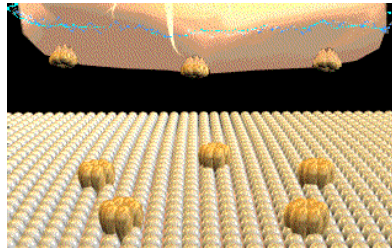




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
SETOR DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

SINALIZAÇÃO CELULAR



Profa. Dra. Nívea Maria Rocha Macedo

Princípios gerais da comunicação celular

Os organismos unicelulares desenvolveram mecanismos para responder às mudanças físicas e químicas do ambiente bem antes da existência dos organismos multicelulares;

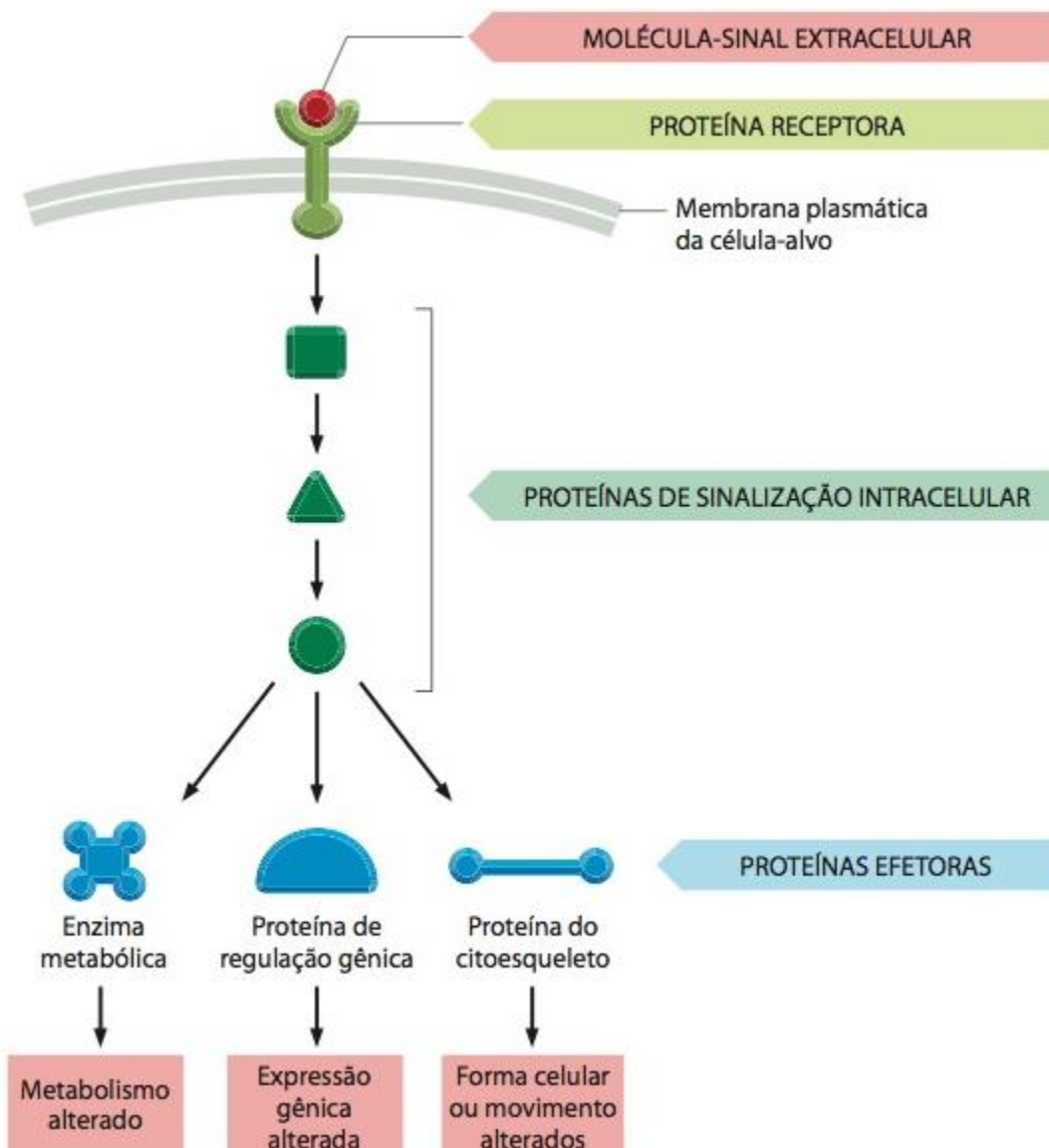
A levedura *S. cerevisiae*, por exemplo, secreta um fator de acasalamento peptídico que sinaliza para as células do sexo oposto pararem de proliferar e se prepararem para o acasalamento;



Usam maquinaria muito similar de comunicação celular!

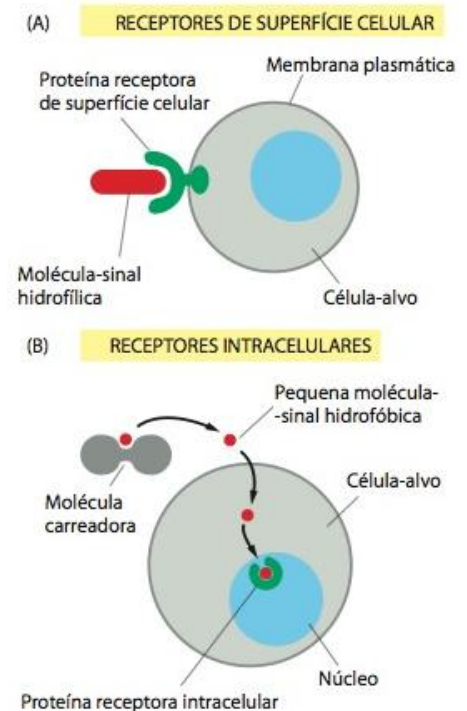


Figura 15-1 Via de sinalização intracelular simples ativada por uma molécula-sinal extracelular. A molécula-sinal geralmente se liga a uma proteína receptora inserida na membrana plasmática da célula-alvo e ativa uma ou mais vias intracelulares mediadas por uma série de proteínas sinalizadoras. Finalmente, uma ou mais dessas proteínas alteram a atividade de proteínas efetoras, alterando, assim, o comportamento da célula.

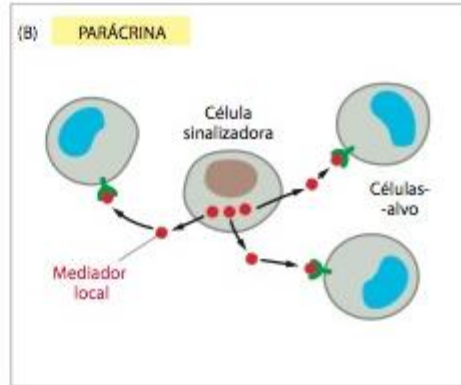
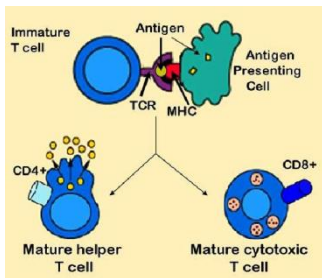
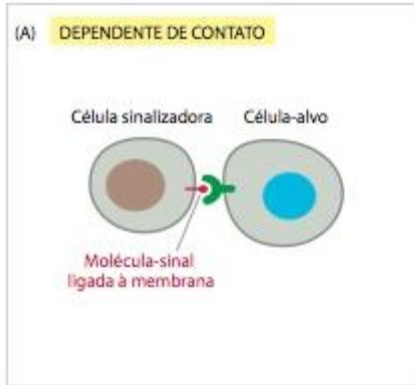


Fundamentos da transdução de sinais

- Nos animais multicelulares, as células se comunicam por meio de centenas de tipos diferentes de moléculas-sinal (ex.: proteínas, peptídeos pequenos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóis, derivados de ácidos graxos e gases dissolvidos – NO e CO);
- As moléculas sinalizadoras podem ser liberadas no espaço extracelular por exocitose, podem se difundir através da membrana celular ou podem estar na superfície externa de células;
- Tipos de moléculas sinalizadoras: **Hormônios** (polipeptídeos - hidrossolúveis, aminas – a maioria é hidrossolúvel e esteróides - lipossolúveis), **reguladores locais** (citocinas, muitos fatores de crescimento, NO, prostaglandinas), **neurotransmissores**, **neurormônios** e **feromônios**;
- Receptores podem estar na superfície celular ou podem ser intracelulares;



As moléculas-sinal podem agir a pequenas ou a grandes distâncias



Reguladores locais atuam em muitos processos como: regulação da pressão arterial, funcionamento do sistema nervoso, reprodução e sistema imune;

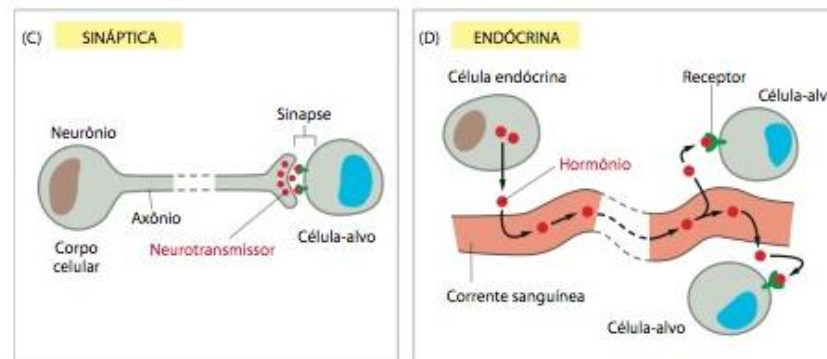
- Sinalização dependente de contato: importante durante o desenvolvimento e a resposta imune;
- Na maioria dos casos, as moléculas-sinal são secretadas para o fluido extracelular agindo em alvos distantes ou como mediadores locais;

Para que os sinais parácrinos atuem localmente:

- Recaptação por células vizinhas;
- Destruição por enzimas extracelulares;
- Imobilização pela ECM (heparan sulfato);
- Inibição por antagonistas;

As moléculas-sinal podem agir a pequenas ou a grandes distâncias

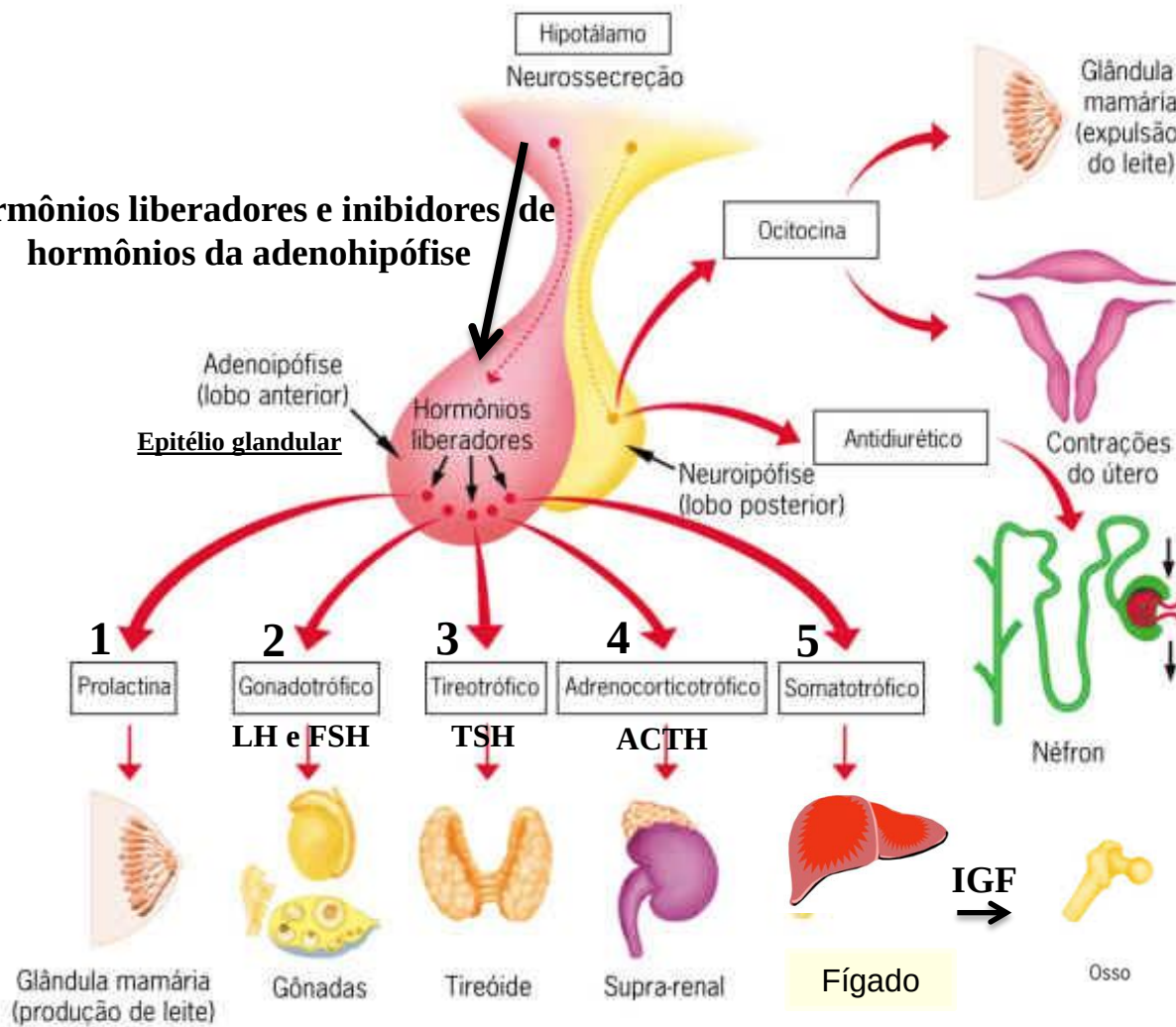
- As células nervosas utilizam os mecanismos mais sofisticados de comunicação de longo alcance, por meio dos axônios entram em contato com células-alvo distantes;
- A **sinalização sináptica** é **rápida**, os neurotransmissores podem alcançar **altas concentrações locais** e os seus **receptores** apresentam **baixa afinidade** aos **neurotransmissores**, colaborando para a **rápida extinção da resposta**;
- As células endócrinas usam como estratégia a secreção de moléculas-sinal (hormônios) na corrente sanguínea;
- A **sinalização endócrina** é **lenta**, os hormônios são capazes de **agir em baixas concentrações** ($<10^{-8}$ M) e os **receptores** nas células-alvo apresentam **alta afinidade** ao **ligante**;



O hipotálamo recebe informações de nervos de todo o corpo e de outras partes do cérebro e inicia a sinalização endócrina adequada às condições ambientais:

Estímulo

Hormônios liberadores e inibidores de hormônios da adenohipófise



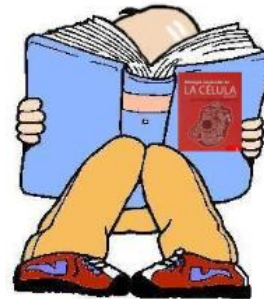
1



2



3

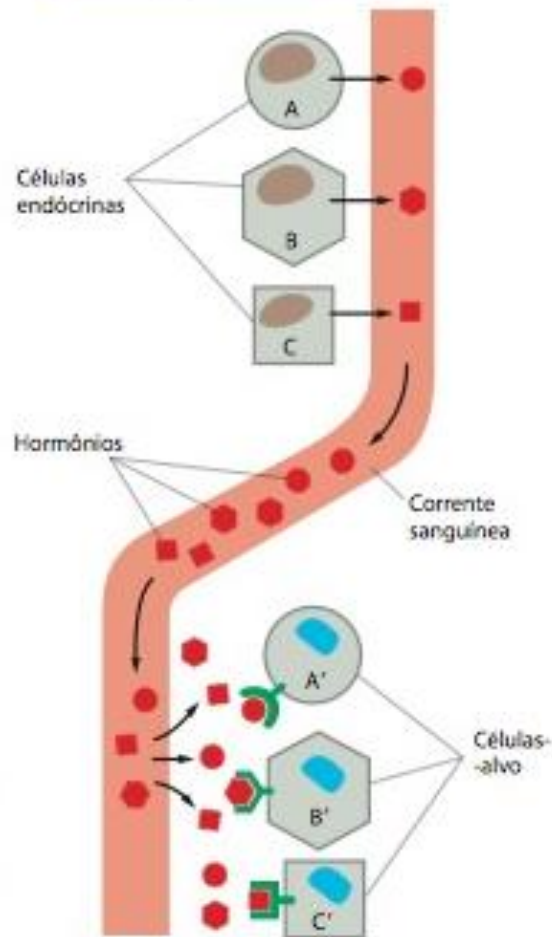


4

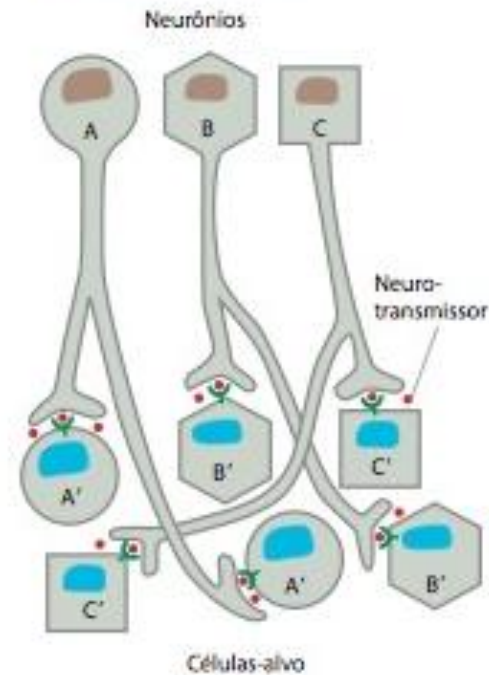
1. **DA** (Dopaminha – inibidora da secreção de prolactina);
2. **GnRH** (Horm. Liberador de Gonadotrofinas);
3. **TRH** (Horm. Liberador de Tirotropina – TSH);
4. **CRH** (Horm. Liberador de Corticotrofina);
5. **GHRH** (Horm. Liberador de Horm. do Crescimento);

Comparação entre as estratégias endócrina e neuronal na sinalização de longo alcance

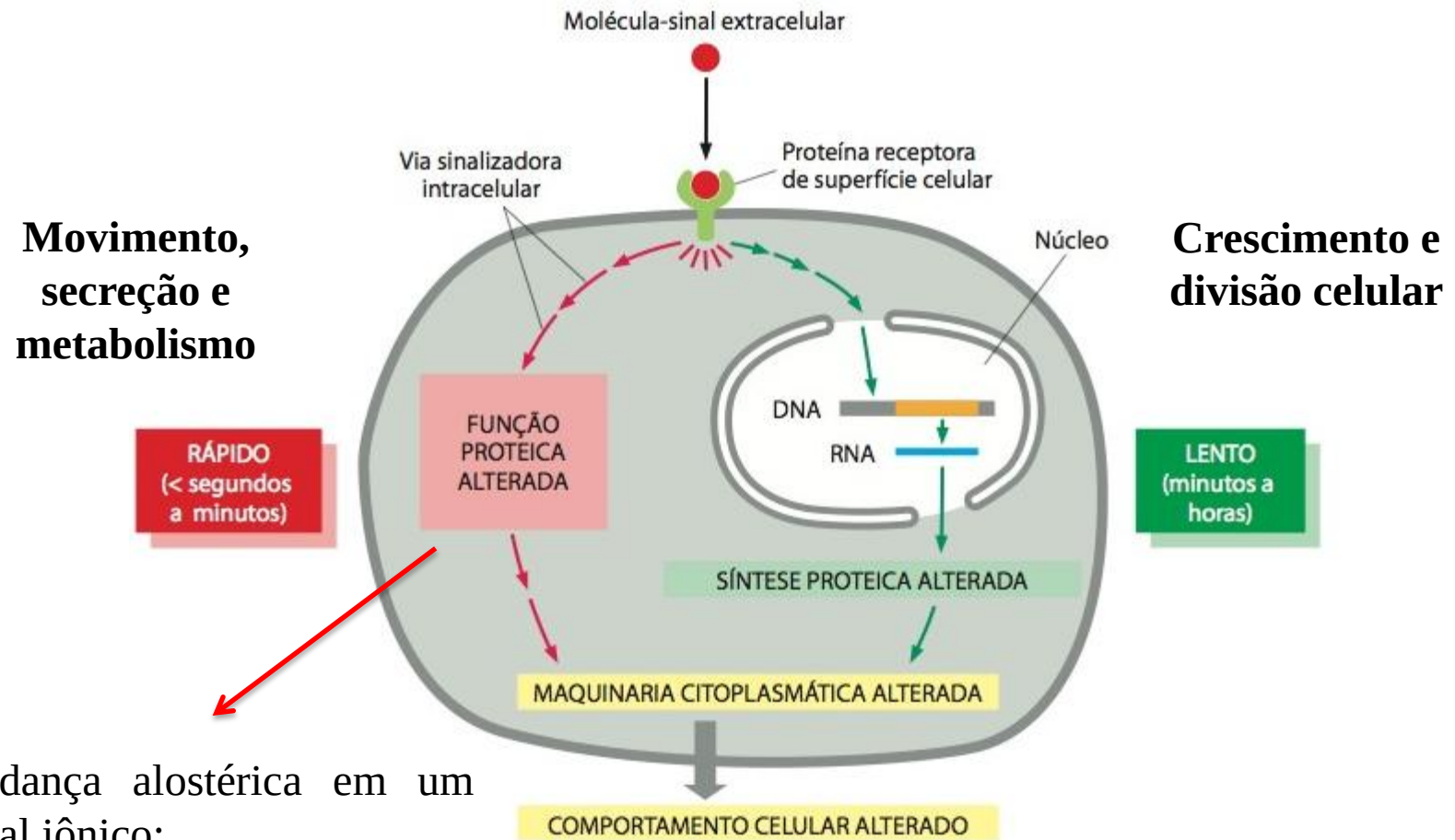
(A) SINALIZAÇÃO ENDÓCRINA



(B) SINALIZAÇÃO SINÁPTICA



Os sinais extracelulares podem agir de modo lento ou rápido na mudança de comportamento da célula-alvo



- Mudança alostérica em um canal iônico;
- Fosforilação de proteínas;

As junções comunicantes permitem que a informação sinalizadora seja compartilhada pelas células vizinhas

- São importantes na propagação do efeito de sinais extracelulares que atuam por meio de mediadores intracelulares pequenos, como o Ca^{2+} e o cAMP, que passam pelos canais.
- Nem todos os hepatócitos possuem inervação simpática, responsável pela liberação de noradrenalina (que, quando ocorre diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, estimula a degradação do glicogênio e liberação de glicose no sangue, uma resposta dependente do cAMP). As junções comunicantes transmitem o sinal para os hepatócitos que não são nervados;

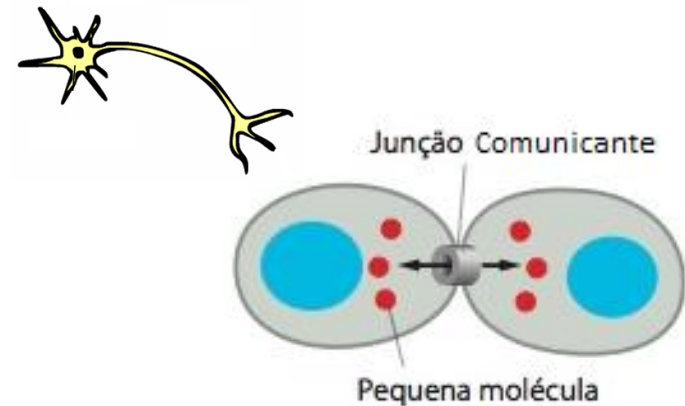
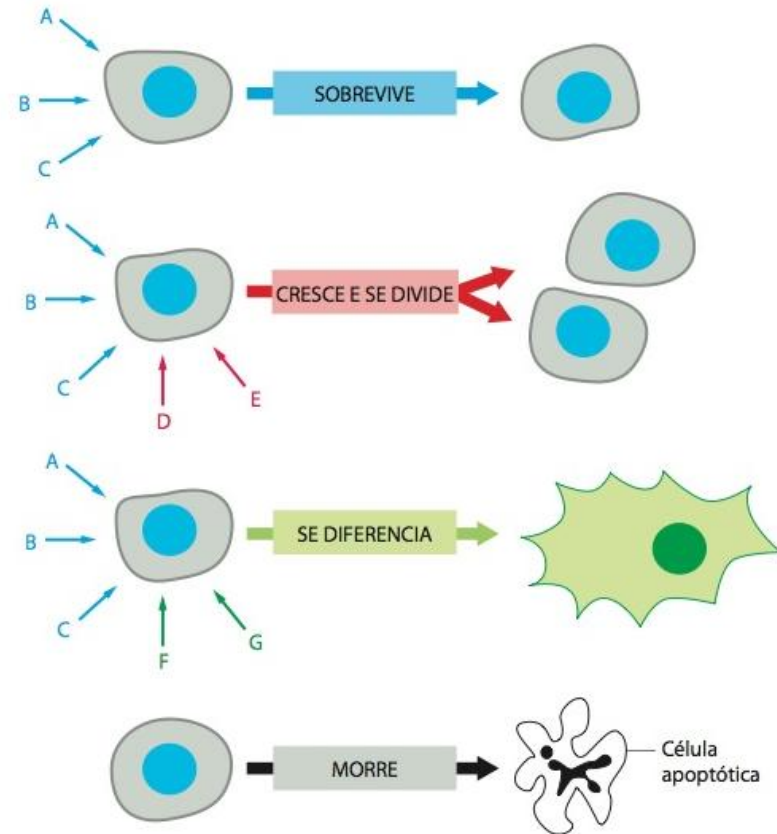


Figura 15-7 Sinalização via junções comunicantes As células conectadas por junções ocludentes compartilham moléculas pequenas, entre elas moléculas sinalizadoras intracelulares como AMP cíclico e Ca^{2+} , e podem por isso responder de maneira coordenada a sinais extracelulares.

Cada célula está programada para responder a combinações específicas de moléculas-sinal extracelulares

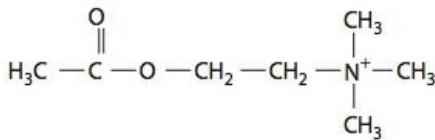
- Uma célula deve responder seletivamente a uma confusão de sinais de acordo com sua própria característica específica. Essa característica é adquirida através da especialização celular progressiva no curso do desenvolvimento.
- Um número relativamente pequeno de receptores e moléculas-sinal é suficiente. A complexidade encontra-se nas maneiras pelas quais as células respondem às combinações de sinais que recebem.



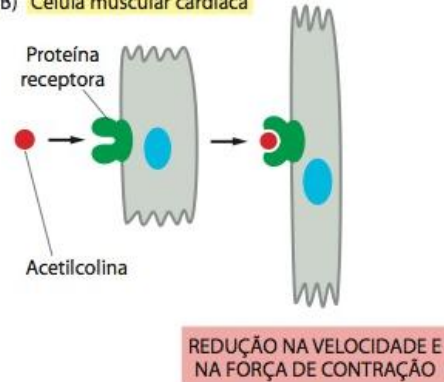
Diferentes tipos celulares respondem diferentemente à mesma molécula-sinal extracelular

- A mesma molécula-sinal ligada a receptores diferentes em tipos diferentes de células-alvo: isso pode refletir diferenças entre proteínas sinalizadoras intracelularmente ativadas, diferenças na proteínas efetoras ativadas ou genes específicos expressos;

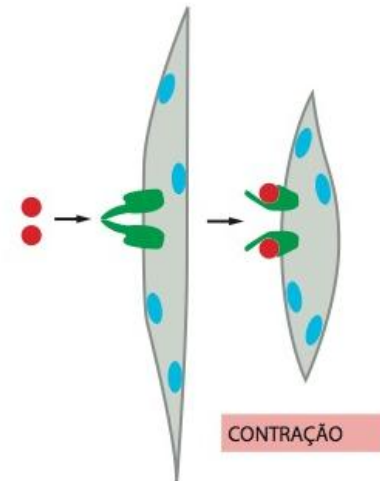
(A) Acetilcolina



(B) Célula muscular cardíaca



(C) Célula muscular esquelética



(D) Célula da glândula salivar

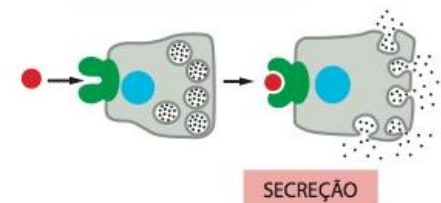


Figura 15-9 Diferentes respostas induzidas pelo neurotransmissor acetilcolina. (A) A estrutura química da acetilcolina. (B-D) Tipos celulares diferentes são especializados para responder de maneiras diferentes à acetilcolina. Em alguns casos (B e C), os receptores são diferentes. Em outros casos (B e D), a acetilcolina se liga a proteínas receptoras similares, mas os sinais intracelulares produzidos são interpretados diferentemente em células especializadas em diferentes funções.

O destino de algumas células em desenvolvimento depende da sua posição no gradiente de morfógeno

- O mesmo sinal que atua sobre o mesmo tipo celular pode ter, qualitativamente, diferentes efeitos dependendo da concentração do sinal. Respostas diferentes da célula a diferentes concentrações da mesma molécula-sinal são críticas no desenvolvimento animal, quando as células se diferenciam.
- As células-alvo seguem destinos diferentes de acordo com sua posição no gradiente de morfógeno.

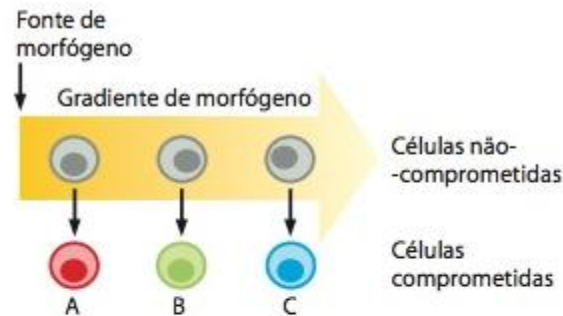


Figura 15-10 As células seguem destinos diferentes dependendo de suas posições em um gradiente de morfógeno. Diferentes concentrações do morfógeno induzem a expressão de grupos diferentes de genes, resultando em diferentes destinos celulares (indicados por letras e cores diferentes).

O óxido nítrico sinaliza pela regulação direta da atividade de proteínas específicas dentro da célula-alvo

↓O₂ no sangue → liberação de NO pelas células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos

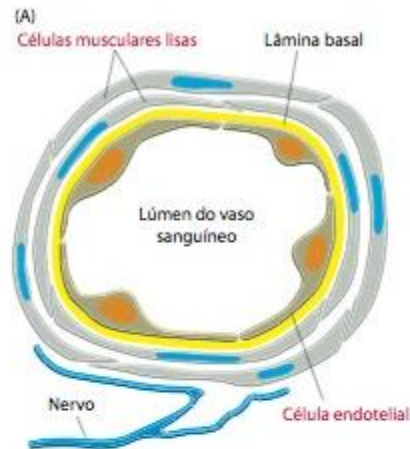
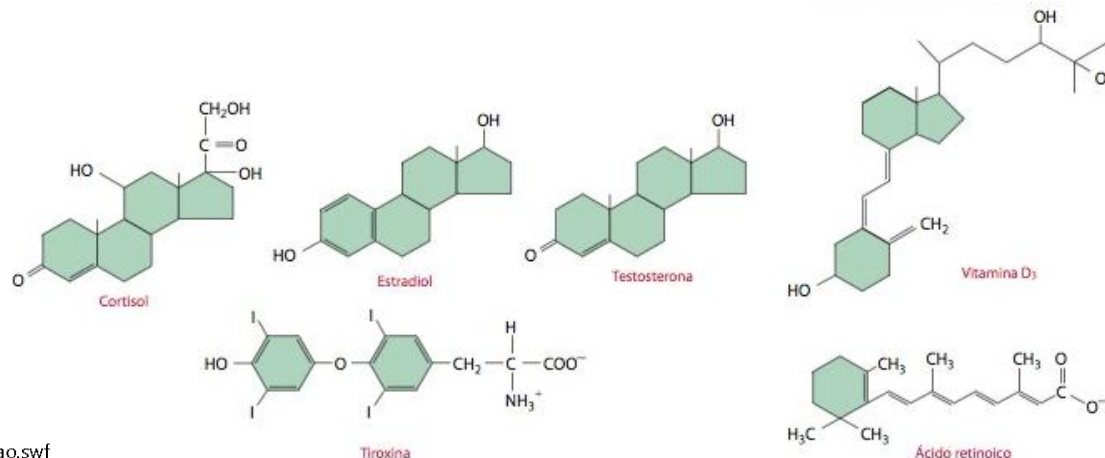


Figura 15-12 Papel do óxido nítrico (NO) no relaxamento do músculo liso da parede de um vaso sanguíneo. (A) Desenho simplificado de um nervo autônomo em contato com um vaso sanguíneo. (B) A acetilcolina, liberada pelos terminais nervosos na parede do vaso sanguíneo, ativa a NO-sintase das células endoteliais que revestem o vaso, induzindo a produção de NO a partir de arginina. O NO se difunde para fora das células endoteliais e para dentro das células musculares subjacentes, onde ele se liga à guanilil-ciclase, ativando-a, com a consequente produção de GMP cíclico. Este desencadeia uma resposta que causa o relaxamento das células musculares, aumentando o fluxo de sangue através do vaso.

Os receptores nucleares são proteínas reguladoras gênicas moduladas por ligantes

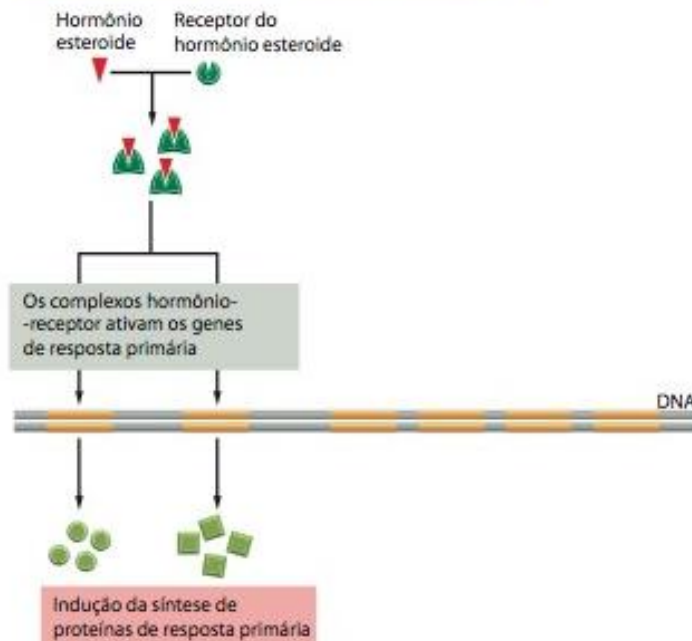
- Várias moléculas-sinal pequenas e hidrofóbicas se ligam a receptores intracelulares que são proteínas reguladoras gênicas e, portanto, alteram sua capacidade de controlar a expressão gênica (ex.: hormônios tireóideos, esteróides, retinóis e vitamina D);
- Receptores de hormônios esteroides estão localizados no citosol;
- Receptores de tiroxina, vitamina D, ácido retinoico e outros hormônios lipossolúveis estão localizados no núcleo;
- Moléculas-sinal hidrossolúveis podem desencadear resposta citoplasmática direta ou alteração da expressão gênica, enquanto moléculas-sinal lipossolúveis somente podem desencadear diretamente alteração da expressão gênica;
- Esses receptores também atuam como efetores intracelulares do sinal;



Respostas primárias e secundárias induzidas pela ativação de um receptor hormonal nuclear

- A resposta transcricional ocorre em múltiplas etapas:

(A) RESPOSTA PRIMÁRIA (PRECOZE) AO HORMÔNIO ESTEROIDE



(B) RESPOSTA SECUNDÁRIA (TARDIA) AO HORMÔNIO ESTEROIDE

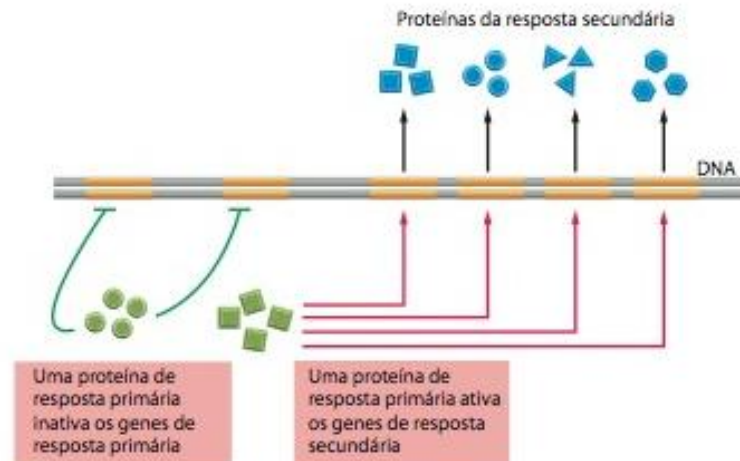
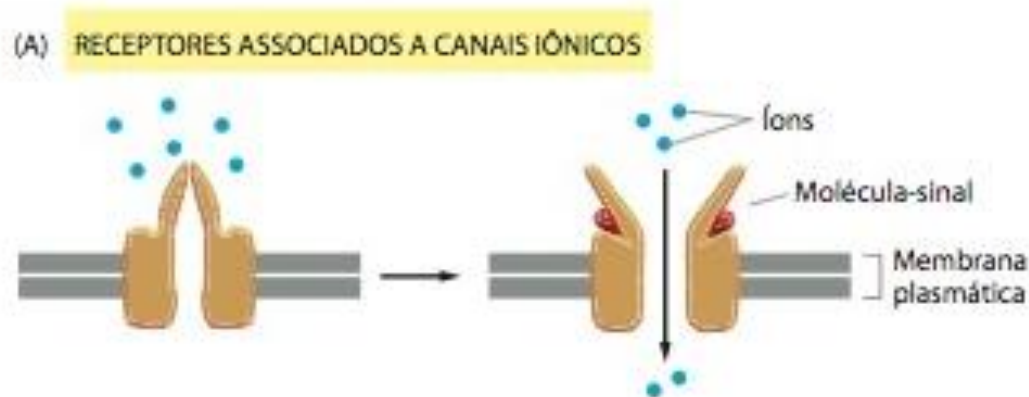


Figura 15-15 Exemplo de respostas primária e secundária induzidas pela ativação de um receptor hormonal nuclear. (A) Resposta primária precoce e (B) resposta secundária tardia. Algumas proteínas de resposta primária ativam genes de resposta secundária, enquanto outras inativam genes de resposta primária. O número real de genes de resposta primária e secundária é maior do que o representado. Substâncias que inibem a síntese proteica suprimem a transcrição dos genes de resposta secundária, mas não os genes de resposta primária, permitindo diferenciar entre as duas classes de resposta de transcrição. A figura mostra as respostas a um hormônio esteroide, mas os mesmos princípios são empregados por muitos outros ligantes que ativam proteínas receptoras nucleares.

Os receptores associados a canais iônicos, a proteína G e a enzimas são as 3 maiores classes de receptores de superfície celular

- Os **receptores associados a canais iônicos** (canais controlados por transmissores ou receptores ionotrópicos) estão envolvidos na sinalização entre células nervosas e outras células excitáveis.
- Os neurotransmissores abrem e fecham, temporariamente, um canal iônico formado pela proteínas a qual se ligam.
- A maioria dos receptores associados a canais iônicos pertence à grande família das proteínas homólogas transmembrana de múltiplas passagens.



Os receptores associados a canais iônicos, a proteína G e a enzimas são as 3 maiores classes de receptores de superfície celular

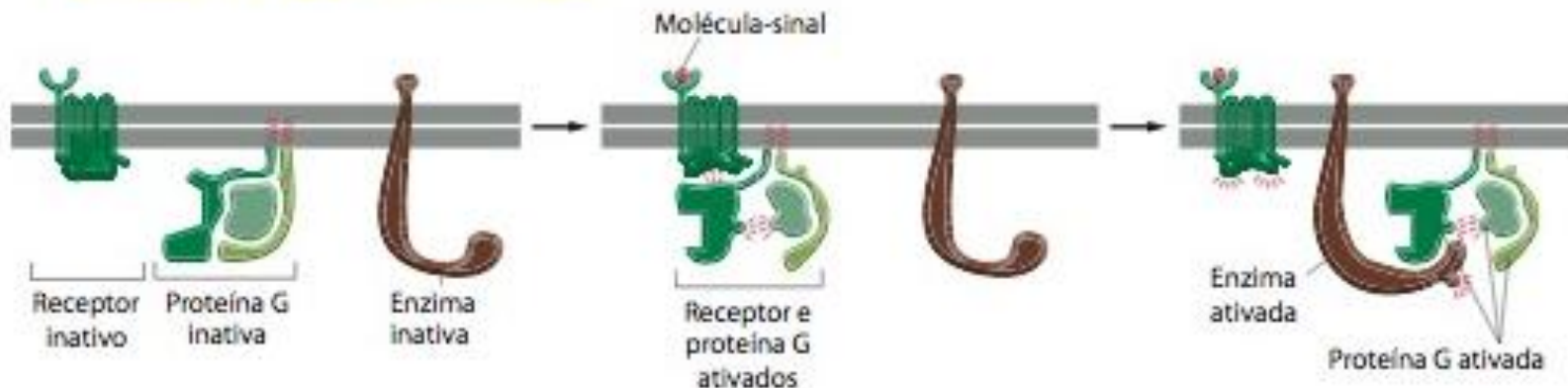
- Os **receptores associados à proteína G** (GPCR) atuam indiretamente na regulação da atividade de uma proteína-alvo ligada à membrana plasmática, que pode ser tanto uma enzima como um canal iônico.
- São a maior classe de receptores de superfície celular, mediando respostas aos mais diversos tipos de sinais extracelulares.
- Todos os receptores associados a proteína G pertencem à grande família das proteínas homólogas transmembrana de múltiplas passagens.
- A interação entre o receptor e essa proteína-alvo é mediada por uma terceira proteína, chamada de *proteína trimérica de ligação a GTP (proteína G)*.
- A ativação da proteína-alvo altera a concentração de um ou mais mediadores intracelulares pequenos ou altera a permeabilidade da membrana a íons.

Os receptores associados a canais iônicos, a proteína G e a enzimas são as 3 maiores classes de receptores de superfície celular

- A ativação da proteína G inicia graças à ação de uma proteína auxiliar, *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), que desloca o GDP e dá lugar à ligação do GTP, configurando o estado ativo dessa proteína.
- Esse estado de ativação é mantido graças à ação da proteína *guanine nucleotide dissociation inhibitor* (GDI), que mantém o GTP ligado e a proteína ativa pelo tempo necessário.
- Uma característica importante da subunidade α é sua atividade GTPásica intrínseca, que dessa forma hidrolisa o GTP e devolve a afinidade da subunidade α pelo dímero $\beta\gamma$. Entretanto, essa atividade autocatalítica é fraca, sendo necessárias as ações de outras proteínas: a proteína ativadora da GTPase (*GTPase activating protein* – GAP) e os reguladores da sinalização por proteína G (*regulators of G protein signaling* – RGS), que aumentam a atividade da GTPase.

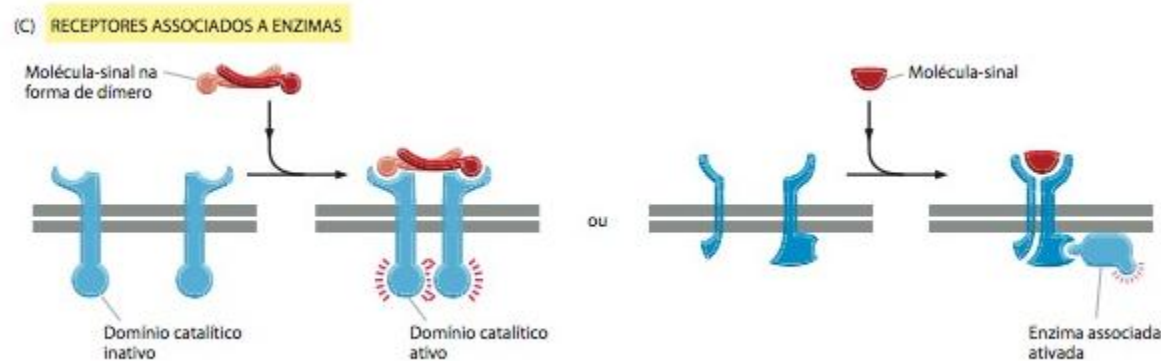
Os receptores associados a canais iônicos, a proteína G e a enzimas são as 3 maiores classes de receptores de superfície celular

(B) RECEPTORES ASSOCIADOS À PROTEÍNA G

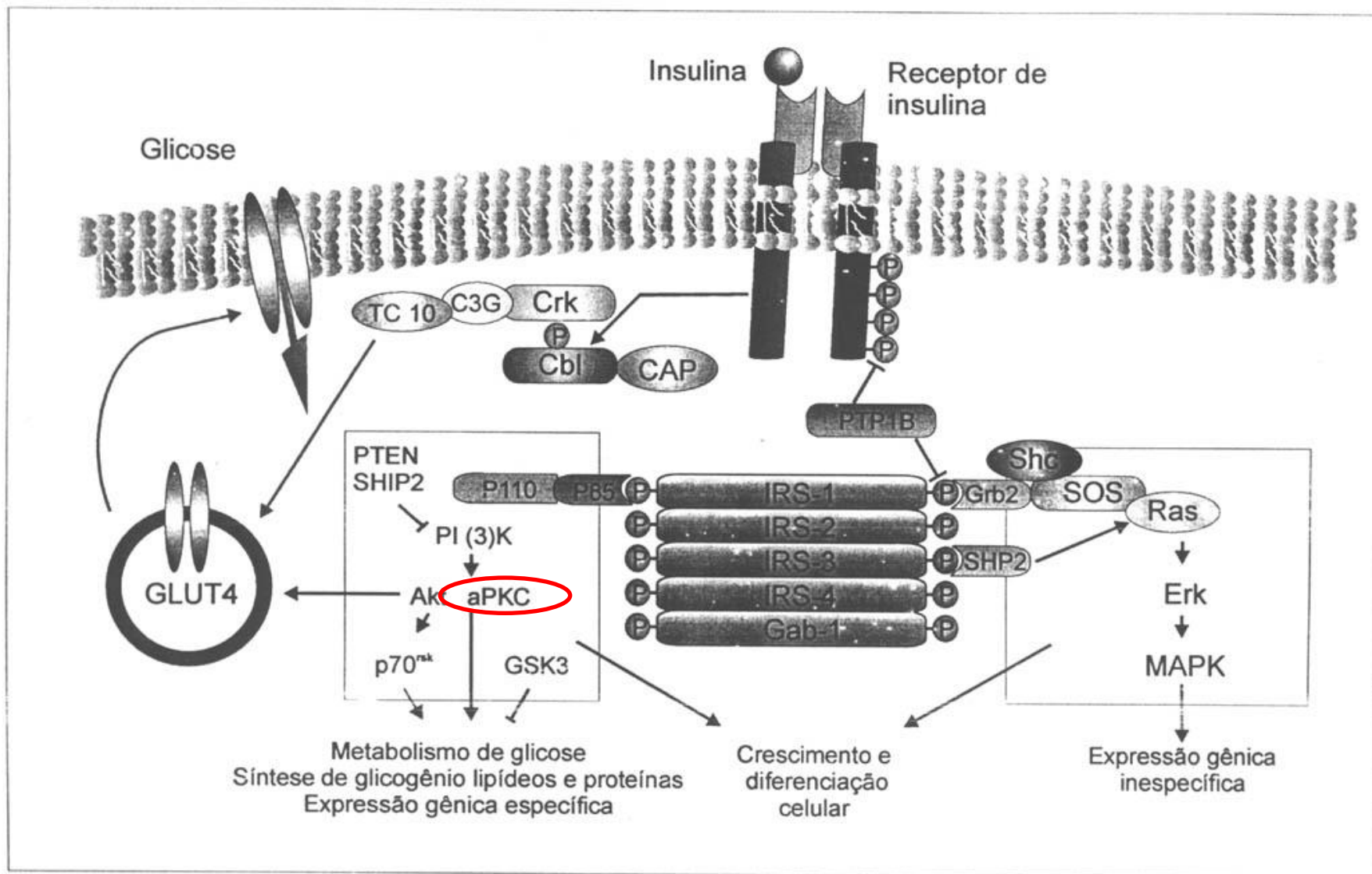


Os receptores associados a canais iônicos, a proteína G e a enzimas são as 3 maiores classes de receptores de superfície celular

- Os **receptores associados a enzimas**, quando ativados, funcionam diretamente como enzimas, ou estão associados diretamente a enzimas ativadas por eles.
- Geralmente são proteínas transmembranares de passagem única.
- A grande maioria é representada por cinases ou está a elas associada e, quando ativados, fosforilam grupos específicos de proteínas na célula-alvo.



Existem receptores de superfície celular que não se enquadram facilmente em nenhuma das classes citadas anteriormente, mas têm funções importantes no controle da especialização de diferentes tipos celulares durante o desenvolvimento e na renovação ou regeneração de tecidos.

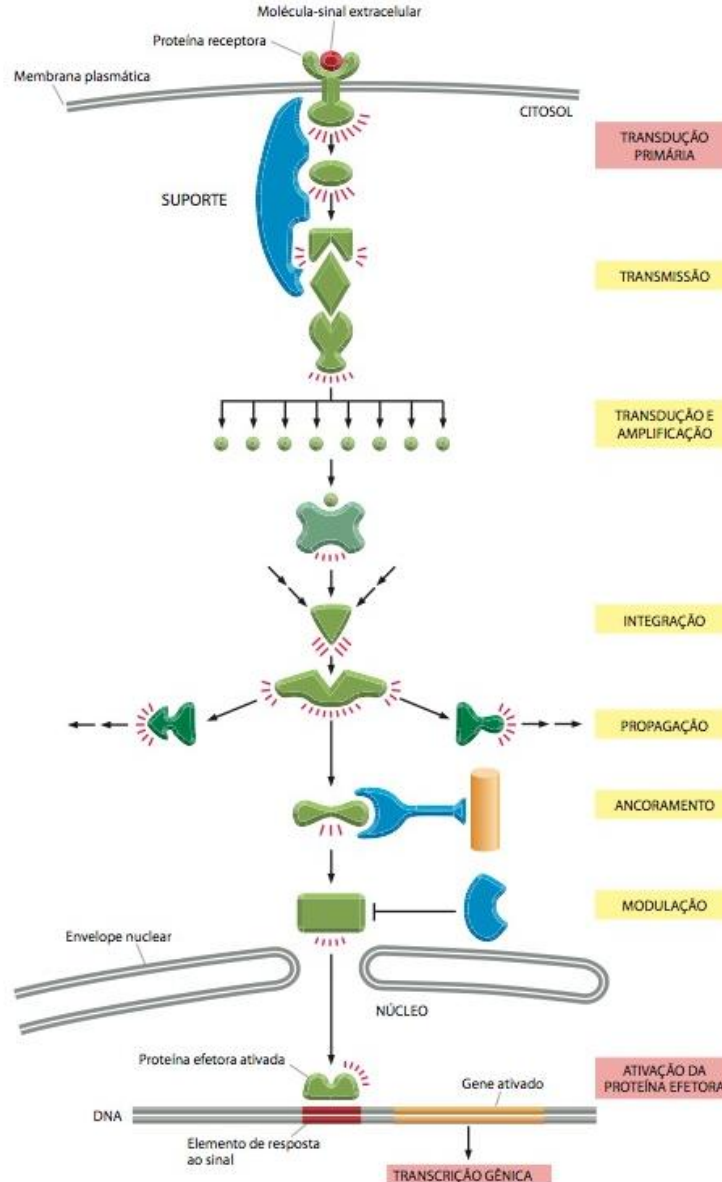


A maioria dos receptores de superfície celular ativados transmite sinais por meio de pequenas moléculas e de uma rede de proteínas de sinalização intracelular

- Os sinais recebidos por receptores associados à proteína G ou associados a enzimas, na superfície de uma célula, são transmitidos para o seu interior por uma combinação de pequenas e grandes *moléculas de sinalização intracelular*.
- As pequenas moléculas de sinalização intracelular são denominadas **mediadores intracelulares pequenos** ou **segundos mensageiros**.
- AMP cíclico e o Ca^{2+} são hidrossolúveis e se difundem no citosol, enquanto o diacilglicerol é lipossolúvel e se difunde no plano da membrana plasmática.
- Eles se ligam a proteínas sinalizadoras específicas ou proteínas efetoras e alteram sua conformação e o seu comportamento.

Via de sinalização hipotética

Figura 15-17 Via de sinalização intracelular hipotética, desde o receptor de superfície até o núcleo. Neste exemplo, uma série de proteínas sinalizadoras e mediadores intracelulares pequenos transmitem o sinal extracelular para o núcleo, causando mudanças na expressão gênica. O sinal é modificado (transduzido), amplificado, distribuído e modulado ao longo da via. Uma vez que muitas das etapas podem ser afetadas por outros sinais extra e intracelulares, o efeito final de um sinal extracelular depende de múltiplos fatores que afetam as células (ver Figura 15-8). No final, a via de sinalização ativa (ou inativa) proteínas efetoras que alteram o comportamento celular. Neste exemplo, o efetor é uma proteína de regulação que ativa a transcrição gênica. Apesar da figura mostrar proteínas sinalizadoras individuais executando uma única função, na verdade elas apresentam, frequentemente, mais do que uma função; as proteínas de suporte, por exemplo, com frequência atuam na ancoragem de várias proteínas sinalizadoras a uma determinada estrutura intracelular. A maioria das vias de sinalização que vão ao núcleo é mais direta do que a do exemplo, que não é baseado em uma via conhecida.



bbc1_13_14_amplificacao_sinal(1).swf

Detectores de coincidência

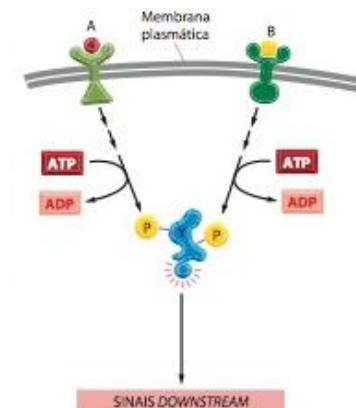


Figura 15-20 Integração de sinais. Os sinais extracelulares A e B ativam diferentes vias de sinalização intracelulares, que levam à fosforilação de diferentes sítios da proteína Y. Esta é ativada somente quando ambos os sítios forem fosforilados, ou seja, é ativada somente quando os sinais A e B estiverem presentes simultaneamente. Tais proteínas são chamadas de detectores de coincidência.

Muitas proteínas de sinalização intracelular atuam como comutadores moleculares que são ativados por fosforilação ou por ligação ao GTP

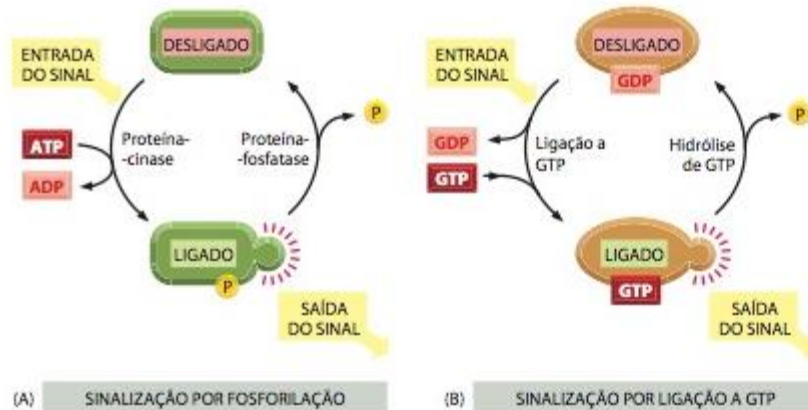
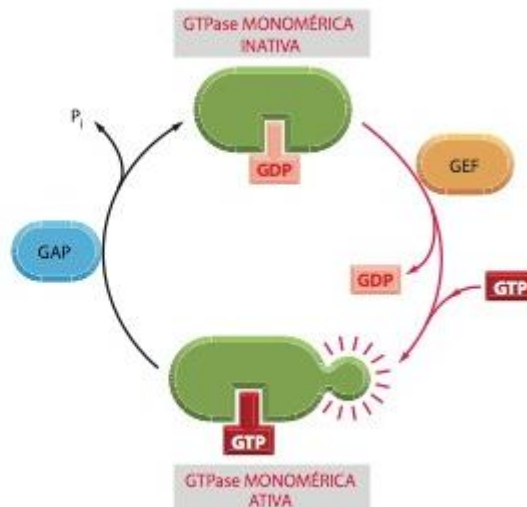


Figura 15-18 Dois tipos de proteínas sinalizadoras intracelulares que atuam como comutadores moleculares. Apesar de um tipo ser ativado por fosforilação e o outro pela ligação ao GTP, em ambos os casos, a adição de um grupo fosfato "liga" o estado de ativação da proteína, enquanto a remoção do fosfato "desliga" este estado. (A) Uma proteína-cinase adiciona covalentemente um fosfato do ATP na proteína sinalizadora, e uma proteína-fosfatase remove o fosfato. Apesar de não estarem na figura, algumas proteínas são ativadas por desfosforilação e não por fosforilação. (B) Uma proteína de ligação a GTP é induzida a trocar seu GDP por GTP, o que a ativa; esta proteína é autoinativada quando hidrolisa seu GTP a GDP.

Figura 15-19 Regulação de uma GTPase monomérica. As proteínas de ativação da GTPase (GAPs) inativam a proteína por estimularem a hidrólise de seu GTP a GDP, o qual permanece firmemente ligado à GTPase inativada. Fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) a ativam por estimularem a liberação do GDP; como a concentração citosólica do GTP é 10 vezes maior do que a do GDP, logo após a liberação do GDP, a proteína liga GTP e torna-se, assim, ativa.



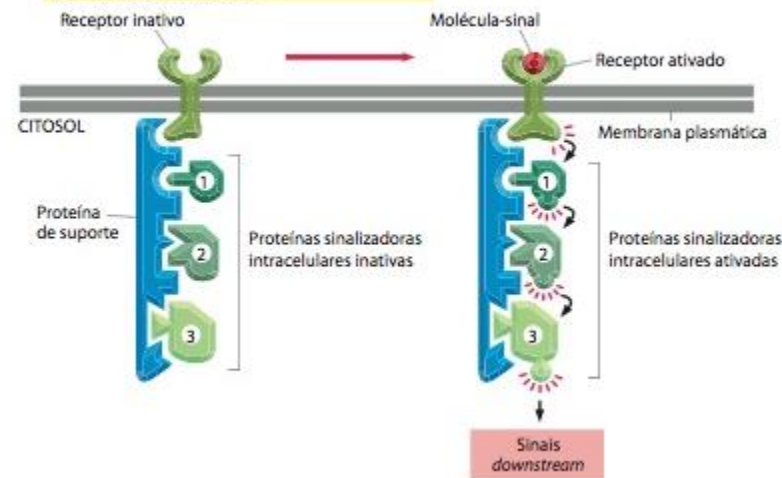
Nem todos os comutadores dependem de fosforilação ou ligação a GTP algumas proteínas comutam por se ligarem a outras proteínas sinalizadoras, um mediador molecular pequeno ou uma modificação covalente como ubiquitinação.

Os complexos de sinalização intracelular aumentam a velocidade, a eficiência e a especificidade da resposta

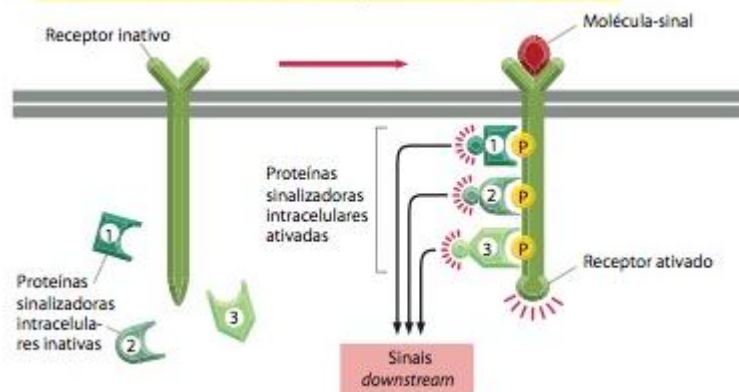
- Uma estratégia para conseguir especificidade e evitar a comunicação cruzada das vias de sinalização é usar proteínas de suporte, que organizam grupos de proteínas de sinalização em complexos de sinalização.
- O suporte mantém as proteínas muito próximas e os componentes podem interagir em concentrações locais altas e podem ser ativados sequencialmente, de forma rápida, seletiva, em resposta a um sinal extracelular apropriado, evitando a comunicação cruzada indesejada com outras vias.

Os complexos de sinalização intracelular aumentam a velocidade, a eficiência e a especificidade da resposta

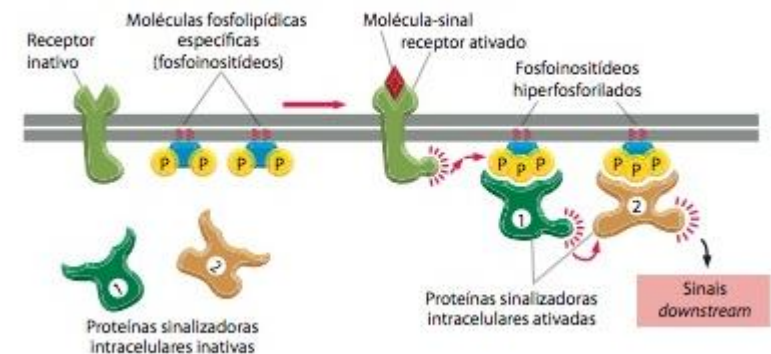
(A) PRÉ-FORMAÇÃO DO COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO NA PROTEÍNA DE SUPORTE



(B) MONTAGEM DO COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO NO RECEPTOR ATIVADO



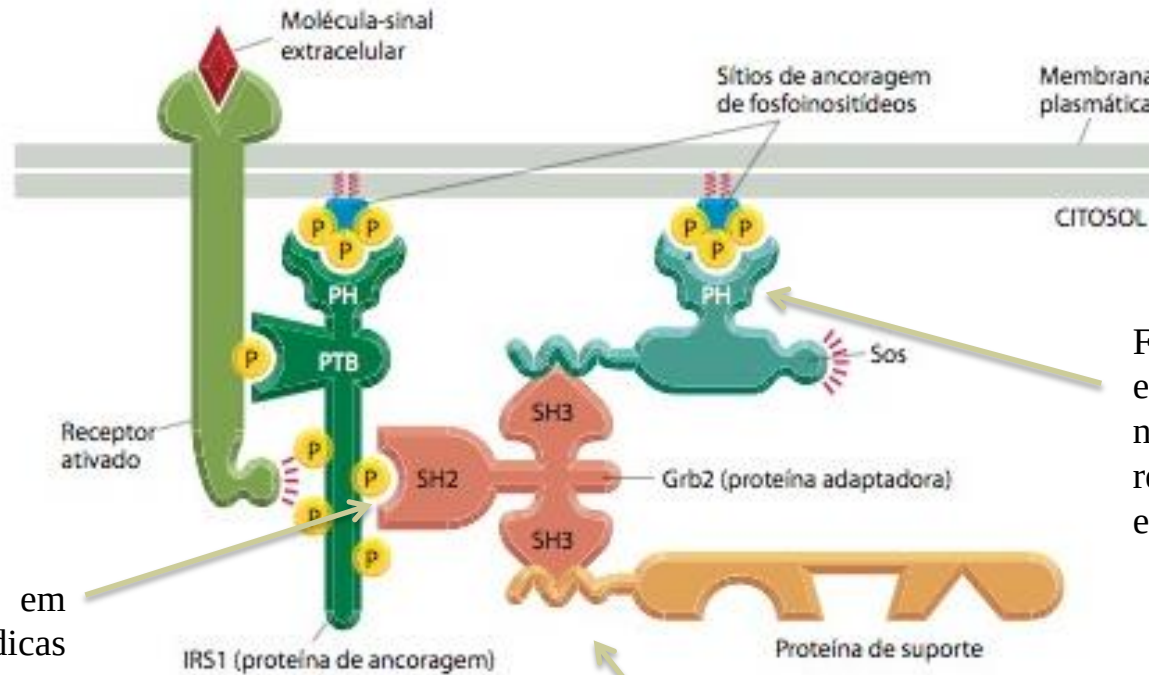
(C) MONTAGEM DO COMPLEXO DE SINALIZAÇÃO NOS SÍTIOS DE ANCORAGEM DE FOSFOINOSÍTEOS



As interações entre as proteínas de sinalização intracelular são mediadas por domínios de ligação modulares

- Muitas vezes, simplesmente reunir as proteínas de sinalização intracelular é suficiente para ativá-las.
- A montagem de complexos depende de vários **domínios de interação** pequenos e altamente conservados (uma sequência peptídica curta, uma modificação covalente – aminoácidos fosforilados ou ubiquitinados), que são encontrados em muitas proteínas de sinalização intracelular.
- Domínios de homologia com Src2 (SH2) e os domínios de ligação à fosfotirosina (PTB) – se ligam a tirosinas fosforiladas em sequências peptídicas específicas em receptores ativados ou nas proteínas de sinalização intracelular;
- Domínios de homologia com Src3 (SH3) – se ligam a sequências curtas ricas em prolina;
- Domínios de homologia com plequistrina (PH) – se ligam a grupos carregados de fosfoinosítídeos específicos produzidos na membrana em resposta a sinais extracelulares específicos;

As interações entre as proteínas de sinalização intracelular são mediadas por domínios de ligação modulares



Tirosinas fosforiladas em sequências específicas

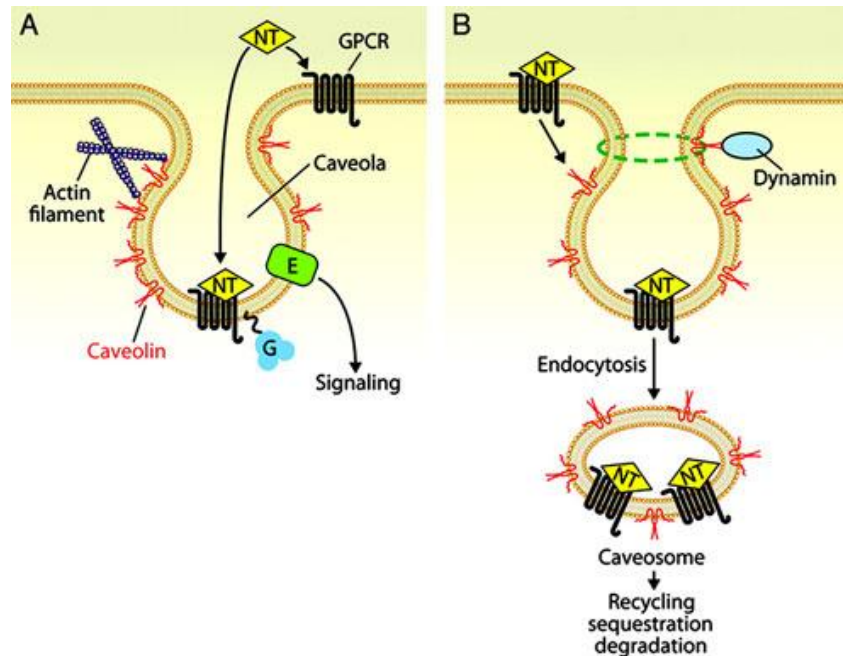
Fosfoinosítídeos específicos produzidos na membrana em resposta a sinais extracelulares específicos

Sequências curtas ricas em prolina

Receptor de insulina acoplado a um tirosina-cinase

As interações entre as proteínas de sinalização intracelular são mediadas por domínios de ligação modulares

- Alguns receptores de superfície celular e proteínas de sinalização celular podem se reunir, transitoriamente, em microdomínios específicos ricos em colesterol e glicolipídeos na bicamada lipídica da membrana plasmática;
- Essas balsas lipídicas promovem sinalização eficiente porque servem como sítios nos quais as moléculas sinalizadoras se reúnem e interagem.



As redes de sinalização intracelular utilizam circuitos de retroalimentação

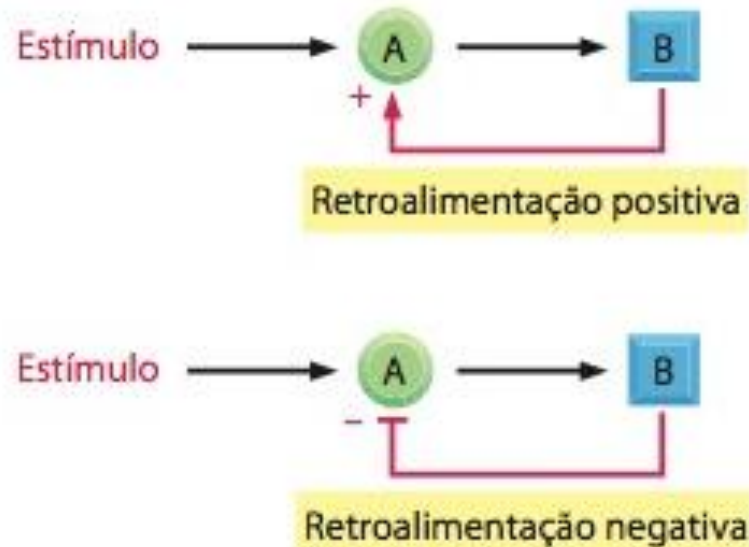


Figura 15-26 Retroalimentação positiva e negativa. Nestes exemplos simples, um estímulo ativa a proteína A, que, por sua vez, ativa a proteína B. Esta atua retroativamente sobre A, aumentando ou diminuindo sua atividade.

As células podem ajustar a sua sensibilidade ao sinal

- As células-alvo conseguem isso por meio de um processo reversível de **adaptação**, ou **dessensibilização**, pelo qual uma exposição prolongada a um estímulo reduz a resposta celular.

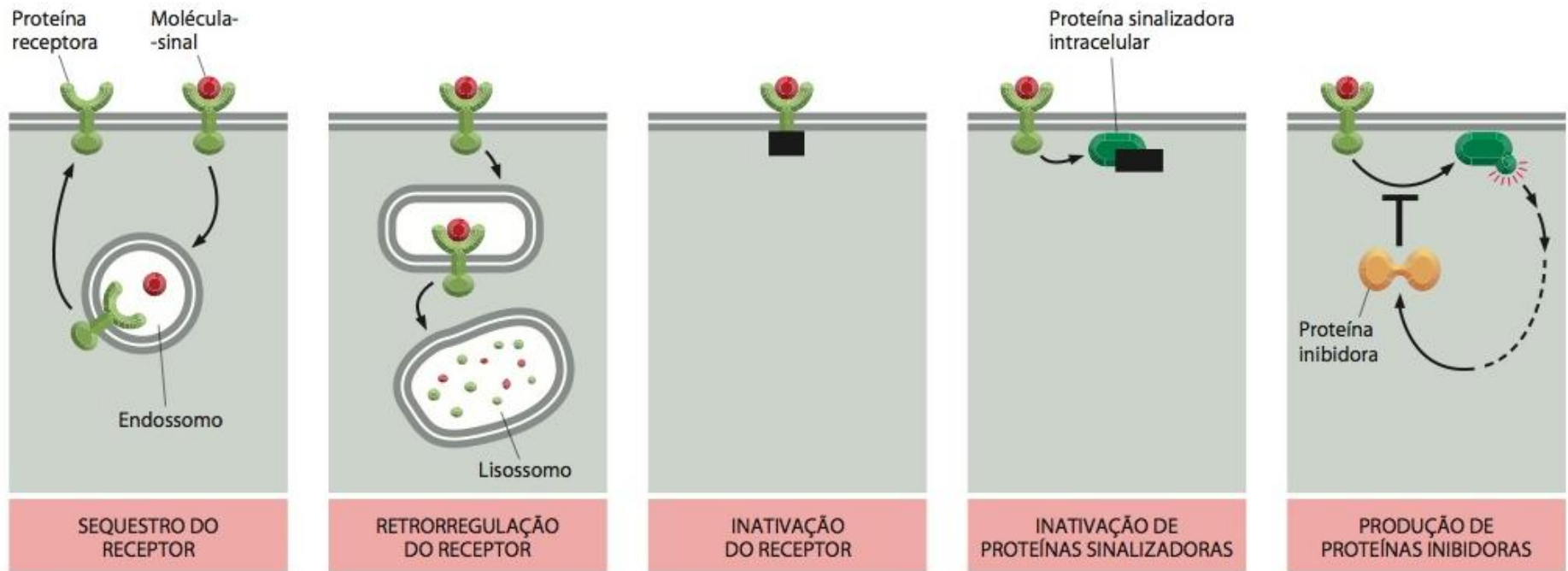


Figura 15-29 Algumas formas pelas quais as células-alvo podem se tornar dessensibilizadas (adaptadas) a uma

**SINALIZAÇÃO POR MEIO DE RECEPTORES
DE SUPERFÍCIE CELULAR ASSOCIADOS À
PROTEÍNA G (GPCRs) E MEDIADORES
INTRACELULARES PEQUENOS**

As proteínas G triméricas transmitem os sinais a partir dos receptores associados à proteína G

- A proteína G se localiza na face citoplasmática da membrana onde acopla fisicamente o receptor a enzimas ou a canais iônicos na membrana.
- A proteína G pode estar acoplada ao receptor antes da sua ativação ou se ligar a ele somente após sua ativação.
- A proteína G possui 3 subunidades – α , β e γ . No estado não estimulado a subunidade α possui GDP e a proteína está inativa



bbc1_13_14_receptor_acoplado_proteinag.swf

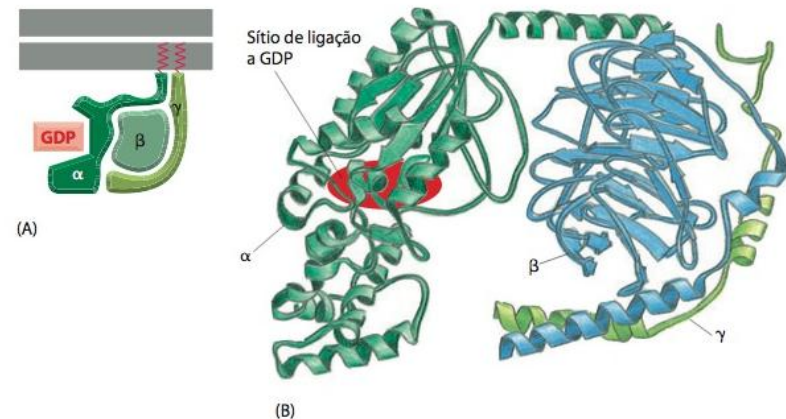
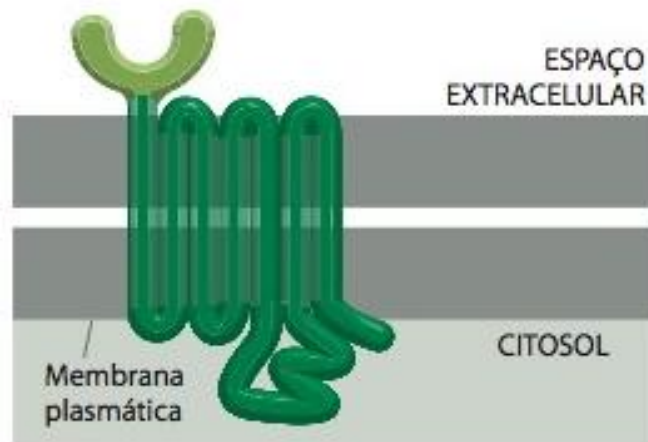


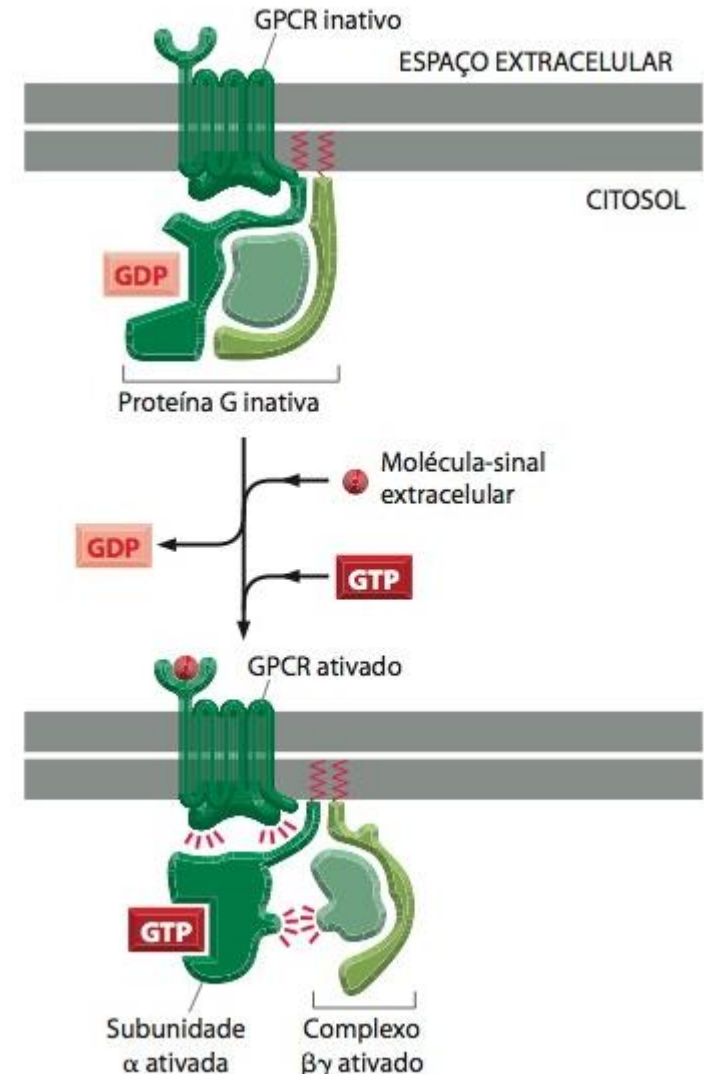
Figura 15-31 A estrutura de uma proteína G inativa. (A) Note que ambas as

As proteínas G triméricas transmitem os sinais a partir dos receptores associados à proteína G

- Quando o receptor associado é ativo, a subunidade α funciona com **um fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF)** e induz a liberação do GDP, permitindo a ligação do GTP. Essa troca causa mudança conformacional da proteína G, ativando-a.

Essa ativação pode...

- 1- Levar à dissociação do trímero em dois componentes ativados – a subunidade α e o complexo $\beta\gamma$.
- 2- Expor superfícies previamente ocultas entre a subunidade α e o complexo $\beta\gamma$, de forma que ambos possam interagir com seus alvos sem requerer a dissociação das subunidades.



As proteínas G triméricas transmitem os sinais a partir dos receptores associados à proteína G

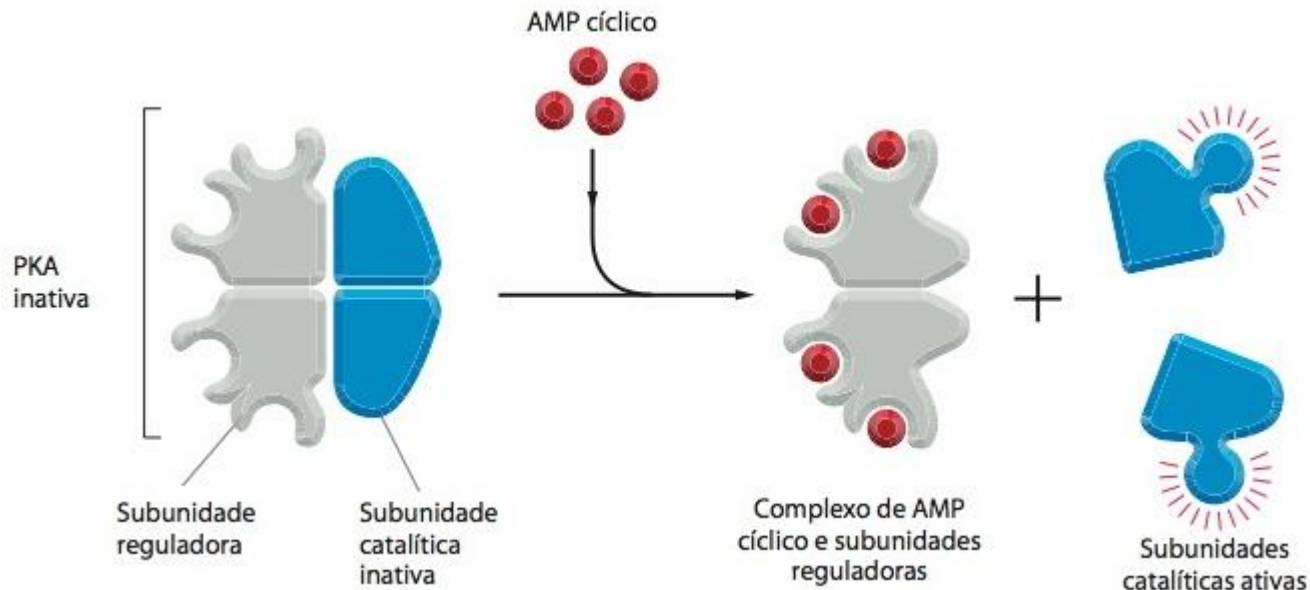
- A subunidade α é uma GTPase que se inativa ao hidrolisar o GTP ligado a ela a GDP.
- A proteína G permanece durante um curto período de tempo ativa porque a atividade GTPase é bastante aumentada quando a subunidade α se liga a uma segunda proteína, que pode ser uma proteína-alvo ou um **regulador da sinalização da proteína G (RGS)**.
- As proteínas RGS atuam como proteínas de ativação da GTPase (GAPs) específicas para a subunidade α .
- As proteínas G são classificadas de acordo com a estrutura e sequência da subunidade α , sendo que as três principais isoformas são a Gs, a Gq e a Gi.
- Podem regular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência, proliferação, Diferenciação e outros processos celulares.

Algumas proteína G (G_s e G_i) regulam a produção de AMP cíclico

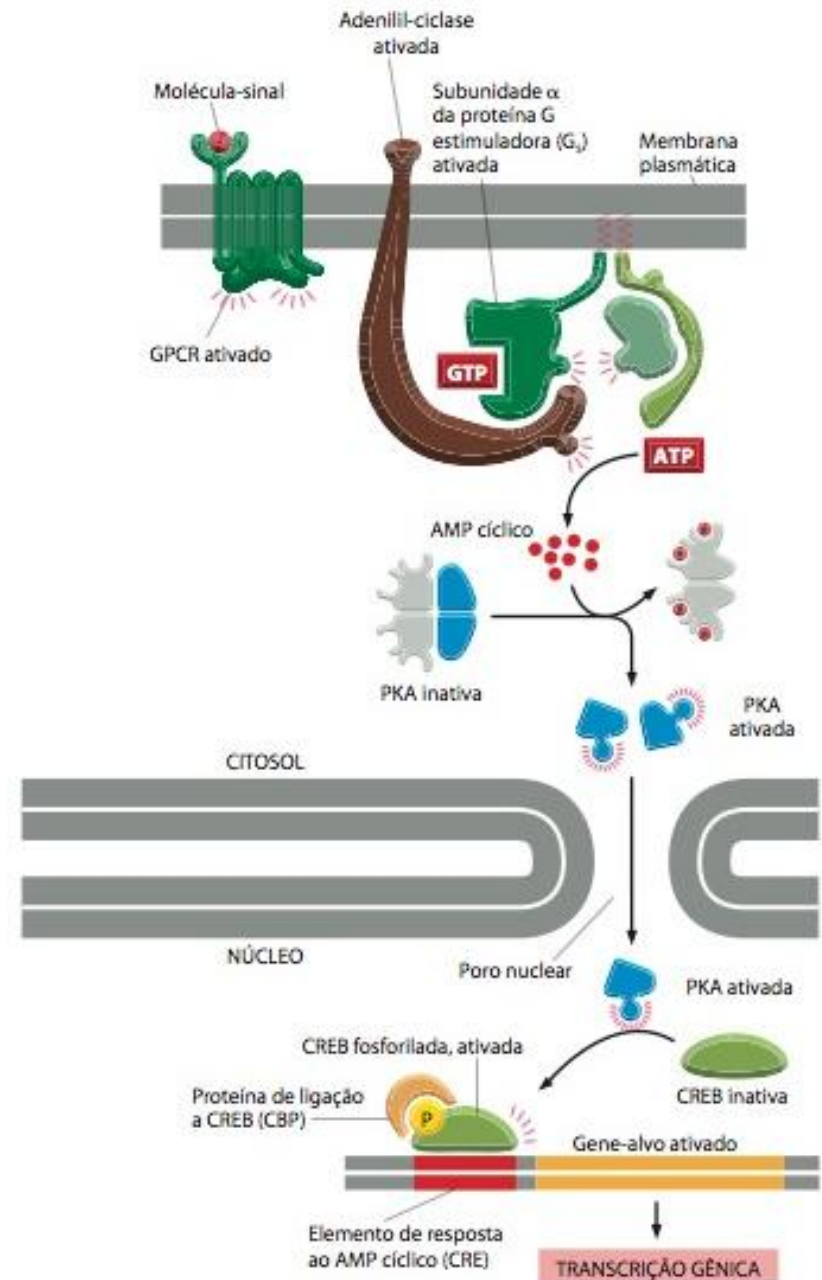
- O cAMP é sintetizado a partir do ATP por uma enzima de membrana chamada **adenilil-ciclase** e foi encontrado em todos os procariotos e células animais já estudados.
- Nos mamíferos foram identificadas 8 isoformas de adenilil-ciclase, sendo a maioria delas regulada pela proteína G ou Ca^{2+} .
- Os GPCRs que são responsáveis pelo aumento do cAMP estão acoplados a uma proteína estimuladora (G_s), que ativa a adenilil-ciclase. A proteína G inibidora (G_i) inibe a adenilil-ciclase, mas atua principalmente regulando diretamente canais iônicos.
- A toxina da cólera altera a subunidade α da G_s , de forma que ela não pode mais hidrolisar seu GTP, estimulando indefinidamente a adenilil-ciclase. A elevação prolongada dos níveis de cAMP nas células epiteliais intestinais provoca um grande influxo de Cl^- e água para o lúmen do intestino, causando diarreia grave.
- A toxina da pertussis (coqueluche) altera a subunidade α da G_i , fazendo com que ela retenha o GDP e seja incapaz de regular suas proteínas-alvo.

A proteína-quinase dependente de cAMP (PKA) faz a mediação da maioria dos efeitos do cAMP

- PKA fosforila serinas ou treoninas específicas de determinadas proteínas-alvo, inclusive proteínas de sinalização intracelular e proteínas efetoras (que diferem nos diferentes tipos celulares), regulando suas atividades.
- As subunidades reguladoras de PKA são importantes para localizar a enzima dentro da célula: *proteínas especiais de ancoragem à cinase A (AKAPs)* se ligam simultaneamente às subunidades reguladoras e a componentes do citoesqueleto ou a membrana de uma organela, confinando o complexo enzimático a um determinado compartimento celular, formando um módulo de sinalização.



- *Células delta do pâncreas endócrino* secretam o hormônio peptídico **somatostatina** em resposta aos **estímulos**: Hiperglicemia, aminoácidos aumentados, ácidos graxos aumentados e aumento dos hormônios gastrointestinais. **Ações da somatostatina**: inibição das células alfa e beta das ilhotas e também a secreção, diminuição da motilidade estomacal e do trabalho gastrointestinal.
- Função da somatostatina: Estender o período de tempo em que o alimento é assimilado no sangue, tornando-o disponível por mais tempo;
- A região reguladora do gene da somatostatina contém uma sequência curta de DNA, chamado de *elemento de resposta ao cAMP* (CRE), encontrada em muitos genes ativados por cAMP.
- A **proteína de ligação a CRE (CREB)** reconhece essa sequência.
- CREB é fosforilado por PKA que é ativada pelo cAMP.



GLUCAGON SIGNALING

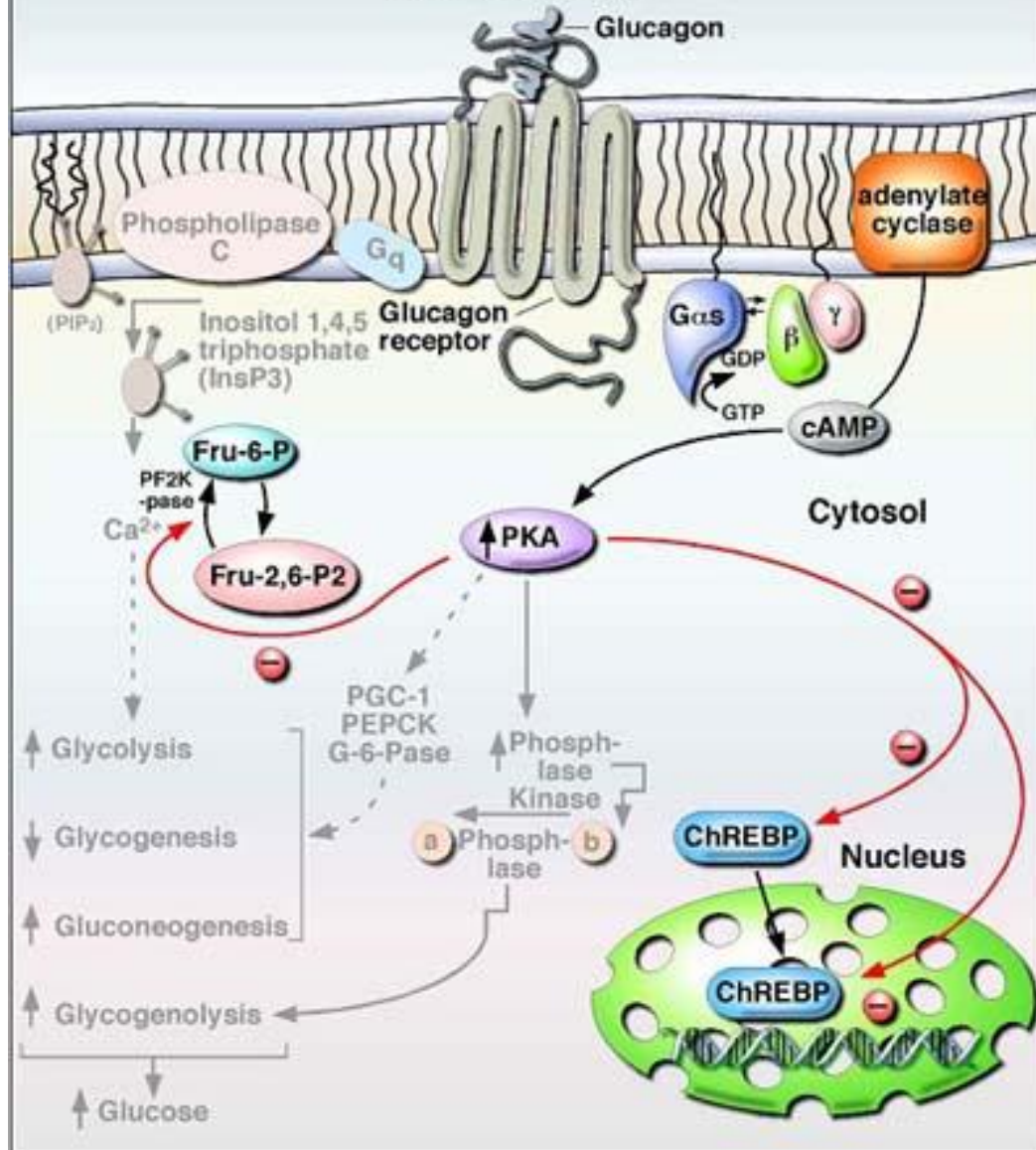


Tabela 15-1 Algumas respostas celulares induzidas por hormônios mediadas por AMP cíclico

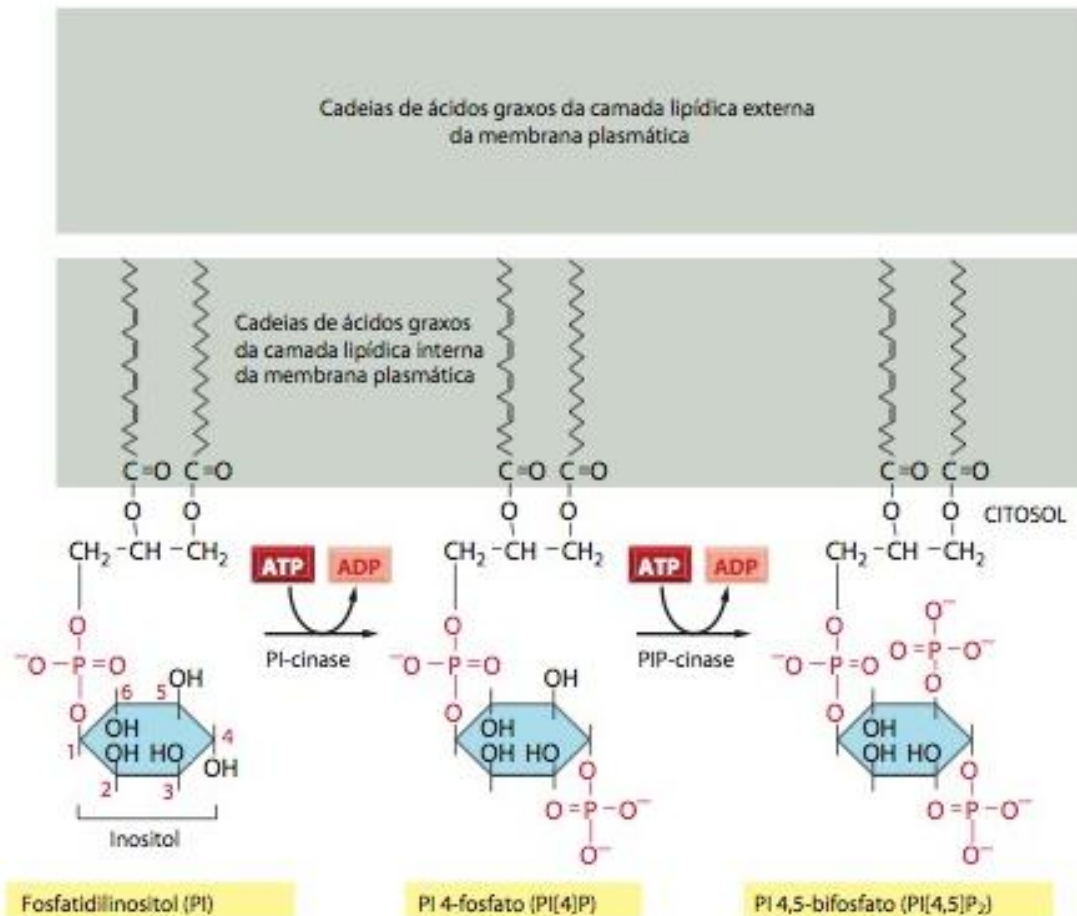
TECIDO-ALVO	HORMÔNIO	RESPOSTA PRINCIPAL
Tireoide	Hormônio estimulador da tireoide (TSH)	Síntese e secreção do hormônio da tireoide
Córtex adrenal	Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)	Secreção de cortisol
Ovário	Hormônio luteinizante (LH)	Secreção de progesterona
Músculo	Adrenalina	Degradação do glicogênio
Osso	Paratormônio	Reabsorção óssea
Coração	Adrenalina	Aumento da frequência cardíaca e da força de contração
Fígado	Glucagon	Degradação do glicogênio
Rim	Vasopressina	Reabsorção de água
Tecido adiposo	Adrenalina, ACTH, glucagon, TSH	Degradação de triglicerídeos

Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

- Muitos GPCRs exercem seus efeitos principalmente via ativação da enzima de membrana fosfolipase C- β (PLC β).
- A fosfolipase atua sobre um fosfolípido de inositol (fosfoinosítídeo) chamado de **fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2)**, presente em pequenas quantidades na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática.
- GPCRs ativam a **via de sinalização do fosfolípido de inositol** principalmente por meio da proteína G chamada G_q , que ativa PLC β .

Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

- A fosfolipase ativada age sobre PIP_2 gerando 2 produtos: *inositol 1,4,5-trifosfato* e *diacilglicerol*, nessa etapa essa via de sinalização se bifurca.



Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

- O *inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃)* é uma molécula pequena e hidrossolúvel, se difundindo pelo citosol, e atua como mediador intracelular pequeno. Quando alcança o RE ativa os **canais de liberação de Ca^{2+} controlados por IP₃** na membrana do RE e mitocôndrias abrindo-os.
- O íon cálcio funciona como um terceiro mensageiro que desencadeia respostas intracelulares, como exocitose nos neurônios e nas células endócrinas, contração muscular e rearranjos do citoesqueleto durante os movimentos amebóides.
- Quando os estoques de Ca^{2+} são depletados, eles são repostos pelos *canais de Ca^{2+} de reposição* na membrana plasmática e uma proteína sensora de Ca^{2+} na membrana do RE, em regiões onde as duas membranas estão próximas.
- Vários mecanismos agem para terminar a resposta inicial do Ca^{2+} :
 - 1- O IP₃ é desfosforilado rapidamente, por fosfatases específicas, formando IP₂.
 - 2- O IP₃ é fosforilado por cinases lipídicas específicas, formando o IP₄ (que pode agir como outro mediador intracelular).
 - 3- O Ca^{2+} que entra no citosol é rapidamente bombeado, principalmente para fora da célula.

Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

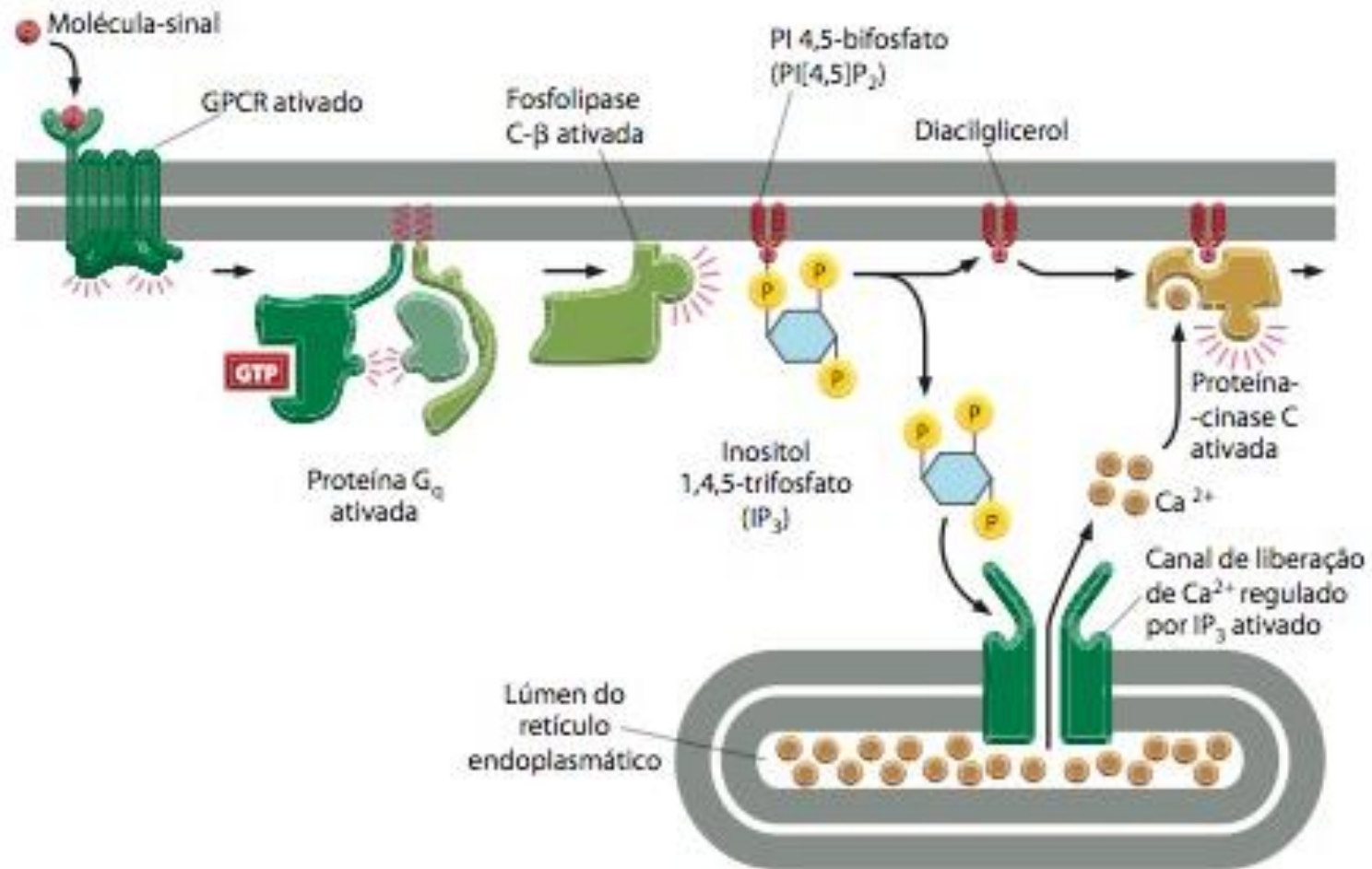


Figura 15-39 Como os receptores associados à proteína G aumentam o Ca^{2+} citosólico e ativam a proteína-cinase C. Os receptores ativados estimulam a proteína G_q , que ativa a fosfolipase C- β . A fosfolipase C- β cliva o PI 4,5-bifosfato ($PI[4,5]P_2$) em diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). O IP_3 se liga a um canal de liberação de Ca^{2+} regulado por IP_3 ativado, abrindo-o e liberando Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citosol. O Ca^{2+} liberado, juntamente com o diacilglicerol, ativa a proteína-cinase C.



Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

- O *diaciglicerol* também é um mediador intracelular pequeno, mas permanece na membrana plasmática, onde tem vários papéis potenciais de sinalização.
- O diacilglicerol pode ser clivado e liberar o ácido araquidônico, que pode agir como um mensageiro, ou ser usado na síntese de outras moléculas-sinal lipídicas pequenas, chamadas *eicosanóides*.
- A maioria das células de vertebrados produz eicosanóides, incluindo as prostaglandinas, que participam de muitas atividades biológicas, como nas respostas inflamatória e a dor.
- **A maioria dos fármacos anti-inflamatórios (aspirina, ibuprofeno e cortisona) atua, pelo menos em parte, inibindo sua síntese.**
- A transdução de sinais mediada pela proteína G_q apresenta importantes funções no cérebro, como a transmissão neuronal, a plasticidade sináptica e a sobrevivência dos neurônios. Levando isso em conta, estudos mostraram que a deficiência da proteína G_q tem um importante papel nos processos de neurodegeneração na doença de Alzheimer.

Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

- A segunda função do diaciglicerol é ativação de uma enzima serinatreonina-cinase, denominada **Proteína-cinase C (PKC)**, dependente de Ca^{2+} .
- O aumento do Ca^{2+} citosólico induzido por IP3 faz com que PKC se desloque do citosol para face citoplasmática da membrana, que é ativada pelo de Ca^{2+} , DAG e fosfatidilserina (-) – *PKCs típicas*.
- Diferentes PKCs fosforilam diferentes substratos, principalmente porque proteínas de ancoragem ou de suporte as retêm em diferentes compartimentos celulares.

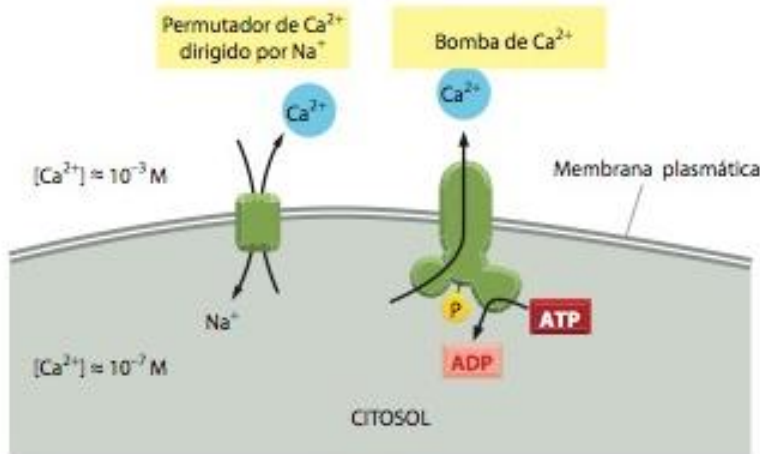
Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípido de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

Tabela 15-2 Algumas respostas celulares nas quais receptores associados à proteína G ativam a fosfolipase C- β

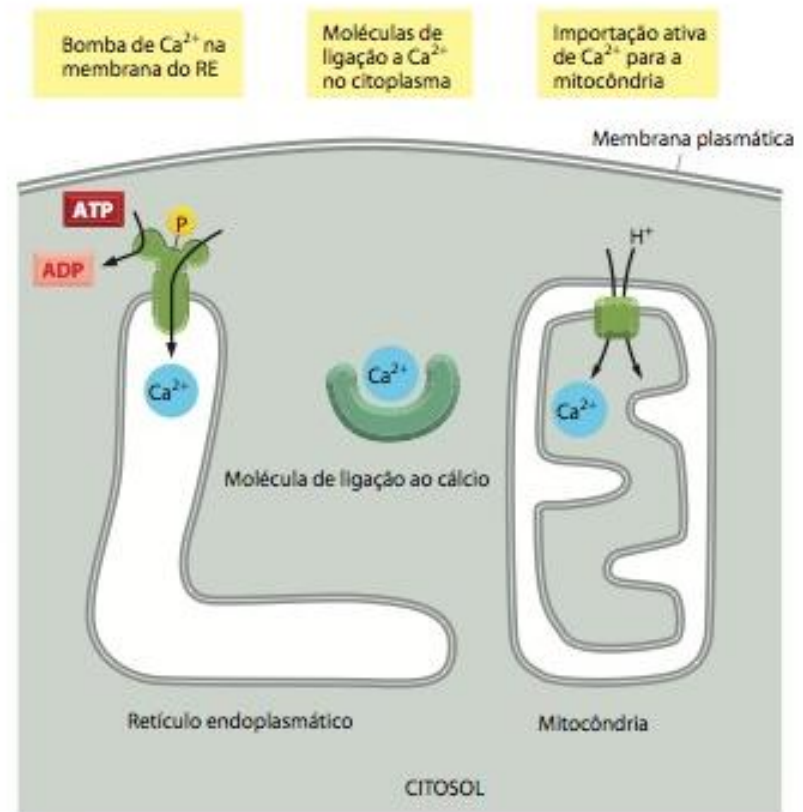
TECIDO-ALVO	MOLÉCULA-SINAL	RESPOSTA PRINCIPAL
Fígado	Vasopressina	Degradação do glicogênio
Pâncreas	Acetilcolina	Secreção de amilase
Músculo liso	Acetilcolina	Contração muscular
Plaquetas	Trombina	Agregação plaquetária

Algumas proteínas G (G_q) ativam a via de sinalização do fosfolípídeo de inositol pela ativação da fosfolipase C- β

Figura 15-41 Principais formas pelas quais as células mantêm uma concentração muito baixa de Ca^{2+} livre no citosol. (A) O Ca^{2+} é bombeado ativamente do citosol para o exterior da célula. (B) O Ca^{2+} é bombeado do citosol para o retículo endoplasmático e para a mitocôndria, e várias moléculas citosólicas se ligam firmemente ao Ca^{2+} livre.



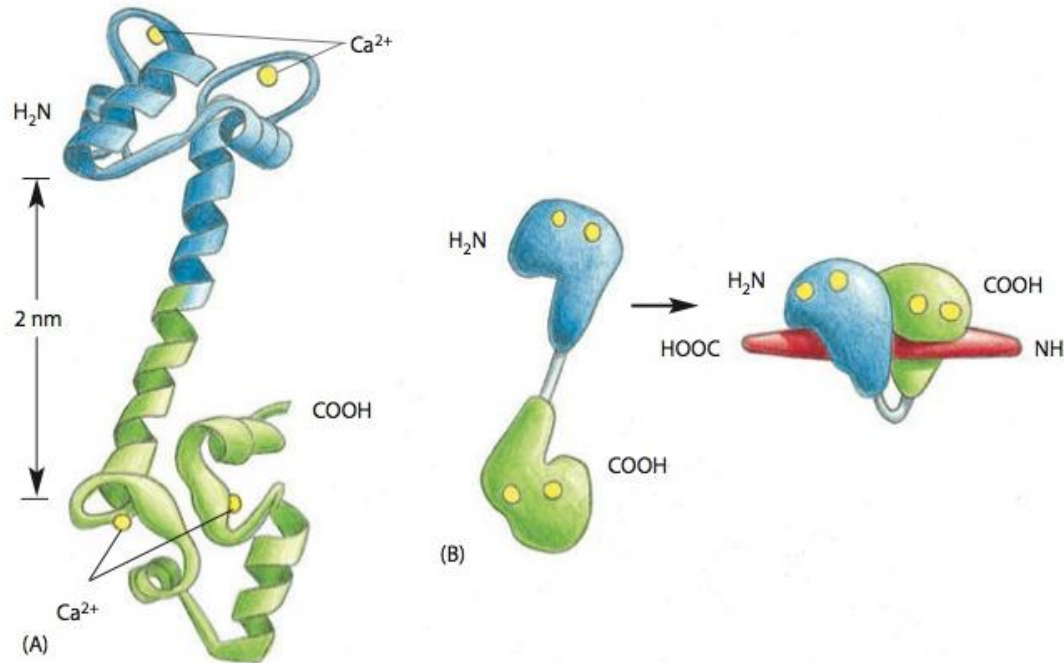
(A)



(B)

As proteína-cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaM-cinases) fazem a mediação de muitas das respostas aos sinais de Ca^{2+} nas células animais

- Várias proteínas de ligação a Ca^{2+} ajudam na transmissão do sinal citosólico de Ca^{2+} ;
- **Calmodulina** é a mais importante e é encontrada em todas as células eucarióticas;
- A calmodulina serve como uma subunidade reguladora permanente de um complexo enzimático, mas, na maioria das vezes, a ligação do Ca^{2+} permite a ligação da proteína a várias outras proteínas-alvo na célula, alterando suas atividades;

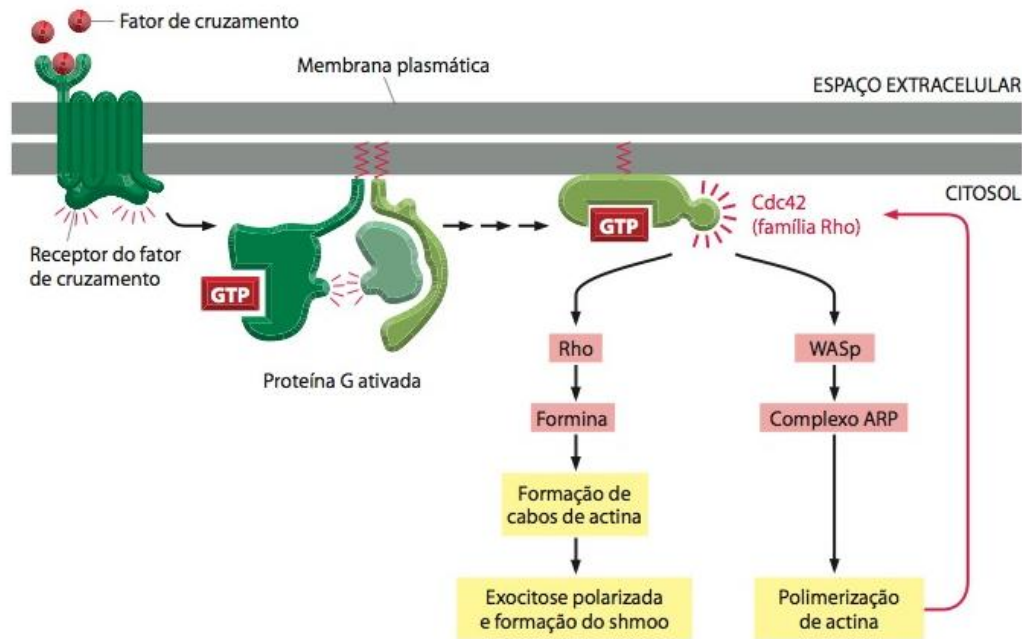


As proteína-cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaM-cinases) fazem a mediação de muitas das respostas aos sinais de Ca^{2+} nas células animais

- Alvos regulados pela calmodulina: muitas enzimas e proteínas de transporte de membrana;
- Ex.: Ca^{2+} /calmodulina ativa uma bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática que usa a hidrólise do ATP para transportar o íon para fora da célula. Quando a concentração intracelular do Ca^{2+} aumenta, a bomba é ativada, auxiliando no retorno do íon aos níveis citosólicos normais;
- Muitos dos efeitos do Ca^{2+} são indiretos e mediados por fosforilações catalisadas por uma família de proteína-cinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaM-cinases), como a CREB;

Algumas proteínas G regulam canais iônicos diretamente

- A subunidade α de um tipo de proteína G (chamada de G_{12}) ativa um GEF que converte uma GTPase monomérica da família Rho em sua forma ativa capaz de regular o citoesqueleto de actina



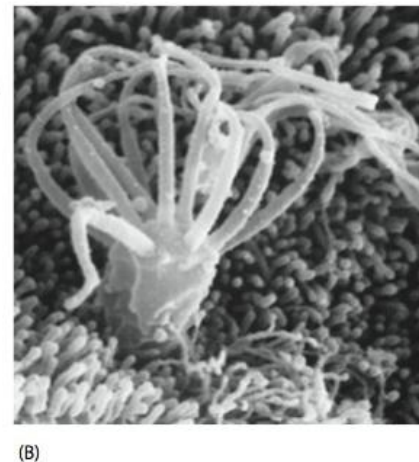
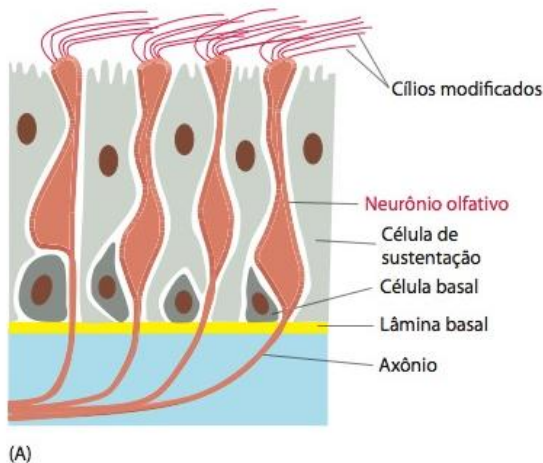
- Em alguns outros casos, as proteínas G ativam ou inativam, diretamente, os canais iônicos na membrana plasmática da célula-alvo, alterando, assim, a permeabilidade aos íons e, por conseguinte, a excitabilidade da membrana.

Algumas proteínas G regulam canais iônicos diretamente

- A acetilcolina, liberada pelo nervo vago reduz a velocidade e a força de contração do músculo cardíaco mediada por uma classe especial de receptores de acetilcolina que ativam a proteína G_i ;
- A subunidade α da proteína G_i , uma vez ativada, inibe a adenilil-ciclase (conforme descrito previamente), enquanto as subunidades $\beta\gamma$ se ligam aos canais de K^+ da membrana plasmática das células musculares cardíacas, abrindo-os.
- A abertura destes canais dificulta a despolarização da célula, o que contribui para o efeito inibitório da acetilcolina no coração;
- Outras proteínas G regulam a atividade de canais iônicos de forma mais indireta, pela estimulação da fosforilação dos canais (PKA, PKC ou CaM-cinase) ou pela produção ou destruição de nucleotídeos cíclicos que ativam ou inativam diretamente esses canais. Estes canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos têm um papel crítico no olfato e na visão;

O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos

- Neurônios olfativos especializados na mucosa nasal reconhecem odores por meio de GPCRs específicos, chamados de receptores olfativos, que estão localizados na superfície dos cílios modificados que se projetam das células;
- Esses receptores atuam por meio do cAMP e quando estimulados pela ligação de um odorante, ativam uma proteína G específica do olfato (conhecida como G_{olf}) que, por sua vez, ativa uma adenilil-ciclase;
- O aumento resultante no cAMP abre os canais catiônicos controlados por cAMP, permitindo um influxo de Na^+ , o que despolariza a membrana do neurônio olfativo e inicia um impulso nervoso que percorre o axônio até o cérebro;



O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos

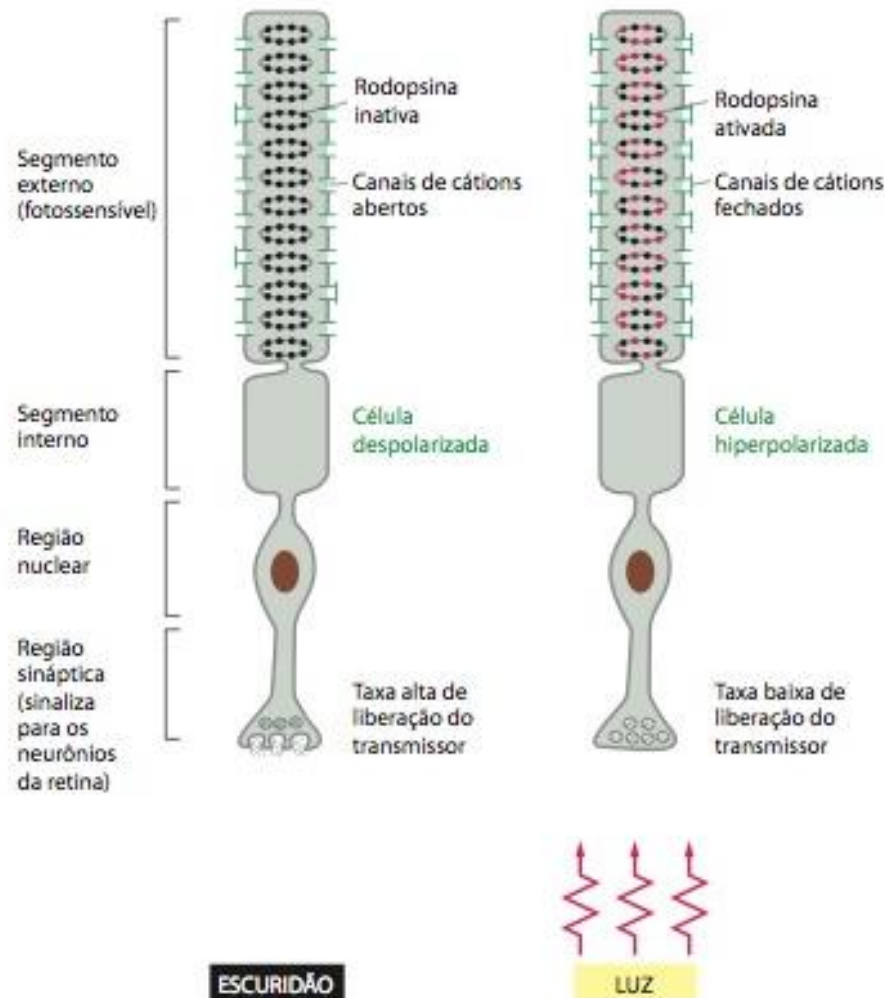
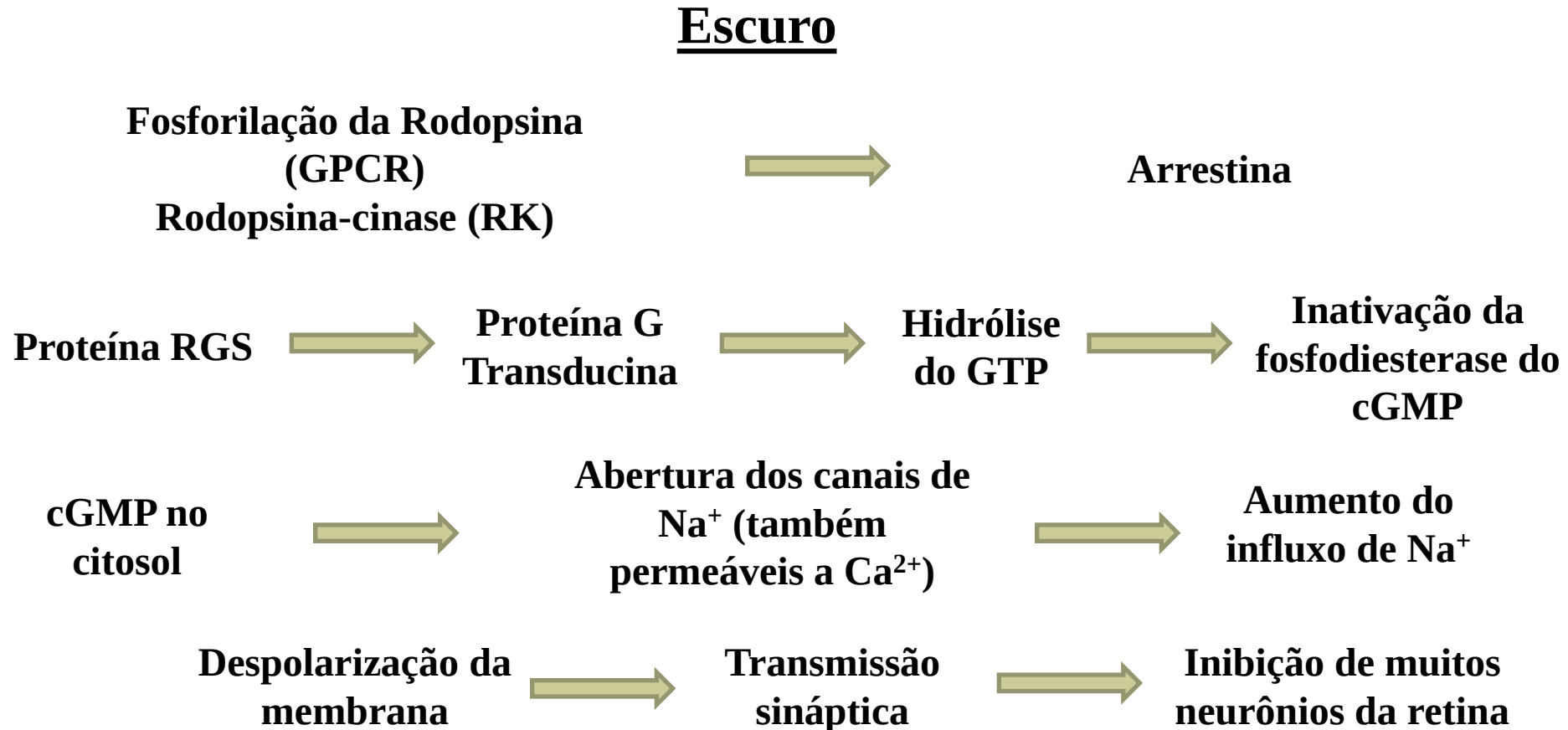


Figura 15-49 Resposta do bastonete ao estímulo luminoso. Os fótons são absorvidos pelas moléculas de rodopsina nos discos do segmento externo. Isso leva ao fechamento dos canais de cátions na membrana plasmática, o que a hiperpolariza e reduz a taxa de liberação do neurotransmissor na região sináptica. Como o neurotransmissor inibe muitos neurônios pós-sinápticos da retina, a luz serve para liberá-los da inibição e, assim, excitá-los.

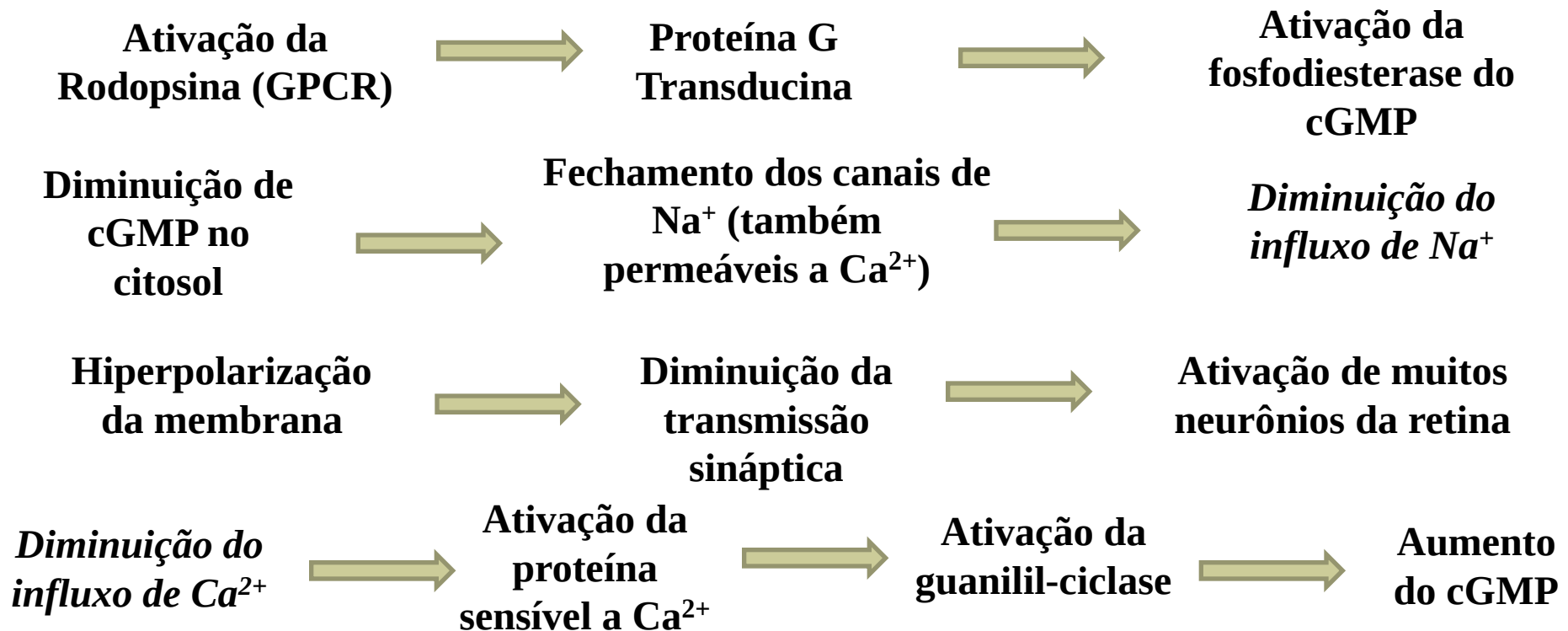
O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos

- Os bastonetes (responsáveis pela visão monocromática no escuro) utilizam vários circuitos de retroalimentação negativa para permitir que as células retornem rapidamente a um estado escuro de repouso que se segue a um sinal luminoso, uma exigência para que a brevidade do sinal seja percebida.



O olfato e a visão dependem de receptores associados à proteína G que regulam canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos

Luz



Os mediadores intracelulares e as cascatas enzimáticas amplificam os sinais extracelulares



Figura 15-50 Amplificação da cascata catalítica, induzida pela luz, nos bastonetes de vertebrados. As setas vermelhas indicam onde as etapas de amplificação ocorrem, e a espessura das setas indica a magnitude aproximada da amplificação.

A dessensibilização dos receptores associados à proteína G depende da fosforilação do receptor

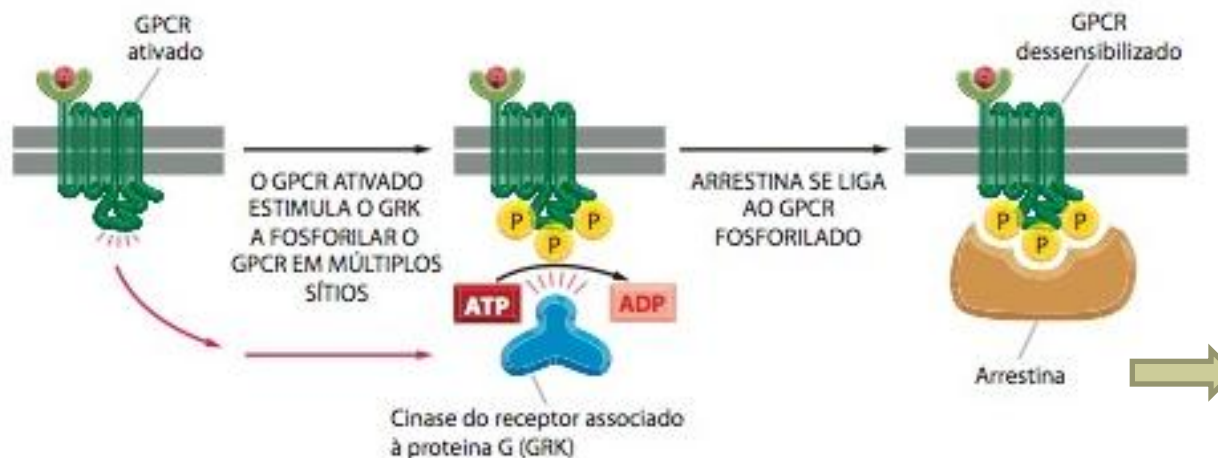
- Existem 3 formas de dessensibilização de GPCRs:

1- **Inativação** - eles se alteram de forma a não interagir mais com as proteínas G;

2- **Sequestro** – eles são temporariamente removidos para o interior da célula;

3- **Retroregulação** – eles são destruídos nos lisossomos após internalização;

- A dessensibilização dos receptores depende da sua fosforilação pelas enzimas PKA, PKC ou por um membro da família das **cinases dos GPCRs (GRKs)**



Impede a interação com a proteína G ou induz a endocitose do GPCR