

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Receptores e transportador de dopamina de *Homo sapiens*: aspectos genéticos, bioquímicos,
funcionais e de identidade com outras espécies

Raphael da Silva Costa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba – MG

Outubro – 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Receptores e transportador de dopamina de *Homo sapiens*: aspectos genéticos, bioquímicos,
funcionais e de identidade com outras espécies

Raphael da Silva Costa

Luciana Karen Calábria

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba – MG

Outubro – 2020

“Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.”

J. A. Redmerski

AGRADECIMENTOS

Meu muito obrigado, em primeiro lugar, a Deus que me permitiu chegar aonde cheguei, e conquistar essa vitória para mim e minha família, em especial na pessoa da minha amada mãe a quem dedico essa conquista por ser uma mulher guerreira que sempre prezou pela nossa casa e nunca mediu esforços para cuidar bem de seus filhos. Também dedico ao meu querido pai, por me dar sempre o apoio, a confiança e as palavras de fé, para enfrentar meus desafios.

Devo agradecer muito também à pessoa do meu padrinho, meu segundo pai de consideração, que muito me ajudou para que essa etapa da minha vida pudesse ser vencida, que tanto se esforçou para que eu pudesse conquistar meu sonho e não titubeasse perante as dificuldades. Pelas tantas vezes que me apanhou no “Trevão” a altas horas pois não havia mais ônibus para que eu pudesse ir para casa, te agradeço também por cada “puxão de orelha” dado, todos ajudaram para o meu crescimento enquanto pessoa.

Muito agradeço pelas pessoas que estiveram do meu lado nesse tempo, minha madrinha, meus irmãos, meus tios, amigos de Itumbiara, que sempre mantiveram firme na amizade desde muito tempo, aos meus irmãos na fé do meu grupo de oração Yeshua, aos meus amigos que fiz em Ituiutaba que estiveram próximos e fizeram de dias difíceis bons dias para se recordar.

De modo especial agradeço ao GOU São Gabriel que foi uma reserva de paz e esperança em muitos dias durante estes anos. Lembrarei para sempre de cada servo que esteve na sala B214 pregando palavras de fé e esperança que me ajudaram a continuar firme e forte.

Também deixo meus agradecimentos, à minha orientadora Profa. Dra. Luciana Calábria que tanto admiro, e que tanto me ensinou acadêmica e profissionalmente, que acreditou no meu potencial e muito graças a ela eu consegui finalizar este trabalho, porque sem seus esforços eu não conseguiria.

E por fim, agradeço a minha instituição UFU que foi minha segunda casa durante todo esse tempo, onde fui muito bem acolhido e que sempre assistiu muito bem os seus discentes, e ao CNPq que financiou minha pesquisa me estimulando a dedicar meu tempo ao trabalho.

RESUMO

A dopamina é um neurotransmissor e seus efeitos fisiológicos são garantidos graças à existência de receptores e transportador específicos, os quais possuem características distintas. O estudo revelou as características genéticas e bioquímicas, bem como as rotas biológicas dos cinco receptores e do transportador de dopamina por meio de ferramentas de bioinformática e revisão da literatura. Os dados revelaram que os receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G, enquanto o transportador é membro da família de genes de carreadores de soluto 6, e ambos apresentam particularidades genéticas, bioquímicas e de localização celular, participando da função sináptica e de transdução de sinal, na doença de Parkinson e nas vias ligadas à dependência de drogas. Os receptores de humanos e de outros vertebrados se distinguem dos invertebrados, indicando uma possível duplicação dos genes no ancestral, bem como a existência de genes de origem distinta, mas com a mesma função. Além disso, a sequência do transportador de dopamina se mostrou altamente conservada. Contudo, apesar da riqueza de informações levantadas, ainda são poucos os estudos com receptores e transportador de dopamina em certos organismos, indicando a necessidade de pesquisas acerca do tema.

Palavras-chave: Bioinformática; Receptores acoplados à proteína G; Transportador de monoamina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP	proteína de ligação 4E do fator de iniciação eucariótico
AC	adenilato ciclase
Akt	proteína quinase B
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AO	ácido ocadaico
ATP	adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CaMKII α	subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
Cdk5	quinase 5 dependente de ciclina
ChEBI	<i>Chemical Entities of Biological Interest</i>
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta
D1	receptor de dopamina, tipo 1
D2	receptor de dopamina, tipo 2
D3	receptor de dopamina, tipo 3
D4	receptor de dopamina, tipo 4
D5	receptor de dopamina, tipo 5
DA	dopamina
DARPP-32	proteína fosforregulada por AMPc-32 kDa e dopamina
DAT	transportador de dopamina
DOPA	3,4-diidroxifenilalanina
DRD	receptores dopaminérgicos
DRD1	gene do receptor de dopamina da classe 1

DRD2	gene do receptor de dopamina da classe 2
DRD3	gene do receptor de dopamina da classe 3
DRD4	gene do receptor de dopamina da classe 4
ERK	proteína quinase regulada por sinal extracelular
FASTA	<i>Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
GIRK	canais de potássio acoplados à proteína G
GPCR	superfamília de receptores acoplados à proteína G
GSK-3	glicogênio sintase quinase
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
INDR	<i>Invertebrate dopamine receptors</i>
IP3	inositol trifosfato
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
mTOR	proteína alvo da rapamicina
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NMDA	N-metil D-aspartato
p70S6	quinase p70S6
PDB	<i>Protein DataBase</i>
PDK	proteína quinase dependente de fosfatidilinositol
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2	fosfatidilinositol 2
PIP3	fosfatidilinositol 3
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C

PLC	fosfolipase C
PLC β	isoforma β da fosfolipase C
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PP1	proteína fosfatase-1
PP2A	proteína fosfatase 2A
PP2B	proteína fosfatase 2B
rpS6	proteína ribossomal
SLC	família de genes de carreadores de soluto
TCD4+	linfócito T Helper
α	alfa
β	beta

LISTA DE SÍMBOLOS

$C_8H_{11}NO_2$ 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol

Ca^{2+} íon cálcio

Cl^- íon cloro

K^+ íon potássio

Na^+ íon sódio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular da dopamina	14
Figura 2 – Síntese de dopamina	15
Figura 3 – Funcionamento do transportador de dopamina	22
Figura 4 – Via da sinapse dopaminérgica	24
Figura 5 – Cascata de sinalização celular dos receptores da família <i>D1-like</i>	27
Figura 6 – Cascata de sinalização celular dos receptores da família <i>D2-like</i>	28
Figura 7 – Regulação do transportador de dopamina	29
Figura 8 – Mapeamento estrutural dos sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores D1, D2 e D3	37
Figura 9 – Mapeamento estrutural dos sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores D4 e D5, e do transportador DAT	38
Figura 10 - Via de interação do receptor-ligante neuroativo com participação dos receptores dopaminérgicos	48
Quadro 1 – Sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores e transportador de dopamina	42
Quadro 2 – Participação dos receptores e transportador de dopamina em vias metabólicas	46
Figura 10 – Via de interação do receptor ligante neuroativo e a participação dos receptores dopaminérgicos	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características genéticas dos receptores e transportador de dopamina	21
Tabela 2 – Informações bioquímicas dos receptores e transportador de dopamina	30
Tabela 3 – Localização celular dos receptores e transportador de dopamina	45
Tabela 4 – Identidade do alinhamento do receptor D1 de <i>Homo sapiens</i>	49
Tabela 5 – Identidade do alinhamento do receptor D2 de <i>Homo sapiens</i>	51
Tabela 6 – Identidade do alinhamento do receptor D3 de <i>Homo sapiens</i>	52
Tabela 7 – Identidade do alinhamento do receptor D4 de <i>Homo sapiens</i>	53
Tabela 8 – Identidade do alinhamento do receptor D5 de <i>Homo sapiens</i>	54
Tabela 9 – Identidade do alinhamento do receptor DAT de <i>Homo sapiens</i>	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	17
METODOLOGIA	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
<i>Classificação das proteínas e estrutura dos genes</i>	21
<i>Aspectos funcionais e cascatas de sinalização</i>	23
<i>Sequência FASTA e estrutura proteica</i>	29
<i>Sítios, motivos e domínios ligantes</i>	36
<i>Localização celular</i>	44
<i>Outras vias metabólicas</i>	45
<i>Similaridade entre as sequências</i>	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	57

INTRODUÇÃO

A dopamina é um neurotransmissor da família da catecolamina, precursor da adrenalina e noradrenalina (Figura 1). É produzida principalmente no mesencéfalo pelos neurônios nigrais (substância negra) e neurônios da área tegumentar ventral, bem como pelas glândulas supra renais, sendo iniciada pela hidratação do aminoácido tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), pela ação da enzima tirosina hidroxilase, seguida pela sua descarboxilação (Figura 2). Sua ação é mediada pela família de receptores dopaminérgicos, sendo importante no comportamento motivado por recompensa (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; HMDB, 2020).

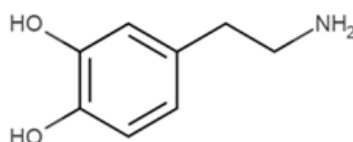


Figura 1 - Estrutura molecular da dopamina, um composto aromático homomonocíclico.

Fonte: HMDB (2020).

Com nome IUPAC 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol e fórmula química $C_8H_{11}NO_2$, a dopamina possui mais de 20 sinônimos, podendo ser encontrados nos bancos de dados *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI) (HASTINGS et al., 2016), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (KANEHISA; GOTO, 2000) e *Human Metabolome Database* (HMDB) (WISHART et al., 2018). Esse composto orgânico faz parte da superclasse benzenóide e classe fenol (HMDB, 2020). Além de seus efeitos fisiológicos característicos, a dopamina também está presente em condições patológicas, como esquizofrenia, vitiligo e hipotireoidismo, por exemplo (HMDB, 2020), sendo indicada como fármaco em casos de desequilíbrios hemodinâmicos, traumas, septicemias, insuficiência renal e congestiva, dentre outros, uma vez que seu tempo de meia vida é de 2 minutos (WISHART et al., 2006; DRUGBANK, 2020).

A dopamina está localizada em pelo menos 20 tipos teciduais e é descrita preferencialmente nos compartimentos extracelular e citoplasmático, podendo ser encontrada em amostras biológicas, sangue, líquido cefalorraquidiano, fezes e urina (HMDB, 2020). Fora do cérebro e em concentrações normais, a dopamina possui importantes funções, como inibição da liberação de noradrenalina nos vasos sanguíneos; aumenta a excreção de sódio e produção de urina, bem como é um vasodilatador nos rins; diminui a produção de insulina no pâncreas; protege a mucosa intestinal e reduz sua motilidade no sistema digestivo; além de diminuir a atividade dos linfócitos no sistema imunológico (HMDB, 2020).

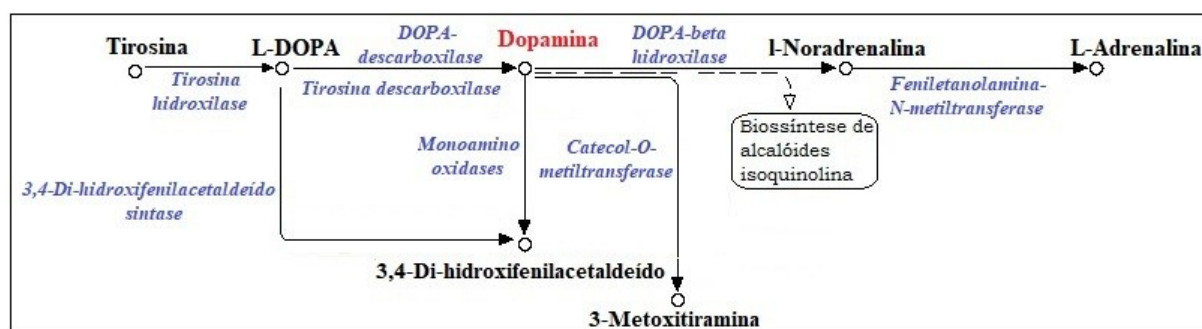


Figura 2 - Síntese de dopamina a partir do aminoácido tirosina.

Fonte: Adaptada de KEGG (2020).

Ao contrário da serotonina que possui função calmante, a dopamina é estimulante, contribuindo para geração da atenção, da energia e da agressividade. Assim, a sua associação à drogas, como cafeína e cocaína, induz temporariamente a sua liberação, enquanto que com o álcool e tranquilizantes há a inibição de sua produção. Além disso, é notável que milhares de medicamentos interajam com a dopamina, promovendo efeitos positivos e adversos no organismo (WISHART et al., 2006; EMMONS; KRANZ, 2007; DRUGBANK, 2020).

No entanto, os efeitos fisiológicos da dopamina no organismo somente são garantidos graças à existência de receptores específicos que garantem o reconhecimento da molécula na sinapse, sendo primordiais no princípio da comunicação neuroquímica e na resposta fisiológica

final. Os receptores dopaminérgicos em humanos (D1, D2, D3, D4 e D5), bem como o seu transportador (DAT), atuam na sinapse dopaminérgica e possuem características distintas.

Os receptores de dopamina são amplamente expressos no sistema nervoso central, uma vez que desempenham importante papel no controle da locomoção, cognição, emoção e afeto, bem como na secreção neuroendócrina (MISSALE et al., 1998). Por outro lado, o DAT é alvo de várias drogas psicoativas e também está sujeito à regulação de curto e longo prazo por diversos medicamentos e mecanismos (SALATINO-OLIVEIRA; ROHDE; HUTZ, 2018).

Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo revelar as características genéticas e bioquímicas, bem como as rotas biológicas dos cinco receptores (D1, D2, D3, D4, D5) e do transportador de dopamina (DAT) por meio de ferramentas de bioinformática e revisão da literatura especializada, mas também buscando a similaridade entre essas moléculas de *Homo sapiens* e organismos de diferentes espécies de grupos distantes, com variados níveis taxonômicos, destacando seus efeitos fisiológicos.

OBJETIVOS

Considerando os cinco receptores dopaminérgicos e o transportador de dopamina, este estudo buscou:

- revelar as características genéticas e bioquímicas, incluindo aspectos de localização cromossômica, níveis primário, secundário e terciário das estruturas proteicas, presença de sítios, motivos e domínios ligantes;

- investigar sua localização celular e suas rotas biológicas envolvidas, descrevendo as principais cascatas de sinalização;

- identificar a similaridade da sequência de *Homo sapiens* e outras espécies que possuem depósito em banco de dados, como *Bos taurus*, *Caenorhabditis elegans*, *Crocodylus porosus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus* e *Xenopus laevis*, descrevendo seus efeitos fisiológicos.

METODOLOGIA

Estudo exploratório e descritivo realizado no período de julho/2019 a setembro/2020, baseando-se em revisão bibliográfica e no uso de ferramentas de bioinformática para obtenção de dados sobre os receptores e transportador de dopamina. A revisão da literatura foi realizada nas bases de dados *Google Scholar* e *PubMed* utilizando como entrada as seguintes palavras-chave: "*dopamine receptors*", "*dopamine receptor D(1-5)*", "*dopamine transporter*", "*dopamine*", "*DAT*", "*dopaminergic synapse*", "*solute carrier family 6*" e "*G protein-coupled receptors*". Além disso, termos foram combinados utilizando o operador booleano "AND" para compor a estratégia de busca.

O banco de dados HMDB (<https://hmdb.ca>) (WISHART et al., 2018) foi acessado para obtenção de informações detalhadas acerca da dopamina utilizando o termo "*dopamine*", selecionando o campo "*metabolites*". As informações utilizadas foram retiradas do número de acesso HMDB0000073.

As sequências de aminoácidos (*Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm* - FASTA) foram obtidas no banco de dados NCBI – *National Center of Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as estruturas proteicas cristalizadas em 3D foram acessadas no PDB – *Protein DataBase* (<https://www.rcsb.org>) (BERMAN et al., 2000) e no SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) (KOPP; SCHWEDE, 2004; WATERHOUSE et al., 2018). As estruturas secundária e terciária também foram analisadas por meio do PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (BUCHAN; JONES, 2019).

O mapeamento estrutural de sítios, motivos e domínios ligantes foi realizado por meio de duas análises, utilizando o PDB considerando o número de acesso e no banco de dados PROSITE (<https://prosite.expasy.org>) (DE CASTRO et al., 2006), ambos com as respectivas sequências FASTA como entrada, sendo selecionada a opção "*Exclude motifs with a high*

probability of occurrence from the scan". Além disso, para avaliação de possíveis sítios ligantes de calmodulina foi realizada a busca no banco de dados *Calmodulin Target Database* (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/no_flash.htm) (YAP et al., 2000).

A plataforma web do PSORT (hospedada no domínio <https://psort.hgc.jp/form2.html>) (NAKAI; HORTON, 1999) foi utilizada para predição da localização celular, selecionando a opção "*yeast/animal*" como sequência de entrada para a busca.

Para obtenção dos mapas bioquímicos foi utilizado o banco de dados do KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) (KANEHISA; GOTO, 2000), que reúne dados de diferentes bancos que lidam com genoma, vias metabólicas e substâncias químicas biológicas. O "*KEGG Pathway*" registra redes de interações moleculares, reações e relações para o metabolismo de diversas moléculas, processamento de informação genética, processos celulares, doenças humanas, entre outros. Para busca dos dados, as entradas utilizadas foram os termos "*D* dopamine receptor*" para cada receptor (D1 a D5) e "*dopamine transporter*", selecionando o resultado que contivesse a melhor descrição para cada busca, todos no conjunto de "*KEGG orthology*".

A construção dos alinhamentos locais, a análise de identidade e grau de similaridade foram feitas utilizando a ferramenta BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1990), selecionando a opção "*Protein – Protein*" e seguindo como "*Non-redundant*" no tópico "*Database*", visando checar todas as traduções não redundantes do GenBank CDS + PDB + SwissProt + PIR + PRF, excluindo amostras ambientais de projetos *Whole Genome Shotgun* - WGS. No tópico "*organism*" foram inseridos os códigos de *tax id* (registro taxonômico) das nove espécies selecionadas, considerando organismos de grupos distantes, com variados níveis taxonômicos, como *Homo sapiens* (taxid:9606), *Bos taurus* (taxid:9913), *Caenorhabditis elegans* (taxid:6239), *Crocodylus porosus* (taxid:8502), *Danio rerio* (taxid:7955), *Drosophila melanogaster*

(taxid:7227), *Gallus gallus* (taxid:9031), *Rattus norvegicus* (taxid:10116) e *Xenopus laevis* (taxid:8355). Nesta análise a identidade (%) revelou a quantidade de *matches* entre duas sequências considerando resíduos similares. Além disso, o valor estatístico (*E-value*) indicou o número esperado de falsos positivos, sendo diretamente proporcional à chance do resultado ser consequência do acaso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Classificação das proteínas e estrutura dos genes

Os receptores de dopamina pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), apresentando uma estrutura canônica de sete transmembranas, sendo classificados em cinco subtipos em mamíferos e divididos em duas famílias de acordo com a sua estrutura e resposta biológica. A família *D1-like* inclui os receptores D1 e D5, enquanto a família *D2-like* agrupa os receptores D2, D3 e D4 (MISSALE et al., 1998; RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). A organização genômica dos receptores de dopamina indica que eles são diferentes quanto ao número de resíduos de nucleotídeos, quantidade de íntrons e localização cromossômica (Tabela 1). Na tabela 1 também estão as características genéticas do transportador de dopamina (DAT).

Tabela 1 - Características genéticas dos receptores dopaminérgicos estratificados em família (*D1-like* e *D2-like*), proteína (D1-D5) e gene (DRD1-DRD5) e do transportador de dopamina (DAT) em *Homo sapiens*.

	D1-like		D2-like			DAT (SLC6A3)
	D1 (DRD1)	D5 (DRD5)	D2 (DRD2)	D3 (DRD3)	D4 (DRD4)	
Resíduos de nucleotídeos	1.341	1.434	1.332	1.203	1.260	1.863
Introns	1	0	14	11	4	15
Localização no cromossomo	5q35.1	4p15.1-16.1	11q22-23	3q13.3	11p15.5	5p15.33

Fonte: Adaptada de Missale et al. (1998) e atualizada com dados do NCBI (2020).

Estes receptores foram inicialmente propostos com base em evidências farmacológicas e bioquímicas, podendo estar acoplados positivamente à adenilato ciclase induzindo a acumulação de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular e a ativação da proteína quinase dependente de AMPC, proteína quinase A (PKA), designados como receptores *D1-like*, ou independente do sistema de geração de AMPC que são acoplados negativamente à adenilato ciclase, reduzindo a acumulação de AMPC e modulando a atividade da PKA e seus efetores,

como são os receptores *D2-like* (MISSALE et al., 1998; RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015).

Os transportadores de neurotransmissores pertencentes à família de genes de carreadores de soluto (SLC) compreendem um grupo de transportadores para os neurotransmissores de monoamina, como a serotonina, a dopamina e a noradrenalina, bem como os neurotransmissores de aminoácidos GABA e glicina, amplamente expressos no cérebro de mamíferos desempenhando um papel essencial na regulação da sinalização e homeostase dos neurotransmissores (KRISTENSEN et al., 2011; SALATINO-OLIVEIRA et al., 2018).

O DAT é membro da superfamília de proteínas simportadoras de neurotransmissores dependentes de sódio e da subfamília de genes *SLC6*, atuando na regulação da neurotransmissão dopaminérgica no cérebro, recaptando a dopamina extraneuronal (Figura 3). Todo o conhecimento sobre a estrutura do DAT em humanos é baseado em dados obtidos a partir de estudos com transportadores homólogos.

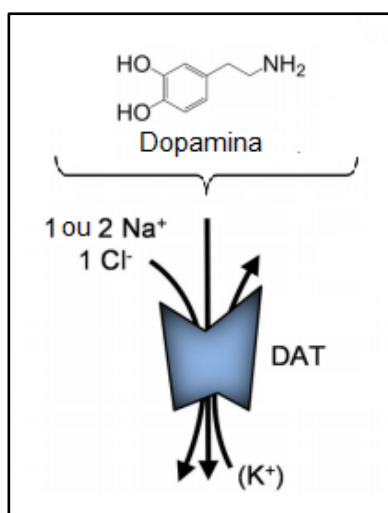


Figura 3 - Funcionamento do transportador de dopamina (DAT) por meio do carreamento do neurotransmissor simultaneamente com a entrada de Na^+ e Cl^- e a saída de K^+ .

Fonte: Adaptada de Kristensen et al. (2011).

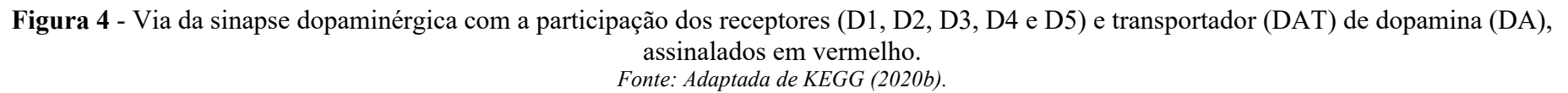
A via de sinapse dopaminérgica na qual há a participação de todos os receptores de dopamina, bem como do seu transportador foi levantada a partir do banco de dados KEGG

(Figura 4), a qual ilustra bem a cascata de sinalização integrada dos cinco receptores nos neurônios pré- e pós-sinápticos e o DAT. Os dados da via extraída do KEGG corroboram com a revisão realizada por Rangel-Barajas et al. (2015), sendo possível notar a localização neuronal dessas moléculas. A função do receptor D2 como autorreceptor e sua presença nos neurônios pré- e pós-sinápticos, bem como a localização do DAT nas células da glia e no neurônio pré-sináptico desempenhando sua função de recaptação da dopamina. A cascata de sinalização dos receptores *D1-like* passam pelo AMPc e PKA, culminando em plasticidade sináptica ou regulação gênica, enquanto os receptores *D2-like* se restringem à proteína G inibitória, produzindo uma resposta no AMPc ou alternativamente na via da fosfolipase C (PLC), na qual os receptores *D1-like* também são ativadores.

Aspectos funcionais e cascatas de sinalização

Os receptores de dopamina são conhecidos por influenciar o sistema imune, bem como o cardiovascular, renal e funções gastrointestinais, mas também podem atuar no movimento voluntário, na recompensa, na regulação do sono, na alimentação, na afetividade e atenção, na função cognitiva, no olfato e visão, além da regulação hormonal, simpática e ereção peniana (BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015).

Neurônios que expressam o receptor D1 induzem o reforço persistente, estando envolvidos no controle temporal e da ingestão de alimentos, desempenhando papel importante na atividade locomotora, recompensa de sistemas, aprendizado e memória (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). Além disso, a ativação do receptor D1 também está relacionada à regulação do gradiente eletroquímico através de Na^+ e K^+ -ATPase e com a homeostase do sódio no rim (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).



A estimulação dos neurônios que expressam o receptor D2 induz inibições transitórias e a sua superestimulação ou atividade excessiva no corpo estriado, levando ao funcionamento alterado dos neurônios do córtex pré-frontal através de vários mecanismos, culminando em deficiências na função executiva e na memória de trabalho. Além disso, o receptor D2 desempenha um papel importante no corpo estriado, atuando no equilíbrio e na plasticidade estrutural, bem como na sinalização da supressão de osteoclastogênese humana e na modulação da imunidade inata em astrócitos, resultando na supressão da neuroinflamação (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015).

O receptor D3 contribui para a regulação da liberação de dopamina e a sua superexpressão não leva a déficits cognitivos, mas a perturbações na motivação. Já o receptor D4 está altamente expresso na glândula pineal atuando no ciclo circadiano, além de contribuir para a longevidade (BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). Por outro lado a ativação do receptor D5 aumenta a produção de interleucinas IL-23, uma citocina que induz a polarização de células TCD4+, as quais estão relacionadas à resposta inflamatória. Além disso, a estimulação do receptor D5 em células dendríticas potencializa a imunidade mediada, sendo capaz de modular o desenvolvimento de uma resposta autoimune *in vivo* (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015).

Quanto ao DAT, sua principal função é regular a disponibilidade de dopamina na sinapse, removendo o neurotransmissor da fenda sináptica e levando-o de volta para o neurônio pré-sináptico, encerrando as ações da dopamina, bem como limitando seus efeitos (SALATINO-OLIVEIRA et al., 2018).

Na figura 3 é possível visualizar o mecanismo de funcionamento do transportador de dopamina à medida que os íons Cl^- e Na^+ adentram a célula devido ao gradiente de concentração, através de uma corrente eletrogênica e a contradireção do fluxo do íon K^+ (KRISTENSEN et al., 2011). Além disso, o DAT desempenha papel integral na cognição, afeto,

reforço comportamental e função motora, mas também pode contribuir em casos específicos para o desenvolvimento da depressão, déficit de atenção, distúrbio de hiperatividade, anedonia, Doença de Parkinson e vícios (SCHMITT; REITH, 2010).

Em relação à cascata de sinalização, os receptores *D1-like* induzem a ativação da adenilato ciclase através da ativação direta de proteínas de ligação a nucleotídeos da guanosina (proteínas G), resultando na conversão de adenosina trifosfato (ATP) em AMPc. O AMPc interage com as subunidades reguladoras da PKA, induzindo a liberação das subunidades catalíticas que fosforilam substratos diferentes. Uma das proteínas mais estudadas envolvidas na regulação de via de transdução de sinal mediada por estes receptores e PKA é a proteína fosforregulada por AMPc-32 kDa e dopamina (DARPP-32) (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015). A figura 5 revela a cascata de sinalização celular completa dos receptores *D1-like*.

Os receptores de dopamina se colocam com DARPP-32 em várias regiões do cérebro. A fosforilação de DARPP-32 pela PKA no resíduo treonina-34 induz a inibição da proteína fosfatase-1 (PP1), enquanto a fosforilação do resíduo treonina-75 por quinase 5 dependente de ciclina (Cdk5) induz a inibição da PKA. A ativação da PKA e a inibição do PP1 são mediadas por PKA, podendo causar alterações diretas no estado de fosforilação de vários canais, como do receptor AMPA, GABA, NMDA, dentre outros, desempenhando papel importante na condução elétrica neuronal (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

Os receptores *D1-like* também ativam uma via de transdução de sinal que tem sido relacionada com vários distúrbios neuropsiquiátricos, ativando PLC, mediado por uma única proteína transmembrana que promove a interação do receptor com a proteína G. Como resultado, a PLC é ativada e aumenta o acúmulo de inositol trifosfato (IP3) que, por sua vez, se liga ao seu receptor no compartimento intracelular induzido pela liberação de íons cálcio (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

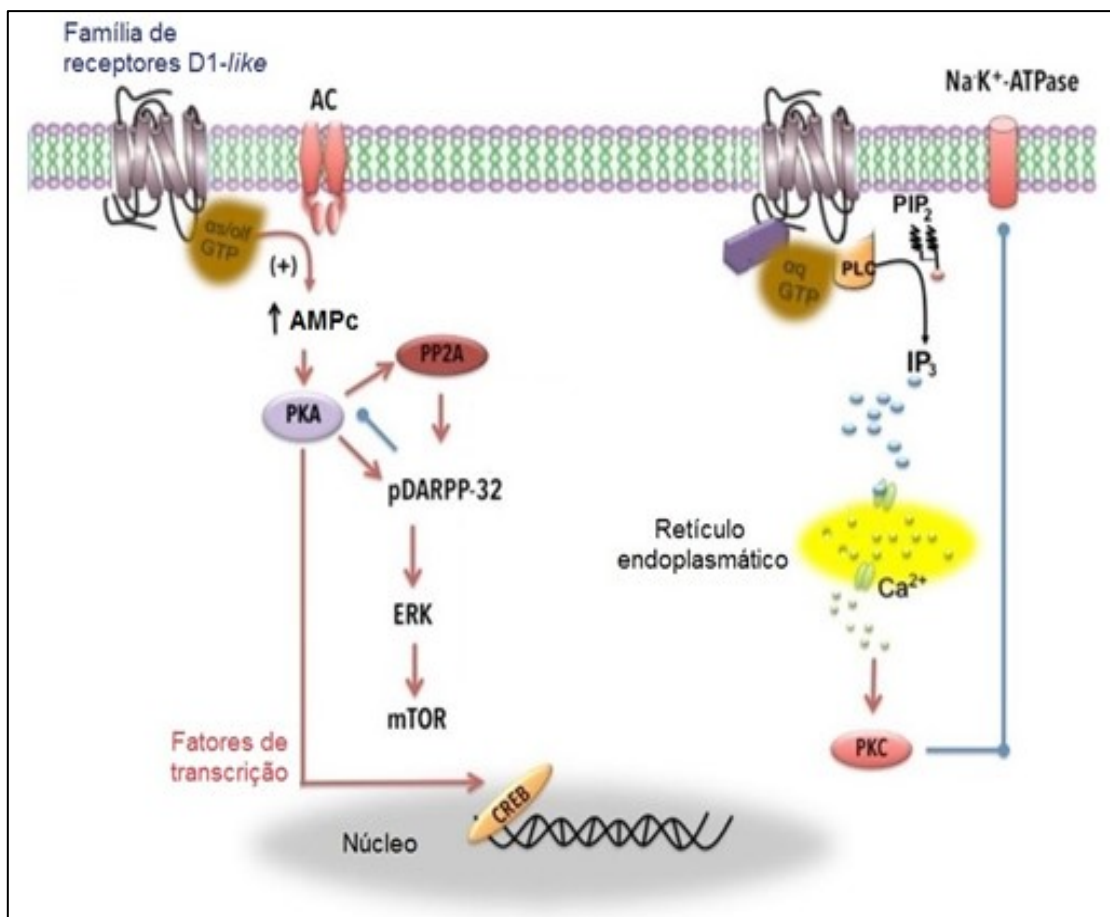


Figura 5 - Cascata de sinalização celular dos receptores da família D1-*like*.
 AMPc, adenosina monofostato 3'-5'-cíclico; PKA, proteína quinase A; DARPP-32, fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc-32 kDa; AC, adenilato ciclase; PP1, PP2A ou PP2B, proteína fosfatase 1, 2A ou 2B; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; IP3, inositol trifosfato; mTOR, proteína alvo da rapamicina; PIP2, fosfatidilinositol 2; Ca²⁺, cálcio; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta.
 Fonte: Adaptada de Rangel-Barajas; Coronel; Florán (2015).

A ativação do ERK1/2 também foi observada em várias linhagens celulares. Os receptores D2 e D4 apresentam algumas diferenças em relação à ativação de ERK/MAPK em comparação com o receptor D3, incluindo a sinalização MAPK ativada por receptores D4 e a ativação de Akt por receptores D2 (Figura 6) (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

Os receptores D3 também participam da fosforilação de Akt e são capazes de aumentar a atividade da proteína quinase C (PKC) e da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Para isso, estes receptores ativam Akt, a qual ativa a sinalização mTOR/p70S6/4E-BP1, provavelmente

através de GPCR, sendo o efeito variável entre os receptores D2-like (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

Por outro, na cascata de sinalização do DAT com ação de drogas, como anfetamina e ácido ocadaico, existe uma rede regulatória complexa que modula a fosforilação do transportador com a participação de quinases (CaMKII α , PKC, PP1, PP2, flotilina-1, PIP2 e syntaxina) de maneira a influenciar a capacidade do transportador de efluir dopamina (Figura 7) (KARAM; JAVITCH, 2018).

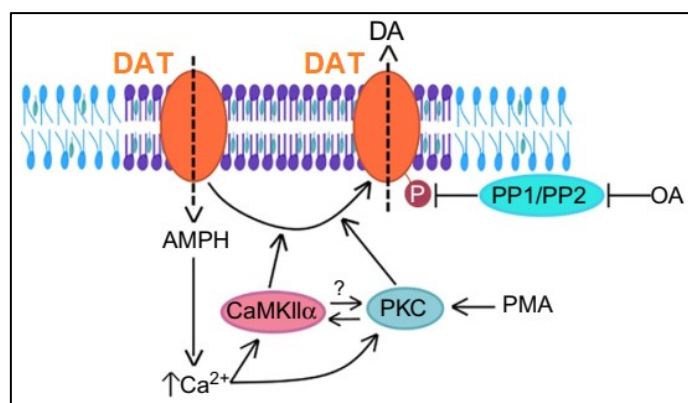


Figura 7 – Regulação do transportador de dopamina (DAT) por fosforilação e a ação da anfetamina (AMPH) atuando como substrato do transportador.

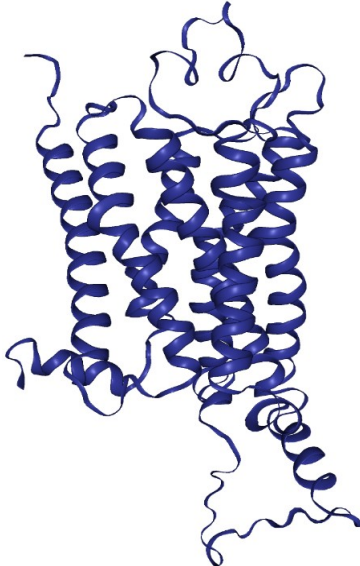
DA, dopamina; PP1/PP2, proteína fosfatase 1/2; OA, ácido ocadaico; CaMKII α , subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina; PKC, proteína quinase C; PMA, forbol-12-miristato-13-acetato.

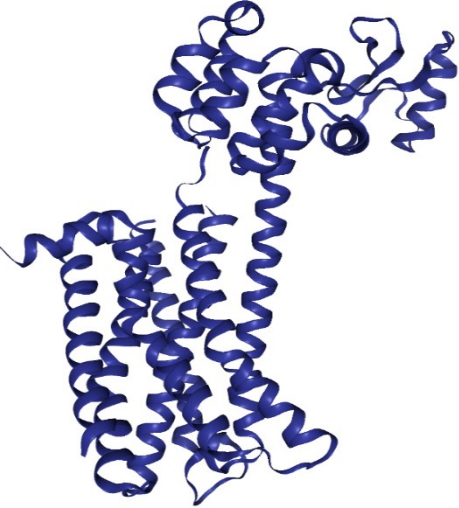
Fonte: Adaptada de Karam; Javitch (2018).

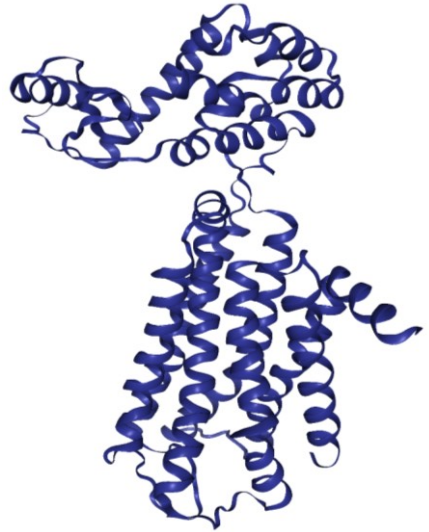
Sequência FASTA e estrutura proteica

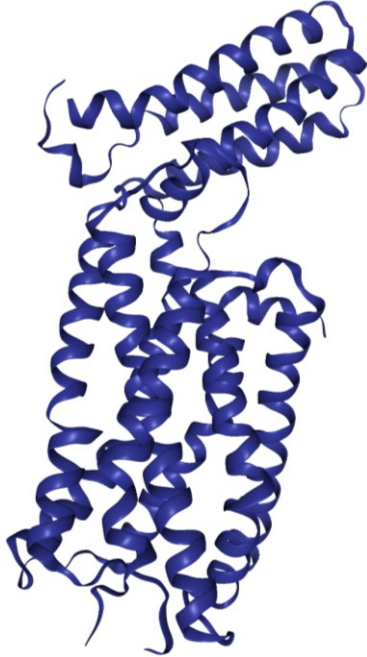
As sequências de aminoácidos dos receptores dopaminérgicos e do transportador de dopamina de humanos estão postadas na tabela 2, as quais foram obtidas no NCBI. Durante a busca restrita para *H. sapiens* foram encontrados acessos de sequências inteiras e parciais para cada um dos receptores, sendo 18 para D1, 12 para D2, 29 para D3, 122 para D4 e 11 para D5, além de 19 para o DAT.

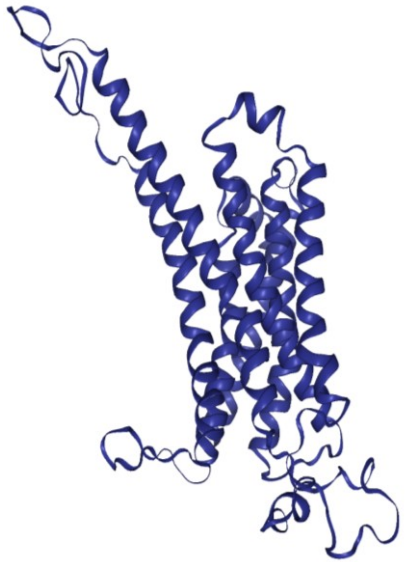
Tabela 2 - Informações bioquímicas dos receptores de dopamina (D1, D2, D3, D4 e D5) e do seu transportador (DAT), incluindo o código de acesso no NCBI, PDB ou Expasy, o número de resíduos de aminoácidos e as sequências primária (FASTA) e terciária (Estrutura) com o seu respectivo método

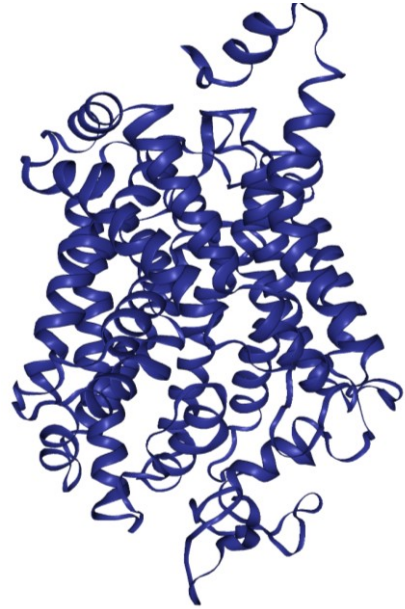
Receptor/ Transportador	Código de acesso	Resíduos de aminoácidos	Sequência FASTA	Estrutura
D1	CAA39286.1 (P21728)	446	>CAA39286.1 dopamine receptor D1 [Homo sapiens] MRTLNTSAMDGTGLVVERDFSVRILTAC FLSLLILSTLLGNTLVCAAVIRFRHLRSKV TNFFVISLAVSDLLVAVLVMPWKAVAEI AGFWPFGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLC VISVDRYWAISSPFRYERKMTPKAAFILIS VAWTLSVLISFIPVQLSWHKAKPTSPSDG NATSLAETIDNCSSLSRTYAISSSVISFYI PVAIMIVTYTRIYRIAQKQIRRIAALERAA VHAKNCQTTTGNGKPVECSQPESSEFKMS FKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFILN CILPFCGSGETQPCIDSNTFDVFVWFGW ANSSLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLC PATNNAIETVSINNNGAAMFSSHHEPRGS ISKECNLVYLIPHAVGSSSEDLKKEEAAGI ARPLEKLSPALSVILDYDTDVSLEKIQPIT QNGQHPT	

D2	<i>P14416.2</i> (6CM4)	443	>sp P14416.2 DRD2_HUMAN RecName: Full=D(2) dopamine receptor; AltName: Full=Dopamine D2 receptor MDPLNLSWYDDDLERQNWSRPFNGSDG KADRPHYNYYATLLTLLIAVIVFGNVLC MAVSREKALQTTTNYLIVSLAVADLLVA TLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVT LDVMMCTASILNLCAISIDRYTAVAMPM LYNTRYSSKRRVTVMISIVWVLSFTISCPL LFGLNNADQNECIANPAFVVYSSIVSFYV PFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRVNTRKSSR AFRAHLRAPLKGNCNTHPEDMKLCTVIMK SNGSFPVNRRRVEAARRAQELEMELSS TSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSHHGLH STPDSPAKPEKNGHAKDHPKIAKIFEIQT MPNGKTRTSLKTMSRRKLSQQKEKKATQ MLAIVLGVFIICWLPFFITHILNIHDCNIP PVLYSAFTWLGYNVNSAVNPPIYTTFNIEFR KAFLKILHC	
----	---------------------------	-----	--	---

D3	<i>P35462.2</i> (3PBL)	400	>sp P35462.2 DRD3_HUMAN RecName: Full=D(3) dopamine receptor; AltName: Full=Dopamine D3 receptor MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARP HAYYALSICALILAIVFGNGLVCMAYLK ERALQTTTNYLVVSLAVADLLVATLVMP WVVYLEVTGGVWNFSRICCDVFVTLDV MMCTASILNLCAISIDRYTAVVMPVHYQ HGTGQSSCRRVALMITAVWVLAFVSCP LLFGFNTTGDPTVCSISNPDFVIYSSVVSF YLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKRLTR QNSQCNSVRPGFPQQLSPDPAHLELKRY YSICQDTALGGPGFQERGGEKTRN SLSPTIAPKLSLEVRKLSNGRLSTSLKLGP LQPRGVPLREKKATQMVAIVLGAFIVCW LPFFLTHVLNTHCQTCHVSPELYSATTLW GYVNSALNPVIYTTFNIEFRKAFLKILSC	
----	---------------------------	-----	--	---

D4	<i>P21917.3</i> (5WIU)	419	>sp P21917.3 DRD4_HUMAN RecName: Full=D(4) dopamine receptor; AltName: Full=D(2C) dopamine receptor; AltName: Full=Dopamine D4 receptor MGNRSTADADGLLAGRGPAAGASAGAS AGLAGQGAAALVGGVLLIGAVLAGNSL VCVSVATERALQTPTNSFIVSLAAADLLL ALLVLPLFVYSEVQGGAWLLSPRLCDAL MAMDVMLCTASIFNLCAISVDRFVAVAV PLRYNRQGGSRRLQLLIGATWLLSAAVA APVLCGLNDVRGRDPAVCRLEDYVYV YSSVCSFFLPCPLMLLLYWATFRGLQRW EVARRAKLHGRAPRRPSGPGPPSPTPPAP RLPQDPCGPDCAAPPAGLPRGPCGPDCA AAPSLPQDPCGPDCAAPPAGLPPDPCGSN CAPPDVRAAALPPQTPPQTRRRRRRAKIT GRERKAMRVLPVVVGAFLLCWTPFFVV HITQALCPACSVPPRLVSAVTWLGYVNS ALNPVIYTVFNAEFRNVFRKALRACC	
----	---------------------------	-----	--	---

D5	<i>CAA41360.1</i> (P21918)	477	>CAA41360.1 D5 dopamine receptor [Homo sapiens] MLPPGSNGTAYPGQFALYQQLAQGNNAV GGGAGAPPLGPSQVVTACLLTLLIHWTLTLL GNVLVCAAIVRSRHLRANMTNVFIVSLA VSDLFVALLVMPWKAVA EVAGYWPFGA FCDVWVAFDIMCSTASILNLCVISVDRY WAISRPFYKRKMTQRMALVMVGLAWT LSILISFIPVQLNWHRDQAASWGGLDLPN NLANWTPWEEDFWEPDVNAENCSSLN RTYAISSSLISFYIPVAIMIVTYTRIYRIAQV QIRRISSLERAAEHAQSCRSSAACAPDTS RASIKKETKVLKTL SVIMGVFVCCWLPFF ILNCMVPFCSGHPEGPPAGFPCVSETTFD VFVWFGWANSSLN PVIYAFNADFQKVFA QLLGCSHFCSRTPVETVNISNELISYNQDI VFHKEIAAA YIHMM PNAVTPGNREVDND EEEGPFD RMFQIYQTSPDGPVAESVWEL DCEGEISLDKITPFTPNGFH	
----	-------------------------------	-----	---	---

DAT	<i>AAB23443.1</i> (Q01959)	620	>AAB23443.1 dopamine transporter [Homo sapiens] MSKSKCSVGLMSSVVAPAKEPNAVGPKEVEL ILVMEQNGVQLTSSTLTNPRQSPVEAQDRET WGKKIDFLLSVIGFAVDLANVWRFPYLCYKN GGGAFLVPYLLFMVIAGMPLFYMELALGQFN REGAAGVWKICPILKGVGFTVILISLYVGFFY NVIIAWALHYLFSSFTTELPWIHCNNSWNSPN CSDAHPGDSSGDSSGLNDTFGTTPAAEYFERG VLHLHQSHGIDDLGPPRWQLTACLVLVIVLL YFSLWKGVKTSKGKVVWITATMPYVVLTA LLRGVTLPGAIDGIRAYLSVDFYRLCEASVWI DAATQVCFSLGVGFGVLIASFSSYNKFTNNCY RDAIVTTSINCLTSFSSGFVVSFLGYMAQKH SVPIGDVAKDGPGLIFIIYPEAIATLPLSSAWA VVFIMLLTLGIDSAMGGMESVITGLIDEFQLL HRHRELFTLFIVLATFLLSLFCVTNGGIYVFTL LDHFAAGTSILFGVLIEAIGVAWFYGVGQFSD DIQQMTGQRPSLYWRLCWKLVSFCFLLFVVV VSIVTFRPPHYGAYIFPDWANALGWVIATSSM AMVPIYAAYKFCSLPGSFREKLAYAIAPEKDR ELVDRGEVRQFTLRHWLKV	
-----	-------------------------------	-----	--	---

Fonte: Os autores. Tabela construída com dados extraídos do NCBI (2020), PDB (2020), ExPASy (2020) e Proteins Plus (2020).

Visto a diversidade de depósitos no NCBI, utilizaram-se como critérios de escolha o número de resíduos descrito na literatura, a data de criação mais antiga e a completude da sequência da estrutura primária. A criação de critérios de inclusão e exclusão é importante para tornar a análise mais adequada metodologicamente, uma vez que existe uma gama de versões redundantes que podem ser parciais, brutas, preditas, comentadas, mais recentes ou mais antigas.

Os receptores D2, D3 e D4 possuem estruturas proteicas disponíveis no banco de dados de proteínas PDB obtidas a partir do método de difração de raio-X, enquanto os receptores D1 e D5 e o transportador DAT não possuem estruturas cristalografadas, mas somente modelos por homologia no banco de dados de proteínas do ExPasy (Swiss-model) (Tabela 2). No início dos anos 2000, os bancos de dados PDB (BERMAN et al., 2000) e ExPASy (Swiss-model - KOPP; SCHWEDE, 2004; WATERHOUSE et al., 2018) eram os únicos arquivos mundiais de dados estruturais de macromoléculas biológicas e ainda hoje lideram no fornecimento confiável dessas informações.

Considerando a estrutura primária, os receptores possuem em torno de 400 a 477 resíduos de aminoácidos em sua cadeia, enquanto que o transportador possui 620 resíduos de aminoácidos. Quanto ao nível secundário proteico, o arranjo prevalente foi o α -hélice (domínios transmembrana) em todas as estruturas tridimensionais encontradas nos bancos de dados, mas também estão presentes a conformação β e dobra β .

Sítios, motivos e domínios ligantes

As características bioquímicas dos receptores e do transportador de dopamina, como localização da estrutura proteica ao longo da membrana plasmática, considerando as regiões extracelular e citosólica, bem como os sítios, motivos e domínios ligantes, foram mapeados no PDB utilizando o código de acesso próprio deste banco ou do UniProtKB (Figuras 8 e 9).

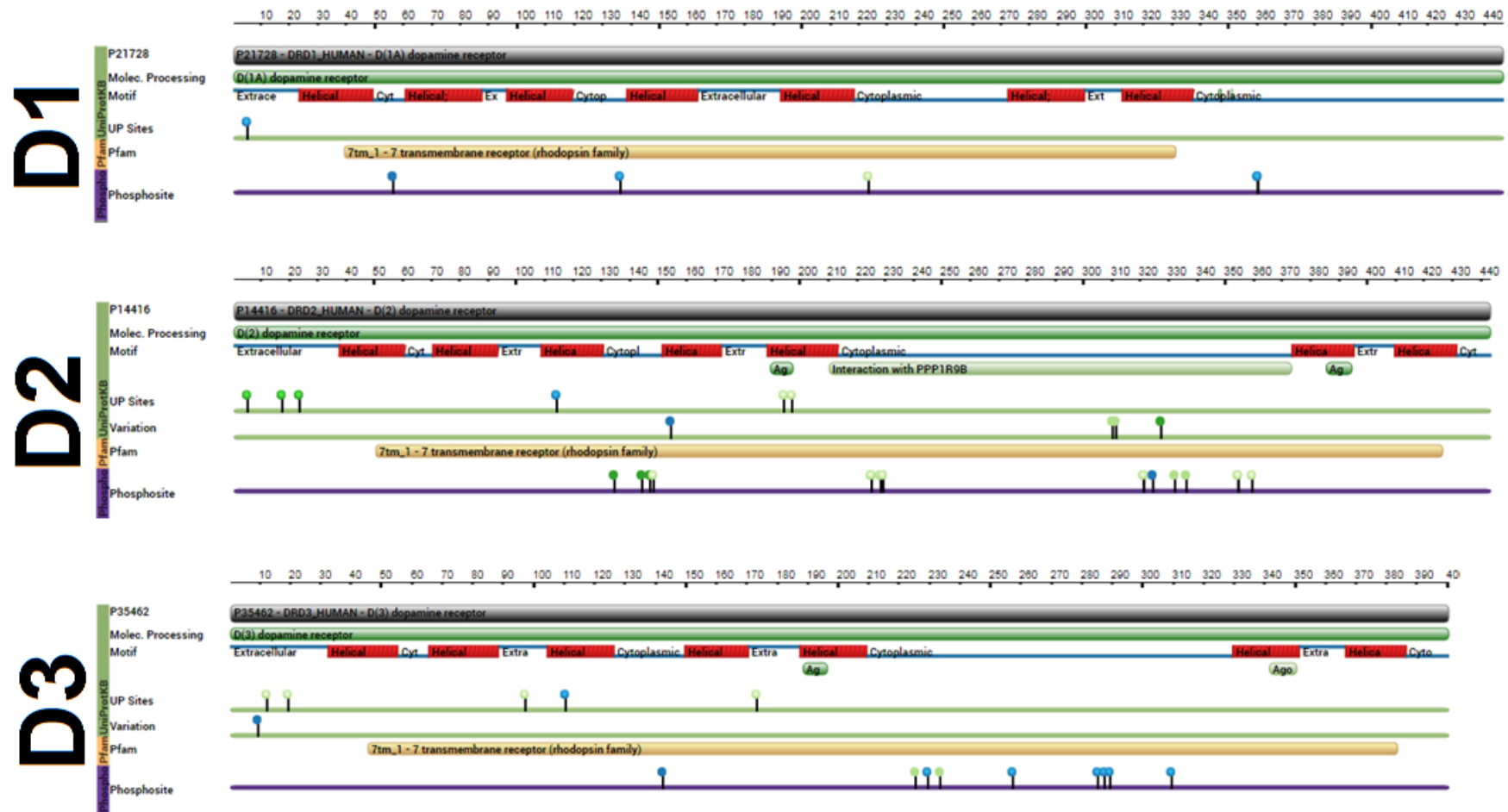


Figura 8 - Mapeamento estrutural de sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores D1, D2 e D3 de *Homo sapiens* obtidos no Protein Data Bank. Os códigos de acesso PDB P21728, P14416 e P35462 são referentes aos receptores D1, D2 e D3, respectivamente. À esquerda estão os nomes dos bancos de dados relacionados aos sítios, motivos e domínios ligantes (UniProtKB, Pfam e Phospho), e a linha acima corresponde à quantidade e localização dos resíduos de aminoácidos.

Fonte: Os autores. Figura construída com dados extraídos do PDB (2019).

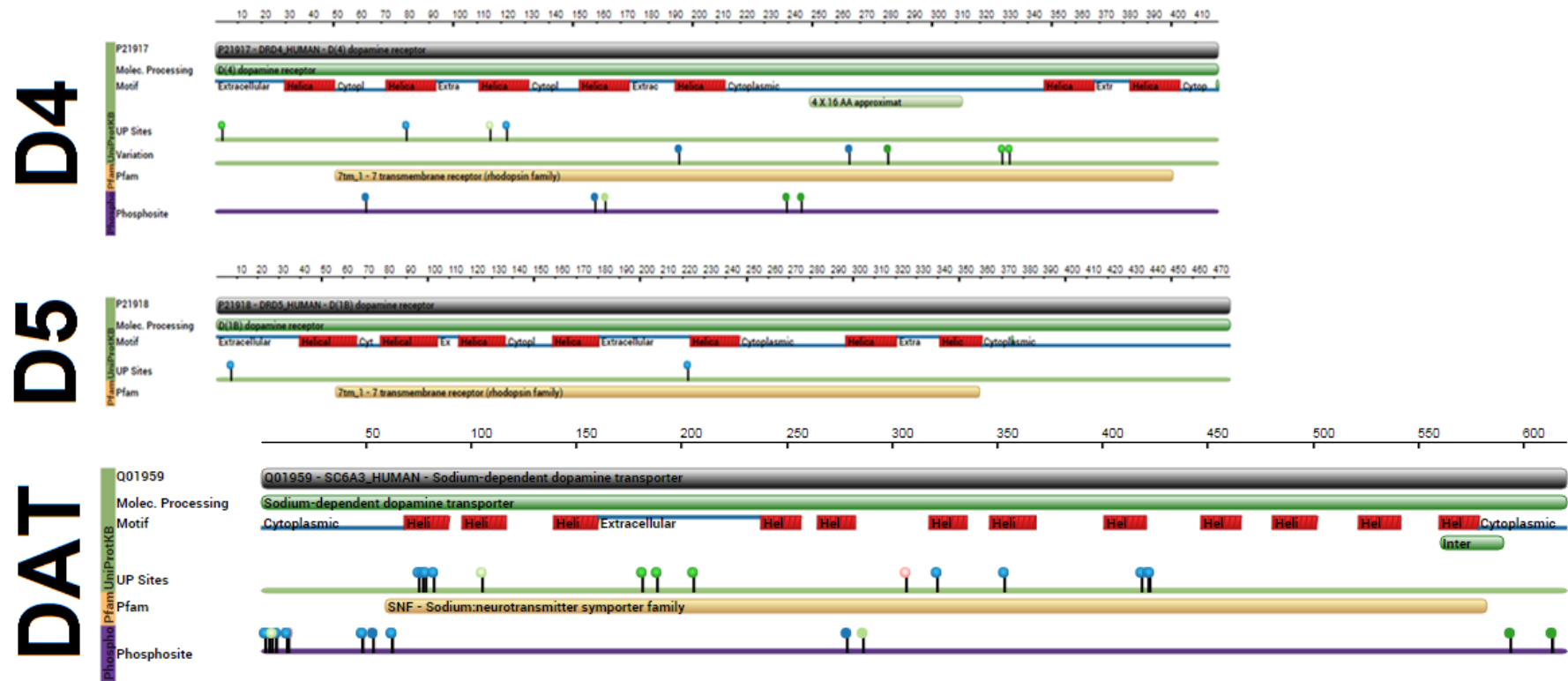


Figura 9 - Mapeamento estrutural de sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores D4 e D5, e do transportador DAT de *Homo sapiens* obtidos no Protein Data Bank. Os códigos de acesso PDB P21917 e P21918 são referentes aos receptores D4 e D5, respectivamente, e do DAT refere-se ao código de acesso PDB Q01959. À esquerda estão os nomes dos bancos de dados relacionados aos sítios, motivos e domínios ligantes (UniProtKB, Pfam e Phospho), e a linha acima corresponde à quantidade e localização dos resíduos de aminoácidos.

Fonte: Os autores. Figura construída com dados extraídos do PDB (2019).

A figura 8 indica o mapeamento estrutural dos receptores D1, D2 e D3, revelando que no receptor D1 há dois sítios de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) nos resíduos 5 e 4, além de quatro sítios de fosforilação, sendo um no resíduo Ser56, dois nos resíduos Thr136 e Thr360 e um no resíduo Lys223.

No receptor D2 há um sítio de interação com PPP1R9B, dois sítios ligantes agonistas, três sítios de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) nos resíduos 5, 17 e 23, dois sítios importantes de ativação nos resíduos de serina 194 e 197, e treze sítios de fosforilação, sendo três nos resíduos de treonina 134, 144 e 225, sete nos resíduos de serina 147, 148, 228, 229, 321, 354 e 359, e três nos resíduos de lisina 324, 332 e 336. No receptor D3 há dois sítios ligantes agonistas, quatro sítios de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) nos resíduos 12, 19, 97 e 173, e nove sítios de fosforilação, sendo três nos resíduos de treonina 142, 225 e 289, e seis nos resíduos de serina 229, 233, 257, 285, 287 e 309.

A figura 9 representa o mapeamento estrutural dos receptores D4 e D5, revelando que no receptor D4 há um sítio de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) no resíduo 3, dois sítios de ligação de íons Na^+ e cinco sítios de fosforilação, sendo um no resíduo Arg63, um no resíduo Thr159 e três nos resíduos de serina 163, 239 e 245. No receptor D5 foram encontrados apenas dois sítios de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) nos resíduos 7 e 222. Por outro lado, para o transportador DAT foram revelados três sítios de N-glicosilação (GlcNAc-asparagina) nos resíduos 181, 188 e 205, um sítio de fosforilação no resíduo Lys5, um no resíduo Tyr593, cinco nos resíduos de treonina 48, 62, 278, 286 e 613, seis nos resíduos de serina 2, 4, 7, 12, 13 e 53. Além disso, no DAT também foram identificados nove sítios de ligação de íon metálico e um sítio de ligação de cocaína de alta afinidade no resíduo. Schmitt; Reith (2010) revelaram a presença dos sítios de glicosilação no segundo *loop* extracelular, sendo críticos para estabilidade e eficiência do transporte. A avaliação de uma mesma sequência em mais de um

banco de dados, estudos com mutantes, dados de transcriptoma e outras ferramentas justificam a apresentação de sítios em diferentes literaturas.

Os domínios e sítios ligantes também foram investigados utilizando como busca a sequência FASTA nos bancos de dados PROSITE e *Calmodulin Target Database*. Os dados foram plotados no quadro 1, considerando a quantidade encontrada em cada receptor como “x”.

Onze tipos de sítios, motivos e domínios ligantes diferentes foram revelados, sendo eles o de N-glicosilação (em maior quantidade no D5, total de cinco); de fosforilação, tanto de caseína quinase II (em maior quantidade em D1 e D5, ambos com total de seis), proteína quinase C (em maior quantidade em D2 e D4, ambos com seis sítios), e de AMPc (em maior quantidade em D2, apresentando quatro sítios); sítios para proteína G (em cada receptor foi encontrado um sítio e nenhum no transportador); sítio simporte de dopamina- Na^+ (encontrado somente em DAT, com três sítios); sítio de amidação e zíper de leucina (ambos somente em DAT e apenas um sítio de cada); de N-miristoilação (em maior quantidade para D4 e D5, com seis sítios em cada); sítio de regiões ricas em prolina (apenas um sítio no receptor D4); e ligante de calmodulina (em maior número em D4, D5 e DAT, ambos com dois sítios). Em suma, o receptor D5 apresenta maior número de sítios ligantes, totalizando 26, seguido do D1 com 21, D2 e D4 com 20, D3 com 17 e DAT com 11.

As modificações pós-traducionais são eventos críticos para a estrutura, função e regulação de receptores e transportadores, incluindo glicosilação, fosforilação, amidação, dentre outras. Quase todos os transportadores são glicosilados, com predominância de N-glicosilação na qual há a adição enzimática de um oligossacarídeo a resíduos de asparagina extracelular (CZUBA et al., 2018). A partir do PDB e PROSITE observa-se a presença de sítios de N-glicosilação de resíduos de asparagina em todos os receptores e transportador de dopamina (Figuras 8 e 9, Quadro 1), porém a extensão da glicosilação e sua influência funcional variam de acordo com o tipo de molécula e o ambiente celular. Dados de Min et al. (2015) indicam que a glicosilação

dos receptores D2 e D3 está envolvida na seleção de vias endocíticas por meio de microdomínios específicos e confirmam que essa modificação pós-traducional é essencial para a expressão e internalização da superfície da própria célula.

De acordo com o mapeamento do PDB nota-se que os receptores D1-like possuem menos sítios, motivos e domínios ligantes comparados com os receptores D2-like (Figuras 8 e 9; Quadro 1). Apesar do mapeamento do PDB não revelar sítios de fosforilação para o D5 (Figura 9), os bancos de dados PROSITE e *Calmodulin Target Database* (Quadro 1) indicam que este receptor dopaminérgico apresenta a maior quantidade de sítios, motivos e domínios ligantes.

Entre os D2-like, o receptor D2 destaca-se com maior número de sítios de fosforilação, o que pode estar relacionado ao fato deste receptor de dopamina apresentar mais funções, em quantidade e em diversidade, estando presente em diferentes vias na cascata de sinapse dopaminérgica, como por exemplo, participando como receptor pré-sináptico, como receptor pós-sináptico, além de atuar como autoreceptor no neurônio pré-sináptico (Figura 4).

A ausência de sítios de fosforilação para AMPc e de receptor para proteína G em DAT (Quadro 1) pode ser justificada pelo fato dos transportadores de monoaminas, como o DAT, serem fosfoproteínas e não necessitarem de um segundo mensageiro para sua sinalização, portanto não se acoplam às proteínas G nem modificam os níveis de AMPc, mas translocam ativamente a dopamina extracelular com o simporte de íons Na^+ . Ainda, assim como os receptores, o DAT também participa de vias de fosforilação, como a da PKA, PKC, ERK, Akt e IP3 (FOSTER E VAUGHAN, 2016).

Outra particularidade do DAT é a presença de sítios simporte dopamina- Na^+ , de amidação e zíper de leucina (Quadro 1). A presença do sítio simportador de neurotransmissor- Na^+ caracteriza o DAT como um transportador que utiliza o gradiente de íons Cl^- e Na^+ ao longo da membrana plasmática para fornecer força motriz para o transporte de dopamina (RUDNICK; CLARK, 1993), como esquematizado na figura 7.

Quadro 1 - Sítios, motivos e domínios ligantes dos receptores (D1, D2, D3, D4 e D5) e transportador de dopamina (DAT)

Sítios, motivos e domínios	D1	D2	D3	D4	D5	DAT
ASN_glicosilação	xxx	xxx	xxxx	x	xxxxx	x
Fosforilação para caseína quinase II	xxxxxx	xxxx	x	xx	xxxxxx	x
Fosforilação para proteína quinase C	xxxx	xxxxxx	xxx	xxxxxx	xxxx	x
Fosforilação para AMPc	xx	xxxx	xx	x	xx	-
Receptor para proteína G	x	x	x	x	x	-
Simporte dopamina-Na ⁺	-	-	-	-	-	xxx
Zíper de leucina	-	-	-	-	-	x
Amidação	-	-	-	-	-	x
Miristoilação	xxxx	x	xxxxx	xxxxxx	xxxxxx	x
Regiões ricas em prolina	-	-	-	x	-	-
Potencial ligante de calmodulina	x	x	x	xx	xx	xx
TOTAL	21	20	17	20	26	11

Fonte: Os autores. Quadro construído com dados extraídos do PROSITE e Calmodulin Target Database (2019).

Poucos são os estudos que tratam do tema amidação no contexto estrutural de transportadores, entretanto sabe-se que a presença de tal modificação é indispensável para a transdução do sinal e reconhecimento de um receptor, sendo também responsável por ancorar peptídeos e proteínas à membrana celular (VIRÁG et al., 2020). Além disso, sabe-se que a amidação garante proteção à degradação proteolítica e às mudanças no pH fisiológico, além de maior afinidade de ligação e sinalização aprimorada (KUMAR; EIPPER; MAINS, 2014).

Por outro lado, os zíperes de leucina são reguladores de transcrição em eucariotos, caracterizados pela presença de leucina a cada seis resíduos de aminoácidos, sugerindo a formação de uma super hélice de alfa-hélices, com possível função de mediar as interações proteína-proteína (ALBER, 1992). Em DAT, Torres et al. (2003) revelou que o zíper de leucina é um domínio importante que contribui potencialmente para a estrutura do transportador, sendo crucial para o seu adequado funcionamento.

O sítio de miristoilação foi identificado em todos os receptores e também transportador de dopamina (Quadro 1). A miristoilação é um processo irreversível no qual o ácido mirístico, um ácido graxo saturado de 14 carbonos, se liga à proteína de membrana através de ligação amida com o grupamento amino da glicina amino-terminal (UDENWOBELE et al., 2017), tendo como função estrutural a estabilização da conformação proteica, neste caso do receptor e do transportador de dopamina. Quando a miristoilação é suprimida por mutação, por exemplo, ocorre a diminuição ou perda de ligação à membrana (RESH, 1999).

Diferentemente dos outros receptores, bem como do transportador de dopamina, no D4 foram encontrados sítios ricos em prolina, com várias repetições em *tandem* e extensão considerável (Figura 9 e Quadro 1). A função das regiões ricas em prolina ainda não está totalmente esclarecida, apesar de haver indicação de que estes sítios estejam envolvidos na ancoragem e reconhecimento de módulos de sinalização (ZARRINPAR; BHATTACHARYYA; LIM, 2003). No caso do receptor D4, o sítio rico em prolina foi

demonstrado *in vitro* servindo como potencial ligante para várias proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal contendo domínio SH3, também chamado de domínio de homologia com Src 3 (OLDENHOF et al., 1998). Segundo Woods (2010), dentre os receptores ligantes de proteína G, o sítio rico de prolina é exclusivo do D4, desempenhando papel importante na interação com outros receptores.

Outro sítio ligante importante é o do complexo cálcio/calmodulina, que interage e regula várias enzimas e proteínas-alvo. A calmodulina é um sensor de íons cálcio onipresente que pode regular várias enzimas envolvidas na sinalização de GPCR, se ligando ao D2 e D4, promovendo importante sinalização e dessensibilização dos receptores (NEVE; SEAMANS; TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). Observa-se no quadro 1 que os receptores D4 e D5 e o transportador DAT possuem mais sítios de calmodulina comparados com os outros receptores dopaminérgicos. Em relação à neurotransmissão, a calmodulina tem um papel regulador importante, permitindo o aumento e diminuição do transporte de dopamina pelo DAT, por exemplo, por meio da mudança de concentração intracelular de cálcio, responsável pela exocitose. Dados de Padmanabhan, Lambert e Prasad (2008) sugerem que a atividade neuronal pode regular a função do DAT e a via de sinalização do complexo cálcio/calmodulina por meio da CaMKII (ver Figura 4). Essa regulação poderia ser estendida ao D4 e D5, uma vez que a cascata de sinalização destes receptores dopaminérgicos pode ser direcionada para a via de ativação da PLC a partir do influxo de íons Ca^{2+} , os quais se ligam à calmodulina, promovendo a modulação por interação proteína-proteína.

Localização celular

A localização celular dos receptores e transportador de dopamina foi revelada pelo software PSORT como consta na tabela 3, sendo preferencialmente encontrados na membrana plasmática e no retículo endoplasmático, o que já era esperado, uma vez que a literatura

restringe a permanência destas moléculas nestes locais. É importante notar que os receptores D2 e D4, ao contrário das outras moléculas investigadas, foram predominantemente localizados no retículo endoplasmático, considerando sua sequência FASTA nas análises.

Experimentos realizados por Prou et al. (2001) mostraram que o receptor D2 fica retido no retículo endoplasmático por um processo acompanhado de vacuolização desta organela. Este fenômeno parece ser resultado da sua alta atividade intrínseca, promovendo a ativação da proteína G heterotrimérica dentro da via secretora, contribuindo para a regulação do tráfego intracelular das isoformas do receptor D2 (CALLIER et al., 2003). Rondou et al. (2010) sugerem que o receptor D4 interage com a proteína KLHL12 no ER e na membrana plasmática.

Tabela 3 - Localização celular dos receptores (D1, 2, D3, D4 e D5) e transportador (DAT) de dopamina com base na sequência FASTA

Receptores/Transportador	Localização celular	
	Membrana plasmática	Retículo endoplasmático
D1	43,5%	34,8%
D2	33,3%	55,6%
D3	56,5%	26,1%
D4	33,3%	55,6%
D5	56,5%	17,4%
DAT	73,9 %	13,0%

Fonte: Os autores. Tabela construída com dados extraídos do PSORT (2020).

Outras vias metabólicas

A busca dos receptores D1, D2, D3, D4 e D5, e do transportador DAT no KEGG resultou nos códigos de acesso K04144, K04145, K04146, K04147, K05840 e K05036, respectivamente.

O quadro 2 indica a participação dos receptores e do transportador de dopamina em diversas vias metabólicas depositadas no KEGG, incluindo as relacionadas à função de sinapse

e transdução de sinal (ou seja, sinapse dopaminérgica, ciclo da vesícula sináptica, interação ligante-receptor neuroativo, junção GAP, sinalização de AMPc, sinalização de cálcio e sinalização da Rap1), à doença de Parkinson, e as vias ligadas à dependência de drogas (álcool, anfetamina, cocaína e morfina). Em destaque, o receptor D1 está presente em dez das doze vias (exceto na via de sinalização da Rap1 e no ciclo da vesícula sináptica), enquanto os receptores D3 e D4 participam em apenas duas vias, ambos na de sinapse dopaminérgica (Figura 4) e na de interação com receptor ligante neuroativo (Figura 10), sendo estas as únicas vias que apresentam participação de todos os receptores dopaminérgicos, segundo o KEGG.

Quadro 2 – Participação dos receptores (D1, D2, D3, D4 e D5) e transportador (DAT) de dopamina em vias metabólicas

Vias metabólicas (KEGG ID)	D1	D2	D3	D4	D5	DAT
Sinapse dopaminérgica (KEGG ID: 4728)	x	x	x	x	x	x
Ciclo da vesícula sináptica (KEGG ID: 4721)						x
Doença de Parkinson (KEGG ID: 5012)	x	x				x
Interação com receptor-ligante neuroativo (KEGG ID: 4080)	x	x	x	x	x	
Junção Gap (KEGG ID: 4540)	x	x				
Sinalização de AMPc (KEGG ID: 4024)	x	x			x	
Sinalização de cálcio (KEGG ID: 4020)	x				x	
Sinalização da Rap1 (KEGG ID: 4015)		x				
Vício em álcool (KEGG ID: 5034)	x	x				x
Vício em anfetamina (KEGG ID: 5031)	x					x
Vício em cocaína (KEGG ID: 5030)	x	x				x
Vício em morfina (KEGG ID: 5032)	x					

Fonte: Os autores. Quadro construído com dados extraídos do KEGG (KANEHISA et al., 2000).

A via de interação receptor-ligante neuroativo é uma categoria de anotação estrutural e funcional do KEGG que inclui diferentes subclasses, sendo uma delas a dos receptores acoplados à proteína G, na qual fazem parte os receptores de dopamina (Figura 10).

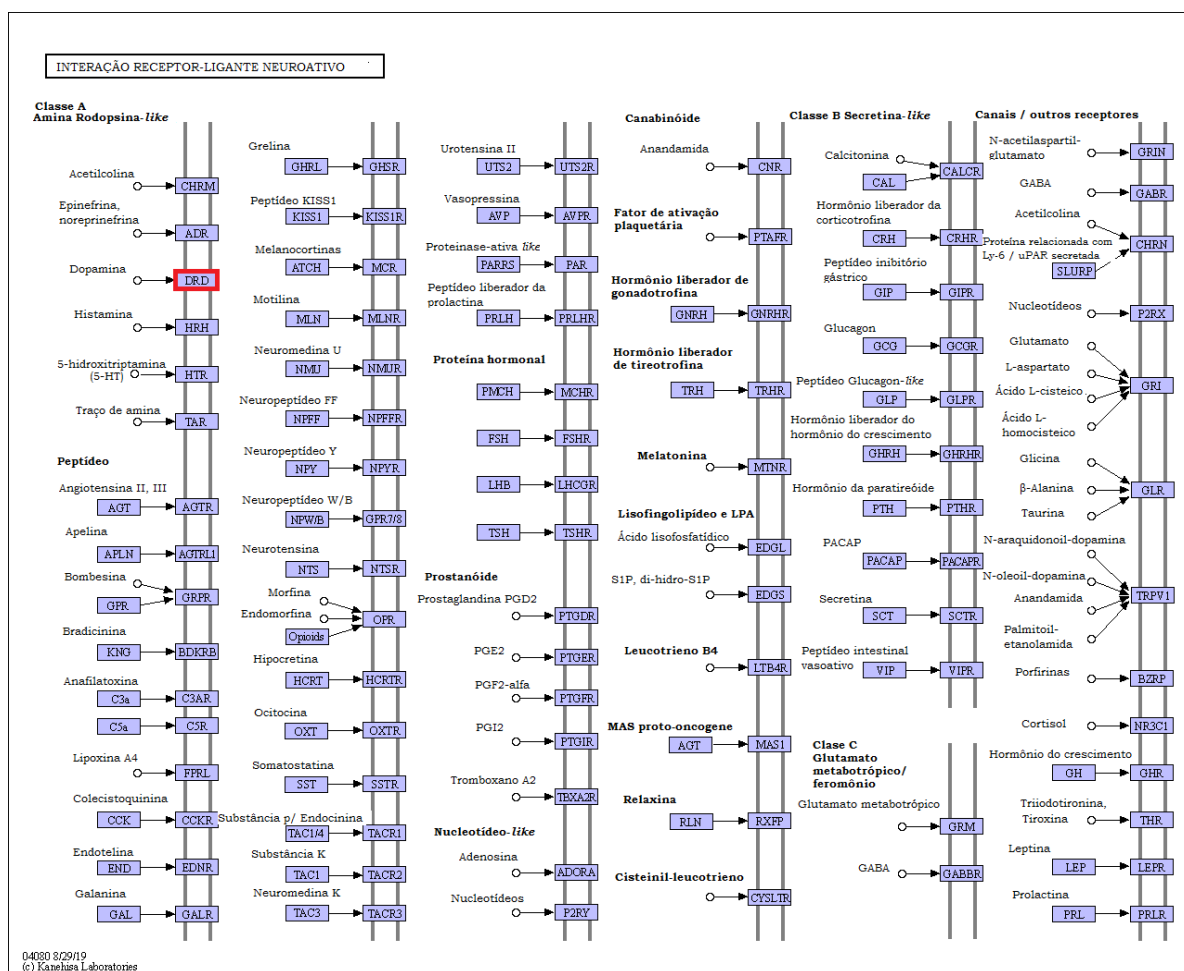


Figura 10 - Via de interação do receptor-ligante neuroativo com participação dos receptores dopaminérgicos (DRD - assinalado em vermelho).

Fonte: Adaptada de KEGG (2020c).

Similaridade entre as sequências dos receptores e transportador dopaminérgicos de humanos e de outros organismos

O alinhamento local de todos os receptores e do transportador de dopamina foi realizado e observou-se maior identidade da sequência de *Homo sapiens* com a dos organismos *Bos taurus* e *Rattus norvegicus*. Os dados de e-value e % de identidade, código de acesso nos bancos

de dados, bem como a espécie analisada estão detalhados nas tabelas 4 a 9. Os organismos *Caenorhabditis elegans*, *Crocodylus porosus*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus* e *Xenopus laevis* também revelaram identidade com a sequência de *Homo sapiens*, porém seus valores de identidade foram $\leq 86,29\%$.

O distinto perfil de identidade dos receptores de dopamina entre os organismos analisados sugere que pode ter havido ortologia; isto é, uma série de eventos de diferenciação gradual em genes homólogos duplicados de um ancestral comum dos receptores ao decorrer da evolução, entretanto eles continuam tendo suas funções correspondentes. Isso porque, a função dos receptores e do transportador de dopamina no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados já está bem estabelecida e a literatura amplamente descreve suas relações evolutivas interespecíficas. A relação dos receptores dopaminérgicos entre os vertebrados e invertebrados é tão distante que a classificação se distingue em três grupos nos invertebrados, os quais são DOP1, DOP3 (semelhantes ao D1-like e D2-like de humano, respectivamente) e INDR (*Invertebrate dopamine receptors*) (MUSTARD; BEGGS; MERCER, 2005; TROPPEMANN et al., 2014).

Tabela 4 - Identidade do alinhamento da sequência do receptor de dopamina D1 de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0,0	100,0	NP_000785.1
<i>Bos taurus</i> (boi)	0,0	94,39	NP_776467.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	0,0	91,20	NP_036678.3
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	0,0	82,67	XP_019390515.1
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	0,0	81,56	NP_001138320.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	0,0	80,44	XP_018110186.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	0,0	73,62	NP_001129448.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	9e-74	40,43	AAA85716.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	1e-63	37,78	NP_001024578.1

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2019).

Atualmente sugere-se que os receptores de amina biogênica (como os da dopamina) provavelmente tenham surgido previamente à radiação de cnidários e que a divergência D1 ou D2 do ancestral aconteceu antes da separação de platelmintos (CHEN et al., 2017).

Vincent et al. (1998) afirmam que as vias neurais catecolaminérgicas em vertebrados foram recrutadas em meio a crescente demanda de informações mediando funções psicomotoras e a evolução de tais eventos foi estimulada pela força de duplicações gênicas na radiação de cefalocordados/vertebrados. Durante a evolução dos vertebrados, destacam-se duas etapas de duplicação dos genes dos receptores dopaminérgicos, primeiramente em animais da classe Agnatha (peixes sem mandíbula) e depois no surgimento de peixes cartilaginosos. Com isso, surgiram três subtipos de receptores *D1-like* (D1A, D1B ou D5 e D1C) em todos os gnátostomados (vertebrados com mandíbula), exceto para os mamíferos eutérios (placentários) nos quais são encontrados somente D1A e D1B, e em arcossauros (pássaros) no quais surge um quarto subtipo, o D1D (KAPSIMALI et al., 2000).

A classificação dos receptores de vertebrados, como se conhece atualmente, foi construída com base nos dados obtidos desde peixes e outros organismos até chegar em *Homo sapiens*. No ancestral comum de Osteichthyes vertebrados com mandíbula havia quatro subtipos de *D1-like* e cinco subtipos de *D2-like*. Secundariamente foi perdido quase a metade destes genes ancestrais em mamíferos, mas muitos foram mantidos em espécies de não mamíferos (YAMAMOTO et al., 2015).

Os vertebrados mais basais (como lampreias e *hagfish*) apresentam apenas um tipo de receptor *D1-like*, pois descendem dos primeiros vertebrados divergentes. É provável que eles tenham divergido do ancestral do receptor D1 de vertebrado, antes mesmo da duplicação de genes, que depois viria a gerar os subtipos de receptores de dopamina tal qual é encontrado atualmente em vertebrados (CALLIER et al., 2003). Curiosamente foram encontrados dois

tipos de receptores, tanto de INDR quanto de vertebrado (*D1-like*) em anfioxo, mostrando similaridades estruturais e farmacológicas aos dois receptores (BURMAN; EVANS, 2010).

Evolutivamente é possível notar que de Chondrichthyes (peixes cartilaginosos) a Amphibia (anfíbios) existem três subtipos de *D1-like* (D1A, D1B e D1C) e em Osteichthyes (peixes ósseos) encontra-se uma sequência extra de D1R resultado de uma duplicação gênica (CALLIER et al., 2003). Em Archosauria, que incluem aves e crocodilos, foi isolada uma quarta sequência de *D1-like* denominada D1D, também encontrada em Lepidossauros (lagartos e cobras). Surpreendentemente também foi encontrada sequência de D1D juntamente com D1A em mamíferos prototérios (ornitorrinco e equidnas) (CALLIER et al., 2003; HAUG-BALTZELL et al., 2015).

Tabela 5 - Identidade do alinhamento da sequência do receptor de dopamina D2 de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0,0	100,0	NP_057658.2
<i>Bos taurus</i> (boi)	0,0	95,66	XP_006243041.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	0,0	89,16	XP_005215857.1
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	0,0	82,30	XP_019402679.1
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	0,0	80,00	XP_015153517.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	0,0	71,33	XP_018079742.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	0,0	69,44	XP_009289892.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	9e-84	38,28	AAN15957.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	2e-64	33,83	NP_001024568.1

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2019).

Presume-se que quatro subtipos diferentes de receptores existiam na linhagem de amniotas. Em mamíferos prototérios houve o desaparecimento de D1B e D1C, e no restante dos mamíferos houve a perda de D1C e D1D. Contudo, os mamíferos são uma exceção entre os vertebrados, tendo em vista que o receptor D1C, que é ausente nos mamíferos, está presente em todos os grupos de gnathostomata e o subtipo D1D é encontrado em todos os amniotas,

exceto na subclasse Theria (mamíferos placentários e marsupiais) (CALLIER et al., 2003; HAUG-BALTZELL et al., 2015).

Para rã *X. laevis* não foi encontrado nenhum depósito de sequência similar ao receptor D3 de humano (Tabela 6), estando presentes somente os receptores D1A, D1B e D1C da classe D1-like (SUGAMORI et al., 1994), e D2 (Tabela 5) e D4 (Tabela 7) da classe D2-like, apesar de Jensen et al. (1997) imunodetectarem anticorpo de roedor em oócitos de *X. laevis*. Cabe destacar a escassez de estudos sobre os receptores D2-like em *X. laevis* e o fato do sistema receptor deste organismo possuir características tanto dos D2R quanto dos receptores alfa-adrenérgicos evidenciando suas diferenças funcionais (VERBURG-VAN-KEMENADE et al., 1986).

Tabela 6 - Identidade do alinhamento da sequência do receptor de dopamina D3 de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0,0	100,0	NP_057658.2
<i>Bos taurus</i> (boi)	0,0	95,66	XP_006243041.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	0,0	89,16	XP_005215857.1
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	0,0	82,30	XP_019402679.1
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	0,0	80,00	XP_015153517.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	0,0	71,33	XP_018079742.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	0,0	69,44	XP_009289892.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	9e-84	38,28	AAN15957.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	2e-64	33,83	NP_001024568.1

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2019).

De acordo com a tabela 6, existe uma maior identidade do receptor D3 humano com nematódeo (*C. elegans*) do que com inseto (*D. melanogaster*), sendo encontrada uma sequência de resíduos de aminoácidos que codifica um receptor D3 de dopamina em *C. elegans* (NP_001033560.1), enquanto que para *D. melanogaster* a sequência de D3 se alinhou somente

com um receptor *D2-like* genérico da espécie (AAN15957.1), sendo o único subtipo relatado na literatura para *D. melanogaster* (CHEN et al., 2017).

Em *D. melanogaster* foi demonstrado por meio de análises genéticas e farmacológicas a importância da neurotransmissão dopaminérgica na excitação (ANDRETIC; VAN SWINDEREN; GREENSPAN, 2005), na percepção da luz e ciclo circadiano (HIRSH et al., 2010), dentre outros (NECKAMEYER, 1996).

Na tabela 7 é possível constatar que o receptor D4 possui maior identidade com mamíferos do que com outros táxons, ainda que seja menor quando comparada com outros receptores. Com isso, sugere-se que os receptores D4 de mamíferos, em geral, tenham mais semelhança estrutural entre eles. Em análises filogenéticas entre os receptores *D2-like*, D2 e D3 formam um clado independente do D4 (CHEN et al., 2017). Quando verificado em KEGG (2020), o receptor D4 pode ser encontrado em *H. sapiens*, *B. taurus*, *D. rerio*, *G. gallus*, *R. norvegicus* e *X. laevis*.

Tabela 7 - Identidade do alinhamento da sequência do receptor de dopamina D4 de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0,0	100,0	NP_000788.2
<i>Bos taurus</i> (boi)	3e-166	73,03	XP_024843396.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	1e-159	73,03	P30729.2
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	2e-127	55,64	BAP27921.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	1e-127	54,31	XP_018115563.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	1e-137	53,10	NP_001012636.1
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	8e-128	52,49	XP_019402854.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	4e-78	37,30	AAN15957.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	3e-51	29,15	NP_508238.2

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2019).

Quanto ao receptor de dopamina D5 (tabela 8), *C. elegans* não apresentou nenhuma identidade com a sequência de humano. Isto se deve ao fato desta espécie ser um invertebrado

e apresentar receptores de dopamina análogos, como Dop1, Dop2, Dop3, Dop4, Dop5 e Dop6 que são encontrados somente em invertebrados e possuem origem cromossômica diferente, porém com a mesma função que os receptores em *H. sapiens*. Além disso, o gene DRD5 que codifica o receptor D5 surgiu mais tarde somente em vertebrados (CHEN et al., 2017).

Tabela 8 - Identidade do alinhamento da sequência do receptor de dopamina D5 de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0,0	100,0	AAA52329.1
<i>Bos taurus</i> (boi)	0,0	84,13	NP_001193558.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	0,0	82,60	EDL99998.1
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	0,0	71,95	XP_019408115.1
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	0,0	70,29	XP_015141299.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	0,0	67,39	XP_018098149.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	1e-175	59,22	XP_005158584.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	2e-72	38,19	AAA85716.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	-	-	-

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2019).

Analisando a tabela 9, é possível perceber que o transportador de dopamina humano possui mais identidade com peixes e anfíbios do que com aves e répteis, apontando possivelmente que a composição proteica seja altamente conservada evolutivamente, refletindo que a neurotransmissão por dopamina seja um antigo mecanismo de sinalização (SHUMAY; FOWLER; VOLKOW, 2010). Vale ressaltar que os *hits* de *G. gallus* e *C. porosus* se deram por outro transportador de monoamina, o de noradrenalina, diferente dos *hits* de *D. rerio* e *X. laevis* que são de dopamina. Isso pode ser justificado pela alta similaridade existente entre os transportadores de monoaminas (BRÖER; GETHER, 2012).

Tabela 9 - Identidade do alinhamento da sequência do transportador de dopamina de *Homo sapiens* com outras espécies

Espécies (nome popular)	E-value	Identidade (%)	Acesso
<i>Homo sapiens</i> (homem)	0.0	100,0	AAB23443.1
<i>Rattus norvegicus</i> (rato-castanho)	0.0	93,20	NP_036826.1
<i>Bos taurus</i> (boi)	0.0	86,61	XP_024837318.1
<i>Xenopus laevis</i> (rã)	0.0	82,26	XP_018124894.1
<i>Danio rerio</i> (peixe-zebra)	0.0	80,13	NP_571830.1
<i>Gallus gallus</i> (galo-banquiva)	0.0	69,11	XP_015147836.2
<i>Crocodylus porosus</i> (crocodilo)	0.0	68,94	XP_019391240.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-das-frutas)	0.0	55,17	4XPB_A
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	0.0	46,63	NP_499043.1

Fonte: Os autores. Tabela construída a partir de dados obtidos no Blastp/NCBI (2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando todos os dados levantados a partir de ferramentas de bioinformática e a revisão da literatura especializada, conclui-se que os receptores de dopamina pertencem à superfamília de proteínas acopladas à proteína G, enquanto o transportador de dopamina é membro da família *SLC6* de carreadores de soluto. Ambos apresentam diferenças genéticas e bioquímicas entre eles, incluindo número de resíduos de nucleotídeos e aminoácidos, quantidade intrônica, localização cromossomal e estrutura protéica.

Enquanto os receptores podem ser encontrados no retículo endoplasmático e na membrana plasmática dos neurônios pré- e pós-sinápticos, podendo estar acoplados positiva (*D1-like*) ou negativamente (*D2-like*) à adenilato ciclase, o transportador de dopamina está localizado nas duas regiões celulares, mas atua diretamente na recaptação do neurotransmissor extraneuronal para os neurônios pré-sinápticos.

Tanto os receptores quanto o transportador de dopamina possuem uma gama de sítios, motivos e domínios ligantes, seja de glicosilação, fosforilação e miristoilação, quanto de calmodulina, importantes para a função sináptica e de transdução de sinal, na doença de Parkinson e nas vias ligadas à dependência de drogas.

Em humanos, assim como em outros vertebrados, os receptores de dopamina se distinguem dos presentes nos invertebrados, indicando uma possível duplicação dos genes no ancestral de vertebrados, bem como a existência de genes de origem distinta, mas com a mesma função. Em invertebrados, os receptores dopaminérgicos apresentam importante função com efeitos fisiológicos e, apesar de ter havido um *hit* alinhamento de cada um dos receptores com as espécies analisadas, não se pode afirmar que exista um receptor correspondente, mas um *subject* com certo grau de similaridade, podendo ser inclusive outra proteína da mesma família. Além disso, os dados revelados apontam que a sequência do transportador de dopamina é

altamente conservado, indicando que a neurotransmissão seja um antigo mecanismo de sinalização.

Contudo, apesar da riqueza de informações levantadas, ainda são poucos os estudos com receptores e transportador de dopamina em certos organismos, indicando a necessidade de pesquisas acerca do tema, inclusive que relacionem a pesquisa básica com a aplicada, revelando a associação de aspectos biológicos e fisiológicos com sinais e sintomas de doenças e vícios.

REFERÊNCIAS

- ALBER, T. Structure of the leucine zipper. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, p. 205–210, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80275-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80275-8).
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- ANDRETIC, R.; VAN SWINDEREN, B.; GREENSPAN, R.J. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 15, p. 1165–1175, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.025>.
- BEAULIEU, J. M.; ESPINOZA, S.; GAINETDINOV, R. R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 1-23, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.12906>.
- BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- BJÖRKLUND, A; DUNNETT, S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194-202, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>.
- BLASTp - Basic Local Alignment Search Tool (protein). Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- BRÖER, S.; GETHER, U. The solute carrier 6 family of transporters. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 256-278, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01975.x>.

- BUCHAN, D.W.A.; JONES, D.T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W402-W407, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>.
- BURMAN, C.; EVANS, P.D. Amphioxus expresses both vertebrate-type and invertebrate-type dopamine D1 receptors. **Invertebrate Neuroscience**, v. 10, p. 93-105, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10158-010-0111-0>.
- CALLIER, S.; SNAPYAN, M.; LE CROM, S.; PROU, D.; VINCENT, J.; VERNIER, P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 7, p. 489-502, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00089-3).
- CHEN, P.; CHEN, P.; LI, T.; SHEN, Q.; YAN, D.; ZHANG, L.; CHEN, X.; LI, Y.; ZHAO, W. Two dopamine D2-like receptor genes from the silkworm (*Bombyx mori*) and their evolutionary history in metazoan. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07055-5>.
- CZUBA, L.C.; HILLGREN, K.M.; SWAAN, P.W. Post-translational modifications of transporters. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 192, p. 88-99, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.013>.
- DE CASTRO, E.; SIGRIST, C.J.A.; GATTIKER, A.; BULLIARD, V.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; HULO, N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 34, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>.
- DRUGBANK. **Dopamine**. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00988>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- EMMONS, H.; KRANZ, R. **A química da alegria: como superar a depressão através da ciência ocidental e da sabedoria oriental**. São Paulo: Editora Gente, 2007.

EXPASY - SIB Bioinformatics Resource Portal. Disponível em: <https://www.expasy.org/>.

Acesso em: 15 jul. 2020.

FOSTER, J.D.; VAUGHAN, R.A. Phosphorylation mechanisms in dopamine transporter regulation. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 83-84, p. 10-18, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.10.004>.

HASTINGS, J.; OWEN, G; DEKKER, A; ENNIS, M.; KALE, N.; MUTHUKRISHNAN, V.; TURNER, S.; SWAINSTON, N.; MENDES, P. CHRISTOPH STEINBECK. ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1214–D1219, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>.

HAUG-BALTZELL, A.; JARVIS, E.D.; MCCARTHY, F.M.; LYONS, E. Identification of dopamine receptors across the extant avian family tree and analysis with other clades uncovers a polyploid expansion among vertebrates. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 361, p. 1-16, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00361>.

HIRSH, J.; RIEMENSPERGER, T.; COULOM, H.; ICHÉ, M.; COUPAR, J.; BIRMAN, S. Roles of dopamine in circadian rhythmicity and extreme light sensitivity of circadian entrainment. **Current Biology**, v. 20, p. 209-214, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.037>.

HMDB - Human Metabolome Database. **Dopamine**. Disponível em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000073>. Acesso em: 15 jul. 2020.

JENSEN, B. S.; LEVAVI-SIVAN, B.; FISHBURN, C.S.; FUCHS, S. Functional expression of the murine D2, D3, and D4 dopamine receptors in *Xenopus laevis* oocytes. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 420, n. 2-3, p. 191-195, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01505-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01505-6).

- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 27-30, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- KAPSIMALI, M.; DUMOND, H.; LE CROM, S.; COUDOUCEL, S.; VINCENT, J.; VERNIER, P. Evolution et développement des systèmes neuromodulateurs dopaminergiques chez les Vertébrés [Evolution and development of dopaminergic neurotransmitter systems in vertebrates]. **Journal de la Société de Biologie**, v. 194, n. 2, p. 87-93, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1051/jbio/2000194020087>.
- KARAM, C.S.; JAVITCH, J.A. Phosphorylation of the amino terminus of the dopamine transporter: regulatory mechanisms and implications for amphetamine action. **Advances in Pharmacology**, p. 205-234, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.002>.
- KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Tyrosine metabolism**. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00350+M00042. Acesso em: 10 out. 2020a.
- KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Dopaminergic synapse**. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04728+1816. Acesso em: 15 jul. 2020b.
- KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Neuroactive ligand-receptor interaction**. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map04080. Acesso em: 10 out. 2020c.
- KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. D230–D234, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh008>.
- KRISTENSEN, A.S.; ANDERSEN, J.; JØRGENSEN, T.N.; SØRENSEN, L.; ERIKSEN, J.; LOLAND, C.J.; STRØMGAARD, K.; GETHER, U. SLC6 neurotransmitter transporters:

- structure, function, and regulation. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 3, p. 585-640, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>.
- KUMAR, D.; EIPPER, B. A.; MAINS, R. E. Amidation. **Reference Module in Biomedical Sciences. Encyclopedia of Endocrine Diseases**, p. 188-191, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04040-X>.
- MIN, C.; ZHENG, M.; ZHANG, X.; GUO, S.; KWON, K.; SHIN, C.Y.; KIM, H.; CHEOND, S.H.; KIM, K. N-linked glycosylation on the N-terminus of the dopamine D2 and D3 receptors determines receptor association with specific microdomains in the plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1853, n. 1, p. 41-51, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.024>.
- MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>.
- MUSTARD, J.A.; BEGGS, K.T.; MERCER, A.R. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 59, n. 3, p. 103-117, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.20065>.
- NAGAI, T. et al. Phosphoproteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo. **Neuron**, v. 89, p. 550-65, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.019>.
- NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 34-35, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01336-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01336-X).
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 jul. 2020.

- NECKAMEYER, W.S. Multiple roles for dopamine in *Drosophila* development. **Developmental Biology**, v. 176, p. 209-219, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0128>.
- NEVE, K.A.; SEAMANS, J. K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine Receptor Signaling. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 24, n. 3, p. 165-205, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1081/RRS-200029981>.
- OLDENHOF J, VICKERY R, ANAFI M.; OAK, J.; RAY, A.; SCHOOTS, O.; PAWSON, T.; ZASTROW, M.V.; VAN TOL, H.H.M. SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. **Biochemistry**, v. 37, n. 45, p. 15726-15736. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi981634+>.
- PADMANABHAN, S.; LAMBERT, N.A.; PRASAD, B.M. Activity-dependent regulation of the dopamine transporter is mediated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase signaling. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 2017-2027, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06496.x>.
- PDB - Protein Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- PROTEINS PLUS. Disponível em: <https://proteins.plus/>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- PROU, D; GU, W; CROM S, L; VINCENT, J; SALAMERO, J; VERNIER, P. Intracellular retention of the two isoforms of the D2 dopamine receptor promotes endoplasmic reticulum disruption. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3517-3527, 2001.
- RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine receptors and neurodegeneration. **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 349–368, 2015. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0330>.
- RESH, M.D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1451, n. 1, p. 1-16, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00075-0).

- RONDOU, P.; SKIETERSKA, K.; PACKEU, A.; LINTERMANS, B.; VANHOENACKER, P.; VAUQUELIN, G.; HAEGEMAN, G.; VAN CRAENENBROECK, K. KLHL12-mediated ubiquitination of the dopamine D4 receptor does not target the receptor for degradation. **Cell Signal**, v. 22, n. 6, p. 900-913, 2010. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.01.014.
- RUDNICK, G.; CLARK, J. From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1144, p. 249-263, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90109-S](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90109-S).
- SALATINO-OLIVEIRA, A.; ROHDE, L.A.; HUTZ, M.H. The dopamine transporter role in psychiatric phenotypes. **American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics**, v. 177B, p. 211–231, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32578>.
- SCHMITT, K.C.; REITH, M.E. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 316-340, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05148.x>.
- SHUMAY, E.; FOWLER, J.S.; VOLKOW, N.D. Genomic features of the human dopamine transporter gene and its potential epigenetic States: implications for phenotypic diversity. **PLoS One**, v. 5, n. 6, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011067>.
- SUGAMORI, K.S.; DEMCHYSHYN, L.L.; CHUNG, M.; NIZNIK, H.B.. D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10536-10540, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10536>.
- TORRES, G.E.; CARNEIRO, A.; SEAMANS, K.; FIORENTINI, C.; SWEENEY, A.; YAO, W.; CARON, M.G. Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of

- the transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2731-2739, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M201926200>.
- TROPFMANN, B.; BALFANZ, S.; KRACH, C.; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Characterization of an invertebrate-type dopamine receptor of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 629-653, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms15010629>.
- UDENWOBELE, D.I.; SU, R.C.; GOOD, S.V.; BALL, T.B.; VARMA SHRIVASTAV S.; SHRIVASTAV, A. Myristoylation: an important protein modification in the immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 751, p. 1-16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00751>.
- VERBURG-VAN-KEMENADE, B.M. et al. Characteristics of receptors for dopamine in the pars intermedia of the amphibian *Xenopus laevis*. **Neuroendocrinology**, v. 44, n. 4, p. 446-456, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1159/000124685>.
- VINCENT, J.D.; CARDINAUD, B.; VERNIER, P. L'évolution des récepteurs des monoamines et l'émergence des systèmes motivationnels et émotionnels chez les vertébrés [Evolution of monoamine receptors and the origin of motivational and emotional systems in vertebrates]. **Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine**, v. 182, n. 7, p. 1505-1516, 1998.
- VIRÁG, D.; DALMADI-KISS, B.; VÉKEY, K.; DRAHOS, L.; KLEBOVICH, I.; ANTAL, I.; LUDÁNYI, K. Current trends in the analysis of post-translational modifications. **Chromatographia**, v. 83, p. 1-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03796-9>.
- WANG, Y. P.; WEI, S.G.; ZHU, Y.S.; ZHAO, B.; XUN, X.; LAI, J.H. Dopamine receptor D1 but not D3 essential for morphine-induced conditioned responses. **Genetics and**

- Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 180-189, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.January.16.1>.
- WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F.T.; BEER, T.A.P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. W296-W303, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- WISHART, D.S. et al. HMDB 4.0 - The Human Metabolome Database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D608-D617, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>.
- WISHART, D.S.; KNOX, C.; GUO, A.C.; SHRIVASTAVA, S.; HASSANALI, M.; STOTHARD, P.; CHANG, Z.; WOOLSEY, J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Research**, v. 1, n. 34, p. D668-D672, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>.
- WOODS, A.S. The dopamine D(4) receptor, the ultimate disordered protein. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 30, n. 5, p. 331-336, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3109/10799893.2010.513842>.
- YAMAMOTO, K.; FONTAINE, R.; PASQUALINI, C.; VERNIER, P. Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: nine subtypes in Osteichthyes. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 86, n. 3-4, p. 164-175, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1159/000441550>.
- YAP, K.L.; KIM, J.; TRUONG, K.; SHERMAN, M.; YUAN, T.; IKURA, M. Calmodulin Target Database. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v.1, p. 8-14, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011320027914>.
- ZARRINPAR, A.; BHATTACHARYYA, R.P. e LIM, W.A. The structure and function of proline recognition domains. **Science Signaling**, v. 2003, n. 179, p. 1-10, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re8>.