

The background features a complex, abstract design. It consists of numerous overlapping, curved ribbons in shades of orange, yellow, and green, radiating from a central point. Superimposed on these ribbons is a 3D ball-and-stick molecular model. The model includes a central blue sphere, several red spheres, and a network of green and purple spheres connected by white rods, representing a complex chemical structure.

# **CAMINHANDO PELA BIOQUÍMICA...**

**Uma visão objetiva e acadêmica**

**RAQUEL DA SILVEIRA NOGUEIRA LIMA**

“Minha vida é povoada por contos,  
sonhos, fábulas... O que mais posso  
fazer, que não seja escrever e  
sonhar?”

Jorge Luis Borges

Às pessoas que, de alguma forma,  
tenho aprendido a amar.

Este esboço de livro, se assim pode ser denominado, destina-se a todos os que se iniciam no estudo da Bioquímica. Por que Bioquímica? Não estaria tal investigação associada à crença ingênua que, com o auxílio de um repertório de regras claramente definidas e universalmente aceitas, seria possível ampliar nosso saber acerca da natureza biológica? Talvez não... E é por essa razão que, como professora desta disciplina das Ciências Biológicas, em cujo caminho (um tanto árduo!) vamos tentar trilhar vias de acesso para o melhor entendimento dos mecanismos que mantêm a fabulosa máquina que é o ser vivo...

A elaboração da presente obra foi inspirada pelo desejo de aproximar o estudante iniciante das áreas biológicas em alguns dos principais questionamentos a respeito da lógica de organização, manutenção, perpetuação bem como, das possíveis interrelações que podem ser estabelecidas entre os organismos vivos. Apoiada em dois eixos – um predominantemente teórico e outro de cunho mais prático, mais voltado à realidade do estudante – a obra orienta o aluno (seja ele universitário ou aspirante) no entendimento dos principais processos bioquímicos. Espero, desta forma, estar contribuindo, de alguma maneira, para o auxílio à construção de uma nova forma de ver e pensar sobre a Bioquímica, através de um processo contínuo, vivo, dinâmico e, por que não dizer, agradável... Agradeço aqui a colaboração de todos os amigos, colegas de trabalho e alunos, que de alguma forma, fornecem estímulo incontestável para a realização deste e de outros trabalhos; assim como pela animação ao cumprimento deste projeto.

A todos, o meu mais sincero agradecimento.

Raquel da Silveira Nogueira Lima  
Fortaleza, 200

# Sumário

---

## Capítulo 1

- ~~V~~isão geral sobre os primeiros trabalhos em Bioquímica
- ~~O~~s organismos vivos são organizados
- ~~C~~omo a matéria viva é composta? Átomos, moléculas e outros bichos...
- ~~A~~ menor unidade da matéria viva

## Capítulo 2

- ~~C~~omplexidade da Matéria Viva
- ~~P~~rincípios da Lógica Molecular da Vida
- ~~E~~volução Química: A Origem da Vida

## Capítulo 3

- ~~A~~ Célula e Ciclo Celular
- ~~F~~enômenos de Transporte Transmembrana

## Capítulo 4

- ~~I~~nformação Hereditária
- ~~C~~omo as Proteínas são Formadas?
- ~~Q~~ual a Constituição das Proteínas?
- ~~C~~onsiderações sobre as Proteínas...

## Capítulo 5

- ~~A~~limentos
- ~~H~~ormônios

~~E~~ Enzimas

## Capítulo 6

~~L~~ Lipídeos

~~D~~ Digestão e Absorção de Lipídeos e Vitaminas

~~A~~ Acetil-Carnitina

## Capítulo 7

~~C~~ Carboidratos

~~C~~ Carboidratos: Vias Especiais

## Capítulo 8

~~V~~ Visão Geral do Metabolismo

~~M~~ Metabolismo e Transportadores de Energia

~~M~~ Metabolismo do Glicogênio e Mecanismos da Degradação  
Oxidativa de Carboidratos (Respiração Celular)

## Capítulo 9

~~M~~ Metabolismo Lipídico: Degradação e Biossíntese

~~D~~ Degradação Oxidativa de Proteínas

## Capítulo 10

~~M~~ Metabolismo dos Ácidos Nucléicos

~~R~~ Regulação da Expressão Gênica

~~I~~ Importação e Secreção de Proteínas

## Capítulo 11

~~T~~ Tecnologia do DNA Recombinante

## Anexo

~~B~~ioquímica da Respiração: Transporte de Gases e Equilíbrio  
Ácido-Base

~~C~~onsiderações sobre a Contração Muscular

~~A~~cetil-Colina: Importância

~~D~~iabete

## Referências Bibliográficas

# Capítulo 1

## Visão Geral sobre os Primeiros Trabalhos em Bioquímica<sup>1</sup>...

Aristóteles, 384-322 a.C., o mais influente dos filósofos gregos, aceitava a teoria dos quatro elementos (água, terra, fogo e ar). Não considerava, no entanto, que os elementos fossem as matérias com as quais o homem fosse feito. Aristóteles concebia os elementos como combinações pareadas de propriedades opostas: frio e calor, umidade e secura. As propriedades opostas não poderiam combinar-se entre si. Assim, são formadas quatro combinações diferentes possíveis, cada uma das quais, levando à formação de um elemento diferente:

*calor + secura = fogo*

*calor + umidade = ar*

*frio + secura = terra*

*frio + umidade = água*

Conforme mencionado por Michael Behe, em sua primorosa obra “*Darwin’s black box: the biochemical challenge to evolution*”<sup>2</sup>, o maior biólogo grego foi também seu maior filósofo, Aristóteles. Nascido ao tempo em que Hipócrates<sup>3</sup> ainda vivia, Aristóteles compreendeu que o conhecimento da natureza requeria observação sistemática. Mediante cuidadoso exame, reconheceu um volume espantoso de ordem no mundo vivo, o que constituiu um primeiro passo de importância crucial. Foram poucos os investigadores biológicos importantes no milênio que se seguiu a Aristóteles. Um deles, Galeno, um médico de Roma, viveu no século II d.C. Erroneamente, Galeno supôs que o sangue era bombeado para “irrigar” os tecidos, e que o novo sangue era produzido de forma ininterrupta para reabastecer o coração. Foi somente no século XVII que um inglês, William Harvey, apresentou a teoria que o sangue flui sem cessar em uma direção, fazendo um circuito completo, e que volta ao coração.

<sup>1</sup> Por bioquímica entende-se todo e qualquer tipo de ciência que estuda a vida no nível molecular, mesmo que a ciência seja praticada em disciplinas com outros nomes, tais como biologia molecular, genética ou embriologia.

<sup>2</sup> A Caixa Preta de Darwin, 1997, Ed. Ciência e Cultura (vide referências)

<sup>3</sup> Cerca de 400 a.C., denominado o “pai da medicina”.

Na Idade Média, o ritmo de investigação científica acelerou. O exemplo dado por Aristóteles foi seguido por números crescentes de naturalistas. A biologia progrediu rapidamente nos séculos XVII e XVIII, à medida que os cientistas fundiam os exemplos dados por Aristóteles e Harvey, de observação atenta e raciocínio inteligentes.

### **A primeira química médica**

A primeira tentativa para reduzir os processos biológicos a fenômenos materiais, consiste em interferir nas conexões de época da alquimia ou de química e no estudo de suas vias. Esse sistema era denominado quimiatria ou iatroquímica, que etimologicamente significa “química médica”. Geralmente se considera Paracelso como um dos precursores da quimiatria. Philip Theophrast Bombast von Hohenheim (1493-1451), médico e alquimista suíço adotou a forma latinizada de Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus Paracelsus. Em sua obra, que se difundiu muito, é feita através de uma certa incoerência entre os pares: fisiologia/alquimia, magia/astrologia, também apresentando discordâncias entre a medicina hipocrática e galênica. Também foram relevantes os aportes fisiológicos de médico Jean Baptista Van Helmont (1577-1664), médico, químico e filósofo flamenco, o qual se entrega sucessivamente à teologia, à magia à astrologia e à medicina. Van Helmont desenvolveu uma teoria sobre a digestão dos alimentos, seus trabalhos representando febris indícios para o animismo e o futuro da revolução química. Van Helmont aplica a medição a problemas de química e biologia, estudando aspectos de fisiologia vegetal. Na química, estuda vapores que a matéria produz, inventando o nome de “gás” para as substâncias liberadas ao ar.

O iatromecanicismo, baseado na crença que um animal funciona segundo os princípios da mecânica, resulta incompatível com o funcionamento harmônico dos seres vivos. Ao contrário do iatromecanicismo, reage George Ernest Stahl (1660-1734), químico e médico alemão, professor da Universidade de Halle. A doutrina proposta por Stahl utiliza a “*anima*” para explicar o fundamento da vida e toda patologia humana. O *ânima* é o que se constitui o princípio da vida, que mantém reunidas lãs partículas constituintes do organismo, que dirige o funcionamento dos órgãos, sustenta a circulação e evita a putrefação. Stahl também fez contribuições no âmbito da química. Formula, em 1702 a *Teoria do Flogístico*, a qual explica o fenômeno da combustão, reformulando, de modo científico, o antigo princípio do fogo, dos quatro elementos formadores da matéria.

*Cronologia dos primeiros trabalhos...*

- ✂ ✂ 1773: Isolamento da Uréia  
(G.F. Rouelle)
- ✂ ✂ 1789: Interpretação da respiração como sendo um processo oxidativo  
(A.L. Lavoisier)
- ✂ ✂ 1815: Esclarecimento da reação global da fermentação alcoólica  
(Gay Lussac)
- ✂ ✂ 1828: Síntese da uréia a partir do cianeto de amônia: primeira síntese de um composto orgânico próprio dos seres vivos  
(Friedrich Wohler)
- ✂ ✂ 1836-39: Esclarecimento da fermentação como sendo um processo catalítico  
(Berzelius, Liebig)
- ✂ ✂ 1857: Estabelecimento da teoria vitalista da fermentação: a fermentação é devida à atividade da célula viva  
(L. Pasteur)
- ✂ ✂ 1869: Isolamento dos ácidos nucleicos  
(F. Miescher)
- ✂ ✂ 1890: Cristalização da primeira proteína: ovalbumina  
(Franz Hofmeister)
- ✂ ✂ 1897: Descobrimto da ação de extratos de levedura sobre a fermentação
- ✂ ✂ 1903: Isolamento do primeiro hormônio: a adrenalina  
(Jokichi Takamine)
- ✂ ✂ 1905: Estabelecimento da importância do ácido fosfórico na fermentação  
(A. Harden Young)
- ✂ ✂ 1912: Primeiro esquema da fermentação  
(Carl Neuberg)
- ✂ ✂ 1914: Isolamento da tiroxina da tireóide  
(E C. Kendall)
- ✂ ✂ 1926: Isolamento da tiamina, a primeira vitamina  
(W.F. Donath, B.C.P. Sansen)
- ✂ ✂ 1926: Obtenção da urease, primeira enzima cristalizada  
(J.B. Sumner)
- ✂ ✂ 1929: Descobrimto do fosfato "lábil", adenosina trifosfato, ATP



- (K. Lohmann, Fiske & Subarrow)
- ✂ ✂ 1932: Descobrimto do ciclo da ornitina  
(Hans Adolf Krebs & Henseleit)
- ✂ ✂ 1935: Descoberta da treonina como aminoácido essencial  
(W.C. Rose)
- ✂ ✂ 1935: Isolamento do primeiro vírus cristalizado: o vírus do mosaico do tabaco (TMV)  
(W.M. Stanley)
- ✂ ✂ 1937: Formulação do ciclo do ácido cítrico  
(Hans Adolf Krebs, Knoop & Martius)
- ✂ ✂ 1939-44: Isolamento e esclarecimento da constituição do primeiro antibiótico de aplicação terapêutica, a penicilina  
(A. Fleming, H.W Florey & E.B. Chain)
- ✂ ✂ 1944: Isolamento dos fatores de transformação dos pneumococos e identificação do material vital (DNA)  
(G. Avery)
- ✂ ✂ 1948: Introdução da técnica de centrifugação como um método para o isolamento de componentes celulares  
(Scheider i Hoogeboom, Potter)
- ✂ ✂ 1950: Isolamento da cortisona  
(E.C. Kendall)
- ✂ ✂ 1952: Proposição do modelo helicoidal para as proteínas  
(L. Pauling)
- ✂ ✂ 1953: Determinação da estrutura da insulina  
(F Sanger)
- ✂ ✂ 1953: Descobrimto do ciclo da pentose-fosfato para a degradação da glicose  
(Horecker & Dickens)
- ✂ ✂ 1953: Modelo Helicoidal do DNA  
(J.D. Watson & F.H. Crick)
- ✂ ✂ 1958: Demonstração da infectividade de vírus puros  
(Alfred Gierer i Gerhard Schramm)
- ✂ ✂ 1961: Interpretação do código de bases de ácidos nucléicos  
(S. Ochoa & M. Nieremberg)
- ✂ ✂ 1963: Proposição, pelo Instituto Pasteur, dos modelos das enzimas alostéricas

(F. Jacob, J. Monod Changeux)

✂ ✂ 1965: Primeira determinação da seqüência de um ácido nucléico

(Holley e colaboradores)

✂ ✂ 1965: Determinação da primeira estrutura tridimensional de uma enzima, a lisozima

(Phillips e colaboradores)

✂ ✂ 1966: Síntese completa do hormônio insulina

(Kung Juehting, Du Yu-cang & Wang Yu)

✂ ✂ 1966: Isolamento de uma molécula de repressor

(Gilbert & Muller-Hill)

✂ ✂ 1968: Produção de ribossomas híbridos, Universidade de Wisconsin

(Nomura & colaboradores)

✂ ✂ 1969: Isolamento de genes que constituem o operon "lac" de *Escherichia coli*

(Beckenwith e colaboradores)

✂ ✂ 1969: Primeira síntese de uma enzima, a ribonuclease, obtida separadamente por dois grupos distintos, um na Universidade Rockefeller (Merrifield & Gutte), e outro nos laboratórios Merck, Sharp & Dohme

(Denkewalter & Hirschmann)

✂ ✂ 1970: Descrição de nove reações da fase luminosa da fotossíntese

(Knaff & Arnon)

Até o século XIX, a maioria das pessoas pensava que a vida era composta de um tipo diferente de material, diferente do observado na composição dos objetos inanimados. Em 1828, no entanto, Friedrich Wöhler aqueceu cianato de amônio e descobriu que o produto formado era uréia, um produto biológico. A partir desse sucesso, formulou a idéia de metabolismo, através do qual o corpo compõe e decompõe substâncias por meio de processos químicos. Ernst Hoppe-Seyler cristalizou o material vermelho do sangue (a hemoglobina) e demonstrou que se ligava ao oxigênio para transportá-lo via sangue. Emil Fisher demonstrou que a grande classe de substâncias denominadas de proteínas era constituída, sem exceção, por apenas vinte tipos de blocos de construção (aminoácidos). Na primeira metade do século XX, a cristalografia de raios X era usada para determinar a estrutura de pequenas moléculas. A cristalografia implica em lançar um feixe de raios X sobre o cristal de um elemento químico; os raios são dispersos por um processo denominado difração. Aplicar as armas da cristalografia de raios X às proteínas lhes revelaria a estrutura. Uma nova técnica veio a ser adotada para complementar e suplementar a cristalografia: é a ressonância nuclear magnética (RMN). Com o

emprego da RMN, uma molécula pode ser estudada enquanto em solução. Encerra, no entanto, limitações que a tornam aplicável apenas a uma parte das proteínas conhecidas. Juntas, porém, a RMN e a cristalografia de raios X conseguiram esclarecer as estruturas de proteínas em número suficiente para dar aos cientistas uma compreensão detalhada de como elas são (BEHE, 1997).

## OS ORGANISMOS VIVOS SÃO ORGANIZADOS

A Matéria Viva é composta por moléculas intrinsecamente inanimadas tal como a matéria não-viva! Assim, de onde vem a incrível diferença? A Bioquímica, portanto, procura responder a esta pergunta<sup>4</sup>!

Todo organismo vivo é extremamente complexo e organizado. Cada parte de um organismo vivo tem um propósito ou função específica, seja esta parte uma estrutura complexa como um órgão ou aparelho, estruturas submoleculares ou mesmo moléculas individuais.

Os organismos vivos são capazes de extrair e utilizar energia do seu ambiente seja na forma de nutrientes orgânicos, seja na forma de luz solar. Os organismos vivos são capazes de autoduplicar, gerando uma descendência que perpetua o estado vital.

## COMO A MATÉRIA VIVA É COMPOSTA? ÁTOMOS, MOLÉCULAS E OUTROS BICHOS...

Todo organismo vivo é formado por **MACROMOLÉCULAS ORGÂNICAS** construídas de acordo com um plano comum. Há uma simplicidade básica na estrutura das macromoléculas, apesar de serem, por exemplo, cerca de 100000000000,0 os tipos de proteínas existentes em 10 milhões de espécies de seres vivos. Todos os organismos vivos são formados pelas mesmas espécies de moléculas fundamentais e, portanto, parecem ter um ancestral comum. Os organismos vivos trocam **ENERGIA E MATÉRIA** com o meio ambiente e entre si. Os organismos vivos criam e mantêm suas estruturas organizadas e complexas extraíndo, transformando e utilizando energia do seu ambiente.

---

<sup>4</sup> Vide Referências: "The Blind Watchmaker" (*O relojoeiro cego*), de Richard Dawkins, 1985.

As células vivas são máquinas químicas muito complexas e organizadas, que funcionam a base de energia química. A energia de todo ser vivo vem, direta ou indiretamente, do Sol. Os organismos vivos fabricam substâncias capazes de REGULAR todo o seu conjunto complexo de reações químicas. As ENZIMAS são capazes de realizar e controlar todos os processos bioquímicos que caracterizam um organismo vivo. Os processos metabólicos são regulados para operar no princípio da economia máxima.

Os organismos vivos são capazes de se REPRODUZIR com incrível precisão ao longo de milhares de gerações, através de um sistema de replicação auto-reparável. Toda a informação necessária para a construção de um novo ser vivo está armazenada e codificada no DNA de todas as células que o compõe. Esta informação cabe em 0,000000000006 g de DNA, para a célula do ser humano.

## A MENOR UNIDADE DA MATÉRIA VIVA

As primeiras formas de vida  $\approx$  Surgiram há 3,5 a 4,0 bilhões de anos; A terra tem aproximadamente 4,7 bilhões de anos.

A composição da matéria viva é marcadamente diferente da composição da crosta terrestre, o que indica uma origem em meio líquido. O fato de que todas as células vivas possuem moléculas formadas a partir de algumas poucas unidades fundamentais em comum sugere um ANCESTRAL ÚNICO. O surgimento da vida seguiu três etapas:

Evolução Química - Ao acaso

Organização Molecular - Orientada

Evolução Biológica

Historicamente, a pesquisa da origem da vida:

1. Oparin - 1920  $\approx$  "Sopa Primordial"
2. S. Miller - 1953  $\approx$  Experimento clássico
3. Recentemente  $\approx$  Descoberta de um RNA com atividade catalítica, chamado "Ribozima".

Baseados nestas pesquisas pode-se listar os principais eventos relacionados ao surgimento das primeiras formas de vida como, provavelmente:

1. A formação das primeiras moléculas orgânicas;
2. A organização destas em moléculas mais complexas, especialmente o RNA catalítico;
3. A utilização deste RNA como molde para a síntese dos primeiros peptídeos, que assumem a função de catálise;
4. O surgimento das membranas biológicas;
5. A migração do RNA para o DNA como molécula armazenadora da informação genética, pois é formado por uma fita dupla mais estável, duplicável e reparável.

O aumento da competição pelas substâncias disponíveis no meio extracelular levou a célula primitiva à necessidade de "aprender" a sintetizar estas e outras substâncias mais eficientes. Entre as vias metabólicas mais antigas está provavelmente a GLICÓLISE ANAERÓBICA. Há 1,5 bilhões de anos ~~o~~ surgimento das primeiras células EUCARIÓTICAS. As células eucarióticas surgiram provavelmente da simbiose entre células procarióticas, que deram origem às mitocôndrias e aos cloroplastos, duas organelas essenciais<sup>5</sup>. Na seqüência da evolução, células eucarióticas se associaram para formar colônias de células especializadas e cooperativas, os primeiros seres multicelulares. A comparação de seqüências de nucleotídeos de RNA ribossomal permite o estabelecimento de um critério evolucionário muito preciso.

---

<sup>5</sup> Vide Hipótese do Endossimbionte, sobre a origem de mitocôndrias e cloroplastos em células eucarióticas.

## Capítulo 2

### COMPLEXIDADE DA MATÉRIA VIVA:

Todo organismo vivo é extremamente complexo e organizado. Cada parte de um organismo vivo tem um propósito ou função específica, seja esta parte uma estrutura complexa como um órgão ou aparelho, estruturas submoleculares ou mesmo moléculas individuais. Os organismos vivos são capazes de extrair e utilizar energia do seu ambiente seja na forma de nutrientes orgânicos, seja na forma de luz solar. Os organismos vivos são capazes de autoduplicar, gerando uma descendência que perpetua o estado vital.

### PRINCÍPIOS DA LÓGICA MOLECULAR DA VIDA

A evolução de organismos multicelulares grandes dependeu da habilidade de células eucarióticas em expressar sua informação hereditária de formas distintas e também da capacidade de funcionar por cooperação como um coletivo. Toda e qualquer matéria viva é regida por dois princípios básicos, que são denominados Princípios da Lógica Molecular dos Organismos Vivos. Tais princípios podem ser sumarizados como: Princípio da Entropia Máxima (ou tendência ao Caos) e Princípio da Economia Máxima (ou economia das Partes e dos Processos, ou ainda, Princípio da Conservação Máxima de Matéria e Energia<sup>6</sup>). Ambos os princípios voltaram a ser detalhados no decorrer deste livro. Apenas adiantando um pouco, pode-se perfeitamente dizer que, desde que o Universo foi criado, assim como o entendemos, todo o “pool” de matéria e energia, é exatamente o mesmo. Ou seja, não ocorre perda ou formação, seja de matéria ou energia. O que se observa, no entanto, são transformações, ou bioconversões, com a conseqüente realização de trabalho.

### EVOLUÇÃO QUÍMICA - A ORIGEM DA VIDA

As primeiras formas de vida surgiram há 3,5 a 4,0 bilhões de anos; A terra tem aproximadamente 4,7 bilhões de anos. A composição da matéria viva é marcadamente diferente da composição da crosta terrestre, o que indica uma origem em meio líquido.

---

<sup>6</sup> Antoine L. Lavoisier, século XVII.

O fato de que todas as células vivas possuem moléculas formadas a partir de algumas poucas unidades fundamentais em comum sugere um ANCESTRAL ÚNICO. Baseados nestas pesquisas pode-se listar os principais eventos relacionados ao surgimento das primeiras formas de vida como, provavelmente:

✍ ✍ A formação das primeiras moléculas orgânicas;

✍ ✍ A organização destas em moléculas mais complexas, especialmente o RNA catalítico<sup>7</sup>;

✍ ✍ A utilização deste RNA como molde para a síntese dos primeiros peptídeos, que assumem a função de catálise;

✍ ✍ O surgimento das membranas biológicas;

✍ ✍ A migração do RNA para o DNA como molécula armazenadora da informação genética, pois é formado por uma fita dupla mais estável, duplicável e reparável.

---

<sup>7</sup> Ribozima (enzima ribossômica).

## Capítulo 3

### A CÉLULA E CICLO CELULAR

Célula: unidade mínima de um organismo, capaz de atuar de maneira autônoma. Alguns organismos microscópicos, como bactérias e protozoários, são células únicas, enquanto os animais e plantas são formados por muitos milhões de células organizadas em tecidos e órgãos.

Características gerais das células: pode-se classificá-las em células procarióticas e eucarióticas. As primeiras, que incluem bactérias e algas verde-azuladas, são células pequenas, de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e de estrutura simples. O material genético (DNA) não está rodeado por nenhuma membrana que o separe do resto da célula. As células eucarióticas, que formam os demais organismos vivos, são muito maiores (medem entre 10 a 50  $\mu\text{m}$  de comprimento) e têm o material genético envolto por uma membrana que forma um órgão esférico importante chamado de núcleo. Apesar das muitas diferenças de aspecto e função, todas as células estão envolvidas por uma membrana - chamada membrana plasmática - que encerra uma substância rica em água, chamado citoplasma.

Quase todas as células bacterianas e vegetais estão também encapsuladas numa parede celular grossa e sólida, composta de polissacarídeos, externa à membrana plasmática. Todas as células contêm informação hereditária codificada em moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA); esta informação dirige a atividade da célula e assegura a reprodução e a transmissão dos caracteres à descendência.

Núcleo: é o órgão mais importante em quase todas as células animais e vegetais; é esférico, mede cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e está rodeado por uma membrana dupla. A interação com o citoplasma acontece através de orifícios chamados de poros nucleares. Dentro do núcleo, as moléculas de DNA e proteínas estão organizadas em cromossomos, que costumam aparecer dispostos em pares idênticos. O núcleo controla a síntese de proteínas no citoplasma. O RNA mensageiro (RNAm) é sintetizado de acordo com as instruções contidas no DNA e deixa o núcleo através dos poros. Já no citoplasma, o RNAm une-se a corpos pequenos chamados ribossomos e codifica a estrutura primária de uma proteína específica.

Citoplasma: compreende todo o volume da célula, com exceção do núcleo. Engloba numerosas estruturas especializadas e organelas.



Citoesqueleto: é uma rede de filamentos protéicos do citossol que se encarrega de manter a estrutura e a forma da célula. Também é responsável por muitos dos movimentos celulares<sup>8</sup>.

Mitocôndrias: uma das organelas mais importantes do citoplasma e é encontrada em quase todas as células eucarióticas. São as organelas produtoras de energia. Os cloroplastos são organelas ainda maiores, encontradas nas células de plantas e algas.

Outras organelas: a maior parte dos componentes da membrana celular forma-se numa rede tridimensional irregular de espaços, rodeada, por sua vez, por uma membrana e chamada de retículo endoplasmático (RE), no qual formam-se também os materiais expulsos pela célula. O aparelho de Golgi é formado por pilhas de sacos planos envoltos em membranas. Este aparelho recebe as moléculas formadas no retículo endoplasmático, transforma-as e dirige-as para diferentes lugares da célula. Os lisossomas são pequenas organelas que contêm reservas de enzimas necessárias à digestão celular de várias moléculas indesejáveis. As membranas formam muitas outras vesículas pequenas, encarregadas de transportar materiais entre organelas.

Divisão celular: todas as células de qualquer planta ou animal surgiram a partir de uma única célula inicial - o óvulo fecundado - por um processo de divisão. O óvulo fecundado divide-se e forma duas células-filhas idênticas, cada uma das quais contém um jogo de cromossomos igual ao da célula parental. Depois, cada uma das células-filhas volta a se dividir, e assim continua o processo. Nesta divisão, chamada de mitose, duplica-se o número de cromossomos (ou seja, o DNA) e cada um dos jogos duplicados constituirá a dotação cromossômica de cada uma das duas células-filhas em formação. Na formação dos gametas, acontece uma divisão celular especial das células germinais - chamada de meiose, na qual se reduz à metade sua dotação cromossômica; só se transmite a cada célula nova um cromossomo de cada um dos pares da célula original.

Cada compartimento fabrica dentro de si um conjunto específico de proteína e enzimas que vão conferir a essa organela uma série de propriedades especiais, ou seja, a compartimentalização de proteína e enzimas vai conferir a cada organela uma função especial dentro da célula para que de uma maneira geral não seja exercida por outras organelas. Dentro dessas organelas existentes nos organismos eucariontes a maior delas e, talvez a mais importante, é o núcleo celular que é a primeira característica que distingue esses organismos dos procariontes, onde o material genético está solto no citoplasma. Entretanto, essa organela não tem só a função de compartimentalizar o DNA, ou seja,

---

<sup>8</sup> Ciclose

separar o material genético do citoplasma. Além disso, está relacionado com a fisiologia desse ácido nucléico, pois além de armazenar também contém dentro de si um conjunto de proteína, um sistema enzimático, responsável pela replicação dessa informação genética no processo de divisão celular: na mitose e na meiose.

Esse núcleo também replica ou duplica a informação genética para ser passada em quantidades iguais para as células-filhas. Possui também um conjunto de proteína responsável por detectar alterações na informação gênica, ou seja, na estrutura do ácido desoxirribonucleico e uma vez detectadas alterações essas enzimas conseguem reparar, retornando a informação ao estado original e evitando acúmulo de mutações no organismo. Entretanto, não abole completamente, pois qualquer processo biológico tem uma taxa de erro inerente. É também responsável pelo processamento dessa informação porque de uma maneira geral não é acessível aos outros componentes celulares, então, é transformada em outro tipo de informação que possa ser compreendida por determinadas maquinarias da célula. E o modo como é processada é através da síntese de uma molécula complementar: RNA que pode ser transportador, ribossomal e mensageiro. Tem funções no processo de síntese protéica, mas existem certos RNAs que podem funcionar como cofatores de atividade enzimática telomerase.

Existe ainda a regulação da expressão gênica controlada pelo núcleo, quais os gens vão ser impedidos e quais vão ser sintetizados. Esse controle é feito por um conjunto de proteínas existentes no núcleo, chamadas de proteínas regulatórias, integrando sinais recebidos por receptores da membrana citoplasmática e transformam-nos em padrão específico para a expressão gênica para que a célula possa exercer bem suas funções fisiológicas sob aquelas condições num determinado momento. A informação gênica é armazenada num tipo de molécula que é ácido desoxirribonucleico, que se apresenta como fita dupla que seria duas cadeias lineares de bases nitrogenadas ordenadas numa determinada seqüência, dispostas numa orientação antiparalela e formando pareamento entre as bases nitrogenadas de uma fita com a outra. A forma mais comum de associação de DNA é a  $\alpha$ -hélice encontrada na maioria dos organismos.

1) Vírus bacteriófago que tem uma capsula com o genoma do vírus, o DNA circular; no organismo eucarionte se apresenta como “colar de contas”, as estruturas esféricas não são o DNA e sim o nucleossoma, complexo proteico associado ao DNA e os filamentos fininhos que conectam um nucleossoma ao outro seria o DNA da célula eucarionte.

- 2) Cada fita de DNA é formada por uma sequência de nucleotídeos, moléculas de fosfato e uma parte de base nitrogenada (T, A, C, G), conferindo um código genético que pode ser lido por determinados componentes celulares. Em RNA ocorre a uracila em lugar da timina. Essa informação genética vai ser transformada parte numa molécula que pode ser entendida pela célula que é o RNA mensageiro e esse, junto com determinados grânulos protéicos que são os ribossomas, vai ser primeiro traduzido numa sequência linear de aminoácido e esses aminoácidos na presença de um meio de composição apropriada e com a ajuda de determinadas proteínas citoplasmáticas vão adquirir uma estrutura tridimensional (ativa) onde a proteína vai ter função biológica maximizada que é o produto final da informação do núcleo.
- 3) Exemplificação de uma das funções do núcleo que é a duplicação do DNA na fase S do ciclo celular, onde cada fita representa um molde para a produção da fita complementar.
- 4) Processo de transcrição gênica, a informação genética contida na dupla fita de DNA processada por complexos proteicos dentro do núcleo que são as RNAs polimerases que transcrevem várias sequências de nucleotídeos, formando os RNA transportador (tRNA ou RNAt), mensageiro (mRNA ou RNAm) e ribossômico (rRNA ou RNAr).

Em relação à transcrição, existe uma característica que diferencia os organismos eucariontes dos procariontes: na dupla fita de DNA, existe uma região do gen que funciona como um pacote de informação gênica específica que será transcrita para a célula através da RNA polimerase. Essa enzima sintetiza a fita complementar de ácido ribonucleico e à medida que ocorre a síntese ela já promove uma modificação no RNA em uma guanina ligada a uma extremidade 5' que é uma modificação do RNAm que é chamado de cap, ocorrendo em eucariontes e procariontes. E após a síntese do RNAm, tem-se uma modificação na maior parte dos RNAs que é a adição de uma cauda de poli-A e que serve para regular a meia vida dos RNAm dentro da célula. Logo após a ação da RNA polimerase, tem-se a formação de um transcrito que é chamado transcrito primário ou RNA heterogêneo que na célula eucarionte não vai estar pronto ainda para o processo de tradução, ou seja, não pode ser utilizado pelo ribossoma. Outra função do núcleo é processar esse transcrito primário, fazendo o processamento do RNAm, retirada dos introns e soldagem dessas estruturas que codificam a sequência primária das proteínas que fica contínua e aí sim estará pronta para ser mandada para o citoplasma para ser traduzida pelos ribossomas.

Ainda nas células eucariontes, os RNAs são monocistrônicos, RNAm que codifica apenas um polipeptídeo, enquanto que nos procariontes o RNAm pode ser policistrônico, ou seja, a partir de uma mesma sequência codifica polipeptídeos diferentes. Enquanto que nos organismos procariontes, a única forma de regular a expressão da informação gênica é a nível transcricional, os eucariontes têm diversas formas de regulação como o descrito acima, controle do processamento de RNA, do transporte do RNAm para o citosol (90% fica no núcleo e é degradado), o ribossoma pode ser inativado e alguns RNAs podem ser destruídos no citosol.

E o que é a cromatina? Refere-se à associação de DNA e proteína, essas últimas tem como funções: coordenar o metabolismo de DNA (proteínas não-histônicas) e organização física do DNA dentro do núcleo (histonas<sup>9</sup>), as quais formam um conjunto bastante homogêneo de proteína. As histonas são divididas em nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) e não-nucleossomais (H1). Têm baixo peso molecular e possuem grande número de aminoácidos básicos, ou seja, carregados positivamente, como a lisina e arginina. Essas cargas conferem às proteínas a capacidade de se ligar ao DNA por interações eletrostáticas, interagindo com as cargas negativas do ácido fosfórico no esqueleto do DNA.

O nucleossoma é um complexo octamérico formado pelas quatro histonas nucleossomais, onde cada histona é apresentada em um conjunto duplo. Então, a primeira forma de organização dá aproximadamente duas voltas sobre esse nucleossoma, diminuindo o comprimento da fita de DNA e ajudando a organizá-lo. O DNA enovelado ao redor dos nucleossomas se apresenta como um “colar de contas” com um diâmetro de 10 nanômetros ( $10 \times 10^{-9}$  metro). Nunca vai se encontrar numa célula eucarionte um DNA desnudo. Essa estruturação com 10 nanômetros corresponde à primeira forma de compactação de DNA correspondendo à forma eucromatina, estrutura menos compacta de DNA sendo transcricionalmente ativa, gen presente nessa região está sendo transcrito na forma de RNA. Além dessa forma de compactação do DNA, existe outra, que seria o enrolamento dessa estrutura em forma de um “colar de contas” sobre uma mola formando tipo uma fibra mais espessa com 30 nanômetros e é uma forma mais compactada do DNA, correspondendo a estrutura da heterocromatina, que é uma região transcricionalmente inativa, ou seja o gen dali não estão sendo transcritos na forma de RNA. Duas diferenças entre eu e heterocromatina: a primeira morfológica, que seria dada pelo tipo de enovelamento, eucromatina menos e a hetero mais enovelada; a segunda funcional, a eucromatina apresenta região transcricionalmente ativa enquanto que a hetero inativa. E num determinado filamento de DNA, geralmente têm regiões de eucromatina interespaçadas com regiões de hetero e elas podem intercambiar de forma, hetero se transforma em eucromatina e vice-versa, dependendo do

---

<sup>9</sup> Proteínas de caráter básico, constituídas, principalmente do aminoácido básico histidina.

estado de expressão dos gens daquela região. Se um determinado gen não está sendo transcrito fica na forma de heterocromatina...

Quando a célula começa a trancrever um gen, ela não procura fazer uma cópia de cada vez, começando a trancrever o gen através da RNA polimerase, quando ela sai desse início de transcrição, vem uma outra polimerase e se liga, então se tem um mesmo gen transcrito ao mesmo tempo por várias polimerases, porque a única coisa que limita as polimerases é o tamanho. Enquanto tiver espaço elas entram. Depois que esses RNAm forem mandados para o citoplasma são traduzidos justamente de forma sequencial por ribossomas. Do mesmo modo, enquanto existir espaço para os ribossomas se ligarem, eles o fazem. No processo de tradução, ele fica ligado até que seja mandada uma mensagem contrária ao núcleo, ou pelo aumento da concentração de proteína ou por uma alteração do processo fisiológico onde há o desligamento da expressão daquele gene.

‡ Resumo: A informação gênica é armazenada sob a forma de DNA, essa dupla fita se estrutura ao redor dos nucleossomas podendo se estruturar na forma de eu ou heterocromatina e essa DNA + nucleossomas forma a cromátide ou cromossoma interfásico. Precisa de estruturas adicionais para se manter estável dentro da célula e se manter estável ao longo das gerações. Não é qualquer segmento de DNA ligado a histonas (proteína ácida que tem como função empacotar o DNA) e não-histonas que caracteriza um cromossoma eucariote! Então, no filamento de DNA ativo deve haver nas duas extremidades (telômeros) e numa região entre essas extremidades (centrômero), regiões especializadas para caracterizá-lo como cromossoma. Além disso, precisa possuir centenas de regiões ao longo do cromossoma chamadas de *Ori*, onde começa a replicação de DNA. Os telômeros são seqüências de DNA específicas onde ao redor dessa seqüência são montadas estruturas proteicas, eles têm como função evitar o ataque de nucleases, que destrói DNA a partir de uma extremidade livre. Essa extremidade do telômero também é importante para não haver fusão de cromossomas, mantendo o número constante. Por que existem essas nucleases? Para degradar DNA invasor (de vírus) e também pode existir as nucleases dos próprios vírus para atacar o DNA da célula. Normalmente dentro da célula quando tem duas extremidades livres, através do sistema de reparo, automaticamente liga-se uma ponta na outra, para manter constante também o número de cromossomas. E uma última função seria promover a duplicação completa (corretamente) do DNA através da telomerase. O centrômero é também uma seqüência específica de DNA onde vai ser montada uma placa protéica chamada cinetócoro onde as fibras do fuso se ligam na mitose ou meiose.

- 8) Como o cromossoma mitótico, diferente do interfásico, pois já está duplicado (cópia fiel da molécula), tem uma região chamada de primária que contém a sequência do centrômero e ao redor dessa região do centrômero é montada a placa proteica chamada de cinetócoro e ele se liga aos filamentos e microtúbulos para puxar o cromossoma para o pólo da célula.
- 9) Alguns cromossomas eucariontes, além de possuírem todas essas sequências, possuem uma determinada região onde tem a repetição em sequência de um mesmo tipo de conjunto de genes que codificam o RNAr. Então, como o RNAr é muito importante para a célula, não se satisfaz em ter apenas uma cópia de cada gen, deve ter centenas de cópias desse gen e não apenas em um tipo de cromossoma, ela (célula) espalha essas cópias em vários cromossomas diferentes. No caso humano, tem-se pelo menos seis tipos de cromossomas que contêm essas regiões de múltiplas cópias de RNAr chamadas de RON (região organizadora de nucléolo) que se agregam numa região distinta da célula, emparelham-se lado a lado as regiões contendo as sequências dos RNAr ou as RONS. E ao redor dessa região de RONS é montado uma estrutura proteica que forma a matriz do nucléolo. E de acordo com as tarefas que se realizam nessas regiões do nucléolo cria-se uma diferenciação morfológica que vai estar associada a uma função específica. Então, na região central que é fibrilar, tem-se a síntese e processamento do RNAr e na região periférica que é granular, tem-se a montagem das subunidades ribossomais. Cada subunidade é formada por tipos de proteínas diferentes produzidas por genes diferentes, nos eucariontes, na maior, tem-se 31 tipos de proteínas e dois tipos de RNAr e na menor 21 proteínas e um tipo de RNAr. No caso dos eucariontes, tem-se a menor com 40 S (33 proteínas e um tipo de RNAr) e a maior com 60 S (50 proteínas diferentes e três tipos de RNAr). Nos procariontes, por serem mais simples o ribossoma consegue ser montado sem ajuda, já o eucarionte precisa da ajuda de determinados componentes da região fibrilar do nucléolo. Então, na célula eucarionte, tem-se a transcrição dos RNAr que são enviados para o citoplasma, onde são traduzidos em proteínas ribossomais que são enviadas para o núcleo e compartmentalizadas no nucléolo onde através da ação do molde de RNAr mais ajuda de proteínas específicas do nucléolo, montam-se as subunidades menor e maior, que são enviadas separadamente para o citoplasma onde vão ser montadas em um ribossoma ativo e serão engajadas na síntese proteica. Costuma-se chamar, de maneira imprópria, núcleo na célula em repouso. No entanto, nesse período a célula está em constante atividade para sua manutenção e do organismo, só não está se reproduzindo. A célula para atender funções especiais dentro do organismo ou para manter constante o número de células ou para gerar células que irão funcionar como gametas para poder atender às reproduções sexuais, ela irá realizar dois processos distintos: mitose, onde a célula tem como função gerar duas células-filha com informação gênica igual a da célula mãe e

meiose, onde essas células geram quatro células-filha onde a informação gênica é metade da célula-mãe original. O que iremos ver hoje são os processos de mitose e meiose, além do ciclo celular para que a célula possa entrar em divisão (intérfase). O núcleo quando a célula entra em divisão celular sofre várias modificações que visam a atender o objetivo final que é transmitir ou dividir a informação genética para as células-filha. Para a célula entrar em divisão precisa antes passar por um processo preparatório chamado intérfase. A intérfase mais a mitose formam o ciclo celular.

## † Ciclo Celular

Programa Universal seguido por todas as células para se dividirem. Esse ciclo celular é atribuído única e exclusivamente para o processo de mitose e geralmente não usado para o processo de meiose. Esse programa universal significa que todas as células tanto de eucariontes como em procariontes possuem uma série de sistemas regulatórios realizados por proteínas regulatórias e dotadas de transmissão de sinais que irão integrar as mensagens recebidas tanto do meio externo (disponibilidade de nutrientes e sinais químicos) quanto do interno (tamanho da célula) que ao chegar o momento propício para a célula se dividir ela dispara uma série de eventos que irá levar a duplicação do DNA e a montagem do aparato protéico necessário para a separação desse DNA duplicado para cada pólo que irá para células-filha, além de fazer a cisão do citoplasma para formar duas células diferentes. Todo esse sistema de divisão celular é regulado por uma série de proteínas e a ação integrada dessas proteínas é o chamado ciclo celular. Podemos dividir o ciclo celular em quatro fases distintas: G1, S, G2 e M.

1) Na fase G1, a célula que acabou de se reproduzir e gerou a célula filha e de modo geral tem um tamanho menor que a mãe, mas durante esse período ela sintetiza novos constituintes celulares, para atingir o tamanho de uma célula adulta e poder desenvolver seu potencial dentro do organismo. A partir daí ela pode tomar dois caminhos distintos, um destes seria entrar em processo de divisão celular passando para a fase S onde há a duplicação do material genético seguindo para a fase G2, e após esse processo preparatório ocorre então a divisão do citoplasma e da membrana formando duas células, num processo chamado Mitose ou fase M. De uma maneira geral, os organismos unicelulares sofrem ciclos contínuos de divisão celular, que quer dizer que se você encontra uma solução com nutrientes eles irão se duplicar até exaurir a quantidade de nutrientes do meio. A única coisa que restringe o processo de divisão é a quantidade de nutrientes do meio. No caso de organismos pluricelulares, os ciclos de divisão são regulados, ou seja, não bastam apenas nutrientes no meio de cultura para essas

células se dividirem, pois se isso acontecesse estaríamos constantemente crescendo. Além dos nutrientes as células necessitam de determinados hormônios chamados de fatores de crescimento que estão no organismo em quantidades grandes estimulando cada um determinada região do organismo. Assim pode-se regular o crescimento da população de células e evitar que se tenha um crescimento exagerado de um determinado órgão em relação a outro.

*Retomando:* o ciclo celular se divide em quatro fases distintas G1 (que se caracteriza pelo crescimento celular, ou seja, a célula sintetiza os componentes necessários a sua função no organismo). Ao fim dessa fase ela opta por dois caminhos: o mais comum é ir para a fase G0 ou de não-crescimento onde a maior parte das células do nosso organismo está estacionada. Essa fase G0 pode ser temporária, como ocorre com os leucócitos que só começam a se dividir na presença do antígeno, ou permanente, onde nessas células que optam por esse tipo, diferenciam-se e não mais voltam a se dividir como é o caso das fibras musculares e dos neurônios. Os neurônios não podem ser repostos, ou seja, a quantidade de neurônios de um indivíduo adulto é a mesma de quando nasceu. Um outro caminho para a fase G1 é seguir para a fase S (S de síntese de DNA) para se iniciar a divisão celular.

Para passar da fase G1 para a fase S a célula deve receber um sinal regulatório formado por um ponto chamado Start onde ocorre a regulação. Esta regulação é feita por uma proteína quinase e uma proteína regulatória. A proteína quinase é a p34 encontrada sempre dentro da célula em qualquer fase da vida dessa, e é ativada por uma proteína regulatória chamada de ciclina. A fase S será ativada é o complexo p34-ciclina. A p34 sozinha é inativa e ativada pela ciclina que é sintetizada no final da fase G1 e após 30 minutos ela é completamente degradada. Só que ainda a formação desse complexo não é suficiente para ativar a fase S, ele pega diversas vias de sinalização compostas por várias proteínas quinases e várias fosfatases que irão ser estimulados pela presença de hormônios, nutrientes, tamanho da célula e assim sucessivamente ativando o complexo p34-ciclina que irá atuar na transcrição gênica e faz com que ela sintetize toda maquinaria necessária a duplicação de DNA. Entre as proteínas sintetizadas temos a DNA polimerase que faz a síntese da fita complementar de DNA, proteínas regulatórias, helicases, proteínas ligadoras de fita...

*Retomando:* no final da fase G1 num ponto chamado *Start* há formação de ciclina que irá juntar-se à proteína quinase p34 formando o complexo p34-ciclina que irá fosforilar proteínas alvo nucleares que modulam a transcrição gênica induzindo a formação de, por exemplo: DNA polimerase (responsável pela duplicação do DNA), a SSBP (proteína ligadora de fitas simples do DNA), helicases, proteínas



ligadoras de origem de replicação e assim por diante. A DNA polimerase iria separar as fitas de DNA em duas fitas simples e assim a ssb promoveria a ligação dessas fitas simples com nucleotídeos formando duas fitas duplas. Além dessas proteínas regulatórias, há a indução da formação de proteínas estruturais para a formação da lamina nuclear. Ainda não há o mapeamento de todas as proteínas que sinalizam esse estímulo da divisão do DNA.

2) Então na fase S ocorre a duplicação da fita de DNA.

A palavra cromossomo em Biologia é utilizada para designar duas estruturas completamente diferentes: o interfásico e o mitótico. O interfásico é representado pelas duas fitas de DNA mais as proteínas associadas, a fita simples seria a cromátide ou o cromossomo n. Nós humanos possuímos 46 cromossomos n, 23 de origem paterna e 23 de origem materna. O cromossomo mitótico é formado por uma estrutura em forma de X, onde há duas fitas de DNA unidas pelo centrômero. Nesse caso temos 46 cromossomos e 92 cromátides. As duas fitas são exatamente iguais e herdadas de um único genitor. Durante esse breve período nossa célula fica tetraplóide, ou seja, fica com quatro cópias de um mesmo tipo de cromossomo. Na mitose será dividida em 46 cromossomos para cada célula.

3) Ao terminar a síntese de DNA, a célula entra automaticamente na fase chamada G2, uma fase de verificação para verificar se a célula atende a todos os pré-requisitos para divisão. Se todos os pré-requisitos forem atendidos, novamente entra em ação o complexo p34-ciclina diferente do anterior que irá promover o processo de mitose que envolve dois processos distintos: separação dos cromossomos para pólos opostos da célula e divisão da célula (citocinese).

4) A fase seguinte é a fase M, com duração bastante curta em relação às outras etapas do ciclo celular e em alguns organismos pode demorar 30 min, e em outros 2 horas. Duas modificações interessantes entre essa fase e a intérfase são: o citosqueleto, que na intérfase se espalha homogeneamente pela célula e na mitose é reestruturado para formar o fuso mitótico para poder mover os cromossomos para polos opostos da célula; outra modificação será dentro do núcleo com a condensação dos cromossomos e dissolução do núcleo com a formação de uma placa equatorial de cromossomos.

## FENÔMENOS DE TRANSPORTE TRANSMEMBRANA

A permeabilidade seletiva da membrana plasmática resulta em um tipo especial de difusão denominado OSMOSE, o qual envolve o movimento de moléculas do solvente (nesse caso a água) através da membrana plasmática. As moléculas de água passam livremente em ambas as direções, mas, como em todos os tipos de difusão, o movimento se dá a favor de um gradiente de concentração, ou seja, de onde as moléculas estão mais concentradas para onde elas estão menos concentradas. A grande maioria das moléculas que constitui os solutos de uma solução não pode, no entanto, sofrer difusão. No caso da água, dizemos que ela passa do meio HIPOTÔNICO (menos concentrado em soluto e mais concentrado em solvente) para o HIPERTÔNICO (mais concentrado em soluto e menos concentrado em solvente).

A membrana celular ou biológica que envolve completamente as células corporais, é constituída quase que exclusivamente de proteínas e lipídios. Essa membrana é formada por dupla camada lipídica, com grandes números de moléculas de proteínas flutuando na bicamada, e às vezes, atravessando toda a espessura da membrana. Os mecanismos que as substâncias utilizam para deslocarem pela membrana e a estratégia que a membrana utiliza para normalizar essas concentrações recebem dois nomes: TRANSPORTE PASSIVO e TRANSPORTE ATIVO.

### TRANSPORTE PASSIVO ou DIFUSÃO

Todas as moléculas e íons dos líquidos corporais estão em movimento constante, no qual cada molécula possui seu movimento particular. É denominado de difusão esse movimento contínuo das moléculas entre si, nos líquidos e nos gases. A grande característica da Difusão é o sentido da direção do movimento das moléculas, o movimento sempre será do meio mais concentrado para o meio menos concentrado, isto é, a difusão é sempre à favor do seu gradiente de concentração, ou eletroquímico ou de pressão. Sendo, portanto, SEM GASTO DE ENERGIA. Existem quatro tipos diferentes de difusão: simples, por carreadores, por canal protéico e osmose.

#### A. Difusão Simples

Algumas substâncias têm a capacidade de difundirem-se pela porção lipídica da membrana celular sem a necessidade de qualquer meio de transporte. Essas substâncias simplesmente atravessam a camada lipídica, são elas: Oxigênio ( $O_2$ ), dióxido de Carbono ( $CO_2$ ), ácidos graxos (gordura) e álcool. Assim sendo, essas substâncias apresentam uma característica importante: alta solubilidade em lipídios.

## B. Difusão Facilitada ou por Carreadores

A difusão facilitada se faz por meio de uma proteína carreadora que transporta as substâncias glicose e aminoácido. O mecanismo funciona da seguinte maneira: o carreador está situado na membrana celular e apresenta em sua estrutura um ponto de fixação (binding site) que possui afinidade ou a glicose ou Aminoácido. Sendo assim, a molécula a ser transportada une-se no ponto de fixação, ao fazê-lo, altera a estrutura do carreador que a desloca para dentro célula. Após, esse transporte, a molécula transporta se solta, a alteração estrutural do carreador se desfaz e reinicia o processo.

Vale ressaltar que, não há gasto de energia e tanto a glicose quanto os aminoácidos são transportados sempre do meio mais concentrado para o menos. Um detalhe importante é que o carreador da glicose não possui afinidade aos aminoácidos e vice-versa, portanto, cada molécula possui seu próprio meio de transporte.

## C. Difusão pelos Canais Protéicos

Além de formar carreadores, as proteínas que constituem a membrana celular podem formar canais denominados de canais protéicos. Esses canais são um conjunto de moléculas de proteínas que possibilitam um canal (um túnel) pela membrana, permitindo o transporte de determinadas moléculas. Os canais possuem uma característica importante, a permeabilidade seletiva. As próprias formas, diâmetro e natureza das cargas elétricas ao longo da superfície dos canais possibilitam esse fenômeno. O canal do sódio possui diâmetro ideal para o íon e a superfície interna deste canal é revestida de cargas elétricas negativas. Essa carga negativa atrai o íon e juntamente com o seu diâmetro, possibilita a difusão do mesmo.

## D. Osmose

Osmose é a difusão da molécula de água pela membrana celular. A água, por ser o solvente universal difunde pela membrana sem necessitar de qualquer canal ou carreador, e em uma velocidade muito alta. Assim denomina-se movimento efetivo, a diferença entre a difusão para o meio interno em relação ao meio externo.

## E. Fatores que influenciam a cinética da Difusão

Alguns fatores podem alterar a cinética da difusão, tornando-a mais lenta ou acelerando-a. Para entender melhor, observe a fórmula que se segue. A diferença de concentração (ou simplesmente o uso

de [ ]), é a diferença na quantidade de qualquer substância entre dois meios (podendo ser meio intra ou extra celulares). Área de secção reta, é o espaço pelo qual ocorrerá a difusão (seria o tamanho "porta" pelo qual ocorrerá a difusão). A difusão será maior em ambientes quentes, locais com temperaturas elevadas aceleram o movimento das moléculas. A distância corresponde o percurso que a molécula irá percorrer para difundir, isto é, a distância entre os dois meios.

E o peso molecular refere-se ao próprio peso da molécula, moléculas pesadas dificultam os seus transportes. Assim sendo, a diferença de [ ], área de secção reta e temperatura são diretamente proporcionais, isto é, esses fatores aumentando, aceleram a difusão. A demais, distância e peso molecular são inversamente proporcionais, e, portanto, a diminuem.

## TRANSPORTE ATIVO

Estudando difusão podemos concluir que não é possível uma molécula difundir contra o seu gradiente. No entanto, ocorrem determinadas situações nos quais uma determinada substância difunde-se contra seu gradiente, por exemplo: uma substância em [ ] reduzida no líquido extracelular e mesmo assim, há necessidade de [ ] elevada no meio intracelular. Ou ainda, substância que difunde para o meio intracelular e há necessidade de sua remoção, mesmo que apresente reduzida [ ] no meio intracelular em relação ao extracelular. Esse transporte de substância contra seu gradiente denomina-se de TRANSPORTE ATIVO. Podemos caracterizá-lo como um transporte que GASTA ENERGIA e utiliza CARREADORES. Como ocorre na difusão facilitada, as proteínas carreadoras se estendem por toda a espessura da membrana e nesse caso, transporte a substância contra o gradiente com o uso de energia.

### A. Bomba de Sódio e Potássio

As concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  são diferentes entre os meios, e assim sendo, tendem a difundir através dos canais protéicos para dentro e fora da célula, respectivamente. Caso ocorra, a homeostase da célula se perde. Para que não ocorra essa perda da homeostase, a célula utiliza um transporte ativo denominado de bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . A intensidade dessa bomba é suficiente para retornar as concentrações aos valores ideais. Sendo um meio de transporte, a bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  possui duas proteínas carreadoras, a menor sem função conhecida e a maior, apresenta três sítios específicos. A parte voltada para o meio interno da célula possui um sítio com afinidade a três íons  $\text{Na}^+$ , a parte voltada para o meio exterior da célula possui um sítio com afinidade a dois íons  $\text{K}^+$ , a parte próxima ao sítio de afinidade ao  $\text{Na}^+$  apresenta atividade energética (ATPase).

Quando na porção interna da proteína fixarem três íons  $\text{Na}^+$  e na porção externa dois íons  $\text{K}^+$ , esse íons são transportados para o meio externo e meio interno, respectivamente. Após o transporte, utiliza-se energia da molécula do ATP para ativar a proteína para no transporte.

## B. Bomba de Cálcio

O íon cálcio é muito importante para o mecanismo de contração muscular, tanto esquelética quanto miocárdica. No coração a  $[\text{Ca}^{++}]$  no meio intracelular é insuficiente para promover a contração do coração, e elevada no meio externo. Assim sendo, o  $\text{Ca}^{++}$  difunde-se para o meio interno. Porém, ainda assim, é insuficiente. Dentro do citoplasma da célula, existe uma organela denominada de retículo sarcoplasmático que é rico em  $\text{Ca}^{++}$ , que também, permitirá a difusão desse íon para o citoplasma. Com o  $\text{Ca}^{++}$  do meio extracelular mais o  $\text{Ca}^{++}$  do retículo, a  $[\text{Ca}^{++}]$  desse íon é suficiente para promover a contração do coração. Após a contração, o íon  $\text{Ca}^{++}$  deverá retorna aos seus respectivos locais de origem, entrando em o transporte ativo do  $\text{Ca}^{++}$ . A bomba de  $\text{Ca}^{++}$  apresenta características importantes:

1. a bomba de  $\text{Ca}^{++}$  é encontrada em dois locais, nas membranas celulares e nas membranas do retículo sarcoplasmático (mitocôndrias);
2. sua função é só transportar  $\text{Ca}^{++}$  do meio intra para dentro do retículo (e mitocôndrias) e para o meio extra.

## TRANSPORTES ATIVOS SECUNDÁRIOS

São denominados de transportes ativos secundários, três mecanismos que não apresentam as mesmas características das bombas e das difusões anteriores.

### A. Co-transporte de Sódio com Glicose ou Aminoácidos

Nas células intestinais, a glicose e os aminoácidos, são absorvidos do bolo alimentar por meio de uma proteína carreadora que utiliza o transporte do sódio. A energia para esse transporte não vem do ATP, mas sim da diferença do gradiente de concentração desse íon entre os meios. A proteína transportadora está localizada na membrana da parede do intestino e apresenta dois sítios de fixação. Sendo um deles para o  $\text{Na}^+$  e o segundo para a glicose ou para os aminoácidos.

## B. Contra-transporte ou antiporte

Esse transporte é muito comum nos rins, onde o organismo necessita excretar hidrogênio ( $H^+$ ) para formar a urina e não alterar o pH. O mecanismo desse transporte funciona da seguinte maneira, o movimento de uma substância em uma direção fornece energia para o movimento acoplado de uma segunda na direção oposta. O contra-transporte é muito comum, quando é excretado o  $H^+$  e absorvido o  $Na^+$ .

## C. Transporte Dependente

Ocorre também nos rins, sem alterar as cargas elétricas, realizado quando os rins absorvem o  $Na^+$  junto com o cloro ( $Cl^-$ ).

## Capítulo 4

### INFORMAÇÃO HEREDITÁRIA

Os Ácidos Nucléicos são as moléculas com a função de armazenamento e expressão da informação genética.

- Existem basicamente dois tipos de ácidos nucleicos:
  1. O Ácido Desoxirribonucleico - DNA
  2. O Ácido Ribonucleico - RNA
- Os ácidos nucleicos são macromoléculas formadas pela ligação tipo fosfodiéster entre 5 nucleotídeos diferentes, suas unidades fundamentais.

#### Os Nucleotídeos:

- São as unidades fundamentais dos ácidos nucleicos. Ligam-se uns aos outros através de ligações fosfodiéster, formando cadeias muito longas com milhões de resíduos de comprimento. Além de participarem da estrutura dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos atuam também como componentes na estrutura de coenzimas importantes no metabolismo oxidativo da célula, e como forma de energia química - ATP, por exemplo. Atuam ainda como ativadores e inibidores importantes em várias vias do metabolismo intermediário da célula.

Os nucleotídeos são moléculas formadas por:

Uma pentose, Uma base nitrogenada e Um ou mais radicais fosfato.

#### As Bases Nitrogenadas:

Pertencem a duas famílias e compostos, e são cinco no total:

1. Bases Púricas, ou Purinas: Adenina e Guanina
2. Bases Pirimídicas, ou Pirimidinas: Citosina, Timina e Uracila

Tanto o DNA como o RNA, possuem as mesmas bases púricas, e a citosina como base pirimídica. A timina existe apenas no DNA, e no RNA, é substituída pela uracila - que possui um grupo metil a menos. Em alguns tipos de DNA virais e no RNA de transferência podem aparecer bases incomuns

### As Pentoses:

A adição de uma pentose a uma base nitrogenada produz um nucleosídeo. Os nucleosídeos de A, C, G, T e U são denominados, respectivamente, Adenosina, Citosina, Guanosina, Timidina e Uridina. Se o açúcar em questão é a RIBOSE, temos um ribonucleosídeo, característico do RNA. Se o açúcar é a desoxirribose - uma hidroxila a menos em C<sub>2</sub> - temos um desoxirribonucleosídeo, característico do DNA. A ligação com a base nitrogenada ocorre sempre através da hidroxila do carbono anomérico da pentose.

### O Fosfato:

A adição de um ou mais radicais fosfato à pentose, através de ligação tipo éster com a hidroxila do carbono 5 da mesma, dá origem aos Nucleotídeos. Os grupos fosfato são responsáveis pelas cargas negativas dos nucleotídeos e dos ácidos nucléicos. A adição do segundo ou terceiro grupo fosfato ocorre em seqüência, dando origem aos nucleotídeos di e trifosfatados.

### O DNA:

Está presente no núcleo das células eucarióticas, nas mitocôndrias e nos cloroplastos, e no citosol das células procarióticas. Nas células germinativas e no ovo fertilizado, dirige todo o desenvolvimento do organismo, a partir da informação contida em sua estrutura. É duplicado cada vez que a célula somática se divide.

### O RNA:



Atua como uma espécie de "cópia de trabalho", criada a partir do molde de DNA e utilizada na expressão da informação genética. A síntese de uma molécula de RNA a partir de um molde de DNA chama-se "TRANSCRIÇÃO". Nesta transcrição, modificações podem ocorrer sobre a molécula de RNA transcrita, convertendo-a de uma cópia fiel em uma cópia funcional do DNA.

## COMO AS PROTEÍNAS SÃO FORMADAS?

A biossíntese protéica é resultado do processo de tradução da informação contida no material genético da célula; as proteínas são, portanto, a expressão da informação genética.

Esta informação flui do DNA para o RNA (linguagem de quatro "letras") e deste para uma cadeia polipeptídica (linguagem de 20 "letras"), no considerado "dogma central" da bioquímica. O processo de tradução requer um CÓDIGO GENÉTICO, através do qual a informação contida em uma seqüência de nucleotídeos de um ácido nucléico é expressa na forma de uma seqüência específica de aminoácidos de um peptídeo.

Uma alteração na seqüência original de nucleotídeos leva a uma alteração na seqüência de aminoácidos, potencialmente causando uma doença - às vezes letal ao organismo. Estas "palavras" de três letras são denominadas CÓDONS, e são possíveis 64 tipos diferentes de códons. Os códons são expressos na linguagem do RNA Mensageiro, sempre no sentido 5' - 3', e cada códon pode ser traduzido em um aminoácido específico. Três códons sinalizam o término da seqüência polipeptídica, e são ditos de encerramento: UGA, AUG e UAA. O códon AUG codifica a metionina e, em certas condições, a iniciação de uma cadeia polipeptídica, com a metionina como aminoácido amino-terminal.

### Componentes Necessários para a Tradução

- São vários, entre eles:
  - ✍ Os Aminoácidos: Devem estar presentes todos os 20 aminoácidos no momento da síntese, inclusive os essenciais;
  - ✍ O RNA de Transferência: São as moléculas "bilíngües" do processo, e estão ligadas de forma específica aos aminoácidos nas suas extremidades 3'. Possuem o "ANTICÓDON", ou a seqüência bases complementar e antiparalela ao códon do RNAm. Cada aminoácido pode ser transportado

por mais de uma molécula de RNAt. São em número de cerca de 50 RNAt no ser humano, para 61 códons diferentes;

- ⚡ A hipótese "wobble", ou de oscilação, tenta explicar como um RNAt pode reconhecer mais de um códon; nesta hipótese, o pareamento da primeira base do anticódon (5') não é necessariamente feita do modo tradicional. Assim, nesta posição, G pode parear com C ou U, e U com A ou G, por exemplo;
- ⚡ O RNA Mensageiro: Produzido a partir de um molde de DNA no núcleo da célula, vai ao citosol para ser traduzido em uma seqüência polipeptídica;
- ⚡ Ribossomos: São organelas formadas por uma complexa associação entre proteínas e RNA ribossômico, localizadas no citosol na forma livre ou associadas ao retículo endoplasmático, quando sintetizam proteínas que serão "exportadas" da célula. São formados por duas subunidades, uma maior e outra menor, cujas características são expressas em termos de coeficientes de sedimentação, ou "S" (de Svedberg). O ribossomo eucariótico é formado por uma subunidade 60S e outra 40S; o procariótico, por uma subunidade 50S e outra 30S.

⚡ Compõem um ribossomo:

⚡ RNAr ⚡ 3 moléculas no procariótico, 4 moléculas no eucariótico

⚡ Proteínas ribossômicas ⚡ Desempenham várias funções na tradução

⚡ Sítios "A" e "P" ⚡ São sítios de ligação para as moléculas de RNAt, e estendem-se por ambas as subunidades:

⚡ Os sítios "A" e "P" cobrem juntos dois códons vizinhos

Na tradução, o sítio "A" - de aminoacil - é ocupado pelo aminoacil-RNAt correspondente ao códon posicionado, e especifica o próximo aminoácido a ser adicionado à cadeia peptídica em formação. O sítio "P" - de peptidil - é ocupado pelo peptidil-RNAt, ligado à cadeia peptídica que está sendo sintetizada.

⚡ Fatores Protéicos:

São fatores de iniciação, alongamento e liberação da cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada.

⚡ Fontes de Energia

A adição de cada aminoácido à cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada utiliza 2 moléculas de ATP e 2 de GTP como fonte de energia. Outras moléculas de ATP e GTP são necessárias nos processos de iniciação e liberação da cadeia sintetizada

#### Etapas da Biossíntese Protéica:

**Ativação dos Aminoácidos:** Refere-se à ligação dos aminoácidos ao(s) seu(s) RNAt específico(s). Esta ligação é catalisada pelas AMINOACIL-RNAt-SINTETASES, enzimas que reconhecem os aminoácidos e seus RNAt específicos com grande especificidade. A reação ocorre em 2 etapas, e é dependente de energia. Na primeira etapa, o aminoácido liga-se ao AMP, obtido a partir da hidrólise do ATP e com liberação de Ppi. Na segunda etapa, o AMINOÁCIDO-AMP liga-se à extremidade 3' do RNAt, liberando o AMP e energia.

?? **Iniciação da Cadeia:** Depende da presença da subunidade ribossomal 40S, do RNAm, do RNAt com o anticódon de iniciação AUG (metionina), e de uma série de proteínas denominadas "fatores de iniciação", ou eIF, em número de nove, no mínimo, nos eucariontes.

- o Em etapas:

O eIF-2 liga-se especificamente com uma molécula de GTP e com o Met-tRNA<sub>i</sub>

A subunidade ribossomal 40S liga-se ao eIF-3, que a separa e a mantém separada da subunidade 60S, que por sua vez se liga ao eIF-6, com o mesmo propósito

O complexo formado em (a) liga-se ao complexo 40S formado em (b), com a ajuda de vários outros fatores de iniciação, e este novo complexo associa-se ao RNAm (complexo de pré-iniciação).

A associação do complexo de pré-iniciação com o fator de iniciação eIF-5 e com a subunidade 60S do ribossomo dá origem ao complexo de iniciação propriamente dito. O GTP é hidrolisado e os outros fatores de iniciação são liberados.

O complexo de iniciação é, portanto, formado por um ribossomo 80S associado aos eIF-5 e eIF4, ao RNAm corretamente posicionado, e ao RNAt de iniciação também posicionado no sítio "P", com o sítio "A" vazio.

?? Elongamento da Cadeia: Depende dos "fatores de alongamento" e do complexo de iniciação

- o Em etapas:

O Fator de Elongamento eEF-1 dirige a seleção do RNAt correto para o posicionamento no sítio "A" do complexo de iniciação. Este posicionamento depende ainda da hidrólise de um GTP e ocorre com posterior liberação do eEF1.

Há a formação da ligação peptídica entre os dois aminoácidos adjacentes. A enzima peptidiltransferase, componente da subunidade ribossômica 60S, faz a transferência da metionina inicial do sítio "P" para o aminoácido do sítio "A", formando um dipeptidil-RNAt. O ribossomo move-se - às custas do GTP - na direção 5'-3' em uma distância de 3 nucleotídeos, com a ajuda do eEF-2, ou "translocase", posicionando o peptídeo no sítio "P" e liberando o sítio "A" para o posicionamento de um novo aminoácido. O RNAt livre é liberado, e o processo se repete até a tradução completa do RNAt.

Liberação da Cadeia Polipeptídica: O surgimento de um códon de término - UAG, UGA ou UAMINOÁCIDO - determina a ligação de um "Fator de Liberação", ou eRF, associado ao GTP. Este fator de liberação determina o rompimento da ligação entre o último aminoácido e seu RNAt. A dissociação do eRF do ribossomo depende da hidrólise do GTP.

### Modificações Pós-Traducionais

Várias modificações podem ser impostas à cadeia polipeptídica após a sua biossíntese. As principais modificações são:

Redução do Tamanho = Conversão de proteínas inativas e zimogênios nas suas formas ativas, por remoção de seqüências de aminoácidos catalisadas por endoproteases específicas.

Alterações Covalentes = Fosforilação, glicosilação, hidroxilação, etc.

Algumas proteínas são ainda endereçadas a organelas específicas da célula ou mesmo ao meio extracelular.

## QUAL A CONSTITUIÇÃO DAS PROTEÍNAS?

### Características Gerais dos Aminoácidos:

- São as unidades fundamentais das PROTEÍNAS.
- Todas as proteínas são formadas a partir da ligação em seqüência de apenas 20 aminoácidos.
- Existem, além destes 20 aminoácidos principais, alguns aminoácidos especiais, que só aparecem em alguns tipos de proteínas.

### Estrutura Química Geral

A presença de um carbono central alfa, quase sempre assimétrico; nas proteínas encontramos apenas "L" aminoácidos. Ligados a este carbono central, há um grupamento CARBOXILA, um grupamento AMINA e um átomo de hidrogênio. O quarto ligante é um radical chamado genericamente de "R", responsável pela diferenciação entre os 20 AMINOÁCIDOS. É a cadeia lateral dos aminoácidos. É o radical "R" quem define uma série de características dos aminoácidos, tais como polaridade e grau de ionização em solução aquosa. É a polaridade do radical "R" que permite a classificação dos aminoácidos em três classes:

### Classificação dos Aminoácidos

Aminoácidos com Radical "R" Apolar:

Possuem radical "R" geralmente formado exclusivamente por carbono e hidrogênio - grupamentos alquila. São hidrofóbicos e em número de 8:

Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina - Forma anel imina, Fenilalanina, Triptofano, Metionina - "R" contém enxofre.

Aminoácidos com Radical "R" Polar Não-Carregado:

São aminoácidos com radicais "R" contendo hidroxilas, sulfidrilas e grupamentos amida; São hidrofílicos e em número de 7: Glicina - o mais simples dos aminoácidos, Serina - "R" com função alcoólica, Treonina - "R" com função alcoólica, Cisteína - possui um radical sulfidrila, Tirosina - "R" com grupamento fenol, Asparagina - "R" com função amida, Glutamina - "R" com função amida

Aminoácidos com Radical "R" Polar Carregado:

"R" Carregado Positivamente:

São aminoácidos diamino e monocarboxílicos, em número de três: Lisina, Arginina, Histidina.

"R" Carregado Negativamente:

São aminoácidos monoamino e dicarboxílicos, em número de 2: Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico.

Aminoácidos em Solução Aquosa: Propriedades Químicas e Elétricas

Os aminoácidos são ANFÓTEROS, pois, em solução aquosa, comportam-se como ácido e como base, formando ÍONS DIPOLARES, a saber: O grupamento carboxila ioniza-se em solução aquosa liberando próton, e adquirindo carga negativa; O grupamento amina ioniza-se em solução aquosa aceitando próton e adquirindo carga positiva. Este comportamento depende do pH do meio aquoso em que o aminoácido se encontra. Em meio ácido, os aminoácidos tendem a aceitar prótons, comportando-se como base e adquirindo carga positiva - ionizam em seus radicais amina. Em meio básico, os aminoácidos tendem a doar prótons, comportando-se como ácidos e adquirindo carga negativa - ionizam-se em seus radicais carboxila. O valor de pH onde as cargas elétricas do aminoácido se igualam e se anulam chama-se PONTO ISOELÉTRICO, ou pH ISOELÉTRICO.

## **CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PROTEÍNAS...**

São as macromoléculas mais importantes que possuem as estruturas mais complexas e desempenham inúmeras funções. Pertencem à classe dos PEPTÍDEOS, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por LIGAÇÕES PEPTÍDICAS. Entre os peptídeos, formam a sub-classe dos POLIPEPTÍDEOS, pois são macromoléculas, formadas por seqüências de 200 ou mais resíduos de

aminoácidos. As proteínas exercem na célula uma grande variedade de funções, que podem ser divididas em dois grupos:

**Dinâmicas** ↗ Transporte, defesa, catálise de reações, controle do metabolismo e contração, por exemplo.

**Estruturais** ↗ Proteínas como o colágeno e elastina, por exemplo, que promovem a sustentação estrutural da célula e dos tecidos.

### A Ligação Peptídica

Ocorre entre os grupamentos amina e carboxila ligados ao carbono alfa dos aminoácidos, com a saída de uma molécula de água. As ligações peptídicas possuem propriedades especiais, tais como um caráter de dupla ligação parcial, rígida e planar, e configuração quase sempre "TRANS". Apesar disso, o peptídeo tem grande mobilidade rotacional, pois as ligações entre o carbono alfa dos resíduos do aminoácido e seus radicais carboxila e amina possuem giro livre sobre seus eixos:

**Ligação  $\psi$  (psi)** ↗ Entre o carbono alfa e o carbono da carbonila

**Ligação  $\phi$  (phi)** ↗ Entre o carbono alfa e o nitrogênio do grupamento amina

Quanto à Composição:

**Proteínas Simples** ↗ Por hidrólise liberam apenas aminoácidos.

**Proteínas Conjugadas** ↗ Por hidrólise liberam aminoácidos mais um radical não peptídico, denominado GRUPO PROSTÉTICO. Ex: metaloproteínas, hemoproteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, etc.

Quanto ao Número de Cadeias Polipeptídicas:

**Proteínas Monoméricas** ↗ Formadas por apenas uma cadeia polipeptídica

**Proteínas Oligoméricas** ↗ Formadas por mais de uma cadeia polipeptídica; são as proteínas de estrutura e função mais complexas

Quanto à Forma:

Proteínas Fibrosas ↗ De estrutura espacial mais simples

Proteínas Globulares ↗ De estrutura espacial mais complexa

Proteínas Homólogas:

São proteínas que desempenham a mesma função em tecidos ou em espécies diferentes. Estas proteínas possuem pequenas diferenças estruturais, reconhecíveis imunologicamente. Os segmentos com seqüências diferentes de aminoácidos em proteínas homólogas são chamados "SEGMENTOS VARIÁVEIS", e geralmente não participam diretamente da atividade da proteína. Os segmentos idênticos das proteínas homólogas são chamados "SEGMENTOS FIXOS", e são fundamentais para o funcionamento bioquímico da proteína. As proteínas possuem complexas estruturas espaciais, que podem ser organizadas em quatro níveis, crescentes em complexidade:

Estrutura Primária: Dada pela SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E LIGAÇÕES PEPTÍDICAS da molécula (esqueleto covalente da molécula, dele deriva todo o arranjo espacial da molécula). Pode variar em três aspectos, definidos pela informação genética da célula: número de aminoácidos; seqüência de aminoácidos e natureza dos aminoácidos. A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de AMINOÁCIDO semelhante a um "colar de contas", com uma extremidade AMINO TERMINAL" e uma extremidade "CARBOXI TERMINAL". A estrutura primária de uma proteína é destruída por HIDRÓLISE química ou enzimática das ligações peptídicas, com liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres.

Estrutura Secundária: É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína. É o último nível de organização das proteínas fibrosas, mais simples estruturalmente. Ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos  $\alpha$  dos aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila. O arranjo secundário de um polipeptídeo pode ocorrer de forma regular; isso acontece quando os ângulos das ligações entre carbonos  $\alpha$  e seus ligantes são iguais e se repetem ao longo de um segmento da molécula. São dois os tipos principais de arranjo secundário regular:

alfa-Hélice: É a forma mais comum de estrutura secundária regular. Caracteriza-se por uma hélice em espiral formada por 3,6 resíduos de aminoácidos por volta. As cadeias laterais dos aminoácidos se



distribuem para fora da hélice. A principal força de estabilização da alfa-Hélice é a ponte de hidrogênio.

### Folha-beta :

Ou folha pregueada, ou ainda estrutura beta. Ao contrário da alfa-hélice, a folha-beta envolve dois ou mais segmentos polipeptídicos da mesma molécula ou de moléculas diferentes, arranjados em paralelo ou no sentido anti-paralelo. Os segmentos em folha-beta da proteína adquirem um aspecto de uma folha de papel dobrada em pregas. As pontes de hidrogênio mais uma vez são a força de estabilização principal desta estrutura.

### Estrutura Secundária Não Repetitiva:

Em média cerca de 50% da estrutura de uma proteína globular está em a - hélice ou em folha-beta. O restante da molécula assume uma estrutura secundária não repetitiva, menos regular que as acima citadas.

### Estruturas Supersecundárias:

Estruturas que resultam da combinação de segmentos com arranjo secundário em "MOTIVOS", longos padrões que se repetem ao longo de uma proteína.

### Estrutura Terciária:

Dada pelo arranjo espacial de aminoácidos distantes entre si na seqüência polipeptídica. É a forma tridimensional como a proteína se "enrola". Ocorre nas proteínas globulares, mais complexas. A estrutura terciária de uma proteína é determinada e estabilizada por fatores primários como:

Resíduos de prolina ↗ Interrompem estruturas secundárias regulares, causando dobras na molécula.

Impedimento estérico ↗ cadeias laterais muito grandes que precisam se "acomodar" no espaço.

Pontes dissulfeto ↗ Ligações covalentes entre radicais sulfidrila de resíduos de cisteína, formando um resíduo de CISTINA.

## Pontes de hidrogênio

Interações hidrofóbicas ↗ Tendência dos aminoácidos com radical "R" apolar de se acomodar no interior de uma estrutura dobrada, "fugindo" do contato com a água.

Interações Iônicas ↗ Forças de atração entre aminoácidos com radicais "R" carregados com cargas opostas.

Cadeias polipeptídicas muito longas podem se organizar em DOMÍNIOS, regiões com estruturas terciárias semi-independentes ligadas entre si por segmentos lineares da cadeia polipeptídica. Os domínios são considerados as unidades funcionais e de estrutura tridimensional de uma proteína.

## Estrutura Quaternária:

Surge apenas nas proteínas oligoméricas. Dada pela distribuição espacial de mais de uma cadeia polipeptídica no espaço, as subunidades da molécula. Estas subunidades mantêm-se unidas por forças covalentes, como pontes dissulfeto, e ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc. As subunidades podem atuar de forma independente ou cooperativamente no desempenho da função bioquímica da proteína.

Processo de Enovelamento das Proteínas: Como é dirigido o processo de enovelamento da cadeia polipeptídica? Por muito tempo aceitou-se a explicação de que a estrutura tridimensional das moléculas protéicas dependia exclusivamente das suas estruturas primárias. O enovelamento das proteínas é um processo que depende da participação de outras proteínas muito especializadas:

Cis-Trans-Protil Isomerases ↗ Enzimas que catalisam a conversão entre ligações cis e trans de resíduos de prolina, buscando uma configuração adequada destas ligações.

Proteína-Dissulfeto Isomerases ↗ Facilitam o arranjo ideal das ligações dissulfeto, estabilizando-as.

Chaperonas ↗ proteínas que participam do processo de enovelamento das cadeias polipeptídicas logo após a sua biossíntese no ribossomo.

O resultado da atuação destas proteínas e das forças de estabilização de estrutura terciário garante a formação de estruturas espaciais estáveis mais dinâmico.

## Capítulo 5

### ALIMENTOS

A evolução das espécies se apóia em novas maneiras de se obter energia das mais variadas fontes para assim melhor aproveitar as matérias-primas que a natureza oferece aos seres vivos. Seres mais eficazes na forma de obter energia têm-se mostrado mais adaptados e seus descendentes impõem-se na pirâmide evolutiva. Um grupo numeroso de seres vivos especializou-se em obter energia a partir da luz e mais uma série de compostos químicos que extrai da terra e do ar: são os autótrofos (fotossintetizantes, como as plantas e o plancton), capazes de sintetizar suas próprias fontes energéticas. Acontece que esses compostos são sintetizados em tamanha quantidade que dificilmente é utilizado totalmente pelo autótrofo, sendo necessário armazená-lo em grandes quantidades (p. ex. o amido e os óleos das sementes) ou excretá-lo, como é o caso do oxigênio.

Aproveitando-se desse "excesso" de alimentos, um outro grupo de seres vivos, os heterótrofos, especializou-se em obter a energia necessária para suas reações orgânicas alimentando-se dos seres autótrofos ou de seus dejetos (os decompositores). Existem, também, algumas moléculas indispensáveis para o funcionamento das células vivas que só são sintetizadas pelos autótrofos, como alguns aminoácidos e as vitaminas. Os autótrofos, por sua vez, também necessitam de matéria prima derivada dos heterótrofos como o gás carbônico e os produtos da decomposição de seus tecidos.

De qualquer forma, esta relação, que nasce da tentativa desesperada das espécies em se autopreservarem, forma um elo indissolúvel entre os produtores (autótrofos), consumidores (heterótrofos) e os decompositores, construindo uma complexa teia alimentar que faz com que a Terra funcione como um gigantesco ser vivo e prossiga, lentamente, seus passos evolutivos.

A relação entre os consumidores (um herbívoro), os decompositores (bactérias e fungos) e os produtores (plantas).

O ato de obter substratos para as reações orgânicas básicas que ocorrem no interior das células dos seres vivos, em suma, constitui a alimentação. Apesar de as relações bioenergéticas entre as biomoléculas serem fundamentais para a biologia celular, biomoléculas que não produzem energia de forma direta possuem funções-chaves neste processo. Basicamente, os nutrientes de origem alimentar

são fornecidos pelos carboidratos (açúcares), lipídios (gorduras) e proteínas que possuem função primordial a produção de energia a nível celular. Outros nutrientes fundamentais à vida são as vitaminas, os minerais e as  fibras. A água corresponde ao elemento químico em maior quantidade nos seres vivos (cerca de 70% do peso total) e é o solvente dos demais compostos químicos celulares. É, portanto, indispensável na alimentação.

**CLASSIFICAÇÃO DOS ALIMENTOS:** pode-se classificar os alimentos de várias formas, de acordo com o ponto de vista (composição, consistência, modo de preparo etc.). Do ponto de vista bioquímico, a melhor classificação diz respeito às suas propriedades biológicas:

**Energéticos:** fornecem substratos para a manutenção da temperatura corpórea a nível celular, liberando energia para as reações bioquímicas. São os carboidratos, lipídios e proteínas. Os carboidratos são os alimentos energéticos por excelência (4,1 kcal/g), pois são diretamente sintetizados na fotossíntese dos autótrofos e todos os seres vivos possuem as enzimas necessárias para sua degradação. Os lipídios e as proteínas, apesar de possuírem poder energético igual ou superior mesmo aos carboidratos, têm funções outras no organismo e são absorvidos após a absorção dos carboidratos, sendo utilizados, secundariamente, como produtores de energia, apesar do alto poder calórico (9,3 kcal/g dos lipídios e 4,1 kcal das proteínas). Os lipídios são os principais elementos de reserva energética uma vez que são primariamente armazenados nos adipócitos antes da metabolização hepática.

**Estruturais:** atuam no crescimento, desenvolvimento e reparação de tecidos lesados, mantendo a forma ou protegendo o corpo. São as proteínas, minerais, lipídios e água.

**Reguladores:** aceleram os processos orgânicos, sendo indispensáveis ao ser humano: são as vitaminas, aminoácidos e lipídios essenciais, minerais e fibras.

**NECESSIDADE DOS ALIMENTOS:** em condições normais, diariamente a energia absorvida deve ser igual à energia gasta pelo indivíduo, com a alimentação devendo conter uma quantidade tal de alimentos das três classes (energéticos, estruturais e reguladores) que possibilitem as atividades metabólicas básicas do organismo sem carências ou excessos calóricos.

O gasto de energia varia de acordo com o ambiente, com tipo de alimentação e a taxa basal metabólica (quantidade de energia necessária para a manutenção das funções fisiológicas básicas) que é proporcional ao peso corpóreo, à área corporal e ao sexo (nos homens e nos jovens é maior que nas mulheres e idosos em virtude de suas atividades metabólicas serem diferentes). Pode-se medir a taxa

basal metabólica de um indivíduo colocando-o em uma câmara isolada para medir perdas de calor e produtos excretados em relação à alimentação e o consumo de oxigênio. Normalmente, um litro de oxigênio consumido equivale a, aproximadamente, 4,83 kcal de energia gasta. Naturalmente não é possível realizar este teste para cada um de nós, porém conhecendo-se a necessidade média por grupo etário, sexo e atividade física, pode-se sugerir as necessidades calóricas mínimas.

Deve-se levar em consideração o efeito termogênico dos alimentos, onde uma taxa de cerca de 5 a 10% da energia total que pode ser fornecida pelo alimento, é gasta para ser digerida. Esta taxa varia de acordo com o alimento, dependendo de sua digestibilidade.

Absorção de energia recomendada para homens e mulheres.

Categoria	Idade (anos)	Peso (Kg)	Energia Necessária (kcal)
Homens	23 - 50	70	2.300 - 3.100
Mulheres	23 - 50	55	1.600 - 2.400
Grávidas	-	-	+ 300
Lactentes	-	-	+ 500

## HORMÔNIOS

Para acompanhar a importância do estudo sobre hormônios, bastaria acompanharmos o desenvolvimento de um recém-nascido, o desenvolvimento e a complexação do sistema nervoso nele e do sistema endócrino. A observação simplória que podemos fazer, acompanhando essa evolução é que o desenvolvimento desses dois sistemas se dá paralelamente e de forma integrada. O sistema endócrino é fundamental para a manutenção da homeostasia, do nosso equilíbrio em função das variações externas e internas. Os hormônios são fundamentais para isso. E por que o seu desenvolvimento deve se dá paralelamente ao sistema nervoso? Porque são os receptores do SNC que detectam essas variações do meio ambiente ou do meio interno e enviam as mensagens, os sinais para o endócrino que vai sintetizar as substâncias que vão modificar a atividade de determinados órgãos, tecidos, células... Ao modifica-la, haverá manutenção do equilíbrio.

Como é que o Sistema Nervoso pode detectar variações fazendo com que o Sistema Endócrino se responsabilize pelas reações metabólicas que vão se contrapor as essas variações? Para isso, serão dados dois exemplos. A variação de temperatura do meio externo a 14° C e nossa temperatura corporal em torno de 37° C, não há variação da nossa temperatura, porque ela foi detectada por receptores do nosso SNC que enviaram mensagem ao SE, depois de estimular o hipotálamo - centro controlador da temperatura que sinaliza para a hipófise que é preciso liberar hormônio estimulante da tireóide, com o objetivo de modificar a atividade dessa para se contrapor àquela variação. Esses hormônios vão estimular a tireóide a produzir hormônios tireoidianos que em altas concentrações são desacopladores da fosforilação oxidativa. Diminuindo a quantidade de formação de ATP, para aumentar a quantidade de energia livre para trocar com o ambiente. A variação da glicemia é outro exemplo clássico. Mas como pode o SN estar envolvido com essa variação se a insulina que não é um hormônio hipofisário?

Na medida que se libera hormônios tireoidianos na circulação, esses reprimem a síntese da fosfodiesterase. Qual o significado metabólico disso? Preserva-se AMPc (AMP cíclico), ou seja, a resposta fisiológica é a hiperglicemia, fundamental para liberação de insulina. (depende do SE diretamente e do SN indiretamente). Então, o SE é fundamental para o equilíbrio fisiológico e metabólico em função das variações do meio interno e externo. Um último exemplo, se alguém chega e te dá uma notícia ruim, você libera o hormônio de emergência que é a adrenalina, sofre-se um estresse agudo e imediatamente você contrai toda a musculatura. Para ficar tenso, é necessária energia extra para tentar se adaptar psicologicamente, mas o SE não tem a capacidade de interferir no psicológico, diretamente é uma adaptação orgânica, só que é claro que uma inadaptação orgânica pode levar a uma psicológica. E quando se tem esse estresse, ocorre o que chamamos de “frio na barriga”, a descarga de adrenalina. O significado metabólico disso é degradar glicogênio, principalmente nas células da musculatura esquelética e inundar a célula muscular de Glicose-6-fosfato para a contração muscular extra.

Esquema:

O SN com as variações do meio ambiente. Essas são detectadas por receptores do SNC que sinalizam através de impulsos nervosos estimulam o hipotálamo, que quando estimulado, sintetiza e libera os neuro-hormônios, mas a maioria dos livros chama de fatores de liberação, que estimulam a adeno-hipófise (mais precisamente as suas células secretoras) a sintetizar os seus hormônios que atuam em órgãos específicos e hormônios de ação inespecífica. O fator de liberação correspondente ao TSH é

o TRH que estimula adeno-hipófise a sintetizar e liberar TSH na circulação que tem dois níveis de atuação: em órgão alvo (glândula tireóide) a produzir T3 e T4 e pode ter uma ação inespecífica, como a ação lipolítica, em células adiposas. Os glicocorticóides têm sua síntese e liberação estimulada pela ação do ACTH, hormônio adreno corticotrófico que tem como neuro-hormônio correspondente o CRH que quando liberado estimula a produção de glicocorticóides pelo córtex das supra-renais, mas esse ACTH também tem ação inespecífica, ou seja, ação lipolítica, as células adiposas também têm receptores para ACTH. E que tipo de estímulo ocorre para a liberação de CRH e ACTH na adeno-hipófise? Os níveis de glicocorticóides na circulação. É o controle por feedback. O mesmo ocorre com TRH e TSH.

Somente a partir do início do século com o estudo de dois pesquisadores Bayliss e Starling pode se definir com exatidão hormônios que até então, desde o século XVI, eram confundidos com vitaminas que não fazem parte de nenhum componente estrutural, mas eles também não o são. Eles têm uma vida média curta e para desempenhar as suas funções fisiológicas são exigidos em pequenas concentrações assim como as vitaminas. Então, confundia-se hormônio com substância nutritiva. Só em 1904 com o trabalho desses pesquisadores é que se chegou a uma definição do conceito através de uma experiência: eles fizeram um extrato da mucosa duodenal, diluíram em HCl e injetaram (endovenosa) em rato e o que eles perceberam? Que havia estímulo da liberação de suco pancreático. Esse extrato deveria conter uma substância que excitava acordava) o pâncreas para liberar o suco e essa subst. era a secretina, primeiro hormônio descoberto. O conceito é: são substâncias de ação sistêmica produzidas em células especializadas que, quando liberadas, na circulação tem ação endócrina, modificam a atividade metabólica das células que contém receptores (contribuindo para o desenvolvimento do organismo). Observação: As prostaglandinas são colocadas como hormônios por alguns autores, entretanto, não tem ação sistêmica, não tem ação endógena e não são liberadas na circulação. Por isso, é duvidosa a afirmação. De que maneira atuam os hormônios?

Os hormônios que não entram nas células, necessitam de segundos mensageiros para fazer o seu papel dentro delas, ou seja, com exceção dos hormônios tireoidianos e esteróides, os outros precisam de segundos mensageiros. Os tireoidianos entram diretamente nas células e se ligam a receptores protéicos da cromatina nuclear com o objetivo de induzir e inibir a síntese de proteína. Por exemplo, a síntese do hormônio do crescimento só é feita na presença deles. Enquanto que os esteróides se ligam a receptores específicos citoplasmáticos que se dirigem ao núcleo para induzir ou reprimir a síntese de proteína. Os glicocorticóides vão induzir a síntese de enzimas da gliconeogênese: piruvato carboxilase, glicose-6-fosfatase.

A adrenalina (derivada de aminoácido) é micromolécula e não entra na célula, enquanto que o glucagon é um peptídeo, quase uma macromolécula e também não entra na célula. Ambos utilizam o AMPc como segundo mensageiro. Formação dele: a proteína G, subunidade estimulatória ? ligada ao GTP que estimula a adenilil ciclase. Não é indefinida a produção porque a própria subunidade tem atividade GTPásica, que ao mesmo tempo que estimula a adenilil ciclase, está hidrolisando o GTP em GDP e torna a subunidade G ? inativa que vai se ligar as outras subunidades ? e ?, formando a proteína Ginativa ligada ao GDP. Como a toxina do vibrião colérico provoca grande perda de água em poucas horas? A toxina inibe a atividade GTPásica, através da ADPribosilação, modificação covalente na proteína Gs ?, que faz com que o AMPc fique elevado indefinidamente e por que perde-se líquido, porque o AMPc elevado provoca um estímulo permanente de transporte ativo, principalmente de sódio nas células intestinais. Perda de sódio e água e se não for corrigido em pouco tempo pode levar a morte.

O inositol 3P e DAG são obtidos a partir de fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) O ácido fosfatídico que é o glicerol esterificado (geralmente a esterificação de extremidade é feita por ácido esteárico, a hidroxila ? é esterificada pelo ácido araquidônico geralmente e a terceira hidroxila é fosforilada. Qual a importância fisiológica desse fato? A partir do PIP<sub>2</sub>, obtém-se o IP<sub>3</sub> e DAG, que tem vida média curtíssima, de poucos segundos. O DAG quando metabolizado libera glicerol, ácido esteárico e araquidônico, ou seja, dá origem às prostaglandinas que são obtidas a partir do araquidonato.

Metabolizar é liberar para reaproveitar os produtos. Como se obtém a partir desse ácido fosfatídico o PIP<sub>2</sub>? Primeiro combina o ácido com inositol (álcool cíclico - 6 C, 6 OH), formando fosfatidil inositol (PI), depois é só fosforilar e formar o fosfatidil inositol 4, 5 fosfato.

Qual o mecanismo fisiológico que leva a formação dos segundos mensageiros IP<sub>3</sub> e DAG? O hormônio se liga a receptores de membrana que estimulam a enzima fosfolipase C que catalisa a transformação de DAG em fosfatidil 1,4,5 trifosfato. Qual a importância fisiológica do IP<sub>3</sub>? Aumentar a [Ca<sup>+2</sup>] citoplasmático para isso precisa mobilizá-lo de suas reservas (REL<sup>10</sup> e mitocôndria são as principais), inclusive aumentando a permeabilidade de cálcio (sinalizador celular- contração muscular, exocitose de hormônios e coagulação sanguínea) na membrana. Mas no citoplasma das células não tem fosfato? Pi + ADP não é igual a ATP? Se aumentar [cálcio] citoplasmática, e tem-se fosfato disponível, forma-se fosfato de cálcio que é insolúvel. Qual a solução para evitar a formação desses

<sup>10</sup> Retículo Endoplasmático Liso



sais insolúveis? A calmodulina é acepontora de cálcio para impedir isso. Então se forma a  $\text{Ca}^{+2}$ calmodulina, que estimula a glicogenólise. Como o IP3 pode estimular a glicogenólise? O cálcio se liga a calmodulina, e esse composto formado é uma das subunidades da fosforilase quinase, atua fosforilando a glicogênio fosforilase (fica ativa). Como a  $\text{Ca}^{+2}$  é uma subunidade da fosforilase quinase, com o aumento de cálcio para a contração muscular, a fosforilase quinase fica parcialmente ativa porque a  $\text{Ca}^{+2}$ calmodulina que é uma das suas subunidades aceita  $\text{Ca}^{+2}$ , ficando ativa parcialmente.

Qual o papel metabólico do DAG (triglicerídeo)? Papel sinérgico ao do IP3, ou seja, potencializador do IP3. Aumentar a afinidade do  $\text{Ca}^{+2}$  pela proteína quinase C. E por que é sinérgico? O IP3 não estimula a glicogenólise?

Pois bem, a PKC fosforila a glicogênio sintetase, reforçando através da inibição da síntese de glicogênio. O IP3 e DAG tem vidas médias curtas, mas como se metaboliza IP3? Pela ação sucessiva de fosfatases, obtendo inositol. O lítio inibe a reciclagem do inositol, ele é defosforilado uma vez, duas vezes, a terceira fosfatase é inibida pelo lítio e deixa-se de obter inositol e impede-se ou pelo menos diminui, a formação de IP3 por algum tempo. Não formando IP3, diminuição da atividade neuronal. Por que? Dessensibiliza as células do SN responsáveis pela formação de IP3, diminuindo a circulação de neurotransmissores.

A tirosina quinase é uma proteína de membrana. Quando a insulina ou qualquer fator de crescimento se liga a esse receptor proteico inativo, passa a ter a capacidade catalítica de se auto-fosforilar. Mas qual é a importância da fosforilação dos resíduos de tirosina no lado citosólico? Catalisa a fosforilação de algumas proteínas alfa, como por exemplo, a proteína fosfatase- é estimulada pela insulina, ficando fosfoproteína fosfatase que precisa estar fosforilada para estar ativa, ou seja a insulina se liga a tirosina quinase que se autofosforila e fica capaz de fosforilar proteína alfa do tipo fosfoproteína fosfatase 1.

#### † Propriedades Fisiológicas de hormônios

São fundamentais para desencadear as reações metabólicas e fisiológicas de determinados órgãos. Vida média curtíssima, ou entram na célula diretamente ou através de segundos mensageiros desempenham o seu papel. Esses hormônios para fazer suas funções são necessários em pequeníssimas concentrações. Por exemplo, os tiroídianos existem a  $5 \times 10^{-8}$  M.

## † Funções

- 1) Função permissiva: para que as catecolaminas exerçam as funções fisiológicas, é fundamental a presença dos tireoidianos que potencializam a ação daquelas. Hoje se sabe como é essa função do T3 e T4. Reprimindo a síntese de fosfodiesterase, aumenta a [AMPc] , então não potencializa a ação apenas da adrenalina que o usa com segundo mensageiro, potencializa a ação de todos os hormônios que utilizam o AMPc como tal, desde que células que utilizam o AMPc como segundo mensageiro, respondam aos hormônios tireoidianos. Reprime a síntese de fosfodiesterase indução da síntese de hormônio do crescimento (GH).
- 2) Homeostática (talvez a principal): a ação de um ou vários hormônios correspondem ação rigorosamente antagônica de um ou mais hormônios em qualquer situação. Ex. paratormônio antagônico a tireocalcitonina que é hipocalcêmico. A insulina tem que ter uma força muito grande para agir contra vários hormônios hiperglicemiantes.
- 3) Morfogenética: envolve crescimento e diferenciação celular. O GH em diversos estágios de desenvolvimento. Ex. O barbeiro tem cinco estágios antes de chegar à fase adulta e o hormônio para isso é o juvenil, que diminui da hemolinfa na medida que se aproxima da fase adulta. Entretanto, no nosso organismo o GH é fundamental juntamente com os tireoidianos, ele não desaparece na fase adulta e desempenha diversas funções nesse caso.
- 4) Integradora: Relação estreita entre Sistema Nervoso (SN) e Sistema Endócrino (SE).

## † Classificação

Os proteicos e esteróides (glicocorticoides e mineralocorticoides produzidos pelo córtex das supra-renais e os sexuais). Ainda tem os derivados de aminoácido, como de tirosina que são as catecolaminas e os tireoidianos; e os icosanóides que são as prostaglandinas derivadas do araquidonato.

## † Neuro-hipófise

- 1) Vasopressina ou anti-diurético ou ADH: a pressão osmótica deve ter um controle extremamente refinado (controla a vida). Deve haver hormônio ADH para inibir a liberação de água pela urina

contendo a variação da pressão osmótica. Ao mesmo tempo em que se libera o ADH, estimula-se o centro da sede, a necessidade de ingestão de água para diluir o sal que foi ingerido em excesso, controlando a pressão osmótica.

- 2) Os dois hormônios hipofisários: ADH e oxitocina (são oligopeptídeos de aminoácido, variando a estrutura apenas em dois aminoácidos) não são produzidos na neuro-hipófise, sintetizados no hipotálamo, mais especificamente nos núcleos supra-óticos e para-ventriculares, além de sintetizarem as proteínas que se ligam não-covalentemente a esses hormônios (neurofisina 1 e 2 - PM 10000 Da), que os transportam através do axônio para que eles sob a forma de vesículas fiquem acumulados na neuro-hipófise. Liberados na presença do segundo mensageiro: IP3.
- 3) O segundo efeito do ADH é elevar a pressão arterial, vasopressora. Estimula a contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, exigindo como 2º mensageiro o IP3. A partir da década de 90, vários trabalhos mostram que não há necessidade de concentrações muito elevadas para o efeito vasopressor como era dito até a década passada. O outro efeito é em nível de ductos renais, usando AMPc como segundos mensageiros que ativam enzimas que catalisam reações de fosforilação e essa fosforilação de proteína de membrana vai aumentar a permeabilidade da água, ou seja, só há reabsorção dela quando certas proteínas de membrana estão fosforiladas.

Qual o estímulo para a liberação desse hormônio? A variação da pressão osmótica pela ingestão de sal a mais, por exemplo. Essa hipertonicidade do meio provocou o estímulo, através dos osmorreceptores que ficam próximos dos núcleos hipotalâmicos, formando o ADH quando os osmorreceptores (são receptores do SNC) são ativados. A náusea estimula o centro do vômito que fica no hipotálamo, nas proximidades dos núcleos hipotalâmicos fazendo com que haja a liberação do ADH. A náusea é uma possível preliminar para perda de líquido através do vômito. A náusea, nicotina e morfina que atuam no centro do vômito estimulam a liberação de ADH. A hemorragia e desidratação também estimulam enquanto que o álcool inibe a liberação do ADH. O estresse agudo (situação de emergência) inibe a liberação de ADH, mas crônico estimula a liberação. (por exemplo, exercício físico prolongado).

A oxitocina, à semelhança do ADH, é o hormônio que provoca a ejeção do leite e tem dois níveis de atuação: contração das células mioepiteliais das glândulas mamárias. A prolactina produz o leite. Como explicar que a ejeção do leite sem o estímulo mecânico? É o estímulo do SNC. O segundo efeito fisiológico é a contração da musculatura lisa uterina. São controles independentes. O que estimula e o

que inibe a ação da oxitocina no útero? Estimula são os estrogênios através da indução de síntese de proteína receptores de oxitocina. No pré-parto, o nível de progesterona cai porque ela inibe a síntese desses receptores proteicos, portanto inibe a ação da oxitocina e cresce o número de estrogênio para aumentar os receptores para oxitocina, preparando a mãe para o futuro trabalho de parto, aumento da contração da musculatura lisa do útero.

#### † GH, Insulina, Glucagon e Adrenalina

O hormônio do crescimento ou GH, é um hormônio adeno-hipofisário que tem como fator de liberação correspondente ou neurohormônio correspondente GRH. Este hormônio GH é uma proteína com peso molecular 21.500 aproximadamente e apresenta na sua estrutura 188 aminoácidos. As ações metabólicas do GH são de relativa complexidade. Assim, adotaremos o seguinte método estudaremos separadamente o efeito desse hormônio sobre o metabolismo dos lipídios, glicídios e aminoácidos e na medida do possível integrar estes eventos.

Vamos começar pelos efeitos do hormônio do crescimento sobre o metabolismo dos lipídios. Na medida em que o hormônio de crescimento é liberado na circulação vai ocorrendo quase que simultaneamente uma inibição da captação de glicose pelos tecidos periféricos como musculatura esquelética e tecido adiposo, pois, estes são os grandes sugadores de glicose circulante. A consequência desta inibição é a hiperglicemia, então este hormônio é considerado hiperglicemiante. Não é só o GH que inibe a captação de glicose pelos tecidos periféricos, a adrenalina e o glucagon também. Deve haver uma razão metabólica e fisiológica para que isso aconteça e essa razão é a necessidade de disponibilizar glicose para as células nervosas que utiliza 90% de glicose como combustível e isso ocorre principalmente nos intervalos entre as refeições. Assim atendemos a necessidade de glicose do tecido nervoso. Mas uma questão metabólica se coloca: você inibirá a captação de glicose pelos tecidos periféricos para ajudar o tecido nervoso e como que o tecido periférico usará energia durante esse período? Eles não terão glicose disponível e que combustível será utilizado neste período? Ácidos Graxos. O GH terá que mobilizar ácido graxo para atender a demanda energética de nosso organismo. A hiperglicemia não é consequência apenas deste efeito é consequência também do fato do GH estimular gliconeogênese. A gliconeogênese precisa que suas enzimas principais sejam ativadas o que deve ser realizado pelo GH. A ação de um hormônio corresponde a uma ação antagônica de outro hormônio. No caso da regulação da glicemia a ação de vários hormônios hiperglicemiantes corresponde a ação de apenas um hipoglicemiante (a insulina).

O que é a insulina? É um hormônio protéico com 51 aminoácidos em sua estrutura, duas cadeias polipeptídicas uma com 30 aminoácidos e outra com 21 aminoácidos ligados entre si por duas pontes dissulfeto. Peso molecular de 5700. É um hormônio que é liberado quando os receptores protéicos da membrana das células beta das ilhotas de Langerhans são ocupados pela glicose. Temos então liberação de IP<sub>3</sub> no meio que irá provocar exocitose das vesículas com insulina. A exocitose é dependente do aumento intracelular de cálcio. A insulina é um hormônio hipoglicemiante seus efeitos sobre o metabolismo dos glicídios já forma citados anteriormente. Todo o metabolismo dos glicídios é controlado pela insulina e seus antagonistas (glucagon, por exemplo). A insulina aumenta a absorção de glicose pela maioria dos tecidos, nem todos o tecido nervoso não depende de insulina, caso dependesse o diabético ou a doença diabetes melitus seria de uma gravidade quase letal, pois assim teria grandes problemas para manter o sistema nervoso funcionando.

As células do fígado também não dependem tanto da insulina, mas as células da musculatura esquelética e o tecido adiposo dependem muito de insulina por serem consideradas as principais células sugadoras de glicose. A insulina aumenta a disponibilidade metabólica de glicose no meio intracelular, ao aumentar essa disponibilidade a glicose se dirige às várias vias metabólicas do tecido dependendo das circunstâncias metabólicas de cada tecido, circunstâncias essas já discutidas. Então ela é hipoglicemiante porque, primeiramente, aumenta a disponibilidade de glicose no meio intracelular, atendida a essa preliminar, a glicose estimulada pela insulina se dirige as suas várias vias metabólicas de armazenamento ou de oxidação. Se ela é hipoglicemiante e rigorosamente antagonista do GH a insulina inibiria a gliconeogênese. Para comprovar que a insulina inibe a gliconeogênese podemos seguir dois raciocínios, primeiro: se a insulina aumenta a disponibilidade de glicose no meio intracelular não necessitamos mais fazer glicose pela gliconeogênese (formação de glicose a partir de substâncias não glicídicas) já que a demanda já foi atendida; o segundo raciocínio é o seguinte: a insulina reprime a síntese da piruvato carboxilase, da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, da frutose-1,6-bisfosfatase e da glicose-6-fosfatase, as três primeiras enzimas são essenciais para a gliconeogênese. Com a inibição da glicose-6-fosfatase, aprisionamos a glicose no meio intracelular.

Veremos agora a ação do GH no metabolismo dos lipídios. Os tecidos extrahepáticos ou periféricos utilizarão ácidos graxos como substrato energético quando o GH ou outro hormônio hiperglicemiante for liberado. Assim as células adiposas devem conter receptores para GH. Essas células contêm gordura na forma de tri-acil-glicerol, cuja hidrólise depende das lipases triglicéridicas hormônio sensíveis (LTHS) que são ativas na forma fosforilada, ou seja, dependem do aumento da concentração

intracelular de AMPc, mas atenção, pois somente nas células adiposas temos o AMPc como segundo mensageiro do hormônio GH. Quem disser que estimula a glicogenólise estará completamente errado. As gorduras serão hidrolisadas em ácidos graxos e glicérol. Os ácidos graxos irão para a circulação e daí para os mais variados tecidos inclusive os tecidos periféricos cuja captação de glicose estará inibida momentaneamente (devido à ação quase imediata da insulina). Os ácidos graxos passarão a ser usados como substratos energéticos no tecido hepático. O glicérol não pode ser reaproveitado pelas células adiposas, ele irá então para o fígado onde sofrerá a ação da glicérol quinase sendo transformado em glicérol fosfato que será substrato para a gliconeogênese se transformando em di hidroxí acetona fosfato que se transformará em gliceraldeído-3-fosfato seguindo o caminho da gliconeogênese formando glicose 6 fosfato. A hiperglicemia provocada pelo GH é assegurada pela ativação da gliconeogênese.

A insulina é o único hormônio antagônico do GH no metabolismo dos lipídios. Na presença de GH há estímulo da lipólise e na presença de insulina há um estímulo a lipogênese. Para estimular a lipogênese devemos antes inibir a lipólise para preservar os lipídios que ainda existem, esta inibição da lipólise ocorrerá devido à insulina estimular a fosfodiesterase. A fosfodiesterase diminui a concentração de AMPc deixando as lipases na forma não-fosforilada inativando-as impedindo a degradação de gordura ou lipólise. A insulina ativa ainda as proteínas fosfatases defosforilando as lipases já fosforiladas. A insulina irá estimular a lipogênese, ou seja, a síntese extra mitocondrial de ácidos graxos, através das fosfatases que irão manter a ATP citrato liase e a acetil CoA carboxilase na forma ativa. A ATP citrato liase faz com que surja oxaloacetato (que não nos interessa no momento) e acetil CoA, agente iniciador da biossíntese de ácidos graxos e a acetil CoA carboxilase irá formar malonil CoA, o agente continuador da biossíntese de ácido graxo. Finalmente, falta ter disponível glicérol. Como a insulina estimula a glicólise teremos di hidroxí acetona fosfato que dará origem ao glicérol fosfato. Retomando, a lipogênese estará baseada nos seguintes fatos: estímulo a ATP citrato liase e a acetil CoA carboxilase pelas proteínas fosfatases e o fim da lipólise terá como peça principal a ação das fosfodiesterases na diminuição da concentração de AMPc. A insulina ainda estimula a formação de glicérol fosfato estimulando a glicólise. Assim a formação dos tri-acil-glicérol baseada na insulina estará completa.

A insulina age sozinha contra vários hormônios hiperglicemiantes. A adrenalina e noradrenalina, por exemplo, é um hormônio derivado de aminoácido tirosina ou da fenilalanina, não é um hormônio protéico, e produzido na medula da supra-renal. O glucagon é um hormônio protéico e tem 29 aminoácidos em sua estrutura e peso molecular de 3.500, produzido nas células alfa das ilhotas

pancreáticas. Adrenalina e glucagon atuam no metabolismo dos lipídios da mesma maneira que o GH, todos esses são lipolíticos. Em relação a glicemia, todos são hiperglicêmicos também. Mas nem em tudo eles são iguais, apenas nas conseqüências das ações é que há semelhança entre eles. A questão da hiperglicemia é, na verdade, um pouco mais refinada. O GH provoca uma hiperglicemia, impedindo a captação de glicose, nas células dos tecidos periféricos. Já a adrenalina e o glucagon estimulam a glicogenólise hepática (na verdade dizer glicogenólise hepática é uma redundância já que a quebra de glicogênio para a liberação de glicose ocorre basicamente no fígado) pela ação de AMPc. Por que todos os livros dizem então que o glucagon é o principal hormônio hiperglicemiante? Isso ocorre porque ele estimula a glicogenólise hepática e induz a ativação das enzimas da gliconeogênese (as quatro reprimidas pela insulina). A adrenalina não é considerada um importante agente hiperglicemiante por existir no hepatócito enzimas que metabolizam em segundos a adrenalina. Essas enzimas são: mono amino oxidase e catecol orto metil transferase. Elas metabolizam rapidamente a adrenalina assim que se ligam aos receptores da membrana do hepatócito por isso sua ação não é tão eficaz comparada ao glucagon. Isso ocorre por uma razão temporal, de vida média, se inibíssemos a atividade catalítica das duas enzimas que degradam a adrenalina ela teria a mesma importância do glucagon. Nas células musculares, a adrenalina é muito mais potente que o glucagon, já que nessas membranas não se é notado a presença das enzimas que degradam a adrenalina, além disso, o número de receptores para o glucagon é bem pequeno nessas células deixando seu efeito quase imperceptível. Repetindo, glucagon e adrenalina são antagônicos à insulina em relação ao metabolismo dos lipídios e glicídios. Adrenalina produzida na medula da supra renal e glucagon produzido nas células alfa das ilhotas pancreáticas, ambos os hormônios liberados por excitação, ou seja, dependentes de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Ambos têm o mesmo efeito do GH no metabolismo dos lipídios. No metabolismo dos glicídios, adrenalina e glucagon teriam os mesmos efeitos, mas a adrenalina é degradada por enzimas da membrana de hepatócitos assim que se liga a seus receptores. O glucagon irá estimular a glicogenólise hepática e induz a síntese de enzimas essenciais a gliconeogênese o que o GH não faz, ele estimula a gliconeogênese dando a ela seu substrato (glicerol) o que o glucagon também faz.

Sobre o metabolismo das proteínas, o GH a semelhança do que faz a insulina com os glicídios aumenta a disponibilidade metabólica dos aminoácidos no espaço intracelular. Então, na presença de GH há um aumento no número de aminoácidos intracelularmente. O destino destes aminoácidos prioritariamente é a formação de proteínas e quando se tem uma concentração mais elevada de aminoácidos, superando as necessidades da célula de formar as suas proteínas, o destino destes aminoácidos será, serem desaminados e servirem de substrato energético ou para a gliconeogênese. E, portanto, na presença de

GH o balanço nitrogenado será positivo. A insulina que é um hormônio antagonista do GH, glucagon e adrenalina no metabolismo dos lipídios e dos glicídios, não será no metabolismo das proteínas. Seu balanço nitrogenado será positivo também. Como se explica este fato? Na presença de insulina há inibição da gliconeogênese, como a glicose está com a sua concentração elevada no meio intracelular pela presença de insulina, não há razão de formação de mais glicose a partir de substâncias não-glicídicas (gliconeogênese). Se, temos insulina a glicose está sendo aproveitada como substrato energético, os aminoácidos então irão para a biossíntese de proteínas. Isso ocorre pelo fato de você estar carregando a célula com glicose, não necessitando usar aminoácidos como substrato energético. Como se isso não bastasse a insulina ainda estimula a absorção de aminoácidos principalmente pelas células musculares esqueléticas.

Agora são os efeitos não diretamente metabólicos. Na presença de GH há um estímulo a nível hepático a síntese de determinados polipeptídeos que antigamente eram chamados de fatores de sulfatação, e que hoje são conhecidos como somatomedinas (isso porque o hormônio de crescimento era conhecido como hormônio somatotrófico). Estudaremos as somatomedinas com mais profundidade na Morfologia. Estas substâncias são essenciais no metabolismo da cartilagem ou no crescimento da cartilagem, já que para que haja crescimento da cartilagem é fundamental a deposição de sulfato, na verdade é fundamental para a cartilagem que se forme o ácido condroitil sulfúrico ou condroitil sulfato que só é formado na presença de somatomedinas. O GH tem ainda outro papel de fundamental importância além de aumentar a síntese de proteínas, desenvolver o tecido cartilaginoso, ele aumenta ainda a matriz orgânica do osso. Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é formada de colágeno e o GH estimula a síntese de colágeno. Como podemos ainda controlar a liberação do hormônio do crescimento? A circunstância fisiológica mais óbvia que estimula a liberação do GH é a hipoglicemia. E a hiperglicemia inibe a liberação de GH.

Antigamente, costumava-se dizer que um estresse pós-cirúrgico pode levar a liberação de GH. Não é apenas uma ação sobre o sistema nervoso central, pois isso bastaria para estimular a adenohipófise, devido a relação estreita entre hipotálamo e adenohipófise, mas também a lesão tecidual que ocorre em qualquer cirurgia. E para que haja cicatrização da ferida é fundamental que haja síntese de proteínas e para tal necessita-se de GH por motivos já citados.

Mas será que isso bastaria na discussão do controle do GH? Há 20 anos atrás, em 1976, dois pesquisadores publicaram um artigo que revolucionou o controle da liberação não apenas do GH como também da insulina e do glucagon. Eles isolaram uma substância com 14 aminoácidos, tetra-deca-



peptídeo, conhecido como somatostatina. Essa somatostatina é principalmente e não unicamente formada no hipotálamo e nas células delta das ilhotas pancreáticas, que são vizinhas das células alfa produtoras de glucagon e das células beta produtoras de insulina. Ao isolarem esta somatostatina eles verificaram que ela não era um hormônio na concepção da palavra, ou seja, não possuía ação sistêmica e sim, parácrina e atuava de forma a impedir o influxo e a mobilização de cálcio bloqueando os canais de cálcio deixando as concentrações de cálcio intracelular diminuídas. Temos então a diminuição do número de complexos cálcio-calmodulina e conseqüente impedimento da exocitose. Foi verificado também que a somatostatina possui uma forma inativa de peso molecular 12.000 enquanto o peso molecular real é de 1.700, que é ativada quando há hiperglicemia, que será então o agente causador da transformação de pró-somatostatina em somatostatina. No entanto, a somatostatina não é nenhum agente hipoglicemiante já que não é liberado na circulação sanguínea, pois é de ação parácrina. Se ela é produzida no hipotálamo ela vai impedir à nível de adeno hipófise a liberação de GH e TSH (hormônio estimulador da tireóide) impedindo a entrada de cálcio. Ao inibir a liberação de GH não temos nem hipoglicemia nem hiperglicemia. As células delta pancreáticas são vizinhas das células-alfa produtoras de glucagon, que é liberado por exocitose tendo sua liberação impedida. A hiperglicemia se mantém em nível fisiológico, mas seu crescimento é impedido. Um outro artigo dois anos depois, argumentou que a somatostatina iria atuar também nas células beta produtora de insulina já que também são vizinhas das células-beta. Temos a estabilização da hiperglicemia, mas a liberação de insulina estaria inibida. Mas eles estavam raciocinando com a somatostatina na forma inativa de alto peso molecular e não levaram em consideração que a insulina na forma ativa tem apenas 14 aminoácidos, de vida média muito curta. Assim o mecanismo fisiológico fica assim: hiperglicemia chegando a um determinado patamar suficiente para ativar somatostatina, que atua de forma parácrina na inibição dos hormônios hiperglicemiantes (GH, glucagon) e ao inibir estes hormônios temos uma estabilização da hiperglicemia e não uma hipoglicemia. Como tem 14 aminoácidos a somatostatina é rapidamente metabolizada tendo vida-média curtíssima, nesse momento há uma hiperglicemia estabilizada, com a somatostatina inibida temos então uma volta da absorção de cálcio pelas células que poderá assim liberar insulina já que está havendo hiperglicemia, o principal fator de liberação da insulina.

Então temos a entrada rápida da somatostatina nessa via com a função de estabilizar a hiperglicemia e este é um fato fisiológico de extrema importância já que representa um mecanismo poupador de insulina, ou seja, ao estabilizar a hiperglicemia por um período curtíssimo em patamares fisiológicos estamos economizando insulina. Caso não houvesse este controle ao longo de poucos anos teríamos

um quadro de diabetes. Esta é a razão de pessoas obesas, com alimentação baseada em doces e amido, de vida sedentária e sem história familiar de diabetes só adquirirem provavelmente esta doença após os 50 anos devido a diminuição brutal da capacidade do pâncreas de liberar insulina. Caso não houvesse este mecanismo de regulação pela somatostatina este mesmo caso poderia ser visto 15 ou 10 anos antes do previsto.

Os hormônios sexuais (HS) são produzidos tanto nos ovários como nos testículos, adrenais e tecido adiposo. As adrenais e o tecido adiposo representam a fonte hormonal da mulher na menopausa. O precursor dos HS é o colesterol. Ele pode ser da reserva intracelular, vir de lipoproteínas plasmáticas (basicamente LDL) e do acetilCoA. Então, todos os HS produzidos nos locais acima têm como precursor o colesterol obtido das fontes descritas acima. O seu caminho é na mitocôndria e, para que ele possa entrar nesta organela, será necessária a presença de calmodulina e cálcio. Na mitocôndria, o colesterol se transforma em pregnenolona, o qual deixa a mitocôndria se dirigindo para o REL. Neste local, encerra-se o processo de produção dos HS, que vão, então, para o Golgi e daí são secretados. O caminho do HS é, pois, passar primeiramente à mitocôndria, onde é sintetizada a pregnenolona, a qual vai para o REL, no qual acaba a síntese do HS, que vai para o Golgi e é secretado. No plasma, o HS estará sempre ligado a proteínas transportadoras/ligadoras de hormônios sexuais. Este caminho é válido tanto para hormônios masculinos como femininos.

Como este processo é desencadeado? O hipotálamo, via sistema nervoso, elabora o fator de liberação de HS que vai agir na adenohipófise, a qual libera o hormônio luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH), os quais atuarão no testículo e ovário, onde são produzidos testosterona, e progesterona e estrógeno, nos ovários. O hormônio luteinizante, a nível testicular, atua nas células de Leydig, na produção de testosterona. Ela tem três formas de ação. A primeira: circula ligada a proteínas ligadoras de HS. Segundo, ela entra no citoplasma da célula de forma livre (dissociada da proteína ligadora de HS), onde se liga aos seus receptores nucleares, induzindo a síntese de novas proteínas. No caso da próstata, vesícula seminal, epidídimo, pele e folículo piloso, a testosterona vai sofrer a ação da enzima redutase, produzindo diidrotestosterona, que é a forma ativa da testosterona nestes tecidos. Uma terceira maneira da testosterona agir, no hipotálamo e hipófise, é ser transformada em estrógeno. Desta forma, potencializa a atividade androgênica da testosterona: para o hormônio agir melhor, justamente em locais onde vai ser determinado efeito comportamental, caracterização emocional e da personalidade, a testosterona terá seu efeito maior quando parte dela for transformada em estrógeno. Então, temos três maneiras da testosterona agir: ela entra na célula alvo, desligada da proteína ligadora, e induz a síntese de novas proteínas, ou é transformada em

diidrotestosterona, ou é transformada em estrógeno para potencializar seu efeito androgênico. Dizem que a testosterona, na presença de estrógeno, fará a androgenização do cérebro masculino.

Além disso, a testosterona faz a caracterização sexual secundária na próstata e vesícula seminal. Também atua na distribuição de pêlos e gordura no homem, implicando na diferença entre os biotipos masculino e feminino. Promove o aumento testicular e, em seguida, aumento peniano, que é a primeira caracterização secundária na puberdade do homem; o crescimento dos pêlos pubianos; crescimento linear (o adolescente produz testosterona a níveis ideais que permitem-no ter uma maior taxa de crescimento nesta fase; já as mulheres, quando começam a produzir estrógenos, tem deposição e calcificação da epífise, interrompendo o crescimento, e o tamanho da mulher adulta é basicamente o tamanho que tinha na primeira menstruação); crescimento da massa muscular; mudança do timbre da voz; retenção de nitrogênio e fósforo; aumento do metabolismo anabólico e das reservas de glicogênio. Tudo isso é produzido pela testosterona produzida nas células de *Leydig* sob a ação do LH.

E o que faz o FSH? Nos testículos, atua nas células de Sertoli, que são responsáveis pela nutrição das células germinativas (ou espermatogônias). Além disso, também produzem: as proteínas ligadoras de HS, responsáveis pelo transporte dos HS pela circulação, e inibina. O FSH age na célula de Sertoli, que produz espermatozóides. Mas, para isto, a testosterona tem que agir na célula de Sertoli, para que a produção de espermatozóides se faça. A inibina é capaz de inibir a produção de testosterona. Então a produção de testosterona não é contínua no homem, porque à medida que *spontoz* e inibina são produzidos nas células de Sertoli via FSH, esta inibina é capaz de inibir a produção de testosterona, chamada de produção pulsátil. Além disto, esta testosterona também vai inibir FSH e LH e ao hipotálamo. Temos, então, três mecanismos de *feedback* negativo: a inibina sobre a testosterona nas células de Leydig (inibição local); a testosterona circulante ligada às proteínas, no nível máximo (máxima: 800 ng/dl testosterona), inibindo a hipófise e o hipotálamo. Isto significa que, sendo a produção de testosterona pulsátil, a produção de *spontoz* não é contínua. Hoje, diz-se inclusive em ciclos de testosterona e ciclos de produção de espermatozóides (antes se acreditava na ocorrência contínua destas produções). Existe uma doença genética chamada síndrome de feminilização testicular, que pode ocorrer porque, no cromossoma Y tem-se o gene que determina a produção de hormônios andrógenos (testosterona e diidrotestosterona); em X, tem-se o gen que determina a formação de receptores para estes hormônios nos órgãos-alvos. Nesta doença, no cromossoma X não está codificando os gens para a produção destes receptores para hormônios andrógenos. Com isso, o homem produz estes andrógenos, mas não tem receptores e eles não podem agir. Os hormônios sexuais femininos são derivados dos hormônios sexuais masculinos. Com isto, os seus precursores biossintéticos são os andrógenos. Então, forma-se a testosterona e, a partir dela, o estrogênio e a

progesterona. Da mesma forma que no homem, LH e FSH vão ter locais determinados para atuar. O LH atua nos ovários nas células da teca interna, ou seja, a camada mais central do folículo. Já o FSH atua nas células da granulosa, que é a parte mais interna do folículo. O LH vai promover a síntese de precursores andrógenos, nas células da teca interna, que vão para as células granulosas, onde haverá, portanto, produção de estrógeno. Na mulher, então, temos já um fato controlado: somente os precursores que chegarem nas células da granulosa serão transformados em estrógenos.

Em presença de estrógeno, o FSH vai fazer a maturação do folículo ovariano. Tem também outros efeitos: crescimento/diferenciação/manutenção das células ciliadas e da atividade motora da Trompa de Falópio (toda parte de nidação do ovo fecundado ou do percurso feito pelo óvulo para ser fecundado é controlado pelo FSH); crescimento do endométrio - que varia durante o ciclo menstrual - e miométrio (ele vai atuar aumentando a atividade da via glicolítica, sintetizando ATP; ativa a fosforilase, levando à quebra do glicogênio, produzindo glicose, que é usada tanto para a produção do ATP e para a diferenciação da célula do endométrio, como também serve de substrato para o crescimento dos bacilos do Toterham, que mantêm o pH de toda a cavidade vaginal e uterina ideal (ácido, pela quebra da glicose em ácido láctico) para impedir o crescimento de outros fungos e/ou bactérias e, com isso, mulheres com deficiência deste hormônio ficarão mais suscetíveis a infecções nestas cavidades. A ativação da deposição de cálcio e ossificação das epífises nas mulheres precocemente), interrompem seu crescimento (então, quanto mais retardo houver na chegada da menstruação, mais a mulher poderá crescer, porém não tendo sua caracterização secundária); aumenta tônus vascular; diminui colesterol plasmático, enviando-o para as reservas para a síntese de hormônios, por exemplo.

Ciclo Menstrual: LH e FSH no primeiro dia começam a ser produzidos, já que a menstruação foi originada porque não houve nidação do ovo e o corpo lúteo regrediu, hormônios (estrógeno e progesterona) descem da circulação, a preparação para a nidação deixa de existir e a mulher menstrua. Eles (LH e FSH) atuarão na teca interna e na granulosa. Por volta do 14º dia tem-se a subida do FSH e do estrógeno. Logo depois, começam a cair, com o estrógeno permanecendo um pouco mais do que o FSH. A partir do 14º dia, em função de muito estrógeno circulante no plasma, teremos feedback negativo para o FSH e hipotálamo. O LH se mantém mais ou menos constante, já que sua produção é em baixas quantidades (menos que o FSH). Quando o estrógeno atinge a quantidade máxima há, literalmente, um surto de LH, por volta do 14º dia. Geralmente, cerca de 16 horas após este surto de LH ocorre a ovulação, que, portanto, coincide com o pico de estrógeno e o surto de LH. Após a

ovulação, o corpo lúteo passa a produzir estrógeno e progesterona. Então, o estrógeno é essencial para que ocorra a ovulação e a progesterona fundamental para a manutenção do ovo fecundado (nidação e desenvolvimento). Neste surto de LH, costuma ter-se aumento de temperatura corporal. Em caso de gravidez, a placenta se encarregará de produzir os hormônios para a manutenção do feto e não mais o corpo lúteo. Após a menopausa, o ovário não mais produz hormônios femininos, restringindo tal produção às adrenais e ao tecido adiposo. Porém estes locais produzem muito pouco e, após a menopausa, aconselha-se às mulheres a fazerem uso de tratamento hormonal, para evitar problemas, como a osteoporose, principal problema da mulher após a menopausa.

O córtex da adrenal utiliza colesterol livre (circulante no plasma) para sintetizar glico e mineralocorticóides. A síntese desses hormônios acontece em dois locais: na mitocôndria e no REL. A primeira reação ocorre a nível mitocondrial, onde existe um complexo enzimático chamado de desmolase que é influenciado positivamente pelo ACTH que é hormônio da adeno-hipófise que vai agir no córtex da adrenal para a síntese de glico e mineralocorticoides. O complexo enzimático está encarregado basicamente de hidroxilações no colesterol para formar os hormônios. A fonte para a síntese desses e as hidroxilações é o NADPH da via das pentoses mas ocorre também a participação do citocromo P450 que é citoplasmático ou mitocondrial. No caso da síntese de hormônios do córtex da adrenal, a partir do colesterol livre no plasma, o citocromo é mitocondrial, mas também existe a nível citoplasmático; e no citoplasma, principalmente nos hepatócitos, atua junto às mono e dioxigenases para detoxificação de metais pesados, aromáticos, pesticidas. É o agente detoxificador no fígado dos compostos tóxicos que o homem tem acesso, sobretudo pela dieta.

A desmolase vai formar a nível mitocondrial a pregnenolona. Até esse passo tudo é igual tanto para hormônio do córtex adrenal, quanto para os hormônios esteróides sexuais. Formada a pregnenolona, vai ao retículoendoplasmático liso (REL), onde vai ser formado o desoxicortisol que volta para a mitocôndria, onde vai ser formado o cortisol, e esse vai ao plasma. O cortisol é o hormônio mais importante dos glicocorticóides. A partir da pregnenolona também pode ser formada a aldosterona que é o mais importante mineralocorticóide. Então a via de síntese é a mesma. Se a partir da pregnenolona pode ser formado tanto o cortisol como a aldosterona, quem é que vai direcionar essa via? A presença de ACTH vai fazer com que haja a síntese dos dois, mas a aldosterona precisa de outros fatores além do ACTH. A aldosterona também vai para a circulação. Tanto um como o outro, circulando no plasma vão estar ligados a transcortina (proteína plasmática específica para o transporte de cortisol e aldosterona) e a albumina (proteína plasmática que transporta desde hormônios sexuais como do

córtex adrenal, como também remédios, produtos tóxicos para serem eliminados por filtração renal, então é o transportador-mor do sangue.

Cerca de 90% do cortisol está ligado a essas proteínas transportadoras e 10% estão livres, então somente 10% do hormônio está sob a forma ativa. Esses 90% são reserva, à medida que os 10% forem consumidos, outros sairão, se desligarão da albumina ou transcortina, passarão ao estado livre e efetuarão os seus efeitos a nível tecidual. Apesar de 90% do cortisol estar ligado às proteínas plasmáticas, a sua vida média na circulação é de 70 minutos. Então desde que é liberado pelo córtex da adrenal, ele tem que resistir dentro ou fora da célula, uma média de 70 min. Por o efeito dos glicocorticoides ser extremamente sistêmico e intenso é uma garantia que ele tenha a ação apenas de 70 minutos. Já a aldosterona tem 50% ligado à transcortina e albumina, só que a ligação é muito fraca fazendo com que a meia vida da aldosterona seja menor do que 70 minutos. O ACTH, a partir da formação do cortisol e aldosterona, o cortisol age via AMPc e a aldosterona via AMPc, IP3, DAG e aumento de cálcio intracelular. A aldosterona precisa do influxo de cálcio para poder agir porque mexe com as concentrações iônicas.

#### † Ação dos glicocorticóides:

São poupadores de glicose (principal fonte de energia, caminho mais rápido para obtenção de ATP) porque inibe a síntese de proteína e, ao mesmo tempo, promove-se a proteólise, as peptidases começam agir, liberando aminoácido. Então, acontece uma mobilização de aminoácido, a partir da quebra de proteína. O destino desses aminoácidos: produzir ATP e gliconeogênese. Os aminoácidos, quando desaminados, viram cetoácidos que é um intermediário do C.K. Poupando glicose, tem-se que reverter o processo a partir de outras substâncias, nesse caso os aminoácidos. A outra via é a gliconeogênese, que necessita de enzimas (constitutivas) específicas, que serão ativadas: piruvato carboxilase, fosfoenol piruvato carboxi quinase, frutose 1,6di-fosfatase, glicogênio-6-fosfatase.

Quando o glicocorticóide ativa a sintetase, age como a insulina, mas é contraditório. Quando mobiliza aminoácido, age contrariamente, pois aumentando a proteólise, é anti-insulina. Também favorece a lipólise, sendo anti-insulina nesse caso. Quando a pessoa faz regime, está em jejum para fazer determinado exame, não consegue comer por estresse... Como a pessoa sobrevive? Via glicocorticóides, só que em jejuns prolongados gerais, há a perda de massa muscular, daí se explica, por exemplo, porque uma pessoa fica flácida quando emagrece, porque os glicocorticoides

transformam proteína em aminoácido e transforma-os em glicose na síntese de ATP. O glicocorticoide é essencial, mas o seu excesso produz um desequilíbrio no metabolismo.

O glicocorticoide tem um ritmo “circadiano”, tem um pico máximo pela manhã; e ao anoitecer, o glicocorticoide circulante no sangue é próximo de zero. Então, você acorda, todas as suas funções vitais são retomadas até os alimentos entrem nas células, você, entre o despertar e a primeira refeição, tem um pico de glicocorticóides. Quando se levanta, não se deve fazer exercícios porque o corpo está liberando glicocorticóides, tendo proteólise, síntese de glicose, produção de ATP, ou seja, ele está reestabelecendo um equilíbrio para que se possa viver aquele dia. O excesso de produção de cortisol (por exemplo, quando se toma cortisona) vai favorecer a deposição de gordura no pescoço e no tronco, aparecendo a *Doença de Cushing*. Na falta total de cortisol, aparece a Doença de Addison, na qual ocorre diminuição da acuidade auditiva, olfativa e gustativa, aparece insônia, diminuição da capacidade de concentração. No plasma, existe circulando uma substância chamada de angiotensinogênio que vai ser trabalhada por uma enzima chamada renina (produzida nas células justaglomerulares dos rins) formando a angiotensina 1 que vai circular no plasma e vai sofrer a ação da enzima conversora (produzida no pulmão), transformando a angiotensina 1 em 2. A angiotensina 2 vai produzir no córtex adrenal a aldosterona e fazer o *feedback* negativo para a enzima renina. O que acontece então? Reabsorção de  $\text{Na}^+$ ; secreção de  $\text{K}^+$  e íons hidretos; reabsorção de água, por causa da reabsorção de  $\text{Na}^+$ ; liberação de ADH. Conseqüências: Aumento do volume líquido extra; aumento da osmolaridade; aumento do volume sanguíneo; aumento do débito cardíaco e aumento da pressão arterial que é inconveniente.

## ENZIMAS

Enzimas são em sua maioria, proteínas com atividade catalítica. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação, sem, no entanto participar dela como reagente ou produto.

As enzimas atuam ainda como reguladoras deste conjunto complexo de reações. As enzimas são, portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular

Existem 3 métodos para nomenclatura enzimática:

Nome Recomendado: Mais curto e utilizado no dia a dia de quem trabalha com enzimas; Utiliza o sufixo "ase" para caracterizar a enzima. Exs: Urease, Hexoquinase, Peptidase, etc.

Nome Sistemático: Mais complexo, nos dá informações precisas sobre a função metabólica da enzima. Ex: ATP-Glicose-Fosfo-Transferase

Nome Usual: Consagrados pelo uso. Exemplos: Tripsina, Pepsina, Pتيالina.

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece 6 classes:

1. Oxidoredutases: São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja: reações de oxi-redução. São as Desidrogenases e as Oxidases
2. Transferases: Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc. Como exemplo temos as Quinases e as Transaminases
3. Hidrolases: Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente. Ex: As peptidases
4. Liasas ✎ Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico. As Dehidratases e as Descarboxilases são bons exemplos



5. Isomerases ↗ Catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos. As Epimerases são exemplos.

6. Ligases ↗ Catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas de energia (ATP). São as Sintetases.

São catalisadores biológicos extremamente eficientes ↗ Aceleram em média  $10^9$  a  $10^{12}$  vezes a velocidade da reação, transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação. Atuam em concentrações muito baixas. Atuam em condições suaves de temperatura e pH. Possuem todas as características das proteínas.

Podem ter sua atividade regulada. Estão quase sempre dentro da célula, e compartimentalizadas.

Cofatores Enzimáticos:

Cofatores são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas que podem ser necessárias para a função de uma enzima. Estes cofatores não estão ligados permanentemente à molécula da enzima, na ausência deles, a enzima é inativa. A fração protéica de uma enzima, na ausência do seu cofator, é chamada de APOENZIMA. Enzima + Cofator, chamamos de HOLOENZIMA.

Coenzimas ↗ São compostos orgânicos, quase sempre derivados de vitaminas, que atuam em conjunto com as enzimas. Podem atuar segundo 3 modelos:

Ligando-se à enzima com afinidade semelhante à do substrato

Ligando-se covalentemente em local próximo ou no próprio sítio catalítico da apoenzima

Atuando de maneira intermediária aos dois extremos acima citados. As enzimas são muito específicas para os seus substratos. Esta especificidade pode ser relativa a apenas um substrato ou a vários substratos ao mesmo tempo; deve-se à existência, na superfície da enzima de um local denominado: SÍTIO DE LIGAÇÃO DO SUBSTRATO.

O sítio de ligação do substrato de uma enzima é dado por um arranjo tridimensional especial dos aminoácidos de uma determinada região da molécula, geralmente complementar à molécula do substrato, e ideal espacial e eletricamente para a ligação do mesmo.

O sítio de ligação do substrato é capaz de reconhecer inclusive isômeros óticos "D" e "L" de um mesmo composto.

Este sítio pode conter um segundo sítio, chamado SÍTIO CATALÍTICO ou SÍTIO ATIVO, ou estar próximo dele; é neste sítio ativo que ocorre a reação enzimática.

Alguns modelos procuram explicar a especificidade substrato/enzima:

Modelo Chave/Fechadura  $\approx$  Prevê um encaixe perfeito do substrato no sítio de ligação, que seria rígido como uma fechadura.

Modelo do Ajuste Induzido  $\approx$  Prevê um sítio de ligação não totalmente pré-formado, nas sim moldável à molécula do substrato; a enzima se ajustaria à molécula do substrato na sua presença.

Evidências experimentais sugerem um terceiro modelo que combina o ajuste induzido a uma "torção" da molécula do substrato, que o "ativaria" e o prepararia para a sua transformação em produto.

As enzimas aceleram a velocidade de uma reação por diminuir a ENERGIA LIVRE DE ATIVAÇÃO da mesma, sem alterar a termodinâmica da reação, ou seja: A energia dos reagentes e produtos da reação enzimática e de sua equivalente não-enzimática são idênticas. Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário chamado "Estado de Transição", sempre um composto instável e de alta energia, representado por "Ts", ligado com altíssima afinidade ao sítio catalítico. Nas reações enzimáticas, este composto de transição "Ts" não pode ser isolado ou mesmo considerado um intermediário, uma vez que não é liberado para o meio de reação; sua formação ocorre NO SÍTIO CATALÍTICO da enzima!

Como a afinidade do "Ts" ao sítio catalítico é muito maior que a afinidade do substrato com o mesmo, a pequena quantidade de moléculas em "Ts" será rapidamente convertida em produto. Assim, todo o fator que leva a um aumento do número de moléculas em "Ts" aumenta a velocidade da reação.

São 04 os mecanismos principais através dos quais as enzimas aceleram uma reação, aumentando a formação de moléculas de substrato em "Ts":

1. Catálise Ácido-Base  $\approx$  Ocorre com a participação de AMINOÁCIDO com cadeias laterais ionizáveis, capazes de doar ou liberar prótons

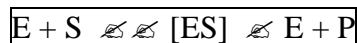
durante a catálise. A histidina, a cisteína, a tirosina e os AMINOÁCIDO ácidos são importantes aminoácidos nestes processos.

2. Torção de Substrato ⇌ Depende da torção do substrato induzida pela ligação do mesmo com o sítio de ligação da enzima, alcançando o estado de transição e estimulando sua conversão em produto.
3. Catálise Covalente ⇌ Resulta do ataque nucleofílico ou eletrofílico de um radical do sítio catalítico sobre o substrato, ligando-o covalentemente à enzima e induzindo a sua transformação em produto. Envolve com frequência a participação de coenzimas.
4. Efeito de Diminuição da Entropia ⇌ As enzimas ajudam no posicionamento e na definição da estequiometria correta da reação, facilitando os mecanismos anteriores.

### Cinética Enzimática:

É a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas, e os atores que influenciam nesta velocidade.

Uma reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação:



O complexo enzima/substrato (ES) tem uma energia de ativação ligeiramente menor que a do substrato isolado, e a sua formação leva ao aparecimento do estado de transição "Ts". A formação de "P" a partir de ES é a etapa limitante da velocidade da reação. A velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações de ENZIMA e de SUBSTRATO.

### Equação de Michaelis-Menten:

Michaelis e Menten foram duas pesquisadoras que propuseram o modelo acima citado como modelo de reação enzimática para apenas um substrato.

A partir deste modelo, estas pesquisadoras criaram uma equação, que nos permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia com a variação da concentração do substrato. Esta equação pode ser expressa graficamente, e representa o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação

enzimática. O  $K_M$  de um substrato para uma enzima específica é característico, e nos fornece um parâmetro de especificidade deste substrato em relação à enzima. Quanto menor o  $K_M$ , maior a especificidade, e vice-versa

Fatores Externos que Influenciam na Velocidade de uma Reação Enzimática:

1. Temperatura ↗ Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até se atingir a TEMPERATURA ÓTIMA; a partir dela, a atividade volta a diminuir, por desnaturação da molécula.
2. pH ↗ Idem à temperatura; existe um pH ÓTIMO, onde a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é ideal para a catálise.

Inibição Enzimática:

Os inibidores enzimáticos são compostos que podem diminuir a atividade de uma enzima. A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível. Existem 2 tipos de inibição enzimática reversível:

- ↗ Inibição Enzimática Reversível Competitiva: Quando o inibidor se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação do substrato. O efeito é revertido aumentando-se a concentração de substrato. Este tipo de inibição depende das concentrações de substrato e de inibidor.
- ↗ Inibição Enzimática Reversível Não-Competitiva: Quando o inibidor liga-se reversivelmente à enzima em um sítio próprio de ligação, podendo estar ligado à mesma ao mesmo tempo em que o substrato. Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor.

Na inibição enzimática irreversível, há modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou no sítio catalítico da enzima.

Regulação Enzimática:

Algumas enzimas podem ter suas atividades reguladas, atuando assim como moduladoras do metabolismo celular. Esta modulação é essencial na coordenação dos inúmeros processos metabólicos pela célula.

### Modulação Alostérica

Ocorre nas enzimas que possuem um SÍTIO DE MODULAÇÃO, ou ALOSTÉRICO, onde se liga de forma não-covalente um modulador alostérico que pode ser positivo (ativa a enzima) ou negativo (inibe a enzima). A ligação do modulador induz a modificações conformacionais na estrutura espacial da enzima, modificando a afinidade desta para com os seus substratos. Um modelo muito comum de regulação alostérica é a inibição por "FEED-BACK", onde o próprio produto da reação atua como modulador da enzima que a catalisa.

### Modulação Covalente:

Ocorre quando há modificação covalente da molécula da enzima, com conversão entre formas ativa/inativa. O processo ocorre principalmente por adição/remoção de grupamentos fosfato de resíduos específicos de serina.

### Enzimas na Clínica:

As enzimas podem ser utilizadas nas Análises Clínicas de 2 formas principais:

Como reagentes altamente específicos e sensíveis em reações colorimétricas quantitativas.

Como indicadores de lesão celular e tecidual ➤ O extravasamento de enzimas do meio intra para o meio extracelular leva a um aumento da atividade destas no sangue; Esta atividade pode ser medida e fornece importante informação diagnóstica e de evolução de um quadro clínico.

A distribuição órgão-específica de algumas destas enzimas permite a localização da lesão com bastante precisão. Exemplos de doenças que podem ser diagnosticadas e acompanhadas enzimaticamente são:

- O Infarto Agudo do Miocárdio
- As Hepatites
- Pancreatite
- Doenças Ósseas

Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica, que aceleram as reações metabólicas espontâneas nas células vivas e cuja propriedade mais notável é a especificidade. Entendimento deste conceito:

- 1) “Enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica”: praticamente todas as enzimas são proteínas. Mas há exceções, descobertas há 6 ou 7 anos, que foram comprovadas por experiências e que demonstram que determinados tipos de RNAm possuem atividade catalítica, ou seja, desempenham um papel de enzimas. Mas nenhuma reação metabólica tradicional é catalisada por RNAm como enzima. Nem todas as proteínas são enzimas, citando como exemplo a albumina (proteína plasmática), a insulina (hormônio), glucagon (hormônio), etc...
- 2) “Aceleram as reações metabólicas espontâneas nas células vivas”: as reações estudadas, mesmo sendo espontâneas, precisam da presença de enzimas para ocorrer de modo rápido. Temos, como exemplo, a urease: seu papel catalítico está envolvido no metabolismo da uréia e sua ausência faria com que a reação da qual faz parte levasse de 500 a 800 mil anos para completar-se; com a enzima, leva-se um milissegundo. Outro exemplo é o Ciclo de Krebs. Enzimas não retardam nenhuma reação; apenas aceleram.

Mas o que é acelerar uma reação? Sabemos que para uma molécula A se transformar em uma molécula B ela precisa adquirir energia suficiente para vencer a barreira energética desta transformação. Imaginem se colocássemos um corante hidrofílico numa bacia com água. Ocorreria a difusão dele em função de um movimento browniano de choque entre as moléculas (teoria da colisão) que faria com que elas adquirissem energia suficiente para romper a barreira energética deste fenômeno, permitindo sua realização. Uma prova para isto é que se a bacia fosse aquecida, doaríamos energia ao sistema e o fenômeno (difusão) se processaria mais rápido. É como uma “energia de ativação”. Não precisaríamos esperar que as moléculas se chocassem para adquirir energia e posteriormente se movimentassem. Entretanto, não podemos viver permanentemente num “caldeirão fervente”, até mesmo porque nossas enzimas são predominantemente proteínas e, como tais, desnaturariam, ou seja, perderiam sua atividade biológica, fisiológica, bioquímica. A explicação para a aceleração será parcial: qual o papel da enzima? Uma enzima “diminui o acaso”, ou seja, para uma substância A se transformar em B rapidamente é indispensável que A e a enzima se liguem havendo consequente mudança para B. Quando adicionamos enzimas em concentração ideal ao meio estamos conferindo maior grau de organização ao sistema (as moléculas não estão se movendo ao acaso até adquirir energia para virar B), ou seja, diminuimos a entropia deste sistema. Entropia: medida do grau de desorganização de um

sistema. Um sistema organizado (com a enzima atraindo e se ligando a A) requer menor energia de ativação. Então, na presença da enzima a reação ocorre mais rapidamente, em função de uma diminuição da entropia com o maior grau de organização ao sistema.

3) “Cuja propriedade mais notável é a sua especificidade”: há centenas de exemplos de especificidade. Tomaremos, porém, apenas dois. A especificidade as enzimas é essencial: como as enzimas são proteínas, são catalisadores orgânicos que, ao contrário dos inorgânicos, como os metais,  $H^+$ ,  $OH^-$ , os quais catalisam inúmeros tipos de reações, possuem esta especificidade, catalisando uma ou, no máximo, duas reações. No último caso, temos, na verdade, uma única reação que é, porém, reversível pela mesma enzima. Os exemplos são a especificidade ótica e a de grupo. Há três grandes grupos de alimentos ingeridos diariamente: proteínas, carboidratos e lipídios, cujas hidrólises são catalisadas por enzimas de especificidade de grupo, como as amilases, lipases, proteases, etc... Não existe uma protease que catalize quebra de lipídio, nem lipase para carboidratos: daí surge esta relação específica enzima-substrato. Há diferenças entre as enzimas de um mesmo grupo. Na especificidade ótica, temos como exemplo a glicose que é normalmente um polialcoolaldeído mas no nosso organismo encontra-se na forma M-acetálica cíclica, obtida pela migração do H do carbono 5 para o 1. Com isso há saturação da dupla ligação e haverá, através da criação de valências livres, ponte de H entre tais carbonos. Entretanto, a hidroxila do C1 pode estar à direita, sendo chamada isômero alfa, ou à esquerda, o isômero beta. A conhecida ptialina é, na verdade, a alfa-1,4-amilase-salivar, tamanha a sua especificidade, e a amilase-pancreática também é uma alfa-amilase, havendo em nosso aparelho digestivo apenas alfa-amilases. Isto quer dizer que apenas as ligações entre isômeros de glicose alfa serão hidrolisadas. Por que se recomendam alimentos ricos em fibras, ou seja, ricos em celulose, para pessoas com problema crônico de prisão-de-ventre? Poderíamos pensar que a celulose é igual ao amido e ao glicogênio por ser formada de n-moléculas de glicose. Porém, a celulose, sem exceção, não é digerida por nós porque as ligações são estabelecidas entre isômeros beta e no nosso aparelho digestivo só há enzimas para isômeros alfa. Desta maneira, sua estrutura mantém-se íntegra, dando uma forma mais rígida ao bolo alimentar, que normalmente é fluido, acelerando o peristaltismo. Daí a recomendação das fibras vegetarianas, visto que a celulose não será digerida devido à especificidade das nossas enzimas, capazes de romper apenas ligações entre moléculas isômeros alfa de glicose.

Tem-se agora um exemplo prático de reação geral enzimática, no caso, do processo de glicólise na célula. O ácido pirúvico pode transformar-se, numa reação reversível, em ácido láctico. Iremos analisar

esta reação a partir da transformação do ácido pirúvico (A) em láctico (B), ou seja, na direção de formação de ácido láctico. Então, temos que o ácido pirúvico é o substrato S da reação e o ácido láctico é o produto P da mesma e, logicamente, A é substrato e B, produto. A enzima que cataliza-a em ambos os sentidos é a LDH (lactatodesidrogenase). A equação correspondente é:  $E + S$  com formação OBRIGATÓRIA do complexo ES, ou seja, da ligação enzima-substrato, para que haja transformação do substrato em produto e forme em  $E + P$ . Esta equação é importante para salientar que a enzima, ao final do processo, é SEMPRE liberada na sua forma íntegra sob o ponto de vista estrutural, ou seja, não sofreu alterações e está pronta para catalisar novamente esta reação. Porém, como explicar que a carbonila do ácido pirúvico foi reduzida por dois átomos de hidrogênio se a enzima não sofreu alteração estrutural? É fácil: aquele que doou esses átomos foi um “auxiliar” da enzima, chamado de coenzima e pode-se concluir que sem este, ou seja, apenas na presença da enzima LDH não ocorreria reação, pois não haveria quem doasse átomos de H para reduzir a carbonila do ácido pirúvico. Então, muitas (mas não todas) reações metabólicas precisam, além da enzima, do colaborador denominado coenzima (co=colaborador). Outras reações no Ciclo de Krebs também são bons exemplos da presença de coenzimas. Verifica-se, também, que para reações de oxi-redução a presença da coenzima é sempre indispensável, e a enzima envolvida neste processo é classificada como oxi-redutase. O que é coenzima? Não é uma macromolécula como a enzima, mas sim uma substância dialisável, ou seja, uma substância de pequeno peso molecular, que pode se ligar à enzima durante a reação ou estar permanentemente ligado a ela. A maioria das coenzimas é alguma vitamina do complexo B. No caso específico da reação que vem sendo estudada é o NAD reduzido (o NAD é uma vitamina do complexo B, a niacina). Ele, então, doa seus hidrogênios ao ácido pirúvico e torna-se oxidado. Se a circunstância metabólica favorecesse a transformação do lactato em piruvato teríamos o LDH como enzima e o NAD oxidado como coenzima (que durante a reação viraria NAD reduzido).

† Conceitos: holoenzima = apoenzima + coenzima. A LDH é uma holoenzima. A holoenzima é toda enzima que, para seu perfeito funcionamento, precisa da colaboração, da presença da coenzima. E apoenzima é a própria enzima.

Observação: somente havendo a ligação entre o piruvato e a LDH é que o NAD reduzido pode agir.

O local da enzima no qual se ligará o substrato é o centro ativo, também conhecido como centro do substrato ou centro catalítico. Mas o que é centro ativo? Centro ativo é a região da enzima à qual se liga ao substrato para que haja formação do produto. Mas como isto acontece? Dois pesquisadores



alemães tentaram explicar. O primeiro, Fischer, elaborou a teoria da chave-fechadura, só modificada por outro pesquisador na década de 70 para a teoria do encaixe-induzido. A primeira teoria, excelente para entender especificidade, alegava que a enzima (a proteína), ao ser sintetizada, já vinha com o local de ligação (a fechadura) pré-formada e ao qual só se liga uma “chave”. Entretanto, com o entendimento de como as proteínas eram sintetizadas viu-se que eram enoveladas ao acaso, ou seja, a maioria das proteínas que desempenham funções é globular, isto é, são novelos, possuindo, no mínimo, uma estrutura terciária e tridimensional, podendo, então, ser movimentada (enzimas, hormônios devem ser solúveis em água para terem acesso a todas as regiões). O que muda é a forma, o modo como estes novelos são enrolados. Então, uma proteína, durante sua síntese, não poderia ter a “fechadura” pré-formada. E como fazer a ligação sem esta estrutura estar pré-moldada? Na verdade, esta região do centro ativo é formada e aparece na medida em que aumenta-se a concentração de substrato. O centro ativo deve ter ao menos dois tipos de aminoácidos: os de ligação e os catalíticos. O papel dos de ligação é, em função da carga das proteínas, exercer a atração eletrostática do substrato (princípio das cargas opostas se atraem) - a região mais positiva do LDH atrairia o piruvato. Porém a ligação eletrostática é fraca demais para o processo se desenvolver. É necessária uma ligação mais forte para fixar o substrato. Então, à medida que o substrato é atraído pelos aminoácidos de ligação, a enzima sofre uma alteração na sua forma (vale salientar que estrutura NÃO é o mesmo que forma), provocando um movimento de rotação em torno dos laços covalentes (que são as ligações peptídicas) como, analogamente, um barbante pode ser enrolado de várias formas sendo, porém, sempre a mesma estrutura: barbante. Uma determinada região pode assumir várias formas sem alterar sua estrutura. Com esta mudança conformacional, há aproximação do substrato aos aminoácidos catalíticos, entre os quais se firmará uma ligação covalente (ligação forte), para fixá-lo à enzima. Exemplos de aminoácido catalíticos: a serina, um aminoácido hidroxilado, a cisteína, um aminoácido sulfurado (com -SH) - a partir destes -OH e -SH é que se formam as ligações covalentes. É esta teoria que é chamada de encaixe-induzido.

† Fatores que influenciam a velocidade de uma reação enzimática:

Concentração do substrato, temperatura, pH (altera carga da proteína, afetando a atração eletrostática), tempo e concentração enzimática são os mais importantes, mas não os únicos. A concentração de coenzima obedece ao mesmo raciocínio da enzima, visto que toda holoenzima “só será uma verdadeira enzima funcional” se houver coenzima (sem ela, é como se não houvesse nenhuma enzima para este caso).

### 1) Concentração do Substrato:

Este é um sistema de duas variáveis: mudando (S) muda-se V. Com isso, admiti-se que todos os demais fatores estão ideais para a reação. Começaremos pela adição de substrato ao meio, levando ao aumento linear da velocidade (o aumento é proporcional à adição). Esta reta tem um limite, porque vai se formando uma hipérbole até se tornar paralelo as abcissas, tendo, pois, V constante. Este limite ocorre porque, como a concentração de enzimas é fixa, a partir de uma determinada concentração de substrato, encontraríamos toda a enzima na sua forma combinada. É como se toda enzima estivesse na sua forma combinada, ou seja, não existiriam enzimas livres no meio, havendo após esta determinada concentração à saturação da enzima pelo excesso de substrato. O perfil hiperbólico demonstra a saturação da enzima pelo excesso de substrato (a saturação corresponde à ausência de enzimas livres no meio, ou seja, todas se encontram como o complexo ES). Caso o gráfico volte a “subir” (tendo uma nova reta) é porque se colocou a concentração de enzimas num nível não saturável para aquela concentração de substrato. À medida que a concentração de substrato aumenta, conseguiremos saturar esta nova concentração enzimática, havendo novo perfil hiperbólico no gráfico. Com isso, podemos concluir que a velocidade medida quando a enzima está saturada pelo excesso de substrato (não devemos pensar que a enzima não atua mais, mas sim que ela atua na sua capacidade máxima), chamada de velocidade máxima da reação, é constante para uma determinada concentração de enzima - se mudarmos (E), mudamos  $V_{m\acute{a}x}$ .

Normalmente, as enzimas atuam em nossas células em cinética de ordem zero, ou seja, com excesso de substrato.

† Constante de Michaelis-Mentem:  $k_M$  --> é uma constante absoluta, isto é, independe de quaisquer outros fatores. Tem como exemplo na prática médica sua importância para os diabéticos não compensados (que não tomam insulina ou o faz irregularmente). Define-se como sendo a concentração de substrato que nos fornece a metade da velocidade máxima de uma reação (não confundir como sendo a metade de  $V_{m\acute{a}x}$ ). Sua importância provém de outro conceito: existe uma reação em todas as células de todos os tecidos, sem exceção, que é a fosforilação da glicose, essencial para que a glicose possa participar das vias metabólicas (fosforilar - adicionar o radical do ácido fosfórico à glicose é “sinônimo” de aprisioná-la no meio intracelular, através de uma ligação éster entre as hidroxilas do ácido e da glicose). Esta glicose na presença de ATP (que doará este grupamento de ácido fosfórico) e magnésio (que tem carga positiva e serve para facilitar a atração enzimática, funcionando como reforço de carga) dará origem à glicose-6-fosfato. Esta reação, em todos os tecidos, é catalisada pela hexoquinase (hexo: a glicose é uma hexose - possui seis carbonos; quinase: terminação de qualquer enzima que catalise uma fosforilação) que tem  $K_m = 0,1 \text{ mM}$ , ou seja, esta é a concentração de

substrato que nos fornecerá a metade da  $V_{m\acute{a}x}$ . No fígado, órgão considerado o centro do nosso metabolismo por todas as reações metabólicas importantes serem realizadas nele - daí o perigo de doenças como a hepatite, há a maior concentração relativa de glicogênio (em termos absolutos é no tecido muscular), que é a nossa reserva de glicose, e há outra enzima para esta reação, a glicoquinase. Porém, a glicoquinase quando catalisa esta reação tem  $K_M = 10 \text{ mM}$ , ou seja, precisa de uma concentração 100 vezes maior de glicose para atingir a metade de  $V_{m\acute{a}x}$ . A hexoquinase tem preferência metabólica porque em função de um menor valor de  $K_M$  é capaz de atingir a cinética de ordem zero em menores concentrações de substrato (glicose). Mas a glicoquinase assumirá a preferência quando houver um excesso de glicose circulante, para não haver hiperglicemia, aprisionando no meio intracelular a glicose (depois, veremos que ela distribui equalitativamente esta glicose - um papel “filantrópico” do fígado). De tudo isso, temos uma outra definição para  $K_M$ , como sendo uma medida do grau de afinidade entre a enzima e o seu respectivo substrato.

Quanto menor o  $K_M$ , maior a afinidade e vice-versa, porque com baixas concentrações de substrato atinge-se a metade de  $V_{m\acute{a}x}$ . A insulina é um hormônio hipoglicêmico e entre várias enzimas que ela induz a síntese de DNA, temos a glicoquinase. Num diabético não compensado o nível de insulina circulante é pouco ou quase nenhum e a glicoquinase não tem sua síntese estimulada, restando apenas a hexoquinase, que se saturaria pelo excesso de glicose entrando na célula. A glicose que não for fosforilada retorna à corrente sanguínea, levando a um quadro de hiperglicemia e glicosúria (excesso de glicose sai pela urina). Foi a partir deste estudo é que se pode o que era e como aparecia a hiperglicemia e, conseqüentemente, a glicosúria.

#### † Inibição enzimática: competitiva e não-competitiva

##### 1) Inibição competitiva:

Vamos pegar uma reação do ciclo de Krebs: a transformação do succinato ou ácido succínico em fumarato ou ácido fumárico, a reação é reversível e a enzima que cataliza essa reação nos dois sentidos é a succinato desidrogenase. Essa é uma holoenzima (enzima que precisa de coenzima), pois necessita do FAD (um dos estados ativos da riboflavina B2) que se transforma em FAD reduzido. Nas mitocôndrias ocorre uma substância conhecida como ácido malônico ou malonato que é muito semelhante ao ácido succínico (difere apenas num  $\text{CH}_2$ ) com isso ocorre a enzima é “enganada” pelo malonato. Então na verdade se ligará a enzima o análogo estrutural que estiver em maior concentração. Por exemplo, imaginemos que tenhamos colocado uma concentração maior do inibidor competitivo do

que do verdadeiro substrato então a enzima terá maior chance de se ligar ao falso substrato. Essa situação pode ser revertida basta que se acrescente maior quantidade de verdadeiro substrato.

Características da inibição competitiva:

- ?? Só ocorre na presença de analogos estruturais do verdadeiro substrato;
- ?? Ocorre apenas no centro ativo;
- ?? É reversível pelo aumento da concentração do verdadeiro substrato;
- ?? Há uma diminuição da afinidade entre enzima e substrato e conseqüente aumento do  $K_M$ ;
- ?? Velocidade máxima será igual a falta do inibidor competitivo contanto que a quantidade do substrato verdadeiro for muito maior do que a de inibidor competitivo.

Aplicação clínica: Exemplo: Bactrim? é um quimoterápico à base de sulfonamidas que pode debelar infecções respiratórias. A sulfanoamida é um análogo do ácido para-amino-benzóico, substrato essencial para síntese de ácido fólico pelas bactérias fundamental para sua biossíntese de proteínas (nós seres humanos só conseguimos produzir um tipo de vitamina - o hormônio D3 - o resto é adquirido por alimentação ou por simbiose com nossa flora intestinal). Por isso, diz-se para tomar o remédio de 12 em 12 horas, assim consegue-se manter sempre uma concentração alta desse inibidor competitivo no organismo, matando as bactérias.

No gráfico de Michaelis Menten a  $V_{m\acute{a}x}$  será igual. No dos inversos (gráfico duplo-recíproco), a reta do inibidor competitivo será mais inclinada, pois quanto maior o  $K_m$  menor a afinidade, assim o  $1/K_M$  será mais próximo do eixo das ordenadas.

2) Inibição não-competitiva:

Como exemplo de inibidores não-competitivos, temos os metais pesados como mercúrio, chumbo, prata... Eles não são análogos estruturais de qualquer substrato. Ele pode inibir as enzimas fora e dentro do centro ativo. Esses metais pesados têm a capacidade de se ligar a grupamento sulfidrilas da cisteína, um aminoácido catalítico presente no centro ativo, indispensável para fixação do substrato por ligação covalente. E a cisteína não existe só dentro do centro ativo, por isso se diz que esse tipo de inibição ocorre no e fora do centro ativo. Se o substrato se ligar a enzima inibida por metal pesado, não haverá formação de produto porque a cisteína estará bloqueada, inibindo a atividade da enzima. O grupamento SH é fundamental para as estruturas secundárias e terciárias, com isso o metal pesado pode funcionar ainda como agente desnaturante.

Há também inibidores não competitivos que bloqueiam grupamentos hidroxilas da serina ou treonina, outros aminoácidos catalíticos. O principal exemplo desse tipo de inibidor é o DFP di-iso-propil-fluorofosfato. Um exemplo disso foi o gás liberado por um terrorista no metro de Tóquio que matou muita gente que estava próxima. Um outro exemplo é o Napalm. Imaginava-se que os bloqueios dos grupamentos OH e SH eram irreversíveis, mas só são irreversíveis pelo aumento da concentração de substrato, mas são reversíveis pelo aumento da concentração de enzimas e no caso do bloqueio dos grupamentos OH da serina pode-se reverter pelo uso da pralidoxina, substância descoberta durante a guerra do Vietnã.

Características do inibidor não competitivo:

- ?? Não há alteração do  $K_M$  porque bloqueia os aminoácidos catalíticos mas, deixa livre os de ligação, não interferindo na afinidade.
- ?? Ocorre no centro ativo pela ligação com os aminoácidos catalíticos e fora dele ocorre a destruição das pontes de hidrogênio e dissulfeto desnaturando as enzimas
- ?? Há diminuição da velocidade máxima porque há uma diminuição das enzimas fisiologicamente ativas ocorrendo saturação mais rápida do substrato.
- ?? É reversível pelo aumento da concentração de enzimas e pelo uso de pralidoxina no caso de bloqueio dos grupamentos OH.

#### † Alostéria

É nome que se dá aos estudos da cinética das enzimas alostéricas. Essas enzimas ocorrem em número bem menor do que as enzimas normais. São chamadas de enzimas regulatórias ou de marca-passo, controlando a velocidade de vias metabólicas. Elas possuem além do centro ativo, um centro alostérico onde se ligam moduladores da atividade enzimática. Quando o modulador é positivo temos os ativadores alostéricos e quando negativos temos os inibidores alostéricos. O ciclo de Krebs, por exemplo, das 7 ou 8 enzimas que participam desse ciclo só 3 são alostéricas. Elas controlam a velocidade do ciclo de Krebs e conseqüentemente a cadeia respiratória. Quando a quantidade necessária de ATP for produzida, o excesso de ATP se ligará aos centros alostéricos dessas enzimas diminuindo a velocidade do ciclo de Krebs, diminuindo a formação de ATP. Quando se diminui a formação de ATP, o excesso é hidrolisado em ADP + Pi. Assim a quantidade de ATP vai baixando e a de ADP subindo, o ADP se ligará então aos centros alostéricos acelerando o ciclo de Krebs e conseqüentemente aumenta a produção de ATP. O modulador positivo, nesse caso, será o excesso de ADP e o negativo será o excesso de ATP. Esta regulação ocorre em milissegundos e funciona como

uma inibição por feedback ou retroalimentação. Então, essas enzimas são muito importantes na regulação das vias metabólicas de um modo geral.

Essas enzimas são muito mais complexas do que as enzimas normais tendo que ter no mínimo 2 subunidades proteicas para serem ativas. Exemplo: fosforilase (4 subunidades protéicas). Assim, por ser mais complexa, os primeiros substratos que se ligam terão que “desbravar” o caminho, ou seja, alterar a conformação do centro ativo realizando rotações das ligações covalentes para facilitar a ligação dos próximos substratos. Então, na presença dos ativadores há um aumento da afinidade (expondo o seu centro ativo) e dos inibidores (dificultando o acesso ao centro ativo) há uma diminuição da afinidade.

## Capítulo 6

### LIPÍDEOS

LIPÍDIOS são biomoléculas insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos. Desempenham várias funções no organismo, entre elas:

1. Reserva de energia
2. Combustível celular
3. Componente estrutural das membranas biológicas
4. Isolamento e proteção de órgãos

A maioria dos lipídios é derivada ou possui na sua estrutura, **ÁCIDOS GRAXOS**. São ácidos orgânicos, a maioria de cadeia alquil longa, com mais de 12 carbonos. Esta cadeia alquil pode ser saturada ou insaturada.

#### Ácidos graxos saturados

Não possuem duplas ligações. São geralmente sólidos à temperatura ambiente. Gorduras de origem animal são geralmente ricas em ácidos graxos saturados

#### Ácidos graxos insaturados

Possuem uma ou mais duplas ligações  $\neq$  são mono ou poliinsaturados. São geralmente líquidos à temperatura ambiente. A dupla ligação, quando ocorre em um AG natural, é sempre do tipo "cis". Os óleos de origem vegetal são ricos em AG insaturados. Quando existem mais de uma dupla ligação, estas são sempre separadas por pelo menos 3 carbonos, nunca são adjacentes nem conjugadas.

Nomenclatura de Ácidos Graxos: O nome sistemático do ácido graxo vem do hidrocarboneto correspondente.

#### Ácidos Graxos Essenciais:

O homem é capaz de sintetizar muitos tipos de ácidos graxos, incluindo os saturados e os monoinsaturados. Os AG poliinsaturados, devem ser obtidos da dieta, pois são sintetizados apenas por

vegetais. Estes ácidos graxos participam como precursores de biomoléculas importantes como as PROSTAGLANDINAS, derivadas do ácido linoleico e com inúmeras funções sobre contratibilidade de músculo liso e modulação de recepção de sinal hormonal.

#### Triacilgliceróis:

Os triacilgliceróis são lipídios formados pela ligação de 3 moléculas de ácidos graxos com o glicerol, um triálcool de 3 carbonos, através de ligações do tipo éster. São também chamados de "Gorduras Neutras", ou triglicerídeos. Os ácidos graxos que participam da estrutura de um triacilglicerol são geralmente diferentes entre si. A principal função dos triacilgliceróis é a de reserva de energia, e são armazenados nas células do tecido adiposo, principalmente. São armazenados em uma forma desidratada quase pura. Fornecem por grama aproximadamente o dobro da energia fornecida por carboidratos. Existem ainda os mono e diacilgliceróis, derivados do glicerol com um ou dois AG esterificados, respectivamente.

#### Fosfolipídios:

Ou "Lipídios Polares", são lipídios que contém fosfato na sua estrutura. Os mais importantes são também derivados do glicerol - fosfoglicerídeos - o qual está ligado por uma ponte tipo fosfodiéster geralmente a uma base nitrogenada, como por exemplo:

☞ Colina ☞ Fosfatidilcolina, ou Lecitina

☞ Serina ☞ Fosfatidilserina

☞ Etanolamina ☞ Fosfatidiletanolamina

As outras hidroxilas do glicerol estão esterificadas a AG

Os fosfoglicerídeos desempenham importante função na estrutura e função das membranas biológicas, pois são claramente anfipáticos.

#### Esfingolipídios:

São lipídios importantes também na estrutura das membranas biológicas. Formados por uma molécula de ácido graxo de cadeia longa, a esfingosina - um aminoálcool de cadeia longa - ou um de seus derivados, e uma cabeça polar alcoólica. Existem 3 subclasses de esfingolipídios:

As Esfingomielinas = Possuem a fosfocolina ou a fosfoetanolamina como cabeça polar alcoólica.



Os Cerebrosídeos = Não possuem fosfato, e sim, um açúcar simples como álcool polar - são glicosfingolipídios, ou glicolipídios.

Os Gângliosídeos = Possuem estrutura complexa, com cabeças polares muito grandes formadas por várias unidades de açúcar como, por exemplo, o ácido siálico.

Esteróides:

São lipídios que não possuem ácidos graxos em sua estrutura. Derivam do anel orgânico Ciclopentanoperidrofenantreno

Os esteróis - esteróides com função alcoólica - são a principal subclasse dos esteróides. Destes, o principal exemplo é o Colesterol. O colesterol é um esteróide importante na estrutura das membranas biológicas, e atua como precursor na biossíntese dos esteróides biologicamente ativos, como os hormônios esteróides e os ácidos e sais biliares. O excesso de colesterol no sangue é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas, principalmente o infarto agudo do miocárdio.

Lipoproteínas:

São associações entre proteínas e lipídios encontradas na corrente sanguínea, e que tem como função transportar e regular o metabolismo dos lipídios no plasma. A fração protéica das lipoproteínas denomina-se Apoproteína, e se divide em 5 classes principais - Apo A, B, C, D e E - e várias subclasses. A fração lipídica das lipoproteínas é muito variável, e permite a classificação das mesmas em 5 grupos, de acordo com suas densidades e mobilidade eletroforética:

Quilomícron = É a lipoproteína menos densa, transportadora de triacilglicerol exógeno na corrente sanguínea.

VLDL = "Lipoproteína de Densidade Muito Baixa", transporta triacilglicerol endógeno.

IDL = "Lipoproteína de Densidade Intermediária", é formada na transformação de VLDL em LDL.

LDL = "Lipoproteína de Densidade Baixa", é a principal transportadora de colesterol; seus níveis aumentados no sangue aumentam o risco de infarto agudo do miocárdio.

HDL = "Lipoproteína de Densidade Alta"; atua retirando o colesterol da circulação. Seus níveis aumentados no sangue estão associados a uma diminuição do risco de infarto agudo do miocárdio.

## DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE LIPÍDEOS E VITAMINAS

Existem enzimas que só funcionam na presença das vitaminas. Elas funcionam como suas ajudantes, sendo, portanto, essenciais para a realização das nossas reações químicas. Outras vitaminas participam da síntese de macromoléculas como, por exemplo, acetilcolina e serotonina, sem as quais não haveria neurotransmissores e as sinapses não ocorreriam, não propagando o impulso nervoso causando a ausência de resposta a qualquer estímulo (do ambiente ou do próprio organismo). Algumas vitaminas têm um papel importante na coagulação do sangue; outras, como anti-oxidantes ou até mesmo hormônios: desempenham um papel fundamental no nosso organismo. Ainda bem que a concentração exigida é da ordem dos microgramas. As vitaminas têm duas características: são ou hidrossolúveis ou lipossolúveis.

As lipossolúveis (A, D, E e K) são armazenadas no fígado. As hidrossolúveis não são armazenadas e, por isso, o excesso é eliminado pela urina; então, tomar 6, 8 ou 10 gramas de vitamina C, por exemplo, seria um desperdício... Você irá absorver alguns microgramas e o excesso sairá na urina (só em casos patológicos onde há uso de antibióticos haverá carência de outras vitaminas hidrossolúveis, havendo grande uso de vitamina C nas reações de oxi-redução).

† Tiamina: Atua como tiamina pirofosfato nas reações de oxi-redução. É essencial para a síntese de acetilcolina.

† Niacina: Atua como NAD ou NADP nas reações de oxi-redução. Quando ingerimos um substrato temos como objetivo inicial oxidá-lo: Um substrato reduzido torna-se oxidado quando perder hidrogênio, que é potencial destruidor de membranas celulares e, por isso, não pode ficar livre. Há, então, carreadores para capturá-lo. S + E-NAD (a estrutura química do NAD impede que ele transporte H<sub>2</sub>, por isso, captura um H e o outro vai para o meio aquoso). A vitamina, num ciclo, liga-se à enzima,

recebe seu equipamento de redução, entrega-o à cadeia respiratória, reoxida-se e volta ao início do ciclo. NAD participa, por exemplo, da glicólise, ciclo de Krebs e é o primeiro elemento da cadeia respiratória. Também participa da quebra de lipídios para a síntese de ATP. As reações de oxi-redução podem ser comandadas pelo NAD. Há ainda o NADP, que se liga à enzima quando oxidado. Ele é usado para a síntese redutora. Exemplos: carboidratos, lipídios, frutose-6-fosfato.

† Riboflavina: Atua nas formas FAD e FMN nas reações de oxi-redução. O FAD, que é a forma atuante no metabolismo, estará sempre ligado à enzima, ao contrário do NAD e NADP que se separam da enzima no processo. É quase um componente eterno da enzima. Sua estrutura fixa permite que ele carregue a molécula de hidrogênio ( $H_2$ ), sempre ligado à enzima, levando-a para seu destino: a cadeia respiratória. Participa do Ciclo de Krebs, da oxidação/quebra dos ácidos graxos, do metabolismo dos aminoácidos. Com isso, temos várias fontes de hidrogênio para a cadeia respiratória. Já a FMN é um dos componentes da cadeia respiratória.

† Piridoxina: Atua como piridoxal fosfato no metabolismo dos aminoácidos, síntese da serotonina (neurotransmissor) e síntese do heme da hemoglobina.

† Cobalamina (B12): Atua na síntese da mielina.

† Ácido Pantotênico: É um dos componentes da coenzima A. Qualquer substrato, para entrar numa via metabólica (de oxidação ou de síntese), tem de ser ativado para atingir um patamar energético superior ao patamar anterior e serem “reconhecidas” pelas enzimas dessa via metabólica. Uma das maneiras é unir esta molécula à nucleotídeos (ATP, GTP) ou à coenzima A, que é, portanto, responsável pelo patamar mais alto de energia de uma molécula que vai participar de uma via metabólica. O fosfato também ativa moléculas.

† Ácido Ascórbico: Em excesso, retira  $Ca^{+2}$  dos reservatórios intracelulares, o que pode elevar em excesso os níveis de  $Ca^{+2}$  no sangue, que se acumularia nos rins, levando à formação do cálculo renal. Efeito semelhante tem o stress sobre o paratormônio. As vitaminas hidrossolúveis são obtidas principalmente das bactérias intestinais. Daí a importância de quando houver ingestão de antibióticos, haver reposição artificial de vitaminas, à exceção do ácido ascórbico. São outras fontes vitamínicas: legumes, frutas, cereais integrais, leite, ovos, peixe, carnes em geral: dieta equilibrada.

‡ Vitamina K: Pré-pro-trombina tem vários aminoácidos na composição mas o ácido glutâmico é o que nos interessa porque, quando ela reage com bicarbonato e vitamina K, se transforma em protrombina porque o ácido glutâmico ganhou mais uma molécula de  $\text{CO}_2$ , virando ácido gama-carboxiglutâmico. A importância da transformação desse aminoácido é que o carboxiglutâmico. É capaz de quelar (sequestrar, guardar, unir) o cálcio, fundamental para a coagulação.

‡ Vitamina E: Família dos tocoferóis: funciona como antioxidante. Exemplo: Em todas as nossas membranas temos lipídios insaturados, ou seja, com duplas ligações que interagem com o oxigênio e radicais livres, os quais as “quebram”, tornando estes lipídios saturados. Se o lipídio exercia uma função, tendo como característica a dupla ligação, agora sendo saturado ele não a exercerá mais. A característica de pessoas mais velhas que não cuidam da saúde é ter na pele muitas manchas marrons, que são, na verdade, lipídios que mudaram sua estrutura pela ação do oxigênio e radicais livres. Em linguagem científica, é o mesmo que ocorre com a manteiga que, se exposta ao ar livre por muito tempo, ransifica-se, ou seja, entra em contato com o oxigênio, perde as duplas ligações, tornando-se saturada e muda de forma (mais mole), função e gosto. A vitamina E cobre estas estruturas lipídicas e, quando o oxigênio e radicais livres chegam, interagem com a vitamina E, mantendo intacto os lipídios de membrana, lipoproteínas e todas as outras estruturas que, por ventura, tenham ácidos graxos. A vitamina E é, então, protetora dessas macromoléculas. Encontra-se nos óleos vegetais (milho e, principalmente, girassol), azeite de oliva e grãos integrais.

‡ Vitamina D: Na nossa derme há colesterol que automaticamente torna-se mais estável hidratando-se e formando deidrocolesterol, o qual recebe radiação UV virando colecalciferol. Pensava-se que esta forma fosse a vitamina D ativa, mas observou-se que apenas 72h após formação dele observava-se vitamina D formada, concluindo-se que nesse prazo, o colecalciferol deveria passar por uma série de reações para se tornar vitamina D ativa. A radiação UV não atravessa vidro, então, receber sol diante da janela fechada não é saudável sob o aspecto da formação de vitamina D. O colecalciferol formado na derme vai ao fígado pela circulação. Lá há uma enzima, a hidroxilase, a qual irá por uma hidroxila no colecalciferol no carbono 25, tornando-o 25-hidroxi-colecalciferol. Este irá se dirigir ao rim, onde outra hidroxilase acrescentará uma nova hidroxila ao carbono 1, chamando-se 1,25-dihidroxi-colecalciferol, que é a vitamina D ATIVA!

Quando uma substância química é capaz de alterar a atividade, o metabolismo de uma célula, induzindo-a à síntese de novas proteínas, esta substância é um hormônio. Estas proteínas são proteínas

transportadoras e ligadoras de cálcio. Á nível intestinal, estas proteína aumentam a absorção de cálcio para a célula e, no osso, haverá saída do cálcio (chamado de desmineralização) do osso. Isto acarretará um aumento do nível de cálcio no sangue. O paratormônio, PTH, auxilia a vitamina D nesta atividade, impedindo a saída de cálcio via renal. A vitamina D atua mantendo a constante. Se há pouco cálcio na dieta alimentar, este sairá dos ossos. A calcitonina tem ação oposta, ativando a excreção do cálcio e o seu depósito nos ossos. Quando se toma vitamina D é para evitar que reações dependentes do cálcio, como a coagulação do sangue e Ca como segundo mensageiro, se interrompam devido a um baixo nível de Ca no sangue. A participação do Ca nos osso é função mínima. Osteoporose - perda da matriz óssea; osteomalásia - má formação óssea, “desintegração” dos ossos por falta de vitamina D, ocorrendo, por exemplo, com mulheres islâmicas que estão sempre vestidas no corpo inteiro.

† Vitamina A: A forma de vitamina A encontrada em todos os vegetais de cor amarela ou laranja é o betacaroteno, utilizado como maior anti-oxidante que se tenha conhecimento, inclusive sendo utilizado com auxiliar na prevenção de câncer intestinal, provocado pela ação de radicais livres produzidos. Na mucosa intestinal há uma enzima, a oxigenase, que, em presença de ferro e oxigênio, quebra o betacaroteno em duas moléculas de retinol. O retinol é um álcool e pode seguir vários caminhos:

?? O retinol origina retinil palmitato, que é um ácido graxo (lipídio), sendo estocado no fígado.

?? O retinol pode receber um grupamento fosfato, virando retinil-fosfato.

?? O retinol ainda pode ser oxidado, via NAD, transformando-se em retinal que poderá virar ácido retinóico.

Vitamina A é polivalente porque é ativa sob 4 formas: ácido retinóico, retinil fosfato, betacaroteno e retinol. Retinol e o ácido retinóico são hormônios que atuam ligando-se ao DNA das células epiteliais e gonadais, induzindo o crescimento e diferenciação celular destes tecidos. Antigamente, atribuiu-se isto à vitamina E, mas hoje se sabe que não. Retinil-fosfato serve para a síntese de mucopolissacarídeos, cuja base química são as glicoproteínas. Este mucopolissacarídeo é um dos componentes da mucosa, hidratando-a. Sua carência leva à pele áspera, propensa a rachaduras, que pode ocasionar infecção bacteriana ou virótica. Isto estende-se a outras mucosas, com boca e olhos, onde o ressecamento com subsequente queratinização e infecção levam à cegueira noturna ou até mesmo total.

O retinal se junta a opsina para formação do nosso pigmento fotossensível, a rodopsina. Quando um fóton de luz incide sobre a rodopsina, há separação da parte vitamínica da parte protéica, modificando o potencial, liberando cálcio e transmitindo um impulso nervoso que no centro óptico leva à formação da imagem. A falta de retinal leva à cegueira noturna (nictalopia). Apesar da identificação de uma

lipase lingual secretada pelas células da base da língua, não há a digestão salivar dos lipídios devido a não haver um refluxo para a boca. Dessa forma, a identificação de uma lipase gástrica provavelmente corresponde àquela secretada pela língua. Porém, o pH extremamente ácido do estômago não possibilita a ação integral desta lipase gástrica, diminuindo a velocidade de sua ação enzimática, havendo apenas a quebra de algumas ligações de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta. Em crianças lactentes, entretanto, o pH gástrico aproxima-se bastante da neutralidade o que indica que a lipase gástrica pode ter ação na digestão das gorduras do leite. Mesmo assim, esta digestão não é eficiente devido às gorduras não estarem emulsificadas, o que dificulta a ação desta enzima hidrolítica.

A ação gástrica na digestão dos lipídios, portanto, está relacionada com os movimentos peristálticos do estômago, produzindo uma emulsificação dos lipídios, dispersando-os de maneira equivalente pelo bolo alimentar. A chegada do bolo alimentar acidificado no duodeno induz a liberação do hormônio digestivo colecistocinina (um peptídeo de 33 aminoácidos, também denominado pancreozimina) que, por sua vez, promove a contração da vesícula biliar, liberando a bile para o duodeno. Os ácidos biliares são derivados do colesterol e sintetizados no fígado. São denominados primários (ácido cólico, taurocólico, glicocólico, quenodesoxicólico e seus derivados) quando excretados no duodeno, sendo convertidos em secundários (desoxicólico e litocólico) por ação das bactérias intestinais. A bile, ainda, excreta o colesterol sanguíneo em excesso, juntamente com a bilirrubina (produto final da degradação da hemoglobina).

A colecistocinina possui, ainda, função de estímulo do pâncreas para a liberação do suco pancreático, juntamente com outro hormônio liberado pelo duodeno, a secretina. O suco pancreático possui várias enzimas digestivas (principalmente proteases e carboidratases) sendo a lipase pancreática a responsável pela hidrólise das ligações ésteres dos lipídios liberando grandes quantidades de colesterol, ácidos graxos, glicerol e algumas moléculas de mono-acil-gliceróis. Os lipídios livres são, então, emulsificados pelos sais biliares em micelas e absorvidos pela mucosa intestinal que promove a liberação da porção polar hidrófila (sais biliares) para a circulação porta hepática e um processo de ressíntese dos lipídios absorvidos com a formação de novas moléculas de tri-acil-gliceróis e ésteres de colesterol, que são adicionados de uma proteína (apo-proteína 48, ou apo-48) formando a lipoproteína quilimíocron, que é absorvida pelo ducto linfático abdominal, seguindo para o ducto linfático torácico e liberada na circulação sanguínea ao nível da veia jugular.

## VITAMINAS

VITAMINAS	FORMA ATIVA	FUNÇÃO BIOQUÍMICA
B1 TIAMINA	Tiamina-Pirofosfato (TPP)	Coenzima na descarboxilação oxidativa de alfacetoácidos
B2 RIBOFLAVINA	Componente de FAD e FMN	Coenzima de transferência de hidrogênio
B3 NICOTINAMIDA	Componente do NAD e NADP	Coenzima de transferência de Hidrogênio
B5 ÁCIDO PANTOTÊNICO	Componente da Co-A	Transferência de grupos acil e acetil
B6 PIRIDOXINA	Piridoxal Fosfato (PALP)	Transaminação descarboxilação de aminoácidos
B12 CIANOCOBALAMINA	Coenzima B12 (desoxiadenosil-cobalamida)	Cofator de reações de metilação
BIOTINA (H)	Biocitina ou Biotinilisina	Transporte de grupos CO <sub>2</sub>
	Ácido tetrahidrofólico	Transferência de grupos

ÁCIDO FÓLICO	(THF)	formil (síntese nucleotídica)
VITAMINA C ÁCIDO ASCÓRBICO	Não precisa ser ativado para exercer sua função	Cofator em reações de hidroxilação
VITAMINA A RETINOL	11-cis-retinal	Regula ciclo visual
VITAMINA D COLECALCIFEROL	1,25 diidroxi-colecalciferol	Regula $Ca^{2+}$ plasmático
VITAMINA E alfa -TOCOFEROL	Não precisa ser ativado	Antioxidante (lipídios insaturados)
VITAMINA K 2-metil-1,4-naftoquinoina	Não precisa ser ativado para exercer sua função	Síntese hepática da protrombina e fatores da coagulação sanguínea

## L-ACETIL-CARNITINA

A L-Acetil-Carnitina é uma substância que ocorre naturalmente no organismo, produzida principalmente no processo de queima de gordura. As triglicérides (reservas de gordura dentro das células adiposas) são hidrolisadas a ácidos graxos e liberados para a corrente sanguínea, daí entram na matriz mitocondrial com a ajuda da L-Acetil-Carnitina para serem oxidados. Na beta-oxidação ocorre formação de radicais acetil e, para efeito de regulamento do balanço Acetil-CoA/CoA, o seu excesso é tamponado com a L-Carnitina (carregador), formando a L-Acetil-Carnitina.

Efeitos da L-Acetil-Carnitina:

Melhora o desempenho físico: a L-Acetil-Carnitina é um agente colinomimético, sendo então capaz de se ligar ao receptor da acetilcolina. A acetilcolina é um neuro-transmissor envolvido principalmente na condução de estímulo da contração muscular. Com a administração da L-Acetil-Carnitina, teremos



uma melhora na condução do impulso nervoso nas sinapses de característica colinérgica, como pôr exemplo na condução do estímulo para a contração muscular.

Doença de Alzheimer: uma das causas da doença é um distúrbio no sistema colinérgico cerebral. Pelo fato da L-Acetil-Carnitina ser colinomimética, ela repara parcialmente esse distúrbio dando uma melhora nos sintomas da doença, como demência, inteligência lógica, habilidade crítica verbal(senso crítico), memórias verbais de longo termo, atenção seletiva.

Reinervação muscular: regeneração de nervos lesionados e a remodelagem da junção neuro-muscular - distrofia muscular progressiva e esclerose múltipla.

Efeito anti-depressivo: quanto maior o sintoma clínico da depressão, melhor será o efeito da L-Acetil-Carnitina. No estado depressivo, ocorre uma somatização em relação ao sistema cardio-vascular, que é eliminada ou diminuída coma L-Acetil-Carnitina.

Isquemia cerebral: numa condição de isquemia cerebral, a proteína é oxidada como fonte de energia. Com a administração da L-Acetil-Carnitina, ocorre melhora do metabolismo energético cerebral, sendo a L-Acetil-Carnitina utilizada no suprimento de energia, poupando as proteínas.

Fluxo sanguíneo cerebral: melhora o fluxo sanguíneo cerebral em pacientes com infarto cerebral crônico.

Anti-radicais: ação anti-radicais livres, indireta, por inibir a peroxidação lipídica.

Envelhecimento: o envelhecimento está associado coma redução da população de sítios de ligação de glutamato-N-metil-d-aspartato sensíveis no hipocampo (região do cérebro); diminuindo essa população, acelera-se o processo de envelhecimento. A L-Acetil-Carnitina bloqueia essa diminuição em idosos.

Diabetes: ameniza os efeitos da neuropatia autonômica e melhora a acuidade visual afetada pelo diabetes.

A L-Acetil-Carnitina melhora o humor, a disposição, o condicionamento cárdio-vascular, a astenia. Durante o exercício físico, ocorre maior oxidação de gordura e conseqüentemente maior produção de

L-Acetil-Carnitina, que como resultado temos essas melhoras. Usando a L-Acetil-Carnitina, temos esses resultados sem fazer o exercício.

Dosagem: a dose usual é 1,5g/dia. Sugere-se o uso de cápsulas de 500mg 3 vezes ao dia. A dosagem pode variar conforme a indicação. Nas dosagens terapêuticas não existem efeitos colaterais.

## Capítulo 7

### CARBOIDRATOS

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Para muitos carboidratos, a fórmula geral é:  $[C(H_2O)]_n$ , daí o nome "carboidrato", ou "hidratos de carbono". São moléculas que desempenham uma ampla variedade de funções, entre elas:

Fonte de energia

Reserva de energia

Estrutural

Matéria prima para a biossíntese de outras biomoléculas

#### Monossacarídeos:

São os carboidratos mais simples, dos quais derivam todas as outras classes. Quimicamente ~~≠~~ São polihidroxialdeídos (ou aldoses) - ou polihidroxicetonas (ou cetoses), sendo os mais simples monossacarídeos compostos com no mínimo três carbonos: O Gliceraldeído e a Dihidroxicetona.

Feita exceção à dihidroxicetona, todos os outros monossacarídeos - e por extensão, todos os outros carboidratos - possuem centros de assimetria (ou quirais), e fazem isomeria óptica. A classificação dos monossacarídeos também pode ser baseada no número de carbonos de suas moléculas; assim sendo, as **TRIOSES** são os mais simples, seguidos das **TETROSES**, **PENTOSES**, **HEXOSES**, **HEPTOSES**. Destes, os mais importantes são as Pentoses e as Hexoses. As pentoses mais importantes são:

~~≠~~ Ribose

~~≠~~ Arabinose

~~≠~~ Xilose

As hexoses mais importantes são:

- ✍ Glicose
- ✍ Galactose
- ✍ Manose
- ✍ Frutose

### Monossacarídeos em Solução Aquosa:

Os monossacarídeos em solução aquosa estão presentes na sua forma aberta em uma proporção de apenas 0,02%. O restante das moléculas está ciclizada na forma de um anel hemiacetal de 5 ou de 6 vértices. O anel de cinco vértices é chamado de anel furanosídico. O anel de 6 vértices é chamado de anel piranosídico. Na estrutura do anel, o carbono onde ocorre a formação do hemiacetal é denominado "Carbono Anomérico", e sua hidroxila pode assumir duas formas:

Alfa ✍ Quando ela fica para baixo do plano do anel

Beta ✍ Quando ela fica para cima do plano do anel

A interconversão entre estas formas é dinâmica e denomina-se Mutarrotação. Exemplo: Para a molécula da glicose, em solução aquosa, temos as seguintes proporções:

beta - D - Glicopirranose: 62%

alfa - D - Glicopirranose: 38%

alfa - D - Glicofuranose: menos de 0,5%

beta - D - Glicofuranose: menos de 0,5%

Forma aberta: menos de 0,02%

Monossacarídeos Epímeros ✍ São monossacarídeos que diferem entre si na posição de apenas uma hidroxila. Exemplos:

Glicose e Galactose são epímeros em C4

Glicose e Manose são epímeros em C2

### Dissacarídeos:

São carboidratos ditos Glicosídeos, pois são formados a partir da ligação de dois monossacarídeos através de ligações especiais denominadas "Ligações Glicosídicas". A Ligação Glicosídica  $\approx$  Ocorre entre o carbono anomérico de um monossacarídeo e qualquer outro carbono do monossacarídeo seguinte, através de suas hidroxilas e com a saída de uma molécula de água.

Os glicosídeos podem ser formados também pela ligação de um carboidrato a uma estrutura não-carboidrato, como uma proteína, por exemplo. O tipo de ligação glicosídica é definido pelos carbonos envolvidos e pelas configurações de suas hidroxilas. Exemplos:

Na Maltose  $\approx$  Gli alfa (1,4)-Gli

Sacarose  $\approx$  Gli alfa (1,2)-beta -Fru e Lactose  $\approx$  Gal beta (1,4)-Gli

### Polissacarídeos:

São os carboidratos complexos, macromoléculas formadas por milhares de unidades monossacarídicas ligadas entre si por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos mais importantes:

O Amido:

É o polissacarídeo de reserva da célula vegetal. Formado por moléculas de glicose ligadas entre si através de numerosas ligações alfa (1,4) e poucas ligações alfa (1,6), ou "pontos de ramificação" da cadeia. Sua molécula é muito linear, e forma hélice em solução aquosa.

O Glicogênio:

É o polissacarídeo de reserva da célula animal. Muito semelhante ao amido, possui um número bem maior de ligações alfa (1,6), o que confere um alto grau de ramificação a sua molécula. Os vários pontos de ramificação constituem um importante impedimento à formação de uma estrutura em hélice.

A Celulose:

É o carboidrato mais abundante na natureza. Possui função estrutural na célula vegetal, como um componente importante da parede celular. Semelhante ao amido e ao glicogênio em composição, a celulose também é um polímero de glicose, mas formada por ligações tipo beta (1,4). Este tipo de ligação glicosídica confere à molécula uma estrutura espacial muito linear, que forma fibras insolúveis em água e não digeríveis pelo ser humano.

Os carboidratos mais simples são denominados monossacarídeos, possuindo pelo menos um átomo de carbono assimétrico que caracteriza a região denominada centro quiral, pois fornece isômeros ópticos. Possuem de 3 a 8 carbonos, sendo denominados, respectivamente, trioses, tetroses, pentoses, hexoses, heptoses e octoses.

Os monossacarídeos de ocorrência natural mais comum, como a ribose (5C), glicose (6C), frutose (6C) e manose (6C), existem como hemiacetais de cadeia cíclica (e não na forma linear), quer na formas de furanose (um anel de 5 elementos, menos estável) ou de piranose (um anel de 6 elementos, mais estável). Esta forma cíclica (hemiacetal), resulta da reação intramolecular entre o grupo funcional (C1 nas aldoses e C2 nas cetoses) e um dos carbonos hidroxilados do restante da molécula (C4 na furanose e C5 na piranose), ocorrendo nas formas isoméricas a e b (cis ou trans), conforme a posição da hidroxila do C2 em relação à hidroxila do C1. Tais formas são interconvertidas através do fenômeno da mutarrotação.

## CARBOIDRATOS: VIAS ESPECIAIS

Além das vias clássicas de produção de energia, existem vários outros processos metabólicos envolvendo carboidratos, e com diferentes objetivos:

A Via das Pentoses Fosfato ↯ Produz NADP reduzido e pentoses para serem utilizadas pela célula em vias de biossíntese, por exemplo.

As vias de interconversão entre açúcares ↯ São numerosas vias de produção de monossacarídeos a partir principalmente da glicose.

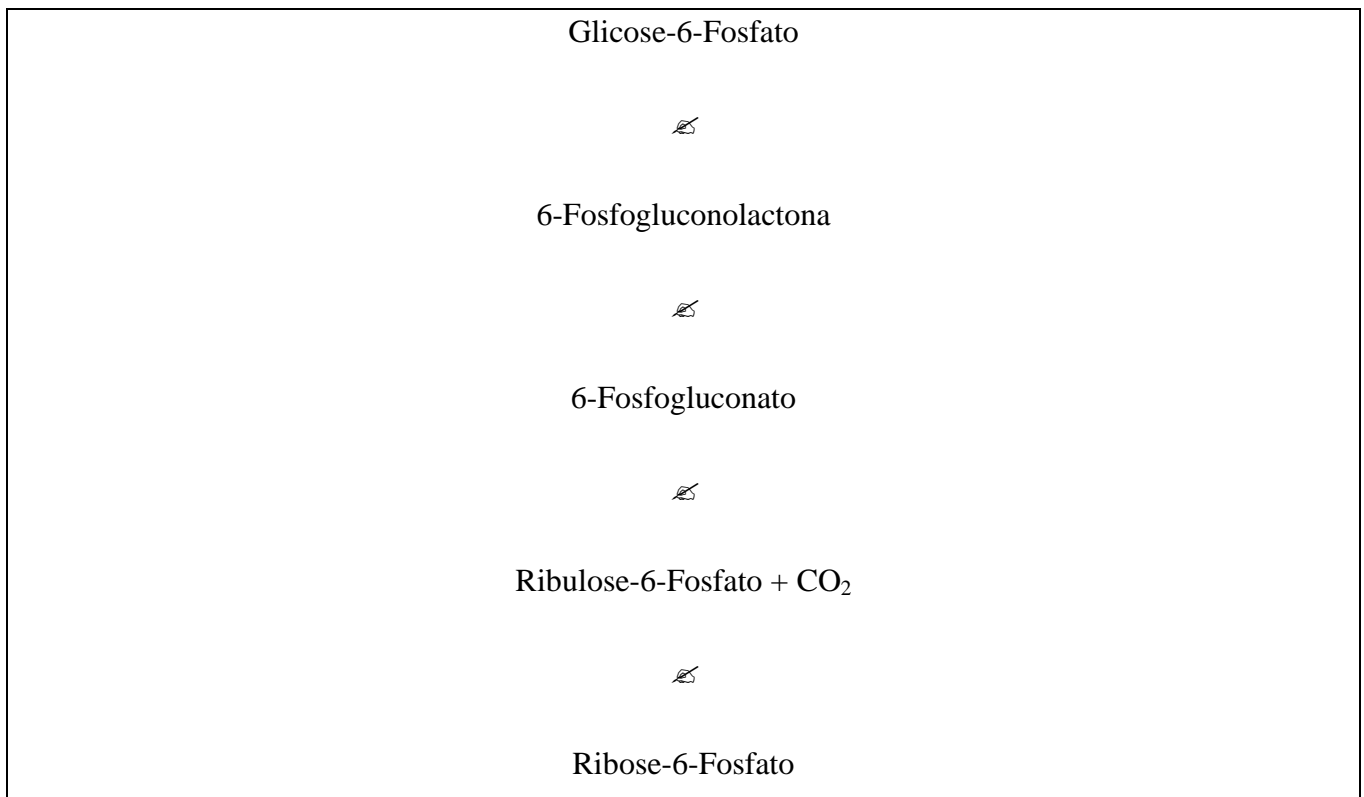
O metabolismo de carboidratos complexos e de macromoléculas  $\rightleftharpoons$  Polissacarídeos, Glicoproteínas e as Proteoglicanas, por exemplo.

A Via das Pentoses Fosfato:

Via em duas etapas que garante a produção de equivalentes redutores na forma de  $\text{NADPH}_2$ , e a produção de pentoses a partir da glicose.

Primeira Etapa: Oxidação da Glicose-6-Fosfato:

Ocorre no citossol, sendo, portanto, independente da mitocôndria e das enzimas do Ciclo de Krebs. Tem como objetivo a produção de equivalentes redutores para as vias anabólicas de biossíntese.



A Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, ou G-6-P dsd, é a enzima chave do processo, e é reguladora da via. Sua deficiência está relacionada a um severo tipo de anemia hemolítica. Em certas condições metabólicas, a via termina neste ponto, com produção de  $\text{NADH}$  reduzido e Ribose-5-Fosfato para a síntese de nucleotídeos.

Segunda Etapa: Interconversão de Pentoses-Fosfato:

Em algumas células, mais NADP reduzido é necessário do que Ribose-5-Fosfato. Nestes casos, um sistema de rearranjo entre açúcares é ativado. Este sistema permite a síntese de trioses, pentoses, hexoses, heptoses, todos processos interligados, além de servir como um "link" reversível entre a via das pentoses fosfato e a cadeia glicolítica. Assim, um possível excesso de ribose-5-fosfato pode ser convertido em intermediários da cadeia glicolítica—frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, e ser utilizado para a produção de ATP. O processo pode repetir-se ciclicamente, envolvendo seis moléculas de glicose-6-fosfato, com liberação de 12 NADPH<sub>2</sub>, e resultando em um balanço líquido de oxidação total da glicose e liberação de 6 CO<sub>2</sub>.

#### O NADPH<sub>2</sub> produzido:

Como não pode ser reoxidado na Cadeia Respiratória, o NADPH<sub>2</sub> produzido nesta via é utilizado como transportador principal de elétrons para as vias anabólicas que os utilizam em reações de redução. A manutenção da integridade das membranas dos eritrócitos, a biossíntese de ácidos graxos e de esteróides são exemplos de vias anabólicas que dependem do NADPH<sub>2</sub>.

#### A Interconversão entre Açúcares e a Formação de Nucleotídeos:

A maioria dos monossacarídeos encontrados na célula pode ser sintetizada a partir da glicose, através de uma série complexa de reações bioquímicas. Estas reações muitas vezes envolvem a formação de nucleotídeos associados a carboidratos - tais como a UDP-Gli, UDP-Gal, GDP-Man.

As reações mais comuns são:

#### Isomerização e Fosforilação:

Permitem a formação de monossacarídeos a partir da glicose de maneira direta. Como exemplos temos a conversão de Gli-6-P em Fru-6-P, a conversão de Fru-6-P em Man-6-P e a modificação da posição do fosfato na mesma molécula, como na conversão da Gli-1-P em Gli-6-P.

#### Epimerização:

É um tipo muito comum de reação de conversão entre carboidratos. Depende da formação de um intermediário ligado a um nucleotídeo, como por exemplo, a UDP-Gli e a UDP-Gal. A conversão mais comum envolve estes dois monossacarídeos-nucleotídeos:





A enzima catalizadora desta reação é a Galactose-1-P Uridil Transferase, e está ausente nos pacientes com Galactosemia Clássica, uma doença genética que leva ao surgimento de catarata, de lesões neurológicas e falência hepática.

#### Oxidação:

A oxidação da UDP-Gli leva à formação do Glicurônico, um precursor do Ascórbico em animais que sintetizam esta vitamina, e da L-Xilose, por descarboxilação.



O homem, assim como outros primatas e a cobaia não possuem uma das enzimas que converte o ácido glicurônico em ácido ascórbico, e necessita desta vitamina na dieta.

#### Descarboxilação e Transaminação:

A única via de descarboxilação conhecida de um açúcar-nucleotídeo é a de formação de UDP-Xilose a partir do UDP-Ácido. Glicurônico. A UDP-Xilose é necessária à síntese de proteoglicanas. Reações de transaminação com formação de aminoaçúcares são importantes pois, estes são precursores da síntese de muitos oligo e polissacarídeos. Exemplos: A formação de Glicosamina-6-P pela reação entre a Fru-6-P com a Glutamina:



A reação é catalisada por uma transamidase. Um outro produto da conversão da N-Acetilglicosamina é o Ácido Acetilneuramínico, um açúcar de 9 carbonos da família dos Ácidos Siálicos.

#### Biossíntese de Carboidratos Complexos:

Carboidratos complexos são oligo ou polissacarídeos formados sempre a partir de um mecanismo em comum. Neste mecanismo, a ligação glicosídica é formada pela doação do resíduo glicosil de um açúcar-nucleotídeo para um açúcar aceptor. Exemplo (onde NDP é um nucleosídeo difosfato):



A reação é catalisada por uma glicosiltransferase específica. Existem pelo menos 55 tipos diferentes de ligação glicosídica, o que sugere uma grande variedade de compostos possíveis e uma possível função

informacional para estas moléculas. Sabe-se, por exemplo que a especificidade de muitas biomoléculas se deve ao seu conteúdo em carboidratos. A especificidade imunohematológica, por exemplo, se deve a açúcares.

N-Acetilglicosamina é o açúcar determinante do tipo sanguíneo "A", e Galactose, do tipo "B"; A remoção destes resíduos da membrana dos eritrócitos os converte em tipo "O".

### Glicoproteínas:

São macromoléculas formadas por uma fração predominante protéica cujo grupo prostético é um ou mais carboidratos. A porcentagem de carboidrato nas glicoproteínas é muito variável, indo de 4 a 80 %. Estes carboidratos podem estar distribuídos ao longo de toda a proteína, ou concentrados em algumas regiões da molécula. Em diferentes espécies, muitas vezes proteínas homólogas possuem idênticas estruturas protéicas primárias, mas diferem entre si na composição em carboidratos. As glicoproteínas exercem variadas e importantes funções na célula humana, como proteínas de membrana, proteínas de exportação ao meio extracelular, hormônios, etc. A ligação entre carboidratos e proteínas se dá por ligações N-glicosil ou O-glicosil, ligações covalentes de 3 tipos principais:

Ligação N-glicosil com a Asparagina

Ligação O-glicosil com a Serina ou Treonina

Ligação O-glicosil com a Hidroxilisina

### Proteoglicanas:

Antigamente chamadas de Mucopolissacarídeos, são macromoléculas que diferem das glicoproteínas por conterem 95% ou mais de carboidratos em relação a proteínas em suas estruturas. Estas moléculas possuem, portanto propriedades mais próximas dos polissacarídeos do que das proteínas. A fração carboidrato destas moléculas é chamada Glicosaminoglicanas

As proteoglicanas são poliânions formados por um núcleo protéico ao qual se ligam muitas glicosaminoglicanas diferentes. Estas glicosaminoglicanas são formadas sempre por longas cadeias não ramificadas de unidades repetitivas de dissacarídeos, geralmente uma hexosamina e um ácido urônico, e são freqüentemente sulfatadas. Entre as funções das proteoglicanas estão a lubrificação e sustentação de tecido conjuntivo e seus elementos celulares, receptores celulares para fatores de

crescimento, proteínas transportadoras e vírus, e efeito anticoagulante, no caso da heparina. Principais tipos:

- O Hialuronato *↗* Estrutura mais simples
- Os Condroitin Sulfatos *↗* Mais abundantes
- Os Dermatan Sulfatos *↗* Têm efeito antitrombolítico
- A Heparina *↗* É um potente anticoagulante natural
- O Heparan Sulfato
- O Queratan Sulfato

A biossíntese das proteoglicanas depende da síntese do núcleo protéico, seguida da adição da fração carboidrato. A degradação depende da atividade de glicosidases e proteases. Defeitos nesta degradação leva a um quadro de Mucopolissacaridose, geneticamente caracterizada por um acúmulo de oligossacarídeos de proteoglicanas.

## Capítulo 8

### VISÃO GERAL DO METABOLISMO

Metabolismo: conjunto de reações químicas que acontecem dentro das células dos organismos vivos, para que estes transformem energia, conservem sua identidade e se reproduzam. Todas as formas de vida, desde as algas unicelulares até os mamíferos, dependem da realização simultânea de centenas de reações metabólicas, reguladas com absoluta precisão, desde o nascimento e a maturação até a morte. Anabolismo e catabolismo: existem dois grandes processos metabólicos: anabolismo ou biossíntese e catabolismo. Chama-se anabolismo, ou metabolismo construtivo, o conjunto das reações de síntese necessárias para o crescimento de novas células e a manutenção de todos os tecidos. O catabolismo, ou metabolismo destrutivo é um processo contínuo, centrado na produção da energia necessária para a realização de todas as atividades físicas externas e internas.

O catabolismo engloba também a manutenção da temperatura corporal e implica a quebra das moléculas químicas complexas em substâncias mais simples, que constituem os produtos excretados pelo corpo, através dos rins, do intestino, dos pulmões e da pele. Fontes de energia metabólica: os carboidratos, gorduras e proteínas são produtos de alto conteúdo energético ingerido pelos animais, para os quais constituem a única fonte energética e de compostos químicos para a construção de células. Estes compostos seguem rotas metabólicas diferentes, que têm como finalidade produzir compostos finais específicos e essenciais para a vida.

### METABOLISMO E TRANSPORTADORES DE ENERGIA

Princípio Geral do Metabolismo Energético:

"O catabolismo libera a energia que será utilizada no anabolismo"

Como Ocorre o Transporte de Energia?

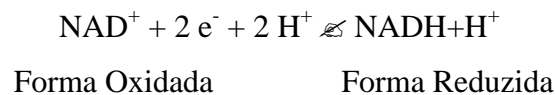
- A energia utilizada pela célula  $\approx$  Energia Química
- Esta energia química pode se apresentar de duas formas:
  - $\approx$  Na forma de pares de elétrons do átomo de hidrogênio
  - $\approx$  Na forma de compostos fosfatados

Transportadores de Elétrons:

Em termos energéticos, elétron equivale à energia para a célula. Logo, reações de oxidação – que liberam elétrons – são catabólicas, pois liberam energia, e reações de redução são anabólicas, pois utilizam elétrons/energia. Os principais transportadores de elétrons na célula são três, e funcionam de maneira muito parecida:

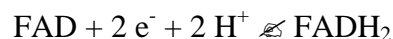
Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – NAD:

Coenzima formada por um dinucleotídeo contendo adenina, capaz de aceitar um par de elétrons do átomo de hidrogênio no catabolismo, e liberar este par de elétrons para ser utilizado no anabolismo. A reação de oxi-redução do NAD:



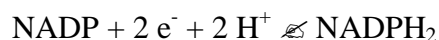
Flavina-Adenina-Dinucleotídeo – FAD

Nucleotídeo de adenina como o NAD, atua de maneira idêntica, reduzindo-se no catabolismo e oxidando no anabolismo. Reação de oxi-redução do FAD:



Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – NADP:

Muito semelhante ao NAD, possui um fosfato a mais na sua estrutura; atua de forma idêntica ao NAD. Sua reação de oxi-redução é:



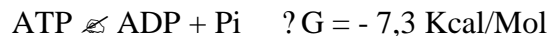
Transportadores Fosfatados de Alta Energia:

O principal composto fosfatado de alta energia presente na célula, e que é também o principal transportador de energia, é a ADENOSINA TRIFOSFATO ou ATP.

Além deste, a Fosfocreatina também desempenha papel importante no metabolismo energético.

Adenosina Trifosfato: ATP:

É um mononucleotídeo de adenina trifosfatado, que por hidrólise, libera grande quantidade de energia para a célula. Termodinamicamente:



O ATP pode ser hidrolisado, em determinadas condições, a AMP + PPi, mas a energia liberada no processo é quase na mesma quantidade que a hidrólise acima!! A energia liberada pelo catabolismo é utilizada na síntese do ATP, que a transporta ao anabolismo, onde esta é liberada pela hidrólise do ATP a ADP + Pi.

Fosfocreatina: Presente no músculo estriado e no tecido nervoso, principalmente, este composto fosfatado de alta energia atua como uma reserva de grupos fosfato, na regeneração rápida do ATP: A Reação:



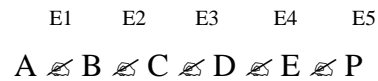
A enzima que catalisa a reação é a Creatino-Fosfotransferase, ou Creatinoquinase – CPK ou CICLO DE KREBS.

Outros Nucleotídeos Trifosfatados:

Os nucleotídeos GTP, CTP, UTP e TTP também podem atuar como transportadores de energia, de forma idêntica ao ATP, mas com muito menos frequência.

O Metabolismo Celular é um conjunto altamente organizado e complexo de reações bioquímicas, catalisadas e reguladas por enzimas. Estas reações se organizam em seqüências enzimáticas denominadas VIAS METABÓLICAS

O metabolismo celular, apesar de ser muito complexo, possui vias metabólicas centrais. Esquemáticamente:



As vias metabólicas podem ser didaticamente divididas em duas classes:

1. Vias Anabólicas
2. Vias Catabólicas

### 1. Vias Anabólicas:

São biossintetizantes e divergentes

Ocorrem com utilização de energia (são não-espontâneas)

Seguem três etapas:

- a) Compostos simples  $\rightleftharpoons$  Precursores
- b) Precursores  $\rightleftharpoons$  Unidades Fundamentais
- c) Unidades Fundamentais  $\rightleftharpoons$  Macromoléculas

### Vias Catabólicas:

Três características básicas:

São degradativas e convergentes

Ocorrem com liberação de energia (são espontâneas)

Seguem três etapas:

- a) Macromoléculas  $\rightleftharpoons$  Unidades Fundamentais
- b) Unidades Fundamentais  $\rightleftharpoons$  Produtos Comuns
- c) Produtos Comuns  $\rightleftharpoons$  Produtos Finais

### Vias Anabólicas e Catabólicas Correspondentes:

Existem na célula vias anabólicas e catabólicas correspondentes, muito parecidas entre si, mas com as etapas enzimáticas com o sentido da reação trocado. No entanto, sempre existem diferenças em pelo menos uma destas etapas.

### Compartimentalização Celular

#### Viabilidade Energética:

Muita vezes, a simples inversão do sentido da reação não é possível por ser a reação no, sentido do anabolismo, energeticamente inviável para a célula.

## **METABOLISMO DO GLICOGÊNIO E MECANISMOS DA DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE CARBOIDRATOS (RESPIRAÇÃO CELULAR)**

### Metabolismo do glicogênio

Por que estudar a síntese e degradação do glicogênio? Por ser a principal forma de reserva de glicose dos animais. Pode ser sintetizado na maioria dos tecidos apesar de quantitativamente, ter importância em dois basicamente: o tecido estriado esquelético e o hepático. Outros tecidos que tenham a capacidade de armazenar glicose sob forma de glicogênio, se o fazem, é em quantidade desprezível para a própria célula e para o organismo. Mesmo sendo os tecidos hepático e muscular capazes de armazenar glicogênio, sob o ponto de vista qualitativo e fisiológico é mais importante fazê-lo no fígado do que nas células musculares. Nominalmente, a quantidade de glicogênio do fígado é muito maior do que das células musculares, mas também é preciso levar-se em conta que a massa de tecido muscular é muito maior. Relativamente às células do fígado armazenam muito mais. Sob o aspecto fisiológico, o fígado é o órgão “nobre” do metabolismo celular, o centro nervoso do metabolismo celular, de forma que armazenar glicose sob forma de glicogênio no fígado é extremamente importante porque neste há uma enzima a glicose-6-fosfatase (que também existe nas células renais e intestinais)



capaz de catalisar a reação de transformação de glicose-6-fosfato em glicose livre que a aprisiona no meio intracelular<sup>11</sup>.

O fígado, então, é capaz de armazenar glicose sob a forma de glicogênio para uma posterior utilização quando, degradando os seus depósitos de glicogênio e utilizando-se da enzima glicose-6-fosfatase pode liberá-la no meio extracelular, sustentar os outros tecidos, mantendo o equilíbrio hiperglicemia e hipoglicemia. O fígado tem esse papel por que consegue armazenar maior quantidade relativa e porque possuía enzima que libera a glicose para a circulação. Ao contrário, a musculatura esquelética é capaz de armazenar uma quantidade bruta de glicose, maior do que o fígado, no entanto, essa não possui glicose-6-fosfatase. O músculo precisa muito da glicose, de forma que não pode armazená-la. Ela é o seu combustível mais facilmente mobilizável. Por que, então estudar o metabolismo do glicogênio?

?? Por que é a principal forma de reserva de glicose nos animais.

?? Por que é principalmente depositário da glicose nas células musculares e no fígado.

?? Por que fígado por sintetizar a maior quantidade do glicogênio e por conter a enzima que catalisa a transformação da glicose-6 em glicose livre, alimenta de glicose os tecidos entre as refeições. Armazena na hiperglicemia e libera na hipoglicemia.

O músculo não faz isso, por que ele armazena para a sua própria utilização. A glicose que entra na célula muscular será obrigatoriamente oxidada. Na célula renal há a tal enzima, mas essa não tem importância na manutenção da glicemia. A cél do intestino interfere na glicemia, pois possui a enzima depois que há a absorção dos nutrientes ela precisa utilizá-la para liberação da glicose na circulação.

#### † Degradação do glicogênio ou glicogenólise

Nós ingerimos na alimentação várias formas de glicídios, principalmente o amido que é degradado em glicose e entra na célula intestinal, sofre a ação da glicoquinase e da hexoquinase<sup>12</sup> que a transforma em glicose-6-fosfato, que sob a ação d outra enzima, glicose 6 fosfato, sai da célula e cai na corrente. No fígado, sob a presença de hexoquinase e glicoquinase a se acumula até atingir o excesso quando passa a se produzir glicogênio, que é um depositário momentâneo podendo ser degradado. Outra via é a glicólise, sua oxidação. Por último têm-se uma via alternativa de oxidação não tão importante quanto a glicólise: via das pentoses.

<sup>11</sup> Como as células nervosas, que vivem essencialmente do metabolismo da glicose, viveriam no intervalo entre as refeições? Vale uma discussão...

<sup>12</sup> Enzimas dependentes do íon magnésio (Mg<sup>++</sup>)

A glicólise tem a utilidade de produzir ATP, principal forma de conservação de energia no meio intracelular de forma que, degradar o glicogênio, significa aumentar os níveis de ATP intracelular. Altas concentrações de ATP significam tendência a polimerização da glicose para posterior utilização.

#### ‡ Parte química e regulação hormonal

##### 1) Glicogenólise

O glicogênio é formado basicamente por ligações glicosídicas do tipo alfa-1,4.

Ligação glicosídica é a saída de uma molécula de água e a formação de uma ponte de oxigênio entre os carbonos 1 e 4. “Alfa” porque a hidroxila (estrutura M acetálica) está à direita. E as ramificações são iniciadas com um carbono alfa 1, 6 seguido de ligações alfa 1, 4. Assim, as enzimas que devem estar presentes para a degradação do glicogênio devem atuar basicamente nas ligações alfa 1,6 e alfa 1,4. Por outro lado, para a polimerização do glicogênio a mesma especificidade de enzimas serão necessárias (para alfa 1,4 e alfa 1,6). A principal enzima para a degradação do glicogênio é para as ligações alfa 1,4, alfa glicogênio fosforilase ou somente fosforilase, mas essa enzima possui uma especificidade refinada, de forma que só atua nas ligações alfa 1,4 que estejam até quatro unidades de glicose do ponto de ramificação. É uma enzima que catalisa a hidrólise (fosforólise) do polissacarídeo (nas ligações alfa 1,4) com a introdução de um ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) ou fosfato inorgânico  $P_i$  tendo como produto a glicose 1 fosfato cujo caminho metabólico será se transformar em glicose 6 fosfato pela fosfoglicomutase que é um enzima dependente do magnésio ( $Mg^{++}$ ).

Agora, no fígado, a molécula de glicose-6-fosfato pode ser transformada em glicose livre pela glicose-6-fosfatase. Mas temos ainda uma cadeia de glicose com as ramificações e quatro subunidades de glicose ao lado de cada molécula de glicose alfa 1,6, porém a enzima que catalisa a fosforólise da molécula alfa 1,6 só atua quando as moléculas envolvidas não estão ligadas a outras subunidades. Para solucionar esse problema, temos uma enzima que faz a transferência das moléculas de glicose ligadas em alfa 1,6 para outras cadeias. Esta enzima é uma transferase ou enzima desramificante. Esta é uma enzima multifuncional, possuindo dois centros ativos em uma única cadeia polipeptídica (subunidade protéica) sem que se trate de uma enzima alostérica. Um centro ativo é responsável pela transferência das três subunidades de glicose ao lado da ligação alfa 1,6 para a estrutura linear ou qualquer outra ramificação de forma que seja catalisada a fosforólise dessa ligação pelo outro centro ativo quando a enzima assume o nome de alfa 1,6-glicosidase.

† Resumindo: com a ação da fosforilase tivemos a obtenção de glicose-1-fosfato e uma molécula de glicogênio reduzida com várias ramificações do tipo alfa 1,6 ligadas a três monômeros de glicose. Para que atue a alfa 1,6 glicosidase é necessária a transferência das sub unidades de três carbonos para qualquer outra cadeia pela transferase (enzima desramificante) quando, então a alfa 1,6 glicosidase pode agir. Todo esse processo de catálise é realizado por uma mesma enzima que possui dois centros ativos. O controle fino do metabolismo do glicogênio é a glicemia: hipoglicemia e hiperglicemia que não necessariamente representam doença, podendo ser apenas fisiológico<sup>13</sup>.

## 2) Glicogênese ou Síntese do Glicogênio

O excesso de glicose tende a ser armazenado sob a forma de glicogênio para isso, a glicose intracelular (glicose-6-fosfato) deve ser transformada em glicose-1-fosfato, que é o monômero do glicogênio pela ação da fosfoglicomutase, na presença de  $Mg^{++}$ , porém notou-se que a presença de glicose-1-fosfato não era o suficiente para a formação do glicogênio, o UTP (uridina tri fosfato) era fundamental nesse processo, sem a qual o processo não ocorre. O seu papel é se ligar com a glicose, formando o UDPG, e ser seu “carreador”, um intermediário que vai liberar a glicose quando for formar o glicogênio. Da reação entre a glicose-1-fosfato e o UTP catalisada pela UDPG pirofosforilase temos como subprodutos o UDPG e  $PP_i$ , o pirofosfato, que irá se quebrar em dois  $P_i$ <sup>14</sup>. A principal enzima na síntese do glicogênio é a glicogênio sintetase porque ela é quem forma as ligações glicosídicas do tipo alfa 1,4. Do mesmo modo tem de se ter pelo menos mais uma enzima para a formação dos pontos de ramificação. Mas a montagem do glicogênio não é toda linear de forma que ao se chegar na 11ª unidade de glicose entra a enzima ramificante que pega um grupo de, em média, sete unidades de glicose de uma cadeia qualquer e faz uma ramificação que dista obrigatoriamente no mínimo quatro unidades de glicose de uma outra.

## 3) Primer

A molécula de glicogênio precisa de um molde para ser sintetizada. Esse molde é chamado de primer. Só a partir dele é que o glicogênio se forma. O primer é formado de uma proteína, a glicogenina que tem atividade catalítica (é uma enzima), e tem em uma das extremidades um resíduo de tirosina que é um aminoácido hidroxilado e o fato de ela ter uma hidroxila fenólica, favorece a ligação com a molécula de glicose (que é um aldeído polialcólico) cedida pelo UDPG<sup>15</sup>. Quando

<sup>13</sup> A hipoglicemia exagerada causa o desmaio, pois é um recurso de emergência para a economia de glicose.. impedindo uma pane metabólica irreversível.

<sup>14</sup> Esse fosfato inorgânico é fundamental na formação do ATP.

<sup>15</sup> Ligação éster

tiverem no mínimo oito moléculas de glicose ligadas, a glicogênio sintetase passa a atuar. O primer nunca se desliga do glicogênio.

### † Degradação do glicogênio

A principal enzima que catalisa a degradação do glicogênio é a glicogênio fosforilase. Esta pode se apresentar no citoplasma de duas formas: ativa (a) e inativa (b). A primeira possui um radical fosfato (ácido fosfórico no radical<sup>16</sup> serina<sup>17</sup> do seu centro ativo) e a segunda não<sup>18</sup>. Assim, para haver a fosforilação gasta-se ATP e a reação é catalisada por uma quinase, a fosforilase quinase que, por sua vez, também existe no citoplasma sob duas formas: inativa (b) e ativa (a), fosfatada. Para que haja a degradação do glicogênio, é fundamental que a glicogênio fosforilase esteja ativa e para que ela esteja ativa, e necessário ativar também a fosforilase quinase gastando, nesse processo duas moléculas de ATP. A fosforilase quinase é ativada por uma quinase (proteína quinase A) estimulada alostericamente pelo AMP<sub>c</sub>. Por que, então, a elevação da concentração citoplasmática de AMP<sub>c</sub> causa a elevação dos níveis de glicemia, mesmo que fisiológica? Por que a elevação do AMP<sub>c</sub> ativa alostericamente a proteína quinase A que, com o consumo de um ATP ativa (fosforilando) a fosforilase quinase que, por sua vez, fosforila a glicogênio fosforilase com o consumo de mais um ATP. Desta forma a glicogênio fosforilase ativa degrada o glicogênio em glicose-1-fosfato que se transforma em glicose 6 fosfato que na presença da glicose 6 fosfatase a transforma em glicose livre elevando a glicemia. A adrenalina e o glucagon são hormônios glicemiantes por que aumentam a [AMP<sub>c</sub>] citoplasmática que desencadeia todo o processo anterior.

### † Glicólise

#### 1) Ciclo de Cori

Mais precisamente Ciclo de Cori and Cori. A primeira dúvida que paira com relação à já vista glicólise é: em anaerobiose o piruvato transforma-se em lactato que em altas concentrações nas células musculares irá voltar a se transformar em piruvato na presença de uma holoenzima (lactato desidrogenase + NAD reduzido (no sentido do lactato) ou NAD oxidado (no sentido do piruvato)). Mas nos músculos há uma situação de anaerobiose portanto, a transformação do lactato em piruvato é inviável. Então, sendo o lactato uma molécula pequena (de apenas três carbonos) e por meio do

<sup>16</sup> Resíduo

<sup>17</sup> Aminoácido catalítico

<sup>18</sup> Serina é um aminoácido catalítico que só se liga ao seu substrato estando fosforilada

gradiente de concentração esse lactato em excesso irá para circulação. Quando se inunda a circulação com lactato ocorre queda do pH sanguíneo, por isso ele vai rapidamente para o fígado, célula hepática onde este lactato em meio aeróbico vai ser transformado em piruvato. Este piruvato formado será extra e não será necessário ao metabolismo da célula hepática, pois é derivado de uma lactato de uma outra célula, no caso a muscular fazendo falta nesta célula. O fígado possui uma forma alternativa de formação de glicose ou glicogênio através de substâncias não-glicídicas - é a gliconeogênese. Por exemplo, o piruvato não é um glicídio e sim um cetoácido. Esta cota extra de piruvato pode então formar por gliconeogênese glicose-6-fosfato que pela ação da glicose-6-fosfatase (uma enzima de membrana) irá formar glicose livre que irá para a célula muscular. Lá, pela ação da hexoquinase na presença de  $Mg^{++}$  teremos a glicose-6-fosfato. Ou seja, o casal Cori descobriu, então que o lactato extra da célula muscular é acolhido pelo fígado onde por algumas reações é transformado em glicose livre que retorna a célula muscular onde é transformado em ATP.

Lembrando: são produzidos quatro ATP em anaerobiose e gastos dois ATP com um saldo positivo de dois ATP. Ou seja, em anaerobiose a formação de ATP é mínima. Por isso a necessidade de muito glicogenio armazenando glicose e do ciclo de Cori alimentando a célula muscular.

## 2) Reoxidação do NAD reduzido

O que fazer com o NAD reduzido já que a via glicolítica para funcionar precisa do NAD oxidado? O NAD red precisa ser reoxidado então. E ele assim será de duas formas: uma em aerobiose e outra em anaerobiose. O NAD é uma vitamina hidrossolúvel que não pode ser armazenado por isso é necessário reutilizá-lo. Assim o NAD será reoxidado na transformação do piruvato em lactato. O NAD oxidado voltará, então, a ser usado na via glicolítica.

## † Via das Pentoses

É uma via alternativa da oxidação da glicose-6-fosfato que ao contrário da via glicolítica não tem finalidade de obter ATP, além de ser essencialmente citoplasmática. Não ocorrem em todos os tecidos, apenas no fígado, nas hemácias, córtex das adrenais, tireóide, tecido adiposo e glândulas mamárias em lactação. Mesmo nesses tecidos, essa via não é mais importante que a via glicolítica. Só 30% da glicose nesses tecidos é oxidada pela via das pentoses.

Objetivos dessa via:

- ?? Formação de NADP red, que é um agente redutor de muitas vias biossintéticas como a síntese de ácidos graxos, esteróides (hormônios do córtex das suprarrenais e vitamina D) e aminoácidos não-essenciais.
- ?? Formação de ribose e a partir desta a desoxirribose, essenciais para formar nucleotídeos (pentose + fosfato + base nitrogenada, os ácidos nucleicos são polinucleotídeos). No entanto, nem toda a ribose e desoxirribose provêm desta via, boa parte sim, o restante é obtido pela dieta.
- ?? Formação de intermediários da via glicolítica, caracterizando a integração do metabolismo, ou seja, várias vias correm paralelas e se cruzam em determinados pontos como estes. Esses intermediários serão a frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato.

Ao contrário da via glicolítica, não há uma outra forma de se estudar a via das pentoses, senão por fórmulas que deverão servir apenas como instrumento de entendimento e não devem ser memorizadas. Deve ser usado o raciocínio, sobretudo. Por exemplo, se iremos obter pentoses a partir de uma hexose (glicose-6-fosfato) deveremos ter uma descarboxilação.

#### 1) Fase Oxidativa

Glicose-6-fosfato possui ponte de oxigênio entre os carbonos 1 e 5. Para se transformar em pentose deve-se transformar o carbono 1 em carboxila (-COOH) com a desidrogenação do carbono 1 realizada pelo NADP que acolhendo os dois átomos de hidrogênio se transforma em NADP reduzido. Assim posteriormente pode haver a descarboxilação. O NADP red formado é usado no citoplasma para síntese de aminoácidos não-essenciais, ácidos graxos e esteróides. Forma-se então a 6-fosfoglicona lactona e a enzima que cataliza a reação é talvez a enzima mais importante dessa via: a glicose-6-fosfato desidrogenase. Esta enzima tem uma importância clínica extraordinária: ela é induzida pela insulina, ou seja, ela estimula a oxidação da glicose por esta via. O diabético não compensado, aquele que não toma regularmente insulina, tem deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tendo maior fragilidade nas hemácias com tendência a anemia hemolítica (qualquer choque irá promover hemólise) já que o NADP reduzido tem papel fundamental na manutenção da integridade das membranas das hemácias. A manutenção das hemácias é importante, pois, nós formamos muitos peróxidos, principalmente água oxigenada no metabolismo dos aminoácidos, produtos danosos à membrana das hemácias. O NADP reduzido irá captar seus dois  $H^+$  e reagir com a água oxigenada formando duas moléculas de água.

Ilustração cultural - na década de 20 descobriu-se um anti-malárico chamado de primaquina e começou-se a usar este remédio como agente profilático. Só que muitos pacientes morreram. Descobriu-se, então, que pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase são sensíveis a primaquina e podem morrer. Cerca de 11 a 15% dos negros americanos têm deficiência dessa enzima, isso levaria a uma possibilidade maior dessas pessoas contraírem malária? Não. Só que essas pessoas por seleção natural são imunes à malária, pois o Plasmodium (vetor da malária) necessita de NADP reduzido para sobreviver, o que não ocorre em grande quantidade nas pessoas com deficiência dessa enzima. A primaquina faz com que haja grande quantidade de peróxido no organismo, letal a membrana das hemácias de pessoas carentes de NADP reduzido provocando hemólise dessas células e consequente anemia hemolítica.

Com a 6-fosfoglicona lactona para formarmos de vez a carboxila, devemos adicionar água na presença de lactonase formando o 6-fosfogliconato, um ácido, já com a carboxila no carbono 1. Agora haverá perda de  $\text{CO}_2$  do carbono 1 numa reação de desidrogenação com descarboxilação na presença da enzima 6-fosfatogliconato desidrogenase, também induzida pela insulina. A desidrogenação ocorrerá com a transformação do NADP em NADP reduzido.

Formar-se-á então um isômero da ribose: a ribulose que irá se transformar na presença de uma enzima chamada fosfopentose isomerase teremos a formação da ribose-5-fosfato aproveitada para formação de nucleotídeos, é substrato para a fase não oxidativa da via das pentoses e forma a desoxirribose. Um outro substrato para a fase não oxidativa da glicose é obtido pela fosfopentose epimerase (epímero = são isômeros que variam em apenas um carbono que não seja o funcional) agindo sobre a ribulose-5-fosfato formando a xilulose-5-fosfato. Nessa fase obteve-se duas moléculas de NADP reduzido por glicose-6-fosfato oxidada. A insulina foi fundamental nessa fase.

## 2) Fase Não-Oxidativa

Os intermediários da via glicolítica serão obtidos nessa fase como a frutose-6 fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. A união da xilulose-5-fosfato mais ribose-5-fosfato é catalisada pela transcetolase na presença de  $\text{Mg}^{++}$  e tem como coenzima vitamina B1, a TPP (pirofosfato de tiamina), ou seja, a transcetolase é uma holoenzima, que catalisa a transferência de um radical de dois carbonos que contivesse um grupamento cetona, obtendo gliceraldeído-3-fosfato e octoheptulose 7 fosfato. Uma parte desse gliceraldeído-3-fosfato formado, segue a via glicolítica e outra parte continua na fase não-oxidativa da via das pentoses, para formar o outro intermediário: a frutose 6 fosfato. Para isso, o

gliceraldeído reagirá com a seetoheptulose-7-fosfato na presença da transaldolase, enzima que cataliza a transferência de três carbonos para uma molécula que contenha o aldeído no caso da seetoheptulose-7-fosfato para o gliceraldeído-3-fosfato formando eritrose-4-fosfato e frutrose-6-fosfato. A Eritrose 4 fosfato pode reagir ainda com a xilulose 5P e formar frutrose 6P e gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima transcetolase.

Para o organismo manter o seu metabolismo, necessita extrair energia do ambiente e com essa, extrair matéria-prima para transformá-la em próprios constituintes das macromoléculas. Tomando os organismos multicelulares como exemplo, têm-se dois grandes grupos de seres vivos que utilizam diferentes estratégias para obter essa energia do ambiente. As plantas, que possuem uma determinada organela que contém um conjunto de enzimas e proteína responsáveis por captar a energia proveniente do sol sob a forma de fótons de energia luminosa e transformá-la em compostos químicos que depois são transformados em ATP que pode ser utilizado para síntese de macromoléculas como a sacarose. Caso a planta necessite de energia, a sacarose é utilizada pelas mitocôndrias das plantas para ser transformada novamente em ATP e fornecer a tal energia para sobrevivência da célula. Os animais que dependem única e exclusivamente da transformação de energia química armazenada nas macromoléculas ou nas moléculas sintetizadas pelas plantas para poder extrair energia delas e transformar essa energia em ATP que vai poder ser utilizado pelas enzimas das células que necessitam de energia para realizar suas funções. A organela especializada em transformar a energia química armazenada em moléculas orgânicas em ATP é a mitocôndria.

‡ Como é estruturada?

Como exemplo, um fibroblasto em cultura, onde se encontra dezenas de mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma que são distribuídas sobre a rede de microtúbulos da célula, que dá sustentação mecânica a elas e é responsável através de proteína motoras pelo transporte dessas mitocôndrias e localização em um determinado local do citoplasma onde há uma maior demanda de energia, ou seja, têm uma tendência a se concentrarem nos locais que precisam mais de ATP, como nas células musculares. Essas mitocôndrias têm uma característica peculiar que se repete em todos os organismos eucariontes com algumas exceções. Possui um sistema duplo de membrana que são as membranas mitocondriais externa e interna, formando dois compartimentos mitocondriais distintos, ou seja, o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. Além disso, a membrana mitocôndria interna forma projeções para o interior da matriz, formando as cristas mitocondriais. A morfologia e o tamanho mitocondrial são variáveis, dependendo da sua fase de vida.



Podem ser encontradas, na matriz mitocondrial, estruturas eletrodensas, os grânulos mitocondriais que são deposições de um tipo de sal chamado fosfato de cálcio, devido à fisiologia da mitocôndria que armazena grande quantidade de fosfato para produção de ATP e de cálcio por causa da função de retirá-lo do citoplasma. As bactérias Gram negativas como a *E. coli* apresentam também um sistema duplo de membrana como a mitocôndria, além do fato de ambas: a membrana mitocôndria externa e a externa da bactéria apresentarem pouca seletividade, devido à existência de uma proteína integral de membrana chamada porina que forma canais hidrofílicos que selecionam a passagem somente pelo tamanho das moléculas. (substâncias  $< 10000$  Da conseguem passar, enquanto que macromoléculas como proteínas e RNA ficam retidas).

Para as substâncias passarem do espaço intermembranar para a matriz existem transportadores específicos. As bactérias Gram positivas só têm uma membrana. O espaço intermembranar se caracteriza por possuir baixas concentrações de proteína, refletida pela presença de poucos tipos de proteína que tenham alguma função nessa região. Exemplos, o citocromo c, que é proteína solúvel e a enzima dinucleotídeo quinase, que realiza a reação  $ATP + NDP \rightarrow ADP + NTP$ , que serve para ser utilizado em reações cujas enzimas envolvidas preferem outro nucleotídeo diferente do ATP. A composição desse espaço é bem mais fluida do que a matriz e citoplasma devido a essa baixa concentração de proteína.

A membrana mitocondrial interna tem como característica a seletividade, parte dessa seletividade se deve a presença de um lipídio especial cardiolipina que serve para aumentar a impermeabilidade da passagem de íons e substâncias hidrofílicas. Então, tendo uma membrana altamente seletiva e impermeável, precisa-se de transportadores específicos para promover a passagem de substâncias necessárias ao metabolismo da mitocôndria. A presença de grandes quantidades de transportadores, que vão controlar a passagem de substâncias da matriz para o espaço intermembranar, é a outra característica. Tem-se também a presença das proteínas da cadeia respiratória??? Como?? A próton-ATPase que fica mais concentrada nas cristas mitocondriais. A  $H^+$ -ATPase sintetiza ATP e proteína da cadeia respiratória transporta elétrons.

A mitocôndria se difere das outras organelas no que se refere ao sistema duplo de membrana como já foi dito e ao sistema genético muito complexo, tendo um genoma na forma de um DNA circular similar ao dos organismos procariontes, além de possuir RNA e DNA polimerases e ribossomas do tipo 70S<sup>19</sup> que traduzem a informação genética sob a forma de proteína dentro da matriz mitocondrial. Essas características mostram a semelhança entre bactérias e mitocôndrias. Por isso,

---

<sup>19</sup> Svedberg, coeficiente de sedimentação.

propõe-se que a mitocôndria se originou a partir de um organismo procarionte que inicialmente passou a viver simbioticamente dentro das células eucariontes primitivas e que depois de algum tempo foi perdendo a capacidade de viver independentemente, ou seja, perdendo parte do genoma e ficando dependente do genoma nuclear para sobreviver. A membrana externa da bactéria tem a função de proteção contra anticorpos, agentes nocivos, enquanto que a mitocôndria, protegida dentro do meio intracelular, não teria necessidade de tal membrana. Entretanto, nunca foi testado um mutante mitocondrial para ver se a membrana é útil ou não a fisiologia da célula. Na matriz mitocondrial, tem-se a presença de uma série de proteínas que participam de vias metabólicas importantes para a fisiologia da célula como o Ciclo de Krebs e as enzimas que participam da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos que vão ter função específica na produção de energia, há outras enzimas que participam da síntese de outras macromoléculas e o sistema genético que consta de várias cópias do DNA circular contendo parte do genoma necessário para a fisiologia da célula e enzimas necessárias a transcrição e tradução da informação genética (RNA polimerase que sintetiza os RNAm e RNAt; os ribossomos que sintetizam as proteínas a partir informação contida na fita de RNAm e as proteínas necessárias a duplicação desse DNA circular para que ao longo da divisão das mitocôndrias a informação genética não seja perdida).

### † Biogênese

Em tempos de divisão celular, as mitocôndrias sempre se originam do crescimento e fragmentação das já pré-existentes e parte dos componentes lipídicos da membrana são sintetizados pela própria mitocôndria e a outra parte pelo REL e transportada através de proteínas específicas para a membrana mitocondrial. Dependendo do tipo do organismo, o genoma mitocondrial é capaz de codificar apenas entre 9 e 15 peptídeos diferentes, 5% das proteínas necessárias ao funcionamento da mitocôndria. Os 95% restantes das proteínas mitocondriais são codificadas pelo genoma nuclear, transcrito em RNAm e esse traduzido pelos ribossomos citoplasmáticos formando as proteínas que devem ser reconhecidas e transportadas por um mecanismo chamado de pós-transcricional para o interior da mitocôndria. O primeiro problema é reconhecer no citoplasma quais são as proteínas que serão transportadas; o segundo é que a mitocôndria tem quatro compartimentos com composição proteica distinta, então tem que ser capaz de distinguir os locais de cada proteína. Como será que faz isso?

Existe na membrana externa um receptor e um transportador proteico. Por exemplo, uma proteína mitocondrial e uma nuclear, como reconhecer? Pela sequência, mas não existe uma para cada proteína, na realidade é uma sequência específica que funciona como sinalizador para indicar que a proteína

deve ser enviada para o interior da mitocôndria. Mais comumente, tem-se nessas proteínas uma seqüência N-terminal, como ocorre nas proteínas que vão ser importadas para o RER, que vai compor um sinal de importe mitocondrial. Algumas proteínas podem tê-lo (o sinal) em seu meio e outras não o apresentam, devendo usar outro mecanismo ainda desconhecido. Quando as proteínas se formam (estão no seu estado biológico funcional) no citoplasma, primeiro, são desenoveladas por uma proteína citoplasmática que é a Hsc 70, que permanece a elas ligadas até serem transportadas através da membrana por um sistema de transportador que envolve uma proteína de membrana que abre uma passagem com diâmetro fixo, determinando o tamanho das moléculas que irão passar. A proteína enovelada (ativa) não consegue, por isso é necessário desenovelá-la para que, na forma linear, seja bombeada através dessa passagem.

A proteína da membrana é formada por um receptor e um transportador, que estão sempre juntos, o sinal é reconhecido pelo receptor e, após isso, esse receptor vai bombear a proteína através da membrana e, à medida que atravessa, solta a Hsc 70. Esse mecanismo é dependente de ATP.

Na membrana interna, existe também um segundo receptor que é capaz, se necessário, de pegar esse peptídeo sinal e continuar o transporte da proteína para a matriz ou membrana mitocôndria interna. De uma maneira geral, nessa região da mitocôndria onde tem o transporte de proteína, encontra-se através do M.E.<sup>20</sup> uma região de contato entre membrana da mitocôndria externa e interna. Pode acontecer duas coisas, a proteína ter um sinal de integração na MME, quando entra na membrana através desse transportador que abre uma passagem para a membrana mitocôndria externa e ela não atravessa a membrana toda, mas fica atravessada na membrana mitocôndria externa ou segundo sinal de liberação da proteína no espaço intermembranar. Se não tiver algum desses, é captada pelo segundo receptor que começa a bombear a proteína através da MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA e aí pode ter um sinal que indique a integração na MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA e se não tiver sinal algum, passa direto para a matriz.

† Como acontece a síntese de ATP?

Como foi visto antes, a mitocôndria tem como uma das suas funções transformar a energia química armazenada nas ligações químicas do tipo carbono-carbono das moléculas orgânicas em um tipo de energia química que possa ser acessível a toda célula e nesse caso é a ligação fosfato-fosfato que existe

---

<sup>20</sup> Microscópio Eletrônico

no ATP. Mas para fazer isso, ela primeiro extrai energia da ligação química e armazena na forma de elétrons numa molécula energética que é o NADH. De uma maneira geral, os compostos orgânicos oxidados parcialmente, tanto no citoplasma quanto na mitocôndria, são transformados numa molécula de Acetil-CoA, que entra no Ciclo de Krebs é oxidado e a energia armazenada nas ligações químicas do acetato ligado Acetil-CoA vai ser armazenada sob a forma de uma molécula com poder redutor que é o NADH. São produzidas poucas moléculas de ATP e energia armazenada sob a forma de NADH, que vai fornecer indiretamente a energia necessária para a síntese de ATP. De que forma? Essa energia do NADH vai ser utilizada por um complexo de citocromos na MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA e por dois outros transportadores (ubiquinona, presente dentro da membrana, e citocromo c, proteína solúvel dentro do espaço intermembranar) que levam o elétron de um citocromo para o outro. Inicialmente o que esse NADH faz é doar os elétrons dele para o primeiro complexo citocromo que é o NADH redutase, que utiliza a energia desse elétron para transportar prótons do interior da matriz para o espaço intermembranar, o elétron é doado a ubiquinona que transfere para o complexo 2, chamado de citocromo c redutase e a energia adquirida desse elétron será utilizada da mesma forma, depois o elétron é transferido para o citocromo c que transfere para o complexo 3 que vai utilizar para transportar mais prótons de dentro da matriz para o espaço. E aí vai ser transferido para um aceptor final que é o oxigênio, formando água. (quatro prótons mais uma molécula de oxigênio = 2 água).

A célula não tem um jeito eficiente de transformar a energia do NADH em ATP então, ela cria um gradiente de prótons que tem dois componentes: elétrico e químico (eletrotônico) através da MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.

Cria-se uma diferença de concentração muito grande de prótons entre o espaço e a matriz, a energia armazenada nesse gradiente vai ser utilizada para síntese de ATP através de uma proteína especial presente nessa membrana interna que é a próton ATPase. O que ela faz? Composta por duas porções, a primeira porção é transmembranar chamada de  $F_0$  (zero) e a segunda globular de  $F_1$ .  $F_0$  compõe um canal de prótons e  $F_1$  é uma região catalítica que promove a conversão de ADP em ATP. A passagem de prótons pelo canal de próton ATPase é que fornece energia para a formação e liberação de ATP dentro da matriz. E grande parte dessa energia deve ser enviada para o citoplasma, através do antiporte do ATP-ADP para continuar o ciclo de síntese.

Aproximadamente 85% da energia é armazenada na ligação entre os fosfatos  $\gamma$  e  $\beta$  do ATP e os outros 15% são dissipados sob a forma de calor. Então, a própria mitocôndria, em estado fisiológico normal, é

capaz de gerar calor e controlar a temperatura do corpo. Existem também mitocôndrias que tem a finalidade de gerar calor que se localizam no tecido adiposo marrom, mas para isso precisa ter uma proteína especial na MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA chamada de termogenina que é um canal de prótons que permite a dissipação do gradiente de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons sem que essa energia armazenada seja utilizada para realizar algum tipo de trabalho. Como não é acoplada a nenhuma reação química, a energia é perdida sob a forma de calor. E como o tecido marrom é altamente vascularizado, o calor produzido naquela região é captado pelo fluxo sanguíneo que passa por aquele tecido e transferido para o resto do organismo, ajudando em muitos animais terminais e recém natos a manter a temperatura corporal constante.

## Respiração celular

Estudaremos no seu sentido intracelular, ou seja, sem englobar as trocas gasosas no pulmão<sup>21</sup>. A formação de CO<sub>2</sub> e o consumo de O<sub>2</sub> para a oxidação da glicose principalmente nas mitocôndrias.

### † Ciclo de Krebs

No citoplasma a glicose-6-fosfato forma piruvato que, em aerobiose, é transportado por proteínas carreadoras da membrana interna da mitocôndria para o interior da mesma onde se transforma em acetil-CoA. Esta reação não pertence ao Ciclo de Krebs, mas é responsável pela sua regulação. O complexo multienzimático que catalisa essa reação é controlado alostericamente e por modificação covalente (fosforilar e defosforilar). O acetil-CoA é intermediário do ciclo de Krebs. A glicose-6-fosfato é obtida no meio intracelular a partir da glicose circulante que, em última análise, foi obtida pela ingestão de amido, glicogênio e outros polissacarídeos e gorduras<sup>22</sup> da nossa alimentação. O catabolismo aeróbico implica necessariamente na formação da acetil-CoA<sup>23</sup>.

Durante o ciclo de Krebs há grande formação de coenzimas reduzidas ( AD e FAD - ambas vitaminas do complexo B, hidrossolúveis). Para isso, é necessária a disposição de coenzimas oxidadas por esse motivo o CICLO DE KREBS está tão integrado à Cadeia Respiratória<sup>24</sup> que é responsável por esse processo, caso contrário o CICLO DE KREBS ficaria momentaneamente paralizado.

### † Transformação do piruvato em acetil-CoA

<sup>21</sup> Apresentadas no Anexo.

<sup>22</sup> O fígado, por ser o órgão responsável por controlar a glicemia, utiliza principalmente as gorduras no seu metabolismo.

<sup>23</sup> Mesmo quando temos a oxidação de proteínas pois alguns aminoácidos geram diretamente acetil Co.A, outros geram piruvato que gera acetil Co.A, ou ainda outros intermediários do ciclo de Krebs atribuindo ao mesmo o título de ponto de convergência do catabolismo aeróbico.

<sup>24</sup> Esse fato faz da cadeia respiratória o principal formador de ATP da respiração apesar de sua função prima não ser esse.

O piruvato é transformado em acetil-CoA<sup>25</sup> por uma descarboxilação oxidativa (liberando a primeira molécula de CO<sub>2</sub>). Os hidrogênios da coenzima A e do piruvato vão reduzir o NAD (reação que ocorre exclusivamente nas mitocôndrias), NAD vai para a cadeia respiratória para ser reoxidado e o acetil-CoA vai para o CICLO DE KREBS. A piruvato desidrogenase é um complexo multienzimático que contém três enzimas e cinco coenzimas e pode ser controlado alostericamente e por modificação covalente. O excesso de NAD reduzido, ATP e acetil-CoA são seus moduladores negativos enquanto que o excesso de ADP, NAD oxidado e baixas concentrações de acetil-CoA são seus moduladores positivos.

Na presença de glucagon a piruvato desidrogenase fica inativa por que seu segundo mensageiro é o AMPc que estimula proteínas quinases que são enzimas que catalisam reações de fosforilação. Então a PDH é inativa na sua forma defosforilada. Preservar o piruvato significa preservar a glicose-6-fosfato para que ela possa ir para a circulação. A insulina por ser hipoglicemiante deve aprisionar a glicose dentro da célula, estimulando a via das pentoses, a síntese de glicogênio e a glicólise, assim, estimula o ciclo de Krebs. Ela estimula proteína fosfatase que catalisa reação de retirada de radical fosfato, a PDH fica ativa transformando piruvato em acetil-CoA.

#### 1) Primeira reação do Ciclo de Krebs

Uma substância orgânica ao ser oxidada, fornece obrigatoriamente o número de moléculas de CO<sub>2</sub> ao seu número de carbonos (um ácido graxo de 18C fornecerá 18 moléculas de CO<sub>2</sub>). Dessa forma, a glicose, ao ser oxidada integralmente até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O fornecerá seis CO<sub>2</sub>. As duas primeiras na reação de piruvato<sup>26</sup> até acetil-CoA.

Acetil CoA, o representante das demais substâncias<sup>27</sup> a serem oxidadas, se combina sempre com oxaloacetato formando citrato<sup>28</sup> (daí chamar o CICLO DE KREBS e de ácidos tricarboxílicos) liberando CoA. O fato mais importante da reação é que nela está o primeiro dos três marcapassos do CICLO DE KREBS, ou seja, primeira das três enzimas alostéricas que controlam a velocidade do CICLO DE KREBS. A citrato sintetase, que catalisa a transformação do acetil-CoA somado ao oxaloacetato em citrato, é alostérica que pode ser modulada negativamente pelo excesso de NADred,

<sup>25</sup>Obtida a partir do ácido pantotênico.

<sup>26</sup> Uma molécula de glicose-6-fosfato fornece duas de piruvato, que por sua vez se transformam em 2 de acetil CoA, liberando duas de CO<sub>2</sub>.

<sup>27</sup> Seja de glicose-6-fosfato, ácido graxo ou aminoácido.

<sup>28</sup> O citrato é um ácido tricarboxílico com 3 C.

e citrato. Por outro lado, altas concentrações de NAD oxidado, ADP e baixas concentrações de citrato são seus moduladores negativos<sup>29</sup>.

## 2) Segunda e terceira reações

A segunda e a terceira reações do CICLO DE KREBS são, respectivamente a transformação do citrato (6C) em cis-aconitato (6C) e sua quase instantânea transformação em isocitrato (6C).

## 3) Quarta reação

Nesta etapa o isocitrato (6C) se transforma em a ceto glutarato (5C), onde há liberação de mais uma molécula de CO<sub>2</sub>, portanto, a redução de uma molécula de NAD oxidado (este vai para a Cadeia Respiratória para ser reoxidado). A enzima que catalisa essa reação é a isocitrato desidrogenase, uma enzima alostérica modulada positivamente por altas de ADP e negativamente por altas de ATP<sup>30</sup>.

## 4) Quinta reação do ciclo de Krebs

Agora o a ceto glutarato (5C) se transforma em Succinil-CoA (4C). Temos novamente e pela última vez a liberação de CO<sub>2</sub><sup>31</sup>. Aqui temos também a formação de coenzimas reduzidas que vai para o CICLO DE KREBS. A enzima que catalisa essa reação é a alfa ceto glutarato<sup>32</sup> desidrogenase a última enzima alostérica do CICLO DE KREBS que é modulada negativamente por altas concentrações de NAD reduzido (ATP) e succinil-CoA e negativamente por altas concentrações de NADox (ADP) e baixas concentrações de succinilCoA .

## 5) Sexta reação

Depois da quinta reação, já obtivemos as três enzimas alostéricas, coenzimas reduzidas e as duas moléculas de CO<sub>2</sub> que deveríamos produzir no CICLO DE KREBS. A partir de agora o CICLO DE KREBS continua com o objetivo de regenerar o oxaloacetato. Como a acetil-CoA pode ser obtida a

---

<sup>29</sup>Alguns autores mencionam a possibilidade de que o excesso de succinil-Co.A (intermediário do CK) inibe competitivamente a citrato sintetase por ser um análogo estrutural do acetil Co.A. Para que ocorra essa inibição são necessárias altíssimas concentrações de succinil Co.A no meio.

<sup>30</sup>Alguns autores consideram o excesso de NAD oxidado e NAD reduzido como moduladores positivos e negativos, respectivamente, da isocitrato desidrogenase.

<sup>31</sup> O ácido palmítico é uma ácido graxo de 16C e, quantitativamente é o principal ác graxo do nosso organismo. O único produto final da oxidação dos ácidos graxos é o acetil Co.A . O ác palmítico, então libera 8 moléculas de acetil Co.A, logo 16 moléculas de CO<sub>2</sub>.

<sup>32</sup> É um complexo multienzimático muito semelhante à piruvato desidrogenase (várias enzimas e várias coenzimas).

partir de várias substâncias a quantidade dessa molécula é muito grande enquanto que são poucas as maneiras de se obter o oxaloacetato. Se o CICLO DE KREBS não fosse uma via metabólica fechada poderia ser paralisada por falta de oxaloacetato então a partir da sexta reação o único motivo de existir do CICLO DE KREBS é a regeneração do oxaloacetato.

O succinil-CoA (4C) vai se transformar em ácido succínico - 4C (succinato) pela ação da succinil CoA sintetase. Na formação do acetil CoA a partir do piruvato, é retirado o CO<sub>2</sub> e formada uma ligação tioéster, caso contrário teríamos a formação de ácido acético. Apesar de se tratar de uma reação de alta energia, não há gasto de ATP porque o ambiente mitocondrial é rico em energia. Ao se transformar o succinil-CoA em succinato há quebra dessa ligação de alta energia liberando-a. Parte dessa energia é captada pelo GDP, transformando o em GTP que por sua vez promove a formação de um ATP a partir de um ADP. A formação do GTP no ciclo de Krebs equivale à formação de um ATP. Muitos autores destacam a importante formação de ATP no CICLO DE KREBS que não é verdade, é formada apenas uma molécula de ATP por volta.

#### 6) Sétima reação

Transforma-se o succinato (4C) em fumarato (4C) na presença de succinato desidrogenase. Essa reação é importante porque essa enzima pode ser controlada competitivamente por altas concentrações de malonato<sup>33</sup>. Também nessa reação forma-se a única reação com formação de FAD.

#### 7) Oitava reação

O fumarato (4C) transforma em malato (4C) por ação da fumarase.

#### 8) Nona (e última) reação

O malato, agora, se transforma em oxaloacetato por ação da malato desidrogenase com a redução de um NAD .

† Resumindo: Temos no ciclo de Krebs três enzimas alostericas (citrato sintetase, a ceto glutarato desidrogenase e isocitrato desidrogenase); são formadas 2 moléculas de CO<sub>2</sub> por volta completa no ciclo de Krebs; são formadas 4 coenzimas reduzidas (3 NAD e 1 FAD); o CICLO DE KREBS é controlado grosseiramente por alta e baixa de ATP; é formada uma molécula de GTP que corresponde

<sup>33</sup> Mecanismo de retro-inibição. Vide capítulo de Enzimas.



a uma de ATP; o CICLO DE KREBS não é uma via metabólica aberta porque é fundamental a regeneração do oxaloacetato.

### † Papel anfibólico (duplo papel metabólico) do Ciclo de Krebs

Ter papel anfibólico significa ter papel catabólico e anabólico<sup>34</sup>. A grande maioria das reações é reversível e, assim, o controle alostérico se torna extremamente importante. O papel de contribuir com o anabolismo se dá em circunstâncias de alta de ATP. Quando isso acontece observa-se altas concentrações de intermediários do CICLO DE KREBS pela diminuição da velocidade da via. Alguns intermediários nessas condições contribuem para o anabolismo.

O oxaloacetato em altas concentrações sofre transaminação e se transforma em aspartato (aminoácido). Do mesmo modo o a ceto glutarato da origem ao glutamato (aminoácido). Por sua vez o piruvato por ação da piruvatocarboxilase se transforma em oxaloacetato. Essa enzima é modulada alostericamente por altas concentrações de acetil-CoA. Essas reações são chamadas de reações de preenchimento ou reações anapleróticas.

## Gliconeogênese e Cadeia Respiratória

### † Gliconeogênese

Ao final do assunto anterior, estudávamos o segundo papel metabólico do CICLO DE KREBS que ocorria em casos excesso de ATP, NAD reduzido e acetil-CoA, assim, teríamos uma menor velocidade da via e, conseqüentemente, maior concentração dos intermediários que não são mais utilizados no sentido do metabolismo aeróbico mas sim de vias biossintéticas como o da formação de aminoácidos não essenciais para a formação de proteínas; a formação de acetil-CoA no citoplasma (excesso de citrato na mitocôndria vai para o citoplasma onde é oxidado em acetil-CoA e oxaloacetato) que vai ser substrato para a biossíntese de lipídios; o oxaloacetato que vai servir de substrato para a formação de glicose6P no citoplasma, gliconeogênese.

A gliconeogênese é a formação de glicose-6-fosfato a partir de substâncias não glicídicas como oxaloacetato que é um cetoácido dicarboxílico. Na presença de GTP o oxaloacetato se transforma em fosfoenol piruvato pela ação da fosfoenol piruvato carboxiquinase com a saída de CO<sub>2</sub>. O fosfoenol

<sup>34</sup> O Ciclo de Krebs, além de ser uma via anfibólica, também é uma via anaplerótica, ou seja “de preenchimento”, fornecendo intermediários metabólicos para outras vias.

piruvato é um intermediário da glicólise obtido a partir do 2-fosfoglicerato que, na presença da enolase, se transformou em fosfoenolpiruvato e que deu origem ao enol piruvato e depois piruvato (forma enólica é instável), reação catalisada pela piruvato quinase. Essa é a única reação absolutamente irreversível da glicólise. Quando há excesso de acetil-CoA temos o estímulo da piruvato carboxilase onde temos a transformação de piruvato em oxaloacetato. É necessário, então, que se disponha de uma alta concentração de piruvato, para isso, inibe-se a piruvato desidrogenase, impedindo que ele se transforme em acetil-CoA. Se a transformação de oxaloacetato em fosfoenol piruvato não fosse irreversível, não precisaria desse “by pass”<sup>35</sup> para se obter novamente glicose. Por que com a inibição da piruvato desidrogenase ocorre gliconeogênese? Porque o piruvato não é transformado em acetil-CoA, acumulando piruvato que faz com que ele se transforme em oxaloacetato nas mitocôndrias, o que implica na formação de citrato que vai para o citoplasma onde é clivado em acetilCoA e oxaloacetato. Existe ainda uma maneira mais fácil de se obter oxaloacetato no citoplasma: a via do malato que vai para o citoplasma onde se transforma em oxaloacetato pela ação da malato desidrogenase do citoplasma.

O oxaloacetato precisa ser obtido no citoplasma, via citrato ou via malato porque a membrana mitocondrial interna é absolutamente impermeável ao oxaloacetato. Depois desse “by pass” o caminho do fosfoenol piruvato é retornar os caminhos da glicólise.

† Resumindo: A gliconeogênese ocorre em casos de excesso de NAD reduzido, acetil-CoA e ATP, quando os intermediários estão em alta e são utilizados para a síntese de aminoácidos não essenciais um deles é usado para fornecer, no citoplasma, substrato para a biossíntese de ácidos graxos (citrato). Quando o citrato é clivado, não só fornece acetil-CoA mas também oxaloacetato. Transformando o oxaloacetato em fosfoenol piruvato pode-se obter glicose6P. Existe ainda uma outra forma de se obter oxaloacetato no citoplasma: a transformação do oxaloacetato em malato. Para que esse oxaloacetato apareça no citoplasma, é necessário que aumente a sua concentração na mitocôndria isso ocorre através da inibição da piruvato desidrogenase e o estímulo simultâneo da piruvato carboxilase, ambas pela modulação da acetil-CoA. O substrato da ação da piruvato carboxilase é o piruvato que não foi mais transformado em acetil-CoA .

† Cadeia Respiratória

---

<sup>35</sup> Derivação.

A importância da Cadeia Respiratória é a reoxidação das coenzimas reduzidas porque são vitaminas hidrossolúveis não armazenáveis. Durante esse processo, haverá a formação da ATP. Três enzimas do ciclo de Krebs, a cetoglutarato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase exigem a formação de NADred, ainda uma das reações da β oxidação forma NAD reduzido, na via do malato e na principal enzima do metabolismo dos aminoácidos. O FAD é produzido em uma reação do Ciclo de Krebs, uma da β oxidação e uma na via do glicerol-fosfato.

O aceptor final dos átomos de hidrogênio na cadeia respiratória é sempre o oxigênio, tanto que a microrespiração celular se resume no consumo de oxigênio com formação de CO<sub>2</sub>. Haverá, então, a formação de água metabólica para cada transporte de dois pares de hidrogênio.

A primeira etapa da Cadeia Respiratória é catalisada por um complexo: NADH- desidrogenase<sup>36</sup> Esse complexo multienzimático tem como radical prostético<sup>37</sup> a FMN<sup>38</sup> (flavina mono nucleotídeo) e recebe os átomos de hidrogênio do NAD se tornando FMN reduzido. Nesse complexo multienzimático existem as proteínas ferro<sup>39</sup>-enxofre de forma que, diferente do NAD reduzido para o FMN onde são passados apenas os átomos de hidrogênio, do FMN para a Co.Q (ubiquinona<sup>40</sup>) são transportados apenas os elétrons transformando-a em ubiquinol<sup>41</sup> (cetona-álcool).

Chegamos ao ponto central da Cadeia Respiratória, pois a ubiquinona é receptora de elétrons do NAD e do FAD. Pela diferente entrada na cadeia respiratória, vai haver diferença na quantidade de ATP produzidos entre o FAD e o NAD, respectivamente dois e três moléculas ATP. A partir desse momento, os H<sup>+</sup> são liberados no meio e apenas os pares de elétrons serão carregados de forma que os inibidores da Cadeia Respiratória causam morte celular não por falta de ATP, mas por acidose como é o caso do CO e do CN<sup>-</sup>. O O<sub>2</sub> não pode ser reduzido para formar água. Os citocromos são proteínas hemínicas (como a hemoglobina) contém grupamento M<sup>42</sup> no radical prostético. O cyt a<sub>3</sub>, além do ferro tem cobre.

Temos três principais complexos multienzimáticos na cadeia: NADH desidrogenase, citocromo C redutase (do cyt.b para cyt c) e citocromo oxidase (do cyt a<sub>3</sub> ao oxigênio).

### 1) Potencial de redox

<sup>36</sup> Possui 34 sub-unidades protéicas e de peso molecular igual a 880mil .

<sup>37</sup> Coenzima fixa à enzima

<sup>38</sup> Outro estado ativo da riboflavina (vit B<sub>2</sub>) bem como o FAD

<sup>39</sup> O Fe pode ser ferroso (+2) ou férrico (+3), ou seja, pode oxidar e reduzir.

<sup>40</sup> Ter o "dom da ubiqüidade" significa poder estar em dois lugares ao mesmo tempo ou estar em todos os lugares.

<sup>41</sup> Fazem parte do seu complexo multienzimático pontons ferro-enxofre que seriam reduzidas pelos prótons e elétrons do meio. A vitamina K é uma quinona e pode participar da Cadeia Respiratória.

<sup>42</sup> Ferro, diferente das proteínas ferro-enxofre no radical prostrético que se oxidado pode se transformar em íon cúprico, podendo receber, então, 2 pares de elétrons que vão impedir a formação de peróxidos que causaria anemia hemolítica.

Capacidade em volts da substância se oxidar e reduzir. Da energia liberada no transporte do par de elétrons, parte é conservada na forma de ATP, ou seja, na fosforilação oxidativa na presença de um complexo multienzimático: atp sintetase. A quantidade de energia necessária é, em média, 7500 calorias. Se cada par de elétrons pode liberar 56.000 cal e sabe-se que cada par produz apenas cinco ATP, pode-se concluir que 60% da energia é liberada em forma de calor e utilizada para outras reações químicas como a ligação tioéster na transformação de piruvato em acetil-CoA.



$$\text{NAD}/\text{NADH} = -0,32 \text{ v}$$

$$\text{O}_2 = +0,82 \text{ v}$$

$$\Delta G = nF \Delta E$$

Quanto mais negativo o seu potencial de oxiredução, maior é sua capacidade de ceder elétrons, ou seja, se oxidar. Assim, o potencial redoxi do citocromo C, por exemplo, é mais positivo que o do citocromo B. Fazendo que a ordem da Cadeia Respiratória seja vigorosa já que depende dos potenciais redoxi.

## 2) Desacopladores da fosforilação oxidativa<sup>43</sup>

A formação de ATP na mitocôndria é fundamental à Cadeia Respiratória uma vez que o fluxo de elétrons na cadeia libera a energia necessária para a formação de elétrons em um processo conhecido como fosforilação oxidativa. Desacoplar a fosforilação oxidativa significa impedir que a energia liberada não seja utilizada na formação de ATP. T3 e T4 são desacopladores da fosforilação oxidativa e, por isso, sente-se muita fome em ambientes frios, pois para compensar a grande parte da energia liberada em forma de calor (para manter a temperatura corporal) sem prejudicar a produção de ATP é necessário excedente calórico. Um outro desacoplador, esse sintético, é o NITROFENOL.

## 3) Inibidores da Cadeia Respiratória

São substâncias que impedem o fluxo de elétrons. A inibição de um sítio inibe todo o fluxo. Isso impede a formação de água metabólica, que causa morte por acidose. No sítio 3 os principais inibidores são o CO, o H<sub>2</sub>S e o CN<sup>-</sup>. No sítio 2 a antinicina que é um antibiótico e no sítio 1 a rotenona

<sup>43</sup> Formação de ATP na cadeia respiratória.

(cetona usada pelos índios para pescar. Algumas plantas continham essa substância que matava o peixe pela inibição da cr) e os barbitúricos (como o fenobarbital).

#### 4) Como o NAD é reoxidado em anaerobiose

Relembrando a glicólise, na reação catalisada pela aldolase (cisão da frutose 1,6-bifosfato, tendo como produto o aldeído 3-fosfoglicérico e dihidroxicetona fosfato) obtinha-se muito mais quantidade de dihidroxicetona-fosfato, gerando uma dúvida: por que formar mais dela se seria transformada em aldeído fosfoglicérico para dar continuidade à glicólise? Um dos motivos é justamente a reoxidação do NAD em aerobiose. Isso se dá através da enzima glicerol-fosfato desidrogenase (citoplasmática) onde o grupamento cetona da DHAP é reduzido produzindo NAD oxidado e DHA reduzida até glicerol-fosfato<sup>44</sup>.

Por que não reoxidar esse NAD na mitocôndria? Por que a membrana mitocondrial é impermeável ao NAD, mas para gerar mais ATP, esse NAD produzido na glicólise se utiliza de uma lançadeira para que os átomos de hidrogênio vão para a cadeia respiratória. Assim o glicerol-fosfato vai para a mitocôndria onde o FAD é reduzido a partir dos hidrogênios que o glicerolP captou do NAD citoplasmático e vai para a Cadeia Respiratória. Depois o glicerol-fosfato volta para o citoplasma. Essa é a via do glicerol-P.

Há ainda uma segunda lançadeira que usa o malato como transportador. Esse malato é obtido a partir do oxaloacetato. Esse possui um grupamento cetona que pela malato desidrogenase recebe os hidrogênios do NAD, oxidando-o. O malato vai para a mitocôndria onde é oxidado por uma NAD mitocondrial que vai para Cadeia Respiratória onde produz três ATPs e o oxaloacetato, por sua vez, vai para o CICLO DE KREBS.

#### 5) Saldo energético da oxidação completa da glicose

Da transformação da glicose até piruvato no citoplasma, temos um total de dois ATP e a formação de dois NAD reduzidos que se for reoxidado pela via do malato, da origem a seis ATPs e se for reoxidado pela via do glicerol-fosfato gera dois ATP. Na mitocôndria, a transformação das duas molécula de piruvato em duas de acetil-CoA. Temos a formação de dois NAD reduzidos que gera 6 ATP na Cadeia

<sup>44</sup> A ingestão excessiva de açúcares engorda já que não se pode armazenar toda a glicose ingerida sob a forma de glicogênio que, por ter uma gde camada de solvatação, ocupa muito espaço, já que o glicerol P é um importante substrato pra a formação de gorduras.

Respiratória. Por último as duas moléculas de acetyl-CoA vai para o Ciclo de Krebs onde dá uma volta cada um onde temos a formação de 1 GTP, correspondente a um ATP; três NAD reduzidos, equivalendo a 6 ATP e 1 FAD reduzido (2ATP), ou seja 12 ATP por volta no Ciclo de Krebs (24 ATP já que são duas de CoA). Dependendo, então, da via de reoxidação dos NAD citoplasmáticos, formaremos 36 ou 38 ATP no total.

## Capítulo 9

### METABOLISMO LIPÍDICO: DEGRADAÇÃO E BIOSÍNTESE

A oxidação de ácidos graxos de número ímpar de carbono é praticamente inexistente no organismo. Este cálculo energético serve muito mais como um trabalho de integração do que a realidade que ocorre no nosso organismo. Fornece sempre moléculas de acetil CoA e uma molécula de uma substância de 3C (propionil-CoA). Com a  $\beta$ -oxidação de um ácido orgânico de 17C, no final, seria obtido uma molécula de propionil e 7 moléculas de acetil-CoA. Para obtenção das sete moléculas de acetil CoA mais uma de propionil é preciso fazer sete vezes a  $\beta$ -oxidação.

Cada molécula de acetil-CoA se dirigindo ao Ciclo de Krebs e movimentando a CADEIA RESPIRATÓRIA, produz 12 ATP. Como são sete acetil-CoA, multiplica-se por 12, que dará um total de 84 ATP. A  $\beta$ -oxidação produz cinco ATP (formados por um NAD e um FAD reduzidos), como são sete vezes, multiplica-se sete por cinco, achando-se 35 ATP. Somando-se esses ATP, encontra-se um total de 119, mas como são gastos dois, têm-se 117 ATP. Mas ainda falta a oxidação do propionil-CoA, que deve ser transformar em um intermediário do Ciclo de Krebs, para ser oxidado até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Essa molécula é carboxilada, na presença de ATP e da enzima propionil carboxilase, e essa como qualquer carboxilase usa como coenzima a biotina uma vitamina do complexo B, transformando-se em succinil-CoA, que vai movimentar o Ciclo de Krebs. Foram gastos dois ATP para sua formação, a oxidação completa de succinil-CoA (4C) vai produzir 24 ATP, pois serão dadas duas voltas no Ciclo de Krebs (liberação de 4  $\text{CO}_2$  e formação de 6 NAD reduzidos, 2 FAD reduzidos e 2 GTP) , dá um total de 22 ATP. Finalizando  $117+22= 139$  ATP.

Outro exemplo, um ácido graxo de 9C, vai dar três acetil CoA mais um propionil (22 ATP). Como foram feitas três  $\beta$ -oxidações para se obter três acetil CoA (36 ATP) e um propionil, produziu-se 15 ATP. No total, têm-se  $36 + 15 - 2$  (gastos na ativação)  $= 49 + 22 = 71$  ATP.

† Biossíntese extramitocondrial de ácidos graxos

Não é uma mera reversão da  $\beta$ -oxidação, na década de 40, descobriu-se que essa síntese é extramitocondrial e, então, surgiu um problema, pois o único substrato dessas moléculas é acetil CoA. De que maneira ela aparecia no citoplasma para servir de substrato? Quando estudamos o segundo

papel do Ciclo de Krebs, vimos isso, quando temos excesso de ATP, de NAD reduzido, de acetil-CoA, significa que o Ciclo de Krebs vai diminuir de velocidade e os seus intermediários estarão em altas concentrações. Entre eles, o que nos interessa para estudo da biossíntese dos ácidos graxos, é o citrato que foi formado na mitocôndria pela reação do oxaloacetato (4C) com acetil CoA na presença de uma enzima alostérica: citrato sintetase. Para que o citrato forneça molécula de acetil-CoA para o citoplasma e lá ocorra a biossíntese, a circunstância metabólica preferencial deve ser o estímulo ao anabolismo, ou seja, é preciso ter um excesso de ATP.

Então, o excesso de citrato vai para o citoplasma através do transporte de proteína tricarboxílicas. Este citrato será oxidado, na presença de CoA e da enzima ATPcitrato liase, transformar-se-á em acetil CoA e oxaloacetato. A ATPcitrato liase é uma enzima que pode ser controlada por modificação covalente, ou seja, por fosforilação. Está ativa quando não-fosforilada. O glucagon inibe a ATPcitrato liase por que o seu segundo mensageiro ( $AMP_c$ ) estimula quinases que fosforilam. Se estivéssemos discutindo a síntese de ácidos graxos nas células adiposas, onde não ocorre a gliconeogênese, o destino do oxaloacetato não poderia ser substrato para glicose-6-fosfato, então se transforma em malato pela via do malato. Essa reação não ocorrerá em alta velocidade, pois a fosfofrutoquinase 1 é inibida pelas altas concentrações de citrato, ou seja, é o seu modulador negativo. Desse modo, forma-se menos NAD reduzido na glicólise e assim menos NAD reduzido para ser reoxidado na via do malato.

Quando a biossíntese dos ácidos graxos está ocorrendo vai haver a transformação do oxaloacetato em malato só que numa velocidade muito baixa por que é fundamental que haja a participação do NAD reduzido que se transforma em oxidado, mas ele vem glicólise, que está produzindo pouco NAD reduzido por causa do citrato que é o modulador negativo da PFK1. A principal fonte de NAD reduzido para a biossíntese de ácidos graxos (via das pentoses - fato que justifica o seu estudo: formação de NADred para a biossíntese...) não é a via das pentoses e sim o proveniente da ação de uma tal enzima málica.

Quem é ela? É a enzima que catalisa a transformação do malato (4C) em piruvato (3C), quando há a formação de um NAD reduzido. Não há saída para o oxaloacetato na cel. adiposa. ou ele forma aminoácido por transaminação ou se transforma em malato na presença de NAD reduzido e da enzima málica. Vamos considerar que a principal fonte de NAD reduzido para a biossíntese (ocorre em alta velocidade) é proveniente da via das pentoses tendo em vista que outra via tem velocidade muito



diminuída pela presença de citrato. O destino do piruvato é a mitocôndria, onde vai se transformar em acetil CoA que vai se ligar ao oxaloacetato, formando mais citrato.

A acetil-CoA é o agente iniciador da biossíntese de ácidos graxos. No citoplasma, é carboxilada na presença de ATP e da acetil-CoA carboxilase, obtendo-se uma substância conhecida como malonil-CoA, agente continuador da biossíntese... Daí, podemos continuar afirmando que a acetil-CoA é o único substrato para essa via, porque mesmo o motivador para que haja a formação de ácidos graxo precisa da presença da acetil-CoA.

?? Observação 1.: A CAT1 (catalisar a união do ácido graxo ativado com o seu transportador: a carnitina, a nível de superfície externa da MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.) é inibida alostericamente por altas concentrações de malonil CoA, ou seja, quando a biossíntese está ocorrendo intensamente (muito citrato no citoplasma, a acetil-CoA se transforma em malonil-CoA), a  $\beta$ -oxidação estará sendo inibida, porque se não interrompe a biossíntese (aquelas 4 reações), inibe o transporte do ácidos graxo ativado do citoplasma para a mit, ou seja, chega muito menos ácidos graxo às mitocôndrias para ser  $\beta$ -oxidado, já que o excesso de malonil-CoA inibe a CAT1.

?? Observação 2.: A acetil-CoA carboxilase é uma enzima alostérica e pode ser controlada também por modificação covalente. Primeiramente, quanto ao aspecto de modificação covalente: a insulina estimularia a acetil-CoA carboxilase que é ativa (defosforilada), o glucagon inativa-a. O principal modulador positivo dessa enzima é o citrato e o único modulador negativo é o ácidos palmítico (16C).

Agora, teremos que estudar a junção dessas duas substâncias. Quando se pensou nisso, verificou-se a presença de um problema: acetil-CoA e malonil-CoA não reagem entre si, ou seja, o malonil (radical do ácidos malônico) quando transportado pela CoA não podia reagir com o radical acil, acetil. Sabendo-se que essa reação acontece, então, só restava uma saída, trocar de carreador. Essa outra substância carreadora de radicais acil é chamada de ACP-SH (proteína carreadora de radicais acil), tem uma sulfidril no seu radical prostético fosfopanteteína (o peso molecular é de 9000).

No lugar da CoA entra ACP<sup>45</sup>, ficando acetil-S-ACP (verdadeiro ácido graxo iniciador) e malonil~SACP(verdadeiro ag. continuador), e há a liberação de CoA-SH. A síntese de ácido graxo no

<sup>45</sup> Proteína Carreadora de Acil (*Acyl Carrier Protein*)

citoplasma é feita pelo sistema ácido graxo sintetase (P.M.=400.000). Esse sistema é composto por sete proteínas, uma delas não tem atividade catalítica (ACP-SH) e as outras seis são enzimas, duas foram utilizadas acetil ACP transacilase e malonil ACP transacilase.

A próxima etapa é reagir o acetil ACP com malonil ACP. Para se construir um ácido graxo de número par de carbonos, usa-se uma molécula de acetil e todas as outras estarão sob a forma de malonil. Mas toda vez que o malonil entrar p/ alongar um ácidograxo, haverá a liberação de um CO<sub>2</sub>. Então, tem um acetil, entra um malonil, sai sempre um CO<sub>2</sub>, ficando uma molécula de 4C... Isso acontece até a formação do ácido graxo desejado. Para a formação do ácido palmítico, por exemplo, tem-se uma molécula de acetil e sete de malonil (doador de 2C para a síntese).

A formação de uma molécula de 4C a partir de acetil e malonil:

- 1) Na primeira reação, sai o gás carbônico e ACP-SH e forma acetoacetil SACP, na presença da ceto acil-ACP sintetase (terceira enzima do complexo ácido graxo sintetase); as próximas reações tem objetivo de retirar grupamento cetona, da seguinte maneira: hidrogenação, desidratação, e finalmente a hidrogenação (o inverso da  $\beta$ -oxidação quando se queria a formação de um grupamento cetona).
- 2) Na segunda reação, redução do grupamento cetona através do NADP reduzido (via das pentoses e via enzima málica), forma  $\beta$ -hidroxiacil SACP na presença de cetoacil ACP redutase;
- 3) Na terceira reação, desidratação (liberação de água estabelecendo uma dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ ), forma enoil ACP na presença da  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase;
- 4) Na quarta e última reação, hidrogenação saturando a ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ , através do NADP reduzido, na presença da enoil ACP redutase, forma um composto de 4C que vai se juntar com malonil... formar um ácido graxo de 6C... até formar, o ácido palmítico na maioria das vezes, por que ele mesmo controla toda a síntese de ac graxos modulando negativamente a acetil-CoA carboxilase. No citoplasmático, não se dispõe mais do malonil por que o ácido palmítico formado está inibindo a formação de malonil-CoA. Quantas moléculas de NADP reduzido foram utilizadas para a formação do ácido palmítico? Quatorze. Por que para cada entrada de malonil utiliza-se dois NADP reduzidos, como são sete de malonil... No final, obtém-se o palmitoil-SACP. Para transformá-lo, em palmitato, é

preciso retirar a ligação tio-éster, para desligá-lo da proteína carreadora e para isso, reage na presença de água com a ação de enzimas desacilases que retiram o ACP e recompõem a carboxila.

### † O alongamento da cadeia de ácidos graxos

A síntese extramitocondrial de ácidos graxos tinha uma limitação não específica do sistema ácido graxo sintetase, mas, da acetil-CoA carboxilase (enzima que catalisa a transformação do agente continuador desta síntese-malonil CoA). A acetil-CoA carboxilase é inibida por altas concentrações de ácido palmítico. Metabolicamente, isto significa que na medida em que for formando o ácido graxo de 16 carbonos começa a inviabilizar, ao menos diminuir a formação de malonil-CoA, diminuindo a velocidade de biossíntese. Isso poderia criar um paradoxo metabólico.

Daremos o exemplo apenas da obtenção de ácido esteárico de 18C<sup>46</sup>. Existem dois sistemas de alongamento classicamente conhecidos nos livros textos e nos artigos científicos: um ocorre no REL e outro na mitocôndria. O primeiro é muito ativo e o segundo é praticamente inativo porque como os ácidos graxos de até 16C são formados no citoplasma, para que ocorresse o alongamento mitocondrial eles teriam que ser ativados, ligados ao complexo acil carnitina e através da translocase serem transportados para o interior da mitocôndria onde seria cindido para então poder ser alongado pelo acetil-CoA. Para que o ácido palmítico seja sintetizado as vias de biossíntese precisam estar ativadas existindo grande disponibilidade de malonil-CoA no citoplasma que representam o único modulador alostérico negativo da CAT I.

As reações de alongamento a partir do ácido palmítico são bem semelhantes àquelas vistas anteriormente. A diferença básica é o uso malonil-CoA (2C) e não malonil ACP. Para montar um ácido graxo de 22C, esse seria montado no citoplasma até 16C pela enzima acetil-CoA carboxilase que é inibida alostericamente por ácido de 16C que seriam alongados por três moléculas de malonil-CoA no REL.

### † Formação de ácidos graxos insaturados

A aspirina® é uma substância que inibe a formação tromboxanas e de prostaglandinas. As primeiras estão envolvidas no processo de coagulação sanguínea enquanto as prostaglandinas têm inúmeras funções, dentre elas a de citoproteção das mucosas como por exemplo o ataque do ácido colorídrico no

<sup>46</sup> No organismo não serão encontrados ácidos graxos com um número ímpar de carbonos.

estômago. A ingestão demasiada de AAS<sup>47</sup> e aspirina pode, então causar danos à mucosa estomacal e intestinal. As estruturas mencionadas são originárias do ácido aracdônico, ácido esse que tem 20C e 4 duplas ligações duplas (=). Estudar a formação de ácidos graxos insaturados não é uma mera elocubração teórica, mas é saber a formação do ácido graxo fundamental para a formação de prostaglandinas, tromboxanas e o ácido graxo fundamental na estrutura do diacil glicerol, segundo mensageiro (ácido araquidônico<sup>48</sup> e ácido esteárico). Então a questão é: o ácido aracdônico é excencial, ou seja, é obtido a partir da dieta? Não, ele é sintetizado no nosso organismo apesar da sua complexidade. Por sinal, nossas células só são capazes de sintetizar um ácido graxo com mais de uma insaturação que é o ácido araquidônico. Os demais ácidos graxos possuem apenas uma insaturação. Como fazer essa insaturação?

Tomemos por exemplo o ácido oléico<sup>49</sup> que possui 18 carbonos e uma dupla entre C<sub>9</sub> e C<sub>10</sub>. Para formar essa insaturação foi necessário a retirada de dois hidrogênios, um de cada carbono (9 e 10) pela ação de enzimas conhecidas como oxidases e que usam o NADP reduzido como coenzima formando duas moléculas de água. Ácidos graxos com duas ou três insaturações são essenciais como o linoléico e o palmitoléico. O ácido araquidônico, portanto, não é essencial, obtido a partir do linolênico com o uso do malonil-CoA .

#### † Formação de triacil gliceróis (TAGs) e fosfolipídeos

O glicerol vai se combinar com novas moléculas de ácidos graxos para formar moléculas de gordura. No entanto, o substrato para a formação de novas moléculas de gorduras (TAG)<sup>50</sup> são respectivamente: ácidos graxos + glicerol fosfato. Isto significa que os ácidos graxos não representam uma forma de armazenamento. Quando muito, representam uma forma de armazenamento de acetil CoA já que esse é seu único substrato. O glicerol obtido a partir da hidrólise de gorduras nas células adiposas, deve ser fosforilado em uma reação catalisada por uma enzima conhecida como glicerolquinase (a glicero quinase). O problema é que essa enzima é praticamente inexistente nas células adiposas, sendo encontrada em alta atividade em outros tecidos, principalmente no hepático.

Assim, por gradiente de concentração, vai para a circulação de onde vai para o fígado. Lá ele vai transformar-se em glicerol-fosfato que, por sua vez pode seguir os seguintes caminhos metabólicos:

<sup>47</sup> Ácido Acetil Salicílico

<sup>48</sup> Insaturado (20:3)

<sup>49</sup> Oléico (18:1); Linoléico (18:2); Linolênico (18:3)

<sup>50</sup> Triacilgliceróis

fosfolipídeos de membrana, ser substrato para gliconeogênese (se o glicerol-fosfato for transformado em diidroxicetona-fosfato e daí a gliceraldeído-3-fosfato ou ser transformado em ácido pirúvico), substrato para formação de moléculas de gordura no fígado, servir de substrato para a via do glicerol fosfato (reoxidação do NADred formado na glicólise). O diabético não compensado, por exemplo, tem deficiência grave com o aproveitamento de glicose porque a insulina estimula a absorção de glicose na célula. Sem mobilização de glicose, a célula utiliza ácidos graxos como fonte principal de energia.

A deficiência de carnitina pode gerar o fígado gordo porque o ácido graxo não vai ser oxidado, acumulando no citoplasma. Os ácidos graxos transportados para o citoplasma para serem fosforilados ao encontrarem ácidos graxos em abundância formarão muita gordura. A glicose se transforma em glicose-6-fosfato que forma gliceraldeído-3-fosfato e diidroxicetona-fosfato que, na presença de glicerol-fosfato desidrogenase e NAD reduzido, saturam a dupla ligação formando o glicerol-fosfato. As hidroxilas 1 e 2 são esterificadas por, principalmente ácido palmítico e ácido esteárico formando o ácido fosfatídico de onde obtemos tanto as gorduras como os fosfolipídeos. Quando esse ácido fosfatídico se une a uma base nitrogenada como a colina, forma uma fosfolipídeo muito importante, a LECITINA. Quando o ácido se liga a serina ou etanolamina, formando a CEFALINA. Esses são dois dos principais fosfolipídeos de membrana. Já os TAG, são formados na presença de uma fosfatase obtendo um DAG que, com a entrada de outro ácido graxo, é esterificado na sua última hidroxila, formando o TAG.

#### † Formação e utilização de corpos cetônicos

O único local onde isso ocorre é nas mitocôndrias das células hepáticas. Dois deles são ácidos fortes: acetoacetato (4C) e beta-hidroxibutrato (4C) e o outro é a propanona-3C (acetona). São formadas a partir de um único substrato: acetil-CoA. Quando há, momentaneamente, um excesso de acetil-CoA em relação ao oxaloacetato. Como o fígado é obrigado a manter a glicemia se utiliza mais de ácido graxo como principal substrato energético o que gera um excedente grande de acetil-CoA, que forma corpos cetônicos ao invés de fígado gordo. A membrana mitocondrial interna é permeável a esses compostos indo para a circulação. Lá o acetoacetato e o beta-hidroxibutirato irão para as células dos tecidos extra-hepáticos.

O jejum prolongado leva as células nervosas a utilizarem corpos cetônicos com substrato energético após voltarem a se transformar em acetil-CoA nas mitocôndrias dessas células. O primeiro corpo cetônico é o acetoacetato. A partir da junção de duas moléculas de acetil-CoA com a retirada de uma

molécula de CoA, reação catalisada pela tiolase, forma-se o acetoacetol CoA. Esse será hidratado pela ação da desacilase, perdendo também a outra molécula de CoA. A acetona é a descarboxilação do acetoacetato. Essa descarboxilação pode ser espontânea e muito lenta ou catalisada pela acetoacetato descarboxilase, vitamina B<sub>6</sub> dependente.

O beta-hidroxi butirato é formado pela hidrogenação do grupamento cetona do carbono b com a oxidação de um NAD reduzido, reação reversível que é catalisada pela beta-hidroxi butirato desidrogenase. Cerca de 25% do acetoacetato são transformados em acetona e 75% em beta-hidroxi butirato, já que o último rende mais energia a célula, pois a sua transformação em acetoacetato rende um NAD reduzido.

Nas mitocôndrias de células de tecidos extra-hepáticos o beta-hidroxi butirato deve ser transformado novamente em acetoacetato usamos uma molécula de NAD oxidado. O acetoacetato deve se transformar em acetil-CoA pela ação da tioquinase acética pois esse precisa ser ativado. Essa enzima não há no fígado e por isso os corpos cetônicos não são utilizados no fígado. Existe uma outra forma de se obter acetoacetil-CoA a partir do acetoacetato, é a sua combinação com o succinil CoA numa reação de dupla troca. Esse doa CoA para o acetoacetato que se transforma em acetoacetol-CoA e o succinil-CoA transforma-se em succinato pela ação da tioforase, que também não existe no fígado.

### † Patologias

A utilização excessiva de ácidos graxos como substrato metabólico gera um excedente brutal de acetil-CoA o que também eleva a produção de corpos cetônicos, que vão para circulação. A acetona, por ser volátil, gera o “conhecido” hálito de maçã, pois a não ingestão prolongada de glicose gera o aumento do consumo de gordura. O jejum prolongado causa então a acidose (cetoacidose) por serem o beta-hidroxi butirato e cetoacetato ácidos fortes. Além disso, as células de tecidos extra-hepáticos, que não necessitam desse excedente de corpos cetônicos, ficam saturadas liberando esse excedente pela urina, só que esses ácido vão ser eliminados na urina sob a forma de sal de sódio b hidroxi butirato de sódio e aceto acetato de sódio. A saída excessiva de sais pela urina inibe os antidiuréticos para diluir os sais, o que causa a desidratação.

Por que os corpos cetônicos não são aproveitados como fonte de energia no fígado?

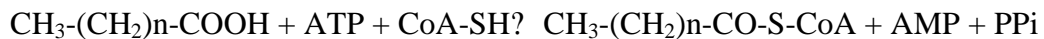
Nem todo o excesso de glicose é armazenado em forma de glicogênio, por isso quando se quer emagrecer diminuem-se os açúcares e não as gorduras. Para as células adiposas a única fonte de

glicerol fosfato é a glicose por que a glicose vai para a glicólise se transforma em gliceraldeído-3-fosfato, diidroxiketona-fosfato que é transformada em glicerol-fosfato. Pois isso mais de 95% do produto da ação da aldolase é a diidroxiketona-fosfato.

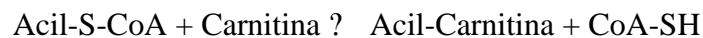
### Ativação Dos Ácidos Graxos

A ativação dos ácidos graxos consiste na entrada destes na mitocôndria, na forma de acil-CoA. O processo depende:

1. Da ligação do ácido graxo com a Coenzima A, formando o acil-CoA no citosol. A reação é catalisada pela enzima Acil-CoA Sintetase, localizada na membrana mitocondrial externa:



2. Do transporte do radical acila através da MMI, do citosol para a matriz, mediado pelo carreador específico Carnitina. A transferência do radical acila da CoA para a carnitina é catalisada pela enzima Carnitina-Acil-Transferase I:



3. Do lado da matriz mitocondrial, a carnitina doa novamente o radical acila para a CoA, regenerando o acil-CoA no interior da mitocôndria. A reação é catalisada pela Carnitina-Acil-Transferase II, localizada na face interna da MMI, e é exatamente o inverso da descrita acima.

### Beta - Oxidação do Ácido Graxo:

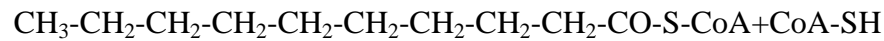
Consiste na quebra por oxidação do ácido graxo sempre em seu carbono beta, convertendo-o na nova carbonila de um ácido graxo agora dois carbonos mais curto. O processo é repetitivo, e libera a cada quebra:

1 NADH+H<sup>+</sup>

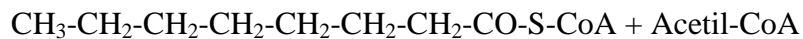
1 FADH<sub>2</sub>

1 Acetil CoA

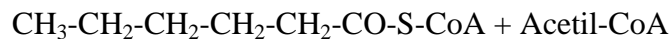
São 4 as enzimas envolvidas em cada etapa de oxidação da via. Exemplo:



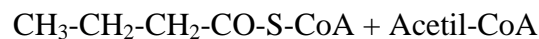
↘



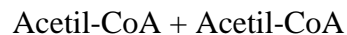
↘



↘



↘



Respiração Celular: A síntese de ATP acoplada à beta - Oxidação vem:

Do transporte de elétrons do NADH e do FADH<sub>2</sub> formados no processo pela cadeia respiratória. Da oxidação dos radicais acetil dos acetil-CoA no ciclo de Krebs. Exemplo: A oxidação de um ácido graxo com 16 carbonos rende para a célula, em ATP:

8 Acetil-CoA ↘ 96 ATPs

7 NADH+H<sup>+</sup> ↘ 21 ATPs

7 FADH<sub>2</sub> ↘ 14 ATPs

**Total ↘ 131 ATPs**

Regulação da beta-Oxidação:



A regulação da via é feita pela enzima reguladora Carnitina-Acil-Transferase I, que regula a velocidade de entrada do ácido graxo na mitocôndria, desta forma, a velocidade de sua degradação. Esta enzima é inibida por MALONIL-CoA, um intermediário cuja concentração aumenta na célula quando esta tem carboidrato disponível, e que funciona como precursor na biossíntese de ácido graxo.

### Oxidação de Ácidos Graxos Insaturados:

Se o ácido graxo a ser oxidado for insaturado, o processo tem dois passos enzimáticos adicionais:

- ?? A conversão do isômero "cis" em "trans";
- ?? A saturação da dupla ligação pela adição de água.

Uma vez o ácido graxo saturado, ele pode seguir com o processo normal de oxidação.

### Oxidação de Ácidos Graxos com Número Ímpar de Carbonos:

A oxidação de um ácido graxo com número de carbonos ímpar leva à formação de um resíduo de PROPIONIL-CoA, que através de uma seqüência de reações enzimáticas e com gasto de energia (1 ATP é hidrolisado para cada propionil-CoA convertido), é convertido em SUCCINIL-CoA, que entra no ciclo de Krebs para ser oxidado.

### Corpos Cetônicos:

A oxidação dos ácidos graxos no fígado leva à formação de grande quantidade de Acetil-CoA, que pode ser oxidado no próprio fígado, ou convertido nos CORPOS CETÔNICOS. São três os corpos cetônicos formados a partir do Acetil-CoA: Acetoacetato, beta – Hidroxibutirato e Acetona. O objetivo da formação dos corpos cetônicos é permitir o transporte da energia obtida pela oxidação dos ácidos graxos aos tecidos periféricos, para lá serem utilizados na síntese de ATP. A formação de corpos cetônicos é uma via de "superabundância" através da qual o fígado distribui energia a todo o organismo. Nos tecidos periféricos os corpos cetônicos regeneram o acetil-CoA, que entra no ciclo de Krebs para produção de energia. Normalmente a quantidade de corpos cetônicos no sangue é baixa, mas em situações como o jejum prolongado ou o "diabetes mellitus", suas concentrações séricas podem aumentar muito, levando o indivíduo a um estado de CETOSE, caracterizada por uma ACIDOSE METABÓLICA, que pode ser fatal.

## DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE PROTEÍNAS

O título de metabolismo das proteínas não é muito adequado porque quando estudamos o primeiro grupo de substâncias orgânicas, os glicídios, estudamos o seu metabolismo, tanto o catabolismo como seu armazenamento; o mesmo ocorrendo com os lipídios, mas no caso das proteínas é mais interessante estudar em separado o catabolismo e anabolismo. Isso devido ao fato das proteínas não representarem uma forma de armazenamento de aminoácidos como o glicogênio e as gorduras, elas exercem funções claras como na estrutura de hormônios e enzimas. Elas não dependem das altas e baixas de ATP como as gorduras e glicídios.

Outro motivo de estudarmos em separado a parte de anabolismo será a sua constante atualização devido aos progressos nesta área. Mas serão os aminoácidos tão importantes quanto os ácidos graxos e glicose na obtenção de energia? Podemos dizer que não, já que cerca de 90% da energia requerida para funcionamento do nosso organismo vem da oxidação de ácidos graxos e glicose e só 10% ou 15% vem da oxidação de aminoácidos. É evidente que isso tem excessões. Uma dieta rica em proteínas irá provocar um excesso de aminoácidos no tecido, os aminoácidos têm um caminho prioritário que é formar proteínas intracelulares não dependendo de altas e baixas de ATP para isso, nesses casos de excesso haverá um maior uso de aminoácidos como fonte de energia. Em que condições nós utilizamos aminoácidos como fonte energética? Só há três condições:

1º) quando os aminoácidos aparecem no meio intracelular provenientes da taxa de renovação de nossas proteínas intracelulares (turn over) (exemplo: paratormônio: vida-média 18 minutos e tirocalcitonina: vida média 11 minutos). As proteínas são hidrolisadas pelas proteases lisossomiais.

2º) quando há um excedente de aminoácidos em relação a necessidade de formação de nossas proteínas intracelulares. Quando, por exemplo, nas células betas do pâncreas quando a aminoácidos suficientes para formação de insulina e ainda sobra, esse excesso irá ser usado na formação de energia.

3º) condição em estado anormal - desnutrição, jejum prolongado, diabetes não controlado (compensado), ou seja, utiliza pouca glicose e ácido graxo e passa a utilizar aminoácidos. Mesmo um jejum de 12 horas, já que há um esgotamento de glicogênio nesse meio tempo com apenas as atividades cotidianas sem contar atividades físicas. As gorduras podem durar até dois meses, mesmo assim há utilização de aminoácidos como complementação da obtenção de energia.

O que é oxidar aminoácidos? É transformá-los em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  com a retirada de seu grupamento amina que sairá na forma de amônia ( $\text{NH}_3$ ), substância tóxica ao nosso organismo e que não necessariamente deve ser eliminada, só em caso de excesso, caso contrário pode ser usada para construção de substâncias fisiologicamente ativas. Caso a amônia não fosse aproveitada em nosso organismo todos os aminoácidos seriam essenciais, já que não poderíamos formar grupamentos aminoácidos nos esqueletos de carbono. Substâncias obtidas pela amônia: nucleotídeos (base nitrogenada dessa substância), aminoácidos não-essenciais e outras aminas importantes. A amônia em grande quantidade é excretada na forma de uréia.

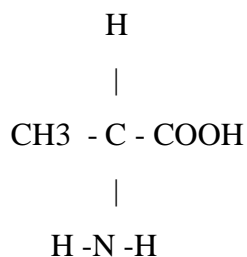
Os aminoácidos ao perderem o grupamento amina formam cetoácidos que alimentam o ciclo de Krebs. São obtidos vários intermediários do ciclo de Krebs pela desaminação dos aminoácidos, que irão movimentar também a cadeia respiratória para formar ATP, ou também irão realizar a gliconeogênese.

Reações características do catabolismo dos aminoácidos:

- 1- Desaminação (oxidativa e não-oxidativa)
- 2- Transaminação
- 3- Transdesaminação
- 4- Descarboxilação

#### † Desaminação oxidativa

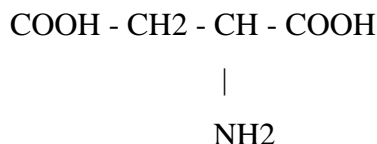
Usaremos a alanina como exemplo:



Na presença de sua L-aminoxidase correspondente e tendo o FMN como coenzima que será reduzida formando FMN reduzido. Haverá perda de dois hidrogênios formando um iminoácido correspondente a alanina. Esse fenômeno irá ocorrer principalmente, não unicamente, no citoplasma de células hepáticas e renais. O iminoácido, uma substância instável, com a adição de água sem necessidade de qualquer enzima irá liberar amônia entrando no lugar do grupamento amina um grupamento cetona. Será formado então o cetoácido correspondente a alanina: o ácido pirúvico cujo destino já é sabido. A

FMN reduzido não vai para mitocôndria ser reoxidada na cadeia respiratória, ela se combinará com oxigênio molecular e formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  - água oxigenada) e para que esses peróxidos formados não sejam prejudiciais as células eles serão transformados em água e oxigênio pela ação das catalases (tecido renal e hepático são ricos em catalases). Assim a FMN é reoxidada.

Outro exemplo é com o ácido aspártico (ou aspartato):



O aspartato na presença da L-aminoxidase corresponde e de sua coenzima FMN irá formar seu iminoácido correspondente formando oxaloacetato. Agora sem enzima haverá entrada de água, liberação de amônia e formação do cetoácido correspondente ao aspartato: o oxaloacetato, não apenas intermediário do ciclo de Krebs como também o principal substrato para a gliconeogênese. O FAD só irá atuar como coenzima de retirada de grupamento amina quando nós estivermos fazendo a desaminação de D aminoácidos e não de L-aminoácidos.

† Desaminação não oxidativa:

A desaminação não-oxidativa ocorre principalmente em dois tipos de aminoácidos: os hidroxilados (exemplo: serina) e sulfurados (exemplo: cisteína).

SERINA	CISTEINA
$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{SH} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$

A serina então pela sua L-amino-acil desidratase perde uma molécula de água e a cisteína perde uma molécula de H<sub>2</sub>S pela sua L-amino-acil desidratase. A partir daí as vias de desaminação se igualam para os dois aminoácidos. O iminoácido formado pela perda do grupamento hidroxila, no caso da serina e o grupamento sulfidrila, no caso da cisteína. Assim esse iminoácido, recebe uma molécula de água e perde o grupamento amina, formando cetoácido: no caso desses dois aminoácidos o cetoácido formado é o ácido piruvico.

### † Transaminação

Podemos dividir os aminoácidos em dois tipos. Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos. Os aminoácidos glicogênicos são os aminoácidos que quando perdem o seu grupamento amina formando cetoácidos que serão usados na gliconeogênese, por exemplo, o aspartato que é essencialmente glicogênico pois, ao ser desaminado forma oxaloacetato que é o principal substrato da gliconeogênese. Os aminoácidos cetogênicos são aqueles que quando perdem seus grupamentos aminas formam cetoácidos que quando metabolizados contribuem direta ou indiretamente para formação de corpos cetônicos. A alanina irá formar piruvato que pode tanto ser indiretamente substrato para a gliconeogênese como também substrato indireto para a formação de corpos cetônicos, podendo ser classificada como aminoácido glicogênico ou como cetogênico. No entanto a aminoácidos como a lisina que quando desaminados fornecem diretamente aceto acetil-CoA que irá formar aceto acetato, a lisina é então essencialmente cetogênico.

Antes de começar a transaminação, devemos alertar que as L-amino oxidases são enzimas que se apresentam em baixíssimas concentrações mesmo nos tecidos hepático e renais. Qual é então a principal forma de retirada do grupamento amina para formação de cetoácido? É a transaminação que é a transferência do radical amina de um aminoácido para um cetoácido que em mais de 90% das situações é o alfa ceto glutarato, que recebe o grupamento amina transformando-se em glutamato (aminoácido) e o aminoácido quando perde seu grupamento amina se transforma no seu cetoácido correspondente. O que acontecerá então com o ciclo de Krebs que ficaria na falta do alfa ceto glutarato que seria usado na transaminação de quase todo aminoácido? Haveria uma paralização do ciclo por falta de alfa ceto glutarato logo deve haver uma saída.

A transaminação é reversível e são catalisadas por aminotransferases (ou transaminases) que são sempre dependentes do estado ativo da vitamina B<sub>6</sub>: o fosfato piridoxal. Os dois exemplos clássicos

são as transaminações da alanina e do aspartato, transaminações essas de importância médica. A alanina, catalisada pela transaminase glutâmica piruvica (TGP), dependente de fosfato piridoxal, transferindo seu grupamento amina para o alfa ceto glutarato que é transformado em glutamato. A alanina irá formar ácido pirúvico com a perda de seu grupamento amina. No caso do aspartato haverá transferência de grupamento amina para o alfa ceto glutarato que dará origem ao glutamato. Essa reação é catalisada pela enzima transaminase glutâmica oxaloacética (TGO), também dependente da forma ativa da vitamina B6 (o fosfato piridoxal). O aspartato perdendo o grupamento amina formará oxaloacetato.

Importância médica da Transaminação: essas duas transaminases (TGO e TGP) são muito usadas no diagnóstico de doenças. A TGO é uma enzima que existe em maior quantidade (não apenas) na mitocôndria, ao contrário da TGP que existe em maior quantidade (não apenas) no citoplasma. No infarto algumas enzimas são liberadas na circulação em função da lesão tecidual, a segunda enzima em maior quantidade (a primeira sem importância no momento é a creatina fosfo quinase) é a TGO já que o tecido cardíaco é rico em mitocôndrias. A lesão poderá ser medida pela quantidade de enzimas na circulação, quanto maior a quantidade maior a lesão assim podemos diagnosticar enfartamento assintomáticos através da medida da lesão tecidual. Já em lesões em tecido hepático como em hepatite, cirrose e icterícia há o controle da cicatrização hepática pelo nível de transaminases sendo que a primeira que sai é a TGP.

Outro exemplo é o caso de operários que se intoxicam em indústrias químicas principalmente as que usam solventes orgânicos como tetra cloreto de carbono como clorofórmio. Tais solventes orgânicos provocam a degeneração do tecido hepático, assim poderíamos acompanhar o nível de lesão pela dosagem de transaminase.

Regeneração do alfa ceto glutarato: para evitar que ocorra paralisação do ciclo de Krebs por falta de alfa ceto glutarato, é preciso regenerar o alfa ceto glutarato. A oxidação dos aminoácidos sempre ocorre com liberação de amônia, no entanto na transaminação não ocorreu até agora essa liberação. Essa regeneração se dá exclusivamente nas mitocôndrias devido à presença de elevadas concentrações da enzima L glutamato desidrogenase (LGDH) que é uma proteína complexa com seis sub-unidades proteicas com peso molecular de aproximadamente 330.000 e é controlada alostericamente. Essa enzima irá retirar o grupamento amina do glutamato, ou seja, que enquanto a enzima que retira o

grupamento amina da alanina, do aspartato, da cisteína e da serina está em baixa quantidade, essa enzima está em alta quantidade nas mitocôndrias das células.

O glutamato obtido no citoplasma (em maior quantidade pela TGP e em menor pela TGO) passa pela membrana mitocondrial interna por uma proteína transportadora de glutamato. No interior da mitocôndria haverá formação de alfaceto glutarato e amônia na presença de LGDH que tem como coenzima o NAD que se transforma em NAD reduzido que irá ser reoxidado na cadeia respiratória com formação de cadeia respiratória. O controle alostérico dessa enzima é realizado tendo como moduladores positivos (alta de ADP e GDP) e como moduladores negativos (alta de ATP e GTP). A reação reversa da LGDH usará como coenzima o NADP reduzido que se transformará em NADP oxidado.

#### † Transdesaminação

É o mesmo que transaminação mais a regeneração do alfa ceto glutarato.

#### † Balanço Nitrogenado

Balanço nitrogenado é a medida da quantidade de nitrogênio fixado aos tecidos (na síntese de proteínas) em relação ao nitrogênio excretado (amônia na forma de uréia). É medida ao longo de 24 horas tirando-se uma média dos balanços nitrogenados positivos e negativos de um indivíduo ao longo dessas 24 horas. Essa medida em pessoas normais deve dar como resultado um equilíbrio, ou seja, excreção é igual à fixação do nitrogênio. O balanço é positivo quando há maior fixação do que excreção, como por exemplo, no caso de fase de crescimento, gravidez, pós-operatório e pós-infecção aguda são casos em que deve haver um balanço nitrogenado positivo. O negativo ocorre em situações de fome, desnutrição, diabético não-controlado e jejum prolongado quando a excreção supera a fixação de nitrogênio. Como as reações do catabolismo de aminoácidos são todas reversíveis, no balanço nitrogenado positivo as reações ocorreram no sentido de síntese de proteínas, formação de aminoácidos não-essenciais e formação de amônia, ou seja, balanço nitrogenado positivo é sinônimo de alta de ATP e GTP.

Já no caso de balanço nitrogenado negativo, as reações ocorrem no sentido de expulsão de amônia, sendo sinônimo de altas de ADP e GDP.

## Capítulo 10

### METABOLISMO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

Existem diferenças marcantes entre o metabolismo de RNA e DNA.

- 1) O de RNA é bastante seletivo (apenas uma das fitas de DNA será transcrita na forma de RNA), ao passo que a replicação de DNA tem que ser fiel e dar origem a uma cópia idêntica ao DNA parental, a síntese de RNA é altamente seletiva, ou seja, a família de RNAs de uma célula é diferente da de outra célula, que caracteriza o teor de proteína daquela determinada célula.

**OBSERVAÇÃO:** Transcrição é passar a informação genética para a linguagem dos ácidos ribonucleicos.

- 2) Durante a síntese de RNA, não há a necessidade da presença de um primer, ou seja, a principal enzima da síntese de RNA é capaz de começar a replicação sem precisar de um pedaço já iniciado, uma âncora.
- 3) Quimicamente, o DNA e RNA diferenciam-se pela presença da uracila (base nitrogenada) e a ribose, que é a presença da hidroxila no carbono 2, no RNA.

A principal enzima que atua na transcrição gênica é a RNA polimerase DNA dependente. Nos procariontes, existe apenas uma enquanto que nos eucariontes existem três RNA polimerases. A equação geral de biossíntese de RNA é a adição de nucleotídeos trifosfato (NTP) mais nucleotídeo mono-fosfato (NMP) crescente na presença da RNA pol, vai dar origem a uma cadeia de RNA alongada mais pirofosfato que deverá ser posteriormente clivado, garantindo a irreversibilidade e a proteção do processo. Características gerais dessa enzima: é multi-subunitária, ou seja, tem muitas subunidades e seu peso molecular gira em torno de 500 quilodalton (alto peso). As subunidades são:  $\alpha$ ,  $\beta$  (responsável pela ligação fosfodiéster),  $\beta'$  (reconhece o molde de DNA) e  $\gamma$  (essas subunidades são a parte catalítica) que fazem parte do cerne da enzima. Mas para se tornar uma holoenzima biologicamente ativa, tem a necessidade de se unir a outras subunidades reguladoras chamadas  $\sigma$  (sigma) e  $\rho$  (rho).



Cada subunidade faz um papel específico dentro do processo de síntese de RNA. As proteínas reguladoras não fazem parte do cerne da enzima. Durante a polimerização do RNA, as subunidades reguladoras devem reconhecer o início da síntese.

A RNA polimerase, diferente da DNA pol, é capaz de se ligar ao molde de DNA em  $\sigma$ -helice e escaneá-lo até achar um sítio de iniciação e a subunidade  $\sigma$  que ajuda a fazer essa associação. Proteína de hit shock ou choque térmico refere-se ao fato de, quando uma célula é submetida a uma alta temperatura, ela responde a essa variação sintetizando as proteínas de choque térmico, são altamente conservadas do ponto de vista evolutivo. Se comparar um animal inferior com um superior, são as mesmas proteínas sintetizadas quando submetidas à alta temperatura. Elas são ditas de proteção da célula. Nós, de certa forma interferimos na produção dessas proteínas na medida em que quando desenvolvemos uma febre, antes até de chegar um limite para começar a entrar com um antitérmico, de um modo geral, já se dá logo o antitérmico. Acontece que o nosso organismo tem esse mecanismo de proteção próprio que é a proteína de choque térmico na medida em que ele é invadido por um agressor (microrganismo) e para se proteger, eleva a temperatura do corpo, na medida que faz isso, muda o padrão de síntese de proteína, sintetizando as de hit shock: proteína que defendem a célula de uma possível desnaturação proteica posterior. A família mais importante até agora pesquisada é a HSP 70. O choque térmico tem sido muito utilizado em agricultura e medicina. A diferença das outras proteínas para as de choque térmico está na subunidade  $\sigma$ , nas proteínas normais, é proteína  $\sigma$  70 (proteína cujo peso molecular é 70 quilodalton) e a de choque térmico tem 32 de peso molecular. Então, quando submetida a altas temperaturas, a subunidade  $\sigma$  32 compete com a 70 e se associa a RNA pol e um grupo de proteínas especiais será selecionado porque um essa subunidade que seleciona o sítio de iniciação. Então, se houve a troca dessa subunidade sigma significa dizer que a síntese de RNA começará em local diferente do usual. É a subunidade  $\sigma$  que determina o lugar que iniciará a transcrição, seleciona o sítio de síntese de RNA.

O processo de síntese de RNA pode ser dividido em iniciação, alongamento e terminação. A iniciação do processo pode ser definida como o reconhecimento e identificação de uma região chamada promotora. Quem é ela? É a região de ligação da RNA polimerase no DNA. Tem como característica regiões de consenso, seqüências comuns a essas regiões. Quando vai determinar o sítio de início da síntese de RNA, o primeiro nucleotídeo que vai determinar um aminoácido é chamado de +1 dentro do mapeamento do DNA e a medida em que você afasta desse sítio, há números negativos para a esquerda -1, -10, -35, (promotora) ,+1, +2 (estrutural), ou seja, dentro do DNA podemos mapeá-lo a partir do início da mensagem que dará origem a um aminoácido e finalmente a uma proteína. Costuma-se

representar a parte que vai codificar uma proteína como positiva e a negativa, a região reguladora ou moduladora que vai ligar a RNA pol, chamada também de promotora. Essa região adjacente a que dará origem a uma proteína compreende a região promotora (tem sempre uma seqüência pppG ou pppA) é a reguladora que é a negativa. O que há de consenso nessa região promotora nos vários promotores analisados em função da síntese de RNA? Existe uma região consenso na posição -10 e -35 do DNA que caracteriza a região promotora, que apresenta seqüências comuns chamadas de catabólicas.

Daí começa o alongamento da cadeia que compreende a adição sucessiva de vários ribonucleotídeos. Então a subunidade  $\sigma$  auxilia a achar o sítio de identificação e fica ligada até aproximadamente a ligação de 10 nucleotídeos e após o início do alongamento se dissocia da enzima de tal forma que a enzima continua alongando sozinha a molécula de RNA, adicionando unidades sucessivas de ribonucleotídeos. Temporariamente, tem-se a formação de um híbrido DNA-RNA. Para terminar a síntese de RNA, a RNA pol se associa a sub-unidade  $\sigma$ , que vai ajudá-la a identificar o sítio de terminação que tem como características uma seqüência muito grande de poli-U e uma seqüência de AG que é palíndromo (imagem especular), por exemplo, a palavra NIS/SIN. Ao observar-se a região do término, constatou-se uma seqüência terminal AGAGAG que no final forma um grampo pareado na região que tem uma haste e uma região redonda que desestabiliza a molécula de RNA. Na medida em que a enzima está fazendo a leitura no RNAm e fazendo o RNA correspondente, esse RNA tem a região palíndromo que permite o pareamento intra-cadeia. Na medida em que a haste faz esse pareamento ele desestabiliza a molécula de RNA fazendo com que ela se solte do molde de DNA. No caso de procariontes, na medida em que a RNA pol vai fazendo a leitura do DNA e sintetizando o RNA, que vai se soltando e entrando na maquinaria responsável pela tradução desse RNA. Portanto, os processamentos sofridos pela molécula de RNA que são sintetizados durante o processo de transcrição no caso de procariontes são poucos quando comparados com eucariontes que sofrem transformações químicas para dar origem ao RNA biologicamente ativos. Quais são os produtos da síntese de RNA?

mRNA

rRNA

tRNA

hnRNA (heterogêneo nuclear)

snRNA (baixo PM nuclear)

Em potencial, cada vez que o processo de síntese ocorrer, haverá todos esses produtos. Mas existe a regulação da expressão gênica que faz com que seja processado mais RNAm do RNAt por exemplo, havendo então um sincronismo dependendo do estado metabólico da célula. A célula eucariótica sofre maior regulação, uma vez que foi compartimentalizada, ou seja, guarda sua informação gênica dentro do núcleo. Formas de regulação: transporte do RNA do núcleo para o citoplasma e os vários processamentos que os RNAs sofrem. Por exemplo, o RNA, em eucarionte, é sintetizado com um número muito maior de base do que quando está ativo, sofre perda de pedaços, na medida em que ele quer modificar aquele gen, ele transmuta esses pedaços que tem. O tempo de transporte, nas células eucarióticas já que é compartimentalizada, enquanto que nos procariontes, quando o RNA acaba de ser sintetizado, já entra na maquinaria de síntese de proteína. A meia-vida do RNA também é um processo de regulação já que é transportado para o citoplasma e existe um balanço da síntese de RNAm em termos de necessidade metabólica.

#### ‡ Processamento de RNAs (eucariontes)

Retirada de introns, adição de cap (7-metil guanossina) no terminal 5', adição de uma cauda de poli-A no terminal 3'. Para que serve o cap que o RNA recebeu? Acredita-se que essa estrutura tenha como função o reconhecimento de ribossoma na tradução, auxiliando o RNAm no sítio de síntese de proteína no processo de tradução. Acredita-se que a cauda de poli-A tenha como função a estabilização do RNA como se ele proporcionasse ao RNA uma menor suscetibilidade a degradação enzimática. Outro tipo de processamento é o "splicing" que é o corte ou perda de regiões introns. Ao ser sintetizado no núcleo a molécula de RNAm é chamada de RNAhn (precursor do RNAm). No núcleo, a forma do RNAm é irregular devido aos introns, que intercalam os exons que são regiões que codificam uma seqüência de aminoácido.

Como são retiradas dos introns?

Os RNAsn que medeiam essa retirada, aproximam extremidades dos exons, de tal forma que formam um laço e unem as extremidades dos introns, liberando-os. Exemplo de atividade catalítica de RNA é a do snRNA<sup>51</sup>, ou seja, une os dois exons mais próximos e cliva o intron. Uma vez perdendo essas regiões de intron<sup>52</sup>, sofre adição do capuz e da cauda de poli-A, pronto para deixar o núcleo. O codon de iniciação mais frequente é o UAG e os de terminação são UAA, UAG, UGA, não codificam mensagem alguma. A função do RNAm é carrear a mensagem genética para o citosol que é o sítio de

<sup>51</sup> Small Nuclear RNA

<sup>52</sup> Saída em "laço".

síntese de proteína. No caso de procariontes é carregada até o sítio de síntese de proteína que são os ribossomas. O RNAt tem como função carregar os aminoácidos até o sítio de síntese de proteína. O RNAt apresenta na sua organização estrutural um pareamento intra-cadeia, conferindo a ele a forma de um trevo, contendo braços, mas em M.E. não aparece bem dessa forma. Ao sofrer processamento, ocorre o pareamento intracadeia, uma série de regiões que permitem a ele essa disposição espacial na forma de um trevo, que apresenta um braço cuja função é se ligar ao aminoácido, esse braço recebe um processamento que é a adição da sequência CCA. O braço oposto é o braço do anti-codon, é a sequência desse anti-codon que vai determinar que aminoácido deve ser engajado no braço oposto.

O RNAr tem como função junto com determinadas proteínas fazer parte da estrutura do ribossoma. Também vai sofrer processamento, nesse caso, o precursor de 30S vai sofrer metilações e clivagens, que dará origem a dois RNAs maduros, no caso de procarionte, 16 e 23S (unidade de sedimentação) que farão parte da estrutura do ribossoma. No caso de eucarionte, o precursor de 45S dá origem a dois de 18 e 28S. Uma vez associados à proteína, dão origem ao ribossoma, que é formado pela união das 2 subunidades graças a ação do magnésio, que vai dar origem ao ribossoma de 70 ou 80S (procarionte e eucarionte). Até 1991, acreditava-se que o RNAr apresentava 2 sítios: A (aminoacil), que recebe os aminoácidos e P (peptidil), que mantém o peptídeo a ser sintetizado, hoje sabe-se da existência de um terceiro chamado E (exit = saída), que é posicionado o RNAt que não contém mais aminoácido.

## Inibidores da Transcrição:

Existem antibióticos que atuam na transcrição. A rifampicina é capaz de se ligar à subunidade  $\beta$  da RNA pol, bloqueando (mais especificamente o estabelecimento da primeira ligação fosfodiéster) a transcrição em procariontes. Então, esses antibióticos que tem especificidade por enzimas são muito úteis por que é possível fazer o tratamento com esse antibiótico na medida em que não vai atingir o processo de transcrição nos eucariontes. Quando se usa a  $\alpha$ -amanitina, ele se liga a RNA polimerase 2<sup>53</sup> (mRNA) em eucarionte. A actinomicina D (AMD) bloqueia a tradução, mas que de forma conjunta também à replicação, muito utilizada no tratamento de câncer. É um acoplador que se insere entre as bases C e G do DNA, antibiótico intercalante. Atualmente, além da resistência das bactérias, existe a tolerância, dose necessária para matar uma bactéria e inibir o crescimento dessa. A diferença de resistência para tolerância tem a ver com a dose para matar ou inibir a bactéria. Quando se tem uma cepa resistente, ela tem o  $c_{nb} = c_{ni}$ . No caso de tolerância, ela adquiriu uma diferença numérica em termos de concentração do  $c_{ni}$  para o  $c_{mb}$ . Ela precisa de uma dose diferente para matar ou inibir o

<sup>53</sup> Pol II

crescimento dela. Quem confere essa tolerância a elas? Já se sabe que os plasmídeos são elementos importantes para trocar gens de resistência entre as bactérias. Os elementos genéticos móveis, blocos de DNA, trocados de uma para outra, permitindo a uma molécula antes sensível a um antibiótico agora se torne resistente. O plasmídeo, que é um DNA extracromossomal, DNA dupla-hélice que é capaz de se replicar, independente do DNA da bactéria. Então, as bactérias que são sensíveis a determinados antibióticos, se desenvolvem essa resistência ou tolerância. Uma vez sintetizados esses RNA, vão se agregar para formar as unidades de síntese de proteína. Tradução é o processo através do qual a mensagem genética é transformada na linguagem dos 20 aminoácidos. Podemos dividi-la em etapas:

- 1 Ativação dos aminoácidos
- 2 Iniciação da síntese de proteína
- 3 Alongamento da cadeia polipeptídica
- 4 Terminação da cadeia polipeptídica
- 5 Processamento da proteína

Ativar os aminoácidos, significa ligá-los aos tRNAs correspondentes. Essa etapa ocorre através da tRNA acil-sintetase. O conjunto de tRNAs que existem dentro das células + aminoácido + ATP através da aminoacil tRNA sintetase, dando aminoacil tRNA + AMP + PPi. Desmembrando a reação: aminoácido + ATP, dando aminoacil adenilato + PPi. Primeiro, então, o aminoácido se liga ao AMP e numa segunda etapa, ocorre a transferência, aminoácido-AMP + tRNA que vai dar aminoácido-tRNA + AMP, de tal forma que fica aminoacil t-RNA. Então, a ligação dos aminoácidos ao tRNA para formar o aminoácido ativado, por definição é aminoácido ligado ao tRNA, ocorre em duas etapas. Primeiro, o aminoácido dentro do sítio catalítico da aminoacil tRNA sintetase se liga ao AMP, clivado a partir do ATP, dando origem ao aminoacil adenilato e sai pirofosfato. Numa segunda etapa, o tRNA compete com o AMP e o desloca e liga-se ao aminoácido, formando aminoacil tRNA + AMP. Dando origem a reação global e uma vez feito isso, a enzima fica livre para atuar de novo.

## REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A seguir teremos o processamento das proteínas. A proteína ao sair do ribossomo sai com sua estrutura primária que irá adquirir suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias por processamento. Através do radical R de cada aminoácido poderemos estabelecer ligações do tipo SS, pontes de

hidrogênio e fracas formando as outras estruturas. Os aminoácidos hidrofóbicos ficarão voltados para o interior da estrutura, expondo na sua estrutura mais externa os aminoácidos ditos hidrofílicos. Em solução formaremos a camada de solvatação, quando alteramos essa camada precipitamos a proteína por expormos os aminoácidos hidrofóbicos do seu interior. Temos como exemplo de precipitadores de proteínas, o tricloro acético (TCA), quando se trata a proteína com ácido, suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias são desfeitas, sofrendo, portanto, desnaturação e precipitação. Podemos também adicionar sal para haver alteração da camada de solvatação e conseqüente precipitação. Contrariando o que acreditávamos antes podemos renaturar uma proteína desnaturada com ácido, só que é um processo de extrema dificuldade.

A proteína sofre então processamento. Como exemplos de processamento pode-se citar a aquisição de sua estrutura formando uma estrutura final secundária, terciária ou quaternária; além disso, se ela for uma lipoproteína ela adquirirá um lipídio, se for uma glicoproteína receberá um carboidrato, se a proteína for uma enzima ela deverá se dobrar para formar seu sítio catalítico. Dependendo do papel biológico que a proteína vá assumir dentro da célula, ela poderá perder seu aminoácido iniciador (Met) e caso seja uma proteína de exportação ganha um pepontoídeo sinalizador e se direciona para o retículo endoplasmático rugoso e daí para o Golgi e de lá para o exterior.

### † Regulação da Expressão Gênica

O teor de uma proteína numa determinada célula vai depender do que chamamos de regulação gênica. As células são movidas por economia celular, ou seja, para que sintetizar uma determinada proteína se ela não será usada pela célula. Então dependendo da necessidade uma determinada expressão deverá ser traduzida ou não. Quem irá regular o teor da proteína na célula será o processo de transcrição do RNA e o processamento propriamente dito. No que diz respeito a procariontes, há maior controle da expressão gênica na tradução, já em eucariontes há tanto na transcrição como na tradução.

O controle da expressão gênica determinou o aparecimento de dois tipos de enzimas: as constitutivas e as induzíveis. As constitutivas são enzimas que fazem parte de rotas metabólicas importantes, são sintetizadas em concentrações constantes e independem do metabolismo celular. As enzimas induzíveis são aquelas sintetizadas em concentrações variadas e dependem do metabolismo. Dois pesquisadores famosos Jacob e Monod propuseram em 1961 um modelo de controle da expressão

gênica, ou seja, porque uma determinada proteína é sintetizada em maior quantidade em dado momento do metabolismo e em menor em outro momento. O que leva na estrutura do DNA a essa regulação? Os estudos foram feitos tomando como base o Operon da lactose, que chamamos de Operon Lac, assim foi feito o modelo da expressão gênica em procariontes. O modelo do Operon da Lactose tenta explicar a indução e repressão gênica.

Para fazer esses estudos eles observaram as reações de bactérias na ausência ou presença de glicose. Assim eles propuseram que o DNA é composto de regiões reguladoras e regiões que expressam o gen a ser codificado, de tal forma que temos o DNA formado de regiões que determinam a expressão e regulação do código genético. As regiões reguladoras estarão sempre adjacentes à região do gen estrutural a quem ela deve re\_\_\_M \_\_\_. Elas são formadas por três regiões. A região i é a chamada inibidora ou repressora, a região p chamada promotora que tem como função ser o sítio de ligação da RNA polimerase e a região o ou operadora. Adjacente a esta região temos a região do gen estrutural que irá codificar a proteína que no caso do Operon Lac se chamarão z, y e a. Cada gene estrutural temos regiões reguladoras. Assim foi observado que à medida que as bactérias (no caso E. coli) cresciam na presença de glicose o Operon Lac se encontrava reprimido. Na medida em que cresciam na ausência de glicose o Operon Lac era induzido. Por que isso ocorreu? Se ela está crescendo na presença de glicose, principal ose utilizada como combustível para produção de energia, ela a utilizará. Mas, se houver falta de glicose no meio uma nova fonte de energia deve ser utilizada que será a lactose. Assim a lactose será clivada por uma enzima chamada beta galactosidase formando glicose e galactose. Acontece que o Operon Lac do DNA correspondente para síntese de beta galactosidase se expressa em quantidades pequenas (cinco cópias), ela é um exemplo clássico de enzima induzível, mas quando transferimos a célula para uma situação de falta de glicose a célula passa a produzir 5000 cópias da beta galactosidase. Isso se explica pelo fato do operon da beta galactosidase estar reprimido na presença de glicose. Na região chamada inibidora ou i haverá síntese de um RNA pelo processo de transcrição que será traduzido dando origem a uma proteína que se chama proteína R ou i de inibidora que se posicionará na região o ou operadora do DNA. Assim a RNA polimerase que está localizada na região p não consegue ultrapassar esta proteína R para fazer a leitura dos gens estruturais e formar a enzima. Esse é um exemplo de repressão gênica.

O processo de indução gênica ocorrerá na falta de glicose no caso do Operon Lac. Assim será transcrito um gen pela região o ou operadora que dará origem a uma proteína chamada IPONTOG (isoproiltiobetagalactosidase) que se ligará à proteína R ou inibidora impedindo-a de se ligar a região

operadora. Assim uma proteína chamada CAP (proteína ativadora do catabólito) ativada pelo AMPc, que irá estar em alta com a falta de glicose, irá se ligar a região p ou promotora onde o RNA polimerase está, estimulando a participar da transcrição dos gens estruturais. A região z dará origem a beta galactosidase, a região y dará origem a beta galactosidase permease e finalmente a região a dará origem à proteína a transacetilase, todas essas enzimas necessárias a síntese de glicose via lactose.

## IMPORTAÇÃO E SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

1. Retículo: REL e RER
2. Aparelho de Golgi

No retículo endoplasmático rugoso você observa a presença de polissomas. Esses ribossomos se apresentam em “rosetas” e trabalham no processo de síntese de proteínas, a qual sempre se inicia no citossol, tanto para proteína de exportação quanto para proteína de consumo próprio da célula. Como vimos, o processo se inicia com a montagem das subunidades na fita de RNAm e a partir deste ponto os caminhos começam a ser delineados, de acordo com o mensageiro. Alguns RNAm têm seqüência de nucleotídeos, em torno de 20, funcionando como elementos de sinal: pepontoídeos de sinalização. Caso o ribossoma se ligue a RNAm portadores destes pepontoídeos, ele será direcionado ao local de destino, no caso, a parede do RER. Na ausência de sinal, permanecem no citossol, onde se completa a síntese protéica. Esta seqüência sinalizadora, então, orienta o destino do ribossoma e, conseqüentemente, da síntese protéica. O ribossoma começa a fazer a tradução, a partir da qual chega à seqüência sinalizadora, fazendo seu reconhecimento, para desencadear o processo de orientação e, neste caso, encaminhamento para a parede do RER. Este processo ainda não está todo elucidado, mas acredita-se que haja outros fatores orientadores além do peptídeo de sinal, como moléculas que ajudem a direcionar o ribossoma para a parede do RER.

Hoje, sabe-se que a parede do RER tem certas proteínas que o REL não possui, as quais formam canais, sulcos, (aberturas, passagens) para a inserção no lúmen do RER das proteínas que estão sendo sintetizadas, chamadas de porinas ou riboforinas. Têm-se as riboforinas I e II, ambas servindo de ponto de apoio, acoplamento, para que o ribossoma chegue ali, se ligue, através da subunidade maior, a elas e possa reiniciar a síntese traducional. Como sabemos, o ribossoma lê no RNAm o peptídeo sinal e dirige-se ao RER, que deve possuir mecanismos de aprisionar, acoplar, este ribossoma nele; dentre



estes mecanismos estão as riboforinas. Podemos ver isto pelo fato de que se o ribossoma caminha ao REL, ele não vai conseguir fazer tal aderência. Agora, é preciso alguém mais para fazer a ligação complementar, para que o ribossoma se acople para injetar a proteína. Este apoio e reconhecimento são feitos por receptores ribossômicos. Há ainda outros elementos de orientação à parede do retículo.

O ribossomo inicia a tradução invariavelmente no citoplasma, mesmo que estas proteínas sejam para exportação. As moléculas orientadoras mais importantes são as SRP (peptídeo reconhecedor de sinal), as quais reconhecem a proteína ainda no início da sua síntese (assim que surge o pepontoídeo sinalizador). Através de uma porção, SRP se liga ao sinal e, por outra porção, fará a aderência com seus recepntoos, localizados próximos as riboforinas. Este SRP, além de orientar, também interrompe a síntese protêica: ela começa no citoplasma, SRP se liga, e há interrupção na tradução a fim de que o ribossoma se desloque do citossol para se fixar à parede do RER. Esse SRP é o mais importante elemento na translocação do ribossomo, funcionando como veiculador, orientador em direção ao ribossomo. Então quando chega ao RER, os recepntoos de SRP ligam-se a ele (SRP) e os recepntoos ribossômicos à subunidade maior. Este SRP, por sua vez, já está ligado à extremidade da cadeia nascente de peptídeo e a proteína nascente vai sendo injetada no lúmen através dos canais/poros criados por proteínas complexas denominadas riboforinas.

Como conclusão, vemos que não basta a presença da seqüência sinalizadora no RNAm (que, em eucariotos, varia muito de tamanho); é também preciso a participação de outras moléculas, como as riboforinas, o SRP, os receptores. Quando o ribossoma estiver totalmente preso, haverá deslocamento do SRP, que sairá. Esta saída se faz necessária também porque o SRP interrompe a síntese protêica quando presente. Com o ribossoma livre, então, pode-se prosseguir com a síntese ribossomal. Como se pode entender, à medida que a tradução ocorre, a proteína vai sendo injetada no interior do RE. A cabeça, o chamado peptídeo de sinal, vai, através da ação de enzimas presas à face luminal da membrana do retículo (a membrana reticular tem duas faces: uma voltada ao meio externo, chamada face C, citossólica, e outra voltada ao meio interno, a face L, luminal - ambiente interno do retículo), chamadas pepontoidases de sinalização, ser retirado, cortado: o peptídeo foi necessário apenas para endereçar a proteína. A célula faz dois tipos de proteínas: com e sem o pepontoídeo de sinal. Uma vez concluída sua função, o peptídeo é retirado. A proteína, então, poderá sair do RE, ir ao Golgi e tomar caminhos diferenciados, como, por exemplo, ir ao lisossoma (geralmente hidrolases, especializadas em quebras), ser inseridas em vesículas que posteriormente serão exocitadas e as proteínas liberadas.

Há ainda casos em que a proteína pode seguir inserida na membrana da vesícula, no que, durante a exocitose, as membranas vesicular e citoplasmática se fundem, e a proteína não é expulsa, ficando inserida na membrana. Esta proteína é uma transmembrana, integral, bi/tripartite. Estas proteínas, ao contrário das demais, possuem uma sequência de sinal intermediária, localizada no meio da molécula, que mantém esta proteína inserida na membrana, podendo, por exemplo, vir a fazer parte do glicocálix. É diferente, por exemplo, da insulina, que é uma molécula grande, que precisa ser processada. Ela possui, além da região pré (a região sinalizadora da extremidade é a chamada “pré” e a intermediária, “pro”), uma região intermediária chamada pro. O primeiro, é um sinal orientador e o segundo ativador e não de ligação como nas proteínas transmembrana. Uma molécula poderá conter até múltiplos sinais.

O ribossoma sintetiza uma proteína, a qual será processada no interior do retículo e depois encaminhada ao complexo de Golgi. Esta síntese inicia-se no citossol, identifica-se a região de sinal, e o SRP se liga ao peptídeo sinal, interrompendo o processo e orientando a translocação em direção à parede do retículo, onde temos os receptores (ribossômicos e SRP) e as riboforinas I e II. Com isto, o SRP já terá cumprido seu papel, e poderá ser descartado, saindo. A síntese, então, reinicia-se. Mais adiante, o sinal vai ser clivado por enzimas da face L do RE. Além deste papel fundamental na tradução, o RE também tem outras funções. O RE tem certa diferenciação quando vistos ao ME: o rugoso é laminar e sacular (sacos achatados) e o liso é canalicular ou tubular. O RER pode ter certa fragmentação na sua constituição. O RER caracteriza-se principalmente pela tradução, enquanto que o liso pela glicosilação. A maior parte das proteínas sintetizadas é para proveito próprio da célula, feitas por ribossomos livres, não tendo desenvolvido ainda grande capacidade de exportação, à exceção, por exemplo, do movimento dos folhetos embrionários durante o desenvolvimento<sup>54</sup>, o qual é orientado por proteínas de exportação.

Normalmente o Golgi é polarizado tanto na sua estrutura quanto na sua localização, enquanto que a tendência do retículo é espalhar-se (exceto nos casos dos plasmócitos e células pancreáticas). As membranas dos dois retículos podem ser estudadas pela fragmentação do retículo em vesículas menores, chamadas microsomas. Se houver ribossomas aderidos, é chamado rugoso (onde se estuda boa parte da síntese proteica). Os microsomas servem, por exemplo, para a análise bioquímica da membrana. De acordo com a origem, terã constituição, principalmente proteica, diferente.

---

<sup>54</sup> Vide processo de gastrulação e fenômenos subseqüentes (embriologia).

O retículo liso é especializado no processo de desintoxicação celular, porque possui citocromos especiais. Eles são chamados de B5 e P450, que metabolizam medicamentos, que têm duas formas principais de metabolização: no rim e no fígado. O principal é o fígado. Neste caso, teremos a participação do corpúsculo de Berg e do REL. Vamos, por exemplo, supor que um indivíduo esteja tomando fenobarbital. Os níveis de citocromo P450, com o uso do medicamento, crescem. O fenobarbital é estimulante da síntese de citocromos porque são estes que irão quebrá-lo. Mas, quanto mais se injere fenobarbital, maior a produção de P450, que vai hipertrofiando. A partir daí, o medicamento pode parar de surtir efeito: resistência à medicação, sendo necessária alteração da medicação, que atinja outros complexos multienzimáticos de metabolização. Outras drogas que não só medicamentos também são metabolizadas pelo REL. O REL tem mais fosfolípídeo do que o RER. Isto está de acordo com sua função: REL sintetiza muitos fosfolípídeos, principalmente lecitinas, mas também outros lipídios como colesterol e TAG. Alguns serão posteriormente inseridos na membrana via vesículas que “brotam” do retículo. Estes processos verificam-se em microsossomos lisos (provenientes do REL). O REL também possui em seu lúmen várias enzimas relacionadas a processos diversos: glicose-6-fosfatase (distribui glicose “livre”), peptidases, hidrolases, transferases (chamadas proteínas residentes: são aquelas que devem permanecer, dentro do retículo para que este execute suas próprias funções). As proteínas residentes estão presentes em ambos os retículos e no Golgi.

O ribossoma aderido à membrana reticular, sintetizando a proteína e injetando-a no lúmen, quando há clivagem do peptídeo sinal, depois do que há desmontagem do ribossoma com finalização do processo. Há estudos que comprovaram a passagem da proteína por poros protéicos e não diretamente pela membrana. Os íons, quando está ocorrendo síntese protéica, não conseguem atravessar estes poros (além disto, não podem difundir pela bicamada lipídica), significando dizer que estes poros estão temporariamente bloqueados. O uso de puomicina mostrou que este bloqueio era devido à injeção, através destes poros, da proteína que estava sendo sintetizada: a puomicina se liga à cadeia polipeptídica, desligando esta da proteína da membrana reticular, e permitindo, então, a passagem dos íons (“desocupou-se o poro”).

A proteína será encaminhada ao Golgi, para o que é fundamental a dobra e empacotamento da mesma, a fim de que seja “aceita” pelo Golgi. O complexo de Golgi tem várias funções dentro da célula. Ele é formado de unidades chamadas dictiossomas (Golgi = soma, dictiossomas). Cada uma dessas unidades é formada de vesículas achatadas e esféricas, de formação sacular. Os dictiossomas vão se localizar numa região determinada da célula, própria ao complexo de Golgi, chamada de zona de efusão

citoplasmática. Esta área está normalmente próxima ao retículo e em associação com ele através do trânsito vesicular. O Golgi é extremamente polarizado: cis  $\neq$  trans, constituindo um sentido direcional ao tráfego das proteínas. Isto faz com que a cis fique bem próxima à região proximal do núcleo, à carioteca. Já a região trans, fica voltada aos pontos de liberação das vesículas.

Funções do Golgi:

?? secreção celular, na direção cis  $\neq$  trans

?? glicosilação de proteínas e lipídios, fruto da ação de enzimas de glicosilação

?? hidrólise de inibidores moleculares, principalmente nas hidrolases, que se localizarão posteriormente nos lisossomas.

Retomando: as proteínas são sintetizadas no RER, encaminhadas à região cis do Golgi. Assim, ocorrerá a fosforilação de oligossacarídeos, reações que envolvem grupos manose (remoções e adições), adicionar glicosaminas, galactoses, ácido siálico, formar proteoglicanos, entre outros, preparando, melhorando, a proteína para que esta possa seguir ao seu destino final, a partir da região trans, como, por exemplo, originando vesículas secretórias, lisossomas.

## Capítulo 11

### TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

O DNA tem a capacidade de desnaturar em altas temperaturas, obtendo-se, pois, as fitas separadas (houve clivagem das pontes de hidrogênio que mantinham-nas unidas). As proteínas podem renaturar-se, entretanto, é um processo muito difícil, complicado, visto que ela precisará retomar toda aquela estrutura tridimensional que caracteriza sua atividade biológica. Já o DNA, devido a complementariedade das suas bases, tem este processo facilitado, podendo, pois, renaturar-se com facilidade, “religando” suas fitas. Essa característica da molécula de DNA é a base do diagnóstico molecular, não esquecendo que o oligonucleotídeo (pedaço do DNA) marcado é a sonda utilizada.

Recolhe-se o tecido a ser analisado. Por um tratamento especial retiram-se as proteínas por uso de proteases, permitindo o acesso ao DNA. Põe-se, então, o DNA extraído junto da sonda. Aquece-se para permitir a clivagem das pontes de hidrogênio da fita de DNA. Diminuindo a temperatura, permite-se a renaturação e, possivelmente, a hibridização: nesse caso, houve complementariedade entre os DNA's na análise feita (já que pôde observar-se as moléculas devido à marcação radioativa que sofreram), e conclui-se que há a infecção viral pesquisada. Caso não haja infecção, na análise não obteremos a complementariedade entre as fitas. O resultado é impressionado num filme para visualização e antes deve ser feita uma lavagem para retirada de substâncias inespecíficas.

Qual o objetivo da tecnologia do DNA recombinante (TDR)? Na verdade é um conjunto de técnicas utilizadas para diagnóstico ou amplificação de um gen (ou mesmo de uma região do DNA). Por que a amplificação? Se, por exemplo, temos uma análise de sangue com pequena amostra, pode-se amplificar o DNA daquele sangue. Você pode amplificar uma região, ou gen, jogando o DNA previamente purificado numa máquina, o PCR<sup>55</sup> (termociclador ou reação de polimerização em cadeia), ou pode colocá-lo num sistema biológico. Seu objetivo é amplificar o DNA já purificado, não precisando dispor de material em grande quantidade. Deve servir não apenas à síntese protéica (insulina, GH, interferon, etc...), como também ao diagnóstico clínico.

---

<sup>55</sup> Reação em Cadeia da Polimerase (início em 1985; *Polymerase Chain Reaction*): amplificação de um segmento de DNA, utilizando-se uma polimerase termoestável.

Na técnica de PCR tem-se a imitação da DNA polimerase em vitro. Lança-se mão do DNA purificado de uma enzima para a polimerização. Termociclador: uso de temperaturas diferentes nos vários estágios do processo (para desnaturar, inserir primer - já que para replicar o DNA precisamos de uma seqüência específica de primer<sup>56</sup> - etc...). Inicialmente, então, insere-se o DNA purificado e aumenta-se a temperatura para causar desnaturação<sup>57</sup>. Posteriormente adiciona-se o primer, cuja seqüência é específica, anelando-o e põe-se a taq-polimerase, que é uma enzima de polimerização resistente às altas temperaturas (nas primeiras experiências utilizaram DNA polimerase, mas era preciso adicionar uma nova enzima a cada ciclo, devido à desnaturação).

A amplificação também pode ser feita por sistemas biológicos, inserindo o DNA a ser amplificado em bactérias, leveduras e bacteriófagos, entre outros. Nosso exemplo compreenderá o uso da E.coli, visto que sistemas bacterianos são mais baratos, de manuseio mais fácil e com alta velocidade no processo. Neste precisamos de um vetor, um veículo transportador, do DNA para o interior da célula, enquanto que no PCR bastava a inserção dos materiais (enzima e DNA purificado), regulando diferentes temperaturas durante o processo. O primeiro passo é purificar o DNA. O segundo, ligar esse DNA ao vetor, que podem ser plasmídeos, bacteriófagos ou cosmídeos, de acordo com o objetivo. Os mais conhecidos são os plasmídeos, que são DNA extracromossômicos, circulares, de dupla fita e com duplicação autônoma. Podem ser comprados prontos, atendendo à especificidade da demanda. Este plasmídeo tem vários sítios em que atuam enzimas de restrição, que são tesouras moleculares (picotam o DNA) responsáveis também pelo corte do pedaço do DNA a ser amplificado (visto que o DNA é muito grande e não pode ser todo transportado para dentro da bactéria de uma só vez). O DNA é unido ao plasmídeo, primeiro se tratando com as enzimas de restrição. O plasmídeo comprado pode conter sítios de resistência se pedido (inclusive, muito da resistência bacteriana a antibióticos provém de plasmídeos, que é de fácil troca entre as bactérias), como, por exemplo, a ampicilina. Então, une-se o plasmídeo com o DNA, formando o DNA recombinante (recombinando o DNA de origens distintas). Para unir é necessário cortá-los com a enzima de restrição e ligá-los através da DNA ligase. A próxima etapa é fazer com que o veículo entre na célula hospedeira (bactéria). O hospedeiro ideal é aquele capaz de receber o vetor e amplificá-lo: a bactéria deve transcrever DNA  $\rightarrow$  RNA e, depois, RNA  $\rightarrow$  proteína. Vamos supor que o DNA introduzido seja para a insulina. Quando o vetor é inserido na bactéria temos o seguinte quadro: ela tem o DNA normal e o DNA recombinante (referente ao plasmídeo).

---

<sup>56</sup> Segmento nucleotídico iniciador.

<sup>57</sup> Promover desenovelamento da dupla fita, separando as fitas anteriormente pareadas.

Esta é a chamada etapa de transformação. A bactéria rapidamente transcreve este DNA recombinante. Produzindo insulina, de modo rápido, fácil e barato, principalmente se compararmos ao método antigo de isolamento do extrato do pâncreas e subsequente obtenção de insulina. No gel de eletroforese, verifica-se a presença da insulina. O problema é que, ao colocar o vetor junto às células hospedeiras, nem todas vão incorporá-lo, recebê-lo. Para o êxito (comercial, por exemplo) do processo, deve-se ter apenas bactérias possuidoras do plasmídeo. A diferenciação entre quem recebeu ou não se faz do seguinte modo mais fácil: dispõe-se a colônia de bactéria a crescimento em contato com a ampicilina; como o plasmídeo possui um sítio que torna a bactéria resistente a este antibiótico, as bactérias com este DNA recombinante sobreviverão; as demais, sem plasmídeo, morrerão (antes de todo o processo, verifica-se se todos os plasmídeos a serem utilizados contêm o DNA a ser amplificado).

Após ser sintetizado a proteína de interesse, pode-se fazer gel, por exemplo, de poliacrilamida. O que se vê são bandas (tanto para proteína como para DNA), revelando grupos de proteínas. Na foto mostrado, utilizou-se eletroforese em proteínas marcadas com aminoácido radioativo. Mostra a importância (as diferenças entre as situações) deste método para a análise da infecção, ou não, da célula estudada. As observações são feitas em filmes (se marcadas radioativamente), papel de filtro e papel celofane. Este processo é, por exemplo, utilizado em testes para o HIV. Há, também, identificação de vírus que paralisam a maquinaria celular, monopolizando-a para seu próprio benefício e depois, matam-na.

Atualmente, uma série de novas técnicas permite ao pesquisador a análise detalhada da estrutura molecular do DNA e, por conseqüência, do material genético de um ser vivo. Esta análise permite, por sua vez, o isolamento e a amplificação de um segmento de DNA, o seu sequenciamento, identificação e manipulação<sup>58</sup>. O Projeto Genoma, por exemplo, pretende, através destas técnicas, identificar toda a seqüência de cerca de 3 bilhões de pares de bases do genoma humano - 50.000 a 100.000 genes! Esta abordagem permitirá a identificação de genes relacionados a doenças genéticas específicas, a abre a possibilidade de diagnóstico e até tratamento estas doenças a nível molecular.

#### Seqüenciamento do DNA:

Duas técnicas, surgidas no final dos anos 70, são empregadas para o sequenciamento de fragmentos de nucleotídeos:

---

<sup>58</sup> Exemplos: Genoma de *Xylolella fastidiosa* (bactéria do "amarelinho" em cítricos) e Projeto Genoma Humano.

✂ Método Químico ou de Maxam-Gilbert

✂ Método Enzimático ou de Singer

Em ambos os casos, é possível definir com precisão a seqüência exata de nucleotídeos de um segmento de DNA.

Amplificação de um Segmento de DNA:

O enorme tamanho e a imensa variabilidade da molécula do DNA são os principais obstáculos ao isolamento e sequenciamento de genes. Assim, técnicas especiais são necessárias para a seleção e amplificação de partes da molécula do DNA, gerando fragmentos menores e mais facilmente analisáveis. São duas as metodologias empregadas atualmente:

A Reação em Cadeia da Polimerase - "Polimerase Chain Reaction", ou PCR. A Clonagem de Genes.

"Polimerase Chain Reaction" - PCR:

Este método - mais recente - de isolamento e amplificação de um segmento de DNA - envolve a produção "in vitro" de milhões de cópias do segmento em estudo. O processo exige a utilização de "primers" que isolam o segmento a ser amplificado, da enzima DNA Polimerase, e ocorre em 3 etapas:

A desnaturação da dupla fita do DNA, em alta temperatura - 90°C

O pareamento dos "primers", à baixa temperatura - 37°C

A duplicação do segmento isolado através da reação da DNA polimerase

O processo é cíclico e pode ser repetido "n" vezes, dependendo do grau de amplificação que se deseja. O "primer" pode ser sintetizado quimicamente, desde que se conheça a seqüência a ser amplificada e a partir desta, e é sempre adicionado em excesso ao meio de reação. Se o segmento de DNA a ser amplificado não é conhecido, ele pode ser clonado a um vetor cuja seqüência de DNA adjacente ao recombinante seja conhecida. A DNA Polimerase utilizada é termoestável, e isolada do microrganismo *Thermus aquaticus* (Taq Polimerase). A tecnologia da PCR pode ser empregada nas análises clínicas



como um poderoso instrumento de diagnóstico de viroses e infecções bacterianas, como a AIDS e a tuberculose, por exemplo, com enorme ganho em sensibilidade.

### Clonagem de Genes:

É um método mais complexo de isolamento e amplificação de DNA que a PCR, mas muito útil em certas situações. Envolve a utilização de endonucleases de restrição, a criação de mapas de restrição e a utilização de vetores para a recombinação e clonagem do gene em estudo. Em etapas:

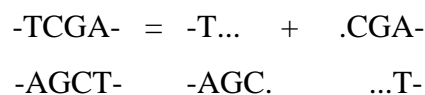
#### As Endonucleases de Restrição:

Fazem a clivagem<sup>59</sup> da molécula do DNA em seqüências específicas da molécula, geralmente palindrômicas. As endonucleases de restrição são batizadas a partir do nome do microrganismo do qual foram isoladas, com a indicação da seqüência de descoberta. Exemplos:

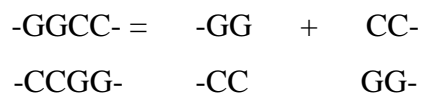
TaqI - *Termus aquaticus*

HaeIII - *Haemofilus aegyptius*

Algumas endonucleases de restrição criam extremidades irregulares e, portanto, coesivas; outras geram extremidades "cegas". Exemplo: TaqI: 4 bases, extremidades adesivas:



HaeIII: 4 bases, extremidades cegas:



#### A Criação do DNA Recombinante:

---

<sup>59</sup> Corte

Envolve a união de um fragmento de DNA a uma molécula maior, utilizando-se uma endonuclease de restrição e a DNA ligase. A clivagem do DNA com a mesma enzima de restrição, cria extremidades complementares adesivas que são unidas pela ação da DNA ligase. Desta forma, um fragmento de DNA pode ser inserido em uma molécula maior, que passa a ser recombinante. Assim, um determinado gene do genoma humano pode ser inserido no genoma de uma bactéria, por exemplo, e lá ser amplificado ou mesmo, transcrito várias vezes.

### Os Vetores:

Um vetor é uma molécula de DNA à qual o fragmento de DNA a ser clonado está ligado. Os principais vetores utilizados são plasmídeos, e vírus de animais. Os plasmídeos são os mais utilizados para a clonagem de pequenos fragmentos de DNA; são geralmente obtidos a partir de células bacterianas, facilmente reintroduzidos nestas células e possuem capacidade autônoma de replicação. Um exemplo amplamente utilizado de plasmídeo é o pBR322, que possui os genes de resistência à tetraciclina e à ampicilina. Alguns tipos de vírus, como o bacteriófago  $\lambda$ , são utilizados na clonagem de fragmentos maiores de DNA. Os Cosmídeos são estruturas híbridas que possuem características do bacteriófago associadas à do plasmídeo pBR322, e são utilizadas para a clonagem dos maiores segmentos de DNA.

### Bibliotecas de DNA:

Uma biblioteca de DNA é uma coleção de fragmentos de DNA obtidos a partir da ação das endonucleases de restrição, ligados aos vetores apropriados e clonados. Quando a biblioteca inclui a totalidade do genoma de uma célula ou organismo, ela é dita "Biblioteca Genômica". Quando a biblioteca inclui apenas moldes de cDNA, obtidos por ação de uma transcriptase reversa, esta biblioteca é dita "Biblioteca de DNA Complementar". A detecção de um determinado segmento de DNA em uma biblioteca genômica é feita com a utilização de SONDAS de DNA.

### Sondas:

As sondas de DNA são seqüências de fita única de DNA que hibridizam - pareiam - com a seqüência de interesse, destacando-as do restante da biblioteca. Estas sondas podem ser marcadas com um isótopo radioativo, um anticorpo, uma substância fluorescente ou outro método de detecção. A utilização em conjunto das sondas e de enzimas de restrição permitiu o desenvolvimento de técnicas de detecção de DNA muito precisas, como o "Southern Blot". No "Southern Blot", um determinado gene

pode ser identificado entre milhões de fragmentos por separação eletroforética em gel com posterior identificação dos fragmentos através de sondas específicas. Variações deste método permitem hoje a identificação de fragmentos de RNA - Northern Blot - e de proteínas - Western Blot, este último utilizando um anticorpo no lugar da sonda.

#### Aplicação da Manipulação do DNA:

São enormes e promissoras as aplicações desta tecnologia. Na identificação e tratamento de doenças condicionadas geneticamente; No diagnóstico muito sensível de doenças infecciosas; no diagnóstico pré-natal; na manipulação terapêutica de genes; na criação de organismos híbridos e transgênicos na medicina, agricultura e pecuária; na indústria farmacêutica; em estudos evolutivos e de descendência e na medicina legal.

## Anexo

### TRANSPORTE DE GASES E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE

#### † Transporte de Gases

Não existe no transporte de gases, tanto do oxigênio como de gás carbônico, transporte ativo, todo transporte de gases sempre se faz por difusão de onde está mais concentrado, para o local de menor concentração. A lei de difusão dos gases obedece à ordem de locais mais concentrados para locais menos concentrados. Por exemplo, se em nível de tecidos temos uma alta de  $p\text{CO}_2$  e em nível de sangue temos uma alta de  $p\text{O}_2$  por difusão teremos o  $\text{CO}_2$  que passa para o sangue e o oxigênio que passa para os tecidos. Ao pulmão temos uma alta de  $p\text{O}_2$  e no sangue temos uma alta de  $p\text{CO}_2$ , o  $\text{CO}_2$  irá para o pulmão e o  $\text{O}_2$  para o sangue. A lei básica será então do mais concentrado para o menos concentrado. Existem outros fatores que podem acelerar essa passagem de  $\text{O}_2$  para os tecidos e  $\text{CO}_2$  para o pulmão além da simples difusão. Mas basicamente tudo acontece pelo processo de difusão.

A célula encarregada pelo transporte de gases na circulação é o eritrócito, uma célula anucleada e bicôncava. Como ele é anucleado ele não terá síntese de proteína e conseqüentemente uma meia vida muito curta. O eritrócito vive graças a glicólise e via das pentoses como fonte de ATP, além disso ele guarda em seu interior uma alta concentração de glicose. Quando essa glicose é oxidada, um dos intermediários que se forma é 1,3-difosfoglicerato, no eritrócito esse produto irá formar 2,3-difosfoglicerato que será importante na manutenção da estrutura quaternária da hemoglobina. A estrutura que nos interessa dentro do eritrócito é a hemoglobina. Quando se faz uma hidrólise ácida ou alcalina na hemoglobina obteremos heme mais globina. Logo sua estrutura é formada por grupamento heme mais uma parte protéica a globina. Cada hemoglobina é formada por quatro cadeias protéicas, ou seja, para cada hemoglobina temos quatro globinas, alfa 1, alfa 2, beta 1 e beta 2. Cada globina possui um grupamento heme. Então uma hemoglobina é formada por quatro radicais heme e quatro radicais protéicas chamadas globinas. Cada globina possui as estruturas primária, secundária e terciária e quando as quatro se reúnem formam uma estrutura quaternária. Para formar a estrutura quaternária da hemoglobina temos pontes salinas entre alfa 1 e alfa 2, alfa 1 e beta 1, alfa 2 e beta 2. Sendo que as cadeias beta estão ligadas entre si pelo 2,3-difosfoglicerato. Daí a glicose em excesso dentro do

eritrócito para que parte dessa glicose forme 2,3-difosfoglicerato para servir de ligação das cadeias beta da hemoglobina. Outro detalhe, no interior do grupamento heme, temos o ferro  $2+$ , nessa cavidade no interior do heme é uma cavidade hidrofóbica formada por aminoácidos hidrofóbicos. Essa cavidade do heme deve ser hidrofóbica porque se os aminoácidos forem hidrofílicos haverá entrada de água no interior e entrando água forma-se superóxido, e esse superóxido impede que o grupamento heme transporte oxigênio, além de ser danoso para as membranas celulares.

Sendo a cavidade do heme uma área hidrofóbica, pensava-se que a combinação do heme com o oxigênio se desse de maneira linear, ou seja, a medida que se aumentava a concentração de oxigênio aumentaria a saturação dos grupamentos heme. No entanto, quando montamos um gráfico de concentração de oxigênio por saturação de hemoglobina temos uma curva sigmóide idêntica ao comportamento das enzimas alostéricas. Se não temos uma reta, e sim uma curva sigmóide, isso indica que existe uma ordem de entrada do oxigênio na hemoglobina e que o efeito é cooperativo, ou seja, a medida que a primeira globina é oxigenada ela abre espaço para a oxigenação da segunda que abre espaço para a oxigenação da terceira e em seguida da quarta globina. Quando o primeiro oxigênio se aproxima da globina alfa 1, as pontes salinas entre alfa 1 e alfa 2 se rompem, significando que alfa 1 está sendo oxigenada e alfa 2 está pronta para se oxigenar. Quando alfa 2 é oxigenada, 2,3 difosfoglicerato sai, abrindo a possibilidade de oxigenação de beta 1 e beta 2. Isso está expresso na curva sigmóide. Então a oxigenação da hemoglobina é cooperativa e ordenada. O ferro tem spin contrário ao oxigênio não mudando a sua valência quando ligado a ele, assim, a ligação ferro-oxigênio é uma ligação eletromagnética, pois eles possuem spin contrário. O gás mais abundante em nosso organismo é o  $\text{CO}_2$ . Dentro do eritrócito o  $\text{CO}_2$  se reúne com a água e pela ação da enzima anidrase carbônica (presente dentro do eritrócito) formará ácido carbônico que irá se dissociar via anidrase carbônica em bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e íon hidreto ( $\text{H}^+$ ).

Dois problemas a serem resolvidos pelo eritrócito: o bicarbonato possui carga negativa e é uma base, já o íon hidreto tem carga positiva e tem o poder de baixar o pH. Quando ele está vindo do pulmão, o eritrócito está trazendo suas hemoglobinas combinadas com oxigênio formando oxiemoglobinas, quando chega ao tecido todo o  $\text{CO}_2$  chega no eritrócito forma ácido carbônico que se dissocia. O bicarbonato formado vai para o plasma, já o íon hidreto terá outro destino. O eritrócito tem em abundância o aminoácido histidina que possui o grupamento imidazólico, os íons hidreto irão se combinar com esse grupamento. O  $\text{CO}_2$  pode ser transportado então na forma de bicarbonato e sob a forma de ácido carbônico formando o tampão bicarbonato, ou seja, todo  $\text{CO}_2$  produzido no ciclo de

Krebs irá ser transportado na forma de tampão bicarbonato. Mas o que é um tampão? É a sua base e seu ácido conjugado. Vamos supor que haja ingestão de ácido, Coca-Cola®, por exemplo, o organismo irá ter que manter o pH do sangue, simplesmente estes ácidos que entrarem serão retirados por uma base, que sequestrará o ácido correspondente, tirando-o de circulação, aumentando a quantidade de ácidos carbônicos. Quando os íons hidreto surgem dentro do eritrócito, o pH abaixa e os oxigênios presos aos grupamento heme irão sair para os tecidos. Então, ao mesmo tempo que, temos a formação da hemoglobina reduzida pelo íon hidreto do ácido carbônico, temos a saída do oxigênio para os tecidos. Essa reação é tão importante que 0,7 moles de  $H^+$  entram nos grupamentos imidazólicos da histidina por mol de oxigênio que sai da hemoglobina. Com isso, o abaixamento de pH originado da alta de  $CO_2$  do eritrócito irá provocar a liberação do oxigênio do eritrócito para as células, ao mesmo tempo como o hidreto é sequestrado pela histidina o pH volta a ser normal. O sequestro de hidreto pela histidina recebe o nome de troca isoídrica. Isoídrica significa manutenção do pH constante e isso ocorre no tecido. A oxiemoglobina tem um pK de 6,17 e a desoxiemoglobina tem um pK por volta de 7,0. O ácido mais forte será a oxiemoglobina, ou seja, sua dissociação será mais rápida do que a desoxiemoglobina, que é a hemoglobina reduzida. Uma parte muito pequena de  $CO_2$  (0,5 milimol por litro de  $CO_2$ ) é transportado também ligado a histidina formando a carbamiloemoglobina mas, a maioria é transportada por tampão bicarbonato. Na desoxiemoglobina ou hemoglobina reduzida o ferro está livre.

Voltando à curva sigmóide. Para que a hemoglobina esteja saturada de oxigênio a p  $CO_2$  deve ser de 40mm de Hg que vai dar um pH de 7,4. O oxigênio tem de estar entre 20 e 80 mm de Hg para se ter uma saturação completa da hemoglobina pelo oxigênio. Isso significa que o sangue com 100% de saturação mostra, que ele acabou de sair do pulmão. No sangue da musculatura de um atleta, a p $CO_2$  irá ser maior do que 40, ocasionando um recebimento de muito bicarbonato, muito ácido carbônico e muito íon hidreto ocasionando uma queda maior de pH, deixando a saturação da heme em 60 a 70%. No fígado, teremos o limite da anoxia, isso significa que teremos uma p  $CO_2$  maior do que 40 e um pH muito menor do que 7,4, a curva de saturação irá baixar ainda mais. Se fixarmos uma concentração de oxigênio, iremos ver que a curva de saturação caminhou para a direita, à medida que ela foi passando para os tecidos (músculo e pulmão) a curva foi caindo para a direita. Quanto maior o deslocamento para a direita haverá alta de  $CO_2$ , baixa de pH e maior oxigenação dos tecidos. Se a curva continuar saturada (100%) indica que não irá haver correta oxigenação dos tecidos, já que a curva caindo indica que os tecidos estão sendo oxigenados. Esse efeito se chama efeito Bohr. Na vida sedentária haverá pouca alteração de pH, a hemoglobina irá e voltará oxigenada.

Quanto mais o efeito Bohr for pronunciado, maior a oxigenação dos tecidos. A hemoglobina reduzida sairá dos tecidos indo para o pulmão. Quando chegam nos pulmões, temos um ambiente oxidado, logo o pH será alto. No sangue temos bicarbonato e no eritrócito temos a hemoglobina reduzida, no pulmão teremos  $pO_2$  alto. O íon hidreto irá se reunir com o bicarbonato formando ácido carbônico que irá se dissociar em água e gás carbônico que serão expirados. O oxigênio como houve saída de íon hidreto, o pH aumenta e o oxigênio se liga ao grupamento heme. A curva que chega, então, ao pulmão está pouco saturada. A medida que os ferros da hemoglobina se combinam com o oxigênio ela volta a taxa de saturação. Então essa curva, ao invés de ir para a direita irá para a esquerda da curva-padrão. Esse é o efeito Haldane que ocorre a nível pulmonar, já o efeito Bohr ocorre a nível tecidual. Quanto mais acentuado para a direita, melhor a oxidação a nível tecidual e quanto mais acentuada a curva para a esquerda melhor é a oxidação das hemoglobinas no pulmão.

### † Equilíbrio Ácido-Base

Quando falamos em pH lembramos logo da famosa equação que é  $pH = -\log [H^+]$ . Mas o nosso pH dos líquidos de nosso corpo não é dado apenas pela concentração de hidrogênio, pois somos uma solução de cátions, ânions, sais, ácidos e bases. O que mais temos é sais, bases e ácidos, mas todos eles bastante fracos. Mas apesar de todos nossos ácidos e bases serem fracos, eles possuem uma gradação (qual é mais forte que outro) dada pelo pK. O pK é o pH da dissociação.

Por exemplo, a oxiemoglobina para ela se dissociar, ou seja, para ela perder seu oxigênio ela deve ter um pH de 6,17 logo esse é seu pK. Já a desoxiemoglobina para se dissociar, ela precisa de um pH 7,71, logo esse é o seu pK. O pH de nosso líquidos será o pK mais logaritmo da concentração do sal ou base sobre a concentração do ácido. Essa é a equação de Henderson-Hasselbach. Então para se dar o pH teremos que falar em ponto de dissociação do ácido formando o sal ou a sua base. Quais as estruturas que mantêm o nosso pH sanguíneo a 7,4 que é o ponto ideal de nosso pH? Primeiro, vimos que a histidina da hemoglobina do eritrócito ajuda a manter nosso pH constante. Isso ocorre também com todas as nossas proteínas, principalmente as plasmáticas. O próprio eritrócito, albumina, lipoproteína irá funcionar tanto como ácido como base ajudando a manter o pH constante.

O tampão fosfato que existe no sangue mas tem uma importância mínima, já que o fosfato tem outras prioridades como participar da formação de ácidos nucleicos como da fosforilação de proteínas. O tampão mais disponível de nosso organismo é o bicarbonato. Nosso pH é dado então pela relação entre

bicarbonato sobre ácido carbônico. O pK do ácido carbônico é 6,1. A concentração de bicarbonato pelo ácido carbônico é de 24 mEq/l (miliequivalente por litro) sobre 1,2 mEq/l. O log dessa equação será 1,3. Esse 1,3 será somado ao pK do ácido carbônico dando um pH de 7,4. Esse é o pH ideal nem sempre conseguido.

O que irá acontecer a essa equação de Henderson-Hasselbach se adicionamos 6 mEq/l de íon hidreto ( $H^+$ ). Ele chegará no sangue e terá que ser sequestrado pelo sistema tampão, já que ele não pode circular sozinho. Tínhamos 24 mEq/l de bicarbonato e 1,2 mEq/l de ácido carbônico, se está entrando 6 mEq/l de ácido irá haver um aumento do denominador (ácido carbônico) já que o bicarbonato deverá se unir ao íon hidreto livre. Se tivermos 24 mEq/l perderemos 6 mEq/l ficaremos com 18 mEq/l e se tínhamos 1,2 de ácido carbônico iremos ter agora 7,2 mEq/l já que foi adicionado mais 6 mEq/l dos íons hidreto. O log de 18 sobre 7,2 será igual a 0,4 mais o 6,1 do pK do ácido carbônico teremos como pH 6,5. A absorção de 6 mEq/l do ácido fez com que o pH baixasse de 7,4 para 6,5. Isso é tampão no sangue. Se tivermos aumento do denominador (ácido carbônico), ele foi modificado no pulmão. Como esta concentração foi alterada pela adição de 6,0 mEq/l precisamos restaurar este pH a nível de pulmão. Fazemos isso com a relação ideal que é de 20 para 1 que será igual a relação de 18 para x. X será o quanto de  $CO_2$  que o pulmão terá de eliminar por expiração. X será igual a 0,9 mEq/l. Ou seja teremos que eliminar 6,3 mEq/l (7,2 que tínhamos menos 0,9 que tem de ficar para se obter a relação ideal de 20 para 1). Assim o pH a nível pulmonar será de 7,4 novamente já que obteremos o pelo log de 18 sobre 0,9 um resultado de 1,3 mais o pK do ácido carbônico de 6,1 obtendo resultado final de 7,4. No rim, chegará o pH de 7,4 e uma concentração de 18 por 0,9 como ideal. O sistema renal irá então reestabelecer as concentrações ideais em 72 horas, por reabsorção e filtração, de 24 sobre 1,2 mEq/l. O tampão sanguíneo absorve o impacto, o pulmão restabelece o pH e o rim restabelece a concentração ideal. A resposta do tampão é imediata, a do pulmão rápida e a do rim extremamente lenta. Então se o problema ocorre a nível pulmonar, a solução será dada a nível renal, e se o problema ocorre a nível tecidual e de sangue a solução será dada a nível pulmonar. No caso de diabete não compensado, haverá metabolização de ácidos graxos preferencialmente. Esses ácidos graxos deixarão na circulação, ácidos orgânicos fazendo com que o pH sanguíneo diminua.

Se o problema ocorreu na célula que passou para o sangue aumentando a concentração de ácido e diminuindo a de bicarbonato, a solução quando o problema é no denominador (ácido carbônico) virá pelo pulmão que hiperventilará eliminando mais  $CO_2$ . Esse quadro será uma acidose metabólica. Esse problema ocorre também em pessoas com diarreia e insuficiência renal e drogas a base de ácido. Uma



pessoa com bronquite, pneumonia ou uma infecção pulmonar não pode expirar grande quantidade de  $\text{CO}_2$ . A hemoglobina continuará reduzida, não haverá efeito Bohr ou efeito Haldane. Temos então um quadro de acidose respiratória, e se o pulmão não pode realizar o seu papel a solução será encontrada no rim. O rim trabalha com o numerador (bicarbonato), aumentando a absorção de bicarbonato. Vômito prolongado, obstrução intestinal e a ingestão excessiva de bicarbonato para se fazer a digestão teremos uma alcalose metabólica. Ela provoca um aumento do numerador. O problema ocorre no sangue, logo o problema poderá ser solucionado ao pulmão hipoventilando. Doenças do sistema nervoso central, histeria (que ocorre tanto em homens como em mulheres), envenenamento com salicilato irão provocar uma alcalose respiratória. A pessoa irá hiperventilar pelo pulmão que será compensado nos rins pelo aumento da eliminação de bicarbonato.

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A CONTRAÇÃO MUSCULAR

A necessidade de energia deve-se a três funções básicas do organismo: PRODUÇÃO E TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO, MANTER A TEMPERATURA E CONTRAÇÃO MUSCULAR. A energia é obtida através dos alimentos (glicose, gordura e proteínas) que são ingeridas e que fazem parte da dieta normal. Mas, esta energia não pode ser obtida diretamente destes alimentos que são ingeridos. Assim há necessidade de se existir uma molécula energética entre a energia contida nos alimentos e a utilizada pelas células. Nas células são encontradas estas moléculas, que são denominadas de ATP ou TRIFOSFATO DE ADENOSINA. Molécula esta, descoberta no final da segunda década do século XX.

### Trifosfato de adenosina ou ATP

Descoberto quase que simultaneamente por Karl Lohmann (Alemanha) e Cyrus Fiske e Yellapragada Subbarw (EUA) em 1929 quando estudavam extratos de músculos esqueléticos. Inicialmente acreditava ser encontrado apenas nos músculos e estivesse relacionado na atividade muscular. Mas em 1941, Fritz Lipmann postulou o conceito unificador de ser o ATP o transportador de energia universal das células. Basicamente, o ATP é constituído por um nucleotídeo (a adenosina e uma ribose), formando a adenosina que se encontra ligada a três moléculas de fosfato (ligações de alta energia).

Daí o nome de fosfato de adenosina. Estudos recentes afirmam que o ATP está localizado no núcleo e em outras organelas células, e não somente no citoplasma celular. As ligações entre os dois grupos

terminais representam as denominadas ligações de alta energia. Quando é desfeita (degradação ou hidrólise) uma dessas ligações de fosfato, isto é, quando é removida do restante da molécula, são liberadas 12 Kcal de energia. Após esta liberação ocorre a formação de adenosina difosfato (ADP) mais fosfato inorgânico (Pi). Essa energia é liberada durante a degradação ou hidrólise de ATP e representa a fonte imediata de energia que pode ser usada pela célula muscular para realizar o seu trabalho. Ainda é possível, em certas condições, uma segunda clivagem do ADP com formação do monofosfato de adenosina (AMP) e fosfato inorgânico e liberação de 7 a 12 Kcal de energia. A hidrólise do AMP, com formação de adenosina e fosfato inorgânico, a liberação de energia é menor que nas ligações anteriores (3,4Kcal).

### Hidrólise ou degradação do ATP

Degradação é definida por ser conversão de um composto orgânico complexo em um composto menor (mais simples). Isto é, conversão dos nutrientes (glicose, gordura e proteínas) e ATP em um composto menor (retira-se energia). A degradação ocorre com a união desta molécula com a água num processo denominado de hidrólise, reação catalisada pela enzima TRIFOSFATASE DE ADENOSINA ou simplesmente ATPase.

A ligação de fosfato mais externa é desfeita e libera-se energia e forma-se ADP. A energia liberada pela degradação ou hidrólise do ATP é utilizada para a produção e transporte de material biológico, manter a temperatura e contração muscular. A hidrólise do ATP se processa com ou sem disponibilidade de oxigênio. Essa é uma reação imediata, ANAERÓBICA, e que libera energia. A capacidade da célula em hidrolisar o ATP permite gerar energia para uso imediato, isto não ocorreria se sempre fosse necessário oxigênio para o metabolismo energético.

### Ressíntese do ATP

Ressíntese é definida por ser a formação de um composto completo através de elementos de um composto mais simples. Isto é, é a formação da molécula de ATP através da energia provinda dos nutrientes. As concentrações médias de ATP dentro do organismo em qualquer momento são cerca de 85g no corpo todo. Assim sendo, durante o exercício de um esforço muscular máximo, o aporte energético é suficiente por apenas poucos segundos de processo contrátil. A quantidade de ATP em atletas é suficiente para manter a potência muscular máxima por apenas 5 a 8 segundos. Estudos têm demonstrado, no entanto, que mesmo em atividades musculares intensas, a redução na concentração de

ATP intracelular é discreta. Além disto, o ATP não pode ser fornecido através do sangue nem a partir de outros tecidos. O que possibilita a degradação COMPLETA da glicose e seu uso em atividade física de BAIXA INTENSIDADE E LONGA DURAÇÃO? Repouso e exercícios.

#### A. Repouso

Durante repouso 2/3 dos nutrientes utilizados para a ressíntese de ATP provém da gordura e o 1/3 restante pelos carboidratos. A contribuição das proteínas é muito pequena. Entre os processos, o aeróbio é o predominante. Isto é comprovado porque nossos sistemas de captação e transporte de oxigênio (sistema cardiorrespiratório) são capazes de fornecer a cada célula oxigênio suficiente. O motivo da produção de ácido láctico se deve a presença da enzima desidrogenase láctica nas células. Esta enzima catalisa a reação de transformação do ácido pirúvico em ácido láctico. Mas o nível de ácido láctico permanece constante e não se acumula.

#### B. Exercício

Todos os três processos contribuem com a ressíntese do ATP, mas a predominância dependerá dos seguintes fatores: tipo de exercício realizado, estado ou nível de treinamento e dieta do atleta.

##### B.1. Exercícios de curta duração

São exercícios realizados em curtos períodos de tempo, mas que exigem esforços máximos. Estes exercícios incluem: 100, 200, 400 e 800m ou qualquer exercício que o tempo só possa ser mantido por dois ou três minutos. O processo predominante é o anaeróbio. O principal nutriente é a glicose. A gordura e proteínas são participantes, mas sua participação é negligenciável. Os níveis de creatina fosfato (CP) chegarão a valores baixos e continuarão baixos até o encerramento do exercício. Mas, após o término, cerca de 70% de toda a CP utilizada será repostada em 30 segundos e 100% em cerca de 3 minutos. Com o predomínio do processo anaeróbio, ocorre acúmulo de ácido láctico. Para que possa continuar o exercício, haverá necessidade de diminuir a intensidade do mesmo ou até pará-lo. O nível de ácido láctico no sangue é um importante indicador de qual processo predominante durante o exercício.

##### B.2. Exercícios prolongados

São exercícios que podem ser realizados por longos períodos de tempo, mas com uma intensidade baixa. Entende-se por períodos longos, acima de 3 minutos. Os nutrientes utilizados são: glicose, gordura e proteínas. Mas o predomínio destes dependerá da duração. Em atividades físicas com duração de 20 minutos, a glicose representará a fonte de nutriente dominante, enquanto a gordura desempenhará um papel secundário.

O nível de ácido láctico será alto, porém não máximo. Para atividades físicas com duração de uma hora, os depósitos de glicogênio muscular começam a mostrar reduções e as gorduras passam a ser a principal fonte de ressíntese do ATP. Esta proporção variará de atleta para atleta devido ou ao seu estado de treinamento, ou a proporção da fibra muscular ou ainda, reservas iniciais de glicogênio.

O principal fornecedor de energia para a ressíntese do ATP é o processo aeróbio, os processos anaeróbios só contribuem no início do exercício.

Os níveis de ácido láctico são mantidos e não alcançam níveis muito altos durante o exercício aeróbio.

A fadiga muscular ocorrida pelos atletas é devida a:

?? Baixo nível de glicose sanguínea;

?? Depleção das reservas de glicogênio muscular (fadiga muscular localizada);

?? Perda de  $H_2O$  e eletrólitos (resultando aumento de temperatura corporal); enfado e abatimento físico sofrido pelo corpo.

### Bases Biológicas e Fisiológicas da Contração Muscular

O músculo pode ser comparado a uma máquina que transforma energia química em trabalho, produzindo calor. Quando em atividade, pode alterar sua tensão e seu comprimento.

As propriedades fisiológicas dos músculos são diferentes nos diferentes estados: relaxamento, início da contração, contração propriamente dita e retorno ao relaxamento. A força exercida pelo músculo na contração é medida pela unidade de tensão (P), que permite a correção para o tamanho do músculo (medida pela área de maior secção transversal do músculo em questão). O tamanho do músculo é expresso como uma fração do comprimento do músculo em que ele é capaz de exercer maior tensão

isométrica (lo). Um músculo relaxado pode ser estendido até certo comprimento, quando então oferece resistência ao aumento do comprimento. Esta resistência caracteriza a existência de um componente elástico no músculo em repouso. No entanto, quando um músculo é estimulado tetanicamente não se permitindo a mudança de comprimento (contração isométrica), observa-se a situação de tensão máxima. A tensão varia muito conforme o estado do músculo (relaxado, pouco contraído, muito contraído, contração máxima).

No caso de um músculo contraído ao máximo, a velocidade de contração é zero [peso infinito]. Quando diminuimos o peso aplicado ao músculo, existirá um peso no qual a velocidade de contração pode ser observada (mas ainda é mínima e constante).

Se o peso for diminuído gradativamente (diminuindo assim a tensão exercida pelo músculo), a velocidade de contração irá aumentando proporcionalmente (peso próximo de zero implica em velocidade de contração máxima).

Contração isotônica: aquela em que a velocidade é diferente de zero e a tensão é constante. A produção de calor por um músculo em contração isotônica é proporcional à mudança de comprimento do músculo e não depende da velocidade de contração ou do peso que foi levantado. Nas contrações isométricas, onde não há alteração do comprimento do músculo, existe a liberação de calor de manutenção. Esta quantidade de calor é proporcional ao tamanho do músculo e corresponde à energia necessária para manter a tensão. Quando parte de um músculo está envolvido na manutenção da tensão, esta parte não estaria necessariamente impedida de participar na geração de calor.

**MÚSCULO RELAXADO:** O ATP é responsável pelo fornecimento de energia para a contração muscular. Miofibrilas isoladas podem ser contraídas e observadas no microscópio comum na presença de ATP. Durante a contração a banda I diminui de comprimento e a banda A permanece com aproximadamente o mesmo comprimento. As bandas Z se aproximam. Na ausência de ATP, a actina e a miosina permanecem ligadas. Na presença de ATP ocorre hidrólise da junção [ponte] miosina/actina, a energia liberada por esta hidrólise faz com que um filamento se desloque sobre o outro.

**MÚSCULO RELAXADO:** Este modelo, chamado "filamentos deslizantes", propõe que o músculo se contraia através do deslizamento de dois filamentos um sobre o outro, sem que nenhum dos dois altere sua estrutura, composição química ou comprimento.

Na contração muscular isotônica observa-se uma diminuição no comprimento do sarcômero e os filamentos tendem a se encontrar no centro da banda H. Neste ponto, existe tensão máxima e não há como deslizar mais os filamentos, atingindo uma situação isométrica. No caso da contração isométrica [tetânica], onde não observa diminuição do comprimento do músculo, a energia liberada pelo ATP não pode ser transformada em trabalho devido à incapacidade de deslizar mais os filamentos sobre os outros e há produção de calor, mas, não de trabalho. A tensão seria então determinada pelas pontes. A quantidade de ATP hidrolisada é proporcional à reciclagem das pontes. Quando a contração é realizada com alta velocidade e baixa tensão, a reciclagem de pontes é alta e mais quantidade de ATP é necessária. À medida que a velocidade diminui, a reciclagem de pontes é mais lenta e menos ATP consumido, mesmo que a tensão seja aumentada.

#### Miosina:

A miosina é uma molécula longa com uma cauda e duas cabeças. As cabeças podem se mover em relação a si mesmas e em relação à cauda. Miosina pode ser separada por enzimas proteolíticas em dois pontos diferentes. Se tratada com tripsina, a miosina é dividida em meromiosina pesada (fragmento que retém a atividade ATPásica) e meromiosina leve (que não possui atividade enzimática). Meromiosina pesada é solúvel em baixas concentrações de sal enquanto o fragmento meromiosina leve só é solúvel em concentrações salinas bastante altas. Para estudo dos polipeptídeos que compõem a estrutura quaternária da miosina, basta romper as pontes dissulfeto e proceder à eletroforese para separação por peso molecular. Existem duas cadeias pesadas na cauda e dois ou três pares de cadeias leves nas cabeças. As cadeias leves estariam relacionadas à atividade ATPásica. O peso molecular e o número destas cadeias leves variam de acordo com o músculo estudado e o tipo de fibras (rápidas ou lentas).

Magnésio é o único cátion, com efeito, acelerador da atividade ATPásica da miosina. O substrato realmente hidrolisado pela miosina parece ser Mg-ATP. A actina estimula de forma significativa a hidrólise de ATP, e in vivo, a interação destas duas proteínas deve ser o fenômeno responsável pela hidrólise do ATP durante uma contração.

#### Actina:

A actina é uma proteína globular com uma única cadeia polipeptídica e peso molecular de 45KD. No estado monomérico (actina-G), possui uma molécula de ATP e uma de cálcio incorporadas em sua

estrutura. Em solução de alta força iônica, a actina se polimerizará, ficando filamentososa com uma dupla fileira de monômeros enrolados sobre si mesmos. Na passagem da forma monomérica para a forma filamentososa, o ATP é hidrolisado.

Actina/Miosina: se colocadas juntas numa solução, com o passar do tempo a solução se torna mais viscosa (formação de complexos actina/miosina) e há aumento de fosfato livre às custas da diminuição de ATP. O ADP formado é estável. A queda de ATP mantém as moléculas de actina e miosina juntas e colocação de novo ATP na solução diminui sua viscosidade. Durante a contração e distensão de uma célula muscular não ocorre um deslizamento livre sobre os dois tipos de filamentos. No relaxamento, uma lenta hidrólise de ATP ocorre e mantém uma certa tensão entre os filamentos. Com a constante regeneração de ATP, não se observa um estado de inextensibilidade das fibras musculares, a não ser nos casos de rigor mortis, onde não existe novo influxo de ATP para o complexo. A concentração de ATP se mantém constante devido à regeneração a partir de ADP e fosfocreatina, reação catalisada pela creatinoquinase. Uma fibra em contração isométrica em um dado comprimento, responde com mudança de seu comprimento em alguns milissegundos, e se estabiliza na nova situação. A alteração por que passa a tensão nesse tempo é chamada de um “transiente”. No transiente observa-se que a tensão varia de forma linear com a mudança de comprimento, até atingir um platô.

Regulação da contração muscular:

Em 1947 foi demonstrado que a injeção de pequenas quantidades de  $\text{Ca}^{++}$  numa fibra muscular desencadeava contração não só no local, mas, propagada por grande parte da fibra. Devido ao curto tempo que se observa entre a despolarização da membrana plasmática e a contração muscular, concluiu-se que não se tratava de um simples processo de despolarização e difusão de íons pela membrana. A membrana plasmática das fibras musculares é composta por um tubo cercado por duas vesículas de retículo endoplasmático liso e que circunda toda as miofibrilas.

O estímulo elétrico é levado ao interior da fibra muscular através dos túbulos e as bolsas de  $\text{Ca}^{++}$  encontradas no interior do retículo estão tão próximas da unidade contrátil que o espaço de tempo necessário entre o estímulo e a contração pode ser explicado desta forma. Terminada a onda de despolarização, o cálcio é ativamente rebombeado para dentro do retículo e o músculo relaxa.

transmissão sináptica gera despolarização levada ao interior da fibra pelos túbulos em T; liberação de cálcio armazenado no interior de vesículas; cálcio + TN-C = alteração conformacional da troponina; deslocamento da tropomiosina = libera os sítios de ligação actina/miosina; bomba de cálcio retorna o cálcio para o retículo sarcoplasmático (uso de ATP); TN-C perde o cálcio = troponina e tropomiosina retornam ao estado anterior.

## ACETIL-COLINA: IMPORTÂNCIA

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor que funciona como propagador do impulso nervoso nas fendas sinápticas. Os receptores neuronais de acetilcolina (nAChRs) estão distribuídos no sistema nervoso central e periférico onde funcionam tanto pré quanto pós sinapticamente como canais iônicos abertos por ligantes.

Os receptores de acetilcolina são divididos em duas classes: Uma primeira inibida por agonistas nicotínicos e uma segunda insensível a estes agonistas e a alfa neurotoxinas. Quando a ACh é liberada pelos neurônios de placa motora estimulam células musculares esqueléticas. Receptores na fibra muscular reconhecem a ACh como um sinal para contração. Muitos animais como serpentes venenosas e o baiacu (um peixe venenoso) produzem toxinas que causam paralisia por bloquear os receptores de ACh. Há também uma doença denominada Miastenia gravis que envolve os receptores de ACh, pacientes com esta doença produzem anticorpos contra os receptores que se ligam a ele impedindo que recebam os sinais para contração, como resultado os músculos não contraem. O tratamento envolve a administração de drogas que causam uma liberação de ACh pelos terminais nervosos maiores que o normal.

Precursos: Colina e Acetil-CoA

Enzima: Colina Acetil Transferase

Enzima: Acetilcolinesterase

Metabólitos: Colina e acetato

A chegada de um impulso nervoso promove a exportação sincrônica do conteúdo de cerca de 300 vesículas de acetilcolina elevando a concentração desta na fenda sináptica de 10nM para 500 ?M em menos de 1 milissegundo. A ligação da acetilcolina à membrana pós-sináptica aumenta a corrente de entrada dos íons sódio e diminui a de saída dos íons potássio o que eleva a despolarização da



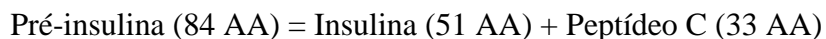
membrana pós-sináptica e dispara o potencial de ação. O receptor possui cinco subunidades em alfa hélice, distribuídas simetricamente em torno do poro: 2 alfa, 1 beta, 1 gama e 1 delta. As subunidades alfa possuem o sitio para ligação da acetilcolina. A ligação de duas moléculas de acetilcolina abre, transitoriamente o poro o que ocorre em aproximadamente 1000 microsegundos. O canal permanece aberto por cerca de um milisegundo pois a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase que se encontra ancorada na membrana pós-sináptica por um grupamento glicolipídico unido covalentemente. A acetilcolinesterase atingiu a perfeição cinética o que permite que potenciais de ação possam ser transmitidos com alta frequência.

Organofosforados (inseticidas agrícolas, gases neurotóxicos para fins militares) inibem a acetilcolinesterase por formarem complexos covalentes fosforil-enzima muito estáveis. A forma aberta do canal nunca foi visualizada por ocorre em espaços muito curtos de tempo.

## DIABETES MELLITUS

### 1 - A INSULINA:

É um hormônio peptídico produzido pelas células beta das Ilhotas de Langerhans pancreáticas. Formado por duas cadeias oligopeptídicas ligadas entre si por duas pontes dissulfeto intercadeias e uma ponte dissulfeto intracadeia. Sintetizado a partir de um pré-hormônio (Pré-insulina).



Seu mecanismo de ação é baseado na ligação da insulina a um receptor específico de membrana, tetramérico e formado por duas subunidades alfa e duas subunidades beta. Este receptor possui ainda atividade de tiosina-quinase intrínseca, e desencadeia um efeito cascata intracelular.

A ação da insulina é ainda regulada por feed-back e por outros hormônios que possuem efeitos hiperglicemiantes, como o glucagon, a adrenalina (glicogenólise), o cortisol e o GH hipofisário (gliconeogênese).

---

## 2 - AÇÕES DA INSULINA:

A Insulina é o Hormônio central de todo o METABOLISMO INTERMEDIÁRIO ENERGÉTICO da célula.

Ações sobre o Tecido Adiposo:

- Entrada de glicose na célula
- Síntese de AG a partir de glicerol e Acetil-CoA
- Síntese de Ácidos Graxos
- Bloqueia a lipólise

Ações sobre o Tecido Muscular:

- Entrada de glicose na célula
- Entrada de aminoácidos e a biossíntese protéica
- Síntese de glicogênio
- Bloqueio à proteólise

Ações sobre o Fígado

O Fígado é um tecido permeável à glicose, e não precisa da insulina para captá-la!

## 3- O "DIABETES MELLITUS"

Doença causada pela deficiência relativa ou absoluta da insulina e, conseqüentemente, em ambos os casos, de seus efeitos sobre o metabolismo energético intermediário. Dois mecanismos principais:

- 1 - Destruição autoimune das células beta do pâncreas: típica do diabetes tipo I ou insulino-dependente. É geralmente condicionada geneticamente, ou desencadeada por vírus/drogas.
- 2 - Resistência periférica à insulina somada à falência gradual das células beta pancreáticas: típica do diabetes tipo II ou não insulino-dependente. Nestes casos a lesão primária é desconhecida.

## Referências Bibliográficas

Albertis, B.A. et al., *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed. Rio Grande do Sul, Artes Médicas, 1997.

Behe, M.J. *Darwin's Black Box : The Biochemical Challenge to Evolution*, Ciência e Cultura, 1997.

Bohinski, R.C., *Bioquímica*, 5ª edición., Addison-Wesley Iberoamericana 1991.

Champe, P.C. and Harvey, R.A. *Bioquímica*. J. D. Rawn. Ed. Interamericana, 1989.

Champe, P.C and Harvey, R.A. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, Amazon Books, 2000.

Creighton, T.E. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, Garland, 1991.

Conn, E.E.; Stumpf, P.K.; Bruening, G. and Doi, R.H. *Outlines of Biochemistry*, 5<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, NY, 1987.

Dawkins, R. *The blind watchmaker*, W.W. Norton, London, 1985.

Devlin, T.M. *Textbook of Biochemistry*, Wiley-Liss, NY, 1992.

Farley, J. *The spontaneous generation controversy from Descartes to Oparin*, John Hopkins University Press, Baltimore, 1979.

Hall, R.H. *The modified nucleosides in nucleic acids*, Columbia University Press, NY, 1971.

---

Herrera, E. Elementos de Bioquímica, Editora Interamericana, 1993.

Jungermann, K. and Mohler, H. Bioquímica, Amazon Books, 2000.

Lehninger, A L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principles of Biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., New York, Worth, 2000

Lewontin, R.C. The Triple Helix: Gene, Organism, and Environment, Amazon Books, 2000.

Michal, G. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Amazon Books, 1998.

Prates, J. A. M. Métodos de Análise Volumétrica. Texto de Apoio ao Curso de Formação em Química, para Técnicos e Auxiliares Técnicos do Ramo Laboratorial. Reitoria da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1996.

Shapiro, R. Origins: a skeptic's guide to the creation of life on Earth, Summit Books, NY, 1986.

Stenesh, J. Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition, Amazon Books, 1989.

Stryer, L. Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed., New York, W.H. Freeman, 1996

Thuillier, P. De Arquimedes a Einstein: a face oculta da invenção científica, Ciência e Cultura, 1998.

Voet, D. and Voet, J.G. Biochemistry. Wiley Eds. NY, 1990

Watson, J.D. et al., Molecular Biology of the Gene. 3<sup>rd</sup> ed., Menlo Park, CA; Benjamin-Cummings, 1987

Zubay, G.; Parson, W.W. and Vance, D.E. Principles of Biochemistry, Wm.C. Brown Publishers, Dubuque, IA, 1995.