

# MECANISMOS DE RECONHECIMENTO INTRACELULAR. IMPLICAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS

M. CARMO-FONSECA

Instituto de Histologia e Embriologia. Faculdade de Medicina de Lisboa

## RESUMO

A endocitose mediada por receptores é um mecanismo que permite à célula controlar a captação de nutrientes e os níveis dos receptores de superfície. Uma vez formado o complexo receptor ligando este é interiorizado e incorporado num compartimento ácido, o endossoma. Aí, alguns complexos dissociam-se, sendo as moléculas de ligando incorporadas em lisossomas e os receptores reciclados para a superfície (esta é a via seguida pelas LDL e vários nutrientes como o ferro). Outros complexos são enviados directamente para os lisossomas onde são degradados (é o caso dos factores de crescimento e respectivos receptores). Outros ainda não são afectados e passam para outro domínio da membrana plasmática (transcitose). Alguns receptores da membrana plasmática são reciclados após passagem pelo aparelho de Golgi. Este organito funciona como a grande central de tráfego intracelular, seleccionando e segregando proteínas e membranas com diferentes destinos.

## SUMMARY

### Intra-cellular reconnaissance mechanisms. Physical and pathological implications

The cell has two distinct organelle systems specialized in the sorting of membrane molecules: the Golgi complex for outward (exocytic) membrane traffic and the endosomal system for inward (endocytic) membrane traffic. Receptor mediated endocytosis allows the cell to internalize specific molecules like LDL, Fe, growth factors and IgA. Within the cell these molecules can follow different pathways, while their receptors are recycled to the plasma membrane.

## INTRODUÇÃO

As células eucariotas em geral e as células humanas em particular caracterizam-se pela sua complexa compartimentação em organitos especializados delimitados por membranas.

De que modo a célula selecciona as diferentes proteínas destinadas a organitos específicos e controla os mecanismos de transporte de membrana entre organitos, mantendo no entanto a integridade de cada compartimento?

Esta pergunta tem constituído um tema central de investigação em biologia celular, acumulando-se actualmente conhecimentos que permitem uma resposta parcial. Muitos destes conhecimentos derivaram do estudo morfológico, bioquímico e molecular de situações patológicas humanas constituindo um bom exemplo de interacção entre Medicina e Biologia Celular. A identificação de perturbações funcionais resultantes de alterações nos genes que codificam os receptores para LDL (Low Density Lipoproteins) foi em grande parte responsável pelo desvendar dos mecanismos de endocitose mediada por receptores. Os processos de endocitose mediada por receptores são ainda responsáveis, entre outros, pela captação de ferro e pela secreção de imunoglobulinas A.

Neste trabalho, apresenta-se uma revisão dos conhecimentos mais recentes sobre os mecanismos que permitem à célula reconhecer distintas proteínas e transportá-las ou segregá-las em compartimentos específicos.

## DINÂMICA INTRACELULAR

Nas células eucariotas o núcleo é limitado pelo envólucro nuclear e o citoplasma encontra-se dividido em compartimentos limitados por uma ou duas membranas, onde se concentram enzimas e outras proteínas responsáveis pelo desempenho de funções específicas. O espaço do citoplasma fora de qualquer organito é geralmente denominado citosol pelos bioquímicos. Corresponde ao sobrenadante obtido após sedimentação de todos os organitos celulares. Nele estão contidos os ribossomas livres, proteínas do citoesqueleto e enzimas do metabolismo intermediário (glicólise e neoglicogénese, síntese de açúcares, ácidos gordos, nucleótidos e aminoácidos).

As membranas celulares são estruturas dinâmicas, passíveis de fusão e reciclagem. Das cisternas do retículo endoplasmático (ER) e aparelho de Golgi destacam-se continuamente vesículas que ao fundirem-se com outros organitos (por exemplo lisossomas ou grânulos de secreção) transportam as membranas e o conteúdo de um organito celular para outro.

As proteínas de secreção são incorporadas, à medida que vão sendo traduzidas pelos ribossomas, nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). Daí são transportadas para o aparelho de Golgi, onde sofrem uma série de modificações e são *empacotadas* em grânulos de secreção. Estes libertam o seu conteúdo para o meio extracelular por fusão

com a membrana plasmática (exocitose). Idêntico trajecto seguem as proteínas da membrana plasmática e as enzimas lisossômicas, ocorrendo a separação à saída do aparelho de Golgi. Em contraste, as proteínas e enzimas destinadas aos peroxissomas e mitocôndrias são traduzidas no citoplasma por ribossomas livres e subsequentemente importadas de modo selectivo para os respectivos organitos, sem nunca entrarem para o lumen das cisternas do RER e aparelho de Golgi.

Durante o processo secretório, a exocitose conduz a um aumento constante da superfície da membrana plasmática, compensado por um mecanismo de re-interiorização de membrana, a endocitose. A membrana endocitada forma vesículas que podem fundir-se com lisossomas ou atingir o aparelho de Golgi donde são novamente incorporadas no processo de exocitose, completando o ciclo de reciclagem.

### SÍNTESE DAS PROTEÍNAS DE SECREÇÃO, PROTEÍNAS MEMBRANARES E LISSOSSÔMICAS<sup>1,2</sup>

Todas as proteínas celulares, com excepção das codificadas por genes mitocondriais, começam a ser traduzidas no citoplasma por ribossomas livres, segundo o *molde* do respectivo mRNA. As proteínas destinadas à secreção, membrana plasmática e lisossomas possuem contudo uma particularidade: uma sequência inicial de aminoácidos que funciona como sinal. O sinal é reconhecido por uma partícula ribonucleoproteica do citoplasma, a SRP (Signal Recognition Particle), que bloqueia a tradução até o ribossoma se associar ao RER. A proteína em formação passa assim a ser incorporada nas cisternas do RER à medida que vai sendo traduzida. No lumen do RER a sequência de sinal é clivada e a proteína é glicosilada. O processo de glicosilação consiste na transferência, a partir de um glicolípido específico da membrana do retículo, de um resíduo complexo oligossacáridico comum para todas as proteínas.

### PROCESSAMENTO DAS PROTEÍNAS NO APARELHO DE GOLGI<sup>2-5</sup>

As proteínas recém sintetizadas e glicosiladas no retículo parecem ser transportadas para o aparelho de Golgi no interior de vesículas que se destacam de regiões de transição do RER e se fundem com as cisternas do Golgi. Neste organito distinguem-se três compartimentos, sequencialmente atravessados pelas proteínas em trânsito: a região cis, a região trans e a cadeia transgolgiiana, TGN (trans-Golgi network). Cada compartimento possui enzimas próprios, nomeadamente glicosiltransferases, que catalizam a adição ou remoção de resíduos glúcídicos específicos às proteínas. Por exemplo, os resíduos de ácido siálico são adicionados às proteínas por uma sialiltransferase presente apenas na região trans e TGN.

O TGN é o último compartimento onde se co-localizam as proteínas de secreção, da membrana e dos lisossomas. Admite-se por isso ser a este nível que ocorre a selecção dos diversos tipos de proteínas (Fig. 1).

### POLARIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA<sup>1,6,7</sup>

Muitas células epiteliais, em particular nos epitélios de revestimento, possuem dois domínios na membrana plasmática, com composição proteica distinta. Os domínios são separados pelas junções de tipo oclusivo (*tight junctions* ou *zonulae occludens*) que impedem a passagem das proteínas entre as duas regiões da membrana.

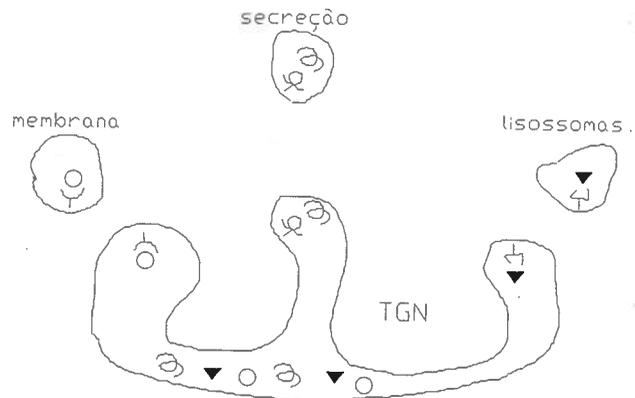
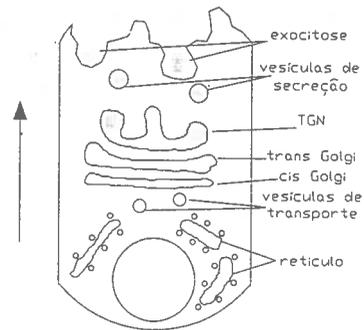


Figura 1 — A cadeia trans-golgiiana (TGN) é um compartimento de forma irregular, tubulo-vesicular, donde se destacam vesículas. A selecção das diferentes proteínas poderá ser consequência da presença de receptores específicos em diferentes regiões da membrana do TGN, posteriormente incorporadas em distintas vesículas.

O enterócito constitui um exemplo típico de célula polarizada: os domínios apical e baso-lateral da membrana possuem enzimas e permeases distintas que transportam glucose e aminoácidos do lumen intestinal para o sangue (Fig. 2). No enterócito os microtúbulos parecem desempenhar um importante papel na manutenção da polaridade da membrana, como demonstram várias experiências utilizando drogas que despolimerizam especificamente este componente do citoesqueleto. Dada a orientação preferencial dos microtúbulos ao longo do eixo do enterócito, terminando junto às microvilosidades, e o facto de as drogas anti-microtúbulos provocarem uma fragmentação e deslocamento do aparelho de Golgi, foi sugerido que os microtúbulos poderiam funcionar como trilhos orientadores do transporte das vesículas destinadas à membrana apical.

É possível manter em cultura células epiteliais polarizadas. Quando estas células são infectadas simultaneamente pelo vírus da estomatite vesiculosa (VSV) e vírus da gripe, a glicoproteína G do vírus VSV detecta-se apenas no domínio baso-lateral da membrana, enquanto a glicoproteína HA do vírus da gripe se encontra exclusivamente no domínio apical. Técnicas de imunocitoquímica utilizando anticorpos contra cada uma destas proteínas demonstram que ambas coexistem no RER e aparelho de Golgi. Deve portanto ser à saída do Golgi (TGN?) que as proteínas se separam, sendo transportadas por vesículas distintas destinadas a fundirem-se especificamente com um ou outro domínio da membrana.

Um mecanismo alternativo para explicar este fenómeno consiste na selecção ao nível da membrana baso-lateral. De

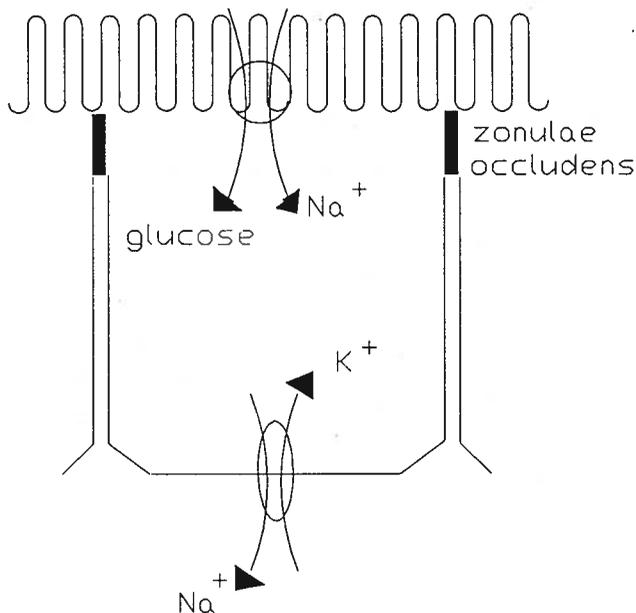


Figura 2 — O enterócito é uma célula polarizada, com uma composição proteica distinta nos domínios apical e baso-lateral da membrana plasmática.

acordo com esta hipótese todas as proteínas membranares seriam inicialmente incorporadas na superfície basolateral. As proteínas destinadas ao domínio apical seriam subsequentemente recrutadas por um segundo mecanismo de transporte (transcitose?). Nos hepatócitos e enterócitos, por exemplo, algumas proteínas da membrana apical parecem passar primeiro pelas membranas basolaterais. É no entanto importante considerar que os mecanismos de selecção podem ser distintos em diferentes epitélios.

## EXOCITOSE <sup>1,8</sup>

Uma vez completo o seu processamento, as proteínas de secreção são transportadas em vesículas que se destacam do aparelho de Golgi, em particular do TGN, em direcção à superfície celular. Denomina-se exocitose o processo de fusão entre a vesícula de secreção e a membrana plasmática. Em muitas células a secreção é um processo contínuo, ocorrendo a exocitose à medida que as vesículas atingem a superfície da célula. É o caso, por exemplo, da secreção de colagénio pelo fibroblasto ou das proteínas séricas pelo hepatócito. Noutras células as vesículas de secreção fundem-se entre si e dão origem aos chamados vacúolos de condensação. Aí as proteínas vão sendo progressivamente concentradas, passando a designar-se grânulos de secreção. Os grânulos ficam acumulados na porção apical da célula até um estímulo apropriado, geralmente uma hormona, desencadear a fusão com a membrana plasmática. É o caso, por exemplo, das células exócrinas do pâncreas, onde a secreção das enzimas digestivas acumuladas nos grânulos de secreção é desencadeada por hormonas libertadas pelo estômago e intestino (gastrina, colecistocinina, secretina), em resposta à chegada de alimentos.

## ENDOCITOSE <sup>1,9-11</sup>

A exocitose conduz a uma expansão contínua da membrana plasmática. Para manter as suas dimensões a célula

deve de alguma forma destruir a membrana adicionada ou reciclá-la para o interior.

Um traçador útil para seguir o destino das proteínas da membrana plasmática é a ferritina cationizada. A ferritina cationizada é constituída por partículas de ferritina densas aos electrões (portanto identificáveis ao microscópio electrónico) e com carga positiva. Estas partículas ligam-se aos resíduos de ácido siálico (carga negativa) das glicoproteínas e glicolípidos das membranas. Quando células são colocadas em contacto com ferritina cationizada, as partículas aderem rapidamente à superfície celular. Após algum tempo observam-se partículas de ferritina no interior da célula, em vesículas limitadas por uma membrana. Mais tarde a ferritina pode atingir vesículas do Golgi e vesículas de secreção. Estes resultados sugerem que a membrana plasmática é interiorizada e reciclada.

Denomina-se endocitose a invaginação progressiva de uma região da membrana plasmática, dando origem a uma vesícula que transporta no seu interior material extracelular. A endocitose é um processo contínuo, praticamente em todas as células. Estima-se que fibroblastos em cultura interiorizam por hora cerca de 50% da sua superfície celular, mesmo na ausência de interiorização de qualquer molécula específica.

Quando a ferritina, que se liga inespecificamente à membrana, é substituída por moléculas (marcadas por exemplo com ouro coloidal) para as quais a membrana plasmática possui receptores específicos, verifica-se a acumulação das moléculas em determinadas regiões da membrana que são posteriormente interiorizadas por endocitose. Estas invaginações e vesículas de endocitose possuem uma particularidade: são revestidas por partículas ou espículas relativamente densas aos electrões, pelo que se designam invaginações e vesículas franjadas (*coated pits* e *coated vesicles*).

Após isolamento e análise bioquímica verificou-se que estas vesículas são ricas numa proteína denominada clatrina. Utilizando uma técnica recente de microscopia electrónica que consiste no congelamento ultra-rápido de células lisadas seguido de desidratação e metalização, as vesículas franjadas aparecem revestidas por uma rede geométrica regular constituída por moléculas de clatrina.

Denomina-se endocitose mediada por receptores esta forma de endocitose que permite à célula a incorporação selectiva de proteínas e pequenas partículas extracelulares. As moléculas de ligando ligam-se com alta afinidade a receptores de superfície que, ou já se localizam em invaginações franjadas, ou se desolcam para lá em consequência da ligação. A invaginação da membrana é provavelmente causada por um rearranjo do revestimento da clatrina. Ao gerar uma elevada relação área de superfície/volume, a invaginação incorpora um volume mínimo de fluido extracelular reduzindo assim a interiorização de ligandos contaminantes.

Para além da clatrina as vesículas franjadas possuem outras proteínas específicas, denominadas adaptadores. Os adaptadores são constituídos por diversas subunidades polipeptídicas sendo as mais abundantes designadas adaptinas.

Os resultados de diversos trabalhos sugerem que os adaptadores medeiam a interacção entre os receptores e o revestimento de clatrina das invaginações e vesículas franjadas:

- 1) O revestimento de clatrina pode ser removido *in vitro*, em condições que não interferem com os adaptadores.
- 2) Por reposição das condições fisiológicas o revestimento de clatrina volta a formar-se, *in vitro*, em torno das vesículas; no entanto este processo é inibido pela remoção prévia dos adaptadores ou pela presença de anticorpos anti-adaptinas.
- 3) Os adaptadores situam-se entre a membrana da vesícula e o revestimento de clatrina.
- 4) Adaptadores isolados ligam-se directamente à clatrina estimulando a formação do revestimento geométrico.

Pouco se sabe ainda quanto à interacção dos adaptadores com os receptores. Para alguns receptores está demonstrado ser na proção citoplasmática que está contida a informação determinante do seu destino intracelular, em particular se devem ou não entrar numa invaginação franjada. Para os receptores de LDL, Man-6-P e transferrina essa informação parece consistir num sinal de tirosina. A substituição de um determinado resíduo de cisteína por tirosina numa hemaglutinina viral que normalmente não é endocitada, conduz à sua incorporação em invaginações e vesículas franjadas.

## DESTINO INTRACELULAR DAS PARTÍCULAS ENDOCITADAS<sup>8,12,13</sup>

### Captação das LDL

O processo pelo qual o colesterol se acumula nas células constitui um dos sistemas de endocitose mediada por receptores melhor estudados (Fig. 3).

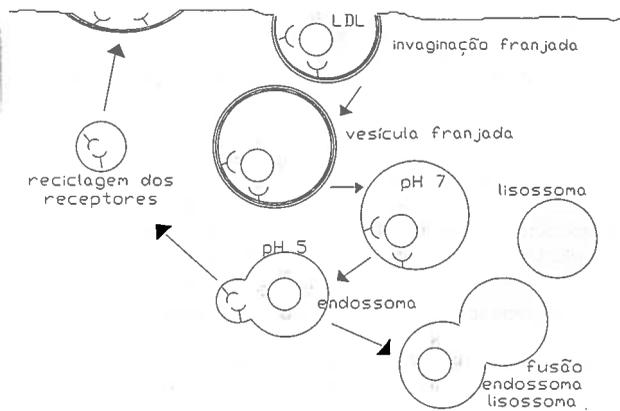


Figura 3 — Mecanismo de captação celular das LDL. As partículas de LDL são reconhecidas por receptores específicos para a apoproteína  $\beta$ . Os receptores localizam-se ao nível de invaginações franjadas que dão origem a vesículas franjadas, interiorizando as LDL. Estas vesículas perdem o revestimento de clatrina e passam a designar-se endossomas. O pH ácido do endossoma provoca a dissociação das LDL dos respectivos receptores. Os receptores são reciclados para a membrana plasmática enquanto o endossoma se funde com um lisossoma, sendo o seu conteúdo parcialmente hidrolizado.

O colesterol é insolúvel em água. Por essa razão, o colesterol proveniente da dieta ou sintetizado no fígado é transportado no sangue associado a partículas lipoproteicas, em particular LDL (Low Density Lipoprotein). A partícula de LDL é uma esfera com 20 a 25 nm de diâmetro. A sua superfície exterior é composta por uma monocamada de fosfolípidos onde se insere uma proteína hidrofóbica, a apoproteína  $\beta$ . No interior da partícula concentram-se cerca de 1500 moléculas de ésteres de colesterol.

A maioria das células possui receptores para as LDL na membrana plasmática, e as partículas de LDL séricas representam a sua principal fonte de colesterol. Ao contrário de outros receptores, os receptores para as LDL localizam-se apenas em invaginações franjadas, mesmo quando não ligados a LDL. A formação do complexo receptor-ligando não necessita energia, mas a sua interiorização sim: não ocorre a 4.º C nem na presença de inibidores da respiração celular. Normalmente a interiorização ocorre 2 a 5 minutos após a ligação.

Uma vez no interior da célula, as vesículas franjadas perdem o revestimento de clatrina, passando a designar-se endossomas. Estas vesículas são pequenas junto à membrana plasmática, mas tornam-se maiores à medida que se afastam para o interior da célula, talvez por fusão com outras vesículas.

Os endossomas são compartimentos ácidos, onde o pH baixo ( $\text{pH} \pm 5$ ) provoca a dissociação das LDL dos respectivos receptores. Os receptores desligados concentram-se numa região da membrana do endossoma, que se destaca sob a forma de vesículas destinadas à membrana plasmática. O endossoma com as partículas de LDL no seu interior acaba por se fundir com um lisossoma primário dando origem a um lisossoma secundário. No lisossoma a proteína apo $\beta$  é degradada e os fosfolípidos dissociados, deixando o colesterol livre para ser utilizado pela célula.

O colesterol exógeno, libertado das LDL nos lisossomas, desencadeia vários mecanismos de regulação na célula: inibe a enzima-chave da biosíntese do colesterol, activa uma enzima necessária para o armazenamento do colesterol e inibe a síntese de receptores de LDL.

De facto, fibroblastos em cultura num meio rico em colesterol possuem cerca de um décimo dos receptores de LDL presentes em fibroblastos cultivados em meio com baixa concentração de colesterol.

Como os receptores de LDL vão sendo progressivamente degradados (provavelmente nem todos são reciclados para a membrana, sendo digeridos pelos lisossomas), se a síntese de novos receptores é inibida, a membrana plasmática vai possuir progressivamente menos receptores e portanto interiorizar menos colesterol sob a forma de LDL.

Muitos dos conhecimentos sobre o sistema de interiorização das LDL humanas resultaram do estudo de uma doença hereditária, a hipercolesterolemia familiar. A doença que se manifesta por fenómenos de aterosclerose precoce, resulta de mutações genéticas que afectam especificamente os receptores de LDL. Nalguns casos o receptor mutante liga-se normalmente às LDL mas não as consegue interiorizar porque não se localiza nas invaginações franjadas. A mutação afecta um resíduo de tirosina do domínio citoplasmático, provavelmente o sinal de reconhecimento pelos adaptadores. Noutros indivíduos afectados por esta doença os receptores não estão fixados na membrana plasmática, sendo libertados para o exterior. Conhece-se ainda outro tipo de mutação que dá origem a uma forma precursora do receptor de LDL incapaz de atingir a membrana plasmática. Estas moléculas possuem resíduos oligossacáridos, que normalmente são removidos por enzimas do aparelho de Golgi. Parece portanto não ocorrer transporte para este organito. De facto, o receptor mutante concentra-se no RER, particularmente em extensões tubulares desprovidas de ribossomas que se pensa correspondam a elementos de transição entre o retículo e o aparelho de Golgi.

### Captação de ferro

O ferro é transportado no sangue, a partir do fígado (principal local de armazenamento) e intestino (local de absorção), em associação com uma glicoproteína sérica específica, a transferrina.

A apotransferrina liga-se a dois iões  $\text{Fe}^{3+}$ , dando origem a ferrotransferrina.

Todas as células em crescimento contêm na sua membrana plasmática receptores para a transferrina, que se ligam com grande avidéz à ferrotransferrina a pH neutro. O complexo receptor-ferrotransferrina é interiorizado e os dois átomos de ferro ficam retidos na célula, enquanto as moléculas de apotransferrina (a transferrina desprovida de ferro) são libertadas para o exterior após alguns minutos. Este facto resulta

de a apotransferrina permanecer ligada aos receptores no interior dos endossomas, onde o meio ácido provoca a dissociação da ligação transferrina-ferro. O ferro permanece na vesícula endocítica para ser subsequentemente utilizado pela célula, enquanto os receptores ligados à apotransferrina são reciclados para a superfície celular. Ai o pH neutro provoca a dissociação da apotransferrina, que entra novamente em circulação pronta para captar mais ferro.

### Transcitose

As moléculas de imunoglobulina A (IgA) são secretadas para a saliva, lágrimas, brônquios e intestino, constituindo a primeira linha de defesa do organismo contra as infecções.

As IgA ligam-se a receptores específicos localizados na membrana plasmática basal de muitos epitélios e são interiorizadas por um processo de endocitose mediada por receptores. Em contraste com as situações anteriormente descritas, as moléculas de IgA não permanecem retidas no interior da célula. Após interiorização ao nível da membrana basal as IgA são transportadas através da célula até à membrana apical sendo exteriorizadas por um mecanismo semelhante à exocitose. Denomina-se a este processo transcitose.

Nos enterócitos, por exemplo, existem na membrana basolateral receptores de IgA em elevado número. Em consequência um grande número de moléculas de IgA é continuamente lançado no lúmen intestinal.

Os receptores de IgA possuem a propriedade única de, durante a passagem do complexo receptor-ligando através da célula sofrerem uma clivagem que os separa do segmento fixado na membrana, permanecendo assim ligados à imunoglobulina secretada.

Outro exemplo de transcitose mediada por receptores é o transporte de anticorpos maternos, nos mamíferos, da placenta para o feto através do intestino para o recém nascido.

Quando as células intestinais de rato recém nascido são incubadas na presença de imunoglobulinas (marcadas com ferritina ou ouro coloidal) e peroxidase, verifica-se que ambas as moléculas são interiorizadas, localizando-se nas mesmas vesículas endocitadas. No entanto a peroxidase (enzima em solução no meio extracelular) entra por pinocitose enquanto as Igs entram por endocitose mediada por receptores. Após algum tempo as moléculas de Ig foram transportadas em vesículas para a membrana baso-lateral enquanto a peroxidase foi incorporada em lisossomas. Estes resultados indicam que, tal como à saída do aparelho de Golgi, as moléculas internalizadas por endocitose são segregadas para diferentes destinos intracelulares (Fig. 4).

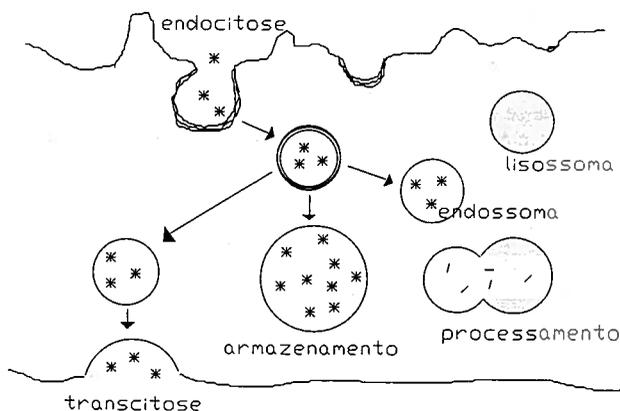


Figura 4 — Destino intracelular de partículas endocitadas.

### Acumulação de produtos de reserva

Por vezes o material endocitado permanece armazenado nas células. É o caso dos ovócitos de insectos e aves que interiorizam em grande quantidade proteínas de reserva para serem posteriormente utilizadas pelo embrião em desenvolvimento. A maioria dessas proteínas são interiorizadas por endocitose mediada por receptores (Fig. 4).

### AS PROTEÍNAS LISSOSSÓMICAS POSSUEM UM SINAL ESPECÍFICO<sup>14,15</sup>

A descoberta do *signal* que permite à célula reconhecer as proteínas lisossômicas foi consequência de estudos sobre um grupo de doenças humanas hereditárias causadas por alterações do metabolismo lisossômico. Estas doenças caracterizam-se pela ausência de determinadas enzimas nos lisossomas. Em consequência ocorre no lisossoma uma acumulação massiva do substrato da enzima em falta (quer a macromolécula intacta quer resíduos parcialmente digeridos). Dependendo da enzima deficiente, conhecem-se situações de acumulação de glicosaminoglicanos (antigamente designados mucopolissacarídeos), glicoproteínas, glicogénio, lípidos e glicolípidos.

Na mucopolissacaridose acumulam-se nos lisossomas grandes quantidades de glicosaminoglicanos (normalmente componentes da matriz extracelular). Ao microscópio electrónico a maior parte das células dos indivíduos afectados contém grandes lisossomas secundários.

A mesma alteração observa-se em células em cultura (fibroblastos) retiradas destes doentes. Mas quando se juntam em cultura fibroblastos normais e fibroblastos doentes estes deixam de acumular o substrato. O factor correctivo que passa para os fibroblastos doentes foi identificado como a enzima  $\alpha$ -L-iduronidase, a enzima deficiente nas células doentes. Experiências idênticas em outras deficiências lisossômicas vieram demonstrar que as células normais libertam para o meio pequenas quantidades de todas as enzimas lisossômicas, passíveis de serem captadas pelas células deficitárias.

Fibroblastos cultivados a partir de indivíduos afectados com a doença de células I (mucopolidose I) são praticamente desprovidos de hidrolases e possuem numerosas inclusões citoplasmáticas correspondentes a lisossomas secundários alterados. No entanto as enzimas encontram-se em elevada concentração no meio de cultura. Mas, por exemplo, a  $\alpha$ -L-iduronidase preparada a partir do meio de cultura de fibroblastos I não corrige células com mucopolissacaridose, apesar de ser activa como hidrolase. No entanto, os fibroblastos I endocitam e retêm as hidrolases libertadas pelas células normais.

A interpretação destes resultados é a seguinte: as células com mucopolissacaridose captam as enzimas lisossômicas libertadas por células normais, provavelmente através de um mecanismo de endocitose mediada por receptores, pois estão envolvidas no processo vesículas franjadas. As hidrolases sintetizadas pelas células I não são reconhecidas pelos receptores da membrana plasmática e por isso não são interiorizadas. O sinal ausente nestas proteínas foi identificado com um resíduo oligossacarídico contendo Manose-6-fosfato (Man-6-P). Se se tratarem hidrolases de células normais com uma enzima que remove os fosfatos terminais, as enzimas deixam de ser incorporadas, comportando-se como enzimas de células I. Se se adicionar Man-6-P ao meio de cultura, a molécula bloqueia os receptores impedindo-os de se ligarem às hidrolases lisossômicas que assim não são incorporadas.

Mas fibroblastos que crescem durante várias gerações na presença de Man-6-P (e portanto não internalizam hidrolases), mantêm lisossomas funcionalmente íntegros, com um

conteúdo enzimático normal. O normal suprimento de enzimas para os lisossomas não depende, portanto, de um mecanismo de re-utilização dos enzimas secretados. Então, a ausência de hidrolases nos lisossomas de células I implica a existência de receptores intracelulares. De facto, detectaram-se nas membranas do aparelho de Golgi receptores para a Man-6-P idênticos aos da membrana plasmática. Admite-se serem estes receptores intracelulares responsáveis pela concentração específica das hidrolases em determinadas regiões do aparelho de Golgi, para serem em seguida enviadas para os lisossomas primários. Nas células I, as hidrolases desprovidas do sinal, não são reconhecidas como enzimas lisossômicas, passando através do Golgi e sendo continuamente lançadas para o exterior.

Em todas as células ocorre normalmente secreção de uma pequena quantidade de enzimas lisossômicas para o exterior e encontram-se na membrana plasmática, embora em pequena quantidade, proteínas da membrana dos lisossomas. Admite-se que este facto resulta de fugas, a nível do aparelho de Golgi, ao processo de selecção (*sorting*) das proteínas destinadas aos lisossomas.

O resíduo de Man-6-fosfato, o sinal lisossômico melhor caracterizado, não parece ser o único mecanismo de selecção das proteínas constituintes do lisossoma. Por exemplo, nos indivíduos com doença de células I os hepatocitos possuem em quantidade normal a maioria das enzimas lisossômicas e são praticamente desprovidos de lisossomas anormais. Por outro lado, a droga tunicamicina, que inibe a glicosilação e portanto a adição da Man-6-P, não afecta a incorporação de proteínas da membrana dos lisossomas.

## OS RECEPTORES DE MAN-6-P SÃO RECICLADOS <sup>14</sup>

As enzimas lisossômicas recém sintetizadas no RER e processadas no aparelho de Golgi são enviadas para os lisossomas através do sistema de reconhecimento da Man-6-P. Os resíduos de Man-6-P são adicionados às proteínas no Golgi e são reconhecidos por receptores específicos das membranas deste compartimento.

Como os lisossomas são desprovidos de receptores para a Man-6-P presume-se que as enzimas ligadas aos receptores do Golgi, se concentrem num compartimento ácido pré-lisossômico. A baixo pH o complexo receptor-ligando dissocia-se, permitindo a reciclagem do receptor de volta para o aparelho de Golgi.

Uma pequena percentagem das enzimas lisossômicas é libertada normalmente para o exterior, podendo algumas destas moléculas ligar-se aos receptores de Man-6-P presentes na membrana plasmática. Os complexos receptor-ligando são concentrados em invaginações franjadas e internalizados em vesículas franjadas que se fundem com outro compartimento ácido, o endossoma. O pH ácido dos endossomas provoca a dissociação dos complexos, deixando os receptores livres para serem reciclados, enquanto as enzimas são incorporadas nos lisossomas.

Foram identificados dois receptores distintos de Man-6-P. Ambos são glicoproteínas transmembranares que formam complexos com o respectivo ligando a pH ligeiramente ácido (próximo da neutralidade) e se dissociam a pH inferior a 5.5.

Estudos recentes de imunolocalização dos receptores de Man-6-P demonstram uma concentração preferencial a nível do TGN. Estes resultados sugerem que as enzimas lisossômicas atravessam todo o aparelho de Golgi antes de serem segregados para os lisossomas. Confirma esta hipótese a presença, em várias enzimas lisossômicas, de oligossacáridos terminalmente processados. Como as glicosiltransferases responsáveis por este tipo de processamento se encontra apenas

na região trans e TGN, as enzimas devem atravessar estes compartimentos.

A localização específica de diversas glicosiltransferases ao longo do aparelho de Golgi permite ainda identificar o percurso de receptores reciclados através deste organito. A sialiltransferase, por exemplo, é muito utilizada como marcador de região trans-Golgi e TGN. É possível modificar os resíduos oligossacarídicos dos receptores presentes na membrana plasmática de modo a torná-los substratos para a sialiltransferase. Se estes receptores aparecerem com resíduos adicionais de ácido siálico é porque recirculam através daquelas regiões do Golgi. Verificou-se assim que os receptores de Man-6-P são reciclados da superfície celular até ao trans-Golgi e TGN.

Também as moléculas de transferrina e respectivos receptores podem adquirir resíduos adicionais de ácido siálico ao serem incorporadas pela célula, sugerindo a sua reciclagem através do aparelho de Golgi.

## DUAS POPULAÇÕES DAS VESÍCULAS FRANJADAS <sup>16</sup>

Na maioria das células eucariotas identificam-se duas populações de vesículas franjadas: uma resultante da invaginação da membrana plasmática, a outra em associação com o aparelho de Golgi. As vesículas associadas à membrana estão envolvidas nos processos de endocitose mediada por receptores enquanto as localizadas na região do Golgi parecem desempenhar um importante papel no transporte de enzimas lisossômicas, proteínas membranares e de secreção respectivamente para lisossomas, membrana e grânulos de secreção.

Resultados de imunolocalização com anticorpos contra as diversas adaptinas sugerem que os adaptadores presentes no aparelho de Golgi têm composição distinta dos relacionados com a membrana plasmática. Sendo os adaptadores aparentemente responsáveis pelo reconhecimento dos receptores e sua incorporação em vesículas franjadas, a existência de diferentes adaptadores em distintos locais da célula (isto é, membrana e Golgi) permitiria a selecção dos receptores a serem incorporados em vesículas franjadas formadas a partir dos distintos compartimentos.

De acordo com esta hipótese, distinguem-se nos receptores de Man-6-P duas sequências importantes para o reconhecimento destas moléculas pelas vesículas com clatrina: uma é o sinal de tirosina comum a outros receptores do ciclo endocítico e reconhecido pelos adaptadores das vesículas franjadas da membrana plasmática; a outra, ainda não foi identificada, parece ser reconhecida pelos adaptadores das vesículas franjadas associadas ao aparelho de Golgi.

## AGRADECIMENTOS

Agradece-se ao Prof. Doutor J.F. David-Ferreira pela leitura crítica e a Inês Condado a dactilografia do manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D.: Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York, 1986.
2. PFEFFER, S.R.; ROTHMAN, J.E.: Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. Ann. Rev. Biochem. 1987; 56:829.
3. GRIFFITHS, G.; SIMONS, K.: The trans Golgi network: sorting at the exit side of the Golgi complex. Science 1986; 234:438.

4. GRIFFITHS, G.; FULLER, S.D.; BACK, R.; HOLLINSHEAD, M.; PFEIFER, S.; SIMONS, K.: The dynamic nature of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 1989; 108:277.
5. FARQUHAR, M.G.: Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985; 1:447.
6. HUGON, J.S.; BENNETT, G.; POTHIER, P.; NGOMA, Z.: Loss of microtubules and alteration of glycoprotein migration in organ cultures of mouse intestine exposed to nocodazole or colchicine. *Cell Tissue Res.* 1987; 248:653.
7. MASSEY, D.; FERACCI, H.; CORVEL, J.P.; RIGAL, A.; SOULIE J.M.; MAROUX, S.: Evidence for the transit of aminopeptidase N through the basolateral membrane before it reaches the brush border of enterocytes. *J. Membr. Biol.* 1987. 96:19.
8. ZIMMERMANN, R.; MEYER, D.I.: A year of new insights into how proteins cross membranes. *Trends in Biochem. Sci. (TIBS)* 1986; 11:512.
9. AJIOKA, R.S.; KAPLAN, J.: Characterization of endocytic compartments using horseradish peroxidase/diaminobenzidine density shift technique. *J. Cell Biol.* 1987; 104:77.
10. CARPENTER, G.: Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56:881.
11. ROBINSON, M.S.: Cloning of cDNAs encoding two related 100 KD coated vesicle proteins ( $\alpha$ —adaptins). *J. Cell Biol.* 1989; 108:833.
12. GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; ANDERSON, R.G.W.; RUSSEL, D.W.; SCHNEIDER, W.J.: Receptor endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985; 1:1.
13. MELLMAN, I.; FUCHS, R.; HELENIUS, A.: Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 1986. 55:663.
14. GRIFFITHS, G.; HOFACK, B.; SIMONS, K.; MELLMAN, I.; KORNFELD, K.: The Mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 1988; 52:329.
15. STORRIE, B.: Assembly of lysosomes: Perspectives from comparative molecular cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 1988; 111:53.
16. GLICKMAN, J.N.; CONIBEAR, E.; PEARSE, B.M.F.: Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *EMBO J.* 1989; 8: 1041.

Pedido de Separatas:

M. Carmo-Fonseca

Instituto de Histologia e Embriologia

Faculdade de Medicina de Lisboa

Rua Prof. Egas Moniz

1600 Lisboa Codex