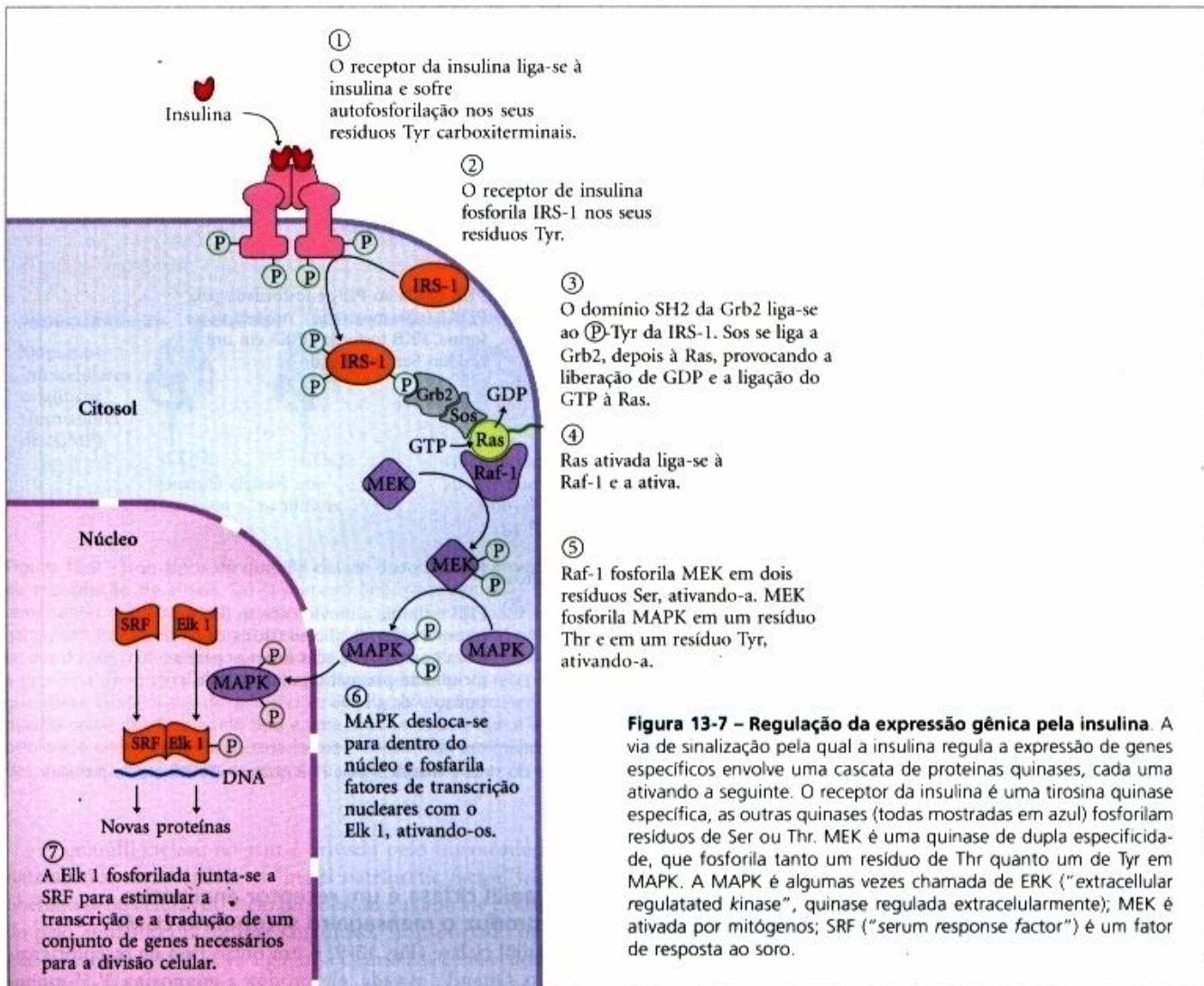


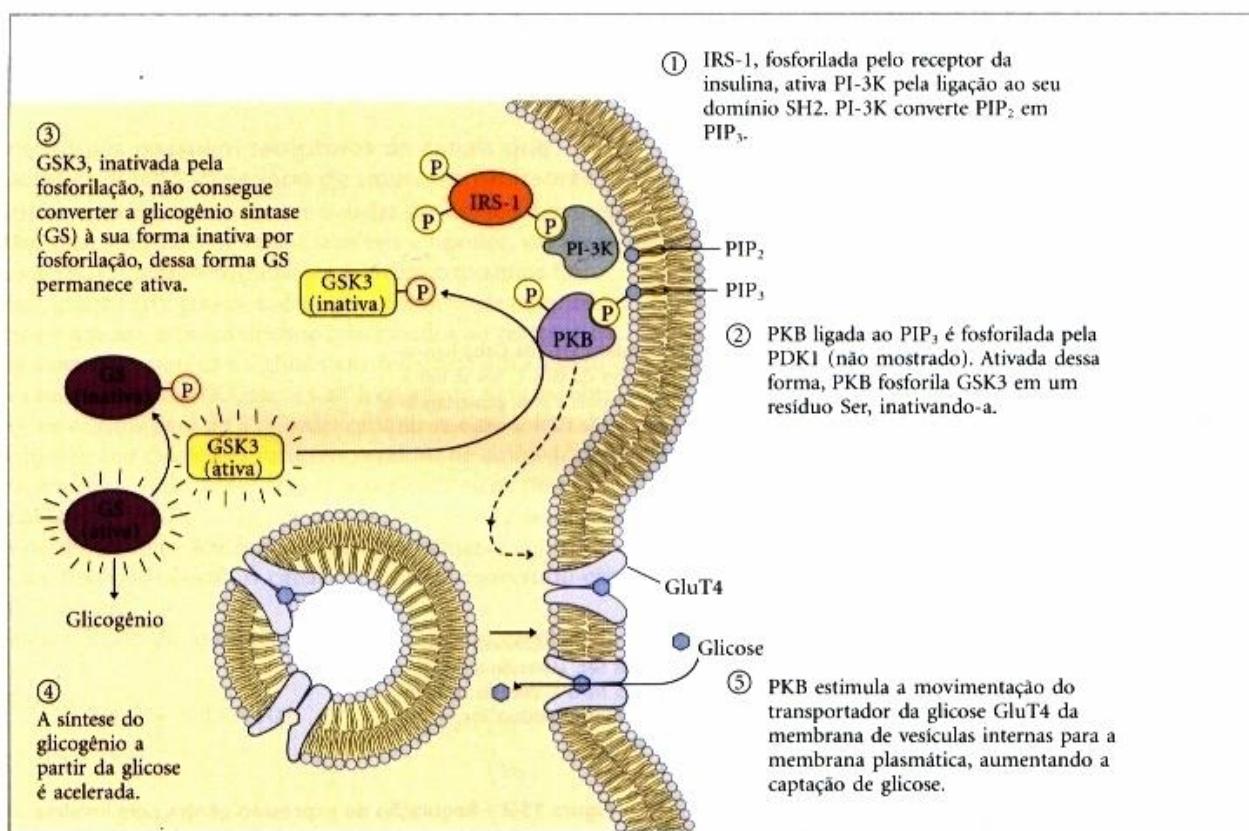
Figura 13-7 – Regulação da expressão gênica pela insulina. A via de sinalização pela qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas quinases, cada uma ativando a seguinte. O receptor da insulina é uma tirosina quinase específica, as outras quinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser ou Thr. MEK é uma quinase de dupla especificidade, que fosforila tanto um resíduo de Thr quanto um de Tyr em MAPK. A MAPK é algumas vezes chamada de ERK ("extracellular regulated kinase", quinase regulada extracelularmente); MEK é ativada por mitógenos; SRF ("serum response factor") é um fator de resposta ao soro.

ao domínio SH2 da proteína Grb2. (SH2 é a abreviação de "Src homology 2"; as sequências de domínios de SH2 são semelhantes a um domínio em uma proteína chamada Src. Várias proteínas sinalizadoras contêm domínios SH2, todas as quais se ligam a resíduos de (P)-Tyr em uma proteína parceira). Grb2, por seu lado, recruta uma outra proteína, Sos, para o complexo em crescimento. Quando ligada à Grb2, Sos catalisa a substituição do GDP por GTP ligado em Ras, uma de uma família de proteínas de ligação de nucleotídeos de guanosina (proteínas G) que medeiam uma grande variedade de transdução de sinais. Quando o GTP estiver ligado em Ras, poderá ativar uma proteína quinase, Raf-1 (etapa ④), a primeira de três proteínas quinases (Raf-1, MEK e MAPK) que formam uma cascata na qual cada quinase ativa a seguinte pela fosforilação de um resíduo Ser (etapa ⑤). A última proteína quinase, a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), é ativada pela fosforilação tanto de um resíduo de Thr quanto de um de Tyr. Quando ativada, ela medeia alguns dos efeitos biológicos da insulina entrando no núcleo e fosforilando proteínas como Elk 1, que modula a transcrição de certos genes regulados pela insulina (etapa ⑥).

Os bioquímicos reconhecem agora que a via da insulina é apenas um exemplo de um tema mais geral no qual sinais hormonais, através de vias semelhantes à mostrada na Figura 13-7, levam à fosforilação de enzimas-alvo por proteínas quinases. O

alvo da fosforilação é freqüentemente uma outra proteína quinase, que então fosforila uma terceira proteína quinase, e assim por diante. O resultado de um catalisador ativando um segundo catalisador que por sua vez ativa um terceiro catalisador é uma cascata de reações que amplifica o sinal inicial em várias ordens de grandeza (Fig. 13-1b).

Grb2 não é a única proteína ativada pela associação com a IRS-1 fosforilada. A PI-3 quinase (PI-3K) associa-se com a IRS-1 por meio de seu domínio SH2 (Fig. 13-8). Ativada dessa forma, PI-3K converte o fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (veja Fig. 11-13), também chamado de PIP₂, em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que indiretamente ativa uma outra quinase, a proteína quinase B (PKB). Quando ligada a PIP₃, PKB é fosforilada e ativada por uma outra proteína quinase, PDK1. PKB fosforila então resíduos de Ser ou Thr nas suas proteínas-alvo, uma das quais é a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3). Na sua forma ativa, não-fosforilada, a GSK3 fosforila a glicogênio sintase, inativando-a e, portanto, diminuindo a síntese do glicogênio. Quando fosforilada pela PKB, GSK3 é inativada. Dessa forma, prevenindo a inativação da glicogênio sintase, a cascata da fosforilação de proteínas iniciada pela insulina estimula a síntese do glicogênio (Fig. 13-8). Acredita-se também que a PKB desencadeie o movimento dos transportadores da glicose (Glut4) das vesículas internas até a membrana plasmática, estimulando a captação da glicose do sangue (veja Adendo 12-2).



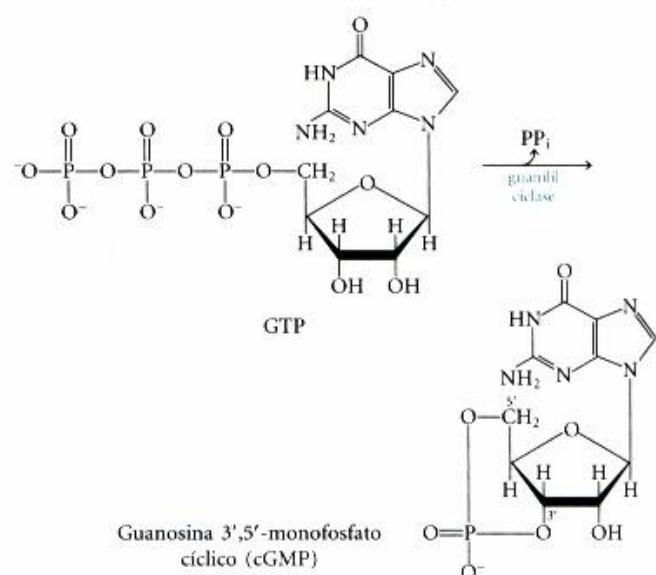
O que impulsiona a evolução de sistema tão complicado de regulação? Esse sistema permite que um receptor ativado ative várias moléculas de IRS-1, amplificando o sinal da insulina, o que proporciona a integração de sinais de vários receptores, cada um dos quais pode fosforilar IRS-1. Além disso, pelo fato de IRS-1 poder ativar qualquer uma de várias proteínas que contêm domínios SH2, um único receptor atuando por meio de IRS-1 pode desencadear duas ou mais vias de sinalização; a insulina afeta a expressão génica por meio da via Grb2-Sos-Ras-MAPK e afeta o metabolismo do glicogênio por meio da via PI-3K-PKB.

O receptor da insulina é o protótipo de vários receptores enzimáticos que possuem uma estrutura semelhante e uma atividade de proteína tirosina quinase. Os receptores para o fator de crescimento epitelial e o fator de crescimento derivado das plaquetas, por exemplo, apresentam semelhanças estruturais e de seqüência com o receptor da insulina e ambos possuem uma atividade tirosina quinase que fosforila IRS-1. Muitos desses receptores dimerizam após a ligação do ligante; o receptor da insulina já é um dímero antes de a insulina se ligar.

Em adição aos muitos receptores que atuam como proteínas tirosina quinases, várias proteínas que se assemelham aos receptores da membrana plasmática possuem uma atividade de proteína tirosina fosfatase. Baseando-se na estrutura dessas proteínas, podemos supor que seus ligantes são componentes da matriz extracelular ou da superfície de outras células. Embora seus papéis de sinalização não sejam ainda bem entendidos como aqueles das proteínas tirosina quinases, elas claramente possuem o potencial de reverter a ação dos sinais que estimulam essas quinases.

A guanilil ciclase é um receptor enzimático que produz o mensageiro secundário cGMP

A guanilil ciclase (Fig. 13-9) é um outro tipo de receptor enzimático. Quando ativada, ela produz a guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP cíclico ou cGMP) a partir do GTP:



O GMP cíclico é um mensageiro secundário que transporta diferentes mensagens em diferentes tecidos. No rim e no intestino, ele desencadeia alterações no transporte iônico e na retenção de água; no músculo cardíaco, ele sinaliza relaxamento; no cérebro, ele pode estar envolvido tanto no desenvolvimento como nas funções do cérebro adulto.

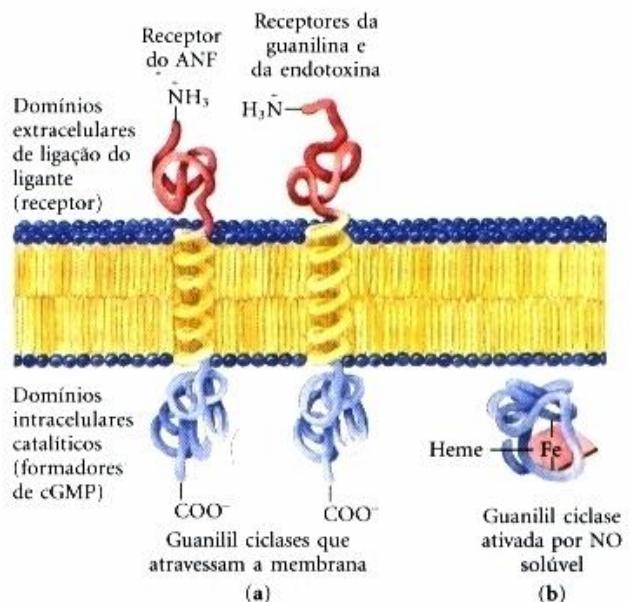
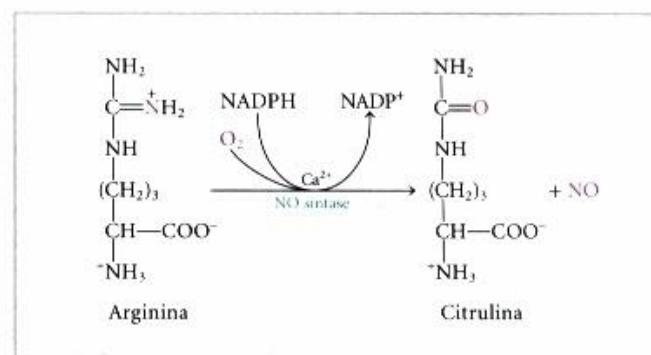


Figura 13-9 – Dois tipos de guanilil ciclase (isoenzimas) envolvidos na transdução de sinais. (a) O primeiro tipo existe em duas formas semelhantes que atravessam a membrana e são ativadas pelos seus ligantes extracelulares: fator natriurético atrial (ANF) (receptores nas células dos ductos coletores renais e no músculo liso dos vasos sanguíneos) e a guanilina (receptores nas células epiteliais intestinais). O receptor da guanilina é também alvo de uma endotoxina bacteriana que desencadeia diarréia grave. (b) O segundo tipo é uma enzima solúvel que é ativada pelo óxido nítrico intracelular; essa forma é encontrada em muitos tecidos, incluindo músculo liso do coração e vasos sanguíneos.

A guanilil ciclase no rim é ativada pelo hormônio **fator natriurético atrial** (ANF — “*atrial natriuretic factor*”), que é liberado pelas células do átrio do coração quando ele é distendido pelo aumento do volume sanguíneo. Transportado no sangue até o rim, o ANF ativa a guanilil ciclase nas células dos ductos coletores (Fig. 13-9a). O aumento resultante na concentração do cGMP desencadeia o aumento na excreção renal do Na^+ e, consequentemente, de água. A perda de água reduz o volume sanguíneo, contrapondo-se ao estímulo que inicialmente levou à secreção do ANF. Os músculos lisos dos vasos sanguíneos também possuem um receptor guanilil ciclase para o ANF; ligando-se a esse receptor, o ANF produz um relaxamento do vaso sanguíneo (vasodilatação), que reduz a pressão sanguínea.

Um receptor guanilil ciclase semelhante, na membrana plasmática das células epiteliais do intestino, é ativado por um peptídeo intestinal, a **guanilina**, que regula a secreção de Cl^- no intestino. Esse receptor é também alvo de uma endotoxina peptídica estável ao calor, produzida pela *E. coli* e outras bactérias gram-negativas. A elevação na concentração de cGMP produzida pela endotoxina aumenta a secreção de Cl^- e, consequentemente, diminui a reabsorção da água pelo epitélio intestinal, produzindo a diarréia.

Uma isoenzima distintamente diferente da guanilil ciclase é uma proteína citosólica com um grupo heme fortemente associado (Fig. 13-9b). Essa enzima é ativada pelo óxido nítrico (NO). O óxido nítrico é produzido a partir da arginina pela **NO sintase**, dependente de Ca^{2+} , presente em muitos tecidos de mamíferos, e se difunde de sua célula de origem para as células próximas. O NO é suficientemente não-polar para atravessar as membranas plasmáticas sem um transportador. Na célula-alvo, ele se liga ao grupo heme da guanilil ciclase e ativa a produção de cGMP. No coração, o cGMP leva a contrações menos potentes, estimulando as bombas iônicas que expelem o Ca^{2+} do citosol.



Esse relaxamento induzido pelo NO no músculo cardíaco é semelhante à resposta induzida pelas cápsulas de nitroglicerina e outros nitrovasodilatadores que são ingeridos para aliviar a angina: a dor causada pela contração de um coração desprovido de O_2 por causa de artérias coronarianas bloqueadas. O óxido nítrico é instável e sua ação é rápida; dentro de segundos após sua formação, ele sofre oxidação a nitrito ou nitroato. Os nitrovasodilatadores produzem um relaxamento duradouro do músculo cardíaco porque se degradam após várias horas, mantendo uma concentração estável de NO.

Acredita-se que a maioria das ações do cGMP seja mediada pela **proteína quinase dependente de cGMP**, também chamada de **proteína quinase G** ou PKG, a qual fosforila resíduos de Ser e Thr nas proteínas-alvo quando ativada pelo cGMP. Os domínios regulatórios e catalíticos dessa enzima estão presentes em um polipeptídeo único ($M_r \sim 80.000$). A ligação do cGMP força uma parte semelhante ao substrato do domínio regulatório, para fora do sítio de ligação do substrato, ativando o domínio catalítico.

O GMP cíclico possui um segundo modo de ação no olho dos vertebrados: ele induz canais iônicos específicos a se abrirem nas células dos cones e bastonetes da retina. Voltaremos a esse papel do cGMP em nossa discussão sobre a visão.

Receptores Ligados à Proteína G e a Mensageiros Secundários

Um terceiro mecanismo de transdução de sinais, distinto dos canais iônicos e dos receptores enzimáticos, é definido por três componentes essenciais: um receptor na membrana plasmática com sete segmentos transmembrana, uma enzima na membrana plasmática que produz um mensageiro secundário e uma proteína ligante de GTP que se dissocia do receptor ocupado e se liga à enzima, ativando-a. O receptor β -adrenérgico, que medeia os efeitos da adrenalina (Fig. 13-10) em muitos tecidos, é o protótipo desse terceiro tipo de sistema de transdução.

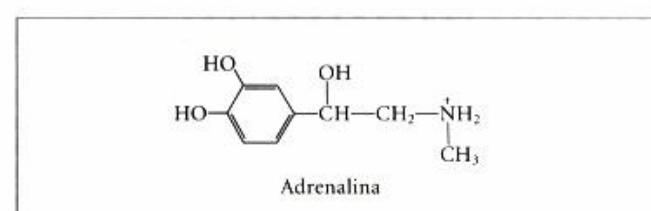


Figura 13-10 – Adrenalina. Esse composto, também chamado de adrenalina, é liberado das glândulas adrenais e regula o metabolismo energético no músculo, fígado e tecido adiposo. Ele também funciona como um neurotransmissor nos neurônios adrenérgicos.

O sistema do receptor β -adrenérgico atua por meio do mensageiro secundário cAMP

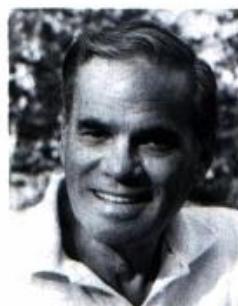
A ação da adrenalina começa quando o hormônio se liga a uma proteína receptora na membrana plasmática de uma célula sensível ao hormônio. Os **receptores adrenérgicos** são de quatro tipos gerais, definidos por diferenças sutis em suas afinidades e respostas a um grupo de agonistas e antagonistas. Agonistas são análogos estruturais que se ligam a um receptor e mimetizam os efeitos de seu ligante natural; antagonistas são análogos que se ligam sem desencadear o efeito normal e, portanto, bloqueiam os efeitos dos agonistas. Os quatro tipos de receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) são encontrados em tecidos-alvo diferentes e medeiam respostas diferentes à adrenalina. Aqui focalizaremos os **receptores β -adrenérgicos** do músculo, fígado e tecido adiposo. Esses receptores medeiam alterações no metabolismo energético, como descrito no Capítulo 23, incluindo o aumento na degradação do glicogênio e das gorduras.

O receptor β -adrenérgico é uma proteína integral com sete regiões hidrofóbicas de 20 a 28 resíduos que serpenteiam para trás e para a frente, sete vezes, através da membrana plasmática. Essa proteína é membro de uma família muito grande de receptores, todos com sete hélices transmembrana, que são comumente chamados de **receptores serpenteantes**. A ligação da adrenalina a um sítio profundo no receptor dentro da membrana (Fig. 13-11, etapa ①) aparentemente promove uma alteração conformacional no domínio intracelular do receptor que permite sua interação com a segunda proteína na via de transdução de sinal, uma proteína G estimulatória, trimérica, que se liga ao GTP, ou G_s ("G stimulatory"), no lado citosólico da mem-

brana plasmática. Alfred G. Gilman e Martin Rodbell descobriram que, quando o GTP está ligado à G_s , ele estimula a produção de cAMP pela adenilil ciclase (veja pág. 351) na membrana plasmática. A função de G_s , como um interruptor molecular, assemelha-se àquela de uma outra classe de proteína G tipificada pela Ras, discutida anteriormente no contexto do receptor da insulina. Estruturalmente, G_s e Ras são bastante distintas; proteínas G do tipo Ras são monômeros de cerca de 20kDa, enquanto as proteínas G que interagem com os receptores serpenteantes são trimeros de três subunidades diferentes, α (M_r 43.000), β (M_r 7.500) e γ (M_r 10.000).



Alfred G. Gilman



Martin Rodbell
(1925-1998)

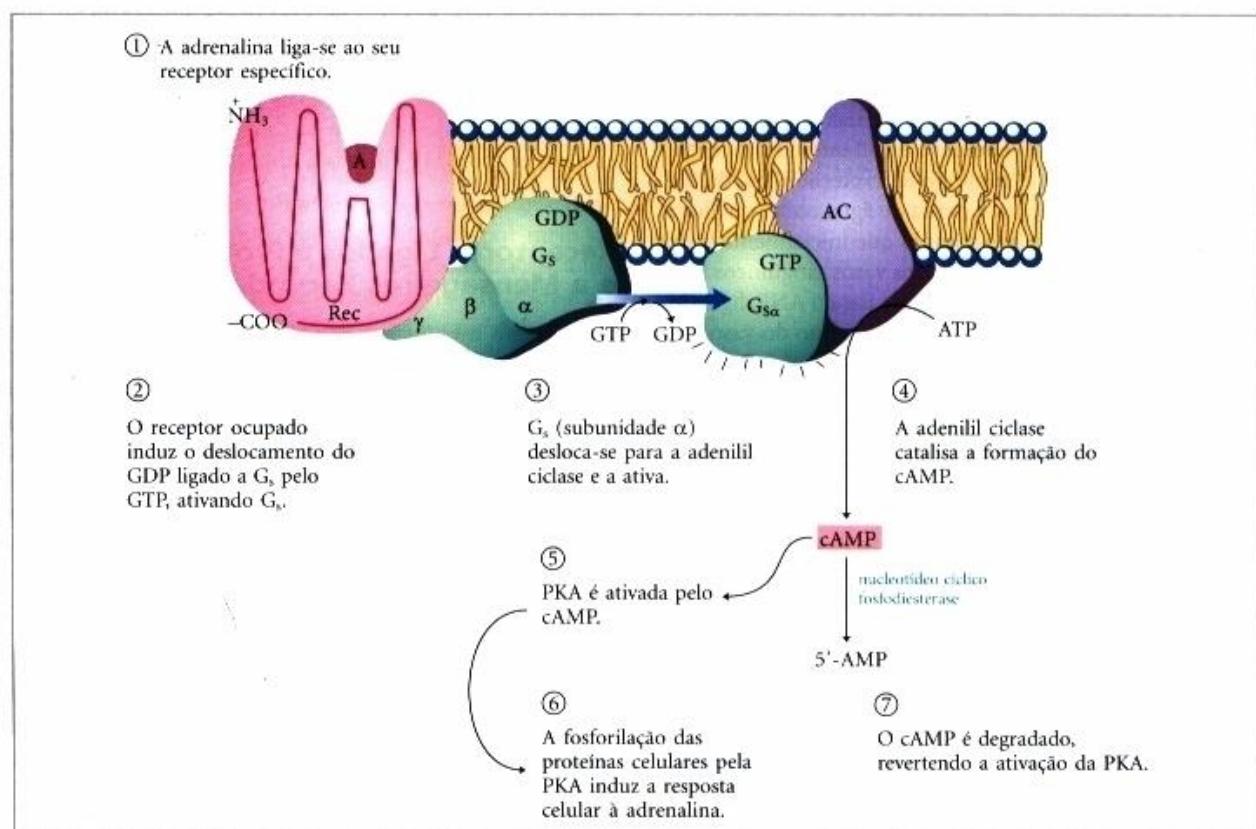
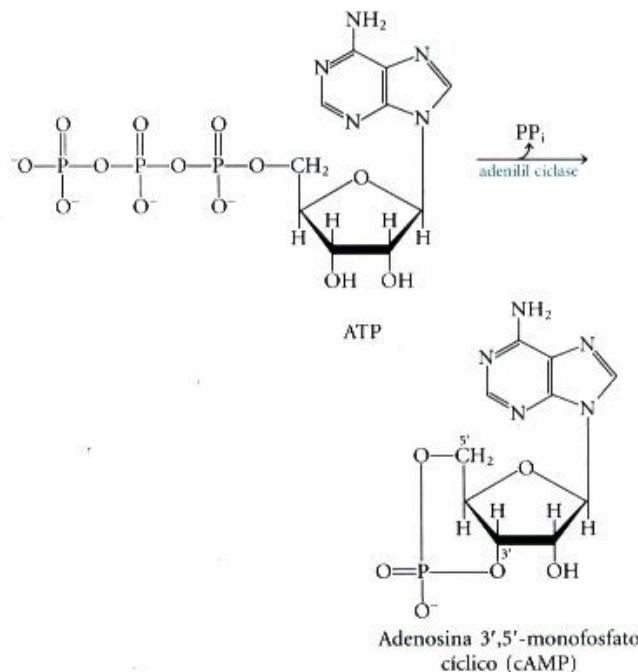


Figura 13-11 – Transdução do sinal da adrenalina: a via β -adrenérgica. As sete etapas do mecanismo que acopla a ligação da adrenalina (A) ao seu receptor (Rec) com ativação da adenilil ciclase (AC) são discutidas no texto. A mesma molécula da adenilil ciclase na membrana plasmática pode ser regulada por uma proteína G estimulatória (G_s), como mostrado, ou uma proteína G inibitória (G_i), não mostrada. G_s e G_i estão sobre a influência de hormônios diferentes. Os hormônios que induzem a ligação do GTP em G_s produzem uma inibição da adenilil ciclase, resultando na diminuição da [cAMP] celular.

Quando o sítio de ligação do nucleotídeo da G_s (na subunidade α) estiver ocupado pelo GTP, G_s estará ativa e poderá ativar a adenilil ciclase; com o GTP ligado ao sítio, G_s estará inativa. A ligação da adrenalina capacita o receptor a catalisar o deslocamento do GDP ligado pelo GTP, convertendo G_s à sua forma ativa (Fig. 13-11, etapa ②). À medida que isso ocorre, as subunidades β e γ da G_s dissociam-se da subunidade α e G_{sα} com seu GTP ligado, move-se no plano da membrana do receptor para uma molécula próxima, de adenilil ciclase (etapa ③). A G_{sα} é mantida ligada covalentemente à membrana por um lipídio.

A adenilil ciclase (Fig. 13-12) é uma proteína integral da membrana plasmática com seu sítio ativo na face citosólica. Ela catalisa a síntese do cAMP a partir do ATP.



A associação da G_{sα} com a adenilil ciclase estimula a enzima a catalisar a síntese do cAMP (Fig. 13-11, etapa ④), elevando a [cAMP] citosólica. Essa estimulação pela G_{sα} é autolimitante; G_{sα} é uma GTPase que se desliga convertendo seu GTP ligado em GDP (Fig. 13-13). A G_{sα}, agora inativa, dissociase da adenilil ciclase, tornando a enzima inativa. Depois que a G_{sα} se reassocia com as subunidades β e γ (G_{sβγ}), G_s estará novamente disponível a interagir com um receptor ligado ao hormônio.

Um efeito da adrenalina é ativar a fosforilase *b* do glicogênio. Essa conversão é promovida pela enzima fosforilase *b* quinase, que catalisa a fosforilação de dois resíduos específicos de Ser na fosforilase *b*, convertendo-a em fosforilase *a* (veja Fig. 8-28). O AMP cíclico não afeta a fosforilase *b* quinase diretamente. Mais precisamente a proteína quinase dependente de cAMP, também chamada de proteína quinase A ou PKA, que é alostericamente ativada pelo cAMP, catalisa a fosforilação da fosforilase *b* quinase inativa, produzindo a forma ativa (etapas ⑤ e ⑥ na Fig. 13-11).

A forma inativa da PKA contém duas subunidades catalíticas (C) e duas subunidades regulatórias (R) (Fig. 13-14a), que são semelhantes em seqüência aos domínios catalíticos e regulatórios da PKG (proteína quinase dependente de cGMP). O complexo tetramérico R₂C₂ é cataliticamente inativo, porque um domínio auto-inibitório de cada subunidade R ocupa o sítio de ligação do substrato de cada subunidade C. Quando o cAMP se

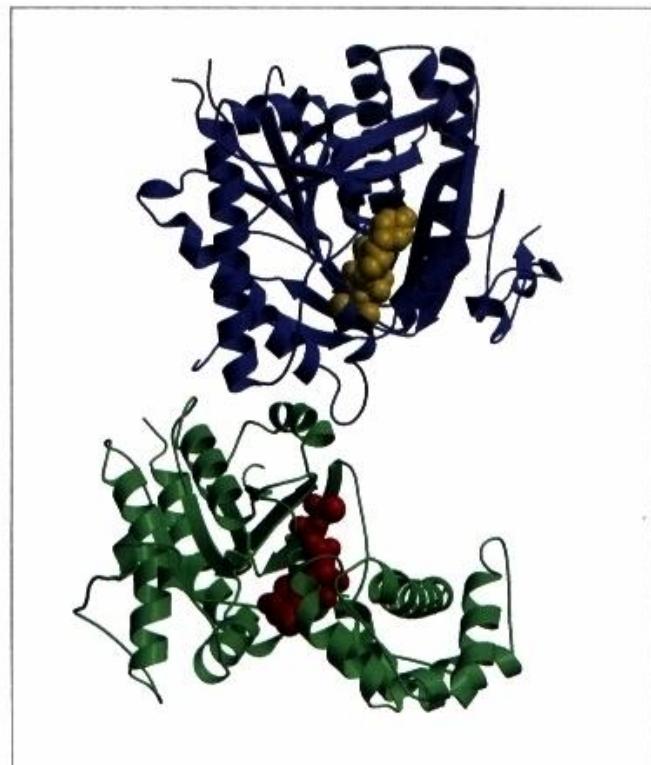
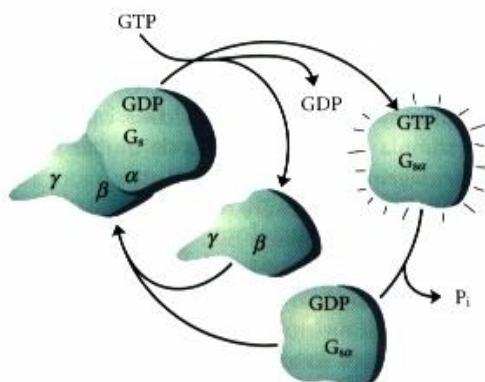


Figura 13-12 – A interação da G_{sα} com a adenilil ciclase. O núcleo catalítico solúvel da adenilil ciclase (azul), separado de sua âncora na membrana, foi co-cristalizado com G_{sα} (verde) para dar esta estrutura de cristal. O terpeno de plantas forskolin (amarelo) é uma droga que estimula fortemente a enzima, e o GTP (vermelho) ligado à G_{sα} desencadeia a interação de G_{sα} com a adenilil ciclase.

- | | | |
|---|---|--|
| <p>① G_s com o GDP ligado é desativada; ela não consegue ativar a adenilil ciclase.</p> | <p>② O contato da G_s com o complexo hormônio-receptor induz o deslocamento do GDP ligado pelo GTP.</p> | <p>③ G_s com o GTP ligado se dissocia nas subunidades α e βγ. G_{sα}-GTP é acionado; ele pode ativar a adenilil ciclase.</p> |
|---|---|--|



- ④ GTP ligado a G_{sα} é hidrolisado pela proteína de GTPase intrínseca; G_{sα} tornando-o, portanto, inativo. A subunidade α inativa reassocia-se com as subunidades β e γ.

Figura 13-13 – A auto-inativação de G_s. As etapas são descritas no texto. A atividade GTPase intrínseca da proteína, estimulada pelas proteínas RGS ("regulators of G protein signaling"), determina quanto rapidamente o GTP ligado é hidrolisado em GDP e, portanto, por quanto tempo a proteína G permanecerá ativa.

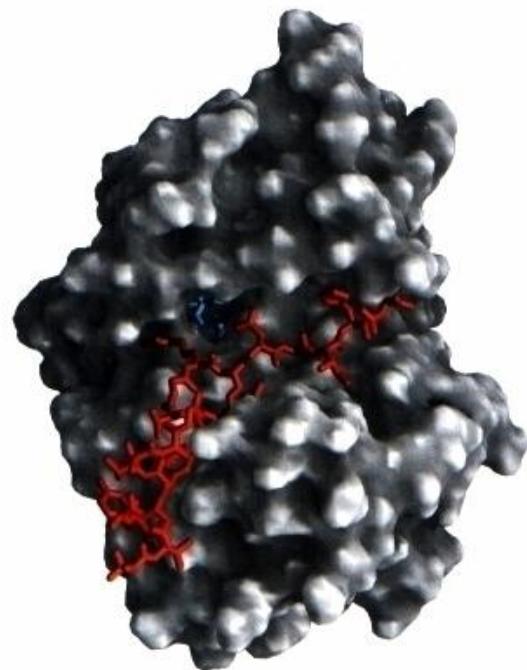
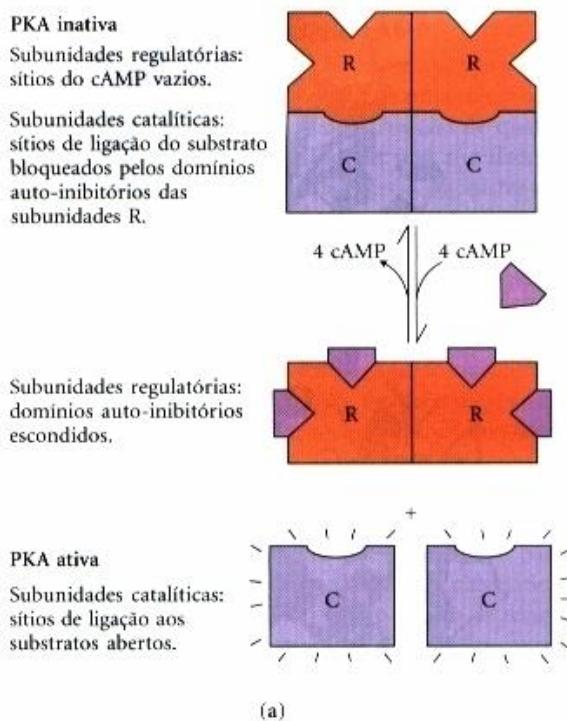


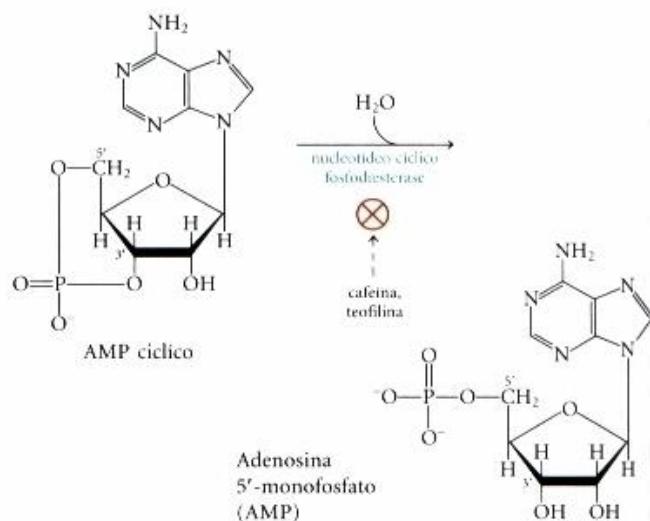
Figura 13-14 – Ativação da proteína quinase dependente de cAMP, PKA. (a) No tetrâmero R_2C_2 inativo, o domínio auto-inibitório de uma subunidade regulatória (R) ocupa o sítio de ligação do substrato, inibindo a atividade da subunidade catalítica (C). O AMP cíclico ativa a PKA induzindo a dissociação das subunidades C com as subunidades inibitórias R. Isso permite que a PKA fosforeile uma variedade de substratos protéicos (Tabela 13-3) que contém a seqüência consenso (veja Tabela 8-9), incluindo a fosforilase β quinase. (b) Uma subunidade C da PKA. Um potente inibidor peptídico (PKI), que mimetiza os substratos normais para a fosforilação, é mostrado aqui ocupando o sítio de ligação do substrato. PKI está em vermelho e o ATP, no sítio ativo, em azul. Esse inibidor contém a seqüência Arg–Arg–Gln–Ala–Ile, que corresponde à seqüência consenso reconhecida pela PKA, exceto que o resíduo de Ser fosforilado em um substrato é substituído por um resíduo de Ala no inibidor.

liga a dois sítios em cada subunidade R, a subunidade R sofre uma mudança conformacional e o complexo R_2C_2 se dissocia produzindo duas subunidades C livres, cataliticamente ativas. Esse mesmo mecanismo básico — deslocamento de um domínio auto-inibitório — medeia a ativação alostérica de muitos tipos de proteínas quinases por seus mensageiros secundários.

A transdução de sinal pela adenilil ciclase envolve várias etapas que amplificam o sinal hormonal original (Fig. 13-15). Primeiro, a ligação de uma molécula de hormônio a um receptor ativa cataliticamente várias moléculas de G_s . Em seguida, pela ativação de uma molécula da adenilil ciclase, cada molécula ativa de $G_{s\alpha}$ estimula a síntese catalítica de muitas moléculas de cAMP. O mensageiro secundário cAMP ativa agora a PKA, que por sua vez catalisa a fosforilação de muitas moléculas da proteína-alvo (fosforilase β quinase). Essa quinase ativa a fosforilase β do glicogênio, que leva à rápida mobilização de glicose a partir do glicogênio. O efeito final da cascata é a amplificação do sinal hormonal, em várias ordens de grandeza, o que explica a concentração muito baixa da adrenalina (ou qualquer outro hormônio) requerida para a atividade hormonal.

PKA regula várias enzimas, além da fosforilase β quinase (Tabela 13-3). Embora as proteínas reguladas pela fosforilação dependente do cAMP possuam diversas funções, elas compartilham uma região de seqüência semelhante em volta do resíduo de Ser ou Thr que sofre fosforilação, uma seqüência que marca para a regulação pela PKA. A comparação da seqüência de vários substratos protéicos da PKA produz a seqüência consenso — o mínimo de resíduos vizinhos específicos necessários para marcar uma Ser ou Thr para a fosforilação (veja Tabela 8-9).

O AMP cíclico, o mensageiro secundário intracelular nesse sistema, é de vida curta. Ele é rapidamente degradado pela nucleotídeo cíclico fosfodiesterase até 5'-AMP (Fig. 13-11, etapa ⑦), que não é ativo como mensageiro secundário:



O sinal intracelular, portanto, persiste apenas enquanto o receptor do hormônio permanecer ocupado pela adrenalina. Metilxantinas tais como a cafeína e a teofilina (um componente do chá) inibem a fosfodiesterase, aumentando a vida média do cAMP e, portanto, potenciando agentes que atuam estimulando a adenilil ciclase.

Tabela 13-3 – Algumas enzimas reguladas pela fosforilação dependente de cAMP (pela PKA)

Enzima	Seqüência fosforilada*	Via
Glicogênio sintase	RASCTSSS	Síntese do glicogênio
Fosforilase β quinase	VEFRLLSI (subunidade α) RTKRS GSV (subunidade β)	Degradação do glicogênio
Piruvato quinase (fígado de rato)	GVLRRASVAZL	Glicólise
Complexo da piruvato desidrogenase (tipo L)	GYLRRASV	Piruvato a acetil-CoA
Lipase sensível a hormônio	PMRRSV	Mobilização triacilglicerol e oxidação dos ácidos graxos
Fosfofrutoquinase/frutose-2,6-bifosfatase	LQRGGSSIPQ	Glicólise/gliconeogênese
Tirosina hidroxilase	FIGRRQSL	Síntese da L-DOPA, dopamina, adrenalina, noradrenalina
Histona H1	AKRKASGPPVS	Condensação do DNA
Histona H2B	KKAKASRKEYSVYVYK	Condensação do DNA
Fosfolamban cardíaco intracelular (regulador de uma bomba cardíaca)	AIRRAST	Regulação da [Ca ²⁺] intracelular
Inibidor-1 da proteína fosfatase-1	IRRRLPTP	Regulação da desfosforilação de proteínas
CREB	ILSRRPY	Regulação da expressão gênica por cAMP
PKA (seqüência consenso) [†]	XR(R/K)(X)(S/T)B	

O resíduo fosforilado S ou T está mostrado em vermelho. Todos os resíduos são mostrados em suas abreviações com uma letra (veja Tabela 5-1).
 †X é um aminoácido qualquer; B é um aminoácido hidrofóbico qualquer.

O receptor β -adrenérgico é dessensibilizado pela fosforilação

Como mencionado anteriormente, os sistemas de transdução de sinal sofrem dessensibilização quando o sinal persiste. A dessensibilização do receptor β -adrenérgico é mediada por uma proteína quinase que fosforila o receptor no domínio (intracelular) que normalmente interage com G_s (Fig. 13-16). Quando o receptor for ocupado pela adrenalina, a **quinase do receptor β -adrenérgico (βARK, “ β -adrenergic receptor kinase”)** fosforila resíduos de Ser próximos do carboxiterminal do receptor. Normalmente localizada no citosol, a βARK é puxada para a membrana plasmática por sua associação com as subunidades G_{αβγ} e dessa forma é posicionada para fosforilar o receptor. A fosforilação cria um sítio de ligação para a proteína β -arrestina, e a ligação da arrestina efetivamente previne a interação entre o receptor e a proteína G. A ligação da arrestina também facilita o seqüestro do receptor, a remoção dos receptores da membrana plasmática por endocitose em vesículas intracelulares pequenas. Os receptores nas vesículas endocíticas são defosforilados, retornando então à membrana plasmática, completando o circuito e ressensibilizando o sistema da adrenalina. A quinase do receptor β -adrenérgico é um membro da família das proteínas G acopladas às quinases do receptor (GRKs, “G protein-coupled receptor kinases”), todas as quais fosforilam receptores serpenteantes em seu domínio carboxiterminal citosólico e desempenham funções semelhantes àquelas da βARK na dessensibilização e ressensibilização de seus receptores.

O AMP cíclico atua como um mensageiro secundário para várias moléculas regulatórias

A adrenalina é apenas um de muitos hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias que agem alterando a [cAMP] intracelular e, portanto, a atividade da PKA (Tabela 13-4). Por exemplo, o glucagon liga-se a seu receptor na membrana plasmática dos adipócitos, ativando (via uma proteína G_s) a adenilil ciclase. A PKA, estimulada pela elevação na [cAMP], fosforila e ativa a lipase do triacilglicerol, levando à mobilização dos ácidos graxos. Semelhantemente, o hormônio peptídeo ACTH (hormônio adrenocorticotrófico, também chamado de corticotrofina), produzido pela hipófise anterior, liga-se a receptores específicos no córtex adrenal, ativando a adenilil ciclase e elevando a [cAMP] intracelular. A PKA fosforila e ativa então várias das enzimas requeridas para a síntese da cortisona e outros hormônios esteróides.

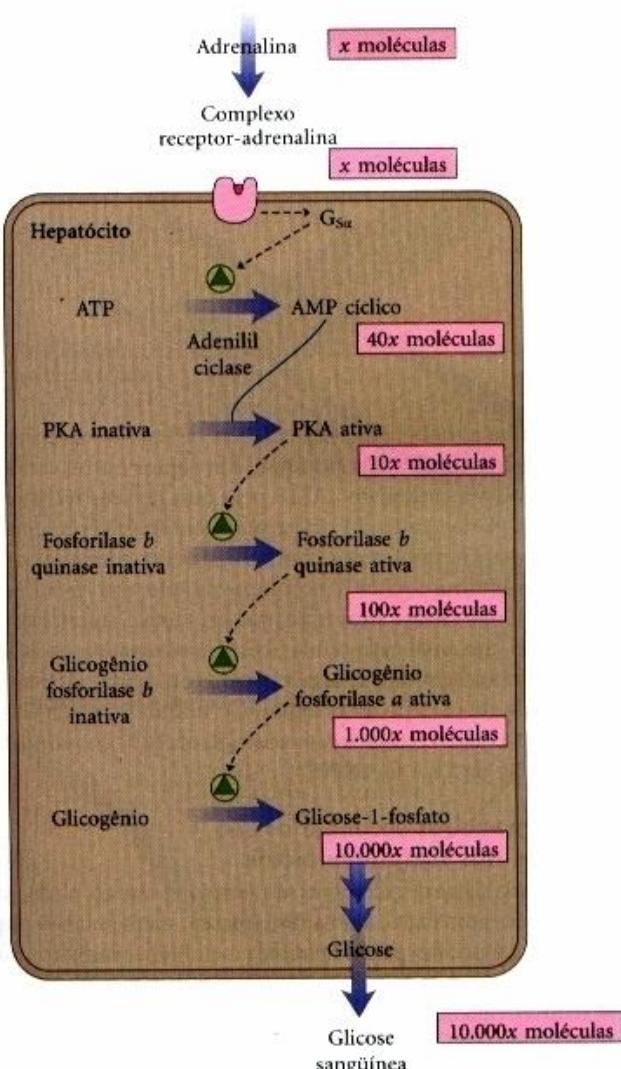


Figura 13-15 – A cascata da adrenalina. A adrenalina desencadeia uma série de reações nos hepatócitos onde catalisadores ativam catalisadores, resultando em uma grande amplificação do sinal. A ligação de um pequeno número de moléculas da adrenalina a receptores β -adrenérgicos específicos na superfície celular ativa a adenilil ciclase. Para ilustrar a amplificação, mostramos 40 moléculas de cAMP produzidas por cada molécula de adenilil ciclase, as 40 moléculas de cAMP ativam 10 moléculas de PKA, cada molécula de PKA ativa 10 moléculas da enzima seguinte, e assim por diante. Essas amplificações provavelmente estão grosseiramente subestimadas.

Figura 13-16 – Dessa sensibilização do receptor β -adrenérgico na presença contínua de adrenalina. Esse processo é mediado por duas proteínas: a proteína β -adrenérgica quinase (β ARK) e a β -arrestina (β arr).

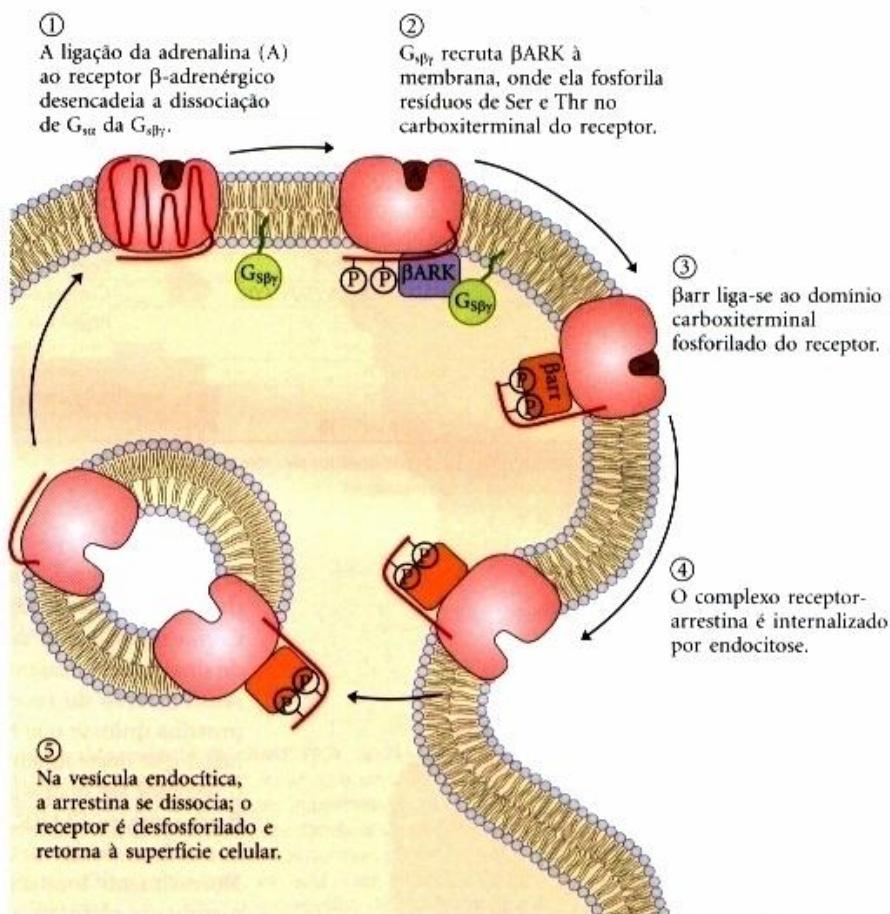


Tabela 13-4 – Alguns sinais que usam o cAMP como mensageiro secundário

Corticotrofina (ACTH)
Hormônio liberador da corticotrofina (CRH)
Dopamina [D-1, D-2]*
Adrenalina (β -adrenérgico)
Hormônio foliculo-estimulante (FSH)
Glucagon
Histamina [H-2]*
Hormônio luteinizante (LH)
Hormônio estimulante dos melanócitos (MSH)
Odorantes (muitos)
Hormônio da paratireoide
Prostaglandinas E ₁ , E ₂ (PGE ₁ , PGE ₂)
Serotonina [5-HT-1 _a , 5-HT-2]*
Somatostatina
Gustativos (doce, amargo)
Hormônio estimulante da tireoide (TSH)

*Alguns sinais possuem dois ou mais subtipos de receptores (mostrados em colchetes), que podem possuir mecanismos de transdução diferentes. Por exemplo, a serotonina é detectada em alguns tecidos pelos subtipos de receptor 5-HT-1a e 5-HT-1b, que atuam por meio da adenilil ciclase e do cAMP, e em outros tecidos pelo subtipo de receptor 5-HT-1c, atuando por meio do mecanismo da fosfolipase C-IP₃ (veja Tabela 13-5).

Alguns hormônios atuam *inibindo* a adenilil ciclase, *diminuindo* os níveis do cAMP e *suprimindo* a fosforilação protéica. Por exemplo, a ligação da somatostatina ao seu receptor leva à ativação de uma proteína G inibitória ou G_i, estruturalmente homóloga à G_s, que inibe a adenilil ciclase e diminui os níveis [cAMP]. A somatostatina, portanto, contrabalanceia os efeitos do glucagon. No tecido adiposo, a prostaglandina E₁ (PGE₁, veja Fig. 11-16b) inibe a adenilil ciclase, abaixando, portanto, [cAMP]

e diminuindo a mobilização das reservas de lipídios desencadeadas pela adrenalina e pelo glucagon. Em alguns outros tecidos, PGE₁ estimula a síntese do cAMP pelo fato de seus receptores estarem acoplados à adenilil ciclase por meio de uma proteína G estimulatória, G_s. Em tecidos com receptores α -adrenérgicos, a adrenalina diminui a [cAMP] porque os receptores α_2 estão acoplados a adenilil ciclase através de uma proteína G inibitória, G_i. Em resumo, um sinal extracelular, como a adrenalina ou PGE₁, pode ter efeitos bem diferentes em tecidos ou células diferentes, dependendo de (1) tipo do receptor, (2) tipo da proteína G (G_s ou G_i) com a qual o receptor estiver acoplado, e (3) conjunto das enzimas-alvo da PKA na célula.

Dois mensageiros secundários são derivados dos fosfatidilinosítóis

Uma segunda classe de receptores serpenteantes está acoplada, por meio de uma proteína G, a uma fosfolipase C da membrana plasmática que é específica para o lipídio da membrana plasmática fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (veja Fig. 11-13). Essa enzima, hormônio-sensível, catalisa a formação de dois potentes mensageiros secundários: diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato ou IP₃ (para não ser confundido com PIP₃ (p. 347)). Quando um hormônio dessa classe (Tabela 13-5) se liga a seu receptor específico na membrana plasmática (Fig. 13-17, etapa ①), o complexo receptor-hormônio catalisa a troca GTP-GDP em uma proteína G associada, G_q (etapa ②), ativando-a exatamente como o receptor β -adrenérgico ativa G_s (Fig. 13-11). A G_q ativada, por sua vez, ativa a fosfolipase C de membrana específica (etapa ③), que catalisa a produção dos dois mensageiros secundários pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato na membrana plasmática (etapa ④).

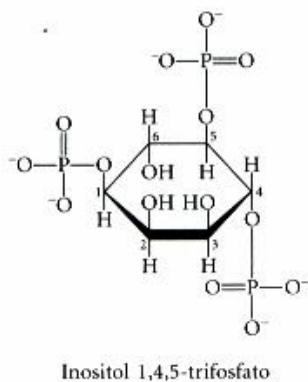


Tabela 13-5 – Alguns sinais que atuam por meio da fosfolipase C e do IP₃

Acetylcolina [muscarínico M ₁]
Agonistas α ₁ -adrenérgicos
Angiogenina
Angiotensina II
ATP [P _{2x} e P _{2y}]*
Auxina
Peptídeo liberador de gastrina
Glutamato
Hormônio liberador de gonadotrofinas (GRH)
Histamina [H ₁]*
Luz (drosófila)
Ocitocina
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Serotonina [5-HT-1c]*
Hormônio liberador de tirotrofina (TRH)
Vasopressina

* Subtipos de receptor estão entre colchetes, veja rodapé da Tabela 13-4.

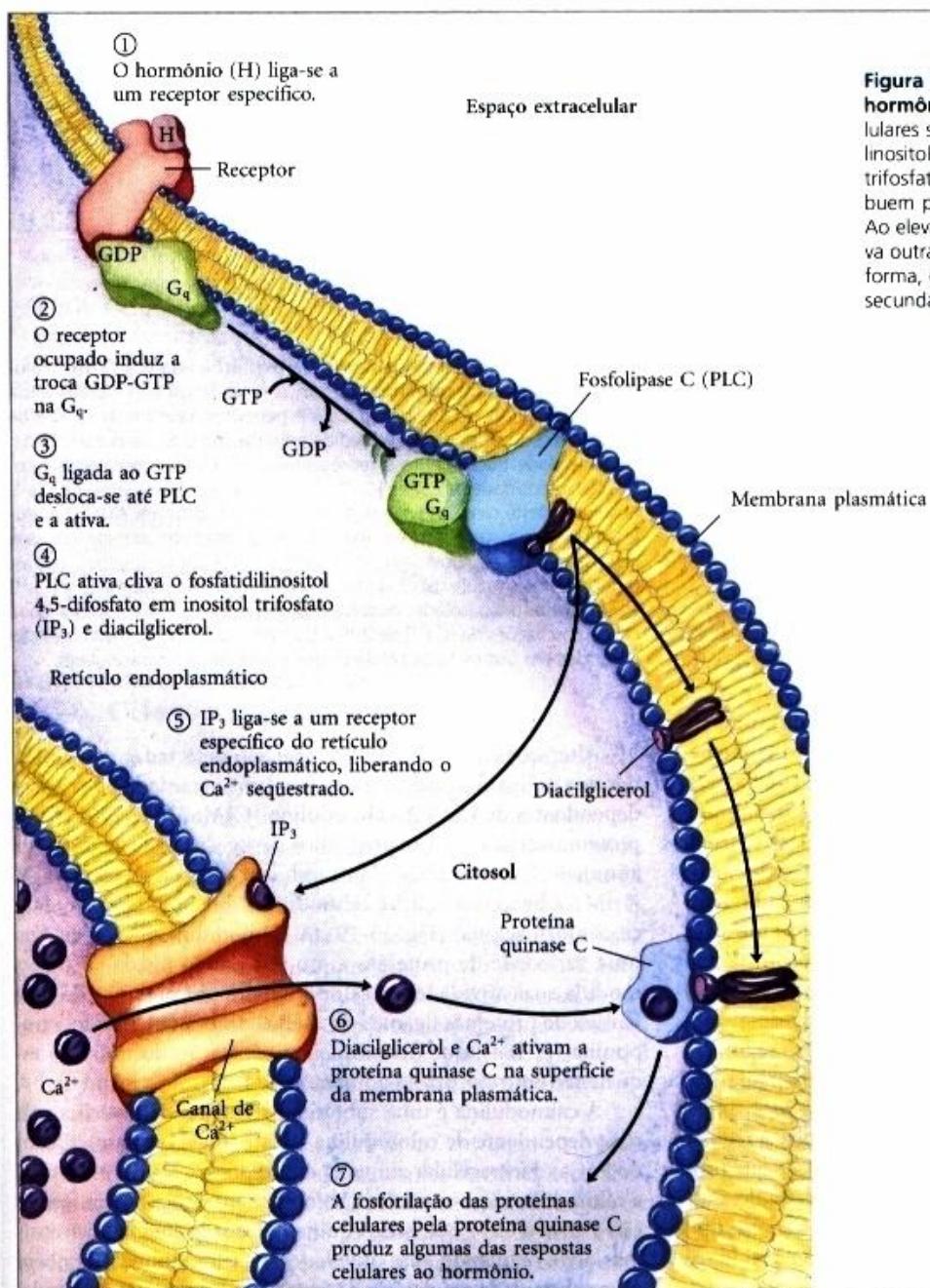
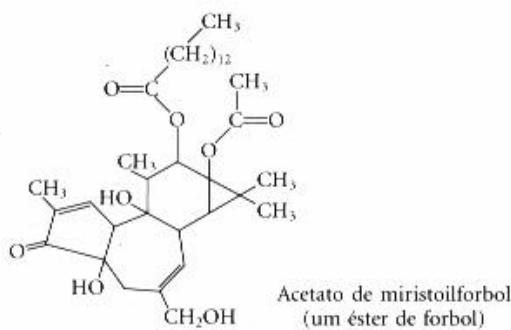


Figura 13-17 – A fosfolipase C ativada por hormônios e o IP₃. Dois mensageiros intracelulares são produzidos no sistema da fosfatidilinositol sensível a hormônios: o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol. Ambos contribuem para a ativação da proteína quinase C. Ao elevar a [Ca²⁺] citosólica, o IP₃ também ativa outras enzimas dependentes de Ca²⁺; dessa forma, o Ca²⁺ também atua como mensageiro secundário.

O inositol trifosfato (IP_3), produto solúvel em água da ação da fosfolipase C, difunde-se da membrana plasmática para o retículo endoplasmático, onde se liga a receptores IP_3 específicos e induz a abertura de canais de Ca^{2+} dentro do RE. O Ca^{2+} seqüestrado é, portanto, liberado dentro do citosol (etapa ⑤). A $[Ca^{2+}]$ citosólica eleva-se rapidamente a cerca de $10^{-6}M$. Um efeito da elevação da $[Ca^{2+}]$ é a ativação da **proteína quinase C (PKC)**. O diacilglicerol coopera com o Ca^{2+} na ativação da PKC e, portanto, é também um mensageiro secundário (etapa ⑥). A PKC fosforila resíduos de Ser ou Thr de proteínas-alvo específicas, alterando suas atividades catalíticas (etapa ⑦). A proteína quinase C possui várias isoenzimas, cada uma com uma distribuição tecidual característica, proteínas-alvo específicas e funções tecido-específicas.

A ação de um grupo de compostos conhecidos como **promotores de tumores** é atribuída aos seus efeitos na PKC. O mais bem conhecido dentre eles, os ésteres de forbol, são compostos sintéticos, potentes ativadores da PKC. Eles aparentemente mimetizam a ação celular do diacilglicerol como mensageiros secundários, mas, diferentemente dos diacilgliceróis de ocorrência natural, eles não são rapidamente metabolizados. Pela contínua ativação da PKC, esses promotores tumorais sintéticos interferem na regulação normal do crescimento e da divisão celulares (discutida mais adiante neste capítulo).



O cálcio é um mensageiro secundário em muitas transduções de sinais

Em muitas células que respondem a sinais extracelulares, o Ca^{2+} funciona como um mensageiro secundário que desencadeia respostas intracelulares como a exocitose nos neurônios e nas células endócrinas, a contração no músculo ou os rearranjos no citoesqueleto durante o movimento amebóide. Normalmente, a $[Ca^{2+}]$ citosólica é mantida muito baixa ($<10^{-7}M$) pela ação das bombas de Ca^{2+} no RE, na mitocôndria e na membrana plasmática. Estímulos hormonais, neurais ou outros produzem ou um influxo de Ca^{2+} para dentro da célula por meio de canais de Ca^{2+} específicos na membrana plasmática ou uma liberação do Ca^{2+} seqüestrado no RE ou na mitocôndria, em ambos os casos elevando a $[Ca^{2+}]$ citosólica e desencadeando uma resposta celular.

Muito comumente, a $[Ca^{2+}]$ não aumenta e depois decai simplesmente, mas sim oscila com um período de alguns segundos (Fig. 13-18), mesmo quando a concentração extracelular do hormônio permanece constante. O mecanismo que está subjacente às oscilações da $[Ca^{2+}]$ presumivelmente envolve a regulação por retroalimentação do Ca^{2+} tanto da fosfolipase que produz IP_3 quanto do canal iônico que regula a liberação do Ca^{2+} do RE. Qualquer que seja o mecanismo, o efeito é que um tipo de sinal (concentração hormonal, por exemplo) é convertido em outro (freqüência e amplitude dos picos da $[Ca^{2+}]$).

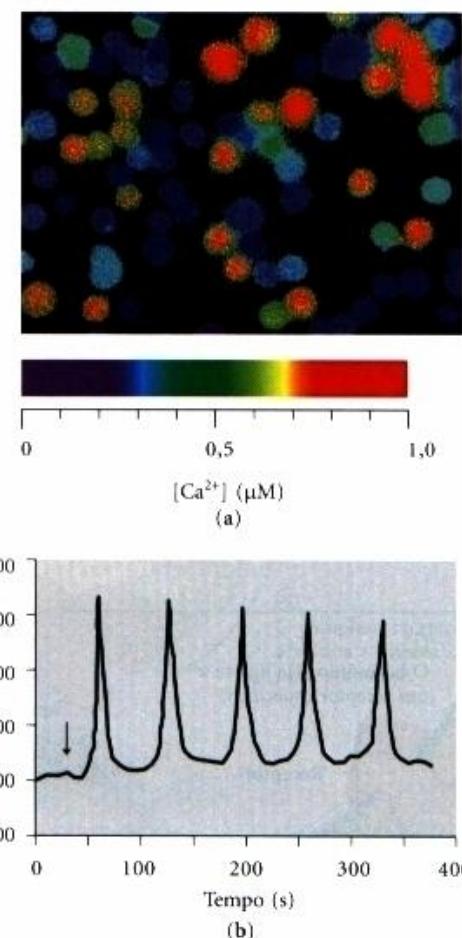


Figura 13-18 – Desencadeamento de oscilações na $[Ca^{2+}]$ intracelular por sinais extracelulares. (a) Um corante (furta) cuja fluorescência se altera quando ele se liga ao Ca^{2+} é permitido se difundir dentro da célula e sua emissão de luz é medida pelo microscópio de fluorescência. A intensidade fluorescente é representada em cores, a escala de cores relata a intensidade da cor ao $[Ca^{2+}]$, permitindo a determinação da $[Ca^{2+}]$ absoluta. Neste caso, os timócitos foram estimulados com ATP extracelular, que eleva a sua $[Ca^{2+}]$ interna. As células são heterogêneas em suas respostas; algumas possuem alta $[Ca^{2+}]$ intracellular (vermelho), outras, muito menores (azul). (b) Quando tal sonda foi usada para medir a $[Ca^{2+}]$ em um hepatócito isolado, observamos que o antagonista noradrenalinca causou oscilações da $[Ca^{2+}]$ de 200 a 500 nM. Oscilações semelhantes são induzidas em outros tipos celulares por outros sinais extracelulares.

Alterações na $[Ca^{2+}]$ intracelular são detectadas por proteínas que se ligam ao cálcio e regulam uma variedade de enzimas dependentes de Ca^{2+} . A **calmodulina (CaM; M_r 17.000)** é uma proteína ácida com quatro sítios de ligação ao cálcio de alta afinidade. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular se eleva a cerca de $10^{-6}M$ ($1\mu M$), a ligação do Ca^{2+} à calmodulina direciona uma mudança conformational (Fig. 13-19). A calmodulina associa-se com uma variedade de proteínas e, no seu estado ligada ao cálcio, modula suas atividades. A calmodulina é um membro de uma família de proteínas ligantes do cálcio, também incluindo a tropomodulina (p. 184), que desencadeia a contração do músculo esquelético em resposta ao aumento da $[Ca^{2+}]$.

A calmodulina é uma subunidade integral da **proteína quinase dependente de calmodulina e Ca^{2+} (CaM quinase)**. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta em resposta a alguns estímulos, a calmodulina liga-se ao Ca^{2+} , sofre uma mudança na conformação e ativa a CaM quinase. A quinase fosforila então várias enzimas-alvo, regulando suas atividades. A calmodulina é também uma subunidade regulatória da fosforilase *b* quinase do músculo,



Figura 13-19 – Calmodulina. A calmodulina, proteína mediadora de muitas reações enzimáticas estimuladas por Ca^{2+} , possui quatro sítios de ligação de alta afinidade para o Ca^{2+} (K_{d} de cerca de 0,1 a 1 μM). (a) Um modelo de fita da estrutura cristalina da calmodulina, determinada por cristalografia de raios X. Os quatro sítios de ligação são ocupados pelo Ca^{2+} (púrpura). O domínio aminoterminal está à esquerda, o domínio carboxiterminal, à direita. (b) A calmodulina associada com um domínio helicoidal (vermelho) de uma das muitas enzimas que ela regula, a proteína quinase II dependente de calmodulina. Note que a longa α -hélice central visível em (a) curvou-se sobre si mesma ao se ligar ao domínio helicoidal do substrato.

que é ativada por Ca^{2+} . Dessa forma, o Ca^{2+} desencadeia as contrações musculares que requerem ATP, enquanto também ativa a degradação do glicogênio, fornecendo combustível para a síntese do ATP. Muitas outras enzimas são também conhecidas como moduladas por Ca^{2+} por meio da calmodulina (Tabela 13-6).

Tabela 13-6 – Algumas proteínas reguladas por Ca^{2+} e calmodulina

Adenil ciclase (cérebro)
Proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina
Canal de Na^+ dependente de Ca^{2+} (Paramecium)
Canal do retículo endoplasmático liberador de Ca^{2+}
Calcineurina (fosfoproteína fosfatase 2B)
Fosfodiesterase do cAMP
Canal olfativo dependente de cAMP
Canais de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ abertos por cAMP (células dos bastonetes e cones)
Quinases da cadeia leve da miosina
NADH quinase
Sintase do óxido nítrico
PI-3 quinase
ATPase Ca^{2+} da membrana plasmática (bomba de Ca^{2+})
RNA helicase (p68)

Transdução Sensorial na Visão, Olfacto e Gustação

A detecção de luz, cheiro e gosto (visão, olfacto e gustação, respectivamente) nos animais é realizada por neurônios sensoriais especializados que usam mecanismos de transdução de sinal fundamentalmente semelhantes àqueles usados para detectar hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Um sinal sensorial inicial é amplificado grandemente pelos mecanismos que envolvem canais iônicos e mensageiros secundários intracelulares; o sistema adapta-se à estimulação contínua, alterando sua sensibilidade ao estímulo (dessensibilização), e a mensagem sensorial de vários receptores é integrada antes de o sinal final chegar ao cérebro.

A luz hiperpolariza as células bastonetes e cones dos olhos dos vertebrados

Nos olhos dos vertebrados, um feixe de luz entrando através da pupila é focado numa coleção de neurônios sensíveis à luz altamente organizados (Fig. 13-20). As células sensíveis à luz são de dois tipos: **bastonetes** (cerca de 10^9 por retina), que sensoriam níveis baixos de luz mas não conseguem discriminar cores, e **cones** (cerca de 3×10^6 por retina), que são menos sensíveis mas

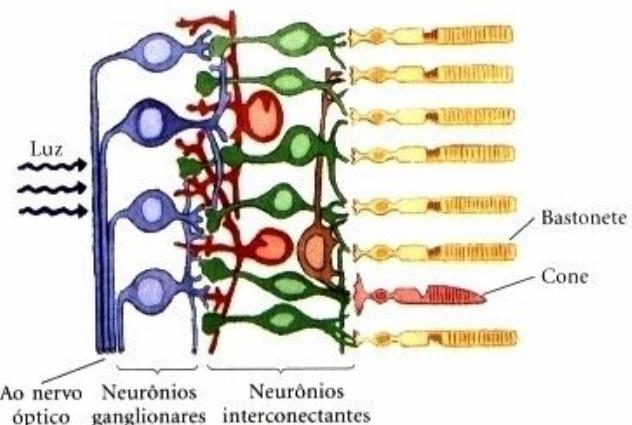


Figura 13-20 – A recepção da luz nos olhos dos vertebrados. O cristalino dos olhos focaliza a luz na retina, que é composta de camadas de neurônios. Os neurônios fotorreceptores primários são as células bastonetes (laranja), que são responsáveis pela alta resolução e pela visão noturna, e as células cones de três subtipos (vermelho) que iniciam a visão colorida. Os bastonetes e os cones formam sinapses com várias camadas de neurônios interconectantes que conduzem e integram os sinais elétricos. Os sinais finalmente passam dos neurônios ganglionares, pelo nervo óptico, até o cérebro.

conseguem discriminar as cores. Ambos os tipos de células são neurônios sensoriais especializados longos e estreitos, com dois compartimentos celulares distintos: um **segmento externo**, que contém dúzias de discos membranosos carregados com a proteína de membrana, a rodopsina, e um **segmento interno**, contendo o núcleo e muitas mitocôndrias que produzem o ATP essencial para a fototransdução.

Da mesma forma que os outros neurônios, os bastonetes e os cones possuem um potencial elétrico transmembrana (V_m), produzido pela bomba eletrogênica da ATPase Na^+/K^+ na membrana plasmática do segmento interno (Fig. 13-21). Contribuindo também para o potencial de membrana está um canal iônico, que permite a passagem quer do Na^+ quer do Ca^{2+} e é aberto pelo cGMP. No escuro, os bastonetes contêm cGMP suficiente para manter esse canal aberto. O potencial de membrana é, portanto, determinado pela diferença entre o Na^+ e o K^+ bombeados pelo segmento interno (que polariza a membrana) e o influxo de Na^+ por meio dos canais iônicos do segmento externo (que tendem a despolarizar a membrana).

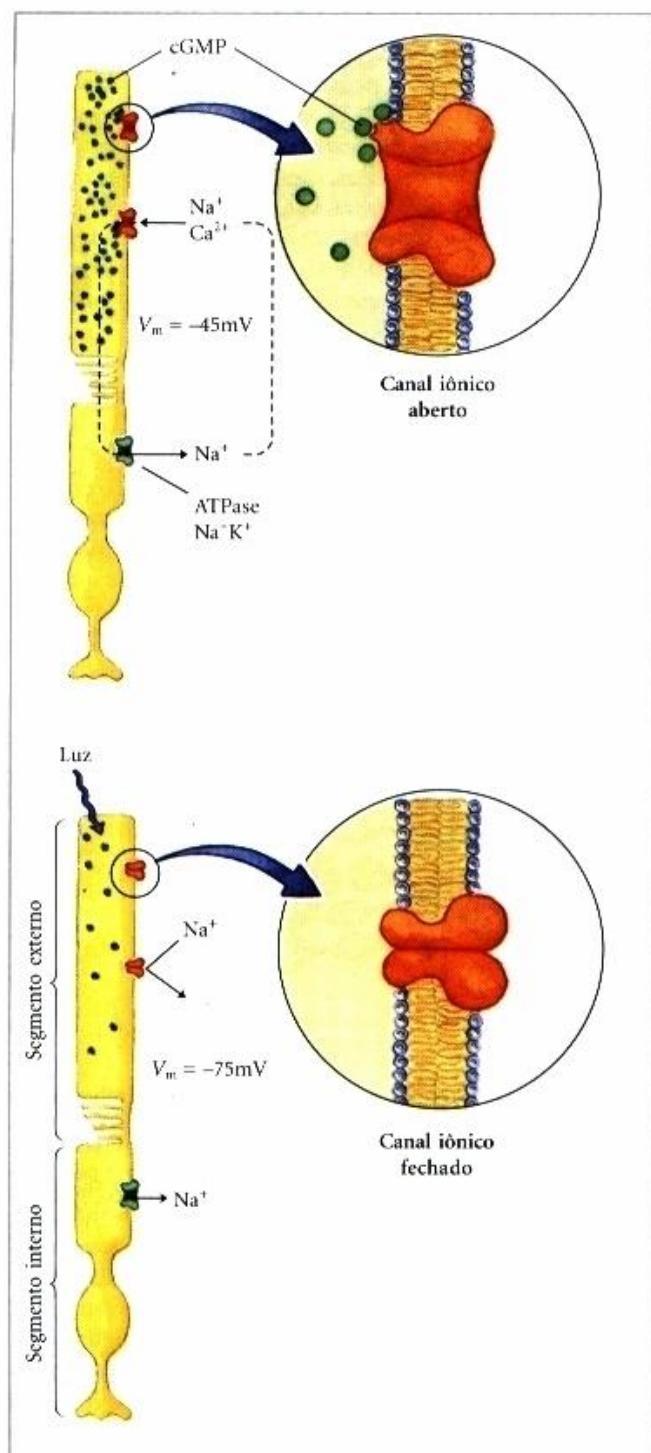


Figura 13-21 – Hipopolarização das células bastonetes induzida pela luz. A célula bastonete consiste de um segmento externo, preenchido com pilhas de discos membranosos (não mostradas) contendo o fotorreceptor rodopsina, e um segmento interno que contém o núcleo e outras organelas. Os cones possuem uma estrutura semelhante. O ATP no segmento interno fornece energia para a ATPase Na^+K^+ , que cria um potencial elétrico transmembrana bombeando 3 Na^+ para fora por cada 2 K^+ bombeados para dentro. O potencial da membrana é reduzido pelo fluxo de Na^+ e de Ca^{2+} de volta para a célula através dos canais catiônicos abertos por cGMP na membrana plasmática do segmento externo. Quando a rodopsina absorve a luz, ela desencadeia a degradação do cGMP (pontos verdes) no segmento externo, causando o fechamento do canal de cátions. Sem o influxo do cátion através desse canal, a célula torna-se hipopolarizada. Esse sinal elétrico é passado ao cérebro através das camadas de neurônios mostradas na Figura 13-20.

A essência da sinalização nos bastonetes e cones da retina é a diminuição na concentração do cGMP induzida pela luz, que faz com que o canal iônico aberto por cGMP se feche. A membrana plasmática, então, torna-se hipopolarizada pela ATPase Na^+K^+ . As células bastonetes e cones fazem sinapse com neurônios interconectantes (Fig. 13-20) que transportam a informação sobre a atividade elétrica aos neurônios ganglionares próximos da superfície interna da retina. Os neurônios ganglionares integram os estímulos de muitas células bastonetes e cones e enviam o sinal resultante através do nervo óptico ao córtex visual do cérebro.

A luz desencadeia mudanças conformacionais no receptor rodopsina

A transdução visual começa quando a luz incide em muitos milhares de moléculas de rodopsina que estão presentes em cada um dos discos do segmento externo. A rodopsina (M_r 40.000) é uma proteína integral com sete α -hélices que atravessam a membrana (Fig. 13-22), a arquitetura serpenteante característica. O domínio aminoterminal projeta-se dentro do disco e o domínio carboxiterminal está voltado para o citosol do segmento externo.

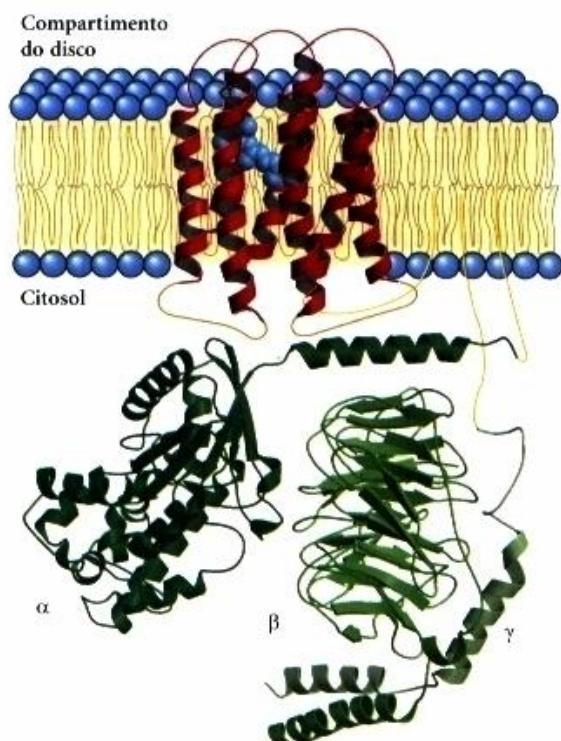


Figura 13-22 – A provável estrutura da rodopsina complexada com a proteína G transducina. A rodopsina (vermelho) possui sete hélices transmembrana incrustadas nas membranas dos discos do segmento externo e está orientada com a sua extremidade carboxiterminal no lado citosólico, sua extremidade aminoterminal está dentro do disco. O cromóforo 11-cis-retinal (azul), preso por meio de uma base de Schiff ligada à Lys²⁵⁶ da sétima hélice, coloca-se próximo ao centro da bicamada. (Essa localização é semelhante àquela do sítio de ligação da adrenalina no receptor β -adrenérgico.) Vários resíduos de Ser e Thr próximos da extremidade carboxiterminal são substratos para as fosforilações que são parte do mecanismo de dessensibilização para a rodopsina. Alças citosólicas que interagem com a proteína G transducina estão mostradas em coral; suas posições exatas não são ainda conhecidas. As três subunidades da transducina (verde) estão mostradas em seu arranjo provável. A rodopsina liga-se ao ácido palmitico em sua extremidade carboxiterminal, e ambas as subunidades α e β da transducina possuem lipídios que ajudam a ancorá-la na membrana; essas caudas hidrofóbicas estão em amarelo.

O pigmento que absorve a luz (cromóforo) 11-cis-retinal é covalentemente ligado à opsina, o componente protéico da rodopsina, por meio de uma base de Schiff com um resíduo de Lys. O retinal está situado no meio da bicamada (Fig. 13-22), orientando-se com seu longo eixo aproximadamente no plano da membrana. Quando um fóton é absorvido pelo componente retinal da rodopsina, a energia produz uma alteração fotoquímica, e o 11-cis-retinal é convertido em todo-trans-retinal (veja Figs. 3-8b e 11-19). Essa alteração na estrutura do cromóforo produz uma mudança conformatacional na molécula da rodopsina — a primeira etapa na transdução visual.

A rodopsina excitada atua por meio da proteína G transducina para reduzir a concentração do cGMP

Na sua conformação excitada, a rodopsina é capaz de interagir com uma segunda proteína, a transducina, que flutua próximo à face citosólica da membrana do disco (Fig. 13-22). A transducina (T) pertence à mesma família das proteínas triméricas que

ligam GTP, como as G_s e G_t . Embora especializadas na transdução visual, a transducina compartilha muitas características funcionais com G_s e G_t . Ela pode ligar-se tanto ao GDP quanto ao GTP. No escuro, o GDP está ligado, todas as três subunidades da proteína (T_α , T_β e T_γ) permanecem juntas e nenhum sinal é enviado. Quando a rodopsina é excitada pela luz, ela interage com a transducina, catalisando a substituição do GDP ligado pelo GTP a partir do citosol (Fig. 13-23, etapas ① e ②). A transducina, então, dissocia-se em T_α e $T_{\beta\gamma}$, e o GTP ligado a T_α transporta o sinal do receptor excitado ao próximo elemento da via da transdução, a cGMP fosfodiesterase (PDE), uma enzima que converte cGMP em 5'-GMP (etapas ③ e ④). Observe que esta não é a mesma nucleotídeo cíclico fosfodiesterase que hidrolisa o cAMP para encerrar a resposta β -adrenérgica. A PDE específica para o cGMP é exclusiva das células visuais da retina.

PDE é uma proteína integral com seu sítio ativo no lado citosólico da membrana do disco. No escuro, uma subunidade inibitória fortemente ligada suprime efetivamente a atividade PDE.

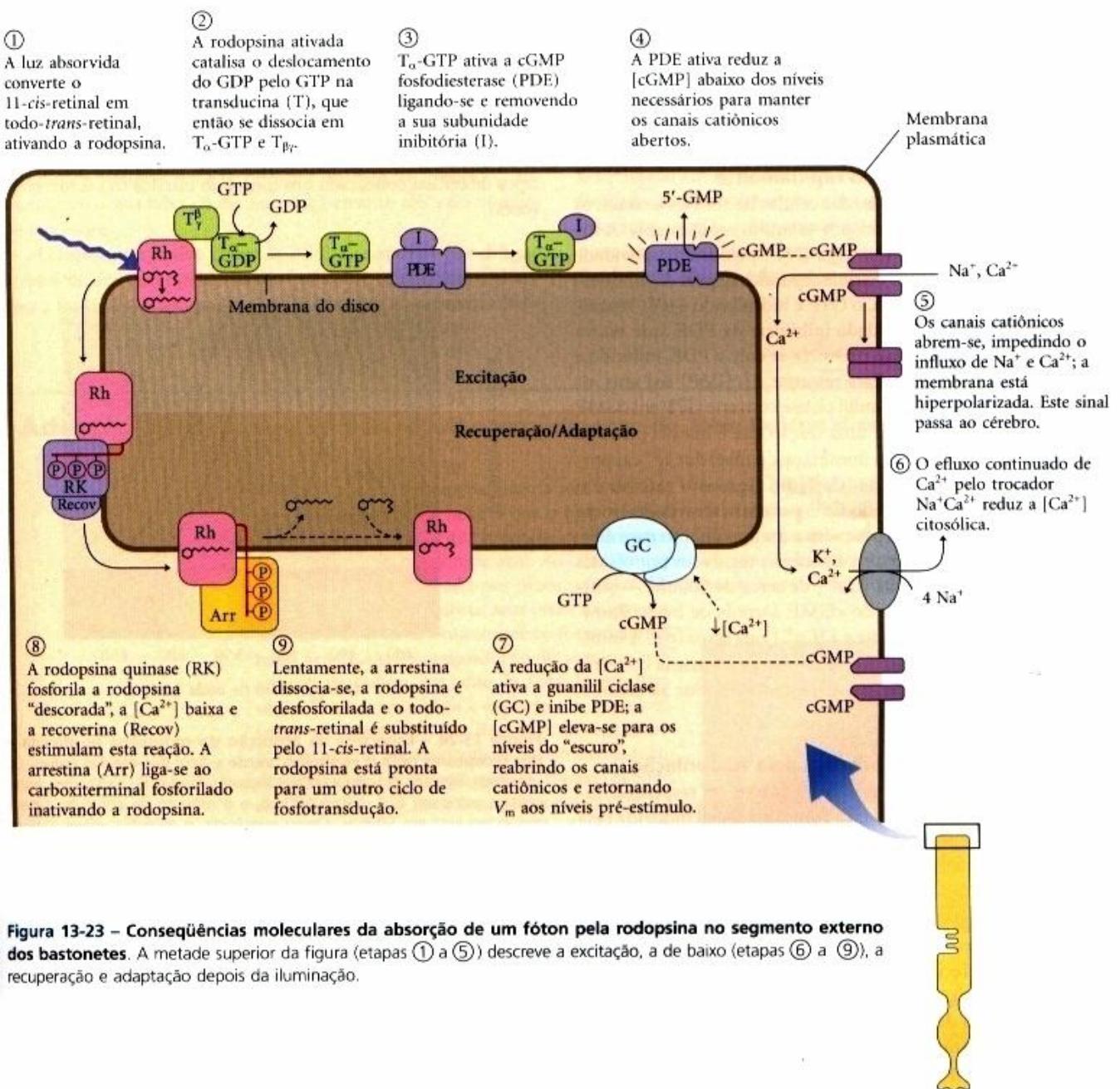


Figura 13-23 – Consequências moleculares da absorção de um fóton pela rodopsina no segmento externo dos bastonetes. A metade superior da figura (etapas ① a ⑤) descreve a excitação, a de baixo (etapas ⑥ a ⑨), a recuperação e adaptação depois da iluminação.

Quando T_α -GTP encontra a PDE, a subunidade inibitória é liberada e a atividade enzimática imediatamente aumenta várias ordens de grandeza. Cada molécula de PDE ativa degrada muitas moléculas de cGMP ao biologicamente inativo 5'-GMP, diminuindo a [cGMP] no segmento externo em uma fração de segundo. No novo e baixo nível da [cGMP], os canais iônicos regulados por cGMP se fecham, bloqueando a reentrada de Na^+ e Ca^{2+} dentro do segmento externo e hiperpolarizando a membrana das células dos bastonetes e cones (etapa ⑤). Por esse processo, o estímulo inicial — um fóton — altera a V_m da célula.

A amplificação de sinal ocorre nas células bastonetes e cones

Várias etapas no processo de transdução visual resultam em grande amplificação do sinal. Cada molécula de rodopsina excitada ativa pelo menos 500 moléculas de transducina, cada uma das quais ativa uma molécula de PDE. A PDE possui um número de renovação marcadamente elevado, cada molécula ativada hidrolisa 4.200 moléculas do cGMP por segundo. A ligação do cGMP aos canais iônicos regulados por cGMP é cooperativa (pelo menos três moléculas devem estar ligadas para abrir um canal), e uma alteração relativamente pequena na [cGMP] registra, portanto, uma grande alteração na condutância iônica. O resultado dessas amplificações é uma sensibilidade delicada à luz. A absorção de um único fóton fecha um milhar ou mais de canais iônicos e altera o potencial de membrana da célula em cerca de 1mV.

O sinal visual é terminado rapidamente

Depois que cessa a iluminação das células bastonetes e cones, os sistemas fotossensoriais desativam-se muito rapidamente. A subunidade da transducina (que liga GTP) possui uma atividade GTPase intrínseca. Dentro de milissegundos depois da diminuição da intensidade luminosa, o GTP é hidrolisado e a T_α reassocia-se com a $T_\beta\gamma$. A subunidade inibitória da PDE, que estava ligada à T_α -GTP, é liberada e reassocia-se com a PDE, inibindo a enzima muito fortemente. Para retornar a [cGMP] aos seus níveis "do escuro", a enzima guanilil ciclase converte GTP em cGMP (etapa ⑦ na Fig. 13-23) em uma reação que é inibida pela alta $[\text{Ca}^{2+}]$ ($>100\text{nM}$). Durante a iluminação, o nível de Ca^{2+} cai porque o estado de equilíbrio da $[\text{Ca}^{2+}]$ no segmento externo é o resultado do bombeamento do Ca^{2+} para fora através do trocador $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ da membrana plasmática e o movimento para dentro do Ca^{2+} através da abertura dos canais regulados por cGMP. No escuro, isso produz uma $[\text{Ca}^{2+}]$ de cerca de 500nM — suficiente para inibir a síntese de cGMP. Depois de breve iluminação, o Ca^{2+} entra lentamente e a $[\text{Ca}^{2+}]$ cai (etapa ⑥). A inibição da guanilil ciclase pelo Ca^{2+} é aliviada e a enzima converte GTP em cGMP para retornar a seu estado anterior ao estímulo (etapa ⑦).

A rodopsina é dessensibilizada pela fosforilação

A própria rodopsina também sofre alterações em resposta à iluminação prolongada. A mudança conformacional induzida pela absorção da luz expõe vários resíduos de Thr e Ser no domínio carboxiterminal. Esses resíduos são rapidamente fosforilados pela rodopsina quinase (etapa ⑧ na Fig. 13-23) que é funcional e estruturalmente homóloga à quinase β -adrenérgica (β ARK) que dessensibiliza o receptor β -adrenérgico (Fig. 13-16). A proteína ligante de Ca^{2+} , a recoverina, inibe a rodopsina quinase em altas $[\text{Ca}^{2+}]$, mas a inibição é aliviada quando a $[\text{Ca}^{2+}]$ cai depois da iluminação, como descrito anteriormente. O domínio carboxiterminal da rodopsina fosforilada é ligado pela proteína arrestina, prevenindo a interação entre a rodopsina ativada e a trans-

ducina. A arrestina é um homólogo próximo da β -arrestina (Fig. 13-16). Em uma escala de tempo relativamente longa (segundos a minutos), o todo-trans-retinal de uma molécula de rodopsina ativada é removido e substituído por 11-cis-retinal, produzindo rodopsina que está pronta para um outro ciclo de excitação (etapa ⑨ na Fig. 13-23).

Os humanos não conseguem sintetizar retinal a partir de precursores mais simples e precisam obtê-lo na dieta na forma de vitamina A (pág. 293). Dado o papel do retinal no processo da visão, não é surpreendente que a deficiência dietética da vitamina A produza a cegueira noturna (visão pobre à noite ou em luz fraca).

As células cones se especializaram na visão colorida

A visão colorida nas células cones envolve uma via de transdução sensorial essencialmente idêntica, desencadeada por receptores de luz levemente diferentes. Três tipos de células cones são especializados em detectar a luz de diferentes regiões do espectro, usando três proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada célula cone expressa apenas um tipo de opsinas, mas cada tipo é muito relacionado à rodopsina em tamanho, seqüência de aminoácidos e presumivelmente estrutura tridimensional. As diferenças entre as opsinas são, entretanto, suficientemente grandes para colocar o cromóforo 11-cis-retinal em três ambientes levemente diferentes, resultando que os três fotorreceptores possuem diferentes espectros de absorção (Fig. 13-24). Nós discriminamos cores e nuâncias integrando os sinais vindos dos três tipos de células cone, cada um contendo um dos três fotorreceptores.

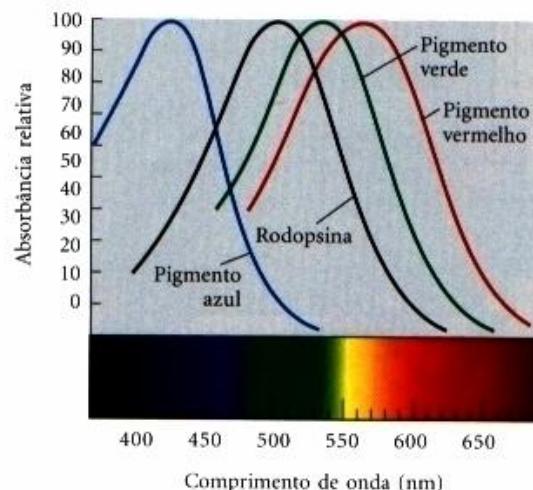


Figura 13-24 – Espectros de absorção da rodopsina purificada e dos receptores para o vermelho, verde e azul das células cones. Os espectros, obtidos de células cones individualizadas de cadáveres, apresentam picos em 420, 530 e 560nm, e o máximo de absorção para a rodopsina está em 500nm. Como referência, o espectro visível para os humanos está entre 380 e 750nm.

A cegueira às cores, tal como a inabilidade para distinguir o vermelho do verde, é um traço geneticamente herdado muito comum nos humanos. Os vários tipos de cegueira às cores resultam de diferentes mutações na opsinas. Uma forma é devida à perda do fotorreceptor vermelho, os indivíduos afetados são chamados de *dicromatas para o vermelho* (vêm apenas duas cores primárias). Outros não possuem o pigmento verde e são

dicromatas para o verde. Em alguns casos, os fotorreceptores vermelho e verde estão presentes mas possuem uma alteração na seqüência de aminoácidos que produz uma mudança em seus espectros de absorção, resultando em uma visão colorida anormal. Dependendo de qual pigmento estiver alterado, tais indivíduos são chamados de **tricromatas anômalos para o vermelho** ou **tricromatas anômalos para o verde**. O exame dos genes para os receptores visuais permitiu recentemente o diagnóstico da cegueira às cores em um famoso “paciente”, mais de um século após sua morte (Adendo 13-2).

A olfação e a gustação dos vertebrados usam mecanismos semelhantes ao sistema visual

As células sensoriais usadas para detectar os odores e os sabores têm muito em comum com as células bastonetes e cones que detectam a luz. Os neurônios olfativos possuem vários cílios longos e finos que se estendem de uma extremidade da célula para dentro da camada mucosa que cobre a célula. Esses cílios apresentam uma área de grande superfície para a interação com os sinal olfativos. Os receptores para o estímulo olfativo são proteínas da membrana ciliar com a estrutura serpenteante familiar das setas α -hélices transmembrana. O sinal olfativo pode ser qualquer um de grande número de compostos voláteis para os quais há proteínas receptoras específicas. Nossa habilidade de discriminar odores origina-se de centenas de receptores olfativos diferentes na língua e na passagem nasal e da habilidade do cérebro em integrar os impulsos vindos dos diferentes tipos de receptores olfativos para reconhecer um padrão “híbrido”, aumentando nossa faixa de discriminação muito além do número de receptores.

O estímulo olfativo chega às células sensoriais por difusão através do ar. Na camada mucosa que cobre os neurônios olfativos, a molécula odorante liga-se diretamente ao receptor olfati-

vo ou a uma proteína de ligação específica que transporta o odorante até o receptor (Fig. 13-25). A interação entre o odorante e o receptor desencadeia uma mudança na conformação do receptor que leva à substituição do GDP ligado por um GTP em uma proteína G_{olf} , análoga à transducina e à G_i do sistema β -adrenérgico. A G_{olf} ativa então a adenilil ciclase da membrana ciliar, que sintetiza cAMP a partir do ATP, elevando a [cAMP] local. Os canais de Na^+ regulados por cAMP da membrana ciliar se abrem, e o influxo de Na^+ produz uma pequena despolarização chamada de **potencial do receptor**. Se um número suficiente de moléculas encontrar os receptores, o potencial do receptor será suficientemente forte para induzir o neurônio a disparar um potencial de ação. Isso é transmitido ao cérebro em várias etapas e é registrado como um odor específico. Todos esses eventos ocorrem dentro de 100 a 200 milissegundos.

Alguns neurônios olfativos usam um segundo mecanismo de transdução. Eles possuem receptores acoplados por meio de proteínas G à fosfolipase C em vez da adenilil ciclase. A recepção de sinais nessas células desencadeia a produção de IP_3 (Fig. 13-17), que abre os canais de Ca^{2+} regulados por IP_3 na membrana ciliar. O influxo do Ca^{2+} despolariza então a membrana ciliar e gera um potencial do receptor ou regula enzimas dependentes de Ca^{2+} na via olfativa.

Em qualquer dos tipos de neurônio olfativo, quando o estímulo não estiver mais presente, a maquinaria de transdução se desliga de várias maneiras. Uma fosfodiesterase do cAMP retorna a [cAMP] no nível do pré-estímulo. A G_{olf} hidrolisa o seu GTP ligado em GDP, inativando-se dessa forma a si própria. A fosforilação do receptor por uma quinase específica previne sua interação com G_{olf} por um mecanismo análogo àquele usado para dessensibilizar o receptor β -adrenérgico e a rodopsina. E, finalmente, alguns odorantes são enzimaticamente destruídos por oxidases.

Adendo 13-2

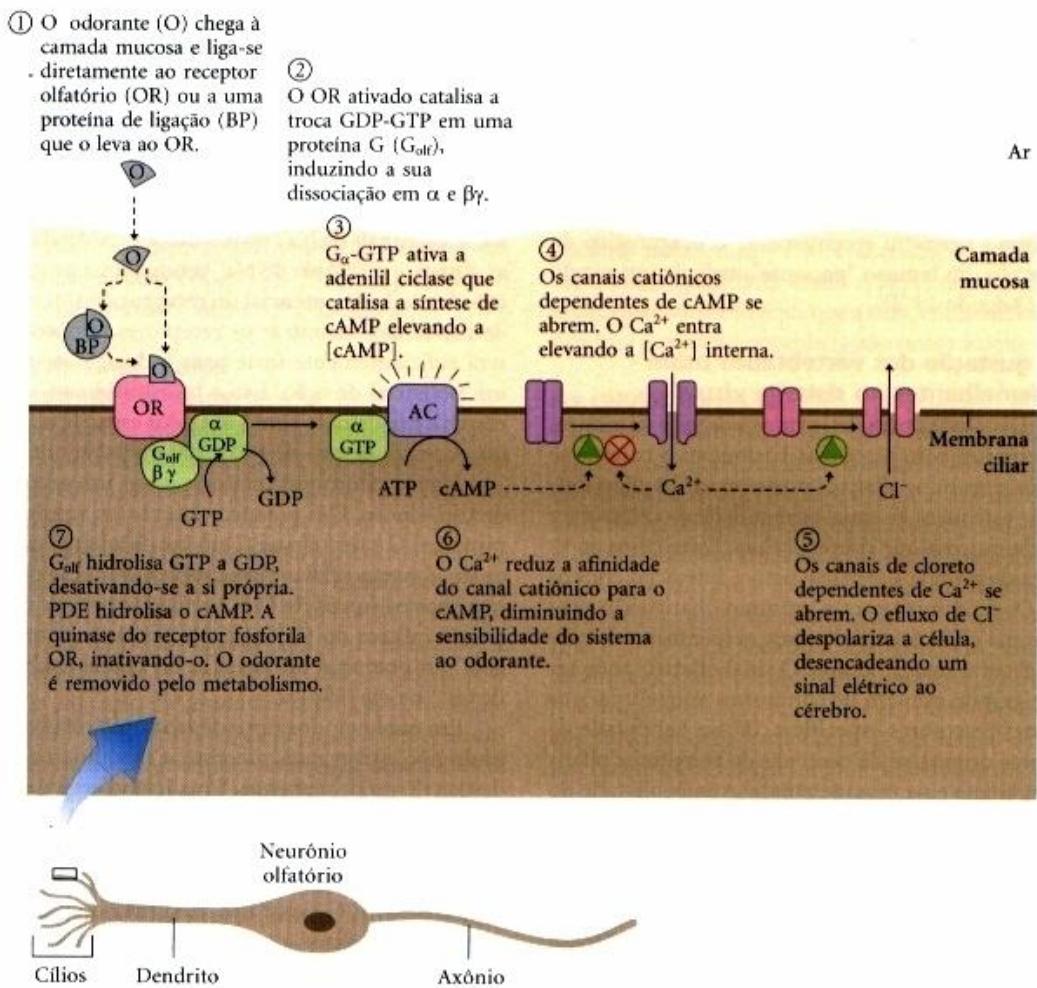
Cegueira às cores: o experimento de John Dalton direto do túmulo

O químico John Dalton (da famosa teoria do átomo) era cego à cor. Ele achava que o humor vítreo de seus olhos (o fluido que preenche os olhos atrás do cristalino) era tingido de azul. Ao contrário do fluido incolor encontrado nos olhos normais. Ele propôs que, após sua morte, seus olhos fossem dissecados e a cor de seu humor vítreo fosse determinada. Seu desejo foi cumprido, no dia seguinte após a morte de Dalton, em julho de 1844, Joseph Ransome dissecou seus olhos e encontrou o humor vítreo perfeitamente incolor. Ransome, da mesma forma que muitos outros cientistas, estava relutante em descartar aquela peça anatômica. Ele colocou os olhos de Dalton em um jarro com preservativo (Fig. 1), onde eles permaneceram até o meio da década de 1990, quando biólogos moleculares da Inglaterra retiraram pequenas amostras dessas retinas de 150 anos e extraíram o DNA. Usando as seqüências de genes conhecidas para as opsinas dos fotopigmentos vermelho e verde, eles amplificaram as seqüências relevantes (usando técnicas descritas no Capítulo 29) e determinaram que Dalton tinha o gene da opsinina para o fotopigmento vermelho mas não

possuía o gene da opsinina para o fotopigmento verde. Dalton era um dicromata verde. Cento e cinquenta anos após sua morte, o experimento que ele iniciou — hipotetizando sobre a causa da sua cegueira à cor — foi finalmente terminado.



Figura 1 – Os olhos de Dalton. Retirado de Hunt DM, Dulai KS, Bowmaker JK, Mollon JD. (1995) The chemistry of John Dalton's color blindness. *Science* **267**, 984-988.



O sentido do paladar nos vertebrados reflete a atividade dos neurônios gustativos agrupados em papilas gustativas na superfície da língua. Nesses neurônios sensoriais, receptores serpenteantes estão acoplados à proteína G trimérica gustaducina (muito semelhante à transducina das células bastonetes e cones). As moléculas de sabor doce são aquelas que se ligam aos receptores nas papilas gustativas doces. Quando a molécula (do sabor) se liga, a gustaducina é ativada pela substituição do GDP ligado pelo GTP e então estimula a produção de cAMP pela adenilil ciclase. A consequente elevação da [cAMP] ativa a PKA, que fosforila os canais de K⁺ na membrana plasmática, forçando-os a se fechar. O efluxo reduzido do K⁺ despolariza a célula (Fig. 13-26). Outras papilas gustativas especializadas em detectar os sabores amargo, azedo e salgado usam várias combinações de mensageiros secundários e de canais em seus mecanismos de transdução.

Proteínas G acopladas aos sistemas de receptores serpenteantes compartilham várias características

Examinaremos agora quatro sistemas (sinalização hormonal, visão, olfato e gustação) nos quais receptores de membrana estão acoplados à enzima, a qual produz mensageiros secundários por meio de proteínas G. Parece que os mecanismos sinalizados se originaram cedo na evolução; receptores serpenteantes, proteínas G triméricas e adenilil ciclase são encontrados na levedura da cerveja. Os padrões gerais foram conservados, enquanto a introdução da variedade oferece aos organismos modernos

a habilidade de responder a uma grande classe de estímulos (Tabela 13-7). Dos aproximadamente 10^5 genes no genoma humano, cerca de 10^3 codificam receptores serpenteantes, incluindo centenas para o estímulo olfatório e vários “receptores órfãos” para os quais ainda não se conhecem ligantes naturais.

Todos os sistemas de transdução bem estudados que agem por meio das proteínas G triméricas compartilham certas características comuns (Fig. 13-27). Os receptores possuem sete segmentos transmembrana, um domínio (geralmente a alça entre as hélices transmembrana 6 e 7) que interage com a proteína G, e um domínio citoplasmático carboxiterminal que sofre fosforilação reversível em vários resíduos de Ser ou Thr. O sítio de ligação do ligante (ou, no caso da recepção da luz, o receptor da luz) está escondido no fundo da membrana e envolve resíduos de vários segmentos transmembrana. A ligação do ligante (ou da luz) induz uma mudança conformacional no receptor, expondo um domínio que interage com uma proteína G. As proteínas G triméricas ativam ou inibem enzimas efetoras (adenilil ciclase, PDE ou fosfolipase C), que alteram a concentração de um mensageiro secundário (cAMP, cGMP, IP₃ ou Ca²⁺). Nos sistemas de detecção de hormônios, o produto final é uma proteína quinase ativada que regula alguns processos celulares pela fosforilação de uma proteína crítica àquele processo. Nos neurônios sensoriais, o resultado é uma alteração no potencial de membrana e um consequente sinal elétrico que passa a um outro neurônio na via, conectando a célula sensorial ao cérebro.

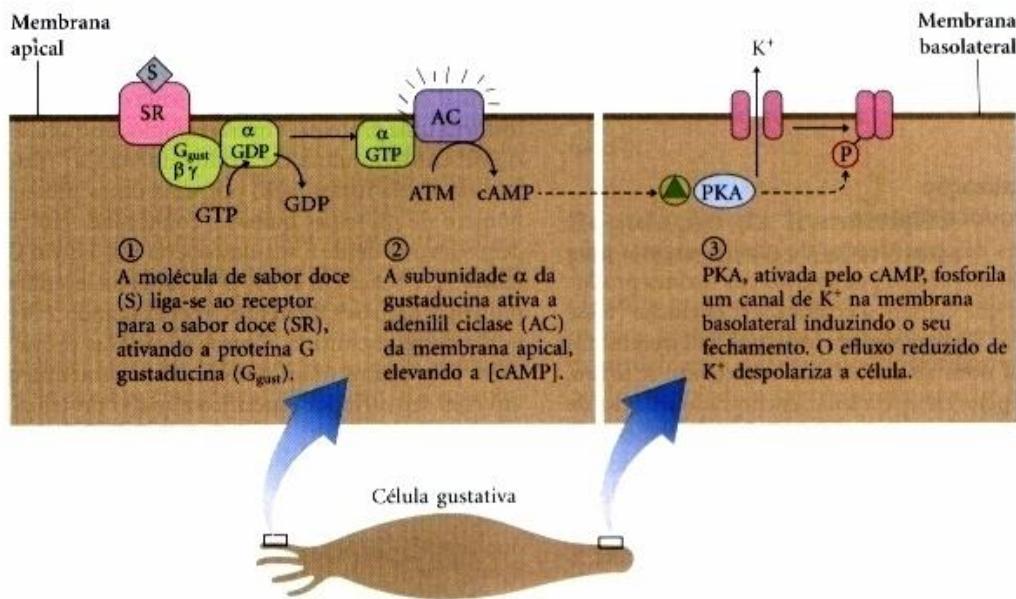


Figura 13-26 – Mecanismo de transdução para o sabor doce.

Tabela 13-7 – Alguns sinais transduzidos pela proteína G acoplada aos receptores serpenteantes

Acetilcolina (muscarínico)	Hormônio foliculo-estimulante (FSH)	Ocitocina
Adenosina	Ácido γ -aminobutírico (GABA)	Fator ativador de plaquetas
Angiotensina	Glucagon	Prostaglandinas
ATP (extracelular)	Glutamato (metabotrópico)	Secretina
Bradicinina	Hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH)	Serotonina
Calcitonina	Histamina	Somatostatina
Canabinóides	Leucotrienos	Sabores
Catecolaminas	Luz	Tirotropina
Colecistocinina	Hormônio luteinizante (LH)	Hormônio liberador da tirotropina (TRH)
Fator de liberação da corticotrofina (CRF)	Melatonina	Peptídeo intestinal vasoativo
AMP cíclico (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	Odorantes	Vasopressina
Dopamina	Opiôides	Fatores de conjugação de leveduras
Endotelina		

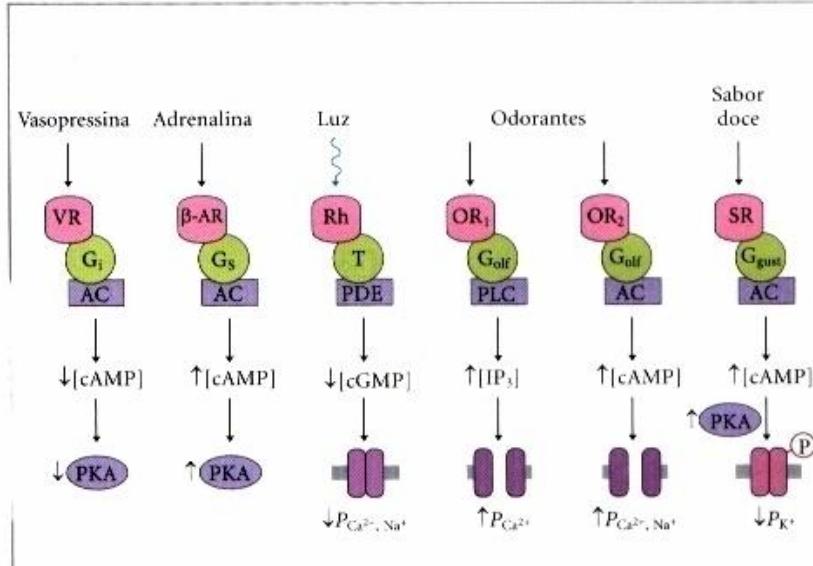


Figura 13-27 – Características comuns dos sistemas de sinalização que detectam hormônios, luz, odores e sabores. Receptores serpenteantes fornecem a especificidade ao sinal, e sua interação com as proteínas G respondem pela amplificação do sinal. As proteínas G heterotriméricas ativam as enzimas efetoras: a adenilil ciclase (AC), a fosfolipase C (PLC) e as fosfodiesterases (PDE) que degradam o cAMP e o cGMP. Mudanças nas concentrações dos mensageiros secundários (cAMP, cGMP, IP₃) levam a alterações das atividades enzimáticas por fosforilação ou alterações na permeabilidade (P) das membranas externas ao Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . A despolarização ou a hiperpolarização resultante na célula sensorial (o sinal) é passada através de circuitos de neurônios aos centros sensoriais no cérebro. Nos casos mais bem estudados, a dessensibilização inclui a fosforilação do receptor e a ligação de uma proteína (arrestina) que interrompe as interações receptor-proteína G. (VR representa o receptor da vasopressina; as abreviações dos outros receptores e das proteínas G são idênticas áquelas usadas anteriormente.)

Todos esses sistemas são auto-inativantes. O GTP ligado é convertido em GDP pela atividade GTPase intrínseca das proteínas G, freqüentemente aumentada pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs) ou proteínas RGS ("regulators of G-protein signaling").

A ruptura da sinalização da proteína G provoca doença

Estudos bioquímicos das transduções de sinal levaram a uma melhor compreensão dos efeitos patológicos das toxinas produzidas pelas bactérias que causam a cólera e a coqueluche (tosse comprida). Ambas as toxinas são enzimas que interferem nas transduções de sinal normais no animal hospedeiro. A toxina da cólera, secretada pelo *Vibrio cholerae*, encontrado na água de beber contaminada, catalisa a transferência da ADP-ribose do NAD⁺ para a subunidade α da G_s (Fig. 13-28), bloqueando sua atividade GTPase e, portanto, tornando G_s permanentemente ativada. Isso resulta na ativação contínua da adenilil ciclase das células epiteliais do intestino e a [cAMP] cronicamente alta, o que desencadeia a secreção continuada de Cl⁻, HCO₃⁻ e água na luz intestinal. A perda de eletrólitos e a desidratação resultante são as principais doenças na cólera. A toxina pertussis, produzida pela *Bordetella pertussis*, catalisa a ADP-ribosilação da G_i, prevenindo o deslocamento do GDP pelo GTP e bloqueando a inibição da adenilil ciclase pela G_i. Esse defeito produz dois dos sintomas da tosse comprida: hipersensibilidade aos histamínicos e diminuição da glicose sangüínea.

A Fosforilação como um Mecanismo Regulatório

Um denominador comum nas transduções de sinal é a regulação final da atividade de uma proteína quinase, uma enzima que fosforila uma proteína. Vimos exemplos de quinases ativadas por cGMP, cAMP, insulina, Ca²⁺/calmodulina, Ca²⁺/diacilglicerol, Ras ativada e pela fosforilação por uma outra proteína quinase. O número de proteínas quinases conhecidas tem crescido consideravelmente desde a sua descoberta por Edwin G. Krebs e Edmond H. Fischer em 1959. O genoma da levedura codifica 120 proteínas quinases diferentes, representando 2% de todo o genoma deste organismo. Outros eucariotos provavelmente possuem pelo menos todos esses genes de proteínas quinases, cada um com seu ativador específico e sua(s) proteína(s)-alvo.



Edwin G. Krebs



Edmond H. Fischer

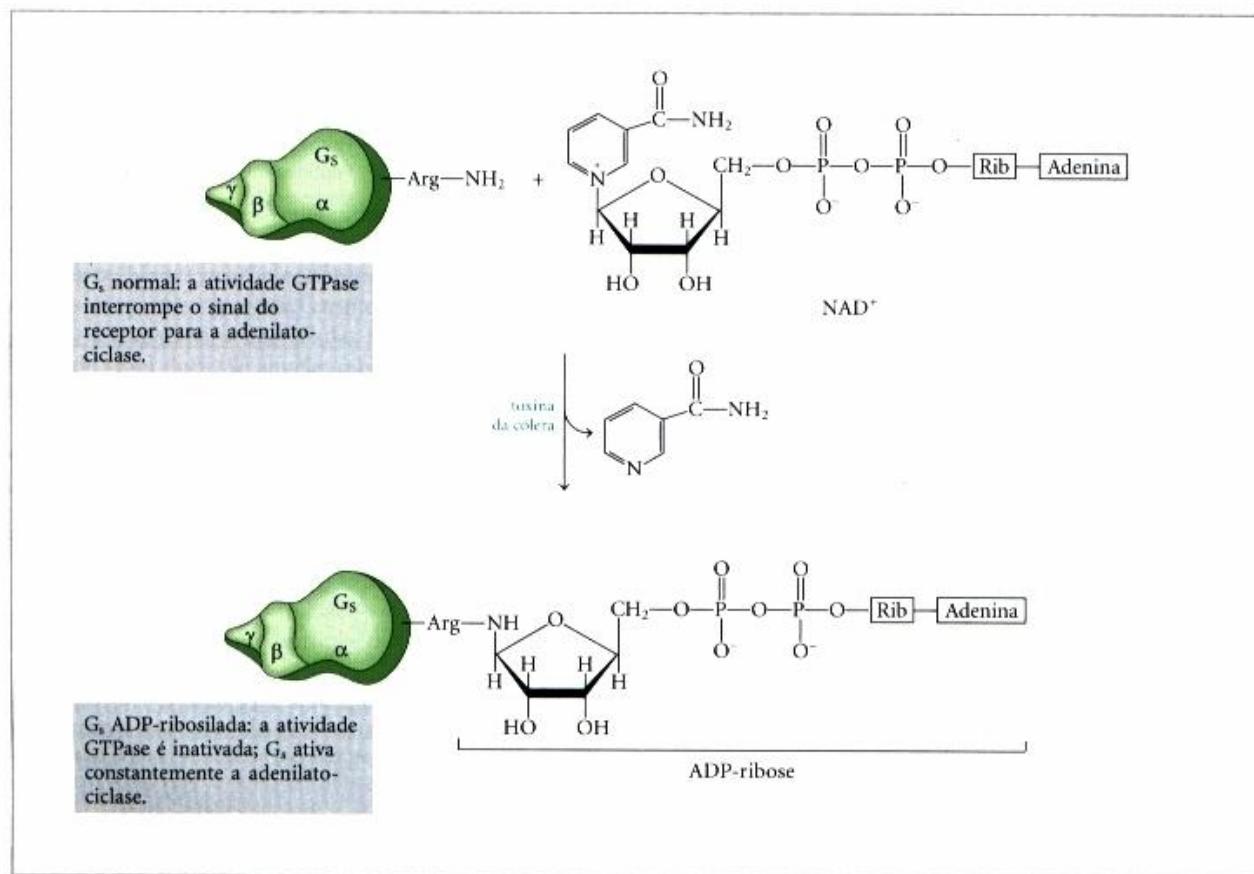


Figura 13-28 – Toxinas produzidas por bactérias que causam a cólera e a coqueluche (pertussis). Estas toxinas são enzimas que catalisam a transferência da porção ADP-ribose do NAD⁺ a um resíduo de Arg das proteínas G. G, no caso da cólera (como mostrado aqui) e G_i na coqueluche. As proteínas G assim modificadas falham em responder aos estímulos hormonais normais. A patologia de ambas as doenças resulta da regulação defeituosa da adenilil ciclase e da superprodução do cAMP.

A localização das proteínas quinases e fosfatases afetam a especificidade das proteínas-alvo

Vários tipos de proteínas quinases e fosfatases estão localizados em regiões subcelulares específicas, mantidas próximas a seus substratos protéicos por uma proteína-alvo. Por exemplo, as enzimas que catalisam a regulação de síntese e degradação do glicogênio no músculo esquelético estão fortemente associadas com os grânulos de glicogênio. A proteína fosfatase-1 (PP-1) é parte da maquinaria regulatória; ela remove fosfatos de resíduos da P-Ser e da P-Thr da glicogênio sintase e da fosforilase quinase, revertendo os efeitos regulatórios da proteína quinase dependente de cAMP, PKA. A PP-1 possui duas subunidades: a subunidade catalítica (C) e a subunidade R_G , que liga a subunidade C ao grânulo de glicogênio, garantindo acesso fácil aos substratos que a PP-1 desfosforila.

As subunidades-alvo mantêm também algumas proteínas quinases próximas a seus substratos. A subunidade R da PKA (Fig. 13-14) associa-se fortemente a uma família de proteínas-alvo chamadas AKAPs (proteínas ancoradouras de uma quinase; “*a kinase anchoring proteins*”), cada uma ancorando PKA a uma região específica da célula — mitocôndria, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, matriz nuclear ou grânulos secretórios — presumivelmente em grande proximidade aos substratos protéicos críticos da PKA. Tal localização da PKA, combinada com a produção de gradientes espaciais na [cAMP] pela localização das atividades da adenilil ciclase e da fosfodiesterase, podem fornecer um mecanismo para a regulação separada de vários substratos da PKA na mesma célula. As várias

isoenzimas da proteína quinase C são também localizadas diferencialmente por meio da sua associação com proteínas âncoras chamadas de RACKs (receptores para a quinase C ativada; “*receptors for activated C kinase*”) ou PICKs (proteínas que interagem com a quinase C; “*proteins that interact with C kinase*”).

Regulação da Transcrição por Hormônios Esteróides

O grande grupo de esteróides, ácido retinóico (retinóide) e hormônios tireóideos exerce seus efeitos por um mecanismo fundamentalmente diferente dos outros hormônios: eles agem no núcleo alterando a expressão gênica. Por essa razão discutiremos seu modo de ação em detalhes no Capítulo 28, junto com os outros mecanismos que regulam a expressão gênica. Aqui ofereceremos uma rápida visão geral.

Os hormônios esteróides (estrógeno, progesterona e cortisol, por exemplo) são muito hidrofóbicos para se dissolver facilmente no sangue, eles são transportados por proteínas transportadoras específicas do seu local de liberação até seus tecidos-alvo. Nas células-alvo, esses hormônios passam através da membrana plasmática por simples difusão e se ligam a proteínas receptoras específicas no núcleo (Fig. 13-29). A ligação do hormônio desencadeia alterações na conformação das proteínas receptoras de tal forma que elas se tornam capazes de interagir com seqüências regulatórias específicas no DNA chamadas de elementos da resposta hormonal (HREs — “*hormone response*

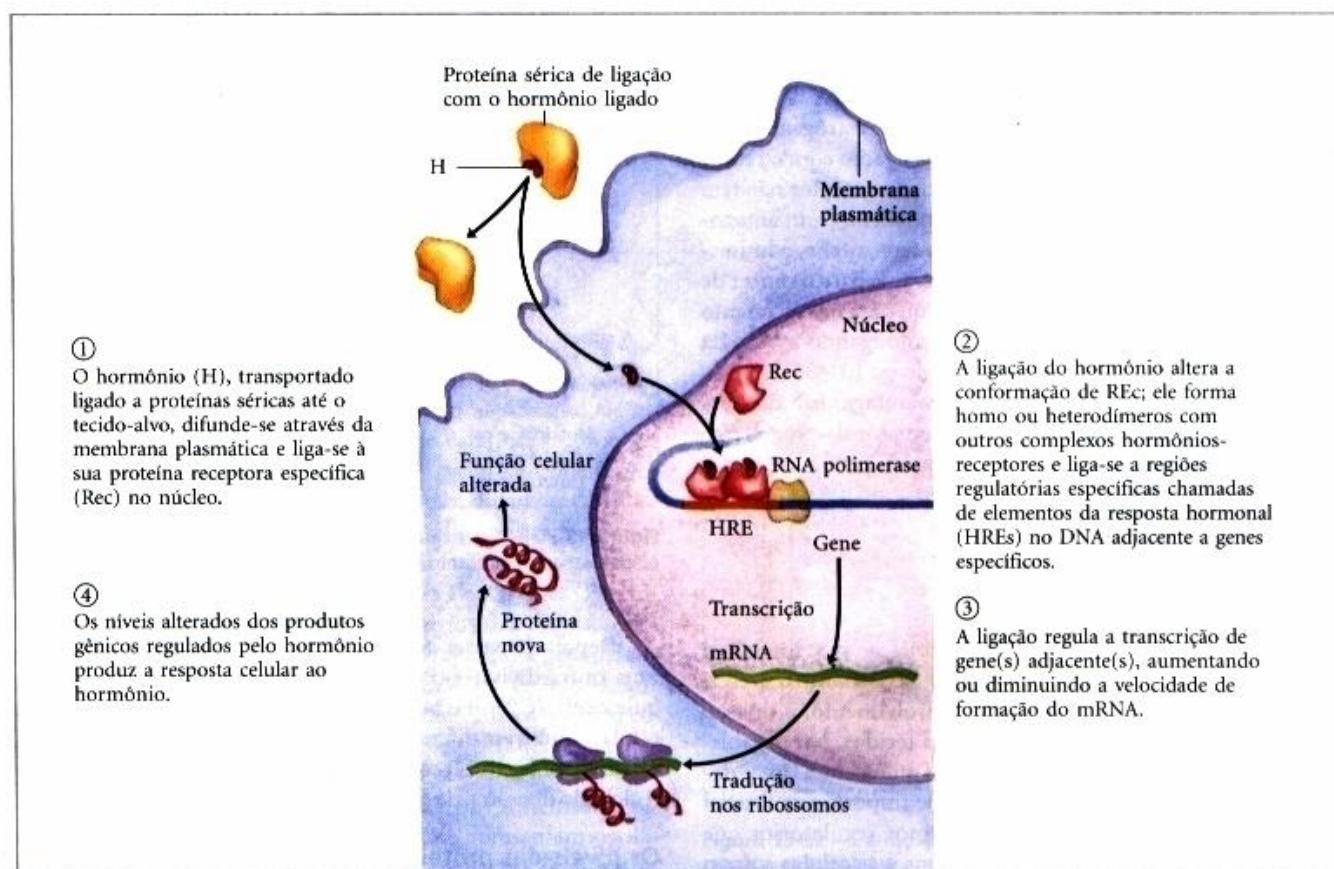
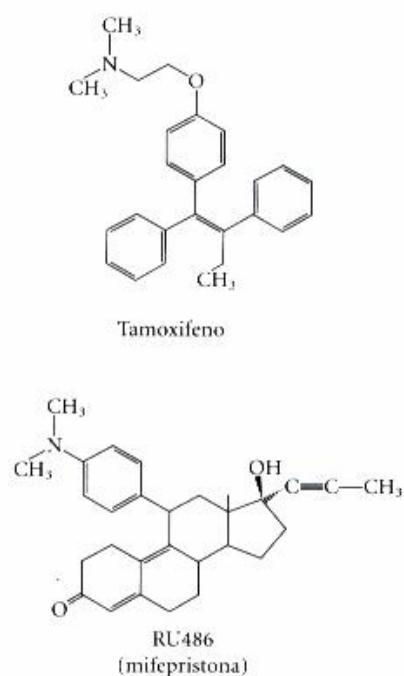


Figura 13-29 – Mecanismos gerais pelos quais os hormônios esteróides, tireóideos, retinóides e a vitamina D regulam a expressão gênica. Os detalhes da transcrição e da síntese protéica são discutidos nos Capítulos 26 e 27.

elements”), alterando dessa forma a expressão gênica (veja Fig. 28-33). O complexo hormônio ligado ao receptor pode ou aumentar ou suprimir a expressão de genes específicos adjacentes aos HREs. Horas ou dias são requeridos para esses reguladores terem seu efeito completo — o tempo requerido para as alterações na síntese de RNA e subsequente síntese protéica se tornam evidentes no metabolismo alterado.



A especificidade da interação esterol-receptor é explorada no uso da droga tamoxifeno para tratar o câncer da mama. Em alguns tipos de câncer da mama, a divisão das células cancerosas depende da presença continuada do hormônio estrógeno. O tamoxifeno compete com o estrógeno para a ligação com o receptor do estrógeno, mas o complexo tamoxifeno-receptor não tem nenhum efeito na expressão gênica; o tamoxifeno é um antagonista do estrógeno. Consequentemente, o tamoxifeno, administrado após cirurgia ou durante a quimioterapia para o câncer de mama dependente de estrógeno, diminui ou pára o crescimento das células cancerosas remanescentes, prolongando a vida da paciente. Um outro análogo esteróide, a droga RU486, é usado para interromper gravidezes iniciais. Um antagonista do hormônio progesterona, RU486, liga-se ao receptor da progesterona e bloqueia as ações do hormônio essenciais para a implantação do ovo fecundado no útero.

Regulação do Ciclo Celular por Proteínas Quinases

Um dos mais dramáticos papéis da fosforilação de proteínas é a regulação do ciclo celular dos eucariotos. Durante o crescimento embrionário e o posterior desenvolvimento, a divisão celular ocorre em virtualmente todos os tecidos. No organismo adulto, a maioria dos tecidos torna-se quiescente. Uma “decisão” da célula de se dividir ou não é de importância crucial para o organismo. Quando os mecanismos regulatórios que limitam a divisão celular estão defeituosos e as células sofrem divisões não reguladas, o resultado é catastrófico — o câncer. A divisão celular apropriada requer uma seqüência de eventos bioquímicos precisamente ordenados que garanta a cada célula filha um complemento inteiro das moléculas requeridas para

a vida. Investigações sobre o controle da divisão celular em diversas células eucarióticas têm revelado mecanismos regulatórios universais. Proteínas quinases e fosforilação de proteínas são centrais ao mecanismo temporal que determina a entrada na divisão celular e garante a passagem ordenada por esses eventos.

O ciclo celular possui quatro etapas

A divisão celular nos eucariotos ocorre em quatro etapas bem definidas (Fig. 13-30). Na fase S (síntese), o DNA é replicado para produzir cópias para ambas as células filhas. Na fase G2 (G indica o intervalo entre as divisões; do inglês, “gap”), novas proteínas são sintetizadas e a célula dobra aproximadamente em tamanho. Na fase M (mitose), o envelope nuclear materno se degrada, os cromossomos pareados são puxados para os pólos opostos da célula, cada conjunto dos cromossomos filhos é envolto por um envelope nuclear formado de novo, e a citocinese pinça a célula no meio, produzindo duas células filhas. Em tecidos embrionários ou em proliferação rápida, cada célula filha se divide novamente, mas apenas após um período de espera (G1). Em células animais em cultura, o processo inteiro leva cerca de 24 horas.

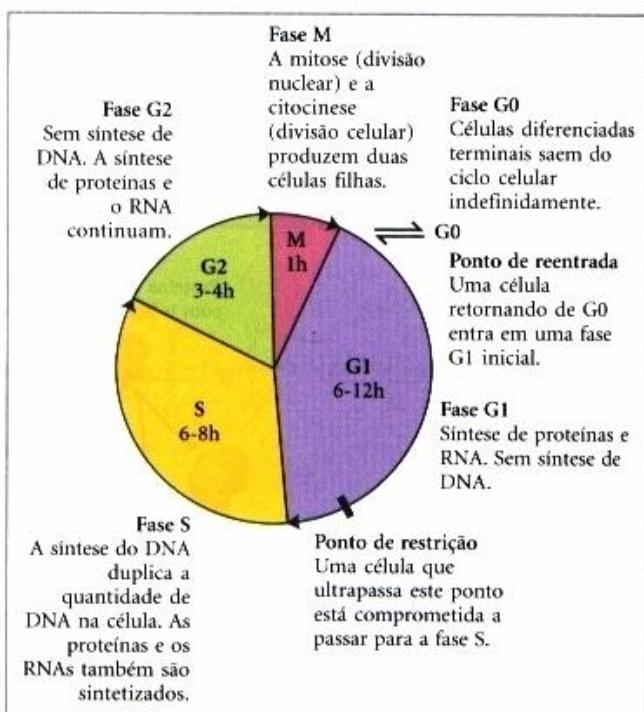


Figura 13-30 – Ciclo celular eucariótico. Os tempos para as quatro etapas variam; entretanto, os mostrados são típicos.

Depois de passar pela mitose e G1, uma célula ou continua uma outra divisão ou cessa de dividir, entrando em uma fase quiescente (G0) que pode durar horas, dias ou toda a vida da célula. Células em diferenciação terminal estão na fase G0. Quando uma célula em G0 começa a se dividir novamente, ela reinicia o ciclo de divisão pela fase G1.

Os níveis das proteínas quinases dependentes de ciclinas oscilam

O tempo no ciclo celular é controlado por uma família de proteínas quinases com atividades que mudam em resposta aos sinais celulares. Fosforilando proteínas específicas em intervalos de

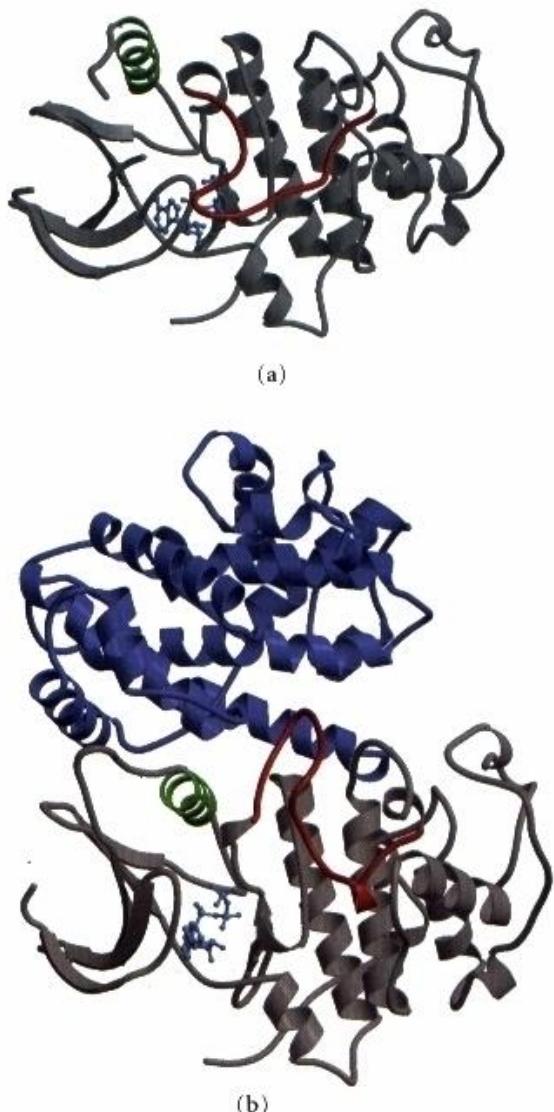


Figura 13-31 – Ativação da proteína quinase dependente de ciclina (CDKs) por meio de ciclina e fosforilação. CDKs, uma família de enzimas relacionadas, são ativas apenas quando associadas às ciclinas, uma outra família de proteínas. A partir da estrutura cristalina da CDK2 com e sem ciclina, a base para essa ativação é evidente. Sem a ciclina (a), a CDK2 dobra-se de tal forma que um segmento, a alça T (vermelho), obstrui o sítio de ligação para os substratos protéicos e, portanto, inibe a atividade da proteína quinase. O sítio de ligação para o ATP (azul) está também perto da alça T. A ligação da ciclina (b) força mudanças conformacionais que movem a alça T para fora do sítio ativo e reorienta a hélice aminoterinal (verde) trazendo um dos resíduos críticos para a catálise (Glu⁵¹) para dentro do sítio ativo. (c) A fosforilação de um resíduo de Thr (modelo espaço-cheio, marrom) na alça T produz um resíduo carregado negativamente que é estabilizado pela interação com três resíduos de Arg (modelo bola-e-bastão, vermelho), mantendo a CDK na sua conformação ativa.

tempo precisos, essas proteínas quinases regem as atividades metabólicas da célula para produzir uma divisão celular ordenada. Essas quinases são heterodímeros com uma subunidade regulatória, as ciclinas, e uma subunidade catalítica, a proteína quinase dependente de ciclina (CDK — “cyclin-dependent protein kinase”). Na ausência da ciclina, a subunidade catalítica é virtualmente inativa. Quando a ciclina se liga, o sítio catalítico se abre, um resíduo essencial para a catálise torna-se acessível e a atividade da subunidade catalítica aumenta 10.000 vezes (Fig. 13-31). As células animais possuem pelo menos dez ciclinas diferentes (designadas como A, B, e assim por diante) e pelo menos oito quinases dependentes de ciclina (CDK1 até CDK8), que agem em várias combinações em pontos específicos no ciclo celular. As plantas também usam uma família de CDKs para regular sua divisão celular.

Em uma população de células animais que sofrem uma divisão sincrônica, algumas atividades CDKs apresentam oscilações impressionantes (Fig. 13-32). Essas oscilações são o resultado de quatro mecanismos de regulação sobre a atividade CDK: fosforilação ou desfosforilação da CDK, degradação controlada da subunidade ciclina, síntese periódica das CDKs e ciclinas, e ação de proteínas inibidoras específicas das CDKs.

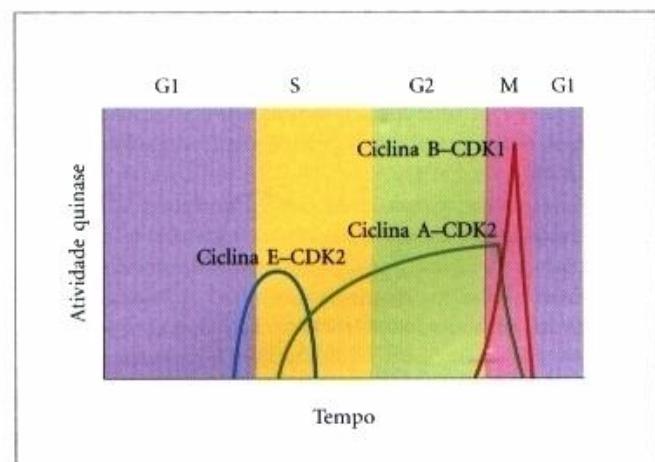


Figura 13-32 – Variações nas atividades das CDKs específicas durante o ciclo celular em animais. A atividade da ciclina E-CDK2 atinge um máximo próximo dos limites das fases G1-S, onde a enzima ativa desencadeia a síntese das enzimas requeridas para a síntese do DNA (veja Fig. 13-35). A ciclina A-CDK eleva-se durante as fases S e G2, caindo depois abruptamente na fase M, quando a ciclina B-CDK atinge o máximo.

Regulação das CDKs pela fosforilação. A atividade da CDK é impressionantemente afetada pela fosforilação e desfosforilação de dois resíduos críticos na proteína (Fig. 13-33a). A fosforilação da Tyr¹⁵ próxima da extremidade aminoterinal torna a CDK2 inativa; o resíduo (P)-Tyr está no sítio de ligação do ATP na quinase, e a carga negativa do fosfato bloqueia a entrada do ATP. Uma fosfatase específica desfosforila este resíduo (P)-Tyr, permitindo a ligação do ATP. A fosforilação da Thr¹⁶⁰ na “alça T” da CDK, catalisada pela quinase ativadora da CDK, forçá a alça T para fora da fenda de ligação do substrato, permitindo a ligação do substrato e a atividade catalítica.

Uma circunstância que desencadeia esse mecanismo de controle é a presença de quebras em uma fita simples do DNA, que leva à parada do ciclo celular em G2. Uma proteína quinase específica (chamada de Rad3 na levedura), que é ativada pelas quebras na fita simples do DNA, desencadeia uma cascata que leva à inativação da fosfatase que desfosforila a Tyr¹⁵ da CDK. A CDK permanece inativa e a célula fica parada em G2. A célula não se dividirá até que o DNA seja reparado e os efeitos da cascata sejam revertidos.

Degradação controlada da ciclina. A degradação proteolítica temporalmente precisa e altamente específica das ciclinas mitóticas regula a atividade CDK durante todo o ciclo celular. O progresso ao longo da mitose requer primeiro a ativação e depois a destruição das ciclinas A e B, que ativam a subunidade catalítica da CDK da fase M. Essas ciclinas contêm próximo de sua extremidade aminoterinal a seqüência Arg–Thr–Ala–Leu–Gly–Asp–Ile–Gly–Asn, a “caixa de destruição” que as marcam para a degradação. (Este uso do termo “caixa” deriva da prática comum, na esquematização da seqüência de um ácido nucléico ou proteína, de envolver dentro de uma caixa uma seqüência curta de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos com alguma função específica. Isso não implica nenhuma estrutura tridimensional.) Uma proteína que reconhece essa seqüência, chamada de DBRP (proteína reconhecedora da caixa de destruição; *“destruction box recognizing protein”*), inicia o processo de degradação da ciclina trazendo juntas a ciclina e uma outra proteína, a ubiquitina. A ciclina e a ubiquitina ativada são unidas covalentemente pela enzima ubiquitina ligase (Fig. 13-33b). Muitas outras moléculas de ubiquitina são anexadas, fornecendo o sinal para um complexo enzimático proteolítico, ou **proteassomo**, para degradar a ciclina.

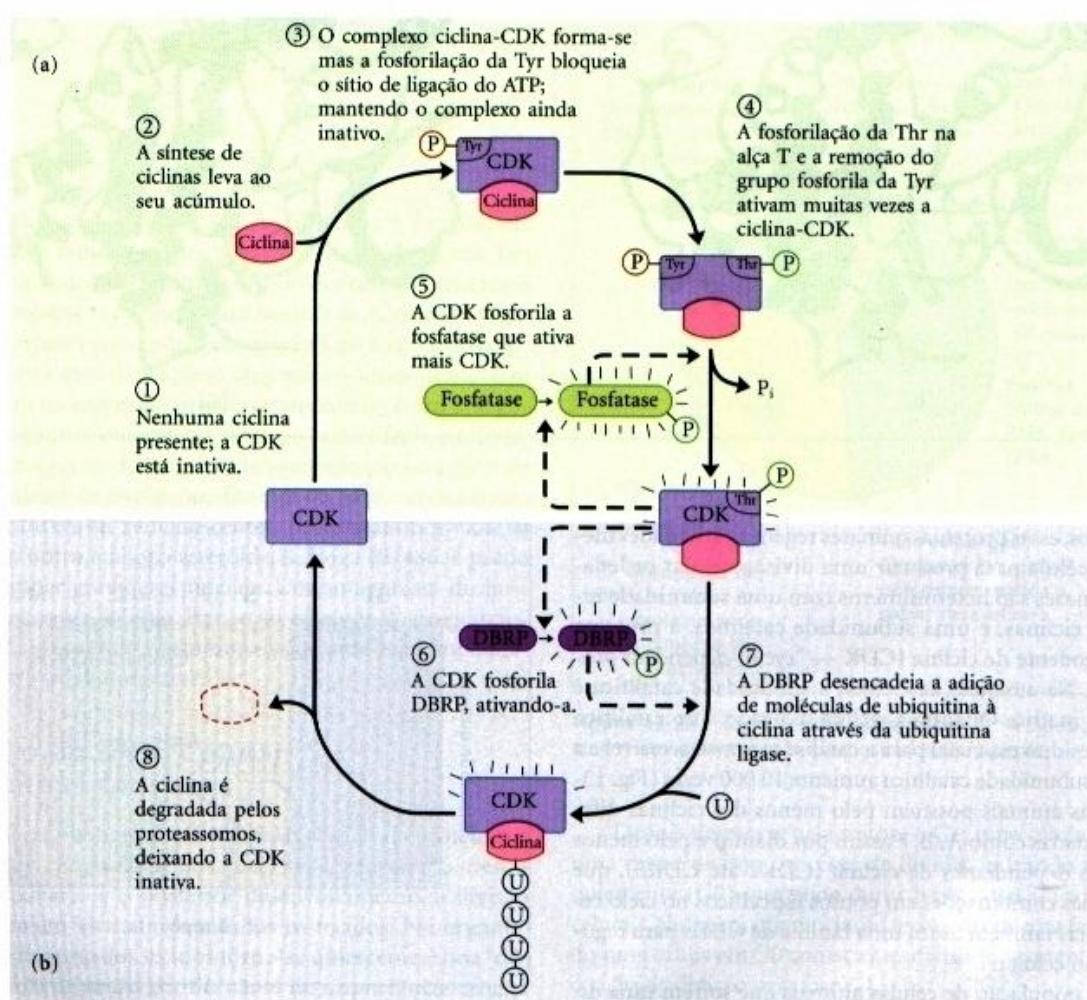


Figura 13-33 – Regulação da CDK pela fosforilação e proteólise. (a) A proteína quinase dependente de ciclina, ativada durante a mitose (a CDK da fase M), possui uma “alça T” que pode se dobrar no sítio de ligação do substrato. Quando um resíduo de Thr na alça T está fosforilado, a alça se move para fora do sítio de ligação do substrato, ativando a CDK muitas vezes. (b) O complexo ativo da CDK-cyclina desencadeia sua própria inativação pela fosforilação da DBRP (proteína reconhecedora da caixa de destruição). A DBRP e a ubiquitina ligase ligam então várias moléculas de ubiquitina (U) à ciclina, marcando-a para a destruição pelos proteassomos, complexo de enzimas proteolíticas.

O que controla o tempo da degradação da ciclina? Há um tipo de regulação em que o aumento da atividade CDK ativa a proteólise da ciclina. Como mostrado na Figura 13-33, a ciclina recentemente sintetizada se associa e ativa a CDK, que fosforila e ativa a DBRP. A DBRP ativa induz então a proteólise da ciclina. A diminuição da ciclina provoca a queda da atividade CDK, e a atividade da DBRP também cai por meio de lenta e constante defosforilação e inativação por uma DBRP fosfatase. O nível da ciclina é finalmente restaurado pela síntese de novas moléculas de ciclinas.

O papel da ubiquitina e os proteassomos não estão limitados à regulação da ciclina, como veremos no Capítulo 27, ambos estão também envolvidos na regulação da degradação das proteínas celulares, um processo fundamental para a economia doméstica celular.

A síntese regulada das CDKs e das ciclinas. O terceiro mecanismo de alteração da atividade CDK é a regulação da velocidade da síntese da ciclina ou da CDK ou de ambas. Por exemplo, a ciclina D, a ciclina E, a CDK2 e a CDK4 são sintetizadas apenas quando um fator de transcrição, E2F, estiver presente no núcleo para ativar a transcrição desses genes. A síntese do E2F é, por seu lado, regulada por sinais extracelulares tais como os fatores de crescimento e as citocinas (indutores da divisão celular), compostos julgados essenciais para divisão das células de mamíferos em cultura. Esses fatores de crescimento induzem a síntese de fatores nucleares específicos de transcrição, essenciais para a produção de enzimas da síntese do DNA. Os fatores de crescimento desencadeiam a fosforilação das proteínas Jun e Fos, fatores de transcrição que promovem a síntese de vários produtos gênicos, incluindo ciclinas, CDKs e E2F. E2F, por seu lado, controla a produção de várias enzimas essenciais para a síntese dos desoxirribonucleotídeos e do DNA, permitindo às células entrar na fase S (Fig. 13-34).

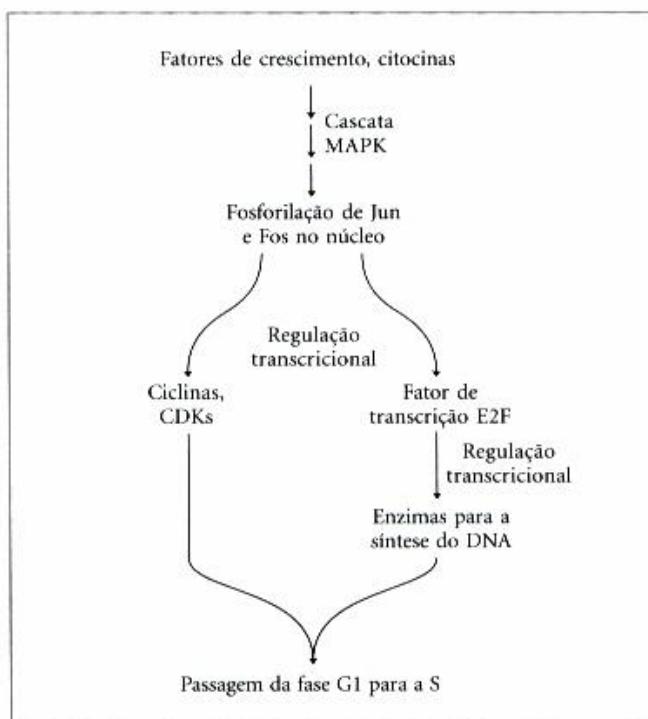


Figura 13-34 – Regulação da divisão celular pelos fatores de crescimento. A via dos fatores de crescimento até a divisão celular passa pelas cascatas de enzimas que ativam a MAPK (proteína quinase dependente de mitógenos, veja Fig. 13-7); da fosforilação dos fatores de transcrição nucleares, Jun e Fos; e da atividade do fator de transcrição E2F, que promove a síntese de várias enzimas essenciais para a síntese do DNA.

Inibição das CDKs. Finalmente, inibidores protéicos específicos ligam-se e inativam CDKs específicas. Uma dessas proteínas é a p21, que discutiremos a seguir.

Esses quatro mecanismos de controle modulam as atividades das CDKs específicas que, por sua vez, controlam se uma célula irá se dividir, diferenciar, tornar permanentemente quiescente ou iniciar um novo ciclo de divisões depois de um período de quiescência. Os detalhes da regulação do ciclo celular, tais como o número das diferentes ciclinas e quinases e as combinações em que elas atuam, diferem de organismo para organismo, entretanto, o mecanismo básico conservou-se na evolução de todas as células eucarióticas.

As CDKs regulam a divisão celular pela fosforilação de proteínas críticas

Examinamos como o controle da atividade da CDK é mantido, entretanto, como a atividade da CDK controla o ciclo celular? A lista de proteínas-alvo conhecidas, nas quais as CDKs agem, continua a crescer, e muito ainda permanece para ser conhecido. Entretanto, podemos ver um padrão geral, atrás da regulação da CDK, inspecionando o efeito das CDKs na estrutura da laminina, da miosina e na atividade da proteína retinoblastoma.

A estrutura do envelope nuclear é mantida em parte pela rede altamente organizada de filamentos intermediários, compostos da proteína laminina. A quebra da membrana nuclear, antes da segregação das cromátides filhas na mitose, é em parte devida à fosforilação da laminina pela CDK, que induz a despolarização dos filamentos da laminina.

Um segundo alvo da quinase é a maquinaria contrátil da actomiosina direcionada pelo ATP, que estreita uma célula em divisão em duas partes iguais durante a citocinese. Depois da divisão, a CDK fosforila uma pequena subunidade regulatória da miosina, provocando a dissociação da miosina dos filamentos de actina e inativando a maquinaria contrátil. A defosforilação subsequente permite a remontagem do aparelho contrátil para o próximo ciclo de citocinese.

Um terceiro, e muito importante substrato da CDK, é a proteína do retinoblastoma, pRb, que participa de um mecanismo que interrompe a divisão celular em G1, se uma lesão no DNA for detectada (Fig. 13-35). Assim chamada por ter sido descoberta em uma linhagem celular de tumor da retina, a pRb funciona em todos os tipos celulares regulando a divisão celular em resposta a uma variedade de estímulos. A pRb não-fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F, enquanto, ligado à pRb, o E2F não consegue promover a transcrição de um grupo de genes necessários para a síntese do DNA (os genes para a DNA polimerase α , a ribonucleotídeo redutase e outras proteínas). Nesse estado, o ciclo celular não consegue prosseguir de G1 para a fase S, a etapa que compromete uma célula à mitose e à divisão celular. O mecanismo de bloqueio pRb-E2F é aliviado quando a pRb for fosforilada pela ciclina E-CDK2, que ocorre em resposta a um sinal para que a divisão celular prossiga.

Quando uma lesão do DNA, como a quebra de uma fita simples, for detectada pela proteína p53, essa proteína age como um fator de transcrição que estimula a síntese da proteína p21, que inibe a atividade da proteína quinase ciclina E-CDK2. Na presença de p21, pRb permanece desfosforilada e ligada ao E2F, bloqueando a atividade desse fator de transcrição, e a célula fica parada em G1. Isso oferece tempo para a célula reparar o seu DNA antes de entrar na fase S, evitando portanto a transferência potencialmente desastrosa de um genoma defeituoso para uma ou ambas as células filhas.

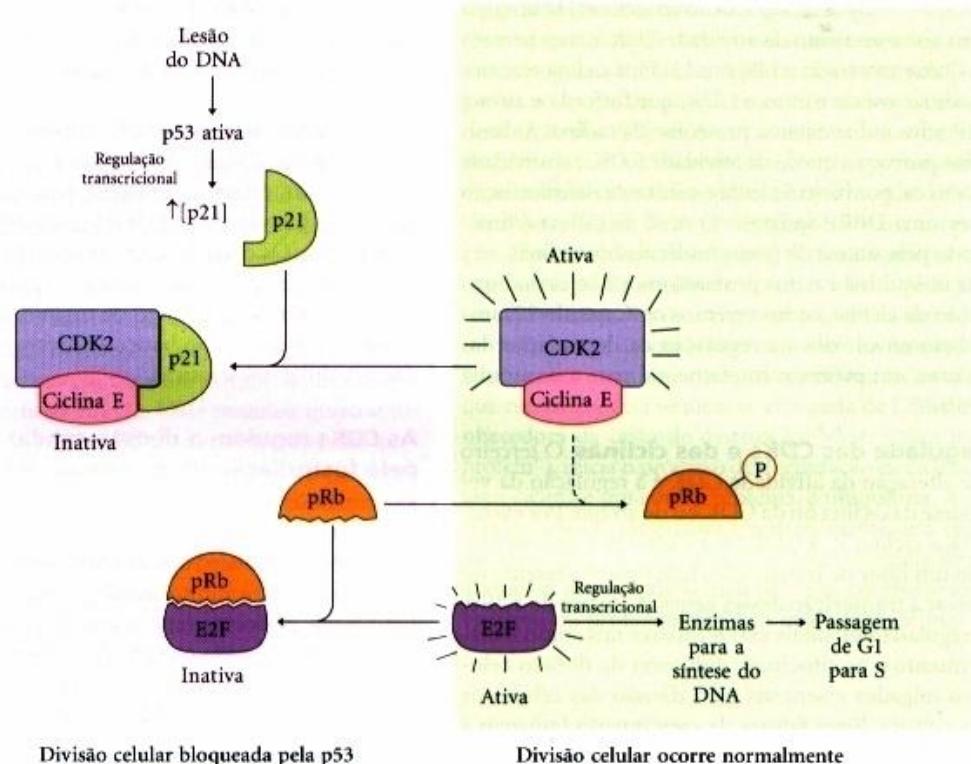


Figura 13-35 – Regulação da passagem entre G1 e S pela fosforilação da pRb. Quando a proteína retinoblastoma, pRb, está fosforilada, ela não consegue se ligar e inativar E2F, um fator de transcrição que promove a síntese das enzimas essenciais para a síntese do DNA. Se a proteína p53 detecta o DNA lesado, ela estimula a síntese da p21, que se liga e inibe a ciclina-CDK2, previnindo a fosforilação da pRb. A pRb não-fosforilada se liga e inativa o E2F, bloqueando a passagem de G1 para S até que o DNA tenha sido reparado.

Oncogenes, Genes Supressores de Tumores e Morte Celular Programada

Tumores e cânceres são resultado de uma divisão celular descontrolada. Normalmente, a divisão celular é regulada por uma família de **fatores de crescimento extracelulares**, proteínas que induzem as células em repouso a se dividir e, em alguns casos, a se diferenciar. Alguns fatores de crescimento estimulam a divisão apenas daquelas células com receptores apropriados, outros possuem um efeito mais geral. Defeitos na síntese, na regulação ou no reconhecimento dos fatores de crescimento podem levar ao câncer.

Os oncogenes são formas mutantes dos genes para as proteínas que regulam o ciclo celular

Os **oncogenes** foram originalmente descobertos em vírus causadores de tumores, depois, descobriu-se que eram muito semelhantes ou derivados de genes presentes em células hospedeiras animais, chamadas de **proto-oncogenes**, que codificam proteínas reguladoras do crescimento. Durante as infecções virais, a seqüência de DNA de um proto-oncogene é algumas vezes copiada pelo vírus e incorporada em seu genoma (Fig. 13-36). Em algum lugar, durante o ciclo da infecção viral, o gene pode tornar-se defeituoso por truncamento ou mutação. Quando esse oncogene viral é expresso em sua célula hospedeira durante uma infecção subsequente, a proteína anormal interfere na regulação do crescimento celular, resultando às vezes em um tumor.

Os proto-oncogenes podem tornar-se oncogenes sem um intermediário viral. Rearranjos cromossômicos, agentes químicos e radiação estão entre os fatores que podem causar mutações oncogênicas. As mutações que produzem os oncogenes

são geneticamente dominantes; se qualquer um dos pares cromossomos contém um gene defeituoso, esse produto gênico envia o sinal “dividir”, o que levará a um tumor. O defeito oncogênico pode estar em qualquer uma das proteínas envolvidas na comunicação do sinal “dividir”. Conhecemos oncogenes que são proteínas secretoras, fatores de crescimento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G e proteínas quinases) e fatores de transcrição nuclear que controlam a expressão de genes essenciais para a divisão celular (Jun, Fos).

Alguns oncogenes codificam receptores de superfície com sítios de ligação ao sinal defeituosos ou ausentes, de modo que a atividade da tirosina quinase seja desregulada. Por exemplo, a proteína ErbB é essencialmente idêntica ao receptor normal para o fator de crescimento epidérmico (EGF), exceto pelo fato de que ErbB não possui o domínio aminoterminal que normalmente se liga ao EGF (Fig. 13-37) e consequentemente envia o sinal para se dividir, estando o EGF presente ou não. Uma variante do Erb, o produto do oncogene erbB2 (para uma explicação do uso de abreviações em nomear genes e seus produtos, veja Capítulo 25), é comumente associada com os cânceres do epitélio glandular na mama, estômago e ovário.

Formas mutantes da proteína G Ras são comuns nas células tumorais. O oncogene *ras* codifica uma proteína com sítio de ligação ao GTP normal mas sem atividade GTPase. A proteína mutante Ras está, portanto, sempre em sua forma ativada (ligada ao GTP), independentemente dos sinais vindos através do receptor normal. O resultado pode ser o crescimento desregulado. Mutações em *ras* estão associadas com 30 a 50% dos carcinomas do pulmão e colo e mais de 90% dos carcinomas pancreáticos.

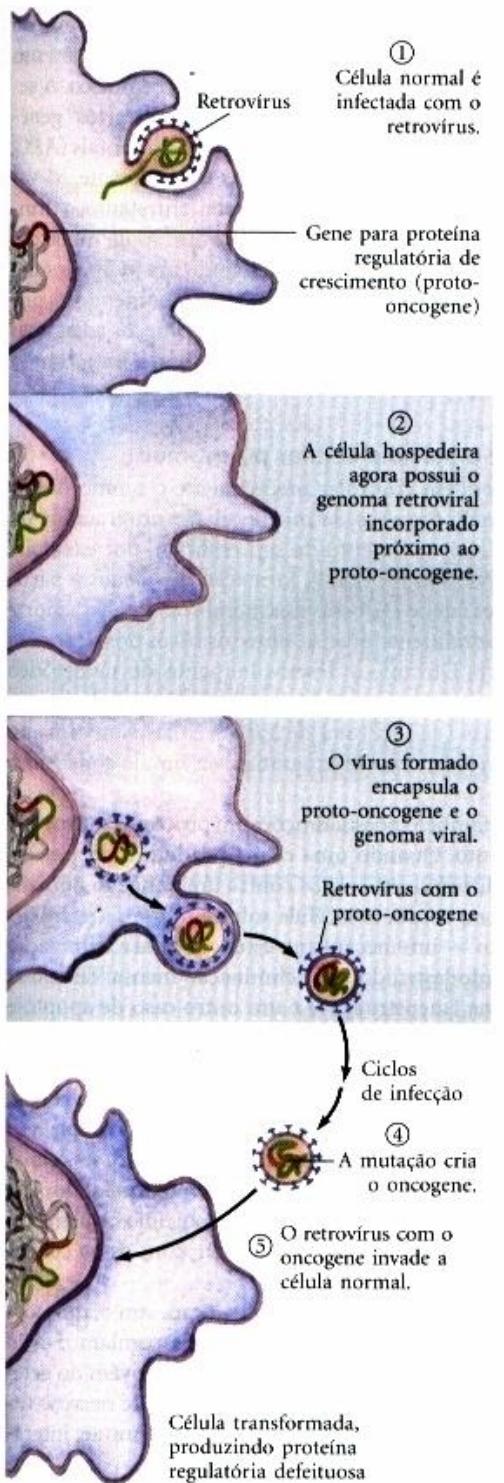


Figura 13-36 – Conversão de um gene regulatório em um oncogene viral. ① Uma célula normal é infectada por um retrovírus (Capítulo 26), que ② insere seu próprio genoma dentro do cromossomo da célula hospedeira, próximo do gene para uma proteína regulatória (o proto-oncogene). ③ As partículas virais liberadas da célula infectada algumas vezes "capturam" um gene hospedeiro, neste caso um proto-oncogene. ④ Durante vários ciclos de infecção, ocorre uma mutação no proto-oncogene viral, convertendo-o em um oncogene. ⑤ Quando o vírus subsequenteamente infecta uma célula, ele introduz o oncogene dentro do DNA da célula. A transcrição do oncogene leva à produção de uma proteína regulatória defeituosa que continuamente oferece o sinal para a divisão celular, sobrepondo os mecanismos regulatórios normais. As células do hospedeiro infectadas com os vírus contendo o oncogene, portanto, sofrem uma divisão celular não regulada — elas formam tumores. Os proto-oncogenes podem também sofrer mutações em oncogenes sem a intervenção de um retrovírus, como descrito no texto.

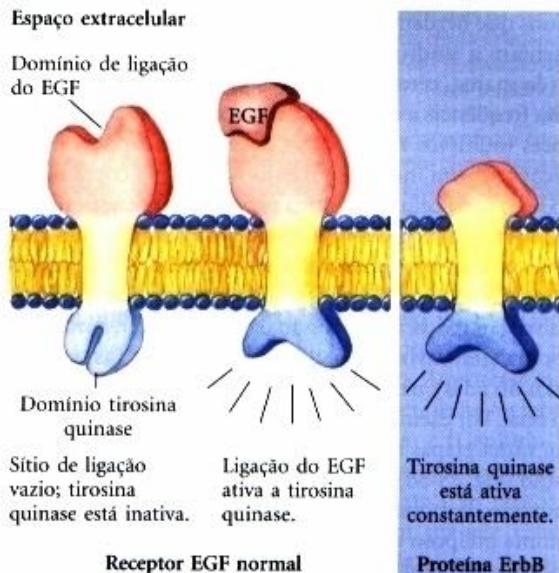


Figura 13-37 – Oncogenes que codificam o receptor EGF defeituoso. O produto do oncogene erbB (a proteína ErbB) é uma versão truncada do receptor normal para o fator de crescimento epidérmico (EGF). Seu domínio intracelular possui a estrutura normalmente induzida pela ligação do EGF, entretanto, a proteína não possui o sítio de ligação extracelular para o EGF. Não regulada pelo EGF, a ErbB sinaliza continuamente para a divisão celular.

Defeitos em genes supressores de tumores removem as restrições normais na divisão celular

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que normalmente restringem a divisão celular. Mutação em um ou mais desses genes pode levar à formação tumoral. O crescimento desregulado devido a genes supressores tumorais defeituosos, diferentemente daqueles devidos aos oncogenes, é geralmente recessivo. Uma pessoa que herda uma cópia correta e uma cópia defeituosa não estará doente, mas cada célula no corpo dessa pessoa terá uma cópia defeituosa do gene. Se qualquer uma dessas 10^{12} células somáticas subsequentemente possuir uma mutação na cópia boa, um tumor poderá crescer a partir daquela célula com dupla mutação. Mutações em ambas as cópias dos genes para pRb, p53 ou p21 produzirão células em que a restrição normal à divisão celular está ausente e termina com a formação tumoral.

O retinoblastoma é um câncer da retina que ocorre em crianças que possuem dois alelos Rb defeituosos. Crianças muito jovens que desenvolvem o retinoblastoma, comumente, possuem tumores múltiplos em ambos os olhos. Cada tumor é derivado de uma única célula da retina que tenha sofrido uma mutação na cópia boa do gene Rb. (Um feto com dois alelos mutantes em cada célula não é viável.) Pacientes com retinoblastoma também possuem uma alta incidência de cânceres de pulmão, próstata e mama.

Um evento bem menos comum é aquele de uma pessoa nascida com duas cópias boas de um gene que terá duas mutações independentes no mesmo gene, na mesma célula, mas isso ocorre. Alguns indivíduos desenvolvem retinoblastomas mais tarde na infância, usualmente com apenas um tumor em um dos olhos. Esses indivíduos presumivelmente nasceram com duas cópias boas do Rb em todas as células, mas tiveram mutações em ambos os genes Rb em uma única célula da retina, levando a um tumor.

Mutações no gene para a p53 também causam tumores; em mais de 90% dos carcinomas das células escamantes cutâneas humanas (cânceres de pele) e em cerca de 50% de todos os outros cânceres humanos, a p53 está defeituosa. Casos raros de in-

divíduos que herdam uma cópia defeituosa da *p53* comumente apresentam a síndrome Li-Fraumeni, na qual cânceres múltiplos (da mama, cérebro, osso, sangue, pulmão e pele) ocorrem em alta freqüência e em uma idade precoce. A explicação para os tumores múltiplos nesses casos é a mesma explicação para as mutações *Rb*: um indivíduo nascido com uma cópia defeituosa da *p53* em cada célula somática provavelmente sofrerá uma segunda mutação na *p53*, em mais de uma célula na sua vida.

O efeito das mutações nos oncogenes e nos genes supressores tumorais não é uma resposta tudo ou nada. Em alguns cânceres, talvez em todos, a progressão de uma célula normal para um tumor maligno envolve o acúmulo de mutações (às vezes durante várias décadas), nenhuma das quais sozinha é responsável pelo efeito final. Por exemplo, o desenvolvimento do câncer colorretal possui várias etapas reconhecidas, cada uma associada com uma mutação (Fig. 13-38). Se uma célula epitelial normal no colo sofre mutação de ambas as cópias do gene supressor tumoral *APC* (adenoma poliposo do colo; "adenomatous polyposis coli"), ele começará a se dividir mais rápido do que as células normais e produzirá um clone de si próprio, um pólipos benigno (adenoma inicial). Por razões ainda não conhecidas, a mutação *APC* levará à instabilidade cromossómica, e regiões inteiras de um cromossomo são perdidas ou rearranjadas durante a divisão celular. Essa instabilidade pode levar a uma outra mutação, comumente em *ras*, que converte o clone em um adenoma intermediário. Uma terceira mutação (provavelmente no gene supressor tumoral

DCC) leva ao adenoma final. Apenas quando ambas as cópias da *p53* se tornam defeituosas é que essa massa celular se tornará um carcinoma, um câncer maligno que coloca a vida em risco. A sequência inteira, portanto, requer pelo menos sete "acertos" genéticos: dois em cada um dos três genes supressores tumorais (*APC*, *DCC* e *p53*) e um no proto-oncogene *ras*. Provavelmente, há vários outros caminhos para o câncer colorretal, entretanto, o princípio de que a malignidade máxima resulta apenas de mutações múltiplas, provavelmente, se manterá. Quando um pólipos for detectado na etapa de adenoma inicial e as células contendo as primeiras mutações forem removidas cirurgicamente, os adenomas tardios e os carcinomas não se desenvolverão, daí a importância da detecção inicial.

A apoptose é o suicídio celular programado

Muitas células podem controlar precisamente o tempo da sua própria morte pelo processo da morte celular programada ou apoptose. No desenvolvimento de um embrião, por exemplo, algumas células devem morrer. A formação dos dedos a partir das extremidades curtas e grossas dos membros envolve a morte de células, temporalmente precisa, entre os ossos dos dedos em desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, a partir de um ovo fecundado, exatamente 131 células (de um total de 1.090 células somáticas no embrião) devem sofrer morte programada a fim de construir o corpo adulto.

A apoptose também possui funções em processos outros que o desenvolvimento. Quando uma célula produtora de anticorpos estiver produzindo anticorpos contra um antígeno normalmente presente no corpo, esta célula sofrerá morte programada na glândula timo — um mecanismo essencial para a eliminação de anticorpos autodestruidores. A eliminação mensal de células da parede uterina (menstruação) é um outro caso de apoptose mediando a morte celular normal. Algumas vezes o suicídio celular não é programado, mas ocorre em resposta a circunstâncias biológicas que ameaçam o resto do organismo. Por exemplo, uma célula infectada por vírus, que morre antes de completar o ciclo infeccioso, previne a propagação do vírus para as células vizinhas. Vários estresses como calor, hiperosmolaridade, luz UV e irradiação gama também desencadeiam o suicídio celular, presumivelmente o organismo estará melhor com essas células mortas do que vivas e aberrantes.

Os mecanismos regulatórios que desencadeiam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular. O sinal para o suicídio freqüentemente provém do exterior, por meio do receptor da superfície. O fator de necrose tumoral (TNF), produzido pelas células do sistema imune, interage com as células por meio de receptores específicos para o TNF. Esses receptores possuem sítios de ligação ao TNF na face externa da membrana plasmática e um "domínio morte" de cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que passa o sinal de autodestruição através da membrana às proteínas citosólicas como o TRADD (domínio morte associado ao receptor do TNF — "TNF receptor-associated death domain") (Fig. 13-39). Um outro receptor, Fas, possui um domínio morte semelhante que permite que ele interaja com a proteína citosólica FADD (domínio morte associado ao Fas — "Fas-associated death domain"), que ativa uma protease citosólica chamada de caspase-8. Essa enzima pertence a uma família de proteases envolvidas na apoptose; todas são sintetizadas como proenzimas inativas, todas possuem um resíduo crítico de Cys no sítio ativo e todas hidrolisam suas proteínas-alvo no lado carboxiterminal de resíduos específicos de Asp.

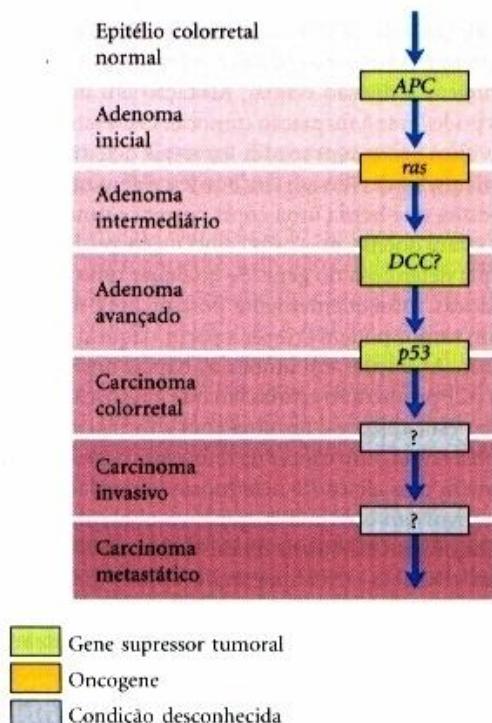


Figura 13-38 – Da célula epitelial normal para o câncer colorretal. No colo, mutações em ambas as cópias do gene supressor tumoral, *APC*, levam a agregados de células epiteliais benignas que se multiplicam muito rapidamente (adenoma inicial). Se uma célula já defeituosa no *APC* sofrer uma segunda mutação no proto-oncogene *ras*, a célula duplamente mutada dá origem a um adenoma intermediário, formando um pólipos benigno do colo. Quando uma dessas células sofre outras mutações nos genes supressores tumorais *DCC* (provavelmente) e *p53*, formam-se tumores progressivamente mais agressivos. Finalmente, mutações em genes ainda não caracterizados levam a um tumor maligno e finalmente a um tumor metastático que pode se espalhar para outros tecidos. A maioria dos tumores malignos é provavelmente o resultado de uma série de mutações como estas.

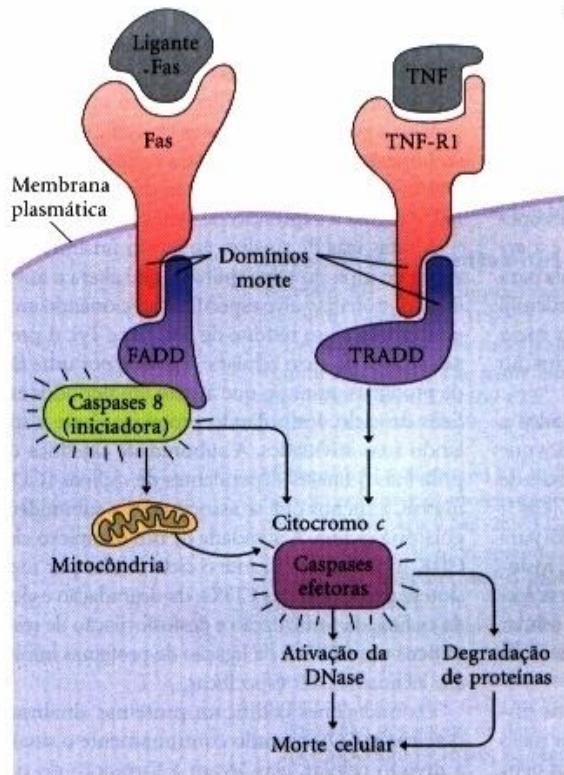


Figura 13-39 – Eventos iniciais da apoptose. Os receptores na membrana plasmática (Fas, TNF-R1) recebem sinais de fora da célula (o ligante Fas ou o fator de necrose tumoral (TNF), respectivamente). A ativação do receptor permite a interação entre o “domínio morte” (uma sequência de 80 resíduos em Fas ou TNF-R1 e um domínio morte semelhante nas proteínas citosólicas FADD ou TRADD. A FADD ativa uma protease citosólica chamada de caspase-8, que ativa proteoliticamente outras proteases celulares. A TRADD também ativa proteases. A proteólise resultante é o fator mais importante para a morte celular.

Quando a caspase-8, uma caspase “iniciadora”, é ativada por um sinal apoptótico transportado por meio do FADD, ela se auto-ativa clivando sua própria forma de proenzima. As mitocôndrias são um dos alvos da caspase-8 ativa. A protease induz a liberação de certas proteínas encontradas entre as membranas mitocondriais interna e externa: citocromo *c* (Capítulo 19) e várias caspases “efetoras”. O citocromo *c* liga-se à forma de proenzima da caspase efetora e estimula sua ativação proteolítica pela caspase-8. A caspase efetora ativa, por sua vez, catalisa a destruição generalizada das proteínas celulares, que é a principal causa da morte celular apoptótica. Uma ação-alvo específica da caspase é a DNase ativada pela caspase.

Os produtos monoméricos das degradações das proteínas e de DNA (aminoácidos e nucleotídeos) são liberados em um processo controlado que os permite ser captados e reutilizados pelas células vizinhas. A apoptose, dessa forma, permite ao organismo eliminar uma célula sem desperdiçar seus componentes.

Sumário

Todas as células possuem mecanismos de transdução de sinais específicos e altamente sensíveis, que têm sido conservados durante a evolução. Uma grande variedade de estímulos, incluindo hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, atua por meio de receptores protéicos específicos na membrana plasmática. Os receptores ligam-se à molécula sinal, amplificam o sinal, integram-no com os vindos de outros receptores e transmitem-no para dentro da célula. Se o sinal persistir, a desensibilização do receptor reduz ou termina a resposta. As células eucarióticas possuem quatro mecanismos de sinalização gerais: (1) canais iônicos na membrana plasmática; (2) enzimas com um domínio catalítico dentro da célula e um receptor extracelular para o sinal; (3) proteínas de membrana que estimulam proteínas-alvo específicas (enzimas ou canais iônicos) pela ativação de proteínas G; e (4) proteínas nucleares que se ligam a esteróides e atuam como fatores de transcrição.

Os canais iônicos abertos por ligantes ou potencial de membrana são centrais para a sinalização em neurônios e outras células. Os canais $\text{Na}^+ \text{K}^+$ abertos por voltagem, das membranas neuronais, transportam o potencial de ação ao longo do axônio como uma onda de despolarização (influxo de Na^+) seguido pela repolarização (efluxo de K^+). A chegada de um potencial de ação desencadeia a liberação de um neurotransmissor da célula pré-sináptica. O neurotransmissor (acetilcolina, por exemplo) difunde-se à célula pós-sináptica, liga-se a receptores específicos na membrana plasmática e desencadeia uma alteração na V_m .

O receptor da insulina é o protótipo dos receptores enzimáticos com a atividade tirosina quinase. Quando a insulina se liga ao receptor, o domínio enzimático fosforila primeiro a si próprio e depois as outras proteínas-alvo em resíduos Tyr, criando um sítio de ligação para as proteínas com domínios SH2. Interações seqüenciais proteína-proteína finalmente terminam na ligação do GTP à proteína Ras, deslocando o GDP e ativando a Ras. A Ras, por sua vez, ativa uma cascata de proteína quinase que termina com a fosforilação de proteínas-alvo no citosol e no núcleo. O resultado são alterações metabólicas específicas e a alteração na expressão gênica.

O fator natriurético atrial liga-se a receptores enzimáticos com atividade guanilil ciclase. O cGMP produzido atua como um segundo mensageiro, ativando a proteína quinase dependente de cGMP (PKG). Essa enzima altera o metabolismo fosforilando enzimas-alvo específicas.

O receptor β -adrenérgico tipifica a grande família de receptores que possuem sete segmentos transmembrana e atuam por meio de proteínas G triméricas. Durante a ligação do ligante, esses receptores serpenteantes catalisam a troca para GTP, do GDP ligado a G_α . A ligação do GTP força a dissociação da subunidade α da G_α , e essa subunidade ativa a adenilil ciclase na membrana plasmática. O cAMP produzido é uma mensagem secundária intracelular que estimula a proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A PKA medeia os efeitos da adrenalina fosforilando proteínas-chave nas vias metabólicas dos carboidratos e gorduras. Essa cascata de eventos, na qual uma única molécula de hormônio ativa um catalisa-

dor que por sua vez ativa um outro catalisador, e assim por diante, resulta em uma grande amplificação do sinal; essa é a característica de todos os sistemas ativados por hormônios. O mensageiro secundário é finalmente destruído pela fosfodiesterase do cAMP, e a G_s desliga-se pela hidrólise de seu GTP ligado, em GDP, terminando a resposta. Quando o sinal da adrenalina persiste, a ação de uma proteína quinase específica para o receptor β-adrenérgico (βARK) e a arrestina temporariamente dessensibilizam a célula para a adrenalina. Alguns receptores estimulam a adenilil ciclase por meio da G_s; outros inibem-na por meio da G_i. Assim, a [cAMP] celular reflete a informação integrada de dois (ou mais) sinais.

Alguns receptores serpenteantes são acoplados a uma fosfolipase C (PLP) da membrana plasmática que cliva PIP₂ em diacilglicerol e IP₃. Abrindo os canais de Ca²⁺ no retículo endoplasmático, o IP₃ eleva a [Ca²⁺] citosólica e o Ca²⁺ combina-se com o diacilglicerol para ativar a proteína quinase C (PKC). Essa enzima, fosforilando proteínas celulares específicas, produz a resposta da célula ao sinal extracelular. A [Ca²⁺] celular regula várias enzimas, freqüentemente por meio da proteína de ligação do Ca²⁺, a calmodulina.

A visão, o olfato e a gustação nos vertebrados empregam receptores serpenteantes, que atuam por meio das proteínas G triméricas para alterar o V_m dos neurônios sensoriais. Nas células bastonetes e cones da retina, a luz ativa a rodopsina, que estimula a substituição do GDP pelo GTP na proteína G, a transducina. A subunidade α liberada da transducina ativa a fosfodiesterase cGMP, que então diminui a [cGMP] e assim fecha os canais iônicos dependentes de cGMP nos segmentos externos dos neurônios. A hiperpolarização resultante da célula bastonete ou cone transporta o sinal para o próximo neurônio na via, e finalmente ao cérebro. Nos neurônios olfativos, o estímulo atua por meio de receptores serpenteantes e proteínas G, desencadeando ou um aumento na [cAMP] (ativando a adenilil ciclase) ou um aumento na [Ca²⁺] (ativando a PLC). Esses mensageiros secundários afetam os canais iônicos e, portanto, a V_m. Os neurônios gustativos possuem receptores serpenteantes que res-

pondem aos sabores elevando (doce) ou diminuindo (amargo) a [cAMP], que por sua vez altera o V_m abrindo os canais iônicos.

Os hormônios esteróides entram nas células e ligam-se a proteínas receptoras específicas. O complexo hormônio-receptor liga-se a regiões específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta hormonal, e regula a expressão de genes na proximidade.

Muitas vias de sinalização levam finalmente à ativação de uma proteína quinase, que altera a atividade de suas proteínas-alvo específicas adicionando um grupo fosforila a um resíduo de Ser, Thr e Tyr. A progressão através do ciclo celular é regulada por uma família de proteínas quinases que atuam em períodos específicos do ciclo, fosforilando proteínas-chave e modulando suas atividades. A subunidade catalítica dessas proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) é inativa, a menos que se associe com a subunidade regulatória ciclina. A atividade de um complexo ciclina-CDK modifica-se durante o ciclo celular por meio da síntese diferencial das CDKs, da degradação específica da ciclina, da fosforilação e desfosforilação de resíduos críticos nas CDKs e da ligação de proteínas inibitórias em ciclinas-CDKs específicas.

Os oncogenes codificam proteínas sinalizadoras defeituosas. Oferecendo continuamente o sinal para a divisão celular, elas levam à formação do tumor. Os oncogenes são geneticamente dominantes e podem codificar fatores de crescimento, receptores, proteínas G, proteínas quinases ou reguladores nucleares da transcrição defeituosos. Os genes supressores tumorais codificam proteínas regulatórias que normalmente inibem a divisão celular; mutações nesses genes podem levar à formação de tumores, mas são geneticamente recessivas. O câncer geralmente é o resultado de um acúmulo de mutações nos oncogenes e nos genes supressores tumorais.

A apoptose (morte celular programada) envolve algumas proteínas que regulam o ciclo celular e outras únicas para a via da morte celular. Desencadeada por sinais externos como o fator de necrose tumoral ou por mecanismos internos, a apoptose termina na ativação de proteases que degradam as proteínas celulares.

Leitura Adicional

Receptores de canais iônicos

(Veja também Leituras Adicionais sobre os canais iônicos no Capítulo 12, em Transporte de solutos através das membranas.)

Aidley DJ & Stanfield PR. (1996) Ion Channels: Molecules in Action. Cambridge University Press, Cambridge 89, 829-830.

Introdução clara e concisa da física, química e biologia molecular usada na pesquisa sobre canais iônicos, a ênfase está nas abordagens moleculares.

Changeux J-P. (1993) Chemical signaling in the brain. *Sci Am.* 269 (November), 58-62.

Descrição introdutória da estrutura e dos mecanismos de sinalização do receptor da acetilcolina.

Lehmann-Horn F & Jurkat-Rott K. (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79, 1317-1372.

Revisão avançada da estrutura e função dos canais iônicos, com ênfase em casos nos quais os defeitos nos canais iônicos produzem doenças humanas.

Receptores enzimáticos

Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, & Garbers DL. (1999) Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135, 1-39.

Revisão avançada da estrutura e função da transdução de sinais das guanilil ciclases.

Fantl WJ, Johnson DE, & Williams LT. (1993) Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 453-481.

Schaeffer HJ & Weber MJ. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435-2444.

Revisão intermediária das MAPKs e bases para a sinalização específica através dessas proteínas de sinalização gerais.

Seger R & Krebs EG. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.

Revisão intermediária.

Shepherd PR, Whitters DJ, & Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333, 471-490.

- Revisão intermediária da importância da PKB e PI-3K na regulação metabólica pela insulina.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, & Johnson GL. (1999)** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.
- Revisão avançada das funções da MAP quinase em diversos organismos, da levedura, fungo do lodo e nematóide até os vertebrados e plantas.
- Receptores serpenteantes**
- Berridge MJ. (1993)** Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361, 315-325.
- Descrição clássica do sistema de sinalização por IP₃.
- Hamm HE. (1998)** The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.
- Introduz uma série de revisões curtas sobre as proteínas G.
- Helmrreich EJ & Hofmann KP. (1996)** Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 285-322.
- Lee AG (ed). (1996)** *Biomembranes*, Vols 2A and 2B, *Rhodopsins, Receptors, and G-proteins*, JAI Press, Hampton Hill, England.
- Doze artigos excelentes sobre os receptores serpenteantes e seus mecanismos de transdução.
- Martin TFJ. (1998)** Phosphoinositide lipids as signaling molecules. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 231-264.
- Discussão dos papéis de derivados do fosfatidilinositol na transdução de sinais, na regulação do citoesqueleto e no transporte de membranas.
- Skiba NP & Hamm HE. (1998)** How G_{sa} activates adenylyl cyclase. *Nat. Struct. Biol.* 5, 88-92.
- Revisão intermediária dos mecanismos de ação da proteína G, baseada em estudos estruturais.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, & Herman B. (1999)** Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79, 1089-1125.
- Revisão avançada dos métodos para estimar os níveis intracelulares do Ca²⁺ em tempo real.
- Thomas AP, Bird GSJ, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, & Putney JW Jr. (1996)** Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* 10, 1505-1517.
- Visão, olfato e gustação**
- Baylor D. (1996)** How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 560-565.
- Uma das seis revisões curtas sobre a visão nesse fascículo da revista.
- Herness MS & Gilbertson T. (1999)** Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 873-900.
- Revisão avançada da gustação.
- Mombaerts P. (1999)** Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286, 707-711.
- Revisão intermediária dos transdutores olfativos nos vertebrados, nematóides e na mosca das frutas.
- Nathans J. (1989)** The genes for color vision. *Sci. Am.* 260 (February), 42-49.
- Schild D & Restrepo D. (1998)** Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* 78, 429-466.
- Revisão avançada.
- Scott K & Zuker C. (1997)** Ligs out: deactivation of the phototransduction cascade. *Trends Biochem. Sci.* 22, 350-354.
- Proteínas quinases e a fosforilação de proteínas**
- (Veja também Leituras Adicionais sobre a fosforilação de proteínas no Capítulo 8, em Enzimas reguladoras.)
- Faux MC & Scott JD. (1996)** More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem. Sci.* 21, 312-315.
- Descrição do papel das proteínas-alvo em manter as proteínas quinases em seus sítios de ação.
- Pinna LA & Ruzzene M. (1996)** How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314, 191-225.
- Revisão avançada dos fatores, incluindo sequências consenso, que dão às proteínas quinases a sua especificidade.
- Roach PJ. (1991)** Multisite and hierarchical protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 14.139-14.142.
- Visão da importância dos múltiplos sítios de fosforilação na regulação da função da proteína.
- Receptores e ação dos hormônios esteróides**
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, & O'Malley BW. (1990)** Steroid receptor family – structure and functions. *Endoc. Rev.* 11, 201-220.
- Discussão avançada da estrutura dos receptores dos hormônios esteróides e do mecanismo de sua ação.
- Jordan VC. (1998)** Designer estrogens. *Sci. Am.* (October), 60-67.
- Revisão introdutória do mecanismo de ação e dos efeitos de compostos semelhantes ao estrógeno em medicina.
- Ciclo celular e câncer**
- Cavenee WK & White RL. (1995)** The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 272 (March), 72-79.
- Fearon ER. (1997)** Human cancer syndromes — clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278, 1043-1050.
- Revisão intermediária do papel das mutações herdados no desenvolvimento do câncer.
- Herwig S & Strauss M. (1997)** The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 246, 581-601.
- Hunt M & Hunt T. (1993)** *The Cell Cycle: An Introduction*. W.H. Freeman and Company/Oxford University Press, New York/Oxford.
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, & Kirschner MW. (1996)** How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.
- Descrição de nível intermediário do papel da degradação dependente de ubiquitina das ciclinas na regulação do ciclo celular.
- Kinzler KW & Vogelstein B. (1996)** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Evidência dos processos de etapas múltiplas no desenvolvimento do câncer.
- Levine AJ. (1997)** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Cobertura de nível intermediário da função da proteína p53 no ciclo celular normal e no câncer.
- Morgan DO. (1997)** Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291.
- Revisão avançada.
- Weinberg RA. (1996)** How cancer arises. *Sci. Am.* 275 (September), 62-70.
- Apoptose**
- Anderson P. (1997)** Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 33-46.
- Ashkenazi A & Dixit VM. (1998)** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Este e os trabalhos de Green e Reed e de Thornberry e Lazebnik (a seguir) estão em um número de Science dedicado à apoptose.
- Duke RC, Ojcius DM, & Young JD-E. (1996)** Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* 275 (December), 80-87.
- Green DR & Reed JC. (1998)** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Jacobson MD, Weil M, & Raff MC. (1997)** Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Thornberry NA & Lazebnik Y. (1998)** Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Problemas

1. Efeitos terapêuticos do albuterol. Os sintomas respiratórios da asma devem-se à constrição dos brônquios e dos bronquíolos dos pulmões devido à contração do músculo liso de suas paredes. Essa constrição pode ser revertida pela elevação da [cAMP] no músculo liso. Explique os efeitos terapêuticos do albuterol, um agonista β -adrenérgico, receitado (por inalação) para a asma. Você esperaria que essa droga tivesse qualquer efeito colateral? Como poderia se projetar uma droga melhor que não tivesse esses efeitos?

2. Amplificação dos sinais hormonais. Descreva todas as fontes de amplificação no sistema do receptor da insulina.

3. Término dos sinais hormonais. Os sinais transportados por hormônios devem finalmente terminar. Descreva vários mecanismos diferentes para a terminação do sinal.

4. Especificidade de um sinal para um tipo celular único. Discuta a validade da seguinte proposição: uma molécula de sinalização (hormônio, fator de crescimento ou neurotransmissor) induz a respostas idênticas em diferentes tipos de células-alvo se elas contiverem receptores idênticos.

5. Potencial de membrana de repouso. Uma variedade de invertebrados pouco usuais, incluindo moluscos gigantes, mexilhões e vermes poliquetas, vivem nas margens de correntes hidrotérmicas no fundo do oceano.

(a) O músculo adutor de um molusco gigante das profundidades do mar possui um potencial de membrana de repouso de -95mV . Conhecidas as composições iônicas intra e extracelulares, mostradas na tabela a seguir, você prediria esse potencial de membrana? Por que sim ou não?

Ion	Concentração (mM)	
	Intracelular	Extracelular
Na^+	440	50
K^+	20	400
Cl^-	560	21
Ca^{2+}	10	0,4

(b) Assumindo que a membrana do músculo adutor seja permeável a apenas um dos íons listados na tabela, qual íon poderia determinar o V_m ?

6. Potenciais de membrana nos ovos do sapo. A fertilização de um óócio do sapo por um espermatozoide desencadeia alterações iônicas semelhantes aquelas observadas nos neurônios (durante a movimentação dos potenciais de ação) e inicia os eventos que levam à divisão celular e o desenvolvimento do embrião. Óócos podem ser estimulados a se dividir sem a fertilização, suspenso em 80mM de KCl (a água de lago normal contém 9mM de KCl).

(a) Como a alteração na [KCl] extracelular afeta o potencial de membrana de repouso do óócio? (Dica: Assuma que o óócio contenha 120mM K^+ e seja permeável apenas ao K^+ .) Assuma uma temperatura de 20°C .

(b) Quando o experimento foi repetido em água sem Ca^{2+} , a [KCl] elevada não tem efeito. O que isso sugere sobre o mecanismo do efeito do KCl?

7. Excitação desencadeada pela hiperpolarização. Na maioria dos neurônios, a *despolarização* da membrana leva à abertura dos canais iônicos dependentes da voltagem, gerando um potencial de ação e finalmente um influxo de Ca^{2+} , que induz a liberação do neurotransmissor no terminal do axônio. Invente uma estratégia

celular pela qual a *hiperpolarização* nas células bastonetes poderia produzir a excitação da via visual e a passagem dos sinais visuais ao cérebro. (Dica: A via de sinalização neuronal nos organismos superiores consiste de *uma série* de neurônios que transmitem informação ao cérebro (veja Fig. 13-20). O sinal liberado por um neurônio pode ser ou excitatório ou inibitório ao neurônio pós-sináptico seguinte.)

8. Experimentos hormonais em sistemas livres de células. Na década 1950, Earl W. Sutherland Jr. e colaboradores realizaram experimentos pioneiros para elucidar o mecanismo de ação da adrenalina e do glucagon. Considerando o que você aprendeu sobre a ação hormonal neste capítulo, interprete cada um dos experimentos descritos a seguir. Identifique a substância X e indique o significado dos resultados.

(a) A adição da adrenalina a um homogeneizado de fígado normal leva a um aumento na atividade da glicogênio fosforilase. Entretanto, se o homogeneizado for primeiramente centrifugado a uma alta velocidade e a adrenalina e o glucagon forem adicionados à fração clara do sobrenadante que contém a fosforilase, nenhum aumento na atividade da fosforilase é observado.

(b) Quando a fração particulada da centrifugação em (a) era tratada com adrenalina, produzia-se uma substância X. A substância foi isolada e purificada. Diferentemente da adrenalina, a substância X, quando adicionada à fração clara do sobrenadante do homogeneizado centrifugado, ativava a glicogênio fosforilase.

(c) A substância X era termoestável, ou seja, o tratamento com o calor não afetava sua capacidade de ativar a fosforilase. (Dica: Seria esse o caso se a substância X fosse uma proteína?) A substância X era praticamente idêntica a um composto obtido quando o ATP puro era tratado com o hidróxido de bário. (A Fig. 10-6 será útil.)

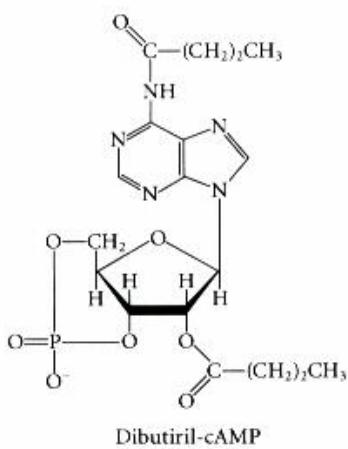
9. Efeito da toxina da cólera na adenilil ciclase. A bactéria gram-negativa *Vibrio cholerae* produz uma proteína, a toxina da cólera (M_r 90.000), que é responsável pelos sintomas característicos da cólera: perda excessiva da água corporal e Na^+ por uma contínua e debilitante diarréia. Se os fluidos corporais e o Na^+ não forem substituídos, ocorre uma desidratação grave; não tratada a doença freqüentemente é fatal. Quando a toxina da cólera ganha acesso ao trato intestinal humano, ela se liga fortemente a sítios específicos na membrana plasmática das células epiteliais que cobrem o intestino delgado, causando uma prolongada ativação na adenilil ciclase (horas ou dias).

(a) Qual é o efeito da toxina da cólera na [cAMP] nas células do intestino?

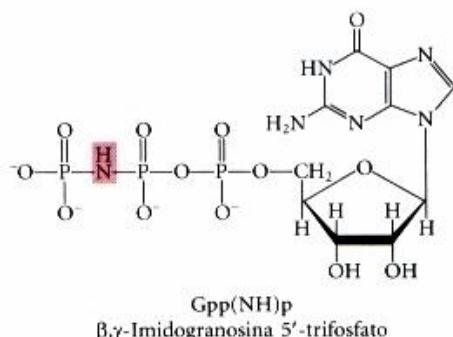
(b) Baseando-se na informação citada, sugira como o cAMP funciona normalmente nas células epiteliais do intestino.

(c) Sugira um possível tratamento da cólera.

10. Efeito do dibutil cAMP versus o cAMP em células intactas. Os efeitos fisiológicos da adrenalina deveriam em princípio ser mimetizados pela adição do cAMP às células-alvo. Na prática, a adição do cAMP às células intactas induz apenas uma resposta fisiológica mínima. Por quê? Quando o derivativo, estruturalmente relacionado, dibutiril cAMP (mostrado a seguir) é adicionado às células intactas, a resposta fisiológica esperada é prontamente visível. Explique a base da diferença na resposta celular para essas duas substâncias. O dibutiril cAMP é largamente usado em estudos da função do cAMP.



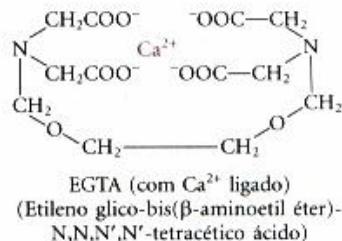
11. Análogos do GTP não hidrolisáveis. Muitas enzimas podem hidrolisar o GTP entre os fosfatos β e γ . O análogo do GTP β,γ -imidoguanosina 5'-trifosfato Gpp(NH)p, mostrado a seguir, não consegue ser hidrolisado entre os fosfatos β e γ . Prediga o efeito da microinjeção do Gpp(NH)p dentro de um miócito na resposta celular à estimulação β -adrenérgica.



12. Diferenças nas proteínas G. Compare as proteínas G, G_i, que age na transdução do sinal entre o receptor β -adrenérgico e Ras. Que propriedades elas compartilham? Como elas diferem? Qual a diferença funcional entre G_i e G_s?

13. Injeção de EGTA. O EGTA (etileno glicol-bis-(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético ácido) é um agente

quelante com alta afinidade e especificidade para o Ca²⁺. Microinjetando uma célula com uma solução apropriada de Ca²⁺-EDTA, um experimentador pode impedir que a [Ca²⁺] citosólica se eleve acima de 10⁻⁷M. Como poderia a microinjeção de EGTA afetar a resposta celular à vasopressina (veja Tabela 13-5)?



14. Dessensibilização visual. A doença de Oguchi é uma forma herdável de cegueira noturna. Os indivíduos afetados recuperam a visão lentamente depois de um "flash" de luz brilhante contra um fundo preto, como a luz de um carro na estrada. Sugira qual poderia ser o defeito molecular na doença de Oguchi. Explique em termos moleculares como esse defeito explica a cegueira noturna.

15. Mutações na PKA. Explique como mutações na subunidade R ou C da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) poderia levar a (a) uma PKA constantemente ativa ou (b) uma PKA constantemente inativa.

16. Mecanismos para a regulação das proteínas quinases. Identifique oito tipos gerais de proteínas quinases encontradas em células eucarióticas e explique qual fator é *diretamente* responsável para ativar cada tipo.

17. Mutações nos genes supressores tumorais e nos oncogenes. Explique por que as mutações nos genes supressores tumorais são recessivas (ambas as cópias do gene devem ser defeituosas para a regulação da divisão celular ser defeituosa) enquanto as mutações nos oncogenes são dominantes.

18. Retinoblastoma em crianças. Explique por que algumas crianças com retinoblastoma desenvolvem tumores múltiplos da retina em ambos os olhos, enquanto outras possuem um único tumor em apenas um olho.

19. Mutações em ras. Como uma mutação no gene *ras* que leva a uma proteína Ras sem atividade GTPase afeta a resposta celular à insulina?