



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

Citoesqueleto

Profa. Dra. Nívea Macedo

Citoesqueleto

- Para o funcionamento celular adequado:
 1. Organizar no espaço;
 2. Interagir mecanicamente com o ambiente ao seu redor;
 3. Apresentar uma conformação correta;
 4. Ser fisicamente robustas;
 5. Estar estruturada de forma adequada internamente;
 6. Capazes de modificar sua forma e migrar;
 7. Capazes de reorganizar seus componentes internos como decorrência dos processos de crescimento, divisão e/ou adaptação a mudanças no ambiente;
- Todas essas funções são dependentes do citoesqueleto e, portanto, altamente desenvolvidas em células eucarióticas!

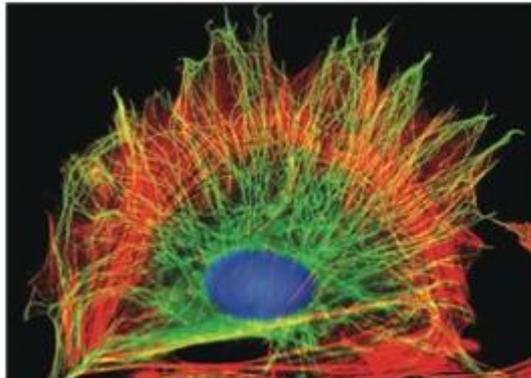


Figura 16-1 O citoesqueleto. Uma célula em cultura foi fixada e corada para mostrar dois dos principais componentes do citoesqueleto, microtúbulos (em verde) e filamentos de actina (em vermelho). O DNA nuclear está corado em azul. (Cortesia de Albert Tousson.)

Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação

- Microtúbulos originam-se a partir do centrosomo e podem reorganizar-se para formar:
 1. *Fuso mitótico* bipolar durante a divisão celular;
 2. Estruturas de locomoção denominadas *cílios e flagelos* na superfície das células;
 3. Estruturas em feixes que servem como trilhos para o *transporte de materiais* ao longo dos axônios neuronais;
 4. Em *células vegetais*, conjuntos organizados de microtúbulos auxiliam a direcionar o padrão de síntese da *parede celular*;

Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação

- Filamentos de actina revestem a face interna da MP de células animais:
 1. *Resistência e forma* a esta fina bicamada lipídica;
 2. *Formam projeções na superfície das células*, algumas são dinâmicas, como os lamelipódios e filopódios;
 3. O *anel contrátil* com base em actina se organiza de forma transiente para promover a divisão da célula em duas;
 4. Arranjos mais estáveis permitem que a célula se fixe a um substrato adjacente, permitindo também a *contração muscular*;
 5. Feixes regulares do *estereocílio* na superfície de células do ouvido interno contém feixes de filamentos de actina que vibram como hastes rígidas em resposta ao som;
 6. As *microvilosidades* da superfície de células epiteliais intestinais;

Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação

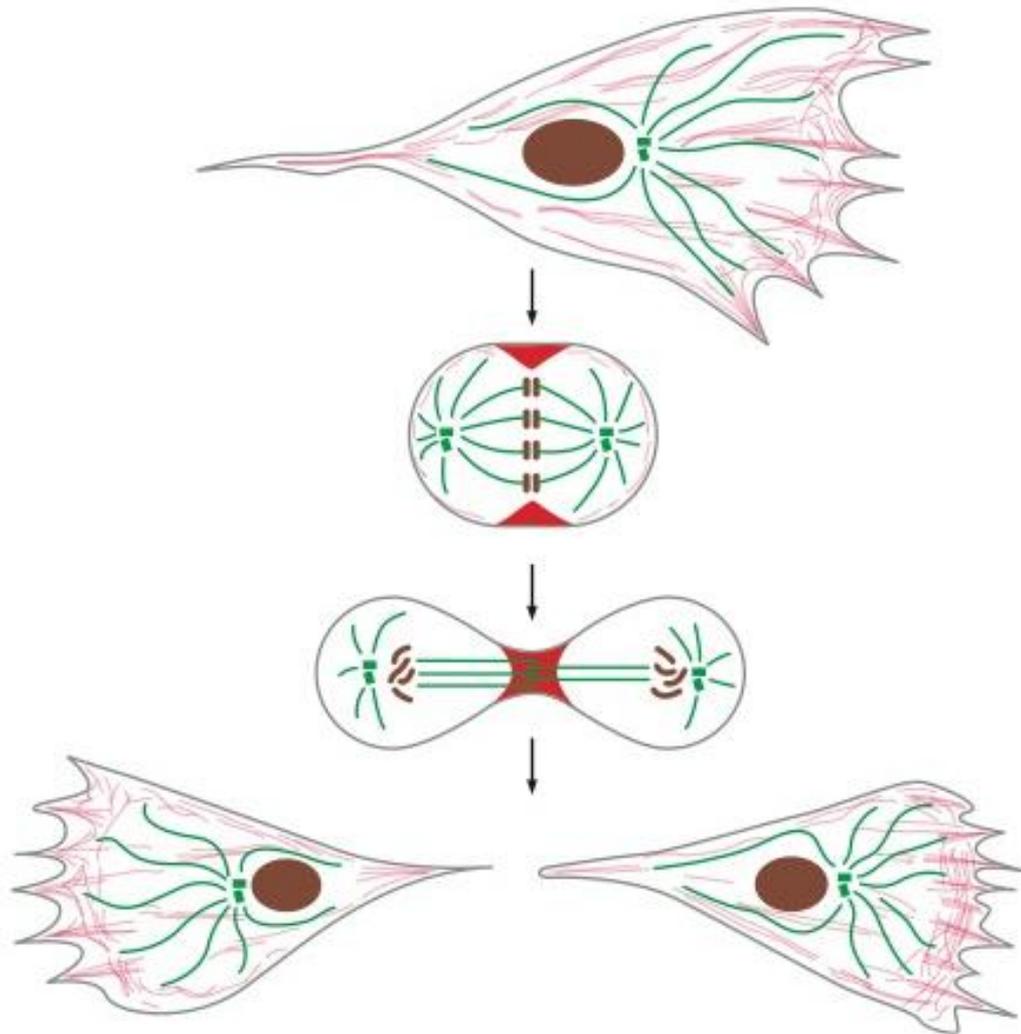


Figura 16-2 Rápidas alterações na organização do citoesqueleto associadas à divisão celular. O fibroblasto em movimento aqui representado possui um citoesqueleto de actina dinâmico e polarizado (ilustrado em *vermelho*) que se associa para impelir a borda frontal para a direita. A polarização do citoesqueleto de actina é auxiliada pelo citoesqueleto de microtúbulos (ilustrado em *verde*), o qual consiste em longos microtúbulos que partem de um único centro organizador de microtúbulos localizado em região anterior ao núcleo. Quando a célula se divide, o arranjo polarizado de microtúbulos é reorganizado para a formação de um fuso mitótico bipolar, o qual é responsável pelo alinhamento e pela posterior separação dos cromossomos duplicados (*marrom*). Os filamentos de actina formam um anel contrátil no centro da célula que a comprime separando-a em duas após a segregação dos cromossomos. Após a completa divisão da célula, ambas as células-filhas reorganizam seus citoesqueletos de actina e de microtúbulos em versões menores daquelas que se encontravam na célula-mãe, permitindo que estas se arrastem em direções distintas.

Os filamentos do citoesqueleto são dinâmicos e capazes de adaptação

- **Filamentos intermediários:**
- Revestem a face interna do *envelope nuclear*, formando uma espécie de gaiola protetora para o DNA da célula;
- No citosol, estes filamentos encontram-se em uma forma de *fortes cabos que mantém as camadas das células epiteliais unidas* ou que auxiliam a extensão dos longos e fortes axônios das células neuronais.
- Permitem a *formação de determinados apêdices resistentes*, como os pelos e as unhas.

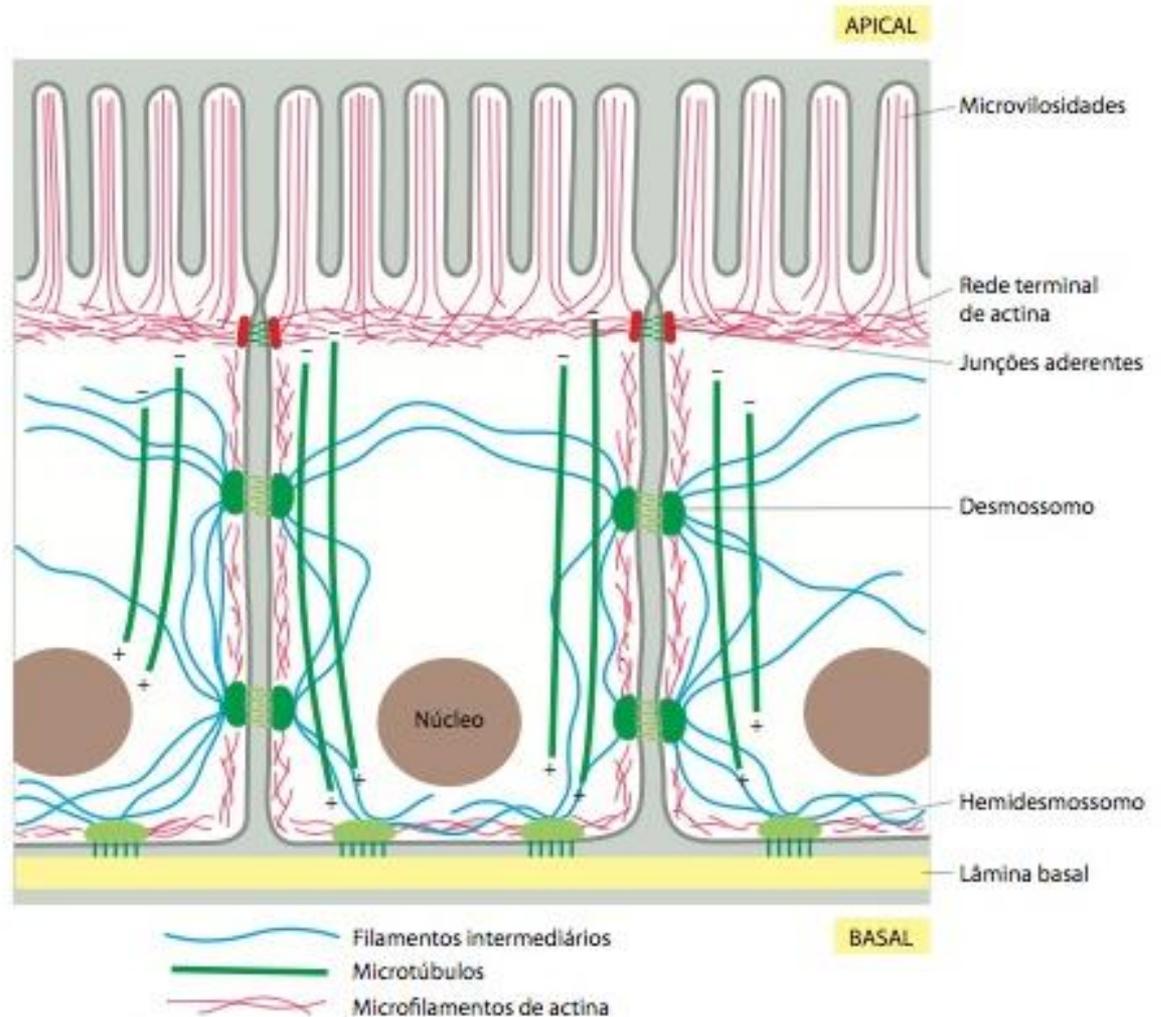
O citoesqueleto também pode formar estruturas estáveis

- O **citoesqueleto também forma estruturas grandes e estáveis** em células que adquiriram uma morfologia diferenciada e estável (ex. neurônios ou células epiteliais maduras);
- **Feixes de actina da região central dos estereocílios** de células do ouvido interno mantêm sua organização estável durante toda a vida do animal, tendo em vista que estas células não sofrem reposição;
- Filamentos de actina apresentam **comportamento altamente dinâmico** e estão continuamente sendo remodelados e substituídos **dentro de estruturas de superfície celular estáveis** que podem persistir por décadas;
- O **citoesqueleto é responsável pela polarização geral das células**, permitindo que elas apresentem diferenças entre suas regiões superiores e inferiores ou anteriores e posteriores;

O citoesqueleto também pode formar estruturas estáveis

- **A informação** referente à **polarização** geral codificada pela organização do citoesqueleto também deve ser frequentemente **mantida durante todo o período de vida da célula**;
- **Células epiteliais polarizadas**, como as que revestem o intestino, por exemplo, usam arranjos organizados de microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários para **manter diferenças funcionais críticas entre a superfície apical que absorve os nutrientes e a superfície basolateral**, onde transferem os nutrientes para a corrente sanguínea.
- A levedura *Saccharomyces cerevisiae* necessita de um **sistema de polarização geral estável**, devido a sua **assimetria**, devido aos arranjos dos filamentos de actina, na **divisão por brotamento**, que dá origem a uma célula-filha pequena e uma célula-mãe grande;

Figura 16-5 Organização do citoesqueleto em células epiteliais polarizadas. Todos os componentes do citoesqueleto cooperam para a definição dos formatos característicos de células especializadas, como as células epiteliais que revestem o intestino delgado. Na superfície apical (superior), que se dirige para o lúmen do intestino, feixes de filamentos de actina (em vermelho) formam microvilosidades que aumentam a área de superfície celular disponível para a absorção de nutrientes a partir dos alimentos. Exatamente abaixo das microvilosidades, uma banda circunferencial de filamentos de actina contribui para a formação de junções célula-célula que evitam que o conteúdo do lúmen intestinal penetre o organismo. Filamentos intermediários (em azul) estão ancorados a outros tipos de estruturas adesivas, como desmossomos e hemidesmossomos, que conectam as células epiteliais em uma camada e as prendem à matriz extracelular subjacente, na extremidade basal da célula; estas importantes estruturas de adesão serão discutidas no Capítulo 19. Microtúbulos (em verde) projetam-se verticalmente do alto da célula até sua base e fornecem um sistema coordenado geral que permite à célula direcionar, para o local adequado, componentes recentemente sintetizados.



Cada tipo de filamento do citoesqueleto é construído a partir de subunidades proteicas menores

- **Os filamentos intermediários** são formados a partir **proteínas fibrosas e longas**, ao passo que os **filamentos de actina** e os **microtúbulos** são compostos por **subunidades globulares e compactas**;
- Esses 3 tipos de filamentos do citoesqueleto formam arranjos helicoidais de subunidades;
- **Diferenças entre as estruturas destas subunidades** e da **resistência das forças de atração** entre elas são as principais responsáveis pelas **características de estabilidade e propriedades mecânicas diferenciadas** de cada tipo de filamento;
- A estrutura dos 3 tipos de polímeros do citoesqueleto é mantida por interações não-covalentes fracas, o que significa que sua associação e dissociação podem ocorrer rapidamente;

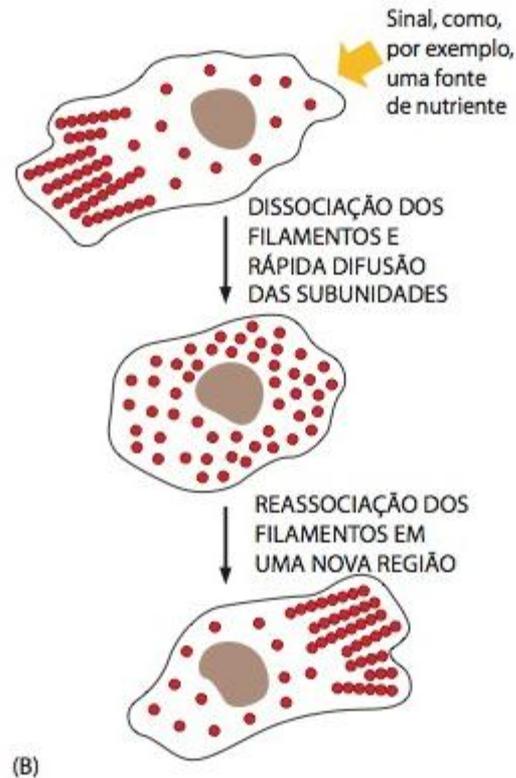
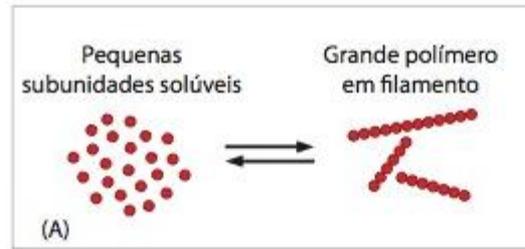


Figura 16-7 O citoesqueleto durante alterações na forma da célula. A formação de filamentos de proteína a partir de subunidades proteicas muito menores permite a remodelação regulada do citoesqueleto por associação e dissociação de filamentos. (A) A formação de filamento a partir de uma proteína pequena. (B) A rápida reorganização do citoesqueleto de uma célula em resposta a um sinal externo.

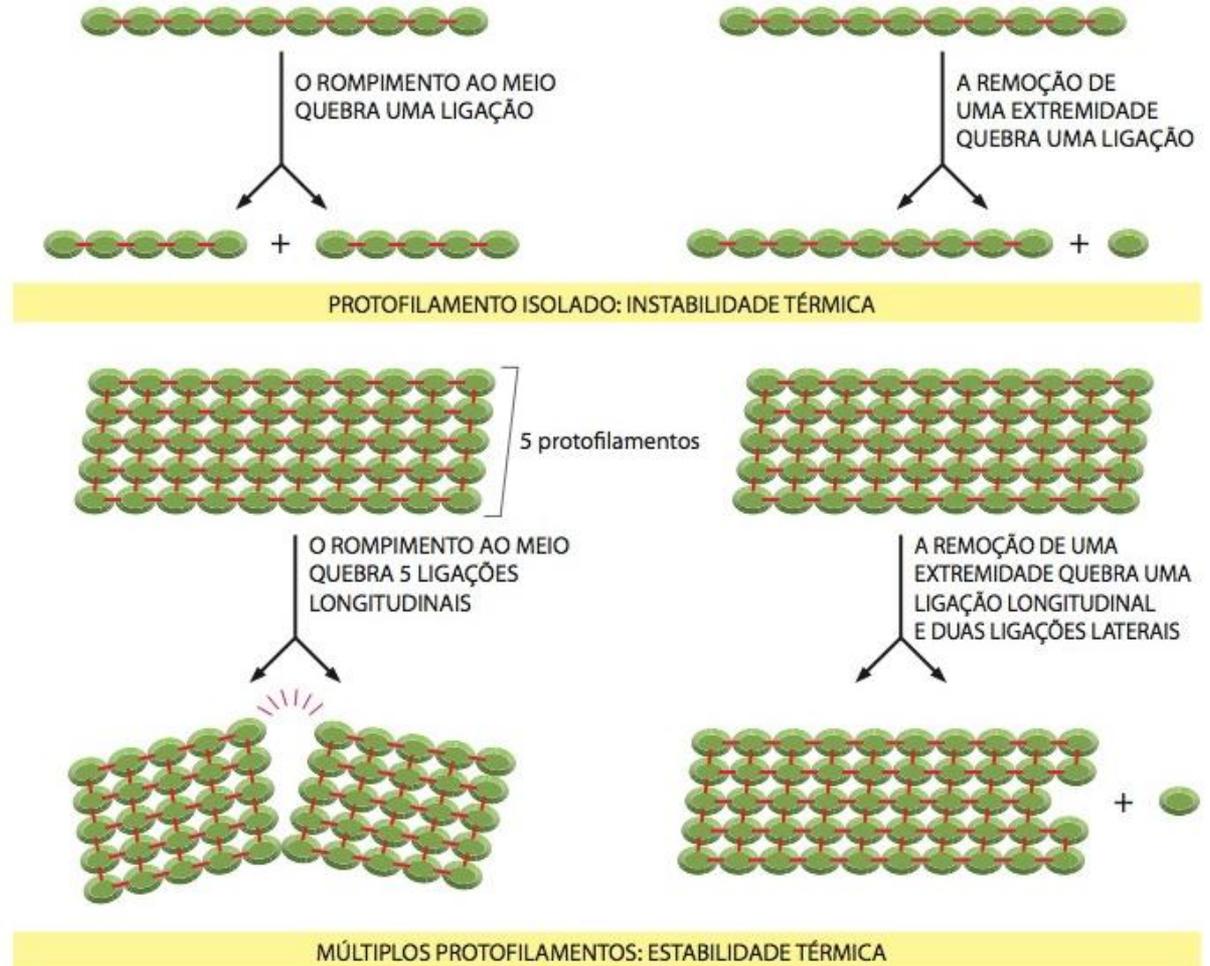
Cada tipo de filamento do citoesqueleto é construído a partir de subunidades proteicas menores

- Centenas de **proteínas acessórias regulam a distribuição espacial e o comportamento dinâmico dos filamentos**, convertendo informações recebidas através de vias de sinalização em ações do citoesqueleto;
- Essas proteínas acessórias ligam-se aos filamentos ou as suas subunidades para:
 1. Determinar o local de montagem de novos filamentos;
 2. Regular a distribuição das proteínas entre as formas filamento ou subunidade;
 3. Modificar a cinética de montagem e dissociação dos filamentos;
 4. Concentrar a energia para gerar força e para ligar os filamentos uns aos outros ou a estruturas celulares, como organelas ou a membrana plasmática;
- Nesses processos, as **proteínas acessórias mantêm a estrutura do citoesqueleto sob o controle de sinais intra e extracelulares**, como as transformações que o citoesqueleto sofre durante cada uma das etapas do ciclo celular;

Filamentos formados a partir de múltiplos protofilamentos apresentam vantagens

- Os **polímeros do citoesqueleto combinam resistência e capacidade de adaptação**, pois são constituídos a partir de múltiplos protofilamentos combinados helicoidalmente;
- Em geral e como característica, os protofilamentos enrolam-se uns aos outros formando uma estrutura helicoidal;
- A adição ou perda de uma subunidade na extremidade de um protofilamento forma ou quebra um conjunto de ligações longitudinais e um ou dois grupos de ligações laterais;
- Para que haja a quebra de um filamento ao meio, é necessário que ocorra simultaneamente a quebra de um conjunto de ligações longitudinais em vários protofilamentos;

Figura 16-8 Estabilidade térmica de filamentos do citoesqueleto com extremidades dinâmicas. A formação de filamentos do citoesqueleto a partir de mais de um protofilamento permite a ocorrência de extremidades dinâmicas, ao mesmo tempo em que os filamentos *per se* apresentam resistência à degradação térmica. Neste exemplo hipotético, o filamento estável é formado a partir de cinco protofilamentos. As ligações que mantêm as subunidades unidas nos filamentos estão representadas em *vermelho*.



Filamentos formados a partir de múltiplos protofilamentos apresentam vantagens

- As **subunidades dos filamentos** do citoesqueleto são mantidas unidas por um grande número de **interações hidrofóbicas e outras ligações não-covalentes fracas**;
- **Filamentos intermediários**, por exemplo, são montados pela formação de **contatos laterais fortes entre hélices supertorcidas**, as quais ocorrem ao longo da quase totalidade de cada subunidade fibrosa adicionada;
- As **subunidades individuais estão intercaladas** no filamento e por isso esses filamentos **toleram a tração e a torção**, formando estruturas fortes semelhantes a um cabo ou corda;
- Os **microtúbulos** são construídos a partir de subunidades globulares **unidas entre si principalmente por ligações longitudinais**, sendo comparativamente **fracas as ligações laterais** que unem o conjunto de 13 protofilamentos. Por essa razão, os **microtúbulos são rompidos de forma muito mais fácil que os filamentos intermediários quando sofrem dobramento**;

Subunidades longas não-coincidentes: domínio de contatos laterais

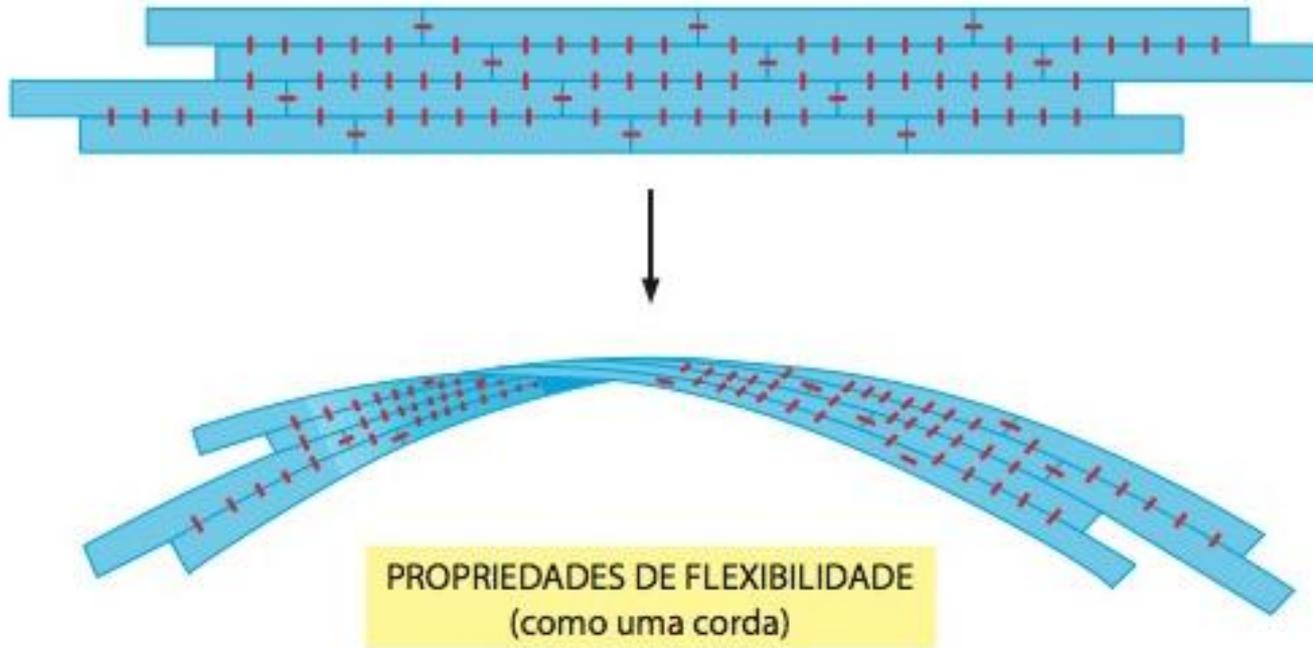
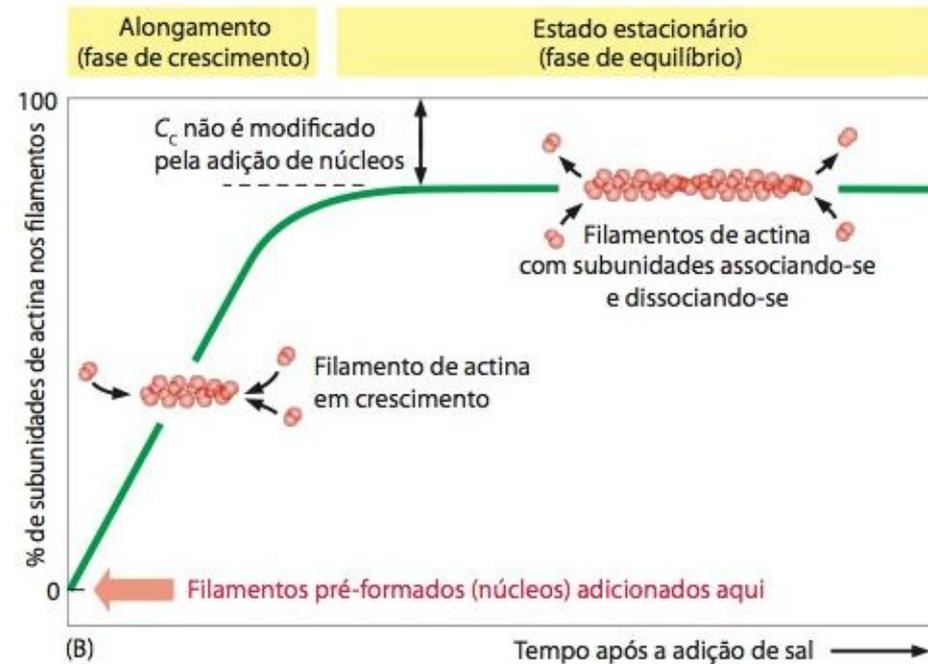
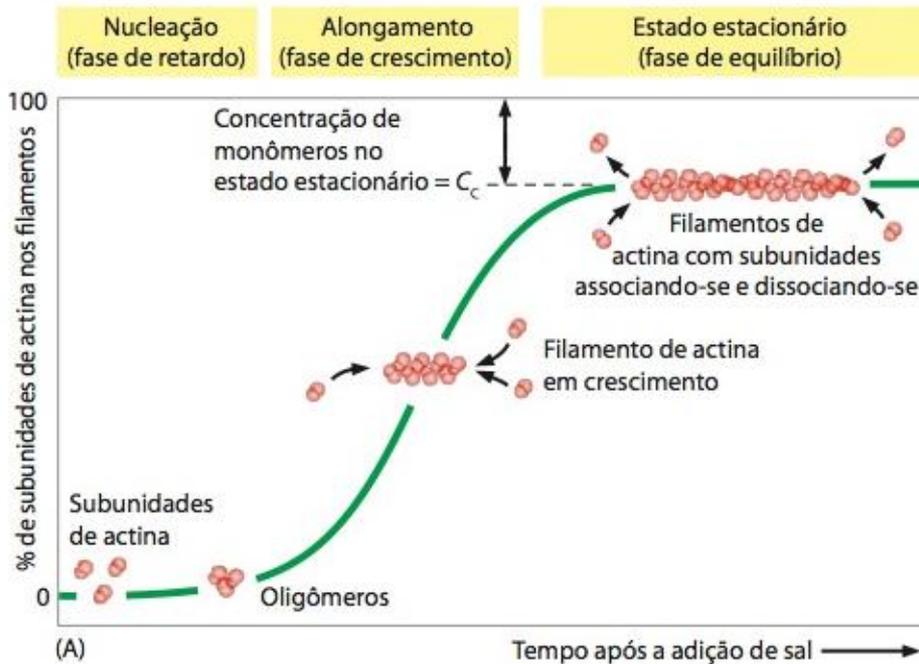


Figura 16-9 Filamento resistente formado a partir de subunidades de fibras alongadas com fortes contatos laterais. Filamentos intermediários são formados desta forma; como consequência, são especialmente resistentes a forças de tração, apesar de serem facilmente dobrados.

A taxa de nucleação é um fator limitante na formação de um polímero do citoesqueleto

- Adição e dissociação são balanceados;
- Concentração de monômeros no estado estacionário = Concentração crítica (C_c);

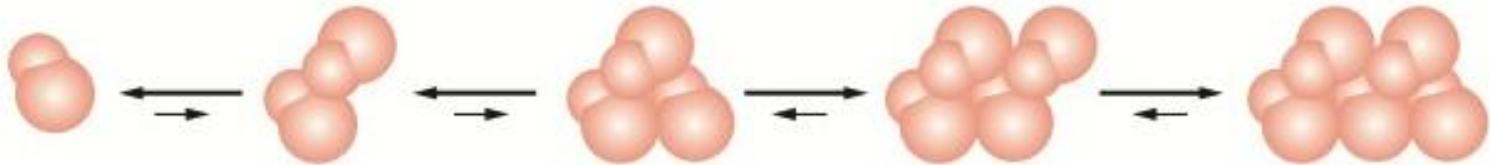
$$C_c = k_{off}/k_{on}$$



Ou temperatura

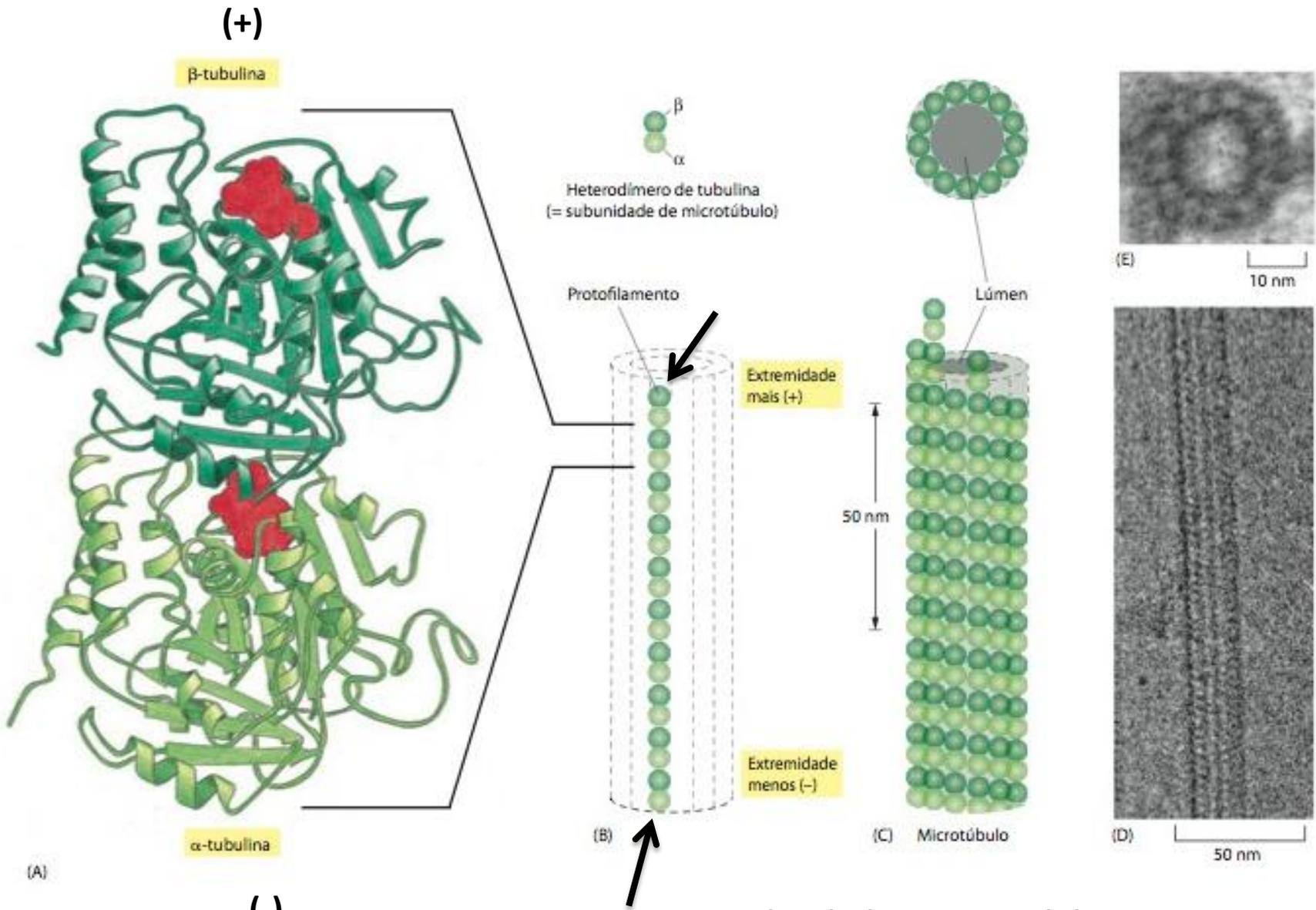
A taxa de nucleação é um fator limitante na formação de um polímero do citoesqueleto

- A célula utiliza proteínas especiais para catalisar a nucleação de filamentos em regiões específicas, determinando, assim, onde novos filamentos do citoesqueleto deverão ser formados.
- A regulação da nucleação do filamento é uma forma essencial de controle por meio da qual as células regulam sua forma e seu movimento.
- Um trímero de actina atua como núcleo para a polimerização de um filamento de actina, enquanto o núcleo de tubulina, provavelmente, constitui um anel de 13 ou mais subunidades;



As subunidades de actina e tubulina associam-se à cabeça e à cauda em oposição, geram filamento polarizados

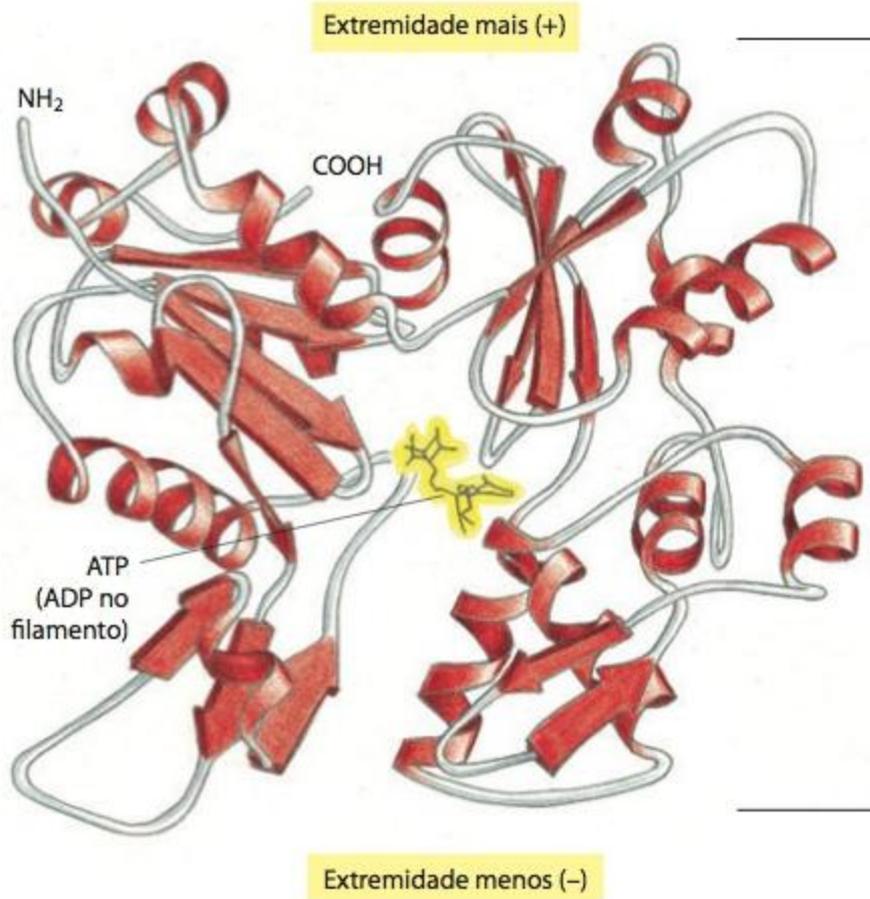
- Microtúbulos é uma estrutura cilíndrica oca e firme formada a partir de 13 protofilamentos paralelos composto das moléculas alternadas α -tubulina e β -tubulina;
- Os microtúbulos são formados por um heterodímero de duas proteínas globulares (α -tubulina e β -tubulina), associadas por ligações não-covalentes;
- Cada um dos monômeros possui um sítio de ligação a uma molécula de GTP.
- O GTP que se liga ao monômero de α -tubulina é parte integrante da estrutura do heterodímero de tubulina, enquanto o GTP que se liga ao monômero de β -tubulina pode estar sob a forma de GTP ou GDP;
- Contatos “topo” e “base” e contatos laterais fazem com que os microtúbulos sejam rígidos e difíceis de sofrer dobramento, tornando-os os elementos estruturais mais rijos e resistentes das células animais;



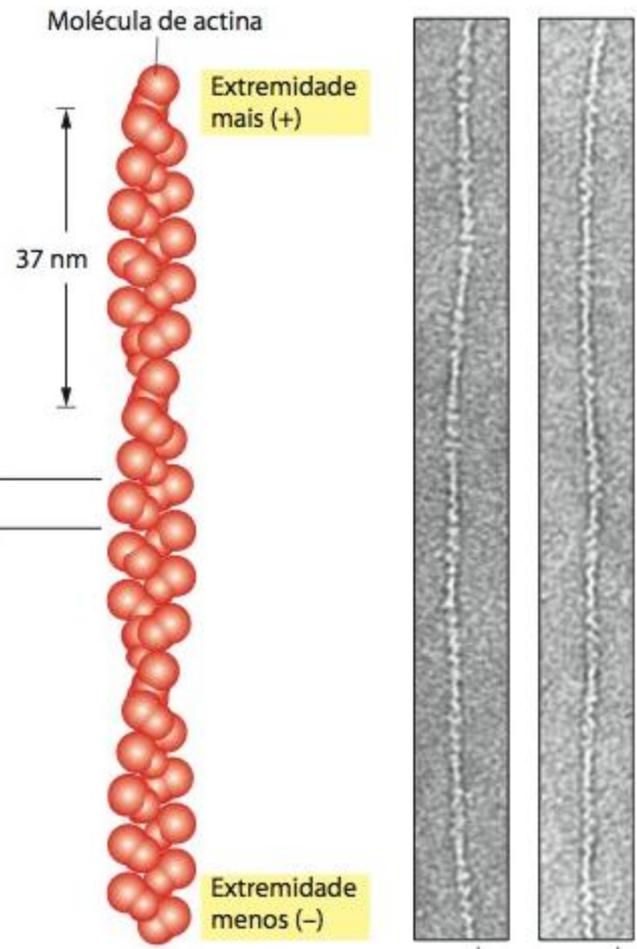
Polaridade estrutural distinta

As subunidades de actina e tubulina associam-se à cabeça e à cauda em oposição, geram filamento polarizados

- A subunidade de actina é um monômero que apresenta um sítio de ligação a ATP ou ADP;
- As subunidades de actina se associam em oposição de cabeça e cauda;
- O filamento de actina é formado a partir de dois protofilamentos paralelos enrolados um sobre o outro em uma hélice dextrógiara.
- Os filamentos de actina são relativamente flexíveis e fáceis de serem curvados, entretanto em uma célula viva, proteínas acessórias interligam os filamentos formando feixes, tornando estas grandes estruturas muito mais fortes do que filamentos de actina individuais.



Extremidade de Pena



(A)

(B)

(C)

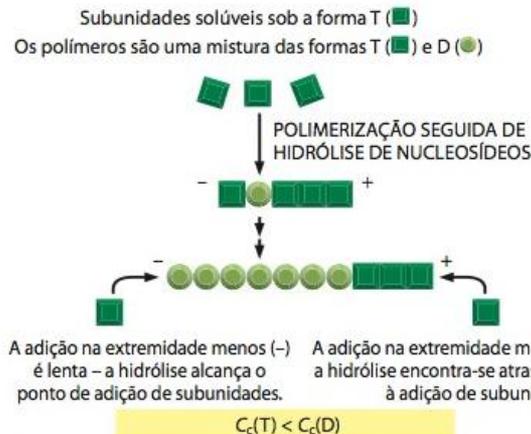
Extremidade de Ponta

Filamentos de actina e microtúbulos possuem duas extremidades distintas com diferentes taxas de crescimento

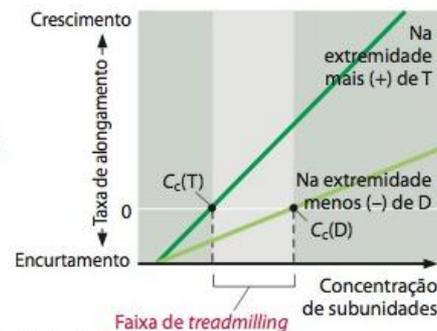
- Na ausência de hidrólise de ATP ou GTP as proporções entre as taxas constantes de crescimento (K_{on}/K_{off}) devem ser idênticas para as duas extremidades, apesar de que os valores absolutos possam diferir em cada extremidade;
- Em um filamento polar, geralmente as taxas de constante cinética são bem maiores em uma das extremidades;
- A dinâmica de crescimento e dissociação ocorre mais rapidamente na extremidade mais (+) em relação à extremidade menos (-);

Os processos de *treadmilling* e instabilidade dinâmica de filamentos

- O processo de hidrólise de trifosfatos de nucleosídeo é acelerado quando as subunidades estão incorporados nos filamentos;
- Em células vivas, a maioria das subunidades livres encontra-se sob a forma T (concentrações de ATP e GTP livres é cerca de 10 vezes maiores de que de ADP e GDP);
- Se a taxa de adição de subunidades é alta, é bastante provável que uma nova subunidade seja adicionada ao filamento antes que a subunidade anteriormente adicionada tenha sofrido hidrólise – formação de uma *capa de ATP ou GTP*;

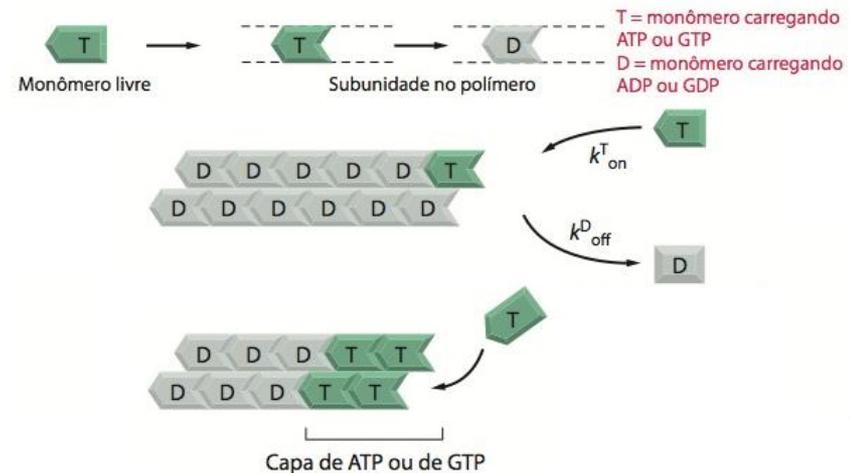


(A)



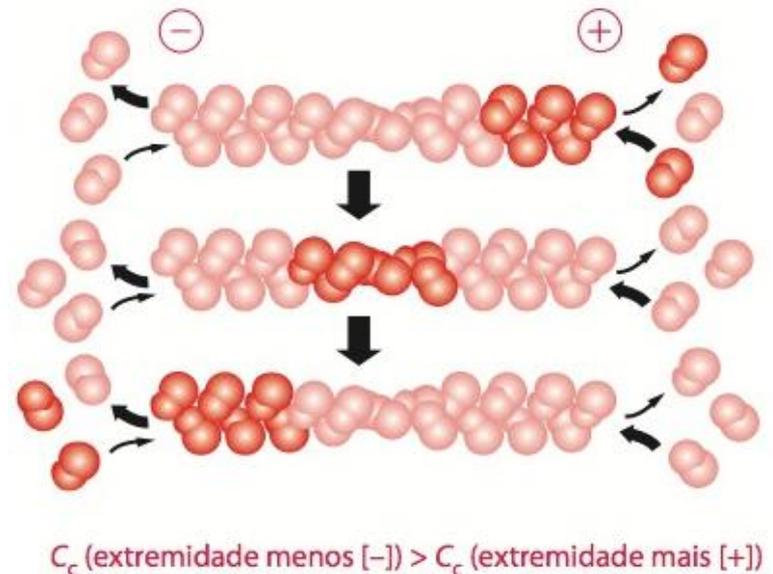
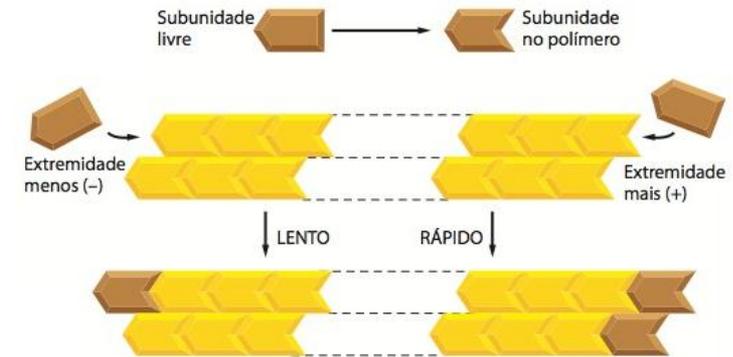
(B)

Para $C_c(T) < C < C_c(D)$ ocorre treadmilling



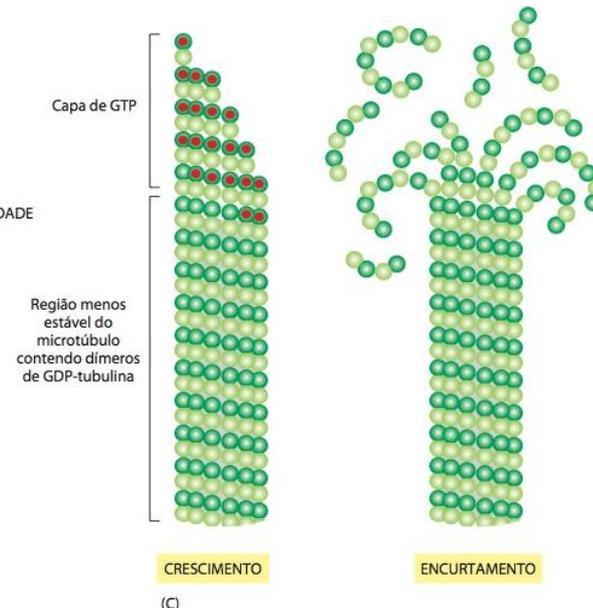
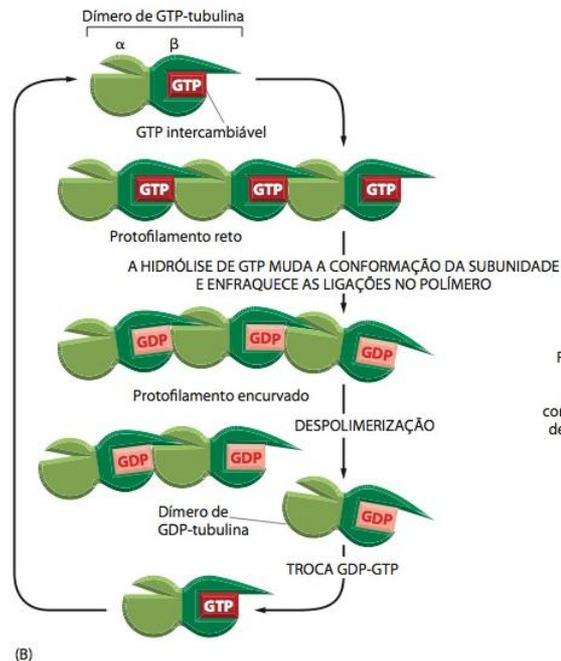
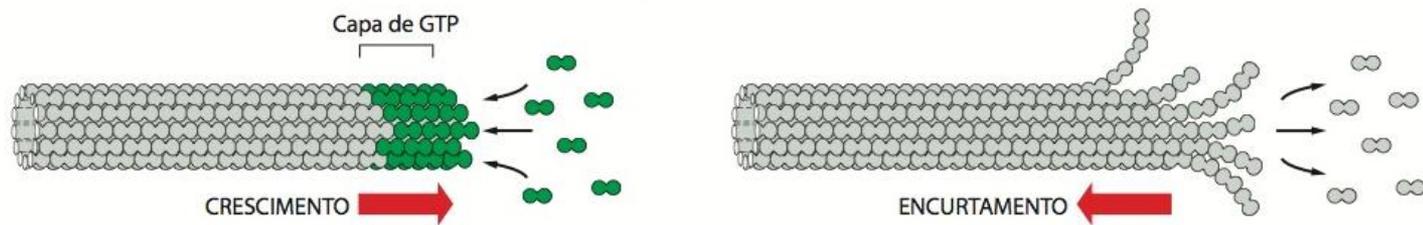
Os processos de *treadmilling* e instabilidade dinâmica de filamentos

- A taxa de adição de subunidades à extremidade do filamento é o produto da concentração de subunidades livres e da taxa constante K_{on} ;
- A K_{on} é muito mais rápida para a extremidade mais (+);
- A C_c para a polimerização em uma extremidade de filamento sob a forma T é mais baixa do que para uma extremidade sob a forma D;
- Se a concentração de subunidades em um dado momento encontra-se em algum ponto entre esses dois valores, a extremidade mais (+) crescerá e a extremidade menos (-) encurtará, resultando em *treadmilling*;



Os processos de *treadmilling* e instabilidade dinâmica de filamentos

- **Instabilidade dinâmica** é a rápida interconversão entre os estados de crescimento e encurtamento que ocorre sob concentração uniforme de subunidades livres;

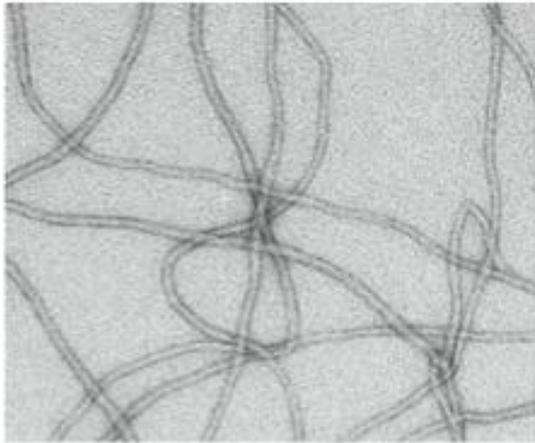


O *treadmilling* e a instabilidade dinâmica auxiliam a rápida reorganização do citoesqueleto

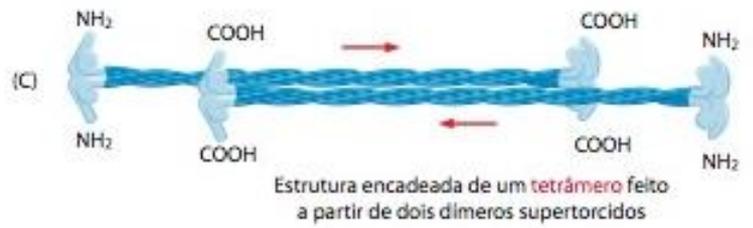
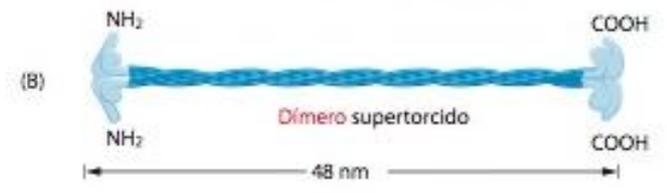
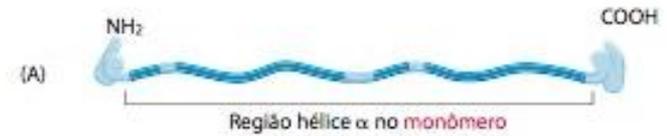
- Para manter a **concentração constante de filamentos de actina e microtúbulos**, a maioria dos quais está sofrendo a ação de *treadmilling* e instabilidade dinâmica;
- A **vantagem** para a célula parece residir na **flexibilidade espacial e temporal** que é inerente a um sistema estrutural com ***turnover* constante**;
- **Subunidades de actina ou tubulina podem** difundir rapidamente e **associar-se em extremidades de filamentos preexistentes ou em regiões onde a etapa de nucleação** esteja sendo catalisada por proteínas específicas;
- Uma **célula pode controlar o posicionamento dos seus sistemas de filamentos** e, conseqüentemente, sua estrutura, pelo **controle da região de nucleação** e pela **estabilização seletiva**;
- Em **determinadas estruturas especializadas**, porções do citoesqueleto tornam-se menos dinâmicas e os microtúbulos e filamentos de actina encontram-se **estabilizados por associação a outras proteínas**;

A estrutura dos filamentos intermediário

- **Filamentos intermediários** são encontrados em alguns animais (**vertebrados, nematódeos e moluscos**), no citoplasma de **células sujeitas a estresse mecânico** e, particularmente, não são encontrados em animais com exoesqueletos rígidos (artrópodes e equinodermos);
- Em vertebrados, **células da glia (oligodendrócitos)** que produzem bainha de mielina no SNC **não contêm filamentos intermediários**;
- Filamentos intermediários citoplasmáticos estão **relacionados** a seus ancestrais, as **lamínas nucleares** (duplicação gênica);
- As subunidades dos filamentos intermediários não contêm sítios de ligação para trifosfatos de nucleosídeo;
- Os filamentos intermediários **não apresentam uma estrutura polarizada**;
- O **grande número de polipeptídeos unidos por interações hidrofóbicas laterais** fortes conferem aos filamentos intermediários sua característica semelhante a um cabo. Eles podem ser facilmente flexionadas, mas é extremamente difícil rompê-los.



0,1 μm



A estrutura dos filamentos intermediário

- Filamentos de queratina conferem resistência mecânica a tecidos epiteliais por meio de ancoramento a desmossomos e hemidesmossomos;
- Mutações nos genes de queratina são causas de doenças genéticas humanas, como a epidermólise bulosa simples, que ocorre quando queratinas defeituosas são expressas em células epiteliais;

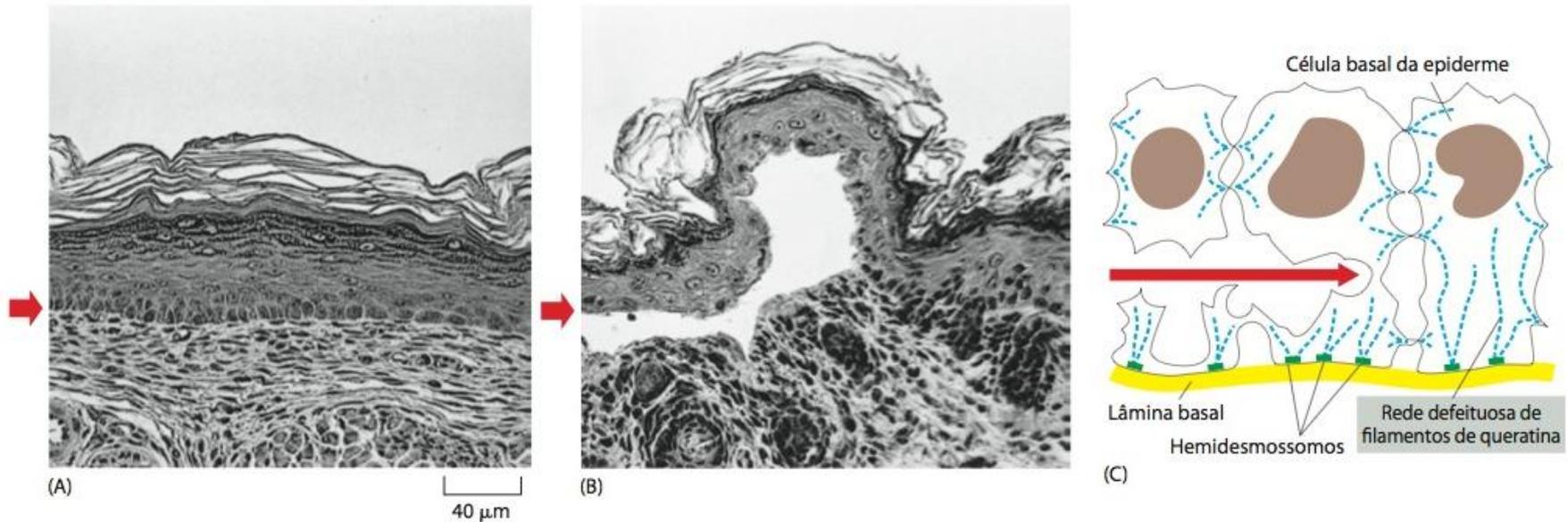


Tabela 16-1 Principais tipos de proteínas de filamentos intermediários em células de vertebrados

TIPOS DE FI	COMPONENTES POLIPEPTÍDICOS	LOCALIZAÇÃO
Nuclear	Laminas A, B e C	Lâmina nuclear (revestimento interno do envelope nuclear)
Semelhantes à vimentina	Vimentina Desmina Proteína ácida glial fibrilar	Diversas células de origem mesenquimal Músculo Células gliais (astrócitos e algumas células de Schwann)
Epitelial	Periferina Queratinas tipo I (ácidas) Queratinas tipo II (básicas)	Alguns neurônios Células epiteliais e seus derivados (p. ex., cabelos e unhas)
Axonal	Proteínas de neurofilamento (NF-L, NF-M e NF-H)	Neurônios



bbc1_21_24_filamento_intermediario.swf



bbc2_04_lamina_nuclear.swf

A polimerização de filamentos pode ser alterada por substâncias

Tabela 16-2 Fármacos que afetam os filamentos de actina e os microtúbulos

FÁRMACOS ACTINO-ESPECÍFICOS	
Faloidina	Liga-se aos filamentos, estabilizando-os
Citocalasina	Promove o capeamento da extremidade mais (+) do filamento
Swinholide	Quebra os filamentos
Latrunculina	Liga-se a subunidades e evita sua polimerização
FÁRMACOS MICROTÚBULO-ESPECÍFICOS	
Taxol	Liga-se aos microtúbulos, estabilizando-os
Colchicina, colcemida	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização
Vimblastina, vincristina	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização
Nocodazol	Liga-se às subunidades e evita sua polimerização

A organização e a divisão celular em bactérias dependem de homólogos do citoesqueleto de eucariotos

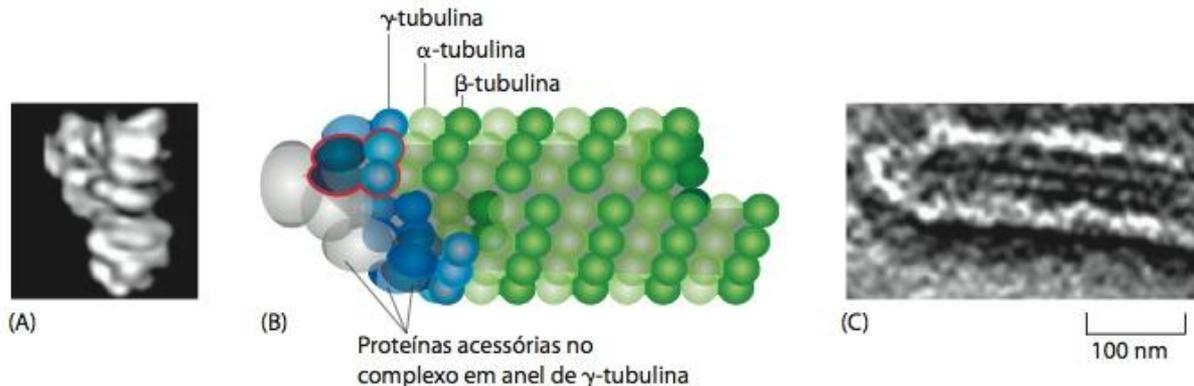
- Todas as bactérias e algumas arqueobactérias contêm homólogos da tubulina (FtsZ) que podem polimerizar dando origem a filamentos e organizar-se em um *anel (anel Z) na região que é formado o septo na divisão celular;*
- Diversas bactérias, predominantemente células bastão ou espirais, também contêm dois homólogos de actina (MreB e Mbl) que parecem estar associados à *forma celular e à segregação cromossômica;*
- **ParM**, um homólogo de actina encontrado em bactérias, é codificado por certos plasmídeos e parece estar associado à *separação de cópias replicadas do plasmídeo;*
- Homólogos do citoesqueleto em bactérias e eucariotos compartilham baixa similaridade de sequência;

A organização e a divisão celular em bactérias dependem de homólogos do citoesqueleto de eucariotos

- A bactéria *Caulobacter crescentus* possui uma proteína (crescentina) com similaridade estrutural a F1;
- Bactérias possuem sofisticados citoesqueletos dinâmicos;
- **POR QUE ELAS SÃO TÃO PEQUENAS E MORFOLOGICAMENTE SIMPLES?**
- Provavelmente, devido à ausência de proteínas motoras (a evolução dessas proteínas parece ter sido uma etapa essencial que permitiu a elaboração morfológica dos eucariotos);

Como as células regulam seus filamentos do citoesqueleto

- γ -tubulina está envolvida na nucleação de microtúbulos em organismos variados, de leveduras a humanos;
- Microtúbulos são nucleados em uma região conhecida como **centro organizador de microtúbulos (MTOC)**;
- O complexo em anel de γ -tubulina (**γ -TuRC**) é capaz de nuclear crescimento de microtúbulos;
- Duas proteínas se ligam diretamente à γ -tubulina, juntamente a várias outras que auxiliam na formação do anel de moléculas de γ -tubulina;



Os microtúbulos irradiam a partir do centrosomo de células animais

- Na maioria das células animais existe um MTOC único chamado *centrossomo*, que é composto por uma matriz centrossomal fibrosa que contém mais de 50 cópias de γ -TuRC;
- *Centríolos* encontram-se inseridos no centrossomo e se tornarão os *corpos basais de cílios e flagelos* em células móveis;
- Um centríolo consiste em um pequeno cilindro de microtúbulos modificados, acrescido de uma grande quantidade de moléculas acessórias;
- Em *fungos e diatomáceas*, os microtúbulos são nucleados em um *MTOC inserido no envelope nuclear*;
- *Células vegetais superiores* parecem nuclear microtúbulos a partir de *regiões distribuídas por toda a superfície externa do envelope nuclear*;
- Fungos e a maioria dos vegetais não possuem centríolos;

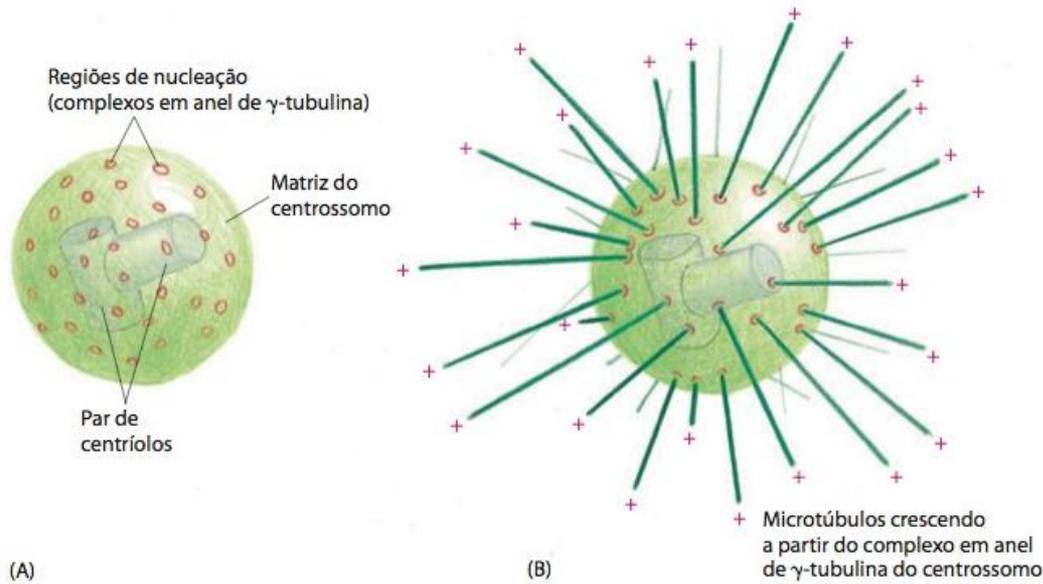


Figura 16-30 O centrosomo.

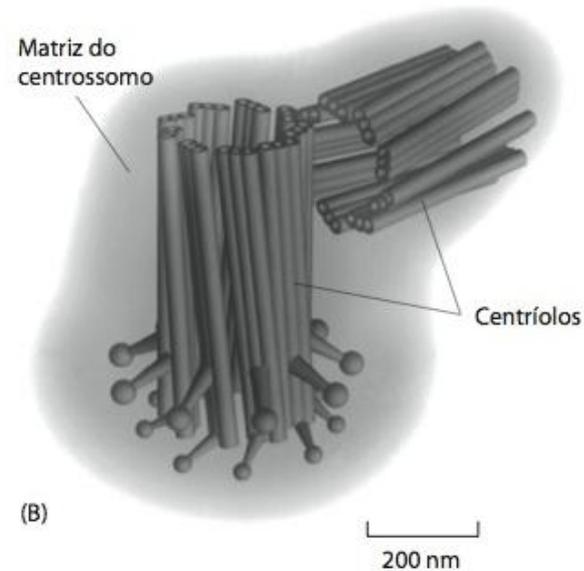
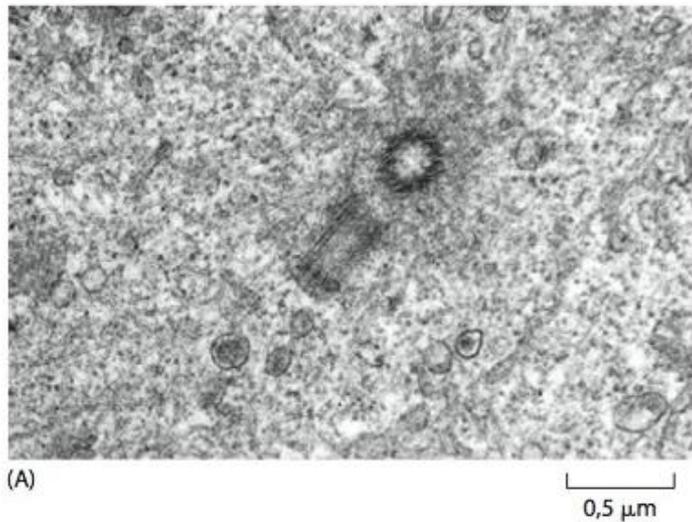


Figura 16-31 Um centríolo no centrosomo. (A) Microfotografia eletrônica de uma fina secção de um centrosomo mostrando a extremidade terminal de um centríolo-mãe e uma secção longitudinal de um centríolo-filho. Diversos microtúbulos podem ser observados à proximidade. (B) Estrutura de um par de centríolos. (A, de G. J. Mack, Y. Ou e J. B. Rattner, *Microsc. Res. Tech.* 49:409-419, 2000. Com permissão de John Wiley & Sons. B, adaptada de D. Chrétien et al., *J. Struct. Biol.* 120:117-133, 1997. Com permissão de Elsevier.)

Os microtúbulos irradiam a partir do centrossomo de células animais

- O sistema de microtúbulos que irradia a partir do centrossomo atua como um aparelho que controla os limites celulares e posiciona o centrossomo na região central da célula;
- Essa capacidade estabelece um sistema coordenado que é utilizado para posicionar diferentes organelas no interior da célula;

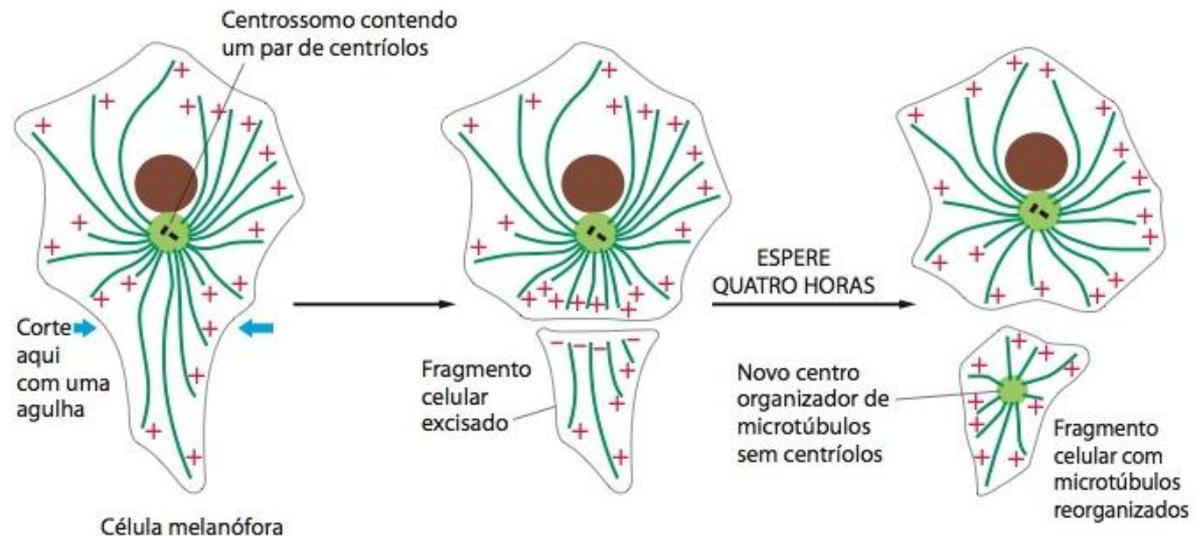


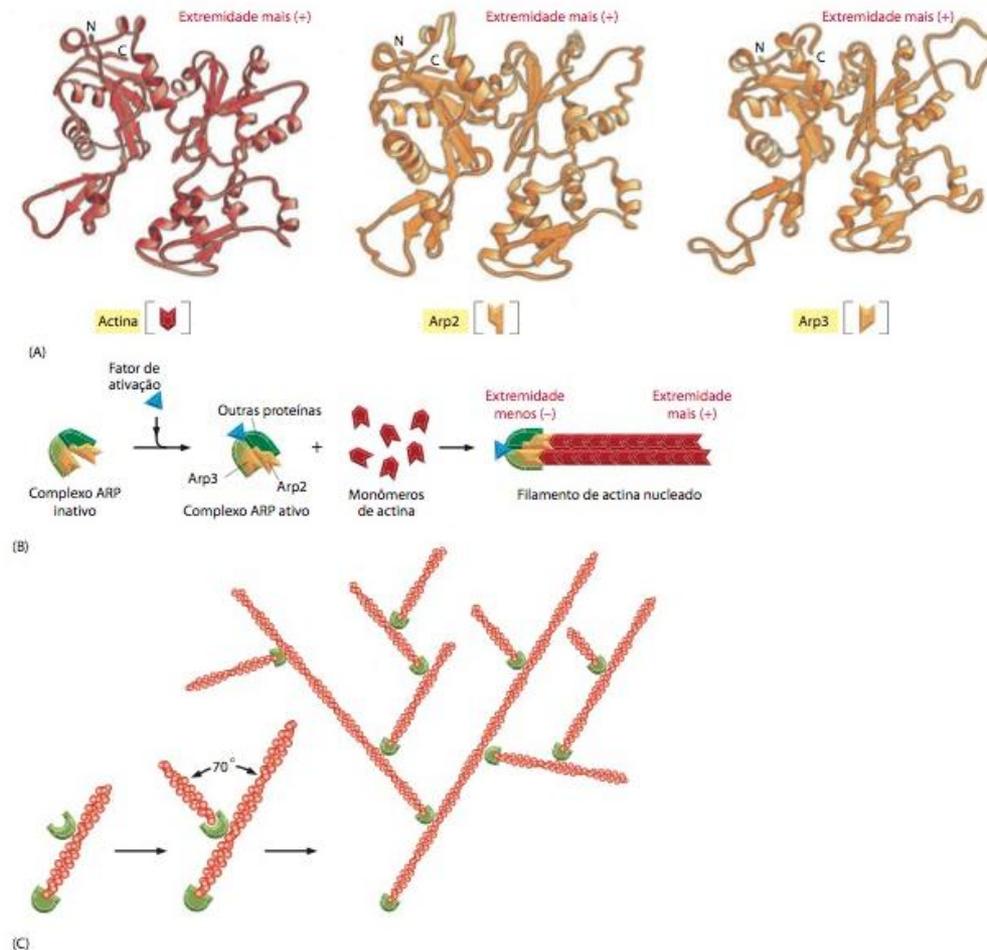
Figura 16-33 Um arranjo de microtúbulos pode encontrar o centro de uma célula. Após a retirada, com o auxílio de uma agulha, de uma parte de uma célula pigmentar de peixe, os microtúbulos presentes no fragmento celular isolado reorganizam-se de tal modo que suas extremidades menos se dirigem para sua região central, inserindo-se em um novo centro organizador de microtúbulos.

Os filamentos de actina frequentemente são nucleados na membrana plasmática

- Na maioria das células, a maior parte do **filamentos de actina** encontram-se na periferia celular (córtex celular) e determinam o **formato e o movimento da superfície celular**;
- Filamentos de actina podem **formar vários tipos de projeções** na superfície celular: **feixes pontiagudos** (*microvilosidades e filopódios*); **projeções planas em véu** (*lamelipódios*) que auxiliam os movimentos das células em substratos sólidos e **projeções fagocíticas** de macrófagos;
- A *nucleação de FA*, em geral, é regulada por sinais externos e pode ser *catalisada* por 2 tipos diferentes de fatores regulados, o **complexo ARP** (*actin-related proteins*) e as **forminas**;
- O complexo ARP (Arp 2/3) provoca a *nucleação a partir da extremidade (-)*, permitindo a *rápida extensão da extremidade (+)* e também pode se ligar à lateral de outro FA, dando origem a uma *rede ramificada*;

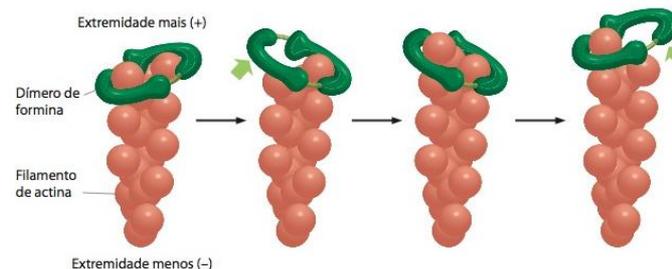
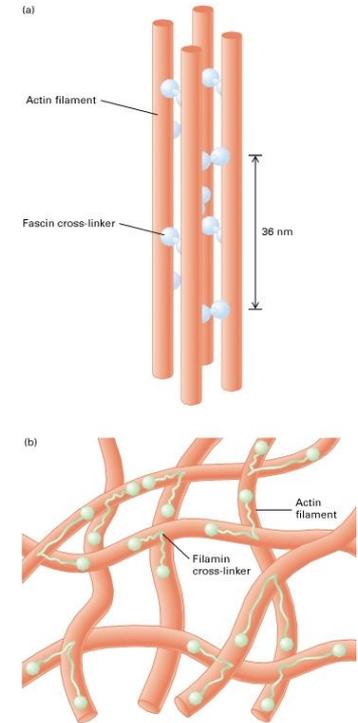
Os filamentos de actina frequentemente são nucleados na membrana plasmática

- Em animais, o complexo ARP está associado a estruturas presentes na borda anterior de células com capacidade de migração;



O mecanismo de nucleação afeta a organização em larga escala de filamentos

- A formação de filamentos retos e não-ramificados de actina é induzida por *forminas*, tais filamentos podem ser interligados por meio de outras proteínas para a formação de feixes paralelos;
- Forminas são proteínas diméricas capazes de nuclear a polimerização de um FA pela captura de 2 monômeros;
- O dímero de *formina* permanece associado à extremidade (+) enquanto o filamento cresce e permite a ligação de novas subunidades a essa extremidade;
- O complexo ARP e γ -TuRC permanecem ligados à extremidade (-) e impedem tanto a adição quanto a perda de subunidades nessa extremidade;



Proteínas que se ligam às subunidades livres alteram o crescimento de um filamento

- Em células não-musculares de vertebrados, aproximadamente 50% das moléculas de actina estão sob a forma solúvel, pois proteínas especiais se ligam a esses monômeros de actina, desfavorecendo a polimerização;
- Monômeros de actina ligados à proteína **timosina** estão em um estado de bloqueio, não podendo associar-se a um **filamento de actina**;
- A **profilina** liga-se à face do **monômero de actina** que é oposta à fenda de ligação de ATP e, assim o complexo profilina-actina pode facilmente ser adicionado à extremidade (+) livre e a profilina é retirada do complexo;
- A atividade da profilina é regulada por fosforilação e ligação com fosfolipídeos de inositol presentes na face citosólica da MP que podem levar a polimerização localizada de actina, que promoverá a formação de filopódios e lamelipódios;
- A proteína **estatmina** liga-se a dois heterodímeros de **tubulina** e evita que sejam adicionados às extremidades de microtúbulos, além de a probabilidade de que um microtúbulo em crescimento sofra encurtamento;

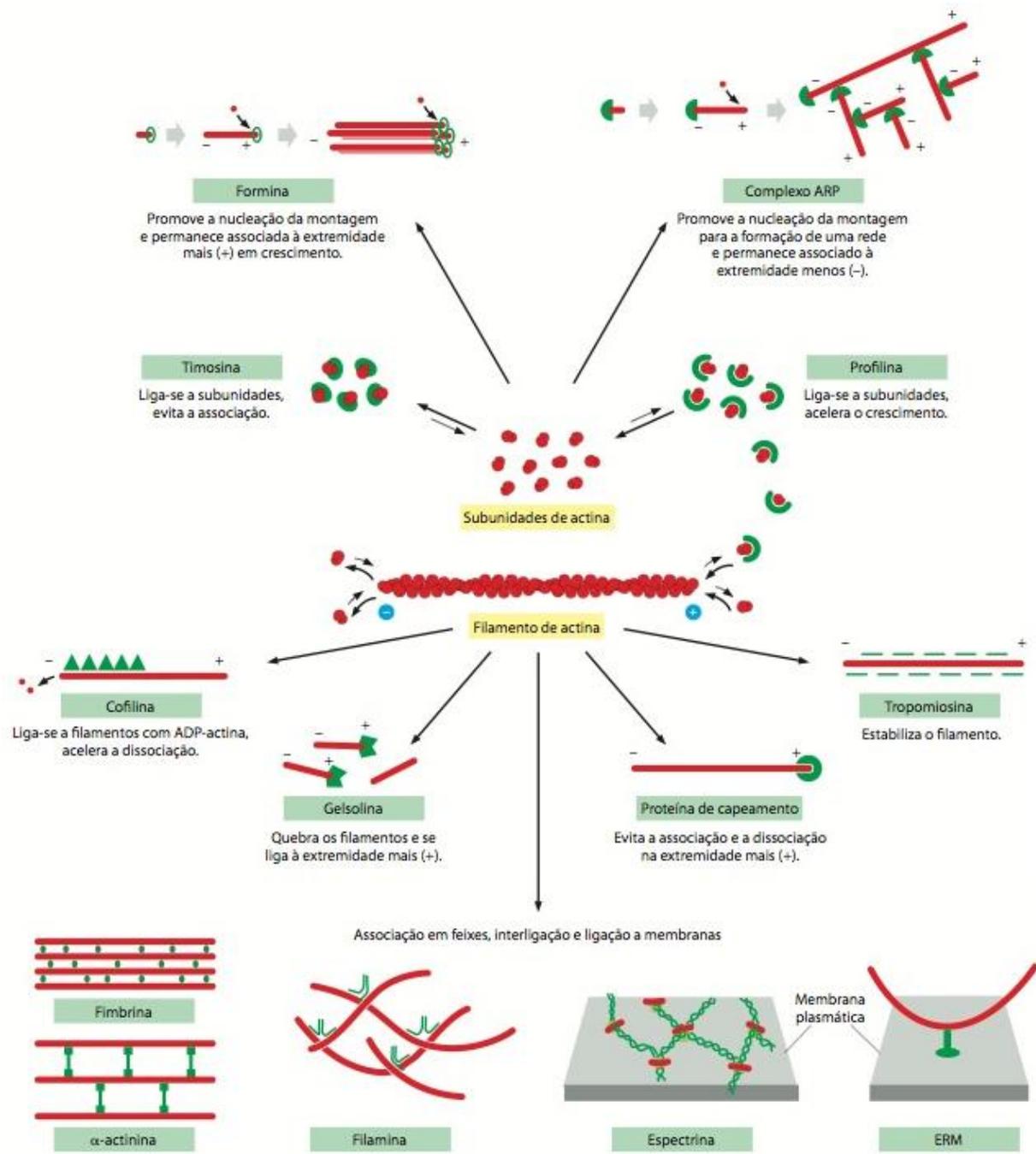


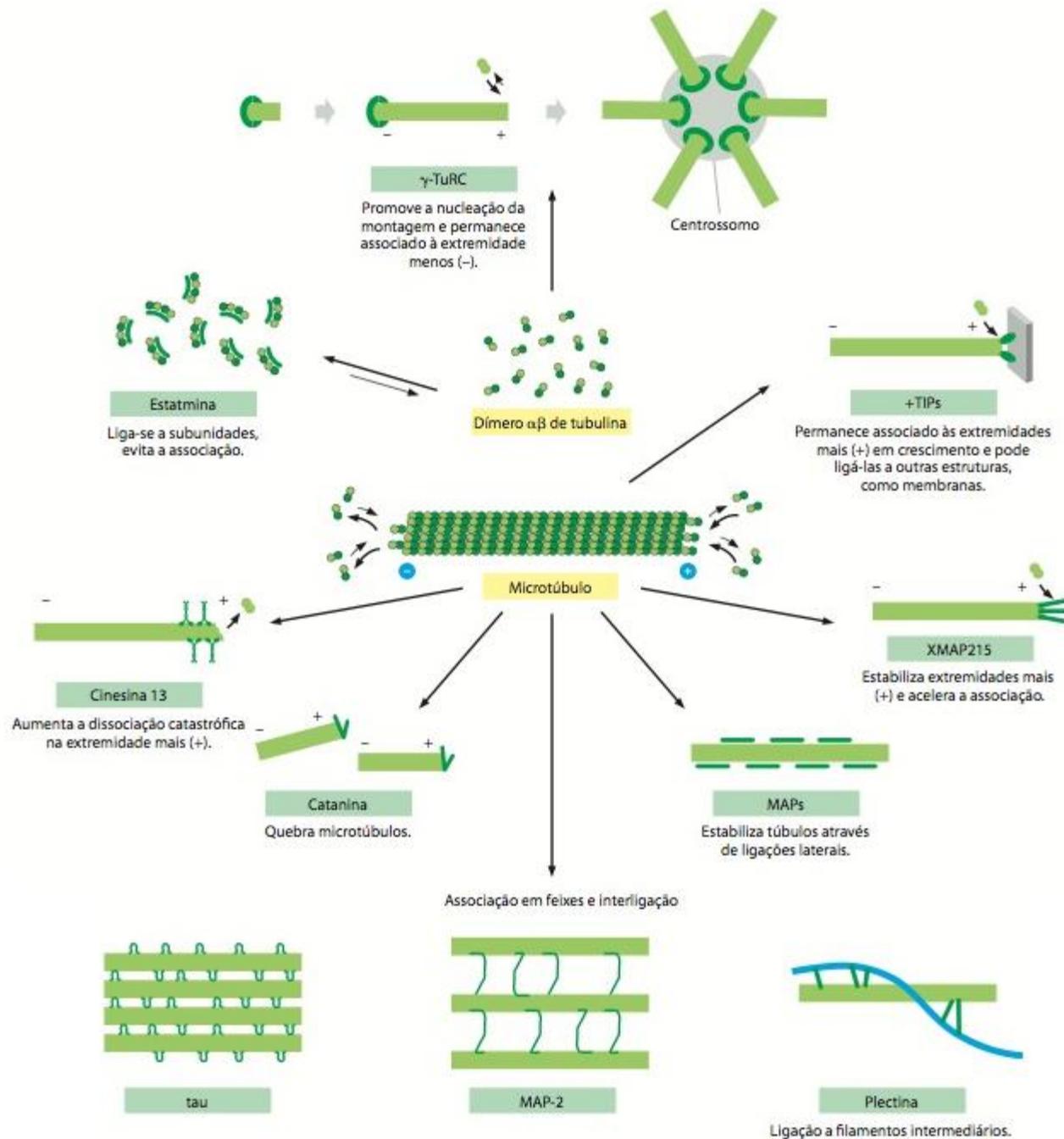
Proteínas de quebra regulam o comprimento e a cinética do comportamento de filamentos de actina e microtúbulos

- Em certas situações, uma célula poderá quebrar um filamento longo preexistente em diversos filamentos menores;
- As extremidades recém-formadas nuclearão o crescimento de filamentos, resultando em aceleração da montagem de novas estruturas filamentosas;
- Em outras condições, a quebra promoverá a despolimerização de filamentos antigos;
- **Catanina**, uma proteína que hidrolisa ATP, promove a **quebra das 13 ligações longitudinais necessárias para liberar os microtúbulos a partir do MTOC** e parece estar envolvida na rápida despolimerização dos microtúbulos observada nos polos do fuso durante a mitose e meiose;

Proteínas de quebra regulam o comprimento e a cinética do comportamento de filamentos de actina e microtúbulos

- Proteínas da **superfamília gelsolina** são ativadas na presença de altos níveis de Ca^{2+} citosólico e são responsáveis pela quebra de filamentos de actina sem necessidade de ATP;
- Gelsolina parece ligar a filamentos de actina e esperar que alterações na temperatura provoquem a formação de uma pequena abertura entre as subunidades adjacentes de um protofilamento para introduzir seu subdomínio na abertura e provocar a quebra do filamento;



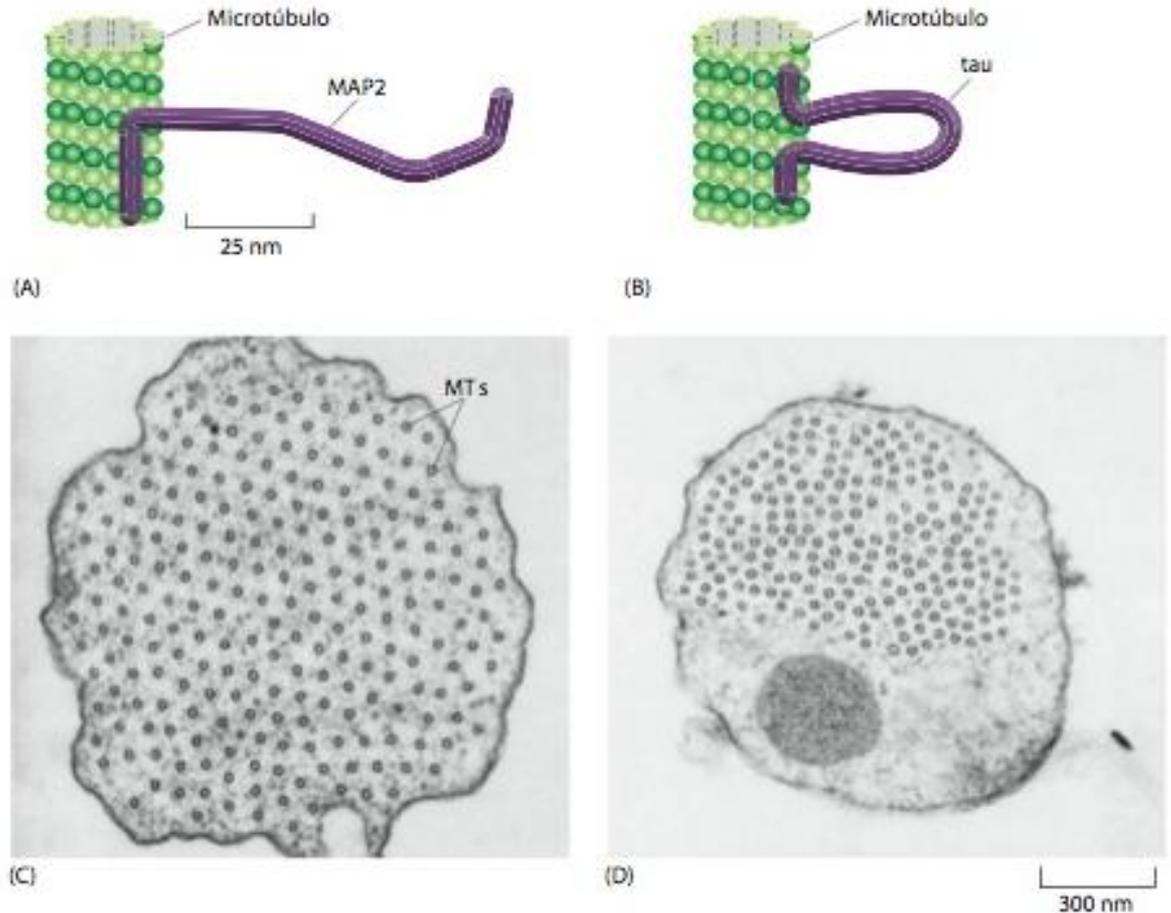


Proteínas que se ligam lateralmente aos filamentos podem tanto estabilizá-los quanto desestabilizá-los

- **Proteínas de associação a microtúbulos (MAPs)** são proteínas que se ligam lateralmente a microtúbulos e podem prevenir a sua dissociação, assim como pode mediar a ligação de microtúbulos a outros componentes celulares;
- MAPs possuem um domínio de ligação a microtúbulos e outro que se projeta a partir de microtúbulos, sendo que o tamanho deste último determina a distância do empacotamento de microtúbulos associados por MAPs;
- **MAP2** apresenta longos domínios projetados e forma feixes de microtúbulos estáveis com um amplo espaçamento, enquanto a MAP **tau** apresenta domínios de projeção curtos, formando feixes de microtúbulos compactos;
- A ligação de tau aos filamentos pode regular o transporte de organelas membranosas direcionada por motores moleculares;

Figura 16-41 Organização dos feixes de microtúbulos pelas MAPs.

(A) MAP2 liga-se à lateral do microtúbulo por uma de suas extremidades e estende um braço sob forma de uma longa projeção, contendo um segundo domínio de ligação ao microtúbulo em sua outra extremidade. (B) Tau liga-se à lateral do microtúbulo usando tanto sua extremidade N-terminal quanto sua extremidade C-terminal, formando uma pequena projeção em alça. (C) Microfotografia eletrônica mostrando uma secção transversal de um feixe de microtúbulos em uma célula com superexpressão de MAP2. O espaçamento regular dos microtúbulos (MTs) neste feixe é consequência do comprimento constante dos braços da MAP2. (D) Secção transversal similar de um feixe de microtúbulos de uma célula superexpressando tau. Neste caso, o espaçamento dos microtúbulos é menor e eles encontram-se mais próximos do que em (C), pois tau apresenta um braço relativamente menor. (C e D, cortesia de V. Chen et al., *Nature* 360:674-647, 1992. Com permissão de Macmillan Publishers Ltd.)



Proteínas que se ligam lateralmente aos filamentos podem tanto estabilizá-los quanto desestabilizá-los

- Proteína-quinases relacionadas à progressão do ciclo celular regulam a atividade de MAPs;
- A alteração na atividade de MAPs regula as alterações na dinâmica de microtúbulos que ocorrem conforme a célula reorganiza seu citoesqueleto de microtúbulos para a formação do fuso mitótico;
- Proteínas tau podem formar filamentos helicoidais em altas concentrações que originam os agregados (emaranhados neurofibrilares) encontrados no citoplasma de neurônios no cérebro de portadores de Alzheimer;
- Filamentos de actina específicos são, na maioria das células, estabilizados pela ligação com **tropomiosina**, o que evita a interação destes filamentos com outras proteínas;

Proteínas que se ligam lateralmente aos filamentos podem tanto estabilizá-los quanto desestabilizá-los

- A proteína **cofilina** (fator de despolimerização de actina) liga-se tanto à subunidade de actina como à actina filamentosa, neste último forçando uma torção que enfraquece o contato entre as subunidades, tornando o filamento quebradiço e mais facilmente afetado por oscilações térmicas;
- Cofilina faz com que seja mais fácil a dissociação de uma subunidade de ADP-actina da extremidade (-) do filamento, pois liga-se preferencialmente a filamentos de actina contendo ADP;
- Filamentos de actina podem ser protegidos da ação da cofilina por ligação à tropomiosina;

Proteínas que interagem com as extremidades dos filamentos podem modificar drasticamente sua dinâmica

- Proteínas de capeamento ligam-se à extremidade (+) de um filamento e estabiliza-o;
- A maior parte dos filamentos de actina em uma célula apresenta a extremidade (+) capeada por proteínas com a **CapZ**;
- Um filamento de actina por de ser capeado na extremidade (-) pela manutenção da ligação ao complexo ARP, no entanto, em células típicas, estima-se que a maior parte das extremidades (-) de filamentos de actina tenha sido liberada do complexo ARP e não seja capeada;
- Em células musculares, onde os filamentos de actina têm uma meia-vida extremamente longa, apresentam-se capeados na extremidade (+) pela **CapZ** e na extremidade (-) pela **tropomodulina**;

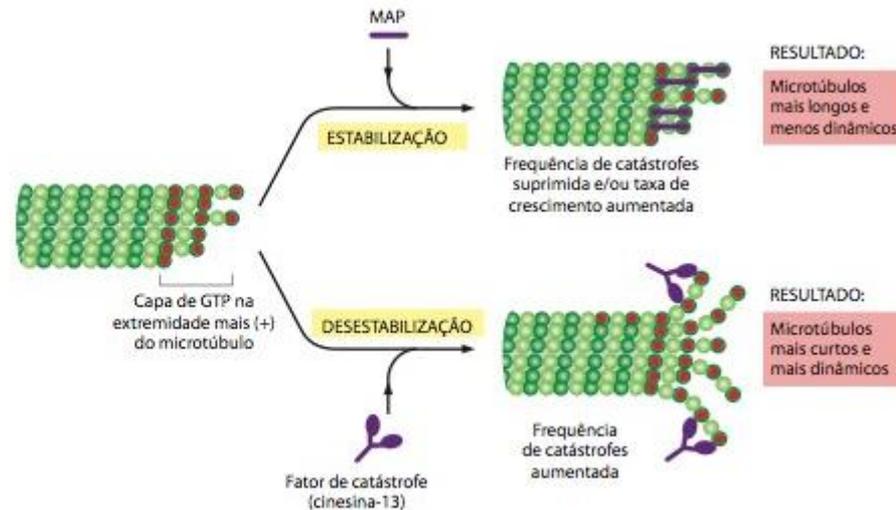
Diferentes tipos de proteínas alteram as propriedades das extremidades

- γ -TuRC pode promover a nucleação de microtúbulos e o capeamento de suas extremidades (-);
- Um **complexo proteico especial promove o capeamento das extremidades de microtúbulos de cílios**, local onde os microtúbulos são estáveis e uniformes em comprimento;
- Algumas proteínas que se ligam às extremidades de microtúbulos podem influenciar na frequência de catástrofes ou de resgates;
- **Fatores de catástrofes** (membros da família de proteínas relacionadas à cinesina) ligam-se as extremidades dos microtúbulos e separam os protofilamentos;
- A proteína **XMAP215 estabiliza as extremidades livres de microtúbulos e inibe seu encurtamento**, a fosforilação dessa proteína na mitose inibe sua atividade, aumentando a instabilidade dinâmica dos microtúbulos que é fundamental para a construção do fuso mitótico;

Diferentes tipos de proteínas alteram as propriedades das extremidades

- Em muitas células, as extremidades (-) dos microtúbulos estão estabilizadas pela associação com o centrôssomo;
- Algumas proteínas de busca de extremidade mais (+TIPs), como os fatores de catástrofe e a XMAP215 modulam o crescimento e o encurtamento da extremidade (+) do microtúbulo ao qual estão ligadas, enquanto outras controlam o posicionamento do microtúbulo em crescimento no local do córtex celular onde estão proteínas-alvo específicas;

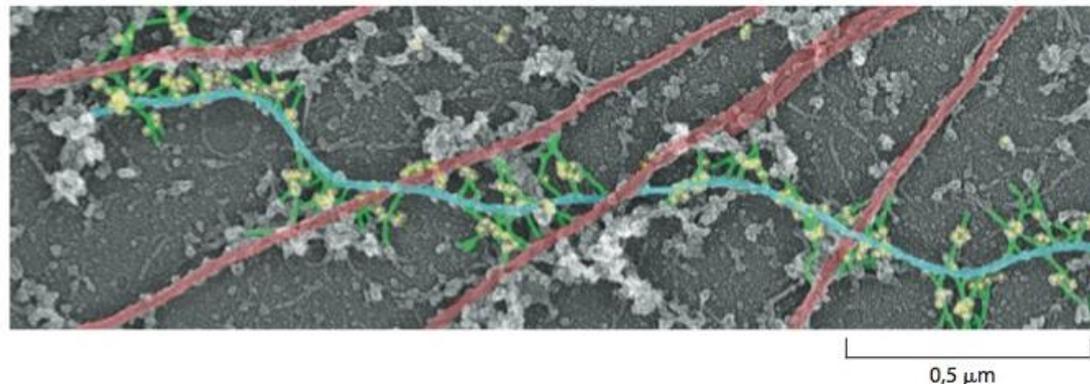
Figura 16-44 Efeitos das proteínas que se ligam às extremidades de microtúbulos. A transição entre os estados de crescimento e de encurtamento de um microtúbulo é controlada, nas células, por proteínas especializadas. Uma MAP como a XMAP215 estabiliza a extremidade de um microtúbulo em crescimento por ligação preferencial a esta. De ação oposta são os fatores de catástrofe, como a cinesina-13, membro da superfamília das proteínas motoras cinesina (discutida mais tarde).



Filamentos intermediários são interligados sob a forma de fortes arranjos em feixes

- Vários filamentos intermediários agregam por auto-associação (ex. NF-M e NF-H), enquanto outros são mantidos unidos por meio de proteínas acessórias;
- A proteína **filagrina** forma feixes de filamentos de queratina epidérmicas que irão conferir a resistência das camadas mais externas da pele;
- A proteína **plectina** promove a formação de feixes de filamentos intermediários e interliga estes a microtúbulos, filamentos de actina e à miosina II, além de auxiliar a ligação de filamentos intermediários a estruturas de adesão na MP;

Figura 16-46 Interligação de diversos elementos do citoesqueleto pela plectina. A plectina (em verde) faz ligações dos filamentos intermediários (em azul) com microtúbulos (em vermelho) e com grossos filamentos de miosina. Nesta microfotografia eletrônica, os pontos (em amarelo) são partículas de ouro ligadas a anticorpos antipectina. Toda a rede de filamentos de actina foi removida para a revelação destas proteínas. (De T. M. Svitkina e G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* 135:991-1007, 1996. Com permissão de The Rockefeller University Press.)

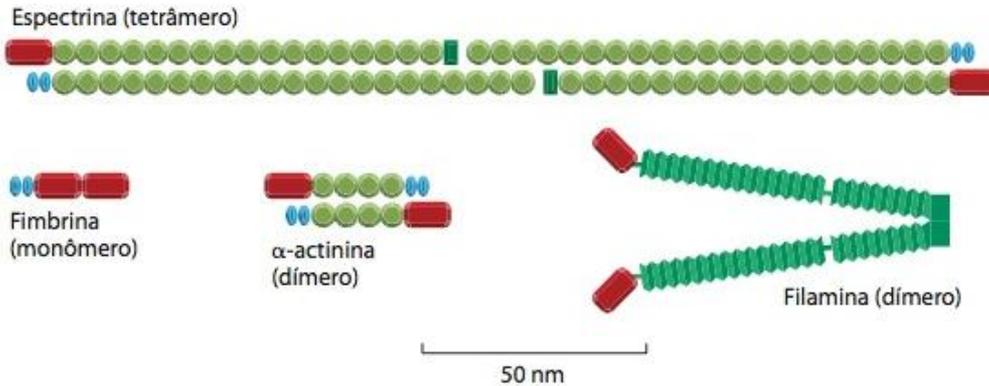


- Plectina
- FI
- MT

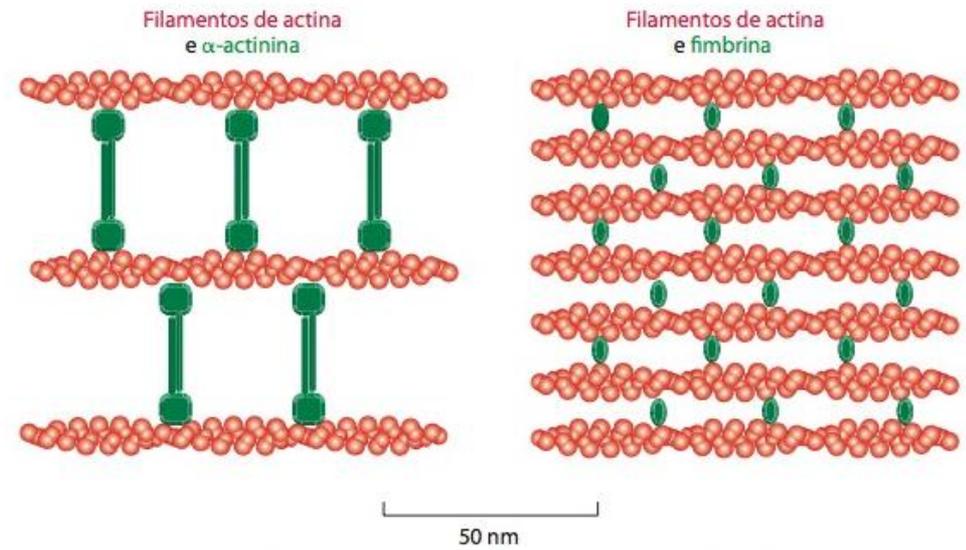
Proteínas de ligação cruzada com diferentes propriedades organizam os diversos arranjos de filamentos de actina

- Os filamentos de actina em células animais estão organizados em feixes e redes ou teias;
- **Proteínas de feixes** e **proteínas formadoras de redes** auxiliam a estabilizar e manter filamentos de actina em arranjos paralelos e em estruturas em ângulos abertos criando tramas frouxas;
- Cada tipo de proteína de feixe determina que outras proteínas podem interagir com filamentos de actina;
- A miosina II, proteína permite a contração em fibras de estresse e em outros arranjos contráteis, não tem acesos a filamentos de actina firmemente empacotados pela proteína **fimbrina**;
- O empacotamento frouxo mediado pela proteína **α -actinina** permite a entrada de miosina, fazendo com que fibras de estresse possam ser contráteis;

Proteínas de ligação cruzada com diferentes propriedades organizam os diversos arranjos de filamentos de actina



Miosina II não tem acesso!



Feixe contrátil

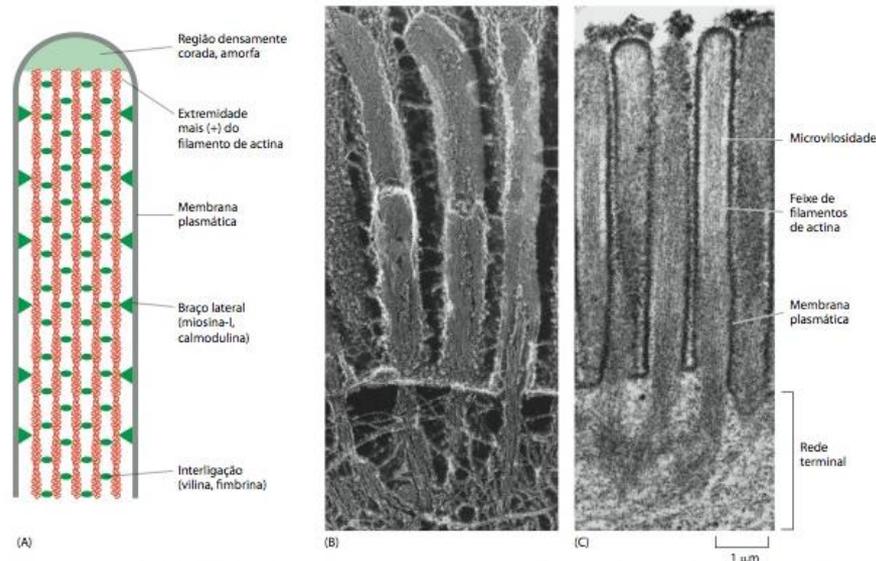
Feixe paralelo

O empacotamento frouxo permite a participação da miosina II no feixe.

O empacotamento compacto impede a participação da miosina II no feixe.

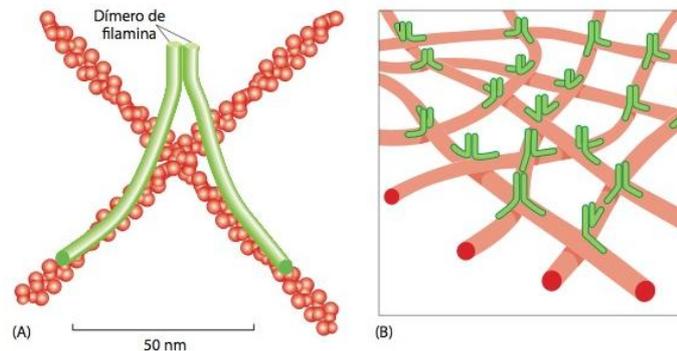
Proteínas de ligação cruzada com diferentes propriedades organizam os diversos arranjos de filamentos de actina

- A proteína **vilina** (junto com a fimbrina) auxilia a interligação de 20 – 30 filamentos de actina fortemente empacotados encontrados nas microvilosidades;
- O centro do filamento de actina de microvilosidades está ligado à membrana plasmática por seus braços laterais de **calmodulina** e **miosina I**, que possui sítios de ligação a lipídeos da MP;



A filamina e a espectrina formam redes de filamentos de actina

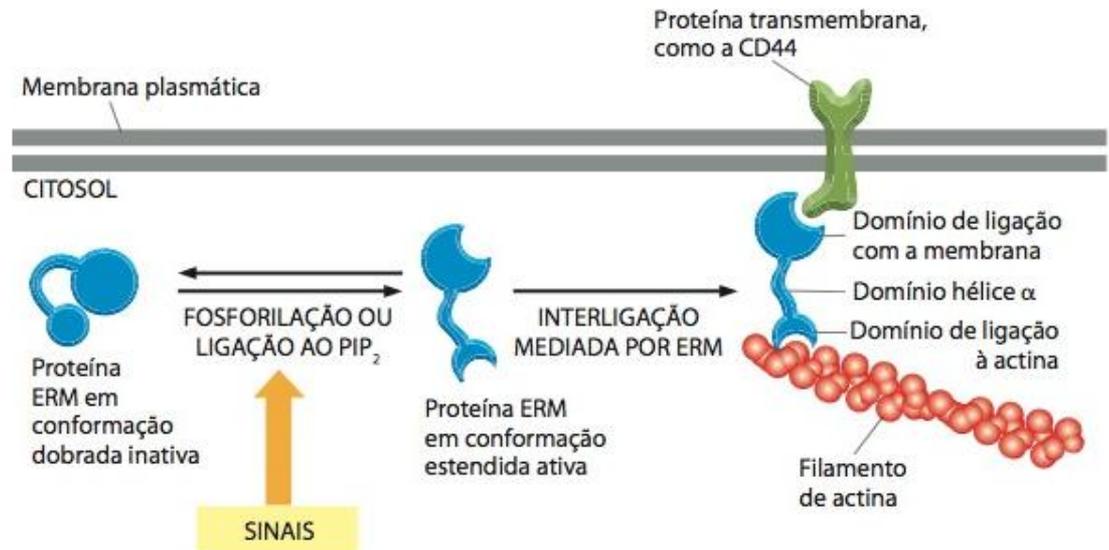
- A proteína **filamina**, que possui domínios de ligação à actina unidos por uma ligação longa e flexível, promove a formação **redes tridimensionais de actina**, nas quais dois filamentos estão unidos em ângulos praticamente retos;
- Géis de actina formados pela filamina são **necessários para formação** de projeções finas planas chamadas de **lamelipódios**, que auxiliam no movimento sobre superfícies sólidas;
- A filamina está ausente em alguns tipos de melanomas malignos;
- A proteína **espectrina**, em células vermelhas do sangue, encontra-se exatamente abaixo da MP, onde forma uma rede bidimensional unida por curtos filamentos de actina, esta rede promove o suporte mecânico para a MP;



Elementos do citoesqueleto estabelecem diversas conexões a membranas

- As conexões do citoesqueleto cortical de actina à MP ainda não estão totalmente compreendidas;
- A família de **proteínas ERM** (ezrina, radixina e moesina) contém membros necessários à manutenção da polaridade celular e estão envolvidos em processos de endocitose e exocitose;
- As propriedades do córtex são sensíveis a uma ampla variedade de sinais recebidos pelas células;

Figura 16-53 Papel das proteínas da família ERM na conexão dos filamentos de actina à membrana plasmática. O desdobramento regulado de uma proteína da família ERM devido à fosforilação ou à ligação com PIP_2 expõe dois sítios de ligação, um para o filamento de actina e o outro para uma proteína transmembrana. A ativação de proteínas da família ERM pode, assim, gerar e estabilizar protrusões formadas em resposta a sinais extracelulares.



Motores moleculares

- Utilizam a energia derivada de ciclos repetidos de hidrólise de ATP para se deslocarem ao longo de um filamento polarizado;
- Região cabeça ou domínio motor – hidrolisa ATP;
- Cauda da proteína motora – identidade da carga;
- Grupos de proteínas motoras: Miosinas, dineínas e cinesinas;
- Existem pelo menos 37 famílias de miosinas em eucariotos;
- Miosina utiliza a energia da hidrólise do ATP para se locomover rumo à extremidade mais (exceção: miosina VI);

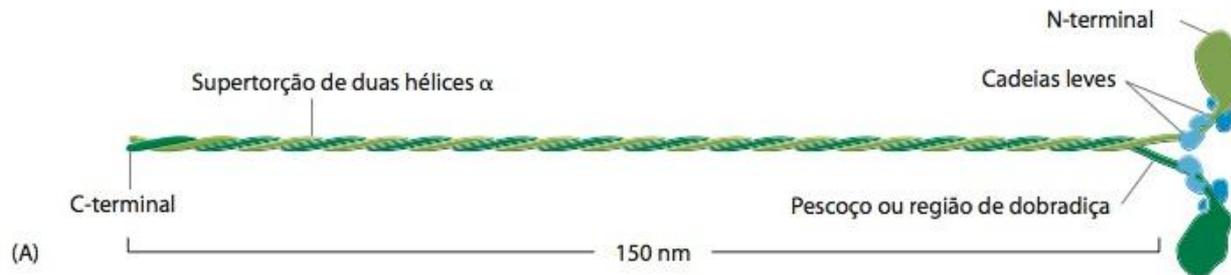
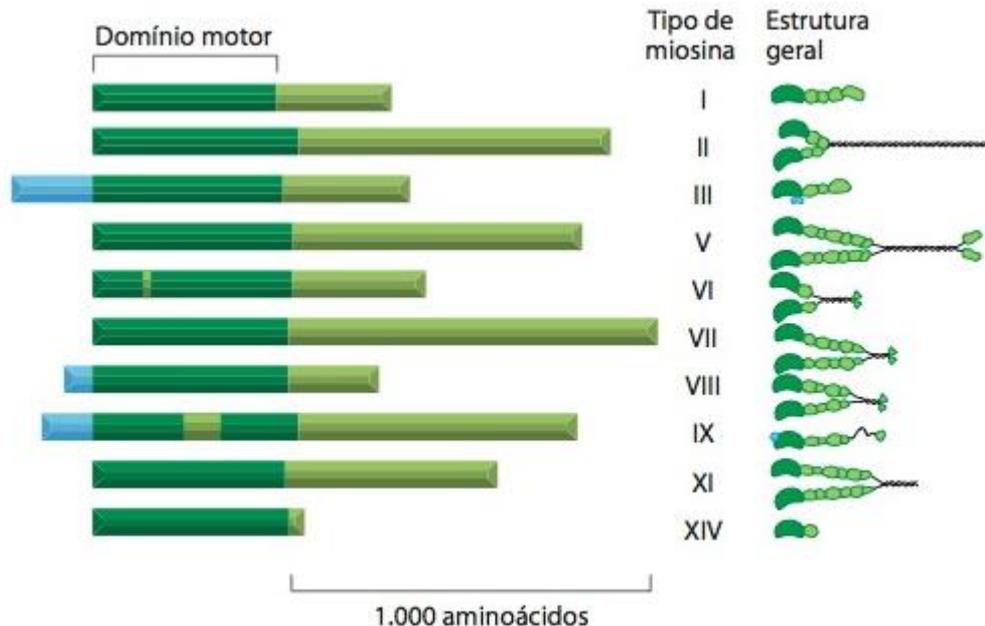
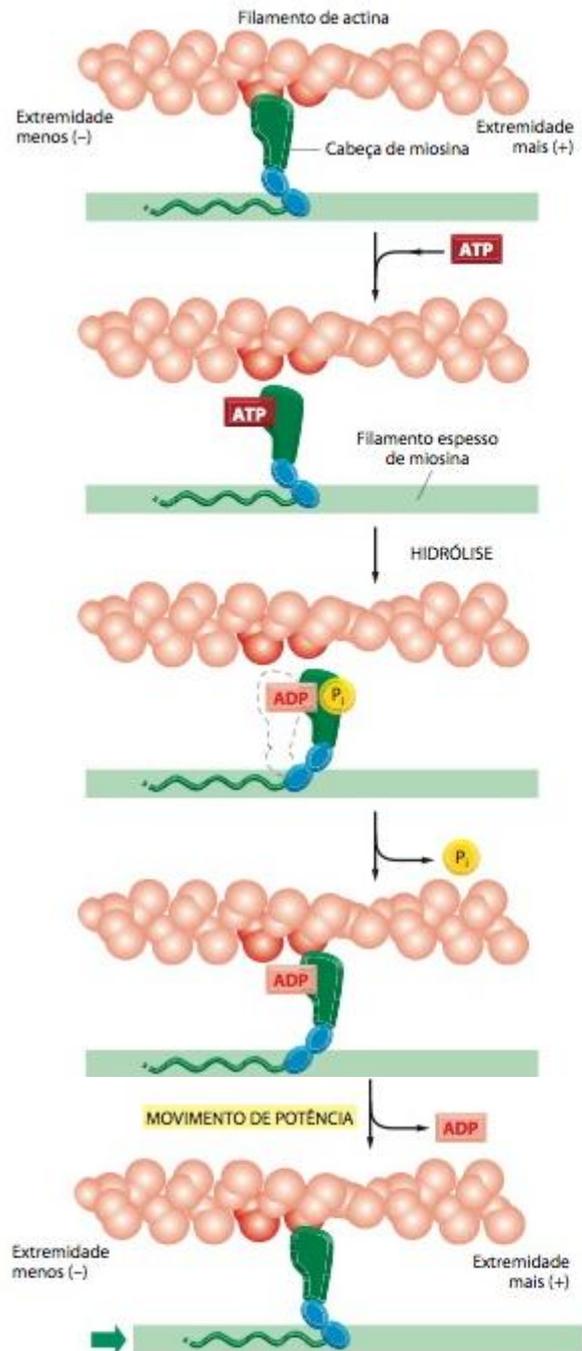


Figura 16-54 Miosina II.

Motores moleculares

- A miosina V está envolvida no transporte de vesículas e organelas;
- A miosina II está sempre associada à atividade contrátil, inclusive está envolvida na formação do anel contrátil na citocinese e participa do processo de migração celular;
- A miosina I está envolvida na construção de protrusões ricas em actina, como as microvilosidades e no transporte de endossomos e outras organelas membranosas;





CONECTADA No começo do ciclo apresentado nesta figura, uma cabeça de miosina sem ligação ao nucleotídeo está firmemente presa a um filamento de actina em uma configuração de rigor (assim denominada por ser responsável pelo *rigor mortis*, a rigidez cadavérica). Em um músculo em contração ativa, este estado é de duração extremamente curta, sendo rapidamente terminado pela ligação de uma molécula de ATP.

LIBERADA Uma molécula de ATP se liga a uma grande fenda existente na "parte posterior" da cabeça (ou seja, no lado mais distante do filamento de actina) e imediatamente provoca uma leve modificação na conformação dos domínios que formam o sítio de ligação à actina. Isso reduz a afinidade da cabeça pela actina e permite seu deslizamento sobre o filamento. (O espaço representado no desenho entre a cabeça e a actina enfatiza esta mudança, embora seja provável que, na realidade, a cabeça permaneça muito mais próxima à actina.)

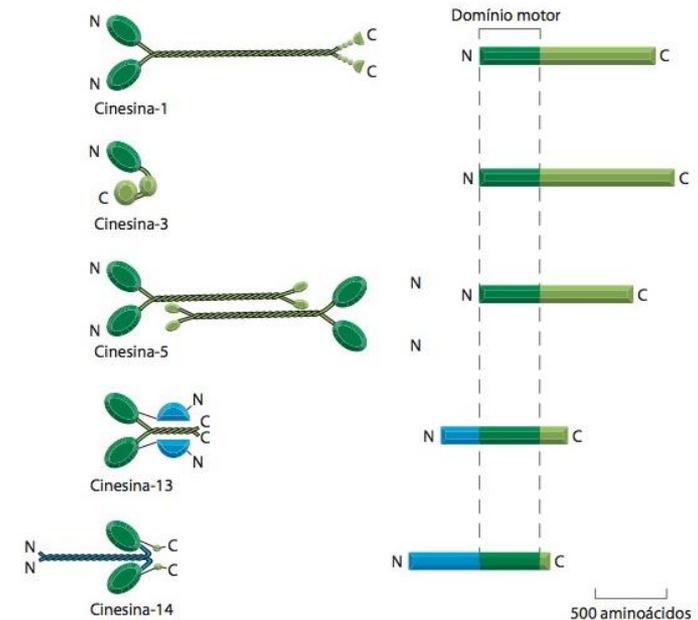
ENGATILHADA A fenda se fecha, como as valvas de uma concha, sobre a molécula de ATP, desencadeando uma grande mudança de conformação que, por sua vez, faz com que a cabeça se desloque sobre o filamento por uma distância de aproximadamente 5 nm. Ocorre hidrólise de ATP, mas o ADP e o fosfato inorgânico (P_i) produzidos permanecem firmemente ligados à proteína.

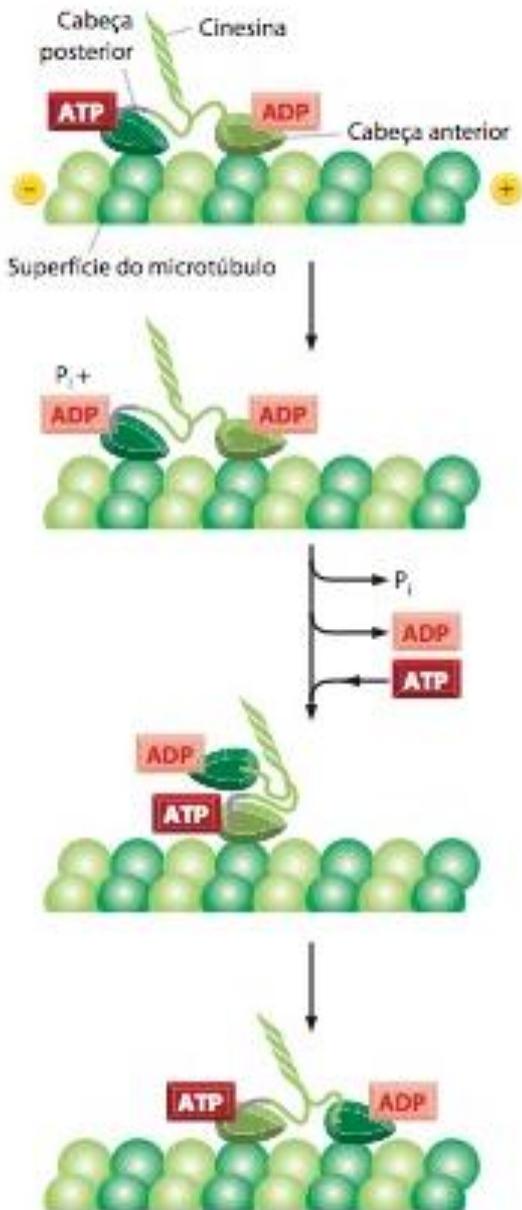
GERADORA DE FORÇA Uma ligação fraca da cabeça de miosina a um novo sítio do filamento de actina provoca a liberação do fosfato inorgânico produzido pela hidrólise de ATP, concomitante à forte ligação da cabeça com a actina. Essa ligação desencadeia o movimento de potência – a modificação conformacional geradora de força durante a qual a cabeça retorna à sua conformação original. Durante o movimento de potência, a cabeça perde seu ADP, retornando, portanto, ao ponto do início para um novo ciclo.

CONECTADA Ao final de um ciclo, a cabeça de miosina está mais uma vez firmemente presa em uma configuração de rigor. Observe que a cabeça se deslocou para uma nova posição sobre o filamento de actina.

Proteínas motoras de microtúbulos: Cinesinas e dineínas

- Cinesinas – estrutura similar à miosina II;
- Existem pelo menos 14 famílias distintas;
- **Locomove-se em direção à extremidade mais,** com exceção de uma família;
- Transporta organelas membranosas para do corpo celular de um neurônio para o terminal axonal;
- Cinesina-5 pode sofrer autoassociação por seu domínio da cauda, formando um motor bipolar que desliza em microtúbulos com orientações opostas, um sobre o outro;



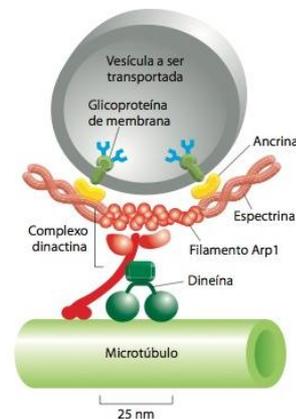


Proteínas motoras de microtúbulos: Cinesinas e dineínas

- **Dineínas** locomovem-se em direção à **extremidade menos** e não são relacionadas às cinesinas;
- São divididas em 2 ramos principais:
 1. Dineínas citoplasmáticas – importante para o transporte vesicular e posicionamento do aparelho de Golgi;
 2. Dineínas do axonema – especializadas no movimento de deslizamento de microtúbulos que direciona o batimento de cílios e flagelos;
- Dineínas são os maiores e mais rápidos motores moleculares;
- O ciclo mecanoquímico da dineína é mais semelhante ao da miosina;

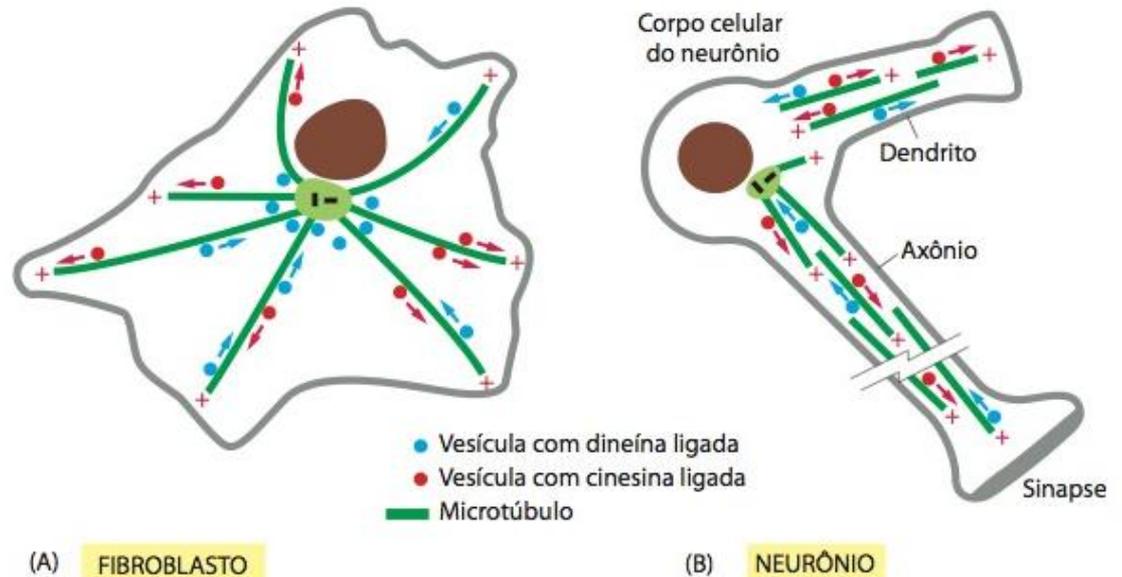
Proteínas motoras de microtúbulos: Cinesinas e dineínas

- Dineínas citoplasmáticas precisam se associar a um segundo complexo proteico (dinactina) para realizar a translocação de organelas;
- As membranas do aparelho de Golgi estão recobertas pelas proteínas **ancrina** e **espectrina**, que podem se associar ao filamento Arp1 no complexo dinactina;
- Em algumas situações dineínas citoplasmáticas interagem diretamente com suas cargas;
- O citoesqueleto e proteínas motoras transportam e posicionam moléculas de mRNA próximos a sinapses de neurônios;



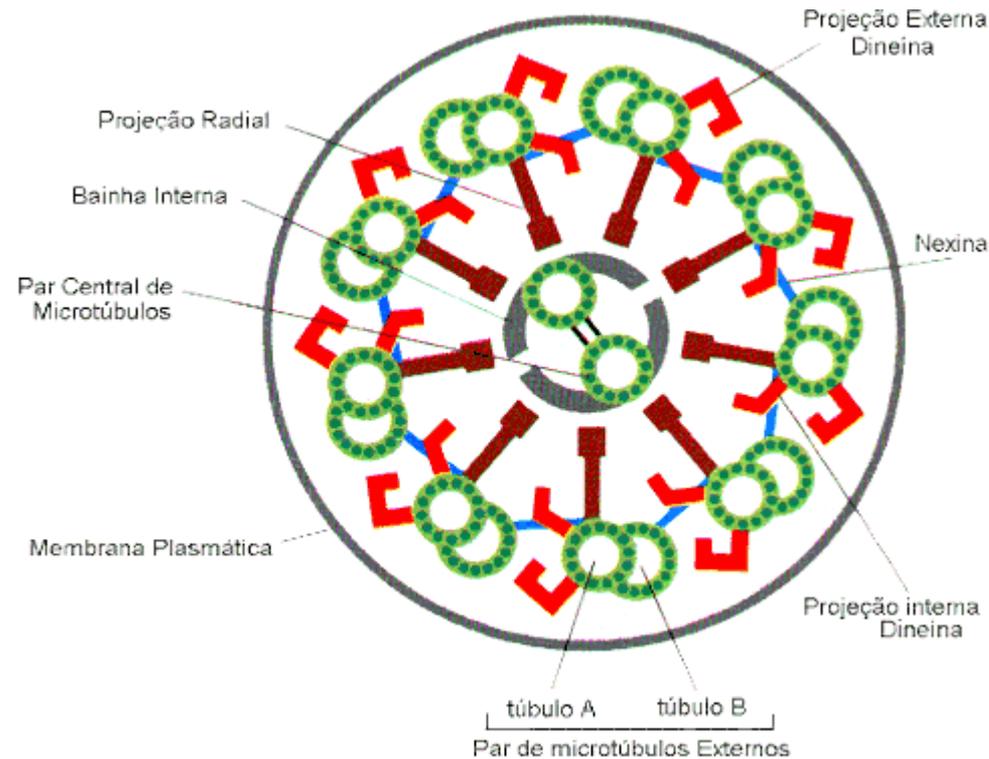
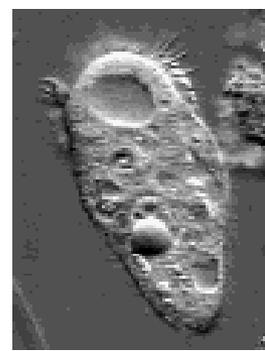
Proteínas motoras de microtúbulos: Cinesinas e dineínas

Figura 16-104 Organização de microtúbulos em fibroblastos e neurônios. (A) Em um fibroblasto, os microtúbulos emanam do centrossomo, localizado no centro da célula. Vesículas ligadas a cinesinas que se direcionam para a extremidade mais (+) se movem rumo à periferia, e vesículas ligadas à dineína, a qual se direciona para a extremidade menos (-), movem-se para o centro da célula. (B) Em um neurônio, a organização dos microtúbulos é mais complexa. No axônio, todos os microtúbulos compartilham a mesma polaridade, tendo as extremidades mais (+) apontando em direção à extremidade terminal do axônio. Nenhum microtúbulo individual abrange o comprimento



Cílios e flagelos

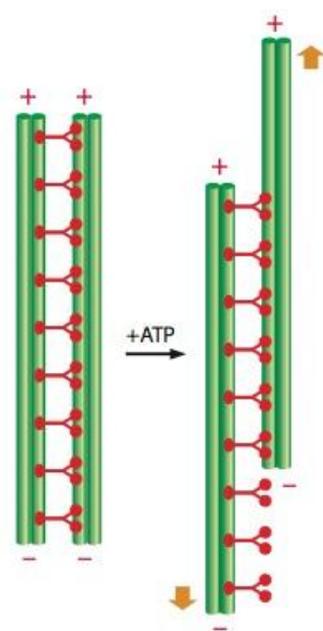
- Cílios e flagelos são apêndices celulares semelhantes a pelos que possuem um feixe de microtúbulos no seu interior;
- Flagelos são encontrados em espermatozoides e em vários protozoários. Por um movimento ondulatório permite que a célula que os possui nade em meios líquidos;
- Cílios tendem a ser mais curtos que flagelos e estão organizados de modo similar a eles, no entanto batem como chicote (Paramecium, trato respiratório, oviduto);
- O movimento de cílios e flagelos é produzido pela flexão de sua parte central, o axonema;



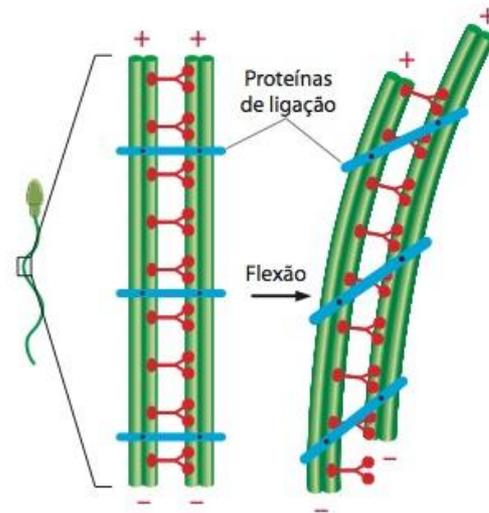
cilio_flagelo.swf



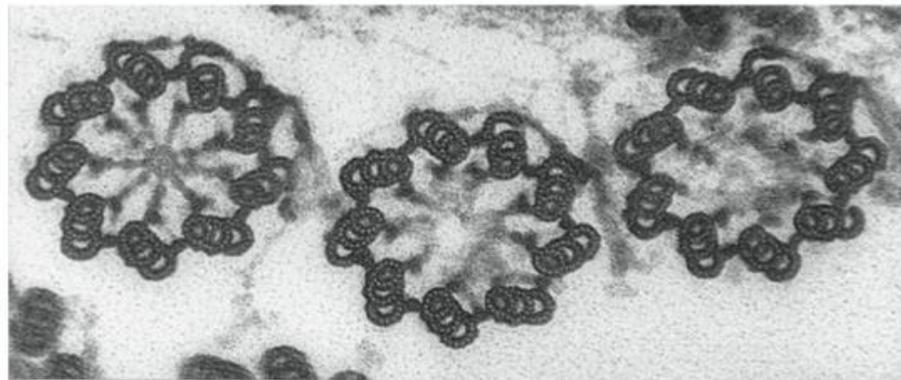
flagelum-1.swf



(A) EM PARES ISOLADOS DE MICROTÚBULOS: A DINEÍNA PROVOCA O DESLIZAMENTO DOS MICROTÚBULOS

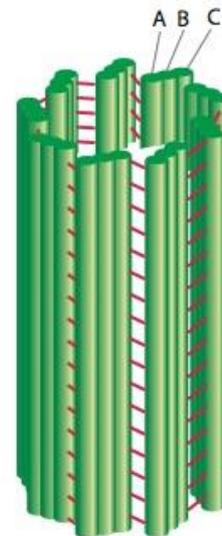


(B) EM FLAGELOS NORMAIS: A DINEÍNA PROVOCA A FLEXÃO DOS MICROTÚBULOS

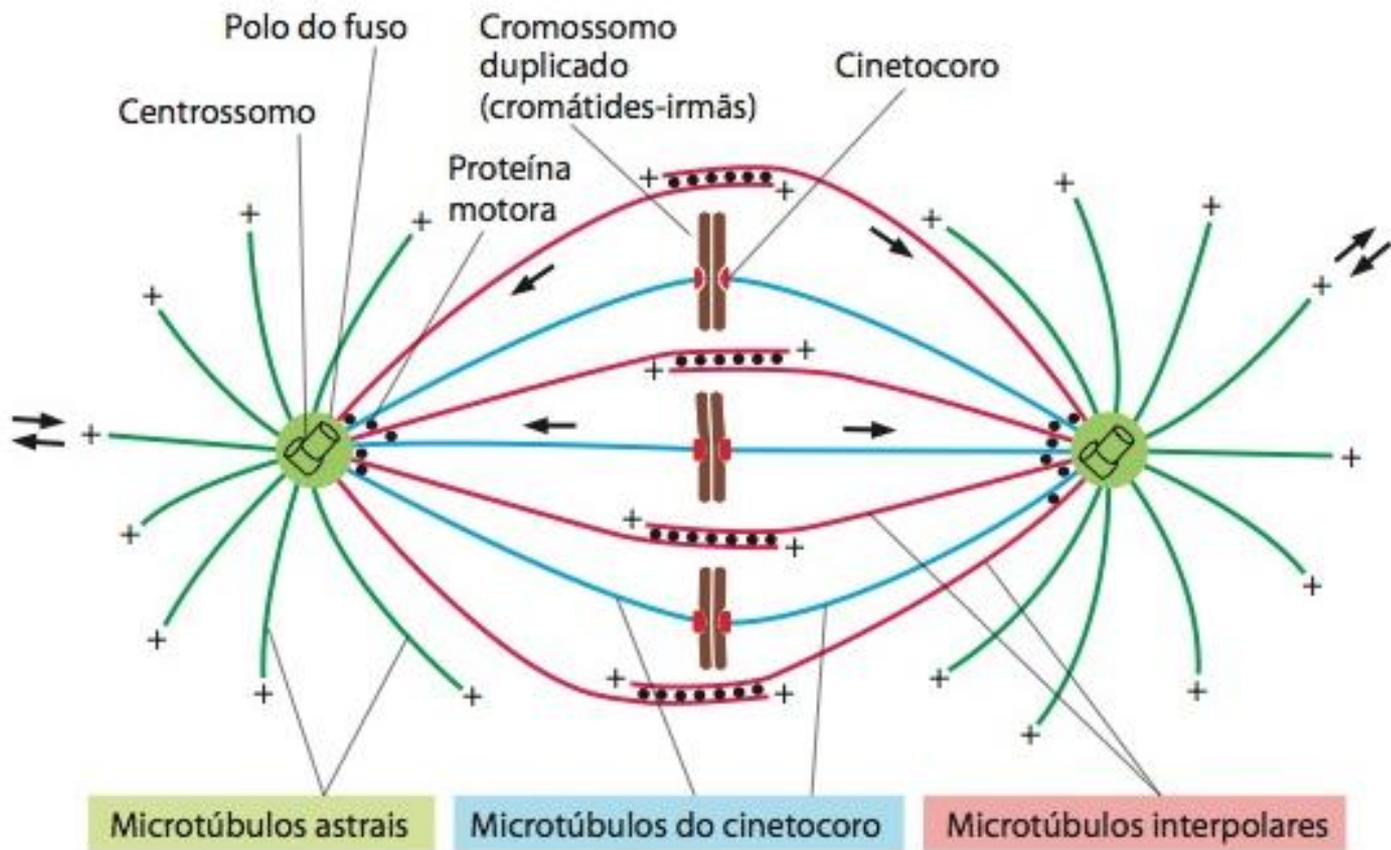


(A)

100 nm



(B)



(A)

