

Artigo de Revisão

Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia *

Wilson Andrade Carvalho ¹; Rosemary Duarte Sales Carvalho ²;
Valdir Cavalcanti Medrado, TSA ³; Pedro Thadeu Galvão Vianna, TSA ⁴

Carvalho WA, Carvalho RDS, Medrado VC, Vianna PTG - Molecular Biology of the Pharmacological Receptors and their Effectors Systems of Interest in Anesthesiology

KEY WORDS - MOLECULAR BIOLOGY; PHARMACOLOGY: receptors

O conhecimento da biologia molecular dos receptores é imprescindível para que possamos entender melhor o mecanismo de ação dos diversos neurotransmissores e drogas envolvidos na modulação central e periférica da nocicepção, bem como os aspectos moleculares e celulares da anestesia. Um número cada vez maior de drogas utilizadas pelos anestesiológicos durante a anestesia, no período pré e pós-operatório e nas clínicas de tratamento de dor aguda e crônica, exerce seus efeitos farmacológicos através da interação com receptores celulares específicos, geralmente proteínas lo-

calizadas na membrana das células. Durante esta última década foi realizado acentuado progresso no entendimento do mecanismo molecular dos efeitos celulares de diversas drogas de interesse em anestesiologia, incluindo os opióides, bloqueadores neuromusculares, benzodiazepínicos e seus antagonistas, os agonistas e antagonistas autonômicos etc.

A comunicação entre as células é fundamental na regulação de processos metabólicos, controle de crescimento e diferenciação celulares e integração fisiológica dos organismos vivos. Esta interessante intercomunicação é realizada por intermédio de moléculas denominadas sinalizadoras, ligantes ou agonistas, representadas por hormônios, neurotransmissores e outros autacóides, fatores de crescimento e, eventualmente, drogas administradas por vias exógenas. Estas se ligam à proteínas específicas, situadas geralmente na superfície das células-alvo que são denominadas de receptor. O complexo ligante-receptor, uma vez estabelecido, poderá então, ativar ou inativar os sistemas efetores dos receptores, os quais, através de vários passos metabólicos, irão iniciar a transdução de respostas específicas dentro da célula, desencadeando, resposta celular característica.

Os receptores da superfície celular usam uma variedade de mecanismos de sinalização de membrana para transdução da mensagem carregada pelo agonista para o interior da célula. Esses mecanismos, no caso dos siste-

* Estudo realizado na Escola de Medicina e Saúde Pública e na Universidade Federal da Bahia (UFBA), BA

1 Professor Adjunto de Farmacologia e Toxicologia da Universidade Federal da Bahia e da Escola de Medicina e Saúde Pública. Médico Anestesiologista da Maternidade Clímério de Oliveira da UFBA e doutorando em Anestesiologia do Curso de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, SP

2 Professor Auxiliar de Ensino de Farmacologia da Escola de Medicina e Saúde Pública e da Faculdade de Farmácia de UFBA, Salvador, BA

3 Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFBA e Chefe do CET/SBA do Hospital São Rafael, Salvador, BA

4 Professor Titular de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, SP

Correspondência para Wilson Andrade Carvalho
Av. Augusto Lopes Pontes 641 Ap 301 - Costa Azul
41750-170 Salvador - BA

Apresentado em 02 de maio de 1996

Aceito para publicação em 26 de agosto de 1996

© 1997, Sociedade Brasileira de Anestesiologia

mas neuronais, são representados por alteração na voltagem transmembrana e como consequência em excitabilidade neuronal. Comumente estes mecanismos são referidos como sinalização de transmembrana ou transdução do sinal¹.

Os sistemas efetores dos receptores incluem principalmente, enzimas (adenilciclase, guanilciclase, tirosina cinase e fosfolipases A₂ e C), canais iônicos e transcrição gênica.

Estrutura e Configuração dos Receptores

Uma das primeiras tentativas de isolamento e caracterização dos receptores foi o uso de marcação dos receptores com um ligante radioativo. Com esta técnica foi possível isolar e purificar o receptor colinérgico nicotínico e posteriormente outros receptores.

O recente desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, de ADN recombinante, da clonagem de genes e da imunologia, possibilitou um melhor entendimento da estrutura, configuração e funções dos receptores.

A biologia molecular baseia-se no fato de que toda proteína produzida no organismo, seja ela uma enzima, um elemento estrutural ou um receptor transmembrana, encontra-se codificado no ADN. A seqüência de nucleotídeo presente no ADN que codifica uma proteína é chamada de gene. Desde quando o ADN encontra-se no núcleo da célula e os blocos para construção da proteína (aminoácidos) estão reunidos no citoplasma, uma molécula intermediária é necessária para transmitir informação do núcleo para o citoplasma. O ARN mensageiro constitui a molécula intermediária. A informação, uma vez transcrita do ADN para o ARN mensageiro, será então levada ao ARN ribossômico e ARN de transferência nos ribossomos celulares, onde as proteínas serão produzidas.

Uma vez isolada e purificada a proteína receptora é possível analisar a seqüência de

aminoácidos de uma pequena extensão, possibilitando a dedução da seqüência do ARNm correspondente. Assim pode ser sintetizada uma sonda de oligonucleotídeo capaz de revelar a extensão completa da seqüência de ADN. Os métodos de clonagem de genes nos quais uma sonda de oligonucleotídeos é usada para estudar a seqüência de ADN, têm revelado a estrutura de diversos receptores.

Pode-se também clonar diretamente o ADN codificador do receptor evitando-se o laborioso processo inicial de purificação da proteína receptora. Isto requer o uso de um sistema de expressão capaz de traduzir o ARN mensageiro em proteína funcional. O oócito de sapo tem sido convenientemente usado com este objetivo^{2,3}.

Diversas outras técnicas, incluindo as imunológicas que usam anticorpos antipeptídeos, foram capazes de revelar a natureza estrutural dos receptores situados na membrana celular. Estes receptores são de natureza protéica, apresentando-se sob a forma de cadeias polipeptídicas, com certa uniformidade na configuração, disposição ou domínios característicos, na extensão da membrana, constituindo verdadeiras famílias de receptores. Uma das configurações mais freqüente é aquela representada pelo dobramento do polipeptídeo em sete alças ou domínios, ou segmentos de aminoácidos, com as regiões hidrofóbicas em forma de α -hélice transmembrana, assumindo no interior da membrana um aspecto serpentina. Cada domínio transmembrana do tipo heptahelicoidal consiste de 20 a 30 aminoácidos hidrofóbicos. Os domínios transmembrana encontram-se interligados por três alças hidrofílicas intracelulares. A fosforilação do receptor ocorre normalmente em sua parte citoplasmática. Além disso, as cadeias polipeptídicas dos receptores apresentam um grupo terminal amínico extracelular e um carboxílico intracelular. As extremidades amínicas extracelulares possuem resíduos de açúcar acoplados a aminoácidos específicos (glicosilação) e eventualmente podem também interagir com um ligante

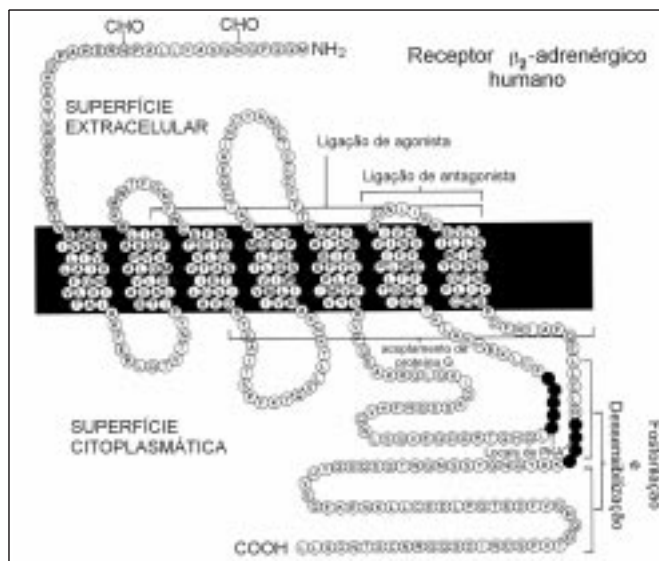


Fig 1 - Estrutura do receptor β_2 -adrenérgico representante da família de receptores acoplados à Proteína G. CHO indica locais prováveis de glicosilação, no domínio extracelular do receptor. Os círculos escuros indicam locais prováveis de fosforilação (pela proteína cinase) no domínio intracelular do receptor. Os domínios transmembrana são hidrofóbicos e de forma α -helicoidal. São indicados os locais de possível ligação de agonistas e antagonistas, do acoplamento de proteína G e de fosforilação. (Reproduzido com permissão de Docklman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ - A family of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins, *Biochemistry* 1987;26:2657-2664)⁴.

(Figura 1) ^{4,6}.

Classificação dos Receptores

A comunicação entre as células e a resposta celular característica, de um modo geral, são mediadas via receptores citoplasmáticos, estimulação ou inibição de sistemas enzimáticos e através de proteínas transmembrana excitáveis. Baseando-se neste critério de localização dos receptores, poderíamos classificá-los em superficiais e intracelulares. Os receptores superficiais estão localizados na membrana plasmática da célula, enquanto os receptores intracelulares podem ser citossólicos (citoplasmáticos) e nucleares. Os receptores citoplasmáticos podem ser representados pelos receptores dos hormônios esteróides e tireoidianos. Como os ligantes esteróides são lipofílicos (não-ionizados e solúveis em lipídios) eles podem facilmente atravessar a bicamada lipídica da membrana celular e interagir dire-

tamente com os receptores esteróides localizados no citoplasma. Estes sistemas podem estar estreitamente associados à membrana plasmática ou presentes em outras localizações intracelulares².

De acordo com a estrutura molecular e a natureza do mecanismo de transdução, podemos distinguir quatro tipos básicos de receptores:

1. Receptores acoplados diretamente a um canal iônico: receptor colinérgico nicotínico, receptor gabaérgico, receptor glutamatérgico etc.
2. Receptores acoplados à proteína G: receptor colinérgico muscarínico, receptores adrenérgicos, receptores serotoninérgicos, receptores opióides etc.
3. Receptores associados à tirosina cinase: insulina e vários fatores de crescimento.
4. Receptores intracelulares que regulam a transcrição do ADN: receptores para esteróides.

Os receptores das três primeiras categorias constituem proteínas da membrana, enquanto os receptores esteróides são proteínas citossólicas ou nucleares.

A estrutura geral das quatro famílias de receptores está representada na Figura 2.

Embora os receptores apresentem individualmente considerável variação na seqüência de nucleotídeos em regiões específicas e possam ainda apresentar alguma variação em seus domínios intracelulares e extracelulares dentro de uma mesma família, apresentam, um padrão estrutural geral, possibilitando agrupá-los em verdadeiras famílias (Figura 2).

Os receptores do primeiro tipo são de grande importância clínica e compreendem os canais iônicos operados por receptores, incluindo os receptores colinérgicos nicotínicos, receptores gabaérgico, receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) para o aspartato e glutamato, receptor da glicina etc. O canal iônico operado por receptores são complexos formados por um receptor e um canal iônico que constitui parte

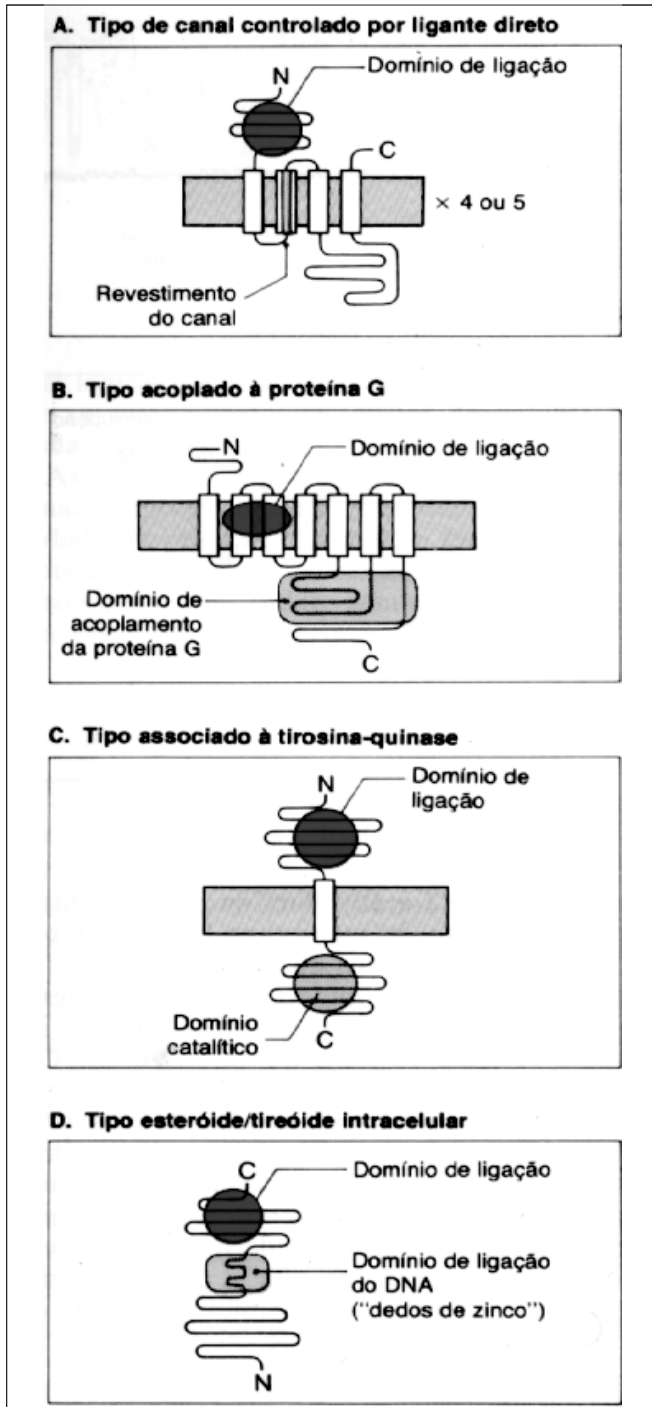


Fig 2 - Estrutura geral dos receptores. Os segmentos retangulares representam regiões α -helicoidais hidrofóbicas da proteína possuindo aproximadamente 20 aminoácidos que formam os domínios dos receptores na extensão da membrana. Os receptores acoplados diretamente aos canais iônicos constituem 4 a 5 subunidades do tipo mostrado, e todo o complexo contém 16 a 20 segmentos da extensão da membrana circundando um canal iônico central. **A.** Tipo de canal controlado por ligante direto. **B.** Tipo acoplado à proteína G. **C.** Tipo acoplado à Tirosina Cinase. **D.** Tipo Esteróide/Tireóide intracelular. (Reproduzido com permissão da Editora Churchill Livingstone, retirado de Rang HP, Dale MM. Farmacologia, 2ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993;431-435)³.

integrante da proteína com vários domínios transmembrana. Estes receptores associados a um canal iônico participam da sinalização sináptica rápida entre células eletricamente excitáveis, mediada por determinados neurotransmissores, como acetilcolina, glicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), aspartato, glutamato etc. Esses neurotransmissores abrem ou fecham transitoriamente o canal iônico, alterando a permeabilidade iônica da membrana plasmática, interferindo deste modo, na excitabilidade da célula pós-sináptica².

O receptor transforma um sinal químico desencadeado pelo neurotransmissor em um potencial pós-sináptico. Esta transformação é realizada pelos canais iônicos, cujo mecanismo de comporta é controlado pelo ligante. Estes canais são operados por receptores, em comparação com outros canais iônicos que são dependentes de voltagem (Voltagem-dependentes).

O receptor colinérgico nicotínico constitui o representante mais típico desta classe de receptores acoplado diretamente a um canal iônico. É um pentâmero formado por quatro distintas subunidades protéicas denominadas de α , β , γ e δ . Existem duas subunidades alfa onde se liga a molécula da acetilcolina. As subunidades protéicas assumem uma configuração pentamérica formando α -hélices que ocupam a extensão transversal da membrana e circundam um poro ou canal central (Figura 3)^{7,8}.

O receptor colinérgico nicotínico constitui importante local de ação de drogas de grande interesse em anestesiologia, notadamente os bloqueadores neuromusculares despolarizantes e não despolarizantes.

Um outro importante exemplo de receptor acoplado a um canal iônico, de grande interesse em anestesiologia, é o receptor do tipo A do ácido γ -aminobutírico (GABA). Os receptores do tipo A do GABA ou GABA_A são formados por complexos protéicos que ao interagirem com o GABA promovem, de forma dose-dependente, a abertura de canais iônicos cloro-seletivos. A ele-

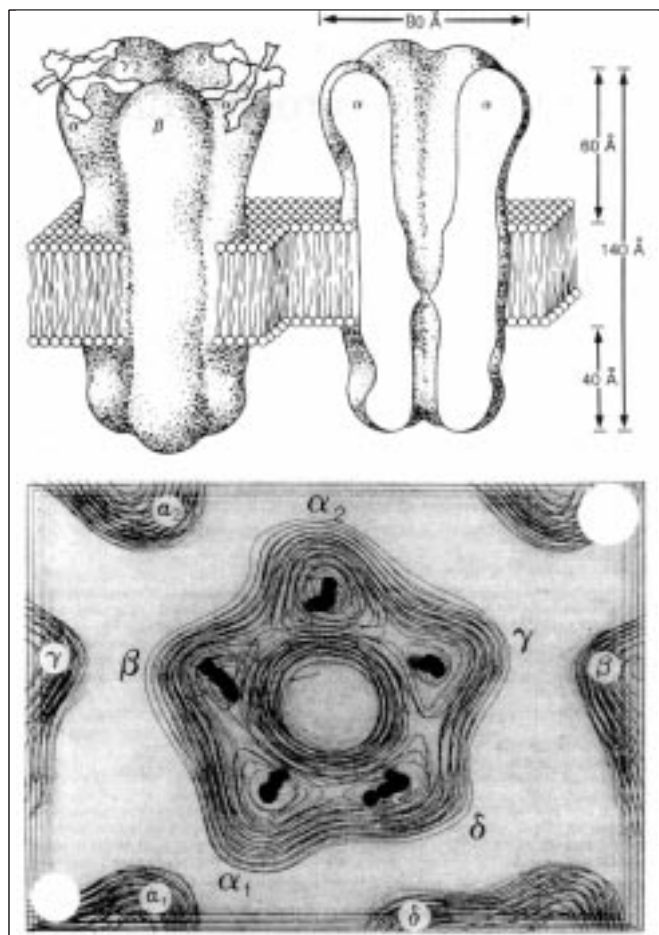


Fig 3 - Estrutura molecular do receptor colinérgico nicotínico. A parte superior apresenta uma visão lateral do receptor e a parte inferior um corte transversal do receptor demonstrando o canal central. São mostradas as posições das subunidades α , β , γ e δ que formam o pentâmero. As duas estruturas semelhantes a folhas, mostradas na superfície extracelular do receptor (parte superior da figura), são moléculas de toxina α da cobra que se ligam às duas subunidades α , local de ligação da acetilcolina. (Reproduzido com permissão de Taylor P - Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS et al - Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed, New York, Pergamon Press, 1990; 166-186)⁸.

vação do influxo de íons Cl^- para o interior dos neurônios provoca uma hiperpolarização da membrana inibindo as descargas neuronais. Os receptores GABA_A possuem em sua estrutura locais de ligação específica para o GABA e, certos antagonistas, como também outros sítios de ligação para barbitúricos, anestésicos esteróides, benzodiazepínicos e etanol (Figura 4)⁹.

Os canais iônicos voltagem sensíveis abrem ou fecham, dependendo da variação da

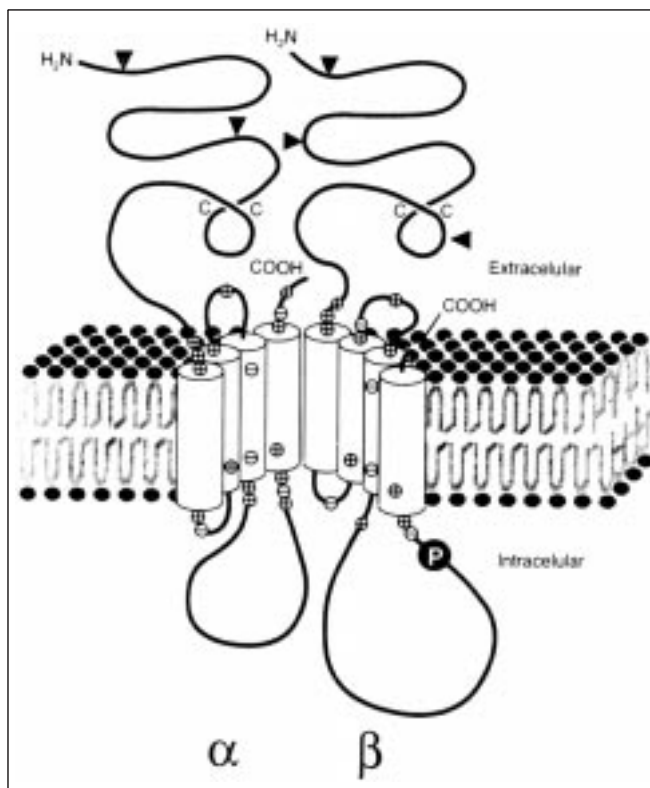


Fig 4 - Topografia e estrutura do receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA_A) situado na membrana plasmática. As quatro hélices transmembrana nas subunidades α e β são mostradas como cilindros. As alças formadas pelas cisteínas ligadas por ligações de dissulfeto são indicadas pela letra C. Os resíduos carregados, perto da superfície da membrana, são indicados por círculos com os sinais da carga. Os locais de glicosilação e de fosforilação são indicados pelos triângulos e por P. Parece que somente as hélices transmembrana é que formam o canal central. (Reproduzido com permissão de Schofield PR, Darlison MG, Fujita N et al - Sequence and functional expression of the GABA_A receptor show a ligand-gated receptor superfamily. Nature, 1987;328:221-230)⁹

voltagem do potencial da membrana e são representados pelos canais iônicos clássicos como os canais de sódio, cloreto, potássio e cálcio. A sensibilidade desses portões à voltagem é devida à presença de regiões eletrocarregadas da proteína do canal.

O canal de sódio encontrado no cérebro de mamíferos é constituído por um complexo heterotrimérico de proteína glicosilada formado por três subunidades designadas de α (260 Kilo-daltons), β_1 (36 Kilodaltons) e β_2 (33 Kilodaltons), enquanto o canal de sódio do órgão elétrico de peixes (enguias elétricas) é formado por uma glicoproteína de aproximadamente 1850 aminoácidos com um peso molecular de

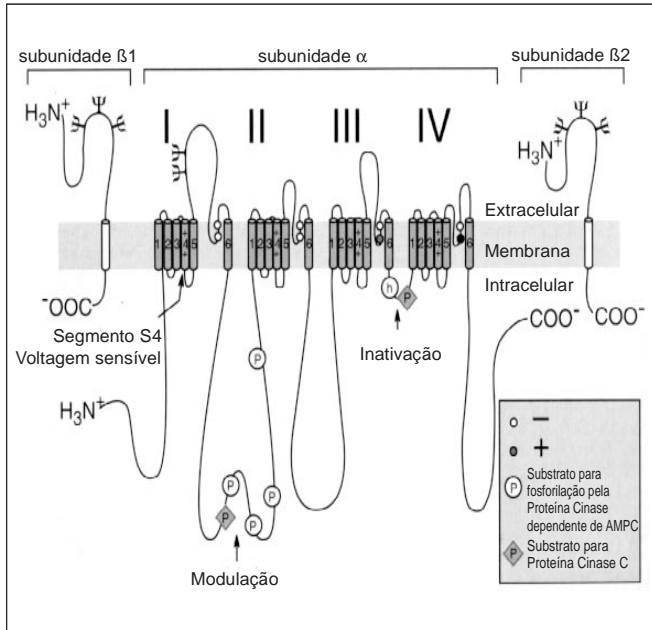


Fig 5 - Estrutura e função do canal de sódio voltagem-dependente na membrana celular.

Representação bidimensional das subunidades α (centro) β_1 (esquerda) e β_2 (direita) do canal de sódio voltagem-dependente do cérebro de mamíferos. A subunidade alfa é formada por quatro domínios transmembrana numerados de I a IV. Cada domínio possui seis segmentos transmembrana representados por cilindros de 1 a 6. O segmento transmembrana S4 de cada domínio homólogo da subunidade alfa funciona como sensor de voltagem e encontra-se positivamente carregado (+). O poro do receptor é formado pelos segmentos S5 e S6 e as alças curtas situadas entre eles (segmentos SS1 e SS2) que formam as paredes do poro no centro dos quatro domínios homólogos. (P) representa substratos para fosforilação por proteínas cinases dependentes de AMP cíclico e <P> substrato para proteína cinase C. (h) representa o portão de inativação do canal. (Reproduzido com permissão de Catterall W, Mackie K - Local Anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 1996;331-347) ¹⁰.

280 Kilodaltons. Somente a subunidade alfa é responsável pela função do canal, onde provavelmente, se ligam os anestésicos locais e neurotoxinas como a tetrodotoxina e saxitoxina. A subunidade alfa é mais extensa e contém quatro domínios transmembrana homólogos (I-IV) formado por uma seqüência repetida de aminoácidos. (Figura 5). Cada um desses domínios, por sua vez, consiste de seis segmentos transmembrana (α -hélices) semelhantes (S₁ - S₆) que atravessam a membrana plasmática e conectam alças intra e extracelulares. O segmento S₄ contém resíduos de aminoácidos positivamente carregados e corresponde ao sensor de voltagem

do receptor. Acredita-se que os domínios transmembrana assumam uma estrutura helicoidal e que os poros dos canais sejam formados neste modelo pelos segmentos transmembrana S5 e S6 e pelos dois segmentos SS1 e SS2 da alça curta entre eles, que se organizam formando as paredes do poro ou canal no centro dos quatro domínios homólogos (Figura 5) ^{10,11}. Após a abertura, o canal de sódio é inativado dentro de poucos milissegundos em virtude do fechamento de um portão de inativação. A alça intracelular curta, que conecta os domínios homólogos III e IV, serve como portão de inativação dos canais de Na⁺.

A abertura do canal de sódio pode ser modulada pela fosforilação de proteínas. A fosforilação do portão de inativação entre os domínios homólogos III e IV pela proteína cinase C lentifica a inativação, enquanto a fosforilação de sítios na alça intracelular entre os domínios homólogos I e II, pela proteína cinase C ou por uma proteína cinase dependente de AMP cíclico, reduz a ativação dos canais de Na⁺.

O estudo da seqüência de alterações conformacionais que ocorrem com o canal de sódio durante a ativação ou inativação, demonstra que pela despolarização cada um dos quatro domínios homólogos sofre alteração conformacional transformando-se em um estado ativado. Após todos os quatro domínios terem sido ativados ocorre a abertura do canal de Na⁺. Poucos milissegundos após a abertura, o portão de inativação, entre os domínios III e IV, se fecha sobre a boca intracelular do canal, ocluindo-o, e dessa forma, prevenindo subsequente condutância iônica.

Os anestésicos locais bloqueiam a condução do impulso no nervo através da ligação com três resíduos de aminoácidos que formam o segmento S6 no domínio IV, que juntamente com os segmentos SS1 e SS2 da alça curta, entre os segmentos S5 e S6, contribuem para a formação da boca extracelular do poro ou canal. A lidocaína liga-se aos resíduos da fenilalanina e tirosina (Figura 6) ^{10,11}.

Acredita-se que os anestésicos

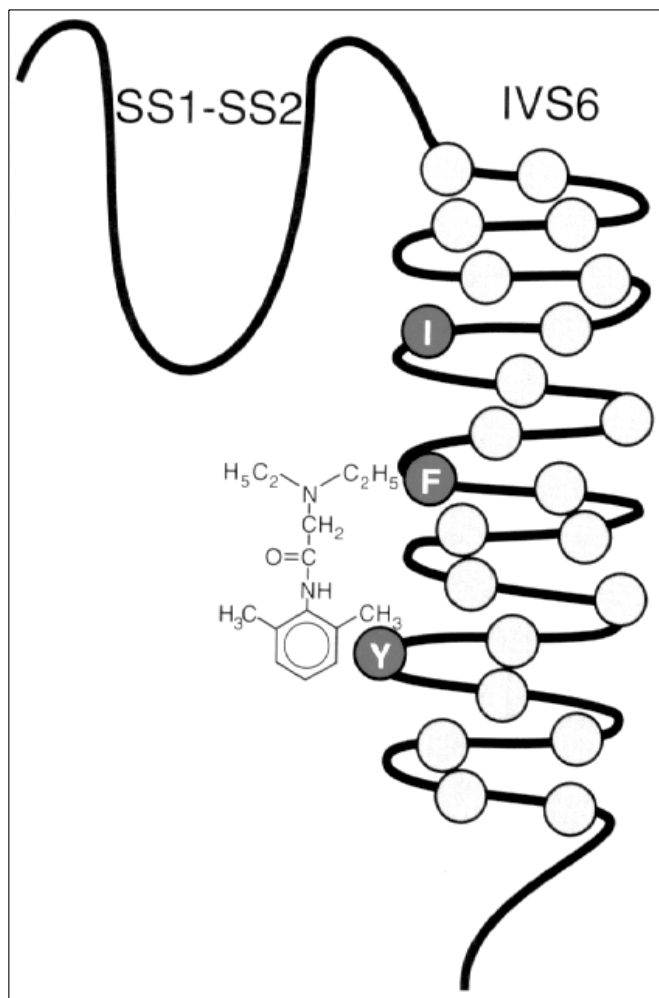


Fig 6 - Sítios de ligação dos anestésicos locais no canal de sódio da membrana celular.

O Segmento S6 no domínio IV da α hélice do receptor é ilustrado conjuntamente com os segmentos SS1 e SS2 da alça curta adjacente que contribuem para a formação da boca do canal. Os círculos representam os resíduos de aminoácidos que formam o segmento. Os três resíduos críticos de ligação dos anestésicos locais são destacados pelas letras I (isoleucina), F (fenilalanina) e Y (tirosina). Observamos na figura a ligação da lidocaína aos resíduos da fenilalanina e tirosina. (Reproduzido com permissão de Catterall W, Mackie K - Local Anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 1996;331-347) ¹⁰.

inalatórios também interfiram na condutância destes canais de sódio, assim como outras substâncias, incluindo várias drogas anticonvulsivantes e antiarrítmicas, neurotoxinas, como a tetrodotoxina, e pesticidas como os piretróides e os inseticidas organoclorados (DDT etc) ¹².

Os antagonistas de cálcio também atuam em canais iônicos e agem nos canais de cálcio voltagem-dependentes, causando vasodi-

latação e atividade antiarrítmica. O verapamil, diltiazem e nifedipina constituem os principais representantes deste grupo e atuam impedindo a abertura de canais de cálcio controlados por voltagem situados na musculatura cardíaca e vascular.

Tsien e colaboradores (1987) ¹³ descreveram três tipos distintos de canais de cálcio voltagem-dependentes, denominados de L, N e T. Distinguem-se pela dependência da voltagem, tempo de inativação e susceptibilidade a diferentes antagonistas. O canal encontra-se presente no músculo liso.

Diversas técnicas foram recentemente desenvolvidas permitindo um grande avanço no entendimento do funcionamento dos canais iônicos das membranas celulares. Entre elas destacam-se principalmente as técnicas de clameamento de voltagem, de registro com *patch-clamp* e de análise de ruído. O emprego destas técnicas proporcionam uma melhor compreensão do comportamento fisiológico do controle da abertura e das características da permeabilidade de diversos canais de membranas operados por receptores e de canais voltagem-dependentes ^{3,14}.

O segundo tipo de proteína transmembrana excitável é representado pelos receptores transmembrana associados à proteína G que ativam ou inativam uma enzima ou um canal iônico. A interação entre o receptor e a enzima ou o canal iônico é intermediada por uma terceira proteína reguladora ligada ao GTP, denominada de proteína G (Figura 7).

O terceiro tipo de receptor é exemplificado pelos receptores catalíticos associados à tirosina cinase cuja estrutura e função são bastante distintas dos receptores vistos anteriormente. Estes receptores mediam as ações da insulina e de vários fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A estrutura destes receptores envolve domínio de ligação do ligante extracelular muito grande (com 400 à 700 resíduos de aminoácidos), conectado através de uma α -hélice à

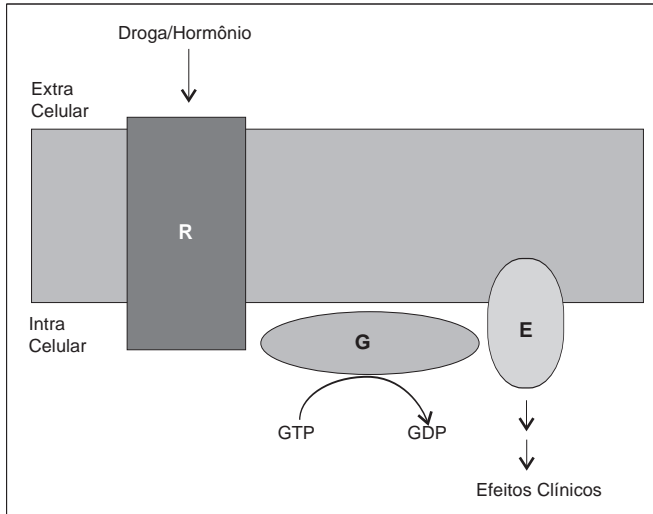


Fig 7 - Drogas, hormônios ou neurotransmissores se ligam à superfície extracelular do receptor transmembrana (R). O receptor acoplado a um agonista interage com um nucleotídeo guanínico intermediário (proteína G). Com a energia fornecida pela hidrólise do GTP em GDP, a proteína G ativada então é capaz de interagir com um sistema efetor (E) que em seguida desencadeará o efeito clínico

região catalítica. Participam principalmente de eventos que controlam a transcrição genética^{2,3,6}.

Os receptores do último tipo regulam a transcrição do ADN. Alguns hormônios como os esteróides e hormônios tireoidianos atuam nesses receptores. A estrutura básica da família destes receptores é representada por grandes proteínas monoméricas de 400 à 1000 resíduos de aminoácidos, contendo uma região altamente conservada de aproximadamente 60 resíduos no meio da molécula que parece constituir o domínio de ligação do ADN do receptor.

A maioria dos receptores que mediam a sinalização transmembrana pode ainda ser classificados dentro de três categorias estrutural e funcional ou grupos, assim discriminados¹⁵.

- 1 - Receptores com um único segmento transmembrana unindo um domínio extracelular de ligação do agonista a um domínio intracelular. O domínio intracelular geralmente possui atividade catalítica. Os receptores ligados à tirosina cinase pertencem a esta categoria.
- 2 - Receptores que tem uma estrutura oligomérica, com cada subunidade com-

posta de uma cadeia polipeptídica com diversos segmentos transmembrana. O oligômero possui sítios de ligação do agonista no domínio extracelular e encerra um canal iônico operado por ligante de definida especificidade iônica.

- 3 - Receptores que são monoméricos e que cada molécula é composta de uma única cadeia polipeptídica que atravessa a membrana sete vezes. A cadeia polipeptídica assume uma forma helicoidal transmembrana contendo um sítio de ligação do ligante e apresenta na superfície citoplasmática diversas alças que reconhecem, ligam e ativam proteínas heterotriméricas de ligação do GTP (Proteínas G), de uma maneira agonista-dependente. A proteína G ativada então media uma grande variedade de eventos, tanto na superfície celular pela abertura de canais iônicos específicos, como dentro da célula, pela ativação de enzimas que produzem ou impedem a liberação de segundos mensageiros, como o AMP cíclico, trifosfato do inositol, diacilglicerol e o ácido araquidônico.

Receptores Acoplados à Proteína G

Um grande número de drogas utilizadas em anestesiologia, incluindo opióides, simpatomiméticos, anticolinérgicos, dopaminérgicos etc, agem através de receptores acoplados à proteína G. Além disso, as proteínas G são intermediários essenciais em diversos sistemas fisiológicos de grande importância em anestesiologia, como no controle hormonal do metabolismo, sistema cardiovascular e em determinadas funções cerebrais. Por outro lado, alterações na fisiologia normal da proteína G são responsáveis pela fisiopatologia de muitas doenças infecciosas e disfunções cardiovasculares. Em razão do importante papel da proteína G, passaremos a estudá-la mais detalhadamente a seguir.

A transdução de um sinal, envolvendo

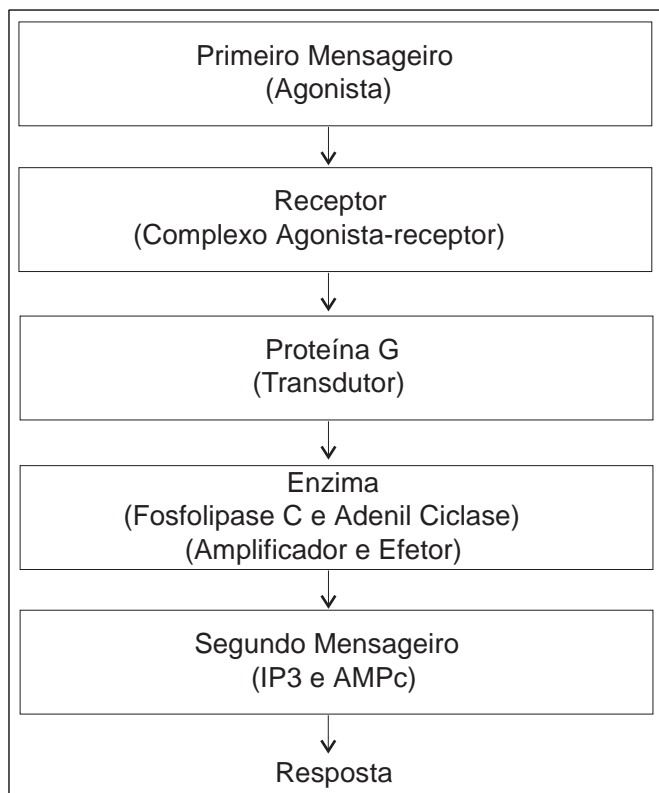


Fig 8 - Diagrama completo representando o processo de transdução de sinal através da ativação de uma proteína G. IP3, trifosfato de inositol; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina (Lambert, 1993)

o acoplamento de um agonista ao receptor, é o processo mediante o qual a célula converte um estímulo em resposta apropriada, como por exemplo a conversão da estimulação de um receptor colinérgico muscarínico de tecido glandular em uma resposta secretória. Em nível molecular destacam-se principalmente quatro elementos básicos, ou etapas fundamentais, entre o estímulo inicial e a resposta, neste sistema de transdução, associado a proteína G (Figura 8). O agonista, ligante ou primeiro mensageiro, que pode ser um neurotransmissor, um hormônio ou uma droga agonista, interage com um receptor específico da superfície celular. Como conseqüência da ligação do agonista ocorrerá uma alteração conformacional na proteína receptora. A modificação conformacional uma vez estabelecida, permite ao receptor interagir com um segundo elemento do sistema denominado de proteína G, encontrada na superfície interna da membrana celular. As proteínas G representam transdutores intermediários do sinal para um terceiro componente do sistema denominado de efetor (sistema enzimático ou ca-

Tabela I - Proteína G e seus Receptores e Efetores Associados (Yost, 1993)

Proteína	Receptores	Efetores	Efeito
Gs	B ₁ ;B ₂ ;B ₃ - adrenérgico, DA ₁ ,H ₁ , H ₂ glucagon, serotonina ₂ , ACTH, LH, FSH, GnRH, TRH, prostaciclina	Adenil ciclase, canais de Ca ²⁺	Aumento de AMPe, Aumento da entrada de Ca ²⁺
G _i	α ₂ -adrenérgico, DA ₂ muscarínico μ δ, K, opióide, adenosina, serotina 1a, angiotensina, endotelina-1 trombina, GABA _b , somatostatina	Adenil ciclase, fosfolípase A ₂ , canais de K ⁺	Redução de AMPc liberação de eicosanóide, hiperpolarização
G _k	Muscarínico atrial	Canais de K ⁺	Hiperpolarização
G _a	Muscarínico (M ₁), α ₁ - adrenérgico	Fosfolípase Cβ isoenzima	Aumento IP ₃ , DAG, Ca ²⁺
G _{olf}	Olfatório	Adenil ciclase	Aumento de AMPc (olfato)
G _t	Fótons	GMP cíclico	Redução do GMPc (visão)
G _o	Ainda sem definição	Fosfolípase C, canais de Ca ²⁺	Aumento de IP ₃ , DAG, Ca ²⁺ redução da entrada de Ca ²⁺

As proteínas G são: Gs, estimulação; G_i, inibição; G_k, regulação de potássio; G_q, regulação da fosfolípase, olfatória; G, transdução; G_o, outras. Abreviações - DA₁ e DA₂, Dopamina, 1 e 2; H₁ e H₂, histamina 1 e 2; ACTH, hormônio adrenocorticotrópico, LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; TSH, hormônio tireóideo estimulante; VIP, peptídeo vasoativo intestinal; CRH, hormônio liberador de corticotropina; GHRH, hormônio liberador do hormônio do crescimento; GnRH, hormônio liberador de gonadotropina; TRH, hormônio liberador de tireotropina; GABA, ácido γ-aminobutírico; AMPc, adenosina 3'5'- monofosfato cíclico; GMPc, Guanosina 3'5' monofosfato cíclico; IP₃, trifosfato de inositol; DAG, 1, 2 diacilglicerol.

nal iônico). O efetor geralmente é uma enzima capaz de converter um precursor inativo em um “segundo mensageiro” ativo, o componente final do sistema. O segundo mensageiro será então capaz de ativar uma cascata de enzimas ou condicionar ao fluxo transmembrana de diversos íons. Tais enzimas, por sua vez, promoverão elevação na fosforilação de proteínas e conseqüentemente uma resposta celular, como por exemplo, a secreção de um hormônio ou neurotransmissor, liberação de glicose, contração muscular etc ^{5,16,17}.

Diferentes receptores transmembrana constituem uma grande família, ou super família de receptores, acoplados a proteína G, destacando-se entre eles os receptores opióides, colinérgicos muscarínicos, adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, da endotelina, natriurético atrial, da colecistocinina, etc (Tabela I).

ESTRUTURA MOLECULAR E FISIOLOGIA DAS PROTEÍNAS G

As proteínas G são heterotrímeros, ou seja, compostas de três subunidades estruturalmente distintas de polipeptídios denominadas α , β , γ . Foram denominadas de proteína G devido à sua interação com os nucleotídeos guanílicos GDP (guanosina difosfato) e GTP (guanosina trifosfato). No estado inativo o GDP encontra-se ligado e, quando a proteína G é ativada, o GDP é substituído pelo GTP. Os nucleotídeos guanínicos ligam-se à subunidade alfa que possui atividade enzimática, catalisando a conversão de GTP em GDP. As subunidades beta e gama apresentam boa homologia entre as diferentes proteínas G, enquanto a subunidade alfa se diferencia bastante possibilitando a distinção das proteínas G através de suas subunidades alfa. As subunidades beta e gama são bastante hidrofóbicas e formam um complexo beta-gama (β , γ) com a superfície citoplasmática da membrana celular ^{2,3,5,17}.

A sequência de eventos envolvendo a proteína G desde a interação agonista-receptor

até a ativação do efetor, pode ser denominada de ciclo da proteína G. Inicialmente a proteína G é encontrada no seu estado de repouso formando um trímero α , β , γ , com o GDP ocupando o local da subunidade alfa. A interação do ligante, ou agonista, com o receptor da membrana promove uma alteração conformacional na molécula protéica do receptor. Essa alteração provavelmente envolve o domínio citoplasmático, permitindo sua interação com a proteína G, e fazendo com que o receptor adquira alta afinidade pelo trímero α , β , γ . A associação do receptor com as subunidades α , β , γ da proteína G causa uma dissociação do GDP ligado e sua substituição pelo GTP intracelular, que por sua vez promove a dissociação da subunidade alfa do complexo $\beta\gamma$. O α -GTP constitui então a forma ativa da proteína G.

Uma vez ativada a proteína G encontra-se livre para se difundir na membrana e encontrar o próximo elemento do ciclo, uma proteína efetora. Usualmente, este efetor será uma enzima intracelular (como por exemplo a adenilciclase, fosfolipase C) ou um canal iônico na membrana celular. Este encontro é capaz de regular o efetor (como por exemplo ativando ou inibindo uma enzima efetora, ou abrindo ou fechando um canal iônico), promovendo assim uma alteração na concentração de um segundo mensageiro intracelular ou alterando o potencial da membrana celular. O passo seguinte do processo envolve a hidrólise do GTP em GDP através da atividade GTPásica da subunidade alfa. A proteína G permanece ativada até o momento da hidrólise do terminal fosfato do GTP que retorna a GDP. O α -GDP resultante dissocia-se do efetor e reassocia-se com o complexo $\beta\gamma$, completando o ciclo. Portanto, quando desativada, ou seja com o GDP agora na posição inicial, a proteína G poderá interagir com outro complexo ligante-receptor e recomeçar um novo ciclo (Figura 9) ^{3,5,16-21}.

Como as subunidades alfa das proteínas G diferem em estrutura, a sua conformação determina qual o tipo de receptor e efetor a ser ativado e conseqüentemente a resposta

Tabela II - Proteína G e seus Principais Efetores e Efeitos Fisiológicos (Gilmar, 1987) ⁵

Estímulo	Tipo de Célula Afetada	ProteínaG	Efedor	Efeito
Adrenalina, glucagon	Células hepáticas	Gs	Adenilil ciclase	Quebra de glicogênio
Adrenalina, glucagon	Células de gordura	Gs	Adenilil ciclase	Quebra da gordura
Hormônio luteinizante	fóliculo ovariano	Gs	Adenilil ciclase	Aumento da síntese de estrogênio e progesterona
Hormônio antidiurético	Células renais	Gs	Adenilil ciclase	Conservação de água pelos rins
Acetilcolina	Células do músculo cardíaco	Gi	Canal de potássio	Diminui a frequência cardíaca e diminui a força de bombeamento
Encefalinas endorfinas, opióides	Neurônios do SNC	Gi/Go	Canais de cálcio e de potássio, adenilil ciclase	Altera a atividade elétrica dos neurônios
Angiotensina	Células de músculo liso nos vasos sanguíneos	Gq	Fosfolipase C	Contração muscular, elevação da pressão sanguínea
Odor	Células neuroepiteliais no nariz	Golf	Adenilil ciclase	Detecção de odor
Luz	Células da retina	Gt	GMP cíclico, fosfodiesterase	Detecção de sinais visuais
Feromônio		GPA1	Desconhecido	Comunicação entre as células

resultante. Até o momento vários receptores associados a proteínas G já foram descritos (Tabela I) ¹⁶. Diversos subtipos de proteínas G já foram clonadas e caracterizadas, constituindo atualmente uma grande família. Até o momento onze diferentes proteínas G já foram identificadas e as mais conhecidas são apresentadas na Tabela II.

Uma das primeiras proteínas G a ser identificada foi a G_S (S do inglês *Stimulation*, estimulação) que ativa a adenilciclase elevando os níveis de Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico ou AMPc). Uma atividade oposta é produzida pela Gi (i de "inhibition", inibição) que inibe a adenilciclase provocando uma redução nos níveis de AMPc. A G_K é encontrada principalmente no tecido atrial cardíaco e está envolvida na regulação dos canais de potássio. A G_q regula a fosfolipase C. Duas modalidades sensoriais são mediadas pela ação de duas proteínas G: a G_t (t de transducin, transducina) que ativa a fosfodiesterase do GMP

nas células bastonetes da retina e a G_{olf} (olf de olfactory) que regula o olfato. Finalmente a G_o (o de outro) pode ser encontrada em tecido excitável do miocárdio, medula espinhal e cerebral e corresponde a cerca de 1% das proteínas de membrana do córtex frontal. Embora não se conheça completamente as funções da proteína G_o, sua distribuição tecidual sugere que esteja associada com funções de canais iônicos que controlam a excitabilidade celular (Tabela II) ^{5,16,18,22}.

Sistemas Efetores Modulados pela Proteína G e Segundo Mensageiros

A proteína G, uma vez ativada pelo complexo ligante ou agonista-receptor, traduz um sinal para um sistema enzimático intracelular amplificador que resulta na elaboração de um segundo mensageiro, que por sua vez, promove a ativação de uma cascata de enzimas, provo-

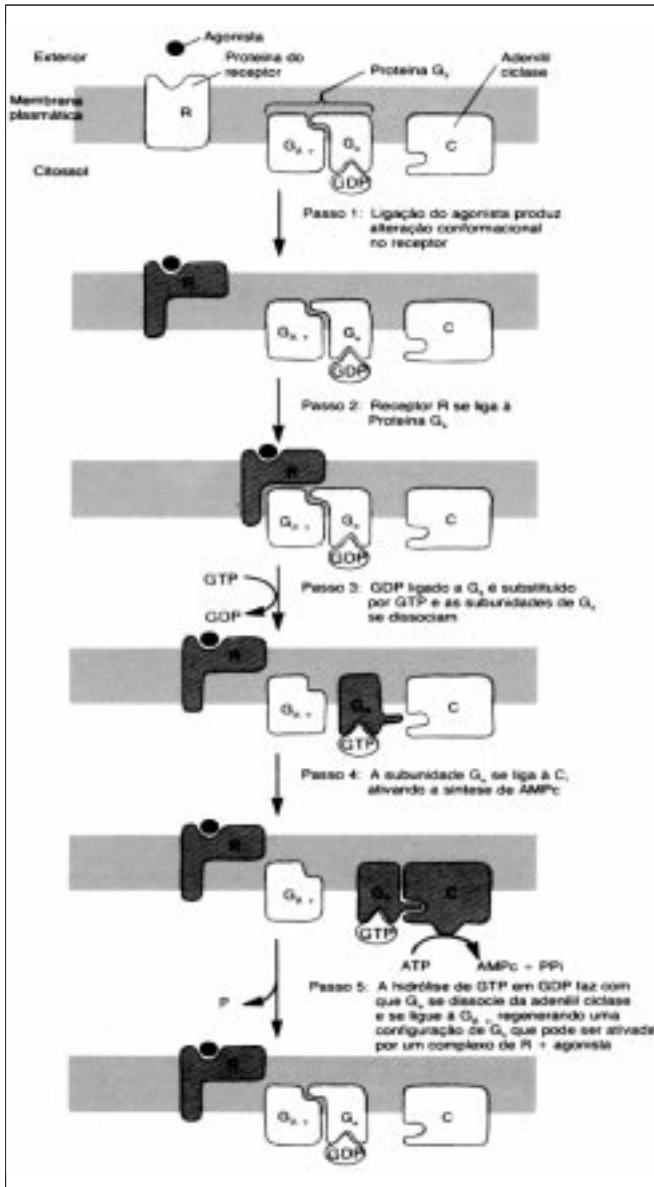


Fig 9 - Seqüência de reações resultantes da ativação de um receptor de membrana associado à proteína G (Lordish et al, 1995) ²¹

cando elevação na fosforilação de proteínas intracelulares, e conseqüentemente uma resposta celular característica. Denomina-se efetor as moléculas sinalizadoras intracelulares ativadas pelo complexo ligante-receptor acoplado à proteína G, representadas por determinadas enzimas, canais iônicos e transcrição gênica. Os principais sistemas efetores acoplados à proteína G são representados pela adenilato ciclase, fosfolipase C, fosfolipase A₂, guanilato

ciclase e canais iônicos.

Sistema da Adenilciclase

A adenilciclase ou adenilato ciclase é uma enzima ligada à membrana celular que converte o ATP intracelular em um segundo mensageiro, o AMPc. A elevação da concentração de AMPc ativa uma proteína cinase AMPc dependente que ativa outras enzimas através de fosforilação, resultando em resposta celular. A enzima fosfodiesterase, por outro lado, regula os níveis de AMPc, pela degradação do AMPc.

Cada passo da cadeia de reações que é desencadeada pela ativação da proteína G pelo complexo agonista-ligante, constituindo um processo de amplificação, em que cada molécula de proteína receptora pode ativar inúmeras moléculas de Proteína G. Cada uma destas moléculas por sua vez, é capaz de ativar uma molécula de adenilciclase. A adenilciclase ativada então, é capaz de catalisar a conversão de um grande número de moléculas de ATP em AMP cíclico, resultando na ativação de diversas moléculas de proteína cinase, com amplificação do sinal inicial e obtenção de maior resposta celular (Figura 10). O mesmo sistema de amplificação pode ser observado com a fosfolipase C. A indução de grande amplificação nestes sistemas celulares poderia ser catastrófico e felizmente as células possuem mecanismos rígidos de regulação destas cascatas metabólicas para degradar rapidamente o AMPc, para tamponar e seqüestrar o cálcio formado, assim como para inativar as enzimas reatoras e transportar proteínas ativadas ^{17,21-23}.

A adenilciclase pode ser estimulada ou inibida pelas proteínas, G_s e G_i, respectivamente. Alguns receptores podem acoplar-se à G_i, resultando em uma diminuição da formação do AMPc intracelular e conseqüente resposta inibitória. Como exemplos de agonistas inibitórios, de interesse em anestesiologia, que atuam em receptores acoplados a uma proteína G_i, podemos citar a acetilcolina ativando alguns receptores muscarínicos, opióides agindo em

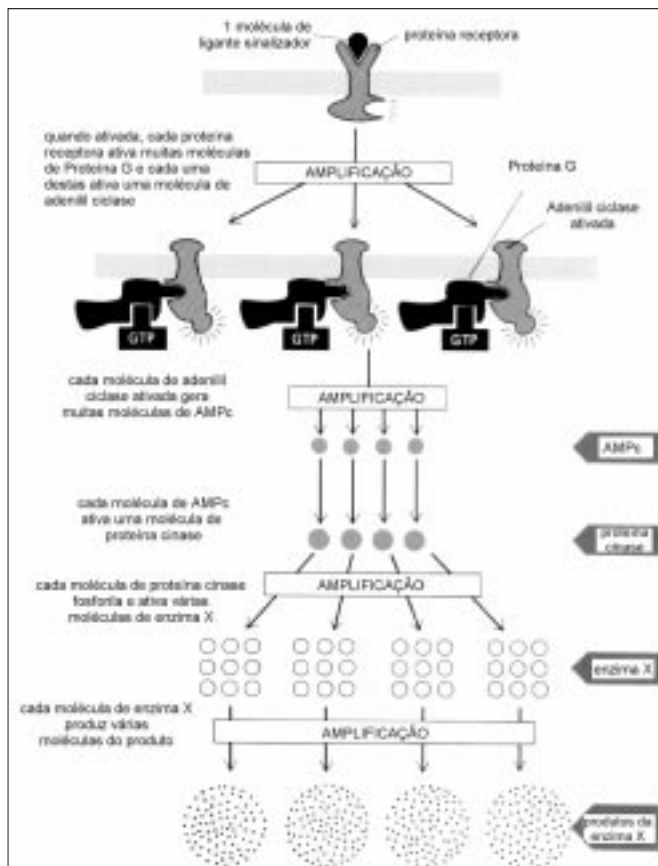


Fig 10 - Amplificação da sinalização celular após estimulação de um receptor associado à adenilil ciclase (Albert et al, 1989)²³

receptores opióides centrais e periféricos, agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos, etc^{16,17,22}.

São diversas ações reguladoras do AMPc sobre as funções celulares, incluindo a influência sobre o metabolismo energético, divisão e diferenciação celulares, transporte de íons, função de canal iônico, e de proteínas contráteis na musculatura lisa. Estas respostas, embora variadas, são todas causadas por um mecanismo comum através da ativação de proteínas cinases pelo AMPc. Essas enzimas catalisam a fosforilação dos resíduos de serina e de treonina de diversas proteínas celulares, usando ATP como fonte de fosfato, regulando, portanto, a função celular.

As proteínas G participam de importantes funções fisiológicas no organismo humano:

alterações na sua atividade podem constituir o mecanismo fisiopatológico de importantes patologias como doenças infecciosas, insuficiência cardíaca, síndrome QT longa, neoplasia, diabetes, depressão, hipotireoidismo, pseudoparatiroidismo etc. Agentes infecciosos, como por exemplo as bactérias entéricas, que causam diarreia secretória, produzem toxinas que afetam a proteína G dentro das células do epitélio intestinal. A toxina do cólera, por exemplo, impede que a subunidade alfa da proteína Gs converta GTP em GDP, permitindo uma estimulação contínua da adenililciclase nas células do intestino. Conseqüentemente, haverá um acúmulo de AMPc nas células, resultando em secreção de elevada quantidade de eletrólitos e água dentro do lúmen intestinal, ocasionado uma diarreia intensa que pode levar a um estado de desidratação potencialmente letal^{5,16}.

O pseudohipoparatiroidismo é uma desordem genética associada à redução na responsividade de hormônios que funcionam através da proteína G estimulatória (Gs). Foi observado que pacientes portadores desta patologia apresentavam uma nítida redução na expressão de αG_s ^{24,25}.

Na exposição aguda ao etanol foi constatado uma estimulação da atividade da adenilato ciclase, enquanto no alcoolismo crônico ocorre um efeito oposto, com atenuação acentuada na atividade da adenilato ciclase. Foi demonstrado que a administração crônica de etanol é também capaz de causar uma redução no ARNm (ARN mensageiro) para αG_s e no RNAm para proopiomelanocortina. As ações sobre a membrana e sobre o ARN devem concorrer para os efeitos tóxicos do etilismo crônico^{24,25}.

Em alguns tipos de neoplasia foi também observada a presença de uma proteína Gs com elevada responsividade. Nos adenomas hipersecretantes do hormônio de crescimento (GH) e em alguns tipos de linfomas foi constatado que a alteração na atividade da proteína G se deve principalmente a mutações que ocorrem na subunidade α (αG_s)²⁴.

Em outras patologias, como no hipoti-

roidismo, diabetes e na insuficiência cardíaca, parece que a alteração ocorre na proteína G_i ²⁴.

Sistema da Guanililciclase

A guanililciclase ou guanilato ciclase forma a guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico (GMPc) a partir da guanosina trifosfato. A GMPc formada é metabolizada pela fosfodiesterase.

O GMPc é um nucleotídeo cíclico que ativa uma proteína cinase que fosforila proteínas alvo intracelulares, canais iônicos e outras proteínas e que pode regular diversas respostas fisiológicas tais como vasodilatação, secreção intestinal e fosfotransdução retiniana.

Vários tecidos contém múltiplas formas de guanililciclase e GMPc fosfodiesterase. A guanilato ciclase pode ser encontrada tanto na membrana celular quanto no citoplasma. Uma forma particulada da guanililciclase situada na membrana celular encontra-se associada a diversos receptores para uma variedade de diferentes peptídios ligantes, como por exemplo o peptídeo natriurético atrial, peptídeo natriurético cerebral, peptídeo natriurético tipo C, etc. A forma solúvel da guanililciclase pode ser distinguida por sua sensibilidade a agentes vasodilatadores como a nitroglicerina, nitroprussiato e óxido nítrico. O óxido nítrico é um regulador endógeno da guanililciclase que media a ação de diversos vasodilatadores.²⁶ Os nitratos orgânicos, o nitroprussiato de sódio e a atropina induzem relaxamento do músculo liso através da formação de GMPc. O óxido nítrico, anteriormente conhecido como Fator de Relaxamento Dependente do Endotélio (FRDE), é formado a partir do aminoácido L-arginina que, sob a ação da óxido nítrico sintetase, é transformado em óxido nítrico (NO) e L-citrulina no interior da célula. A óxido nítrico sintetase é ativada principalmente pela elevação do cálcio intracelular. Uma vez transformado em sua forma ativa de nitrosotiol no interior da célula o óxido nítrico poderá ativar a guanilatociclase que promoverá a transformação de GTP em GMP cíclico. O GMPc ativará então uma proteína cinase dependente de GMPc resultando em relaxamento

vascular. Vários agonistas, como por exemplo a acetilcolina, bradicinina e serotonina, causam vasodilatação pela ativação da óxido nítrico sintetase ^{27,28}.

Sistema da Fosfolipase C

A fosfolipase C é uma outra enzima efetora estimulada pela proteína G. A ativação de receptores α_1 adrenérgicos situados na membrana celular é capaz de estimular uma proteína G acoplada a este receptor, a denominada proteína G_q , que então ativa a enzima fosfolipase C. A ativação da fosfolipase C resulta na hidrólise de um fosfolípido da membrana, o fosfatidilinositol 4-5-bifosfato (PIP₂), formando dois mensageiros secundários: o diacilglicerol (DAG) e o 1,4,5,- trifosfato de inositol (IP₃). O trifosfato de inositol liga-se então ao seu receptor situado na membrana do retículo endoplasmático, ativando a liberação intracelular de cálcio que age como um "terceiro mensageiro". A elevação da concentração de cálcio causa ativação de uma proteína cinase cálcioalmodulina dependente e subsequente fosforilação de proteínas. O DAG formado ativa a proteína cinase C que modula o ciclo do fosfatidilinositol (Figura 11) ^{2,16,17}.

A elevação da concentração do cálcio intracelular pelo fosfatidilinositol produz uma série de importantes respostas celulares tais como contração de musculatura lisa, aumento da força contrátil do miocárdio, secreção de glândulas exócrinas, liberação de neurotransmissores e de hormônios e regulação de canais iônicos. A ativação da proteína cinase C pelo DAG promove também importantes efeitos, incluindo liberação de hormônios e de neurotransmissores, contração ou relaxamento de musculatura lisa, resposta inflamatória e de formação de tumores, dessensibilização de receptores, etc.

Sistema da Fosfolipase A₂

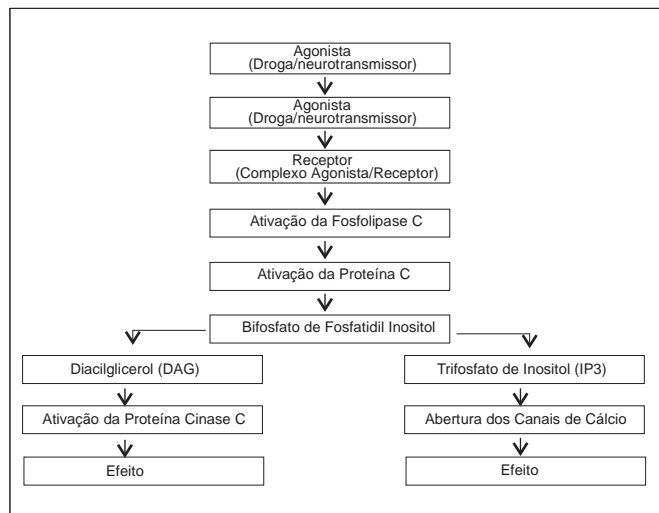


Fig 11 - Diagrama esquemático da seqüência de reações resultantes da ativação do Sistema da Fosfolipase C e do Fosfatidil Inositol

Um outro sistema efetor ativado pela proteína G é o da fosfolipase A₂ que é capaz de agir sobre fosfolipídios da membrana celular iniciando a cascata do ácido araquidônico. O ácido araquidônico pode ser catalisado por duas vias enzimáticas distintas: a via da cicloxigenase, que forma diversas prostaglandinas, incluindo o tromboxano A₂, prostaciclina e prostaglandinas do grupo E (PGE), e a via da lipoxigenase, que forma os leucotrienos²⁹⁻³¹.

Além de sua participação no controle dos canais de potássio, os metabólitos do ácido araquidônico são extremamente importantes na fisiopatologia da asma, inflamação, produção e controle de secreção ácida gástrica e contração da fibra lisa uterina^{31,32}.

Os eicosanóides são produzidos no organismo a partir dos fosfolipídios de membranas celulares, em resposta a uma ampla variedade de diferentes estímulos e encontram-se entre os mediadores e moduladores mais importantes do processo inflamatório. O ácido araquidônico constitui a principal fonte de formação de eicosanóides e encontra-se esterificado nos fosfolipídios da membrana celular. A fosfolipase A₂ é capaz de atuar nos fosfolipídeos da membrana celular, liberando ácido araquidônico que, sob a ação da cicloxigenase será transformado em

prostaglandinas e tromboxanos. A lipoxigenase, por sua vez promoverá a transformação do ácido araquidônico em leucotrienos. A ação antiinflamatória dos glicocorticóides deve-se, em parte, à estimulação da produção de lipocortina que é capaz de inibir a fosfolipase A₂. As ações analgésica, antiinflamatória e antipirética dos antiinflamatórios não esteróides, do grupo dos salicilatos e drogas congêneres, decorrem principalmente da inibição da cicloxigenase impedindo assim, a formação das prostaglandinas. Devido à grande utilização destas drogas pelos anestesiológicos, principalmente como analgésicos no pós-operatório e no tratamento das dores crônicas, é de fundamental interesse o conhecimento do seu mecanismo de ação e de seus efeitos colaterais²⁹⁻³².

Carvalho WA, Carvalho RDS, Medrado VC, Vianna PTG - Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a McGraw-Hill Companies, Churchill Livingstone, Guanabara Koogan, Eric A Barnard e Roberto J. Lefkowitz pela permissão concedida na reprodução das ilustrações utilizadas no texto.

UNITERMOS - BIOLOGIA MOLECULAR; FARMACOLOGIA: receptores REFERÊNCIAS

- Maze M, Tranquilli W - Alpha-2-adrenoceptor agonists: defining the role in clinical anesthesia. *Anesthesiology*, 1991;74:581-605.
- Schwinn DA - Adrenoceptors as models for G protein - coupled receptors: structure, function and regulation. *Br J Anaesth*, 1993;71:77-85.
- Rang HP, Dale MM - *Farmacologia*, 2ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993; 431-445.
- Dohlman HG, Lefkowitz RJ - A family of receptors coupled to guanine regulatory proteins. *Biochemistry*, 1987; 26: 2657-2664.
- Gilman AG - G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 1987;56: 615-49.
- Silva P - *Receptores Superficiais e seus Sistemas Efetores*.

- In: Silva, P. Farmacologia, 4^a Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994;91-110.
07. Unwin N, Toyoshima C, Kubalek E - Arrangement of the acetylcholine receptor subunits in the resting and desensitized states determined by cryoelectron microscopy of crystallized torpedo postsynaptic membranes. *J Cell Biol*, 1988;107:1123-1138.
 08. Taylor P - Agents Acting at the Neuromuscular Junction and Autonomic Ganglia, In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS et al - Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed, New York, Pergamon Press, 1990;166-186.
 09. Schofield PR, Darlison, MG, Fujista N - Sequence and functional expression of the GABA_A receptor show a ligand-gated receptor superfamily. *Nature*, 1987;328:221-230.
 10. Catterall W, Mackie K - Local Anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 1996;331-347
 11. Wann KT - Neuronal sodium and potassium channels: structure and function. *Br J Anaesth*, 1993; 71:2-14.
 12. Urban BW - Differential effects of gaseous and volatile anesthetics on sodium and potassium channels. *Br J Anesth*, 1993;71:25-38.
 13. Tsien RW, Fox AP, Hess P et al - Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc Gen Physiol Ser*, 1987; 41:167-187.
 14. Gurney AM - Molecular Pharmacology of Ion Channels using the Patch Clamp, In: Hulme EC - Receptor-Effector Coupling. A Practical Approach. New York, Oxford University Press, 1990;155-178.
 15. Hulme EC - Receptor-Effector Coupling. A Practical Approach. New York, Oxford University Press, 1990; VII-VIII.
 16. Yost CS - G proteins: basic characteristics and clinical potential for the practice of anesthesia. *Anesth Analg*, 1993;77:822-34.
 17. Lambert DG. Signal transduction: G proteins and second messengers. *Br J Anaesth*, 1993;74:86-95.
 18. Dunlap K, Holz GG, Rane SG - G Proteins as regulators of ion channel function. *Trends Neurosci*, 1987;10:6:241-244.
 19. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F - The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 1990; 348: 125-132.
 20. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F - The GTPase superfamily: a conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 1991;349:117-127.
 21. Lordish H, Baltimore D, Berk et al - Molecular Cell Biology, 3rd Ed, New York, Scientific American Book, 1995;853-990.
 22. Graziano MP, Gilman AG - Guanine nucleotide-binding regulatory proteins: mediators of transmembrane signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 1987; 8:478-481.
 23. Alberts B, Bray D, Lewis J et al - Molecular Biology of the Cell, 2nd Ed, New York, Garland Publishing Inc, 1989.
 24. Houslay MD - Altered Expression and Functioning of Guanine Nucleotide, Binding (regulatory) Proteins During Growth, Transformation Differentiation and in Pathological States. In: Houslay MD, Milligan G - G-Proteins as Mediators of Cellular Signalling Processes, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 1990;196-230.
 25. Milligan G - Immunological Probes and the Identification of Guanine Nucleotide Binding Proteins., In: Houslay MD, Milligan G - G-Proteins as Mediators of Cellular Signalling Processes, Chichester, John Wiley & Sons; 1990;31-46.
 26. Schulz S, Yuen PST, Garbers DL - The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci*, 1991;12:116-120.
 27. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA - Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991;43:109-142.
 28. Moncada S, Higgs A - The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993;329: 2002-2012.
 29. Carvalho WA - Mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteróides. I. Ações farmacológicas das prostaglandinas e leucotrienos. *F Med*, 1990; 100: 37-44.
 30. Carvalho, WA - Mecanismos de ação das drogas antiinflamatórias não-esteróides. II. Ações analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. *F Med*. 1990;100:111-122.
 31. Campbell WB, Halushka PV - Lipid-Derived Autacoids. Eicosanoids and Platelet-activating Factor. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al - Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 1996; 601-616.
 32. Carvalho WA - Analgésicos, Antipiréticos e Antiinflamatórios, In: Silva, P - Farmacologia, 4^a Ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1994; 406-440.