

Bioquímica Geral

Sumário

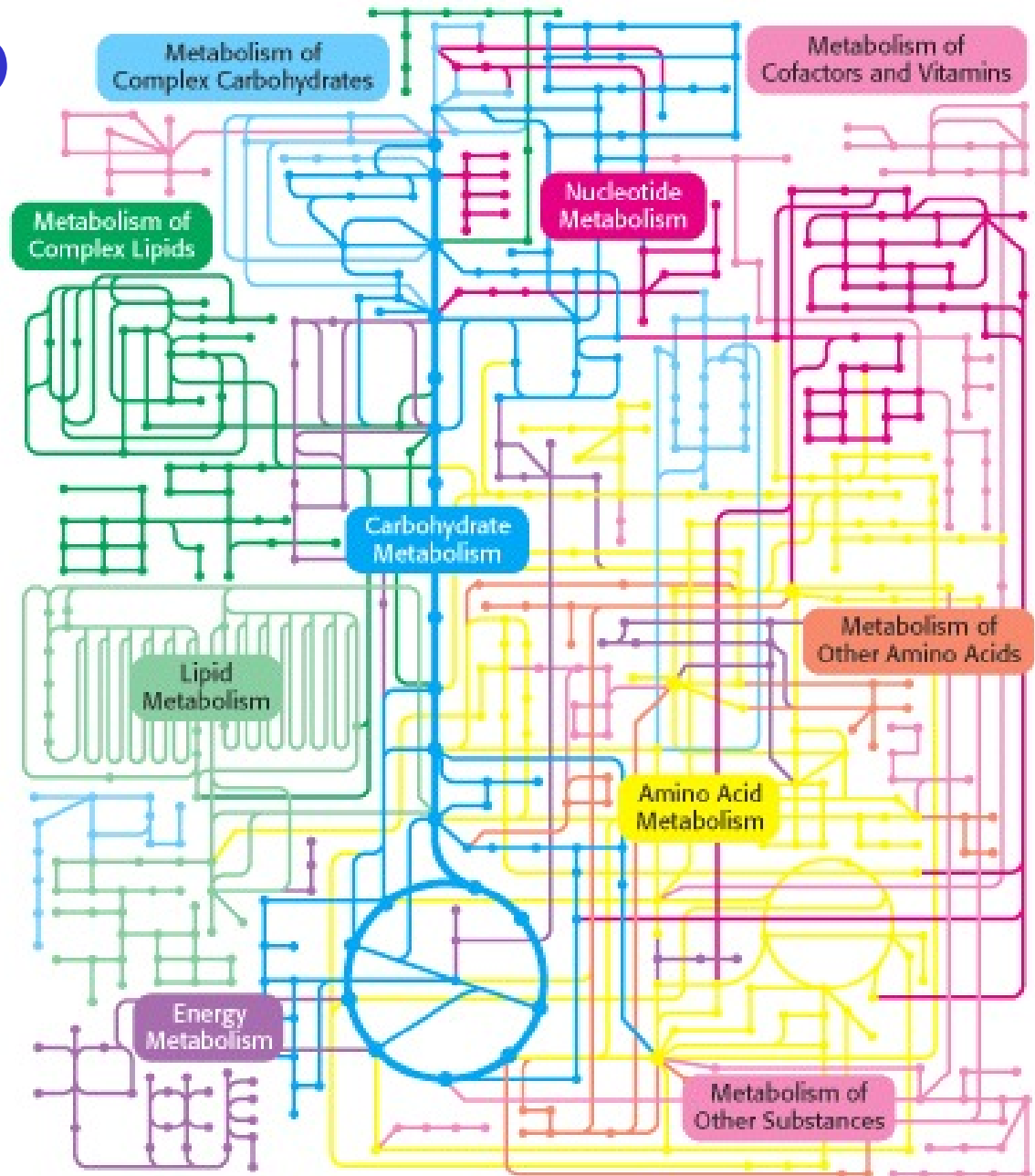
PRINCÍPIOS BÁSICOS DO METABOLISMO

- **Os caminhos metabólicos contêm motivos comuns:** transportadores activados ; seis tipos de reacções e sequências de reacções comuns.
- **Regulação dos caminhos metabólicos** através da quantidade das enzimas, da actividade das enzimas e da acessibilidade dos substratos.
- **Regulação do catabolismo e do anabolismo pela carga energética.**
- **Esquema geral do catabolismo.**

METABOLISMO

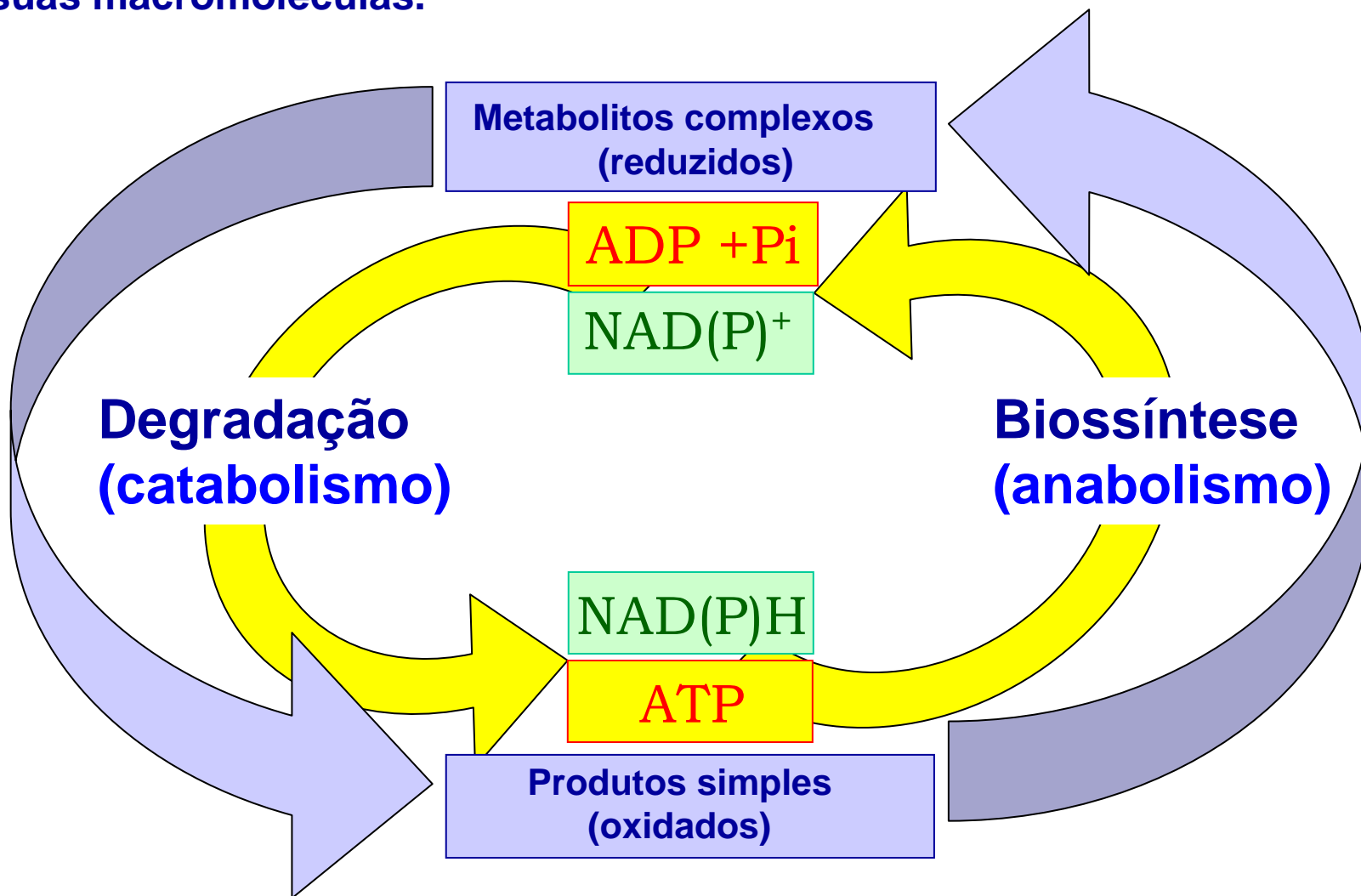
Conjunto de reacções acopladas e interligadas que ocorrem nas células.

Num organismo simples como *E. coli* ocorrem mais de 1000 reacções químicas diferentes!



METABOLISMO

- No **catabolismo** as células extraem energia e poder redutor do ambiente.
- No **anabolismo** as células sintetizam os blocos precursores para construir as suas macromoléculas.



Esquema geral do CATABOLISMO

Fase I

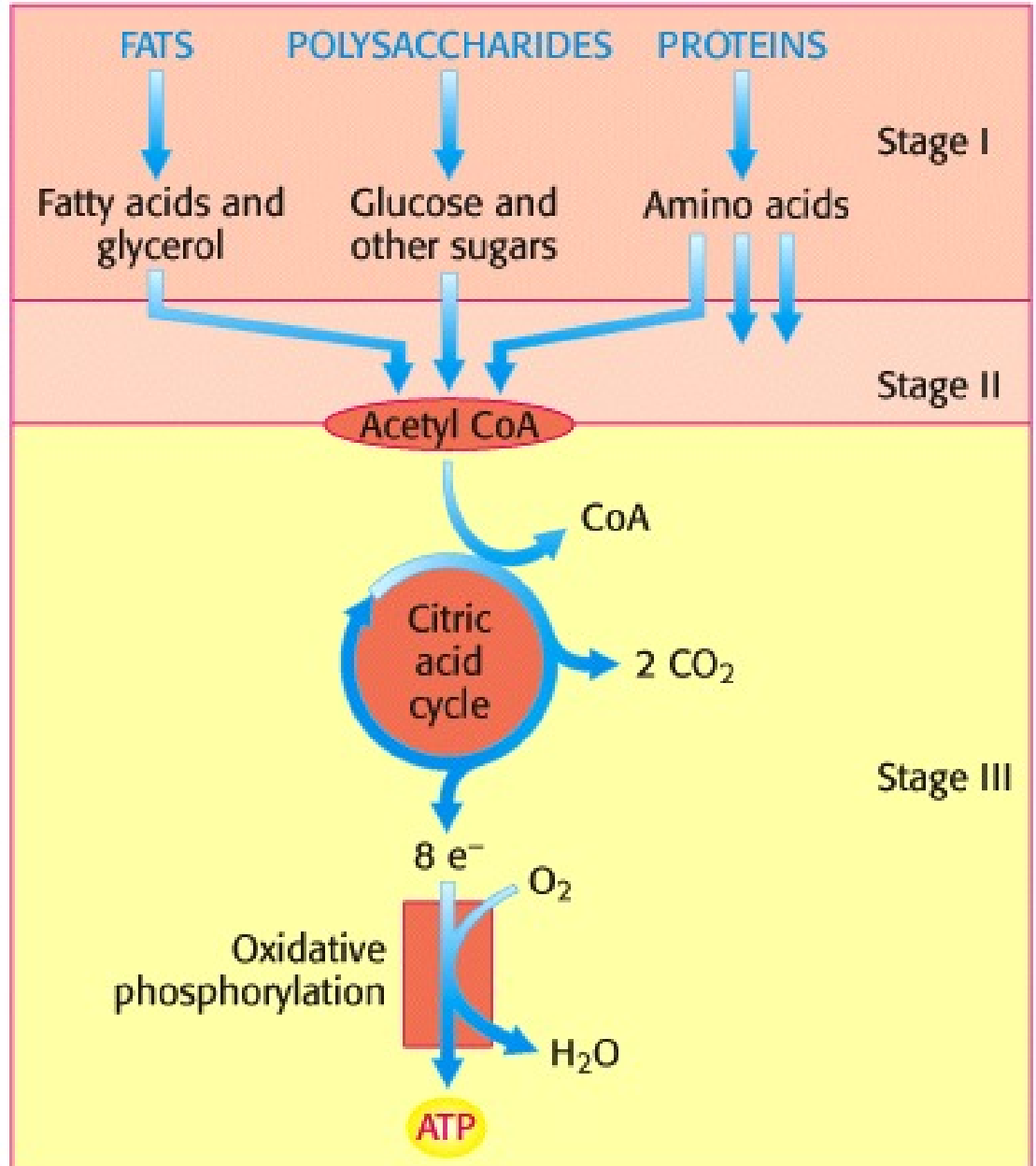
Moléculas complexas são hidrolisadas dando origem a unidades simples.

Fase II

Conversão das unidades simples em acetilCoA.

Fase III

Oxidação completa do acetilCoA com produção de ATP



No metabolismo...

- As sequências de reacções acopladas cumprem objectivos definidos.
 - Os caminhos estão relacionados entre si. A regulação alostérica das enzimas permite que haja comunicação entre as várias vias.
- (ver exemplo da glicólise: estratégia e regulação)

Os caminhos metabólicos têm motivos comuns:

- metabolitos comuns
- sequências de reacções comuns
- estratégias regulatórias comuns.

• **Utilização de ATP como ‘moeda energética’**

• **Utilização de um pequeno número de intermediários activados** (apenas ca. de 100 moléculas com funções-chave em todas as formas de vida)

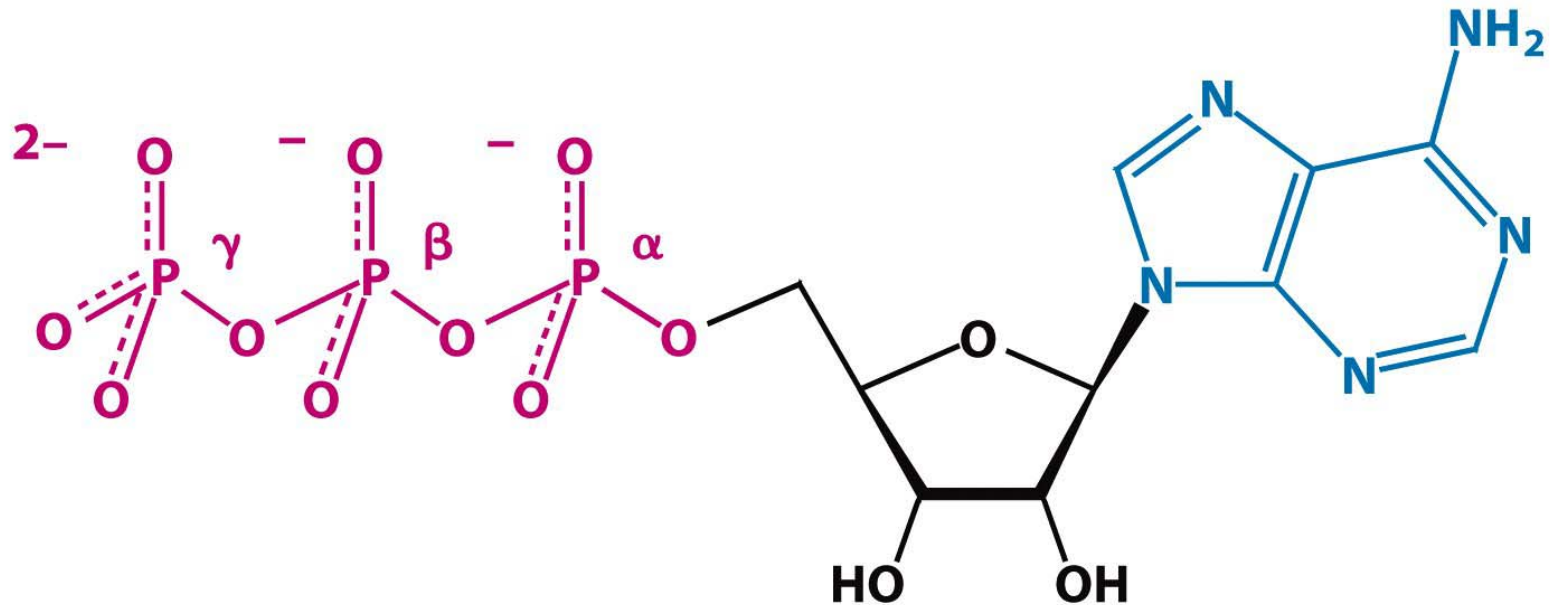
•Utilização de transportadores activados

transportador	grupo	vitamina precursora
ATP	fosforilo	
NADH e NADPH	electrões	niacina
FADH ₂ e FMNH ₂	electrões	riboflavina (B2)
Coenzima A	acilo	ácido pantoténico
Lipoamida	acilo	
Tiamina pirofosfato	aldeído	tiamina

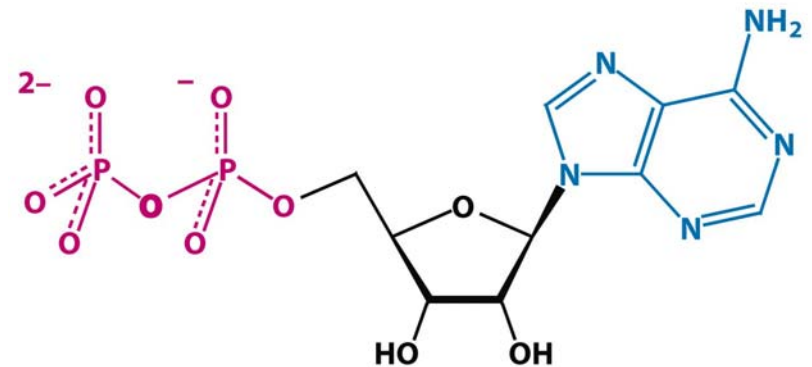
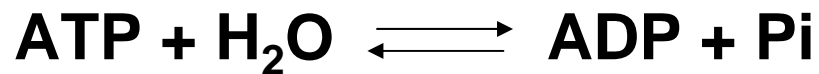
No metabolismo, grande parte das interconversões de grupos activados é feita por um número relativamente pequeno de transportadores, que foram seleccionados ao longo da evolução para efectuar um grande número de tarefas.

Este aspecto ilustra o **carácter modular do metabolismo**, assim como a sua economia e elegância.

ATP (Adenosina trifosfato)



Adenosine triphosphate (ATP)



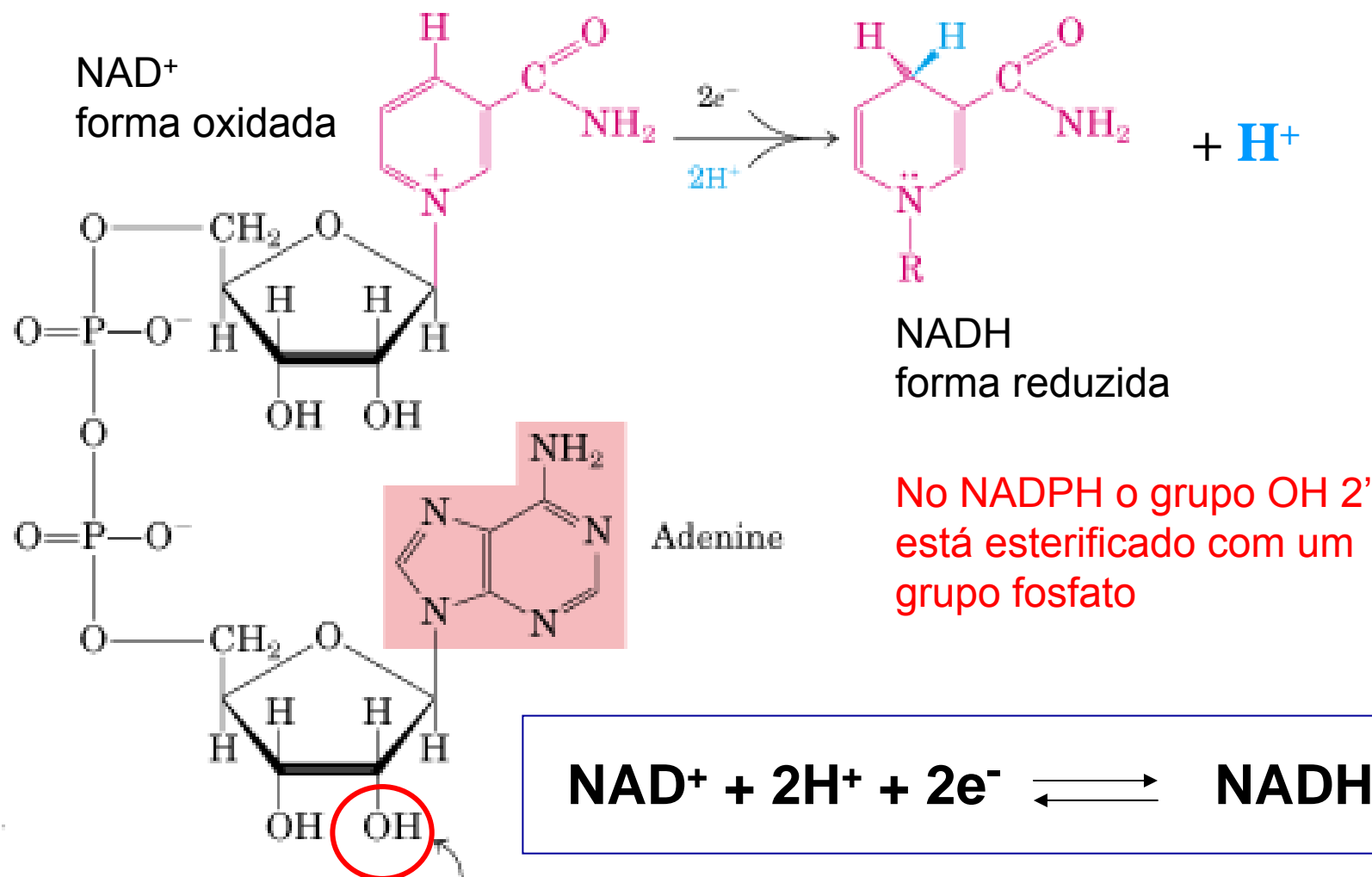
Adenosine diphosphate (ADP)

NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido)

Transportador de electrões na oxidação dos nutrientes (catabolismo)

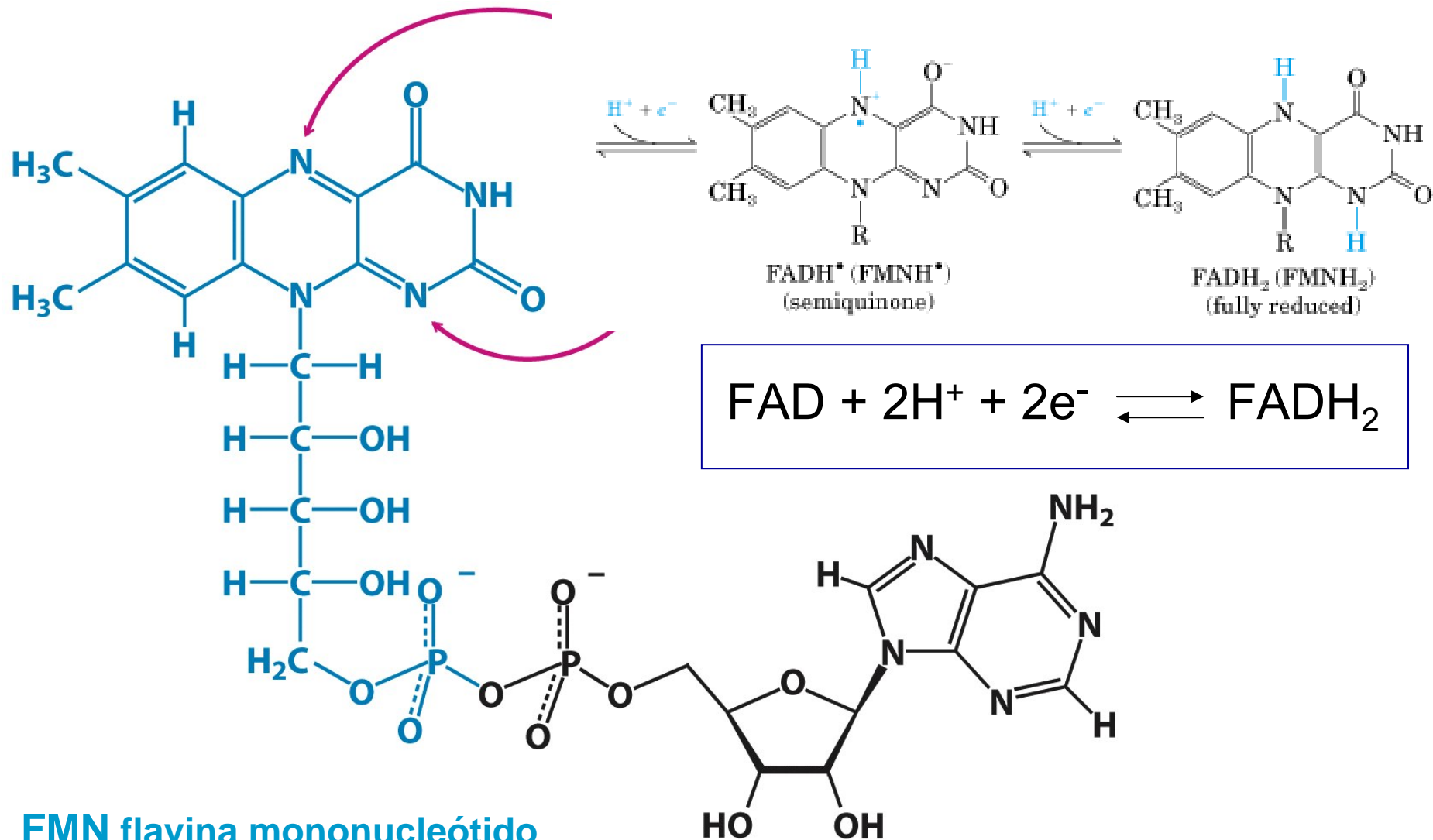
NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido **fosfato**)

Transportador de electrões na biossíntese (anabolismo)



FADH₂ (**flavina** adenina dinucleótido)

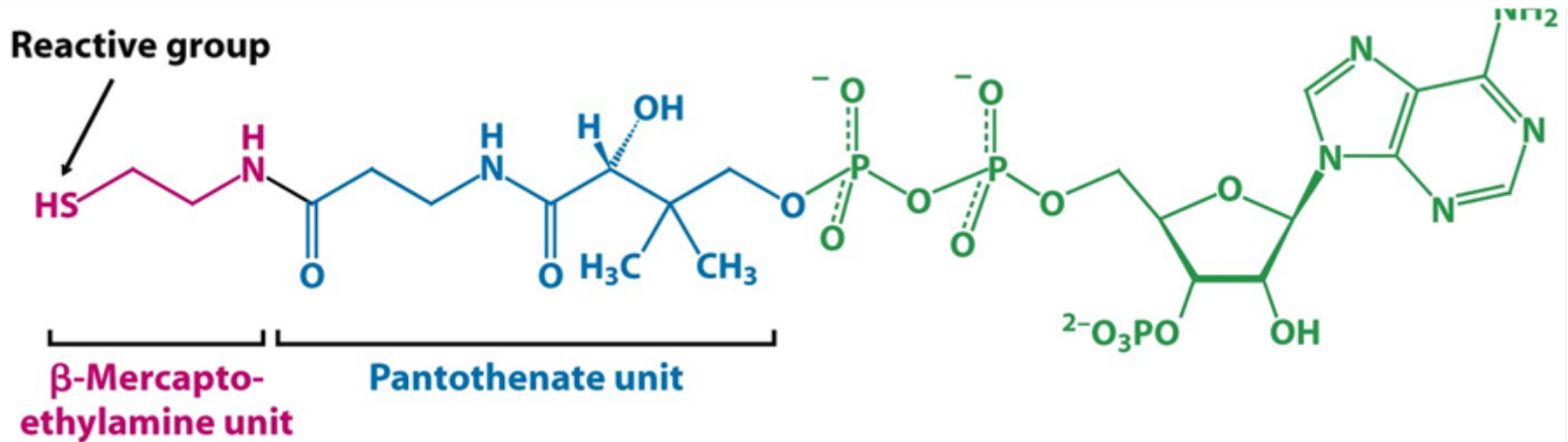
Transportador de electrões na oxidação dos nutrientes



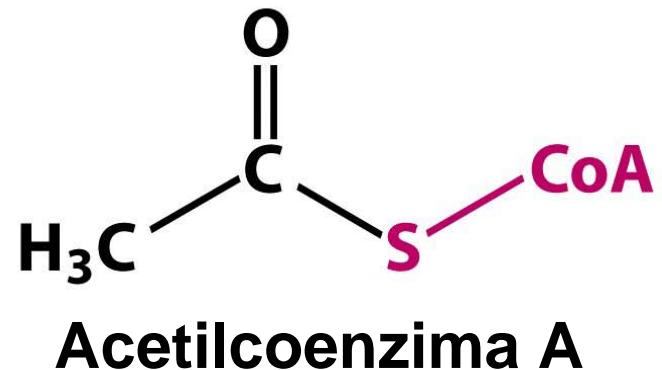
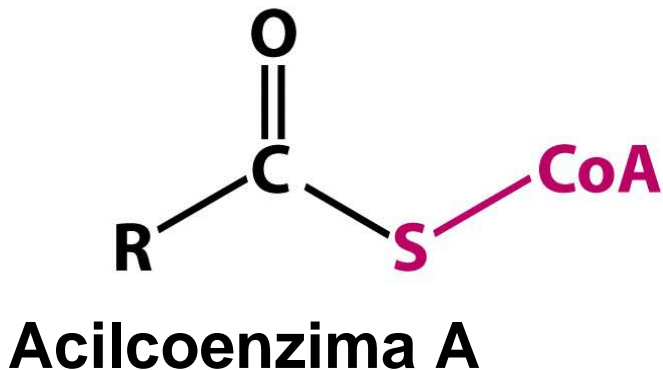
FMN flavina mononucleótido

CoenzimaA (CoA)

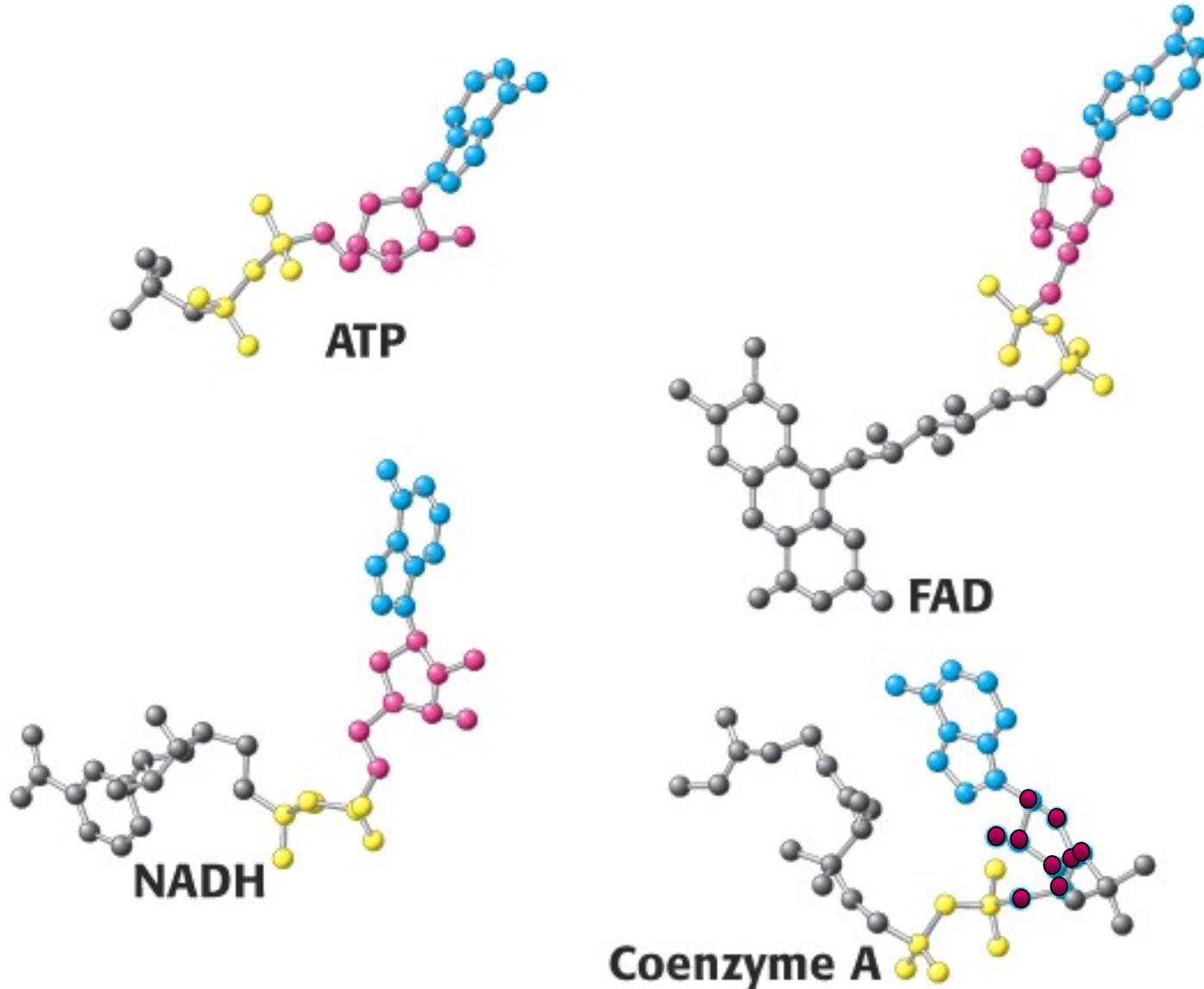
Transportador de grupos acilo activados



$\Delta G^{\circ'} = -7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$
hidrólise da ligação tioéster



Adenosina difosfato (ADP) é um ‘módulo’ antigo no metabolismo. Encontra-se presente em vários cofactores.



•Utilização de apenas 6 tipos de reacções

Oxidação/redução: transferência de electrões

Transferência de grupo funcional de uma molécula para outra

Hidrólise: quebra de ligações por adição de água

Adição ou remoção de grupo funcional a uma dupla ligação

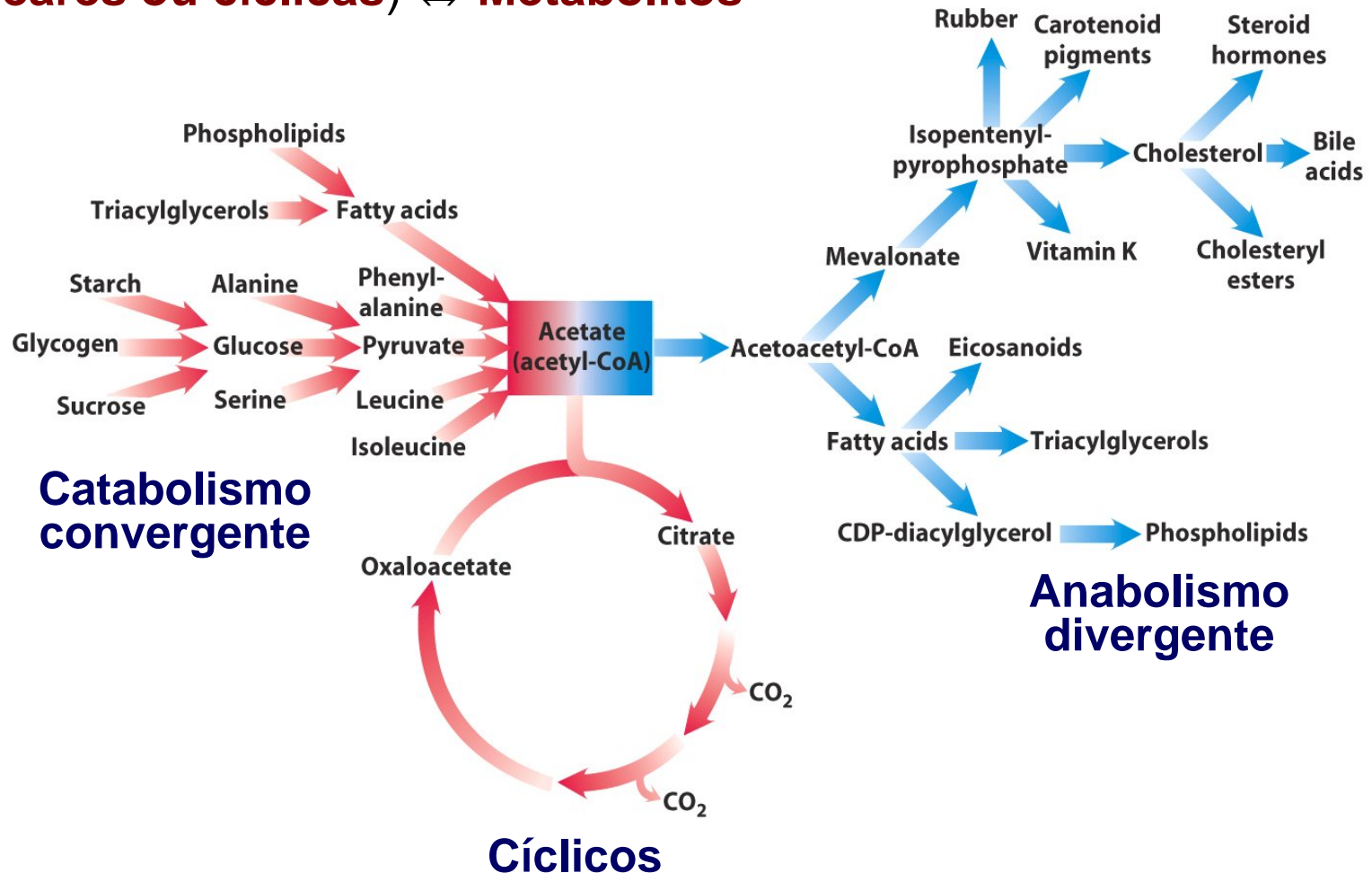
Isomerização: rearranjo de átomos na molécula

Ligação (dependente de ATP) : formação de ligações covalentes

Nota: Relacionar com a classificação das enzimas em 6 classes:
oxidoredutases; transferases; hidrolases; liases; isomerases; ligases

Os seis tipos de reacções organizam-se em caminhos que cumprem objectivos definidos

- Conjunto de reacções enzimáticas consecutivas (**vias metabólicas lineares ou cíclicas**) \Leftrightarrow **Metabolitos**



Princípio geral importante no metabolismo:

Caminhos de biossíntese e degradação são quase sempre distintos

- A separação é necessária por razões energéticas (ambos têm que ter $\Delta G'$ globais negativos).
- A separação permite a regulação independente dos dois caminhos

Os caminhos anabólicos e catabólicos empregam frequentemente enzimas comuns nos passos reversíveis o que permite uma maior economia . No entanto, a regulação independente é feita nos passos irreversíveis (pontos em que os caminhos divergem) nos quais as enzimas regulatórias são reguladas reciprocamente por efectores alostéricos comuns.

Regulação dos processos metabólicos

Em última análise todo o metabolismo é controlado pela energia disponível !

definição de carga energética:

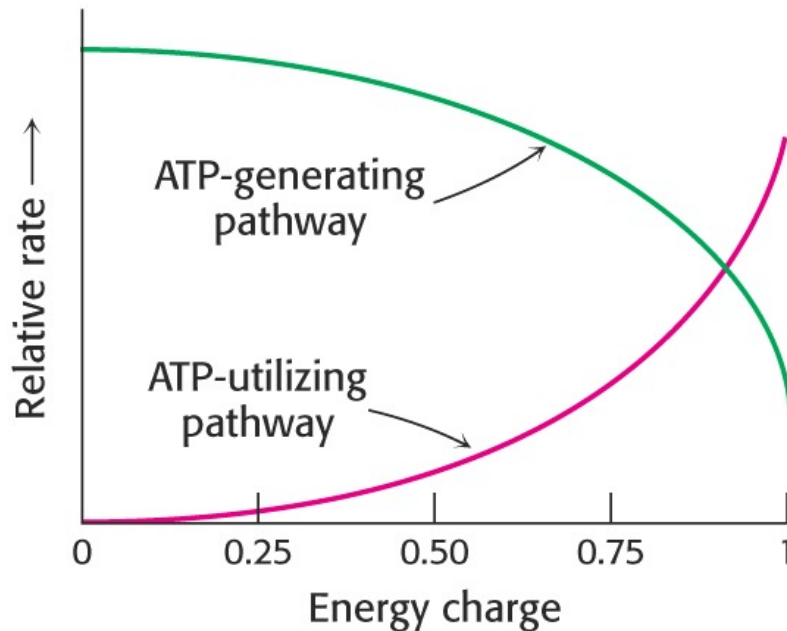
$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

Também se pode utilizar o potencial de fosforilação (P.F.) como critério para definir o estado energético da célula.

O potencial de fosforilação depende de $[\text{Pi}]$ e está relacionado com a energia livre que se obtém quando ATP é hidrolisado nas condições da célula.

$$P.F. = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{Pi}]}$$

A carga energética varia pouco



Catabolismo é inibido por c.e. elevada

Anabolismo é estimulado por c.e. alta

Muitas reacções são reguladas pela c.e.

O controlo dos caminhos metabólicos está feito de maneira a manter a carga energética dentro de limites apertados (c.e. varia 0.80-0.95). Tal como o pH, a carga energética está 'tamponizada' dentro da célula.

Como é feita a regulação das via metabólicas?

- **Regulação da quantidade das enzimas**

Balanco entre a velocidade de síntese proteica – transcrição e tradução - e a velocidade de degradação das enzimas.

- **Regulação da actividade enzimática**

Controlo alostérico de enzimas em pontos chave dos percursos metabólicos (ex. inibição do 1º passo de um caminho de biossíntese pelo produto desse caminho.)

Modificação covalente reversível (ex. Fosforilação/desfosforilação de enzimas)

- **Acessibilidade dos substratos**

Transferência de metabolitos entre diferentes compartimentos celulares nas células eucarióticas. (ex. A oxidação dos ácidos gordos dá-se na mitocôndria e a biossíntese dá-se no citoplasma. A compartimentação permite a indispensável regulação independente de caminhos opostos.)

Estratégias Regulatórias

A regulação dos caminhos metabólicos é essencial para haver coordenação dos processos que ocorrem na célula.



A regulação é feita através da regulação da actividade das enzimas

A actividade enzimática pode ser regulada de 5 maneiras:

- Controle alostérico
- Isoenzimas
- Modificação covalente reversível
- Activação proteolítica
- Controle da concentração da enzima

Controle da quantidade de enzima

A actividade enzimática também pode ser regulada ajustando a quantidade de enzima presente.

$$V_M = k_{\text{cat}} \times [\text{Enzima}]$$

Esta forma importante de regulação faz-se geralmente ao nível da transcrição da informação genética.

Controle alostérico

As proteínas alostéricas são em geral multiméricas e têm sítios regulatórios distintos dos sítios catalíticos.

A ligação de moléculas sinalizadoras aos sítios regulatórios resulta na modificação da actividade destas enzimas.

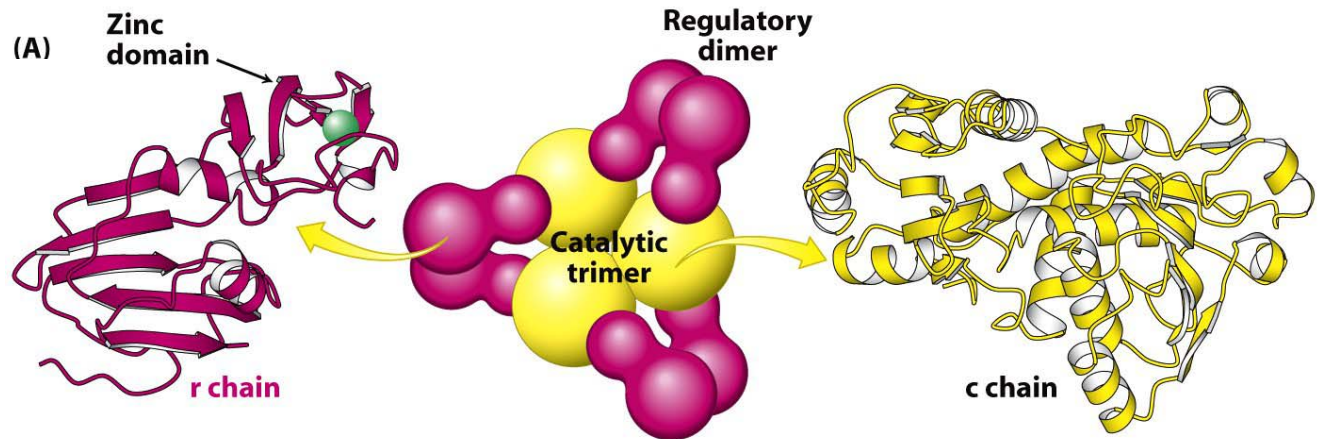
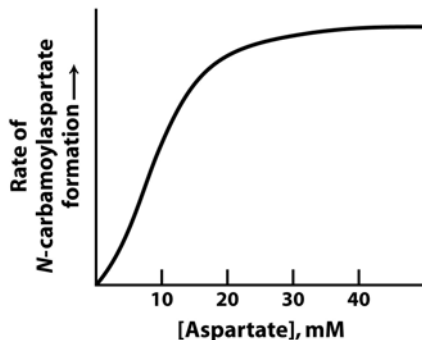
Apresentam cooperatividade.

Os múltiplos sítios catalíticos comunicam entre si.

A curva $v = f([S])$

É **sigmoidal**.

A ligação de S a um centro activo aumenta a afinidade dos outros centros para S.



Ex: Aspartato transcarbamoilase (ATCase)

ISOENZIMAS (ou ISOZIMAS)

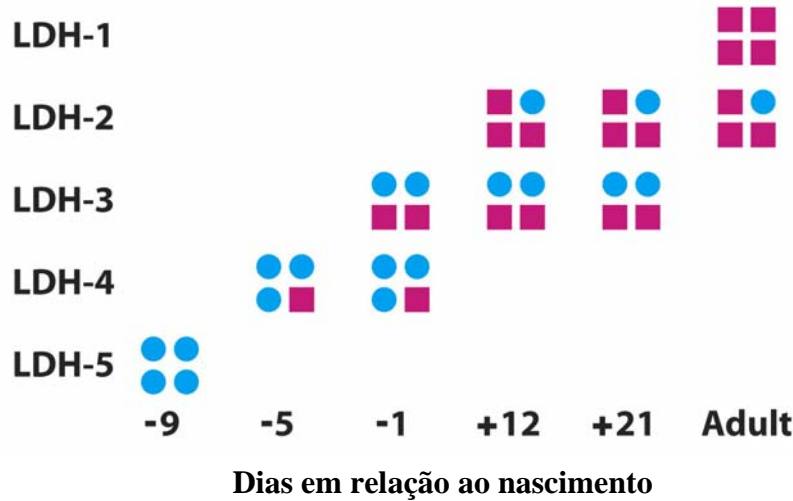
Permitem uma regulação específica da mesma reacção para diferentes tecidos ou estádios de desenvolvimento.

São enzimas homólogas que catalisam a mesma reacção mas têm sequências de aminoácidos diferentes e propriedades cinéticas diferentes (K_M , k_{cat}). A sua regulação também pode ser diferente.

EX: Lactato desidrogenase (LDH)

catalisa a conversão de piruvato em lactato

LDH coração do rato durante o desenvolvimento



Existem dois tipos de cadeias: **H (coração)** e **M (músculo esquelético)**. A enzima funcional é tetramérica e pode ter todos os tipos de combinações. H₄ tem maior afinidade para S e é inibida por concentrações elevadas de piruvato. M₄ tem menor afinidade e não é inibida por piruvato. A isozima M₄ funciona melhor nas condições anaeróbias do músculo e a H₄ nas condições aeróbias do coração.

Quadrados rosa: cadeia H

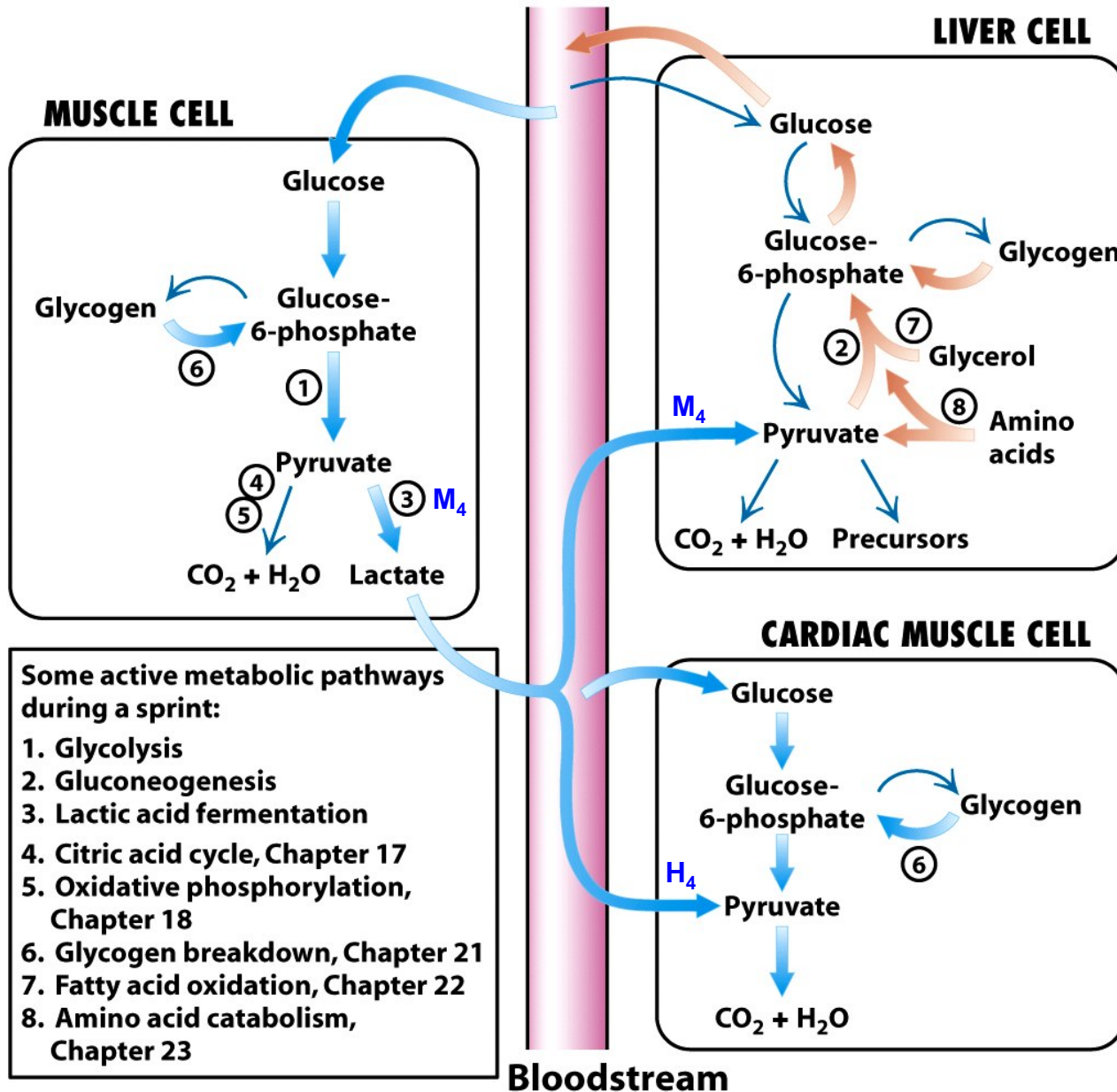
Círculos azuis: cadeia M

	Heart	Kidney	Red blood cell	Brain	Leukocyte	Muscle	Liver
H ₄	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>
H ₃ M	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>
H ₂ M ₂	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>
HM ₃	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>
M ₄	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>	<div></div>

Conteúdo em isozimas LDH em vários tecidos

Alguns caminhos metabólicos activos durante uma corrida de “sprint”

Cooperação entre vários órgãos



LDH

H_4 maior afinidade
inibida por piruvato

M_4 menor afinidade
não é inibida por piruvato

Modificação covalente reversível

As propriedades catalíticas de muitas enzimas são alteradas por ligação covalente de um grupo químico (fosforilo é o mais comum).

ATP serve como dador de grupos fosforilo nestas reacções que são catalisadas por **CINASES**. A remoção dos grupos fosforilo é catalisada por **FOSFATASES**.

Exemplos de modificação covalente:

- Fosforilação

Transferência de grupos fosforilo a partir de ATP. Ex. Fosforilase do glicogénio, enzima envolvida na homeostase da glucose e metabolismo energético.

- Acetilação

Transferência de grupos acetilo a partir de acetil-CoA catalisada por acetiltransferases e remoção catalisada por desacetilases. Ex. Histonas muito acetiladas em genes que estão a ser activamente transcritos.

- Ligação irreversível de lípidos

Dador miristoilCoA ou farnesilpirofosfato. Modificação de proteínas envolvidas em transdução de sinal que ficam associadas à membrana. (Ex. Src e Ras)

- Ubiquitinação

A Ubiquitina é uma pequena proteína que se liga a outras proteínas marcando-as para serem destruídas. Ex. Ciclina, proteína envolvida no controle do ciclo celular.

- γ -carboxilação

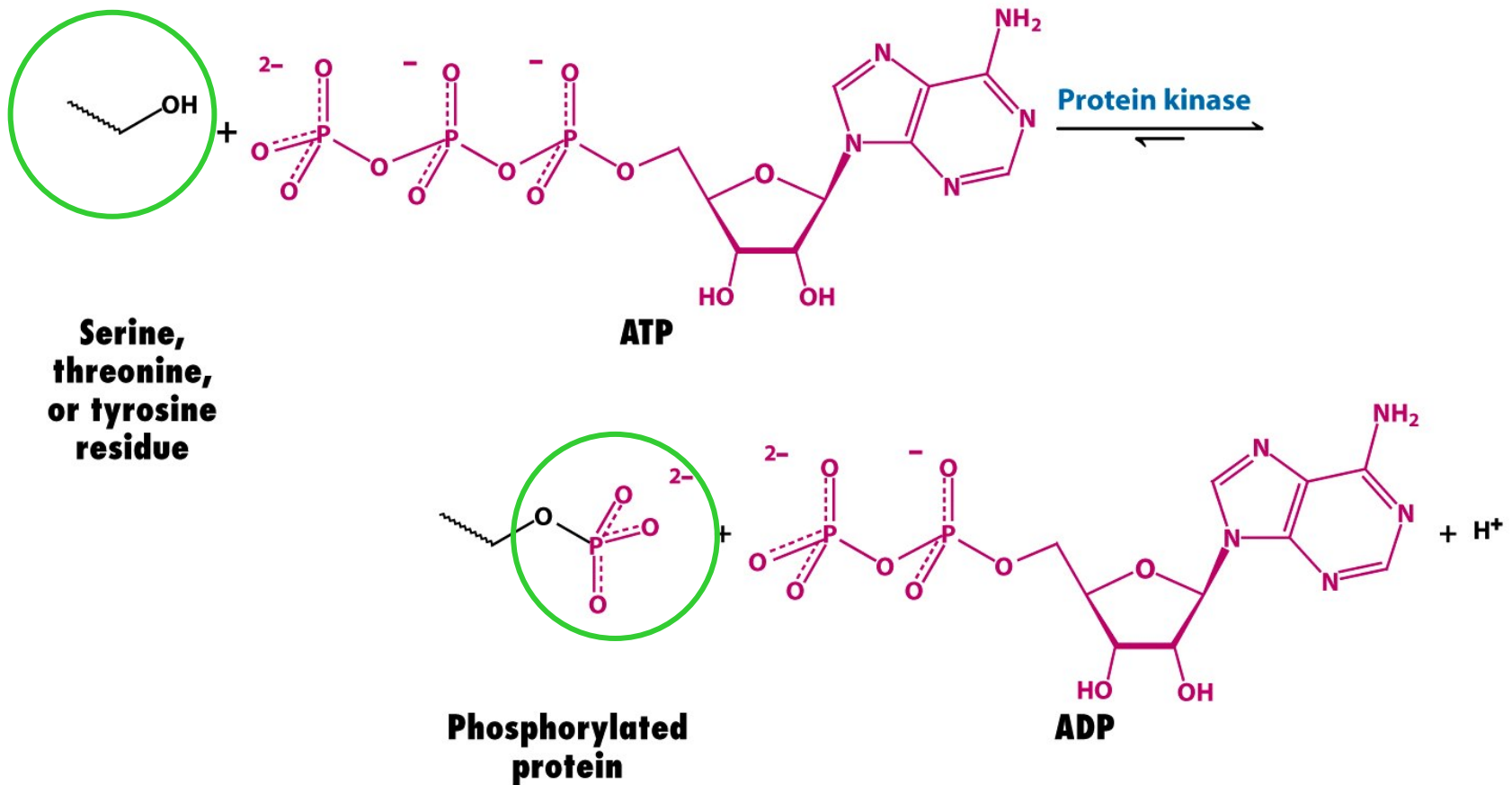
A carboxilação de vários resíduos de Glu na protrombina é fundamental para a sua conversão em trombina e consequente activação do processo de coagulação sanguínea.

Vantagens da utilização de fosforilação na regulação da actividade enzimática

1. O grupo fosforilo confere 2 cargas negativas à proteína modificada. Podem alterar-se interacções electrostáticas (estrutura).
2. O grupo fosforilo pode formar 3 ligações de hidrogénio direccionais. Podem alterar-se interacções específicas com dadores de H (estrutura).
3. ca. de metade da energia de hidrólise do ATP é conservada na proteína fosforilada deslocando o equilíbrio entre os dois estados funcionais de ca. de 10^4 . (a outra metade da energia é para tornar a reacção irreversível)
4. O ciclo fosforilação/desfosforilação pode ocorrer em menos de 1 segundo ou durante horas, permitindo o ajuste do tempo adequado fisiologicamente
5. Amplificação do efeito. Uma cinase activada pode fosforilar centenas de proteínas (enzimas?) num curto intervalo de tempo.
6. ATP é a moeda energética da célula. A utilização de ATP como dador de grupos fosforilo liga a regulação do metabolismo ao estado energético da célula.

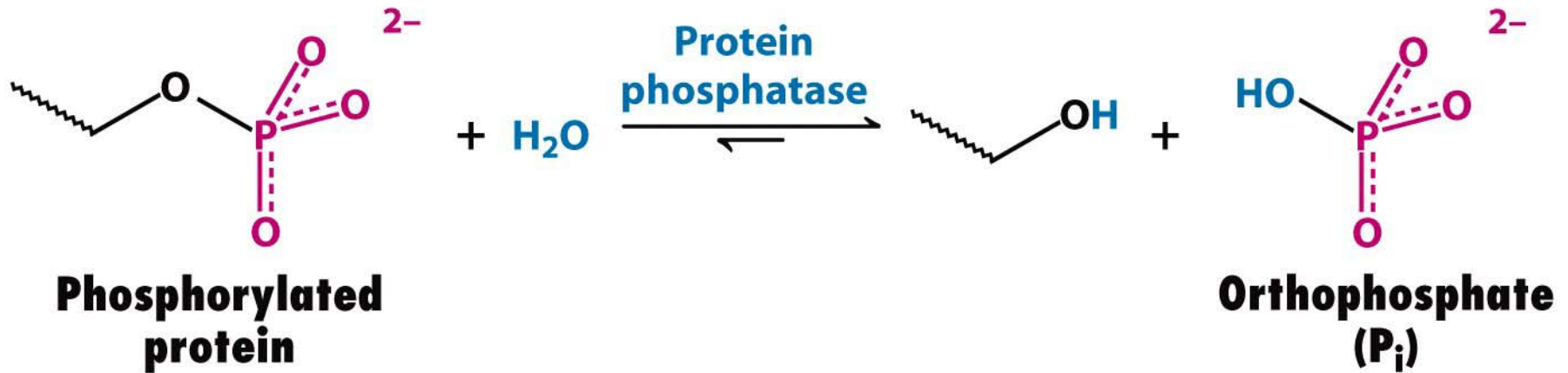
A fosforilação é utilizada como mecanismo de regulação em praticamente todos os processos metabólicos das células eucarióticas.

As enzimas que catalisam a transferência do grupo fosforilo do ATP para resíduos de **serina**, **treonina** ou **tirosina** são **proteína cinases**.



Só as proteínas intracelulares é que podem ser reguladas por fosforilação reversível

A remoção do grupo fosforilo é catalisada por **proteína fosfatases**. Estas enzimas catalisam a hidrólise do grupo fosforilo, regenerando a cadeia lateral não modificada e libertando ortofosfato.



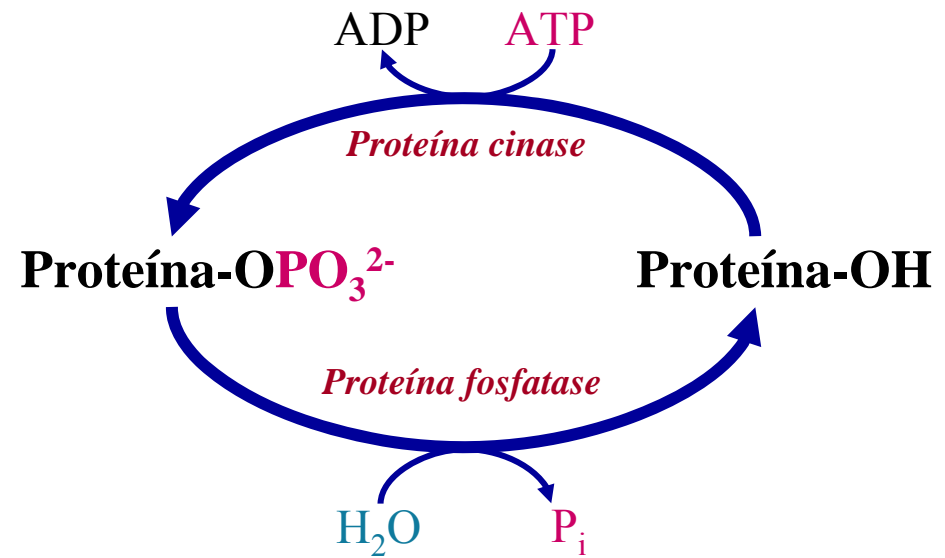
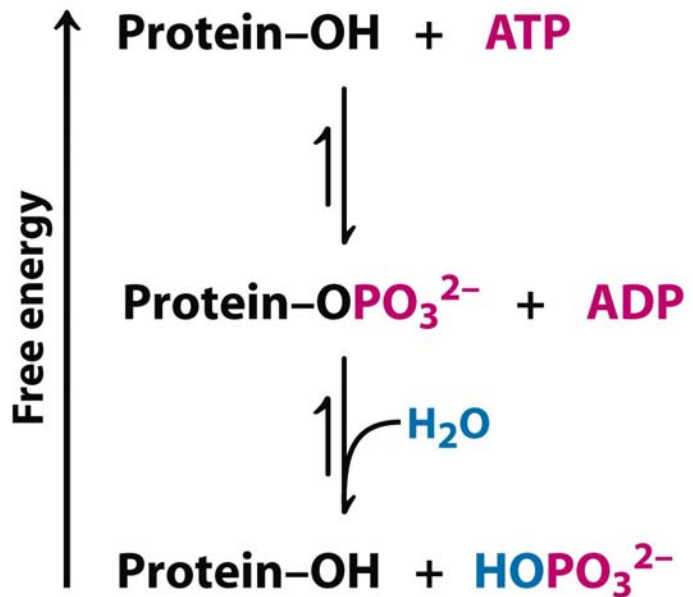
Estas enzimas têm um papel muito importante nas células porque “desligam” as cadeias de transdução de sinal activadas pelas cinases.

As reacções de fosforilação e desfosforilação **não são o inverso** uma da outra.

São ambas irreversíveis nas condições fisiológicas.
Praticamente não ocorrem na ausência das enzimas que as catalisam.

As proteínas alvo circulam unidireccionalmente entre as formas fosforilada e desfosforilada.

A velocidade do ciclo depende das actividades relativas da cinase e da fosfatase.

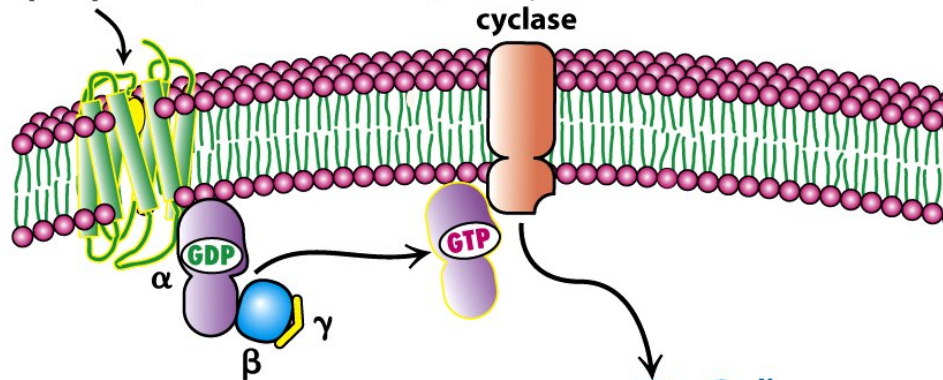


Papel da fosforilação na regulação da síntese e degradação do glicogénio

A síntese e a degradação do glicogénio têm regulação recíproca: a mesma cascata de transdução de sinal que inicia a degradação do glicogénio também inibe a sua síntese.

DURING EXERCISE OR FASTING

Glucagon (liver) or
epinephrine (muscle and liver)

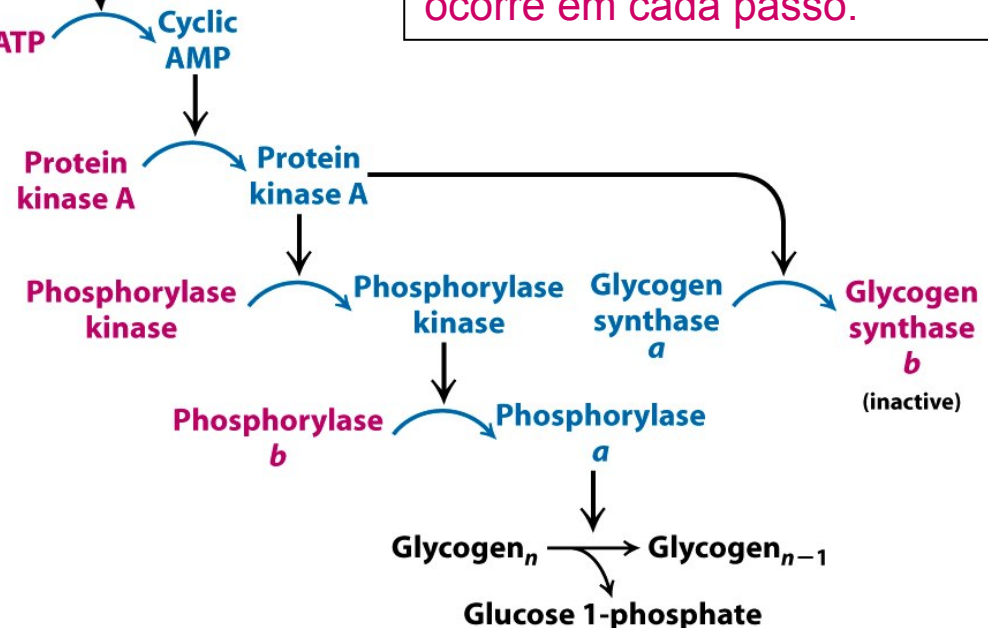


As cascatas enzimáticas são utilizadas em bioquímica quando se pretende obter uma resposta rápida, devido à amplificação do sinal que ocorre em cada passo.

Em resultado da activação da proteína cinase A (PKA) são fosforiladas as enzimas fosforilase cinase e glicogénio sintase.

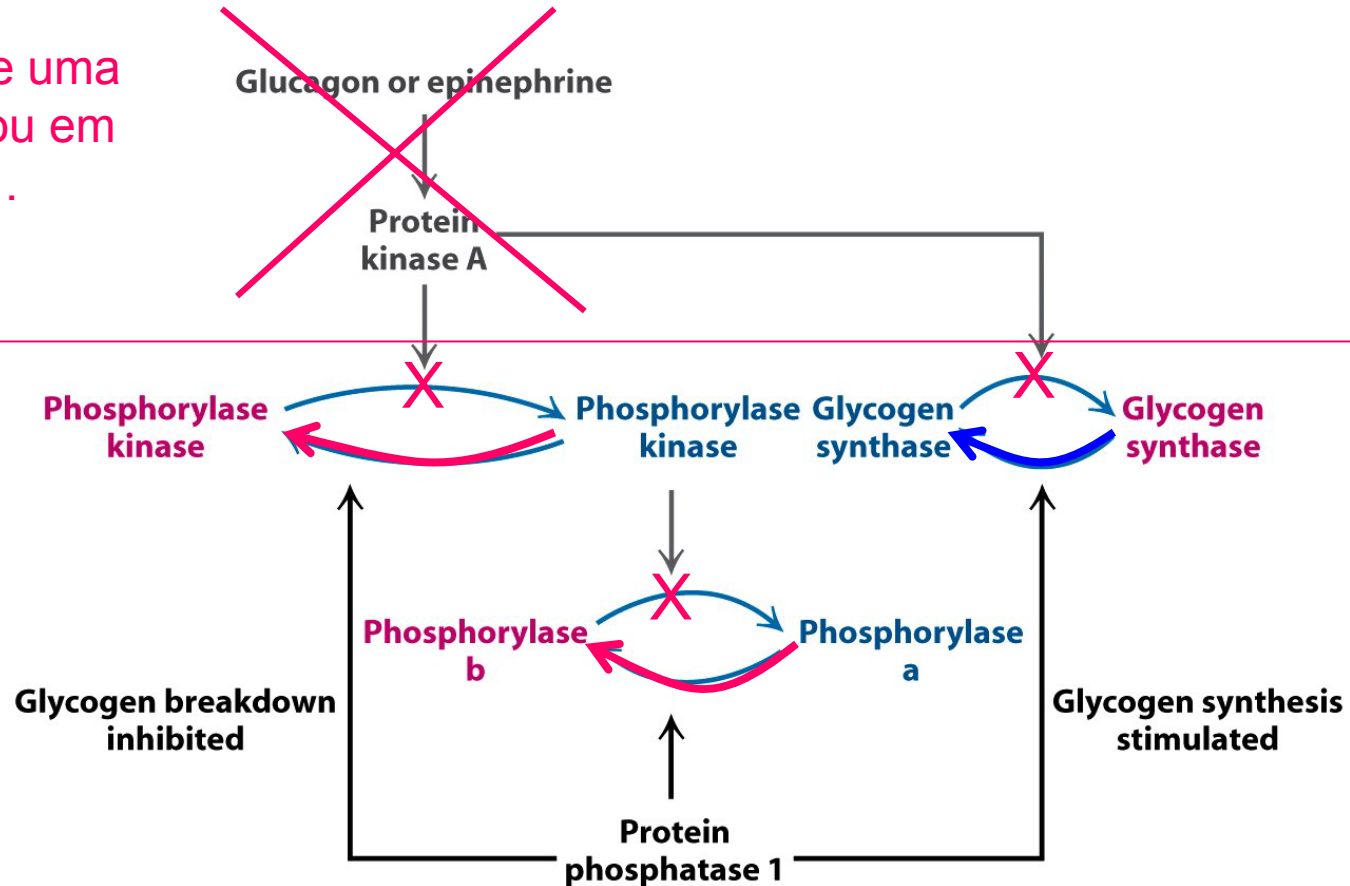
A fosforilase cinase fosforilada é activa e fosforila a glicogénio fosforilase convertendo-a na forma *a* que é activa → dá-se a degradação do glicogénio.

Por outro lado, a glicogénio sintase fosforilada fica na forma *b* que é inactiva → pára a síntese do glicogénio.



A proteína fosfatase 1 (PP1) reverte os efeitos regulatórios das cinases no metabolismo do glicogénio.

Depois de uma refeição ou em repouso...



A desfosforilação da fosforilase cinase e da glicogénio fosforilase conduz à **paragem da degradação do glicogénio**.

A desfosforilação da glicogénio sintase **activa a síntese do glicogénio**.

Activação proteolítica (corte de ligações peptídicas)

Algumas enzimas são sintetizadas sob a forma de um precursor inactivo: ZIMOGÉNIO ou proenzima e só ficam activas após corte de uma ou mais ligações peptídicas específicas.

O corte das ligações peptídicas não necessita de ATP e ocorre apenas uma vez na “vida” da enzima. Este mecanismo de regulação é muito utilizado em **proteínas extracelulares**.

Exemplos de enzimas activadas por proteólise

- enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, elastase, pepsina, carboxipeptidase)
- enzimas envolvidas na coagulação do sangue (trombina, fibrina, etc.)
- algumas hormonas (insulina)
- colagénio
- proteases envolvidas em desenvolvimento (metamorfoses - collagenase)
- caspases (proteases envolvidas na apoptose - morte celular programada)

As enzimas proteolíticas têm inibidores específicos

A activação das proteases é irreversível. São necessários inibidores específicos para parar a sua acção.

Inibidor pancreático da tripsina

Proteína 6 kd análoga do substrato, com grande afinidade para a tripsina ($K_d=0.1$ pM)

Este inibidor é produzido pelo pâncreas para impedir que pequenas quantidades de tripsina iniciem a activação dos outros zimogénios prematuramente. A inibição impede a destruição dos tecidos do pâncreas e do ducto pancreático.

