

Bioquímica Geral

Sumário

TRANSPORTE BIOLÓGICO

Difusão de solutos (revisão)

Transporte: considerações termodinâmicas

Tipos de transporte:

- Difusão simples

- Difusão facilitada (ionóforos, canais iónicos e transportadores)

- Transporte activo primário

- Transporte activo secundário

Classificação dos sistemas de transporte

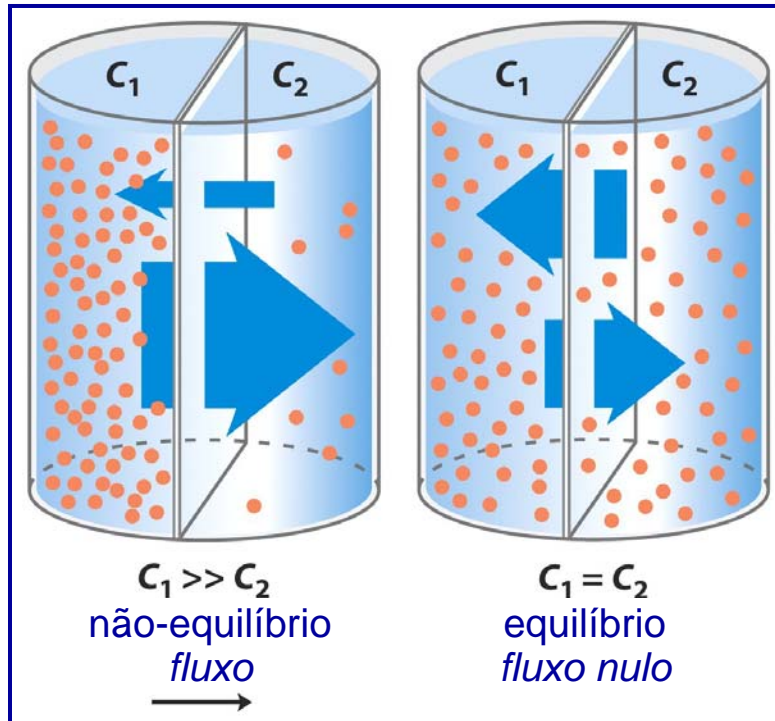
Transporte de solutos

- O carácter altamente hidrofóbico das membranas biológicas confere-lhes uma elevada impermeabilidade à maioria dos iões e moléculas polares \Rightarrow são necessários **transportadores proteicos**.
- A transferência de solutos através da membrana é determinada:
 1. permeabilidade na camada lipídica
 2. disponibilidade de energia

As **substâncias lipofílicas**, que se dissolvem na membrana, tais como as hormonas esteróides ou gases como O_2 , N_2 , CO_2 e NO , difundem dos compartimentos de maior concentração para os de menor concentração por **difusão simples** através da camada bilipídica.

Difusão de solutos: revisão

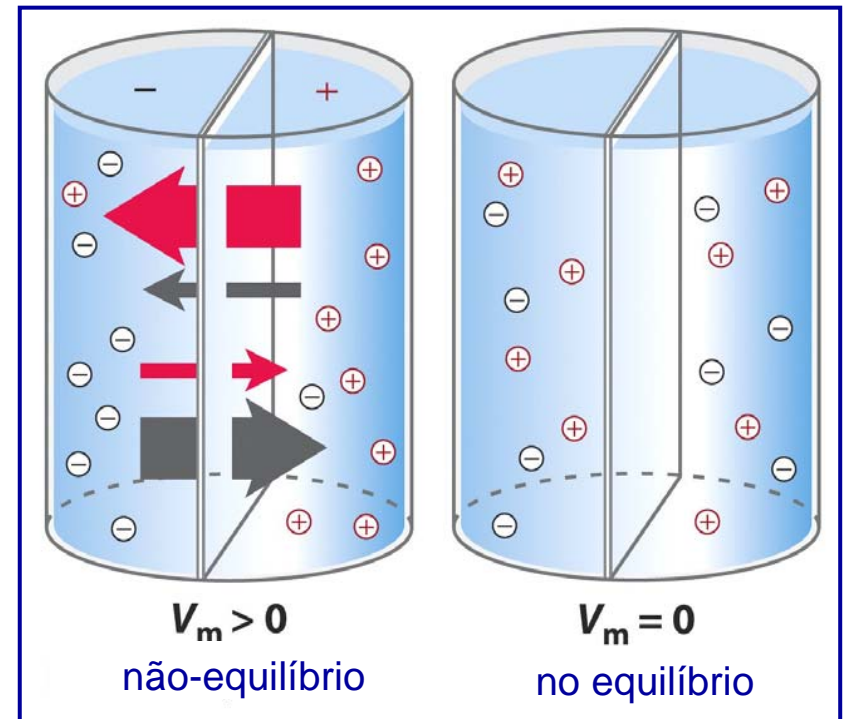
Solutos neutros



O movimento de solutos de carga neutra é no sentido da menor concentração até se atingir o equilíbrio

⇒ **gradiente químico**

Solutos carregados



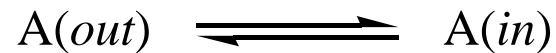
A difusão de solutos carregados depende da concentração e do

potencial de membrana

⇒ **gradiente electroquímico**

Transporte: considerações termodinâmicas

A difusão de uma substância neutra através da membrana é semelhante, do ponto de vista termodinâmico, a um equilíbrio químico:



A energia livre em função da concentração é:

$$\bar{G}_A - \bar{G}_A^{0'} = RT \ln[A]$$

em que \bar{G}_A é o potencial químico (energia livre molar parcial) de A (*a barra indica quantidade por mole*) e $\bar{G}_A^{0'}$ é o potencial químico de A no estado padrão.

A diferença de concentrações dos 2 lados da membrana gera uma diferença de potencial químico:

$$\Delta \bar{G}_A = \bar{G}_A(in) - \bar{G}_A(out) = RT \ln \left(\frac{[A]_{in}}{[A]_{out}} \right)$$

se $[A]_{out} > [A]_{in} \Rightarrow$ a energia livre associada ao transporte de A de fora para dentro é negativa; se $[A]_{out} < [A]_{in}$, a energia é positiva e o transporte de A para o interior requer energia.

Transporte: considerações termodinâmicas (cont.)

O movimento transmembranar de iões resulta, também, em diferença de cargas através da membrana, gerando assim uma diferença de potencial eléctrico:

$$\Delta\Psi = \Psi(in) - \Psi(out)$$

(em que $\Delta\Psi$ representa o potencial de membrana)

Se A for uma substância iónica define-se o potencial electroquímico que resulta da soma do potencial químico com o potencial eléctrico. A variação do potencial electroquímico associada ao movimento transmembranar é igual a:

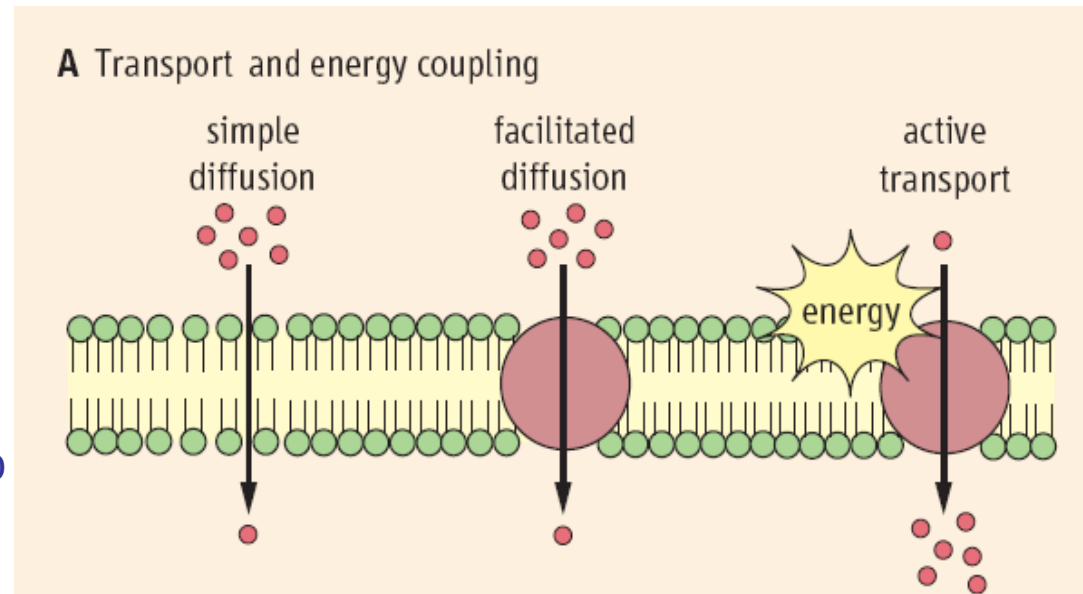
$$\Delta \bar{G}_A = RT \ln \left(\frac{[A]_{in}}{[A]_{out}} \right) + Z_A F \Delta\Psi$$

em que Z_A é a carga eléctrica do soluto transportado, F é a constante de Faraday ($F = 96500 \text{ J V}^{-1} \text{ mol}^{-1} = 23.1 \text{ kcal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

que depende do gradiente de concentrações e do gradiente eléctrico ($\Delta\Psi$)

Tipos de transporte através da membrana

1. Transporte não-mediado ou difusão simples. O soluto move-se a favor do gradiente electroquímico (potencial electroquímico) através da bicamada lipídica. O fluxo depende do gradiente e também da solubilidade do soluto na fase apolar da bicamada (que é muito baixa para iões e solutos polares).



2. Transporte mediado, o transporte ocorre pela acção de um transportador proteico específico:

2.1. transporte passivo ou difusão facilitada, em que o soluto se difunde através do transportador ou canal proteico a favor do gradiente electroquímico. O fluxo aumenta, relativamente à difusão simples, devido ao aumento da permeabilidade por causa da presença do transportador.

2.2. transporte activo, em que o soluto se move contra o gradiente electroquímico; é um processo endergónico que tem de estar acoplado a um processo exergónico ($\Delta G < 0$) para ocorrer. As bombas permitem o acoplamento dos dois processos.

Tipos de transporte através da membrana

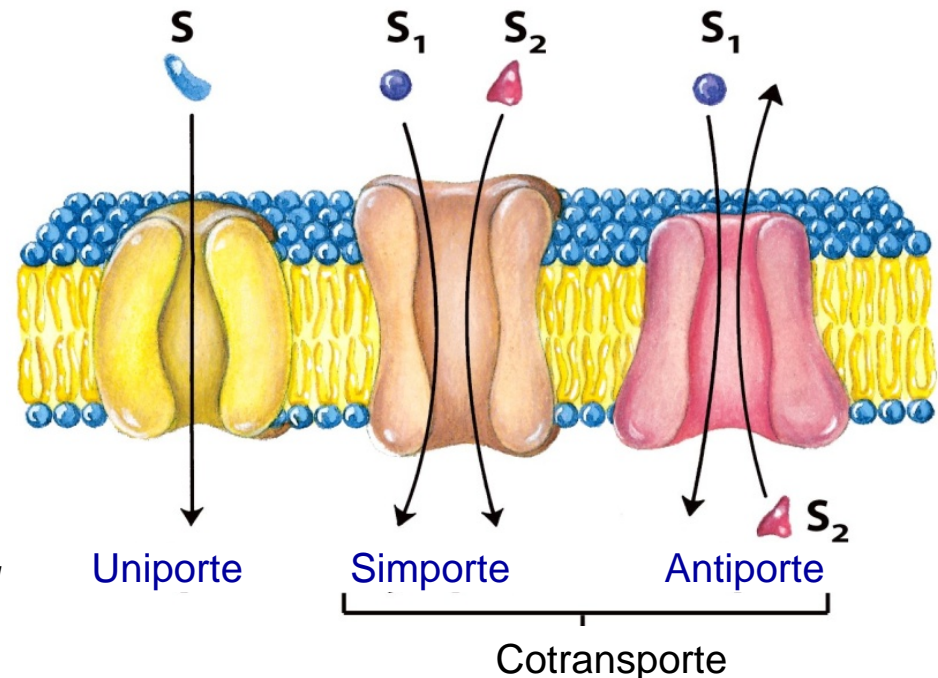
- Classificação dos tipos de transporte baseado no nº de partículas transportadas e na direcção:
- Transporte de uma única molécula ou ião, mediado por um transportador ou um canal \equiv **uniporte**
- Transporte simultâneo de duas partículas por **cotransporte**:
simporte ou **antiporte** (normalmente entre duas partículas de carga igual \rightarrow electroneutralidade; energeticamente mais favorável)

Exemplos:

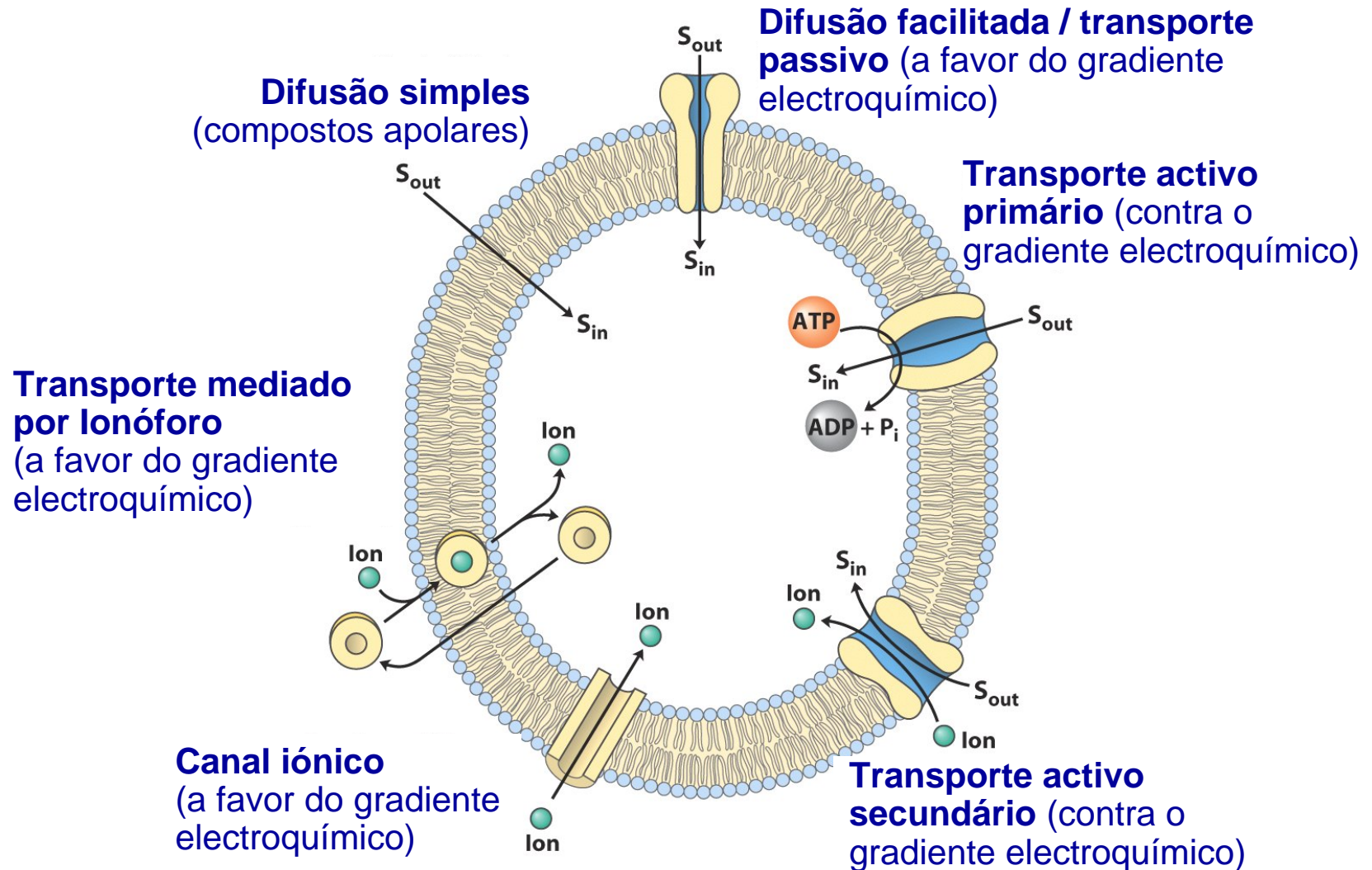
Uniporte: transportador de glucose nos eritrócitos

Simporte: transporte activo de glucose acoplado a Na^+ nas células do epitélio intestinal

Antiporte: permutador aniónico cloreto-bicarbonato dos eritrócitos



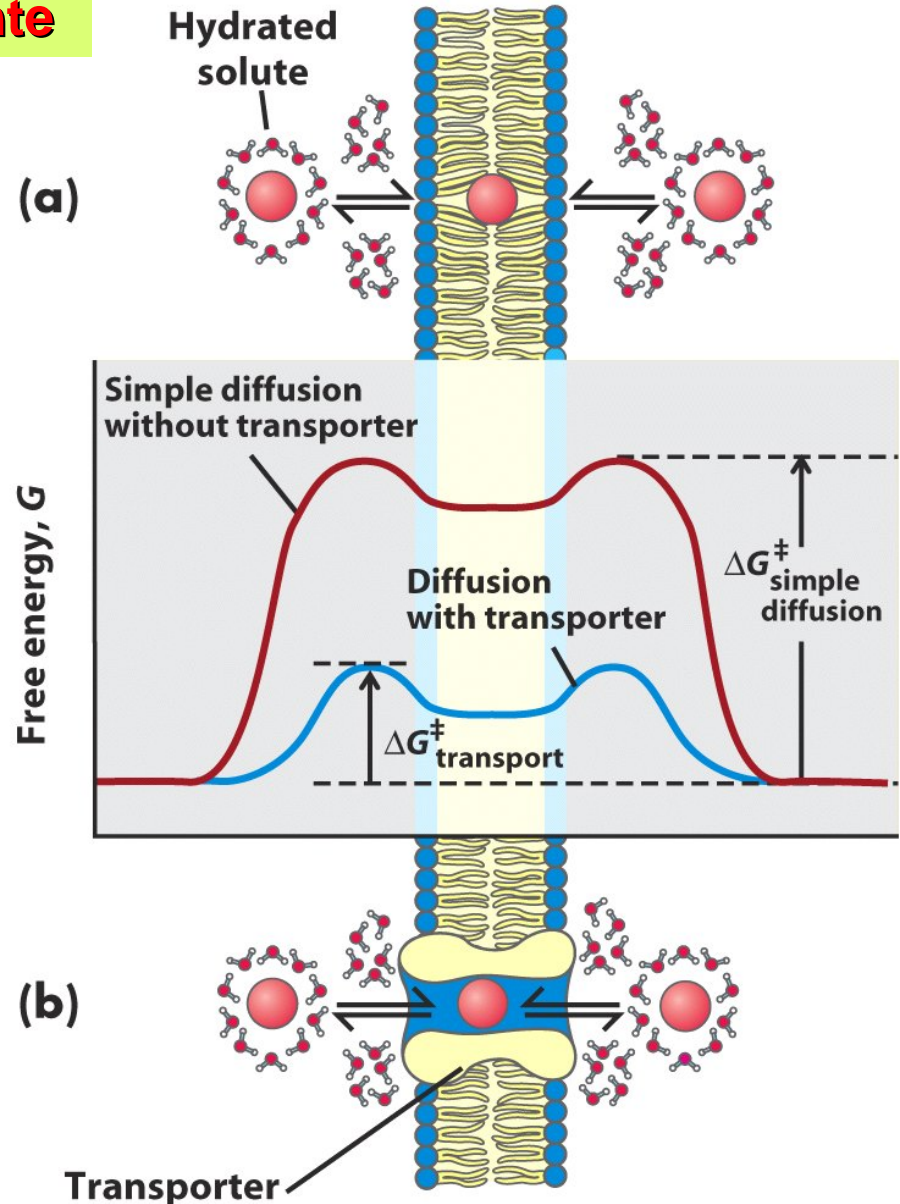
Tipos de transporte através da membrana



Transporte: considerações termodinâmicas

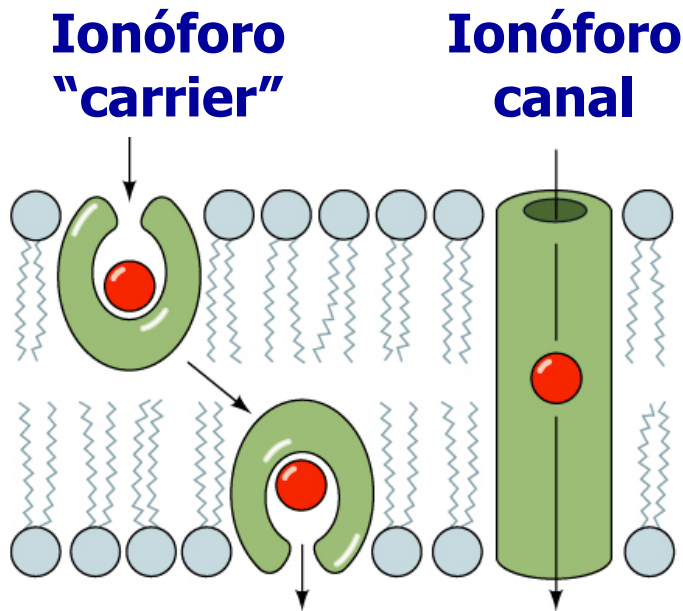
Difusão: sempre a favor do gradiente

- (a) Na **difusão simples**, a remoção da esfera de hidratação do soluto é muito endergônica e tem uma ΔG^\ddagger muito elevada.
- (b) Na **difusão facilitada**, a presença de um transportador proteico reduz ΔG^\ddagger , estabelecendo interações não-covalentes com o soluto hidratado de forma a substituir as pontes de H com a água e disponibilizando um canal hidrofílico \Rightarrow **Difusão facilitada ou transporte passivo**

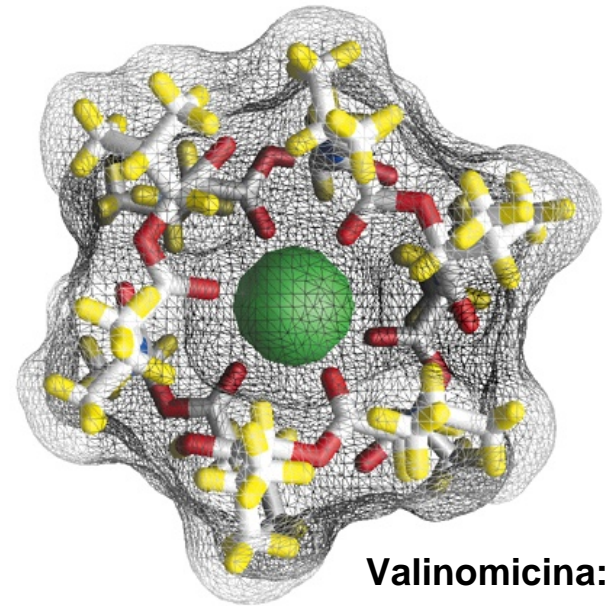


Difusão facilitada: ionóforos

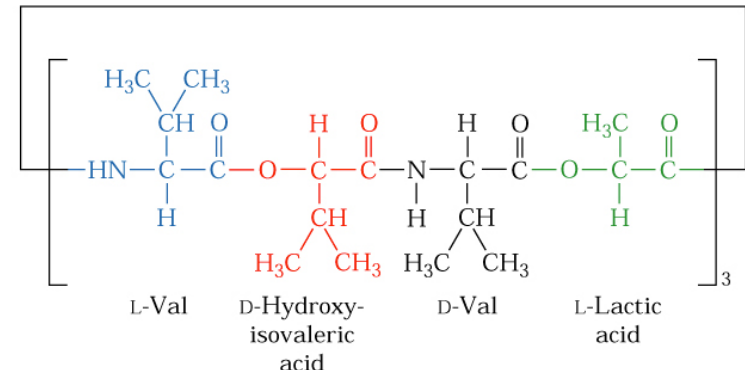
Ionóforos são moléculas orgânicas (antibióticos ou péptidos) que aumentam a permeabilidade da membrana para um ião específico. Alguns funcionam como transportadores ("carriers" ex. Valinomicina) outros formam canais na membrana (ex. Gramicidina).



- o complexo ionóforo-ião tem que ser solúvel em solventes não-polares.
- ionóforos que formam canais através dos quais o ião pode difundir.



Valinomicina:
ionóforo específico para K⁺



Difusão facilitada (transporte passivo)

1. Canais (poros) que possibilitam o movimento rápido de moléculas ou iões específicos através da membrana. São normalmente proteínas oligoméricas intrínsecas, cujas estruturas terciária e quaternária criam um poro aquoso na membrana.

- a substância a transportar não se liga ao canal
- a especificidade do canal baseia-se na carga e no tamanho da substância
- o fluxo é regulado pela abertura / fecho do canal
- velocidade de translocação elevada: 10^7 iões/s⁻¹

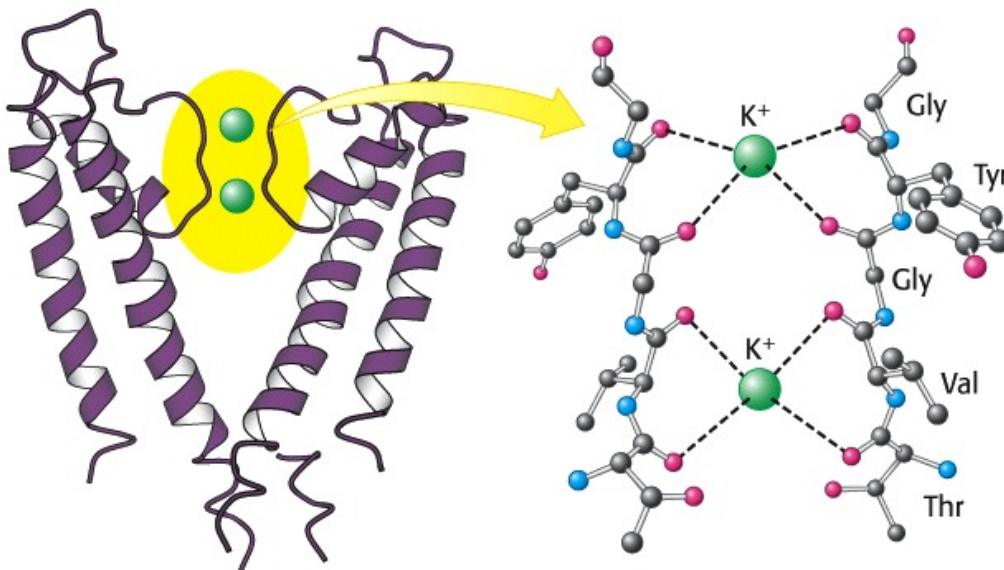
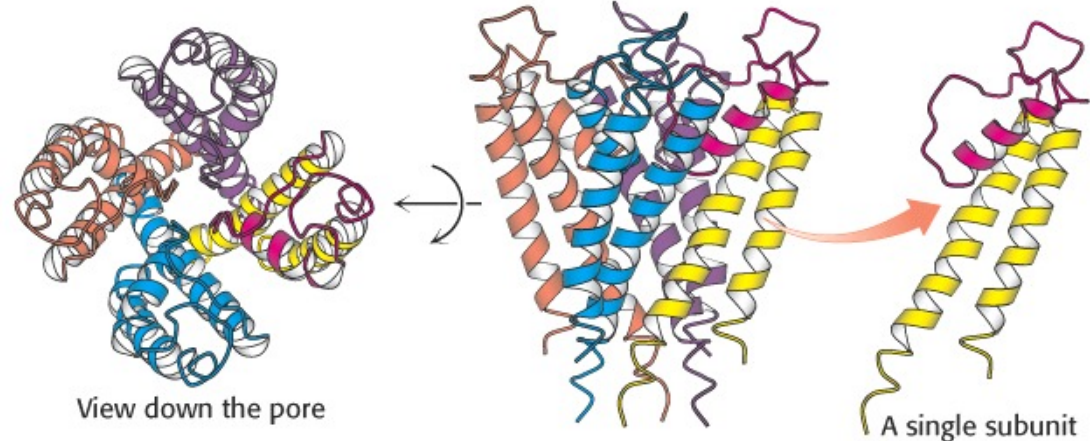
2. Transportadores (*carriers*, *permeases*, *porters*, *translocases*) transportam a molécula ou ião por ligação ao transportador, seguida de alteração conformacional que conduz a translocação da substância. Apesar de não serem enzimas (não catalisam uma reacção química), a sua actividade pode ser descrita usando o formalismo da cinética enzimática \Rightarrow substrato, inibidores competitivos e não-competitivos... Apresentam saturação.

- velocidade de translocação $10^2 - 10^3$ iões/s⁻¹

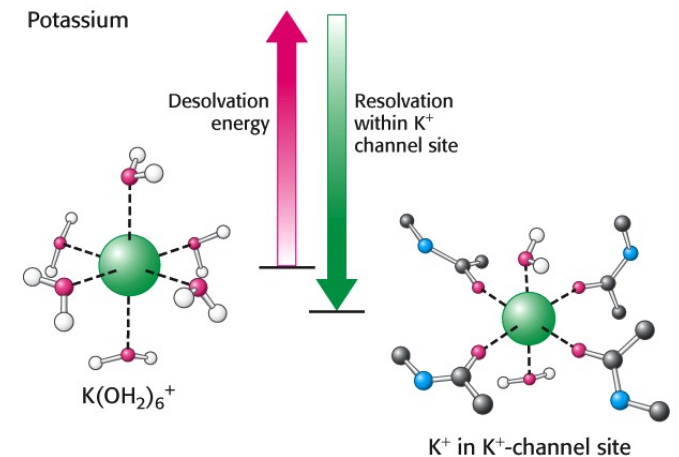
1: Canais iônicos selectivos são proteínas integrais que abrem e fecham em resposta a um acontecimento celular. *Exemplos: canal/receptor de acetilcolina (junção neuro-muscular), canais de Na^+ e K^+ dependentes da voltagem (transmissão do impulso nervoso).*

- Fluxos superiores aos dos transportadores
- Não apresentam saturação
- São controlados ("gated") por ligandos ou por voltagem

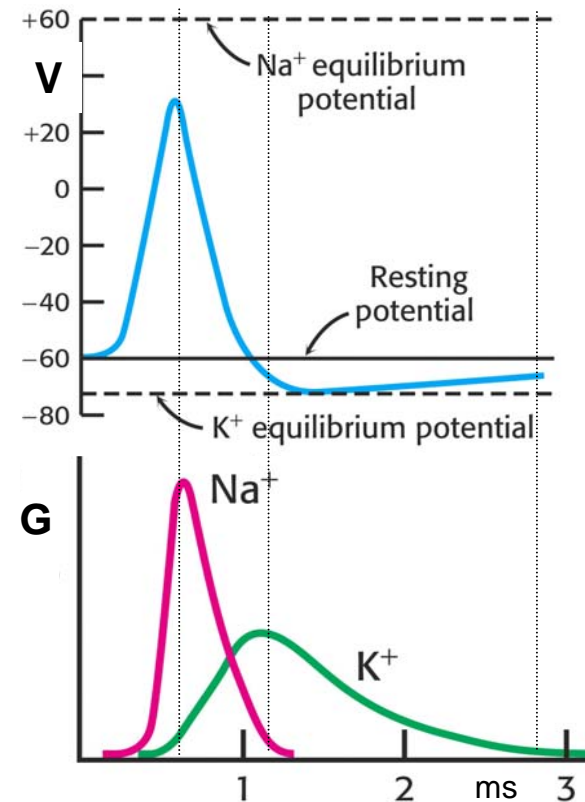
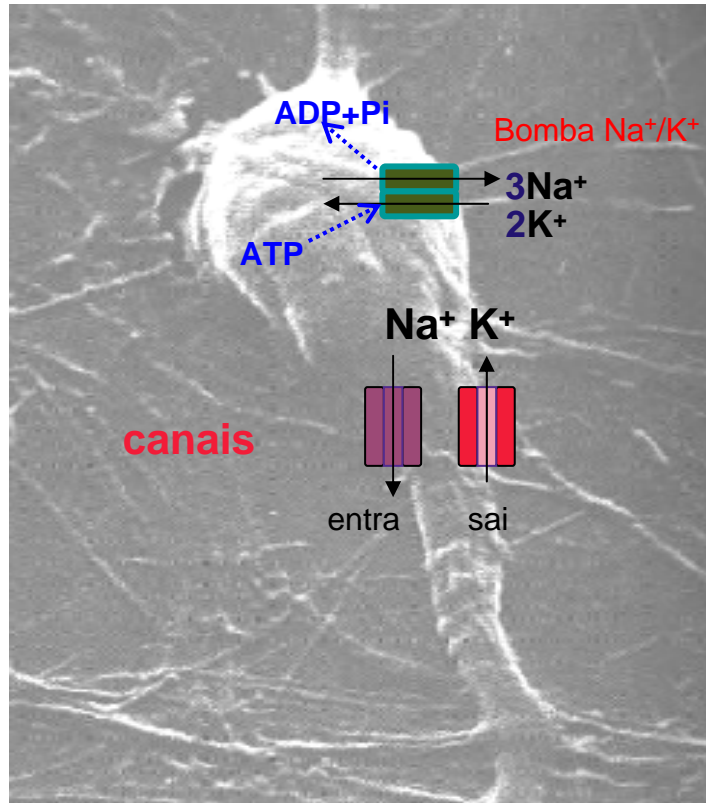
Estrutura do canal K^+ sensível à voltagem



Base energética para a selectividade iónica



A transmissão do impulso nervoso depende da existência de gradientes iónicos (mantidos por transporte activo: bomba Na^+/K^+) e de canais iónicos sensíveis à voltagem: canais de Na^+ e canais de K^+



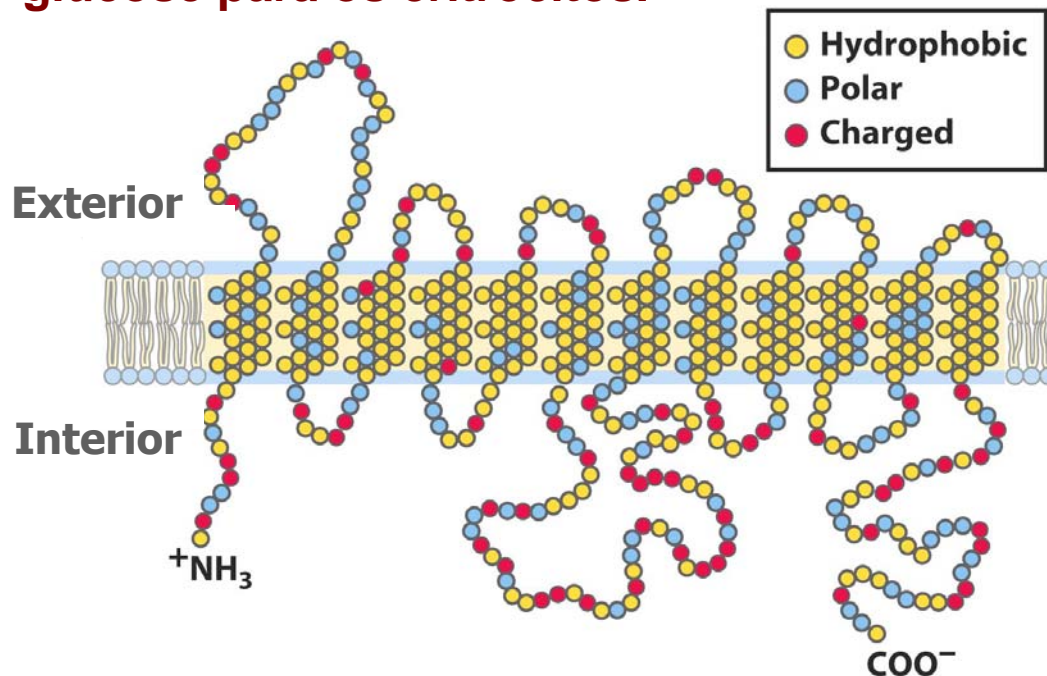
- A informação nas células nervosas é codificada por **sinais eléctricos - correntes** iónicas de Na^+ (que entra) e K^+ (que sai) e provocam alterações no **potencial** de membrana V
- O Na^+ e o K^+ atravessam a membrana através de **canais** iónicos específicos.
- A abertura e fecho destes canais é controlada por voltagem (ou por ligandos) e é responsável pelo aumento da **Condutância G** (Permeabilidade) da membrana a estes iões.

Transportadores ou permeases (transporte passivo)

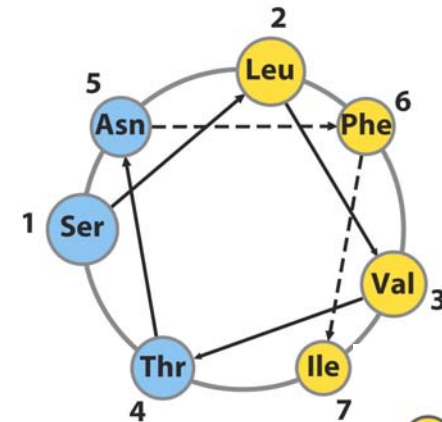
2: Transportadores ou permeases: são proteínas integrais que aumentam a permeabilidade da membrana para água (aquaporinas) ou solutos **específicos**. A proteína forma uma canal aquoso cuja selectividade se baseia no tamanho do soluto.

- aumento da velocidade do transporte a favor do gradiente
- apresentam saturação
- São específicos

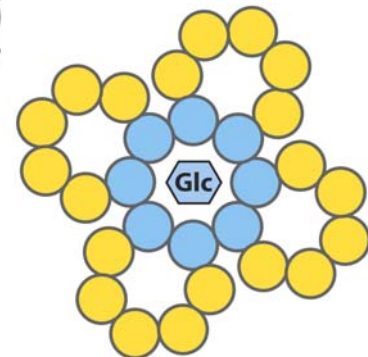
Ex: transportador GLUT1: transporte de glucose para os eritrócitos.



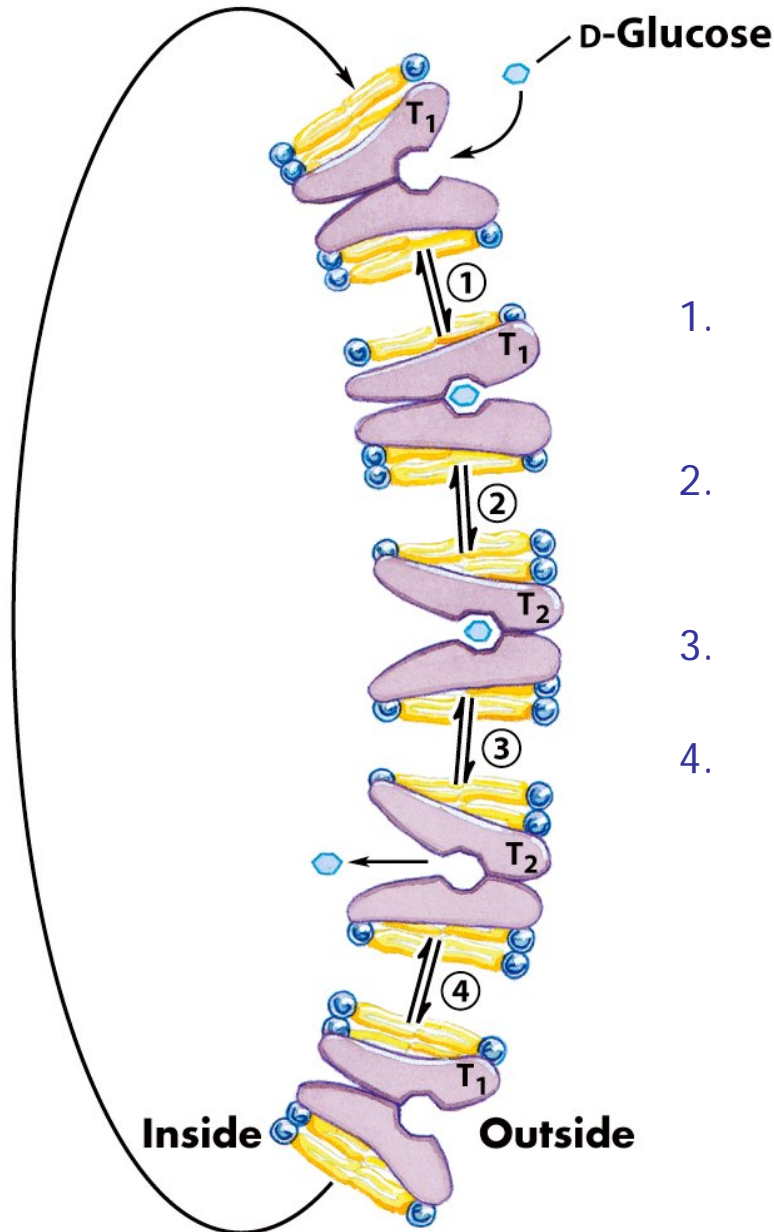
—Ser—Leu—Val—Thr—Asn—Phe—Ile—



(GLUT1 = 45 kDa)

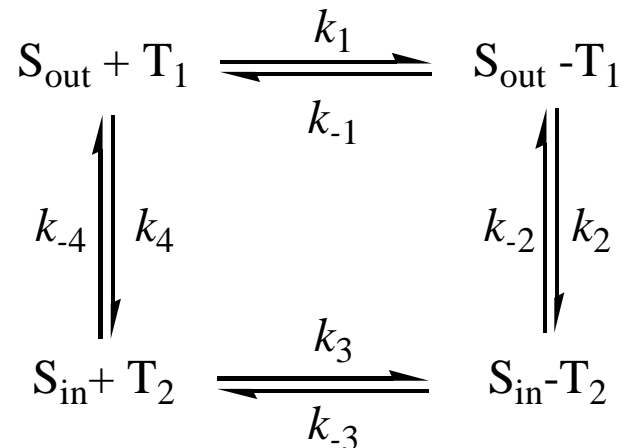


Transporte de glucose nos eritrócitos – GLUT1

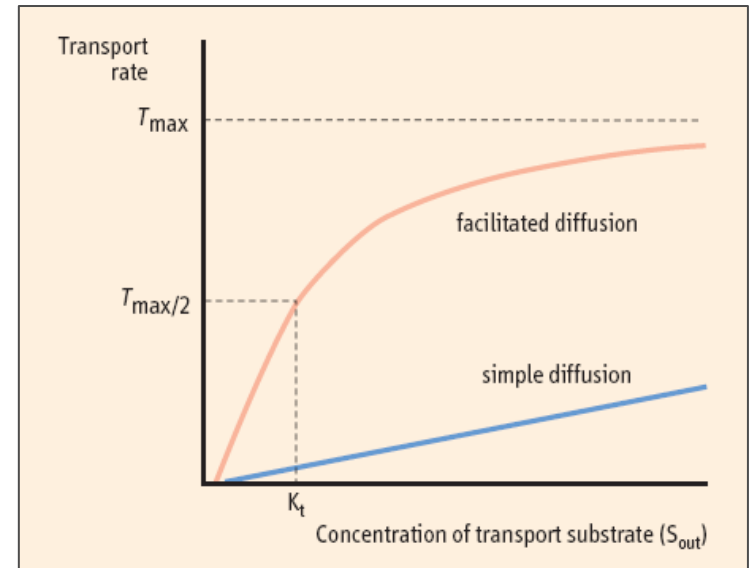
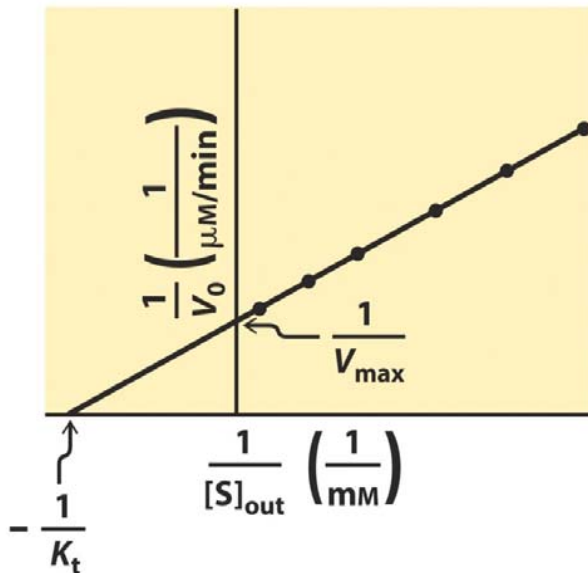
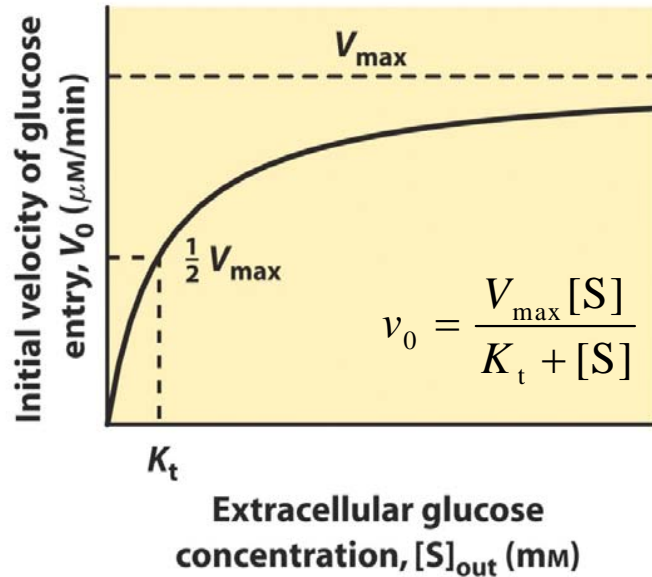


GLUT1 existe em duas conformações: T_1 , com o sítio de ligação da glucose exposto ao lado externo da membrana e T_2 , com o sítio de ligação acessível no lado interno.

1. ligação da glucose a um sítio estereoespecífico do GLUT1 na superfície externa da membrana (conformação T_1) \Rightarrow baixa da E_a
2. alterações conformacionais de $S_{out}-T_1 \rightarrow S_{in}-T_2 \Rightarrow$ bloqueio do 1º sítio de ligação e exposição do sítio de ligação em T_2
3. dissociação da glucose da forma T_2 e libertação no citoplasma
4. conversão do transportador à conformação T_1



Transporte de glucose nos eritrócitos – GLUT1

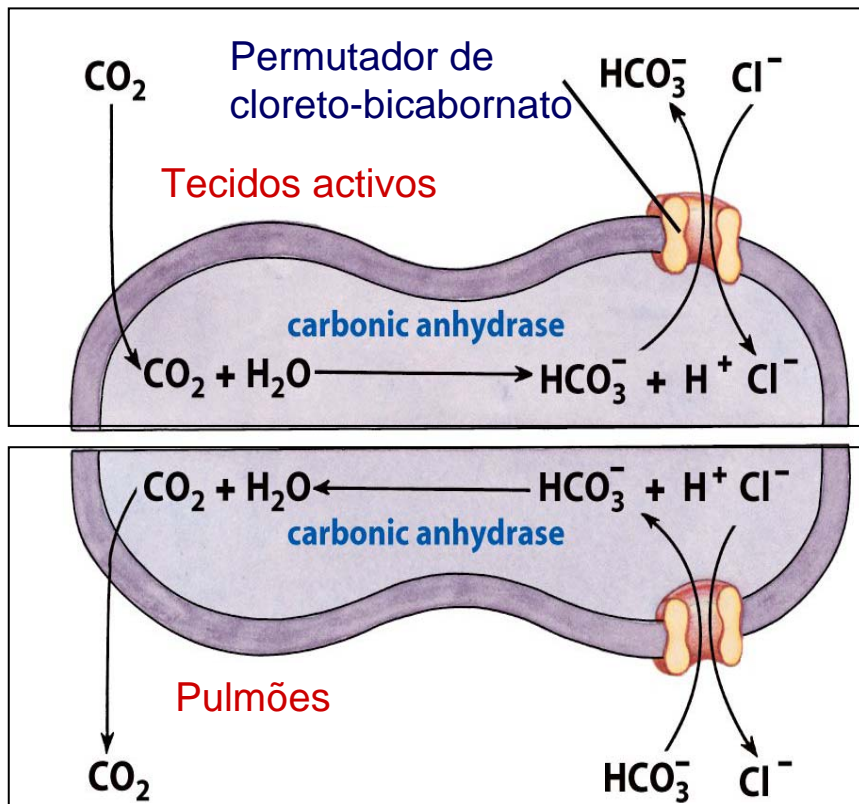


Na difusão simples a velocidade do transporte é sempre directamente proporcional à concentração do soluto

Na difusão facilitada (por permeases) a velocidade do transporte apresenta saturação porque o soluto tem que se ligar ao transportador para atravessar a membrana. Nos canais iónicos também não há saturação mas as velocidades de transporte são muito elevadas.

Difusão facilitada: transporte de cloreto-bicarbonato

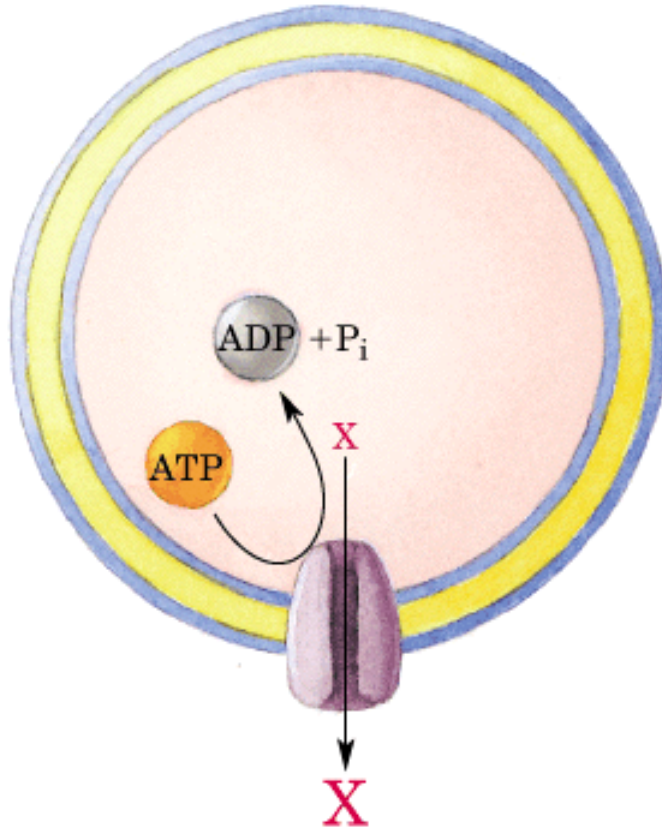
- Transporte de cloreto-bicarbonato nos eritrócitos por um **permutador aniônico** essencial no transporte de CO_2 para os pulmões, na forma de HCO_3^-
- O permutador aumenta a permeabilidade da membrana dos eritrócitos ao HCO_3^- e faz o transporte simultâneo de 2 aniões : por cada HCO_3^- translocado num sentido há um ião Cl^- que se move no sentido oposto \Rightarrow **cotransporte electroneutro de aniões do tipo antiporte**



1. nos tecidos, entrada do CO_2 produzido no catabolismo por difusão simples nos eritrócitos.
2. conversão do CO_2 a HCO_3^- nos eritrócitos pela acção da anidrase carbónica.
3. translocação do HCO_3^- para a corrente sanguínea onde vai até aos pulmões
4. nos pulmões o HCO_3^- volta a entrar nos eritrócitos onde é convertido a CO_2 , libertado nos pulmões e expelido

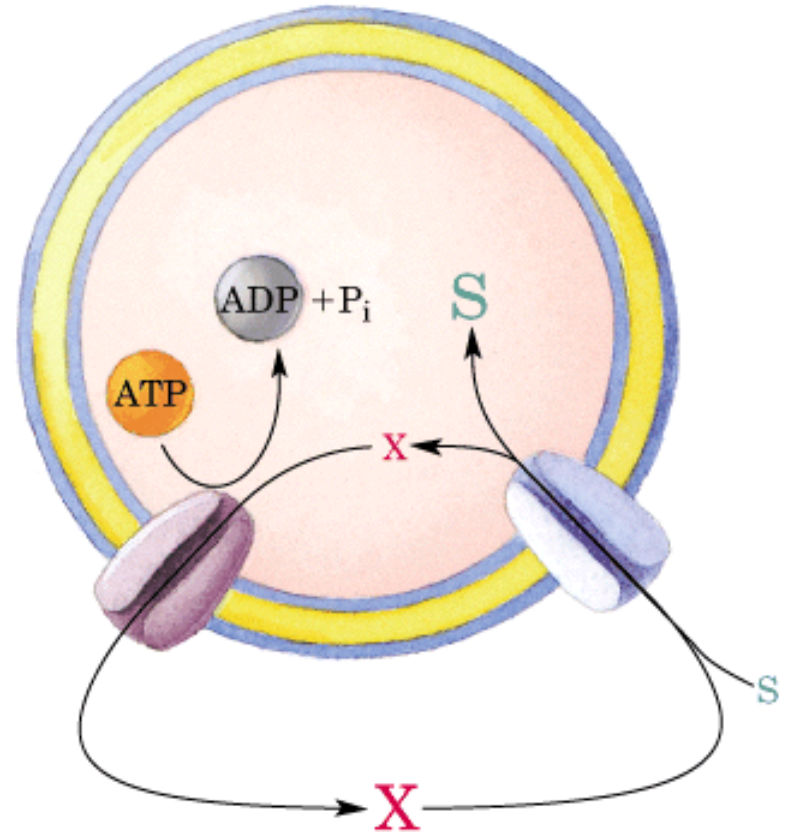
Transporte activo: Dá-se contra o gradiente electroquímico.
Por essa razão necessita de “input” de energia.

ATP ou luz



Transporte activo primário
X é transportado contra o seu gradiente usando energia da hidrólise de ATP.

gradiente de outro ião



Transporte activo secundário
S é transportado contra o seu gradiente usando a energia do gradiente de X, que é dissipado.

O transporte activo secundário depende sempre de um gradiente iónico que é formado e mantido por um transporte activo primário.

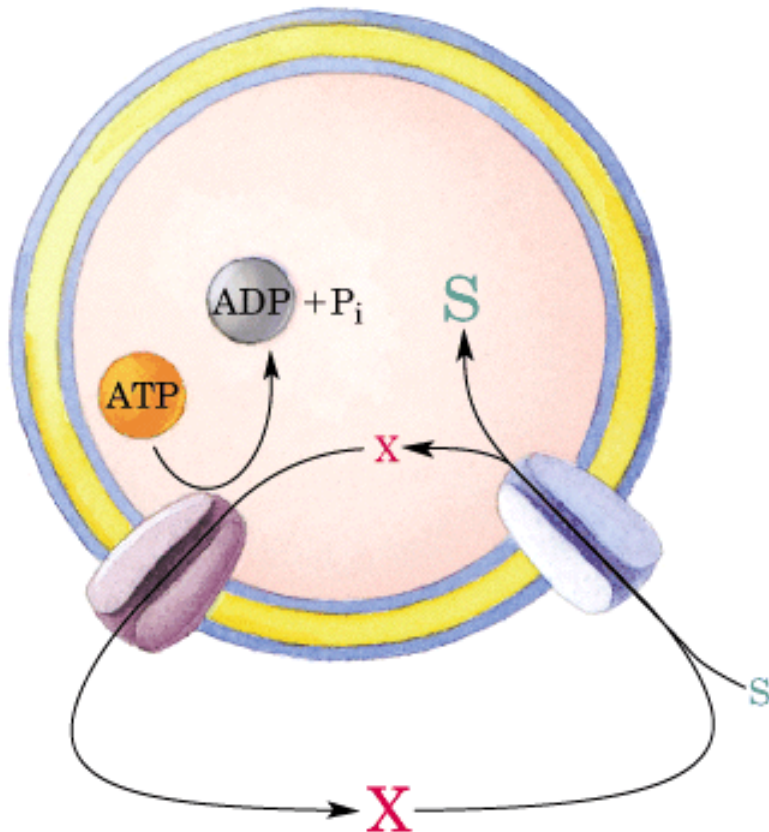
Transporte activo primário:

A bomba gasta ATP para exportar o composto X criando um gradiente.

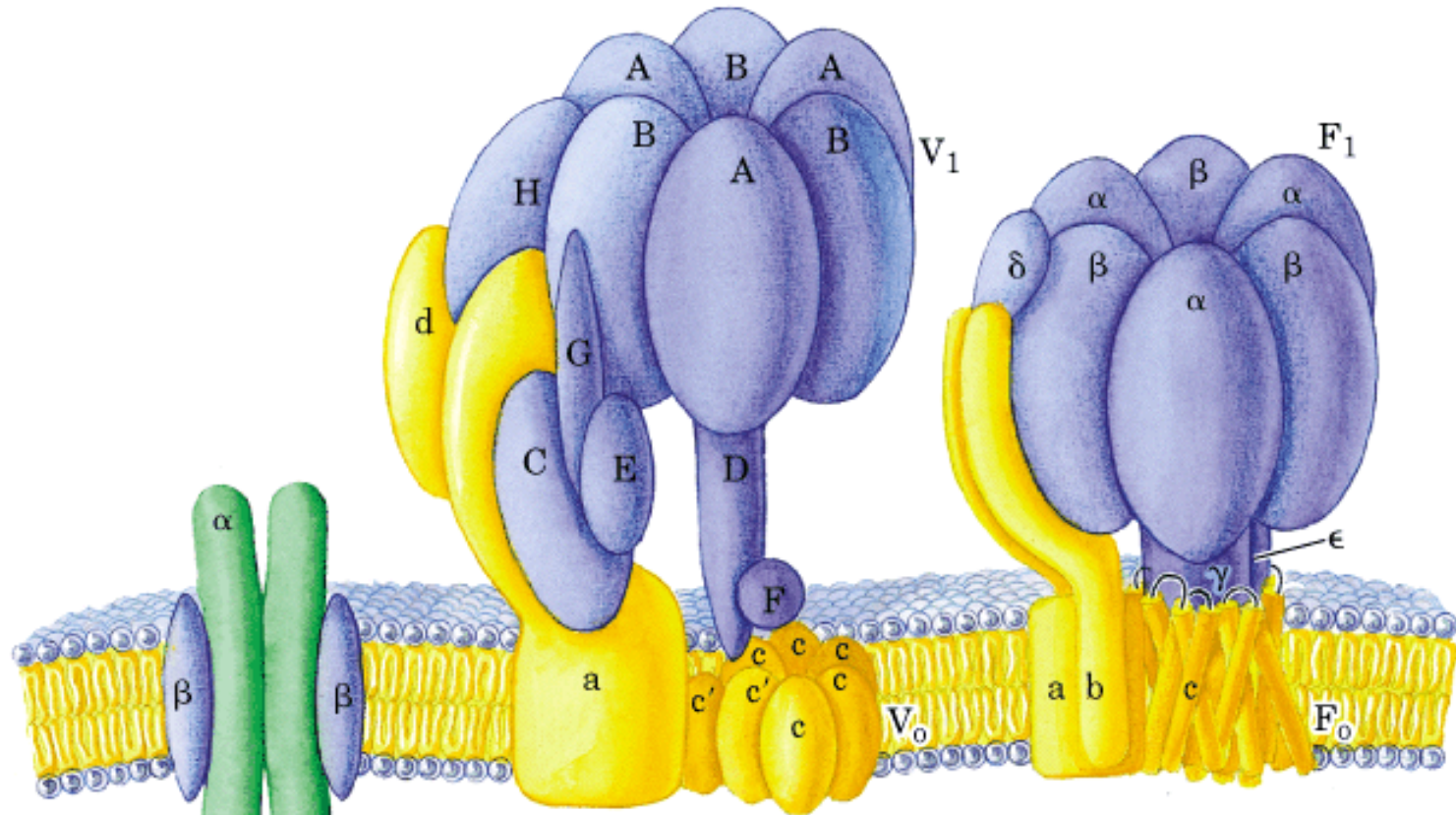
Transporte activo secundário:

O metabolito S é transportado contra o seu gradiente para dentro da célula, à custa da dissipação do gradiente do composto X (que entra na célula a favor do seu gradiente).

Se a bomba for inibida o gradiente de X não é mantido e acaba por se dissipar, nessa altura o transporte de S também pára.



Transporte activo primário (ATPases transportadoras de iões)



Tipo P

Bomba de Na⁺/K⁺

Mantém [Na⁺] baixa e [K⁺] elevada dentro da célula.

Bomba de Ca²⁺

Mantém [Ca²⁺] baixa no citoplasma.

Tipo V

Bomba de H⁺

Cria pH baixo no interior de compartimentos

Tipo F

ATPase

Cataliza o transporte de H⁺ contra o seu gradiente à custa da hidrólise de ATP. É reversível.

Existe na mitocôndria, no cloroplasto e na membrana plasmática de bactérias onde catalisa a reacção inversa.

ATPases do tipo P

As **ATPases P** pertencem a uma família de transportadores de cátions dependentes de ATP.

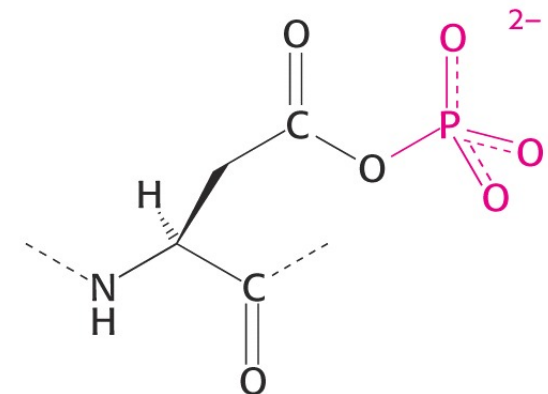
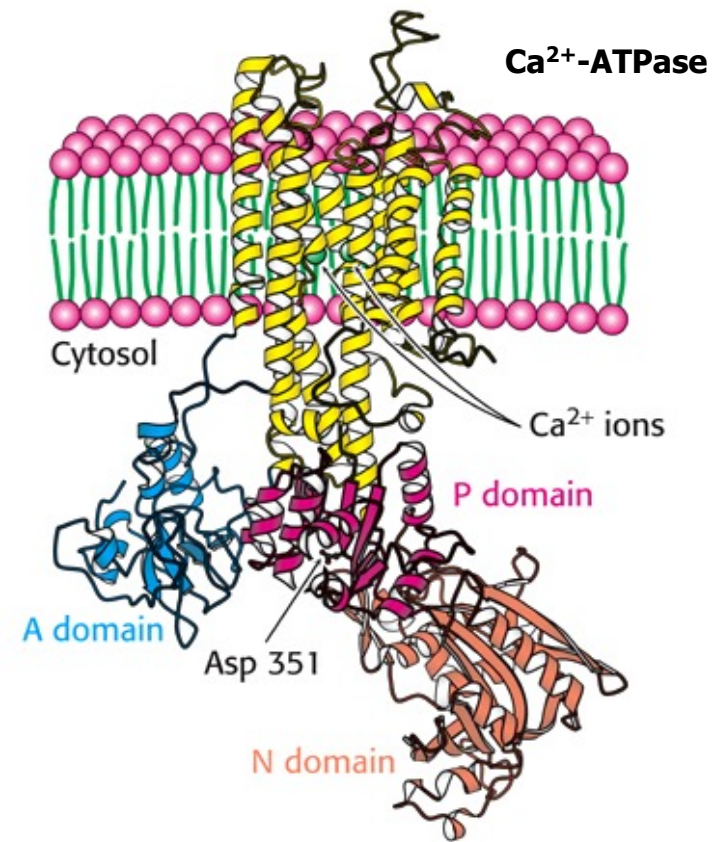
- o transporte envolve a fosforilação reversível do transportador pelo ATP (resíduo Asp conservado)
- a fosforilação implica uma alteração conformacional essencial ao movimento do soluto através da membrana.
- são proteínas integrais, com sequências primárias homólogas, cuja função é manter as concentrações iônicas no interior do citosol.

Exemplos:

Ca²⁺ATPase do retículo sarcoplasmático (células musculares)

H⁺-K⁺ATPase gástrica (mantém [H⁺] elevada no estômago)

Na⁺/K⁺ATPase (mantém gradientes de Na⁺ e K⁺ nas células)



β-Phosphorylaspartate

ATPase de Na^+/K^+

A **ATPase de Na^+/K^+** acopla a hidrólise de ATP ao transporte simultâneo de 3Na^+ e 2K^+ contra os seus gradientes electroquímicos.

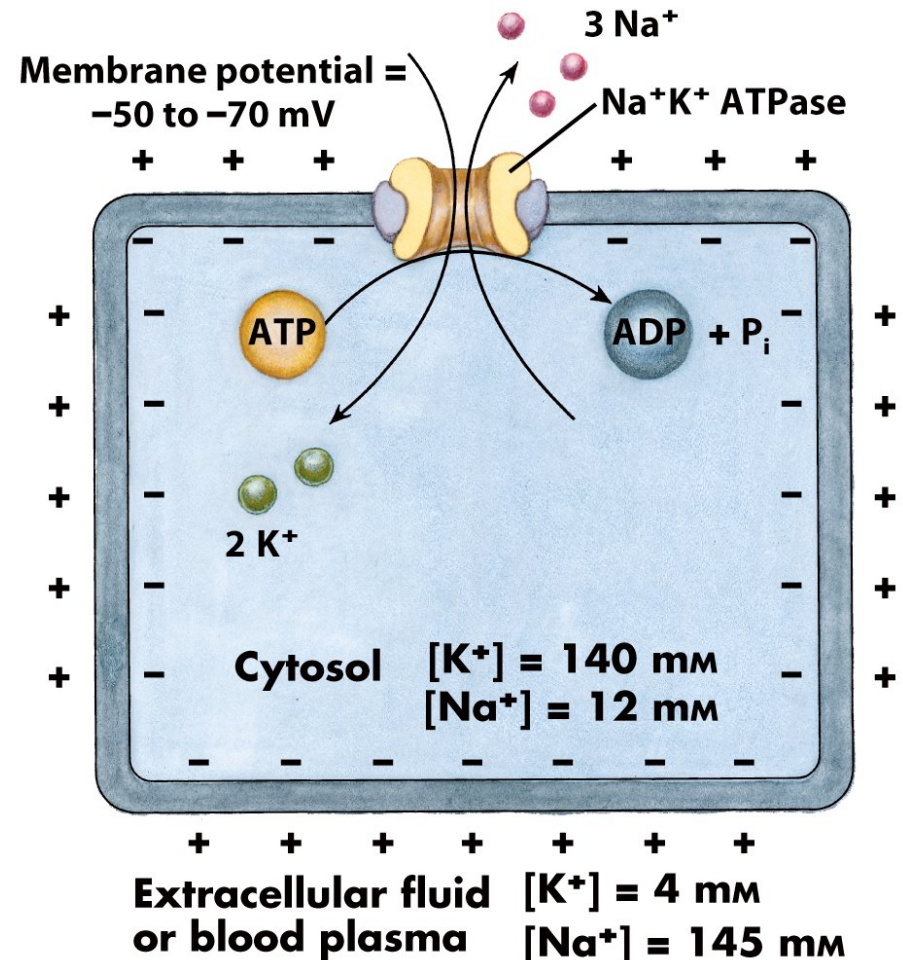
Classificação: Transporte activo primário antiporte electrogénico

É responsável pela manutenção das concentrações intracelulares de Na^+ e de K^+ , contribuindo para o potencial eléctrico de membrana.

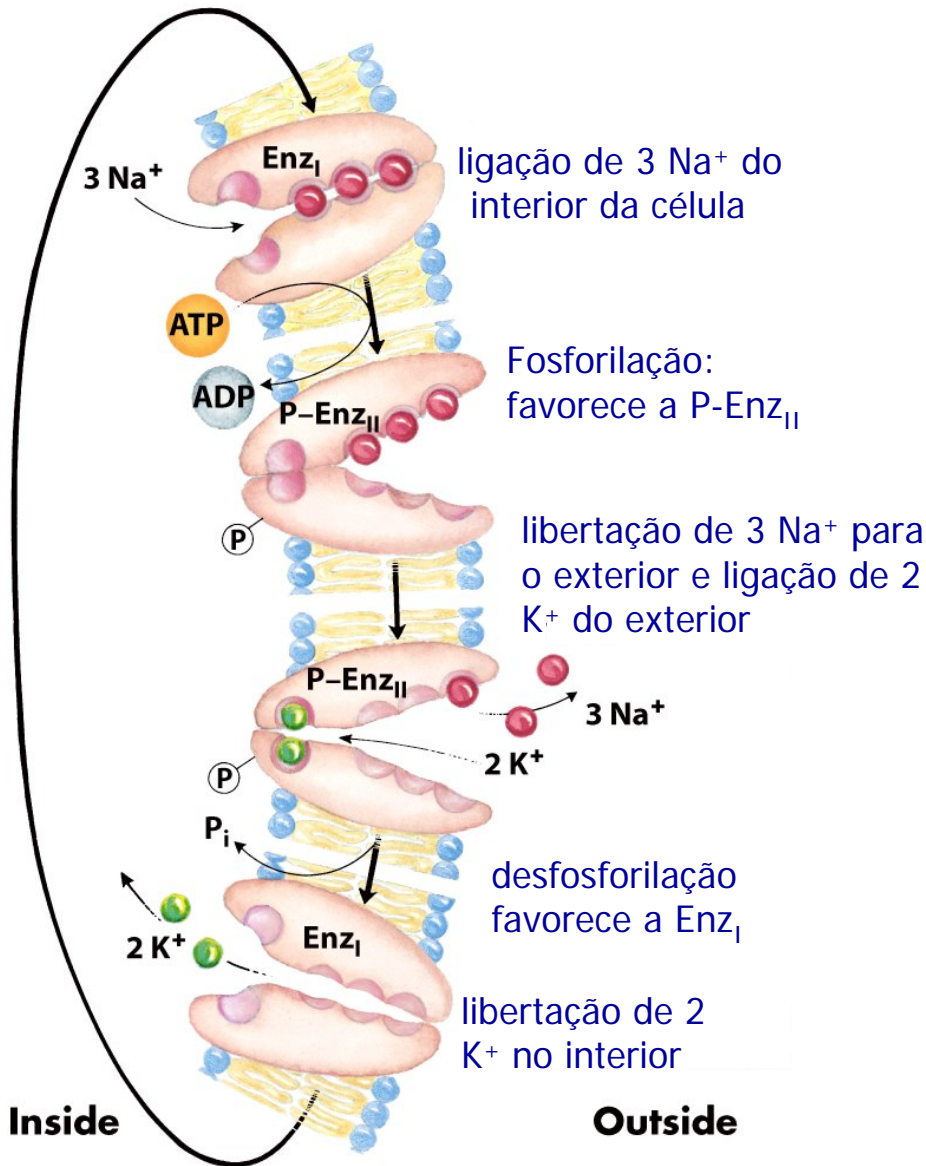


Transloca 3 iões Na^+ para o exterior por cada 2 iões K^+ que entram (acoplada à hidrólise de ATP em ADP e P_i)

Nos neurónios, a manutenção dos gradientes de Na^+ e K^+ é importante na transmissão do impulso nervoso. Além disso, o gradiente de Na^+ é usado como força motriz no cotransporte activo secundário de vários solutos.

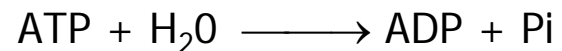
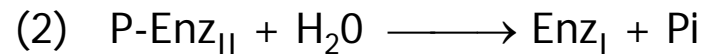
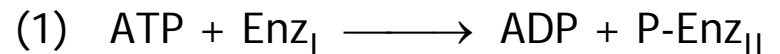


Mecanismo de transporte da ATPase de Na^+/K^+ (modelo)



- durante o ciclo de transporte a ATPase existe em 2 formas: fosforilada (P-Enz_{II}) com elevada afinidade para o K^+ e baixa afinidade para o Na^+ , e desfosforilada (Enz_I) com elevada afinidade para o Na^+ e baixa para o K^+

- a hidrólise de ATP ocorre em 2 passos reaccionais:



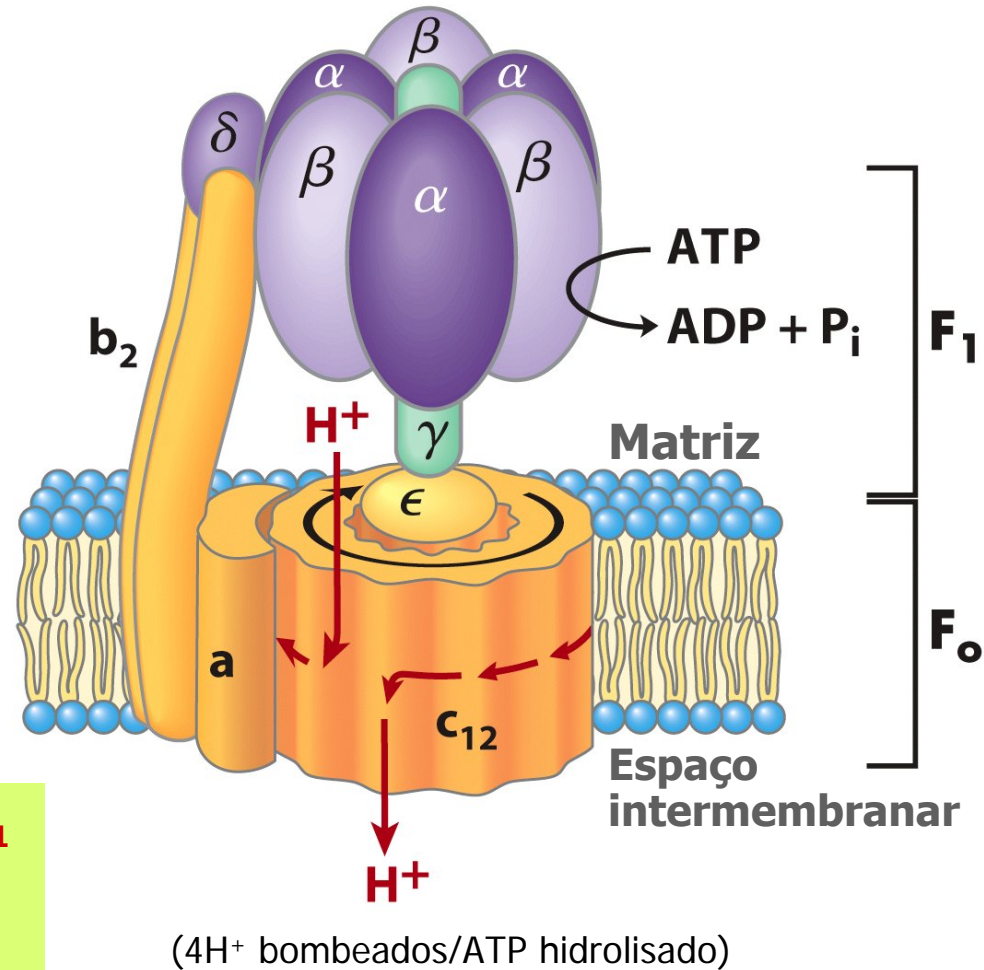
- devido ao facto de serem transportados 3 Na^+ para fora por cada 2 K^+ que entram, há uma separação de cargas em cada face da membrana – processo electrogénico \Rightarrow potencial transmembranar de -50 a -70 mV (negativo no interior relativamente ao exterior).

ATPase do tipo F: a ATPase F_0F_1

- Catalisa o transporte transmembranar de H^+ (contra o seu gradiente de concentração) acoplado à hidrólise de ATP**

- a proteína periférica F_1 é um motor molecular que usa a energia da hidrólise do ATP para mover H^+ contra o seu gradiente de concentração ($\alpha_3\beta_3\delta\gamma$)
- a proteína integral F_0 ($F_0 \equiv$ factor inibido pela oligomicina) forma um canal transmembranar para os H^+

- A reacção catalisada pela ATPase F_0F_1 é reversível \Rightarrow gradiente de protões pode fornecer energia necessária à síntese de ATP (ATP sintase) : mitocôndria e cloroplasto**



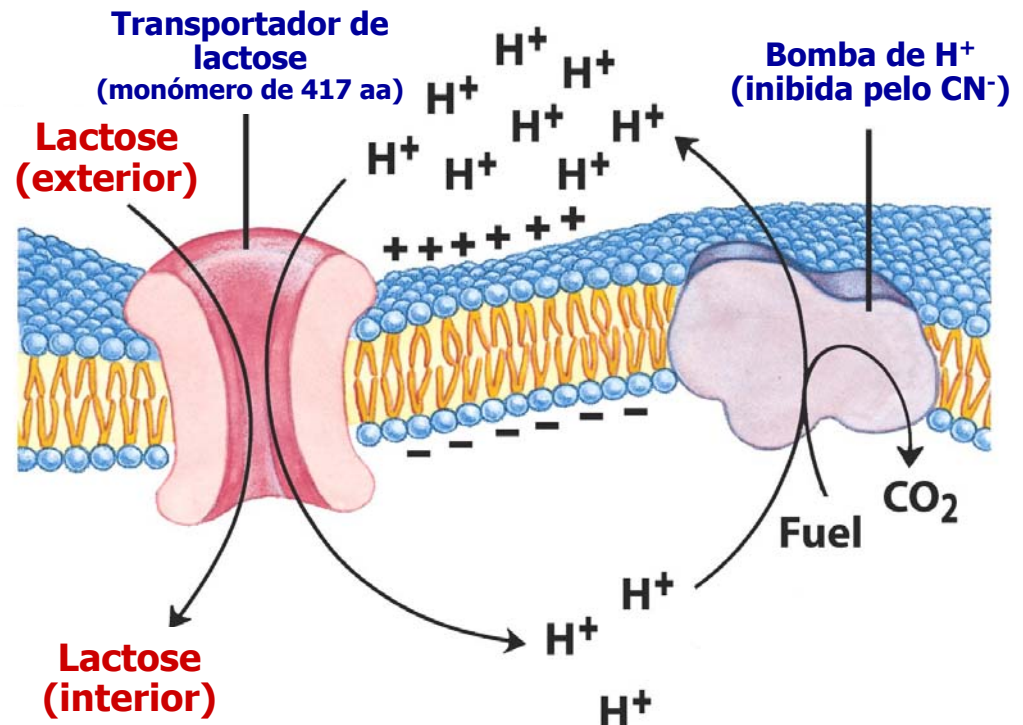
Transporte activo secundário: Transporte de lactose

- Os gradientes iónicos formados no transporte primário de Na^+ ou de H^+ são usados como força motriz no cotransporte de outros solutos (contra o seu gradiente de concentração).

Exemplo: transporte de lactose pela permease de lactose em *E. coli*

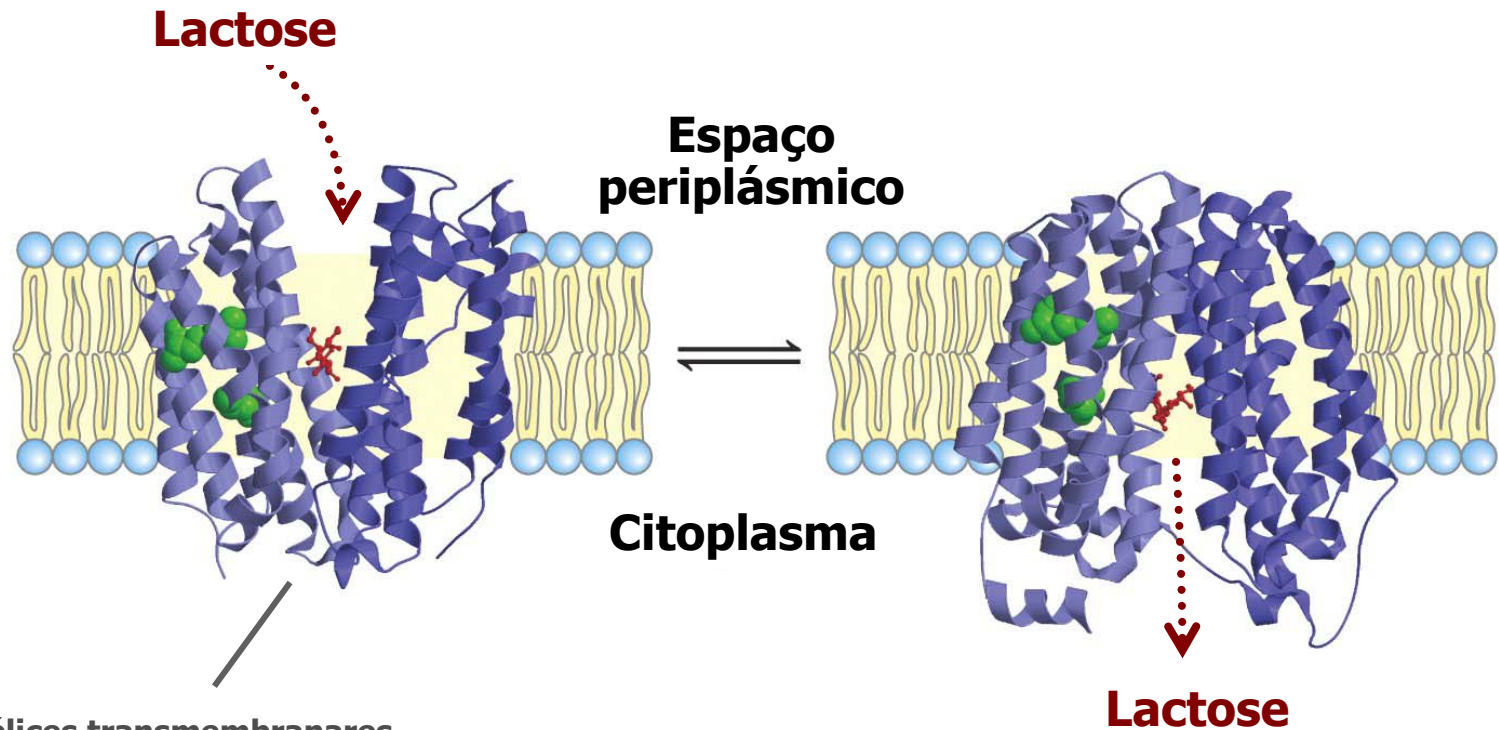
Classificação: transporte activo secundário, simporte, electrogénico

- o transporte primário de H^+ para o meio exterior produzido na cadeia respiratória estabelece um gradiente de H^+ e um potencial eléctrico (negativo no interior) através da membrana.
- o transporte activo secundário de lactose para o interior da célula envolve simporte de H^+ e de lactose pela permease.
- a acumulação endergónica da lactose (contra o seu gradiente de concentração) está acoplada ao fluxo exergónico de H^+ para o interior da célula ($\Delta G_t < 0$)



Transportador de lactose de *E. coli* (cont.)

- o transporte de lactose implica alterações conformacionais em que ocorre abertura para o substrato, primeiro do lado periplasmático e depois do lado citoplasmático, onde a lactose é libertada.
- a interconversão entre as 2 formas é mediada pelo grau de protonação do Glu³²⁵ e da Arg³⁰², que é afectado pelo gradiente protónico transmembranar.



12 hélices transmembranares
distribuídas por 2 domínios
simétricos.