

SISMA

Visualização Dinâmica

em

Catálise & Metabolismo

JOSÉ MAURÍCIO SCHNEEDORF FS

José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva



À minha família...

© 2022 Direitos reservados ao autor. Direito de reprodução do livro é de acordo com a lei de Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde que citada a fonte.

SISMA - Visualização Dinâmica em Catálise & Metabolismo

Disponível em: <http://bioquanti.net/>

Capa e editoração : do autor

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Centro – Alfenas – Minas Gerais –
Brasil – CEP: 37.130-001.

Reitor: Sandro Amadeu Cerveira.

Vice-reitor: Alessandro A. Costa Pereira.

Dados internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Schneedorf, José Maurício

SISMA - Visualização Dinâmica em Catálise & Metabolismo / José
Maurício Schneedorf Ferreira da Silva. 2022

97 p. : il. –

ISBN: 964-75-23473-43-4 (ebook)

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica. 2. Software. 3. Metabolismo. I. Título.

CDD 568



Conteúdo

1	Uso Rápido do Sisma	8
1	Montando uma reação	8
2	Executando a reação	10
3	Avaliando a reação	10
4	Gráfico de progresso da conversão de objetos	11
5	Reação $R \rightarrow P$ reversível	13
2	Outras funcionalidades.	14
1	Grab - captura do mapa	14
2	Figure - Inserção de imagem	14
3	Note - Inserção de texto	15
3	Configuração de objeto e caminho.	16
1	Objeto	16
2	Caminho	17
2.1	Equações	17
4	Cinética de Reações	21
1	Constante de Velocidade e Ordem de Reações	21
5	Cinética Enzimática	27
1	Equação de Michaelis-Menten	28
2	Curva de Michaelis-Menten e obtenção dos parâmetros cinéticos.	31
3	Tratamento de dados.	32
3.1	Pela determinação de substrato e velocidade instantâneos.	32
3.2	Pela equação integrada de Michaelis-Menten	35
4	Os parâmetros catalíticos K_m e V_m	37
6	Modulação da catálise enzimática	40
1	Cofatores	40
2	Vitaminas	43
3	Ajuste induzido	44
4	Enzimas multiméricas	45
5	Modificação covalente.	47

6	Enzima alostérica	48
6.1	Excesso de substrato	51
7	Cooperatividade	52
8	Substratos múltiplos	55
7	Inibição Enzimática	59
1	Diagnóstico de Inibição	62
2	Constantes de Inibição	63
3	Inibição por substrato	66
8	Introdução ao metabolismo: Fenilcetonúria	69
9	Metabolismo de carboidratos	73
1	Algumas condições patológicas	75
1.1	Intoxicação por arsênico	75
1.2	Doença de depósito de glicogênio	76
1.3	Diabetes mellitus	76
2	Controle secundário por Km	76
10	Metabolismo de lipídios	79
1	Efeito de uma disfunção do metabolismo de carboidratos sobre o metabolismo de lipídios	81
11	Metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos & Mapa Metabólico Dinâmico	82
1	Intervenções no Mapa Metabólico Dinâmico	84
1.1	Bloqueio na produção de ureia	84
1.2	Bicicleta de Krebs	84
1.3	Conversões simultâneas	85
12	Como funciona o SISMA	86
1	A lógica das conversões no SISMA	86
1.1	Exemplo numérico de uma simulação	87
1.2	Informações da simulação por Terminal	89
2	Editando o arquivo de mapa	90

Prefácio

Livros de Bioquímica são plenos em conteúdos sobre o metabolismo. Também apresentam reações enzimáticas entre substratos e produtos, rotas metabólicas, e redes metabólicas **mapa metabólico** variadss. Embora esses mapas conduzam a uma melhor organização e menor complexidade sobre essas interações, estão quase presentes como imagens estáticas e impressas, sem o fluxo natural entre as forças envolvidas.

Adicionalmente, há uma carência de ferramentas de simulação que tangencie a percepção visual da transformação de reagentes nos diagramas a partir de leis naturais, tanto em reações simples, como em cadeia, ou rede com múltiplos caminhos.

No intuito de preencher essa lacuna foi concebido o *SISMA*. Sisma - Sistema de Mapas Autocatalíticos. *SISMA* é um programa desenvolvido na UNIFAL-MG em parceria do Depto. de Bioquímica com o Depto da Ciências da Computação, para visualização e estudo de transformações de objetos pautadas na dinâmica de forças (quantidades) e fluxos (taxas de variação). O programa opera em sistemas operacionais que permitem Java (Microsoft, Linux, Apple), para tal dependendo somente da Máquina Virtual Java instalada no sistema. Para verificar se seu computador possui a JVM (*Java Virtual Machine*), entre num buscador da internet e procure pelo sítio do Java.

O Sisma pode ser utilizado sem qualquer instalação, bastando-se clicar no arquivo executável Java presente na pasta **caminho do computador/Sisma/dist, release XX.jar**, onde "XX" representa a versão do programa. <https://java.com>.

Como o Sisma permite a visualização dinâmica de mapas bidimensionais estáticos, pode ser empregado no estudo de conversões variadas, tais como as transformações enzimáticas que ocorrem durante o metabolismo,

tema principal em que se baseou o projeto. Dessa forma, o programa permite a introdução de objetos em seu teor relativo como *forças*, no caso, as biomoléculas, e a introdução de setas conectando os objetos criados, ou seja, os *fluxos* representados pelos caminhos metabólicos de conversão de substratos em produtos.

O programa foi elaborado em parceria com o Prof. Dr. Luiz Eduardo Silva (DCC/UNIFAL-MG) e três orientados de Iniciação Científica do DCC. Seu código encontra-se registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI sob o no. 088693.

Conteúdo

Os 11 capítulos desta obra estão arranjos de modo a permitir uma apreciação progressiva das possibilidades de uso do *SISMA* para diversas situações apresentadas no aprendizado de Bioquímica, especialmente para catálise enzimática e metabolismo celular.

Não obstante, não é pretensão do autor qualquer aprofundamento sobre os temas tratados, o que pode ser facilmente obtido em clássicas obras e livros-texto de Bioquímica, bem como pela internet. O *Capítulo 1* oferece uma visão simples e prática do programa, e que se estende pelos *Capítulos 2* e *3*. O *Capítulo 4* introduz a aplicação do programa para cinética reacional, enquanto o *Capítulo 5* a confina ao formalismo da catálise enzimática. Segue-se nesse âmbito o *Capítulo 6* (modulação) e *Capítulo 7* (inibição). Do *Capítulo 8* ao *10* é oferecida uma aplicação do *SISMA* ao metabolismo celular, envolvendo carboidratos, lipídios, aminoácidos, nucleotídeos, e uma visão integrada do *mapa metabólico*. O último capítulo (*11*) encerra o material descrevendo o funcionamento do *SISMA* e possibilidades avançadas de edição.

Uso Rápido do Sisma

1 Montando uma reação

Abra o programa. Para isso:

1. Descomprima o arquivo *zip* obtido por *download* do sítio <http://bioquanti.net/uploads/sismabook/>.
2. Vá à pasta "dist" e abra o arquivo Java executável denominado Sisma_Realese_1.1.
1

O Sisma foi desenhado para facilitar a inserção de objetos e vias metabólicas, simulando um lápis e uma folha de papel em branco. Com esse par, determinada reação pode ser criada desenhando-se no papel o reagente e o produto, digamos, *R* e *P*, seguindo-se uma seta unidirecional que os une e informa o sentido da reação (Figura 1.1).

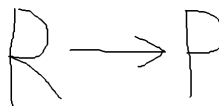


Figura 1.1: Esboço simples para uma reação química, apresentando reagente (R), produto (P) e o sentido da reação (seta).

O Sisma pode reproduzir essa figura, como qualquer editor de imagem ou de apresentação faria, de duas formas: clicando-se nos ícones do menu

¹Por linha de comando (Terminal Linux, por ex) também é possível abrir o arquivo digitando-se "java -jar Sisma_Realese_1.1.jar"

principal (passe o mouse embaixo de cada para conhecer sua ação), ou clicando-se diretamente no ecrã, a janela principal em branco (o "papel").

O segundo método é mais ágil e natural pois, como mencionado acima, busca simular o que o usuário faria com um lápis e um papel. Assim, para reproduzir a imagem da Figura 1.1: clique em qualquer ponto da janela principal com o botão direito do mouse e selecione "Object". Ao abrir a **janela de configuração de objeto, *Object Properties***, selecione no campo de identificação *Name* a letra "R" e clique em OK. Faça o mesmo para letra "P", e posicione os dois objetos criados próximos um do outro, como representado na Figura 1.1, clicando e arrastando cada objeto. Observe que existem 12 pequenos quadrados claros ao redor de cada objeto criado (**conector**).

Agora, para unir R a P como uma reação de conversão, clique com o botão direito do mouse em qualquer conector de R (início da reação), ou mesmo em qualquer lugar do ecrã, e selecione *Path*. Em seguida, deslize o mouse para um conector em P (*mouse over*), clicando em seguida com o botão esquerdo para consolidar a seta. Se não ocorrer nada, mexa um pouco o mouse para que se abra a **janela de configuração de caminho** do *Path*. O resultado deve ser parecido ao da Figura 1.2.

A edição de objetos e caminhos é bastante simples no programa. Basta clicar no objeto ou *Path* desejado para alteração ou remoção.

Caso o "path" (seta) se estabeleça em conector não desejado, basta clicar o botão direito do mouse e selecionar *Remove path*. Há uma dificuldade nas primeiras vezes, pois na concepção do Sisma privilegiou-se o uso simplificado do binômio caneta/papel para todo o processo de simulação, o que resulta por vezes na abertura de outras janelas de diálogo. Insista.

O posicionamento dos objetos do mapa pode ser ajustável com clique e arraste do mouse. Experimente mudar a posição de um objeto e observe como o caminho (seta, *Path*) acompanha essa nova posição.

Para alterar o título do mapa em elaboração (inicialmente como *New*), clique com o botão direito do mouse em qualquer ponto do ecrã e selecione *Rename*.



Figura 1.2: Reprodução da reação $R \rightarrow P$ da Figura 1.1 no Sisma.

2 Executando a reação

Uma vez elaborada a reação (Figura 1.2) pode-se agora visualizar a conversão de R em P, como indicado pela seta. Contudo, a transformação de um objeto em outro no Sisma é visualizada pela variação de sua luminosidade ou brilho. Assim, para que seja possível observar a conversão de R em P, faz-se necessário que R esteja num brilho maior que P, de tal forma que, durante a transformação, R vá cedendo sua luminosidade para P. Na prática, basta atribuir um valor tonal alto para R (nível 100, por ex) e outro baixo para P (nível 10, por ex).

Para alterar esses valores, clique com o botão esquerdo em R e verifique se está em **nível 100 (valor relativo máximo numa escala de luminosidade)** na janela de configuração de objeto. Repita a operação para P, atribuindo-lhe o valor de 10 com auxílio da barra de rolagem.

Para visualizar a conversão de R em P, basta clicar em no ícone de "Play" do menu de ícones. Observe que durante algum tempo, o brilho de R decai enquanto que o de P aumenta até atingir um valor máximo (nível 100). Essa é alma do Sisma: observar transformações de objetos conectados em um mapa pelas variações em seus brilhos.

3 Avaliando a reação

Uma vez criada e executada a reação, o Sisma permite seu estudo por duas ferramentas: visualização de um gráfico no tempo de execução do simulador, e exportação dos dados para planilha.

Para visualizar a conversão num **gráfico de progresso**, clique no ícone de gráfico após o início da execução (**Play**), ou mantenha esse gráfico na tela sobre as demais antes da execução. O resultado é apresentado na Figura 1.3 abaixo.

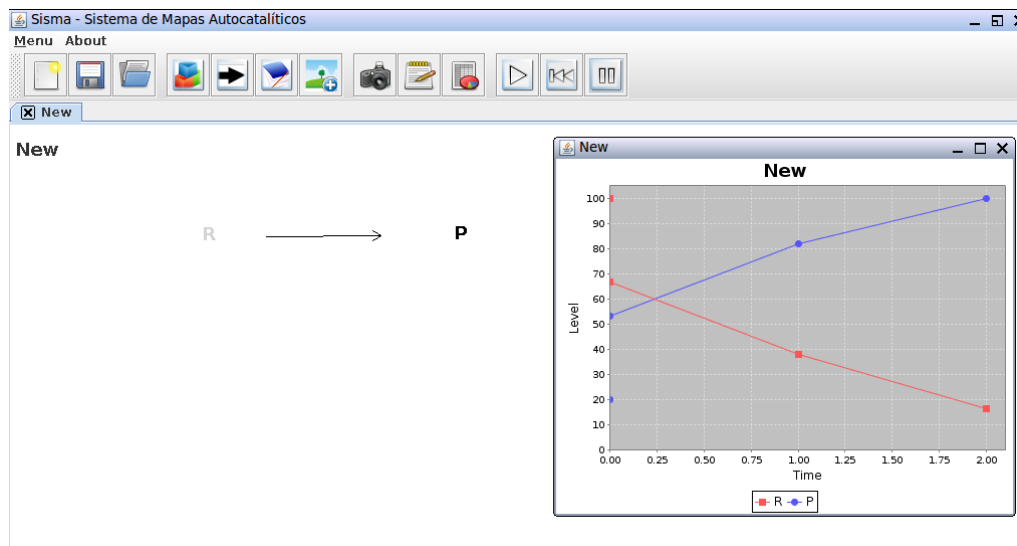


Figura 1.3: Tela do Sisma apresentando uma reação $R \rightarrow P$ e a representação gráfica da variação de luminosidade dos objetos ao longo do tempo.

Por outro lado, o Sisma permite a **exportação dos dados** do gráfico para planilhas convencionais. Para tanto, basta clicar no ícone representado por um caderno e fornecer nome e caminho para o arquivo exportado que aparece na forma de uma tabela (Figura 1.4). Deve-se ter em mente, contudo, que a exportação de dados leva em conta **todos** os dados gerados ao longo da sessão do programa. Dessa forma, esse recurso permite recuperar todas as simulações realizadas, embora sem distinção das mesmas. Para recuperar somente os dados da tabela atual, deve-se optar por selecionar os dados da tabela, seguido de Ctrl+C e Ctrl+V numa planilha já aberta.

4 Gráfico de progresso da conversão de objetos

O gráfico de tempo *versus* nível dos objetos é bastante configurável. Pode-se variar seu tamanho clicando e arrastando suas extremidades, bem como definir diversas opções de título, cores, eixos, impressão e salvamento, clicando-se com o botão direito sobre o plot (Figura 1.5). Deve-se ter em mente que o módulo gráfico trabalha de forma independente ao programa; na prática, a escolha de cores dos objetos na janela principal não é coincidente com as cores e legendas do gráfico de progresso da reação. Para essa

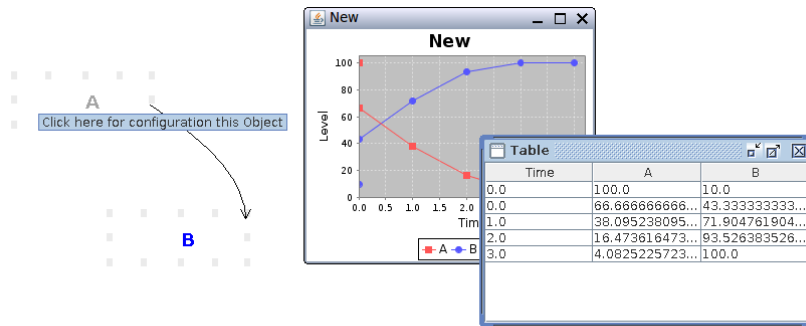


Figura 1.4: Janela do programa apresentando a tabela de valores de luminosidade dos objetos. Para copiar os valores basta clicar na primeira ou última linha da tabela e arrastar o mouse, seguindo-se de Ctrl+C.

situação é necessário alterar a cor dos objetos do ecrã em função de sua matiz no gráfico de progresso apresentado .

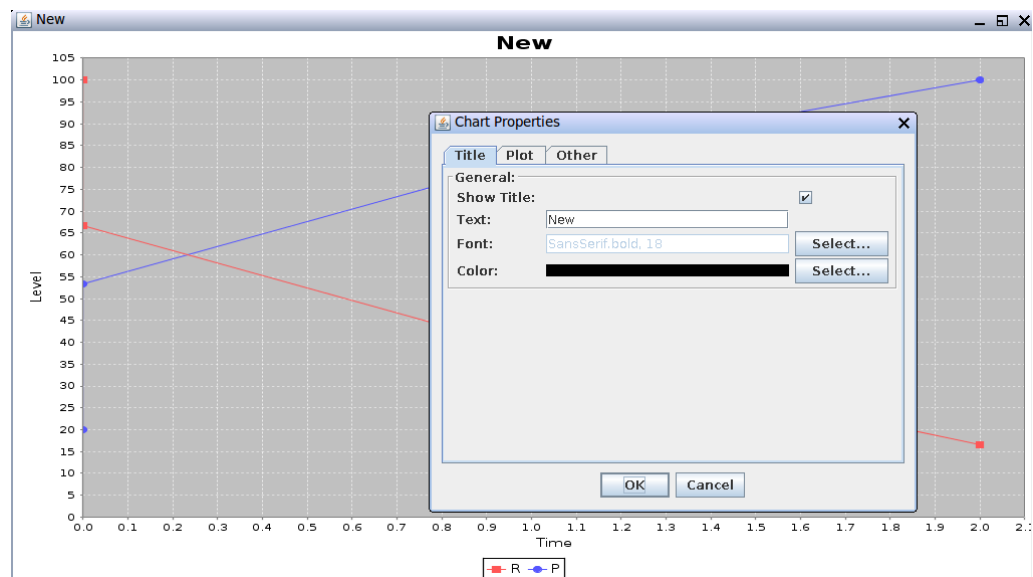


Figura 1.5: Configuração do gráfico gerado ao longo da simulação de $R \rightarrow P$. Permite customizar título, eixos, etiquetas, plano de fundo, cores, símbolos e linhas, além do salvamento em arquivo de imagem rasterizada (PNG, *Portable Network Graphics*).

5 Reação $R \rightarrow P$ reversível

O gráfico da reação $R \rightarrow P$ encerra-se quando esgotado o nível de R. Como seria esse gráfico no tempo se as mesmas taxas de produção de P puderem reverter a reação para R, ou seja, $(R \rightleftharpoons P)$?

Para isso, desenhe um "path" indo de P a R usando um par distinto de conectores, clique no ícone "Play" e visualize o gráfico resultante (Figura 1.6).

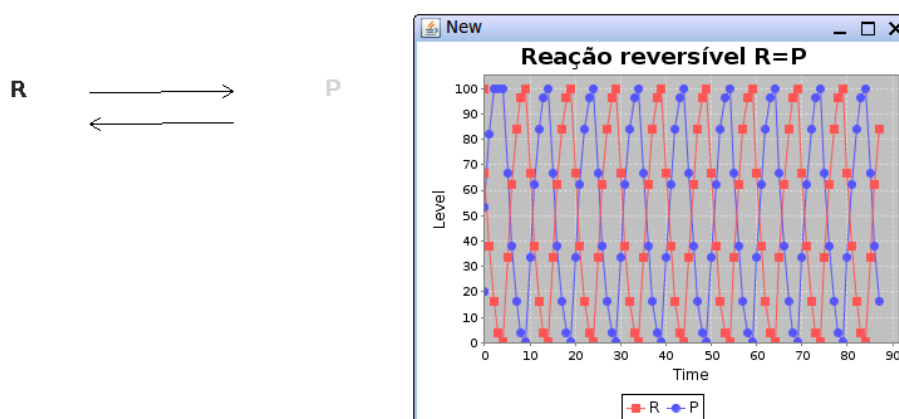


Figura 1.6: Reação direta e reversa entre R e P apresentando o gráfico resultante após um período

Você deverá notar que a reação torna-se infinita, pois R converte-se a P e vice-versa, em taxas iguais, gerando um gráfico simétrico das conversões. Para interrompê-la basta clicar no ícone **Pause** ou reiniciar a reação no ícone "Rewind". O ícone **Rewind** trabalha como sugerido: interrompe a reação e volta ao seu início. Uma observação importante: o início é considerado a partir da construção inicial do mapa ou de sua última imagem armazenada em arquivo (**atributo *.sis**). Assim, "Rewind" reverte ao mapa inicial ou ao seu último salvamento. Na prática, se o usuário executar um mapa que não foi salvo e desejar repetir a simulação, os dados para essa não estarão disponíveis, pois não foram salvos como arquivo pelo Sisma. Por isso, **salve sempre !**

Outras funcionalidades.

O programa permite uma gama variada de funções, embora sem excessos desnecessários, como creem seus autores. Dessa forma, o Sisma permite, além da execução, pausa e retorno de operações do mapa, a visualização de um gráfico de progresso do mapa e da exportação de seus dados, a exportação de uma imagem instantânea do mapa (ícone **Grab**), a importação de uma figura rasterizada (jpg, png, bmp) no ícone **Figure**, e a inserção de texto com janela de dimensão ajustável no ícone **Note**. A seguir uma breve explicação de cada.

1 Grab - captura do mapa

Para a imagem "congelada" do mapa, basta clicar no ícone *Grab* antes, após, ou mesmo durante a execução do mesmo, e salvar a imagem no caminho desejado. A apreensão da imagem durante a execução do mapa (*snapshot* permite o congelamento de um estado intermediário do mesmo, o que pode ser de grande valia para seu estudo. Outra característica interessante é que a função *Grab* permite a exportação da imagem do mapa sem a visualização dos conectores, tornando-o mais limpo.

2 Figure - Inserção de imagem

A inserção de uma Figura promovida pelo ícone homônimo permite enriquecer o mapa com imagens correlatas ao seu desenho. Para tanto, o usuário deve clicar no ítem e selecionar a figura desejada. Deve-se observar que a figura inserida não é dimensionável no programa, o que deve ser testado previamente.

3 Note - Inserção de texto

Essa funcionalidade permite introduzir textos para melhor compreensão da estrutura do mapa construído. As notas podem ser posicionadas logo acima das setas ("paths"), ou em qualquer área do mapa. A dimensão do texto introduzido é ajustável clicando-se no canto inferior direito de sua janela. Isso permite reduzir a sobreposição do quadro de texto sobre objetos e caminhos do mapa. A Figura 2.1 exemplifica as três funcionalidades de inserção de texto (Note) e imagem (Figure), bem como da captura de tela do Sisma (Grab).

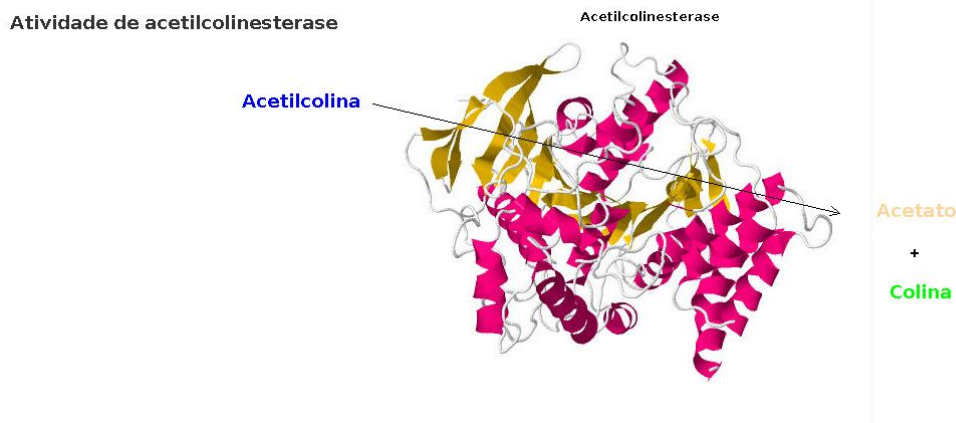


Figura 2.1: Exemplo de imagem (*Figure*), texto (*Note*) e captura de tela (*Grab*) do Sisma em uma única imagem.

Configuração de objeto e caminho.

Tanto os objetos quanto os caminhos podem ser customizados de duas formas:

1. Clicando-se com o botão direito do mouse sobre os mesmos e selecionando-se **Properties**;
2. Ou clicando-se com o botão esquerdo do mouse diretamente sobre o objeto ou ponta da seta de um caminho.

Da mesma forma, ambos, objetos e caminhos, podem ser apagados do mapa selecionando-se **Remove**.

1 Objeto

Os objetos num mapa podem ser configurados por nome, cor e nível (Figura 2.1). Para configuração de objeto, basta clicar o botão direito do mouse. Podem também ser ajustados quanto à sua presença ou não no gráfico de progresso (**caixa Plot**), bem como quanto sua presença ou não ao início da simulação (**caixa Init**).

Em relação à opção *Init*, deve-se ter em mente que a atual versão do programa simula o paralelismo utilizando filas. Não obstante, esse paralelismo não é perfeito, o que impede que vários objetos sejam iniciados com simultaneidade real. Dessa forma, num gráfico de progresso, ainda que se opte por mais de um objeto iniciando a simulação, o efeito visual (e por conseguinte, de exportação de dados) não exhibe um paralelismo completo, e sim uma ordenação. Nessa, o primeiro objeto introduzido no mapa tem prevalência temporal sobre os subsequentes.

2 Caminho

A customização de "path" também pode ser feita clicando-se com o botão direito do mouse seguido de "Properties", ou diretamente, clicando-se com o botão esquerdo sobre a ponta da seta.

O caminho pode ser desenhado de duas formas: linear e curvilinear. Para a primeira, vide o exemplo da Figura 1.2. Para um caminho curvilinear, muito utilizado em representações de mapas, fluxogramas, heredogramas, e organogramas, basta que o usuário clique numa área livre do mapa entre dois objetos, antes de um segundo clique que una os objetos (Figura 3.1)



Figura 3.1: Exemplo de um caminho curvilinear entre dois objetos

2.1 Equações

A configuração de caminho possui uma funcionalidade singular que permite estudos cinéticos sobre os fluxos no mapa. Trata-se da inserção de **equações introduzidas pelo usuário**, podendo igualar-se para todas as reações ou configurar-se individualmente (Figura 3.2).

É possível introduzir para um caminho no *Sisma* qualquer equação que envolva as seguintes operações:

1. Soma: $x + x$;
2. Subtração: $x - x$;
3. Multiplicação: $x * x$;
4. Divisão: x / x ;
5. Logaritmo (natural): $\ln(x)$;

6. Raiz quadrada: \sqrt{x} ;

7. Exponencial: x^x

Na janela principal de inserção de uma equação (Figura 3.2) pode-se editar a função, introduzir uma nova função e utilizar a barra de rolagem para acelerar ou reduzir a velocidade de cada transformação (**speed**). Essa aceleração ou desaceleração, contudo, é apenas visual, não interferindo na reação propriamente dita. Ou seja, visualiza-se a reação mais lentamente ou não, embora preservando-se a variação de brilho dos objetos.

Na janela secundária do editor de equações, e que se acessa clicando-se em **Edit function** para uma equação existente ou **New function** para uma nova, é possível alocar a equação que descreve a conversão entre objetos, bem como os parâmetros (**Parameters**) que a descreve (Figura 3.3).

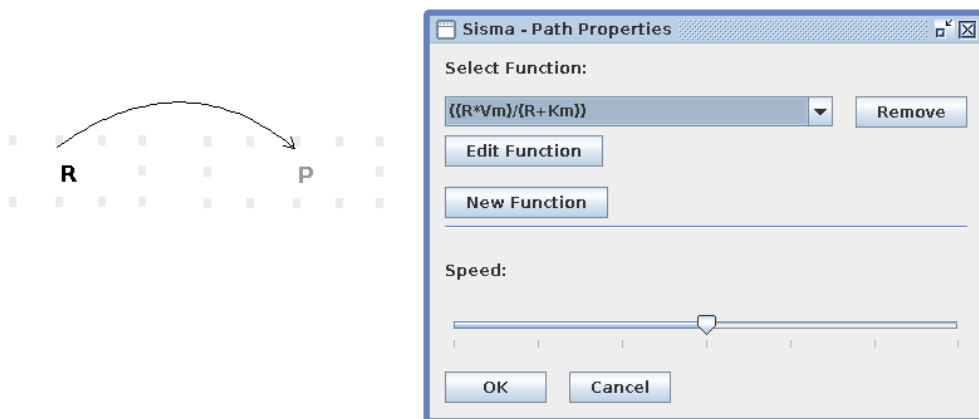


Figura 3.2: Janela principal de configuração de equações do *path*.

É possível a inserção de até 12 parâmetros numa equação, embora esse limite possa impactar na estabilidade das simulações dependendo da capacidade de *hardware*. Para a inserção de uma nova equação, deve-se estabelecer a relação entre os parâmetros e demais valores (R e P, por exemplo) sem o sinal de igualdade, bem como alocar valores para os parâmetros (Figura 3.3).

Como representado na Figura 3.3, é também possível manter um conjunto de informações sobre cada reação (**Hint**), tais como origem da equação ou suas variantes, parâmetros alternativos à equação, ou referência bibliográfica da reação.

Por padrão no Sisma, a função comum disponível quando se insere um novo caminho no mapa é a equação de cinética enzimática clássica de Michaelis-Menten ([1]:

$$v = \frac{V_m * S}{K_m + S} \quad (3.1)$$

Observe também pela Figura 3.3 que o valor da intensidade do brilho de cada objeto interligado por uma função é dada, embora sua edição só seja possível na janela de *Objeto*. De fato, se uma simulação for pausada seguindo-se a edição de seu caminho, os níveis de luminosidade apresentados serão os obtidos no momento da interrupção da simulação.

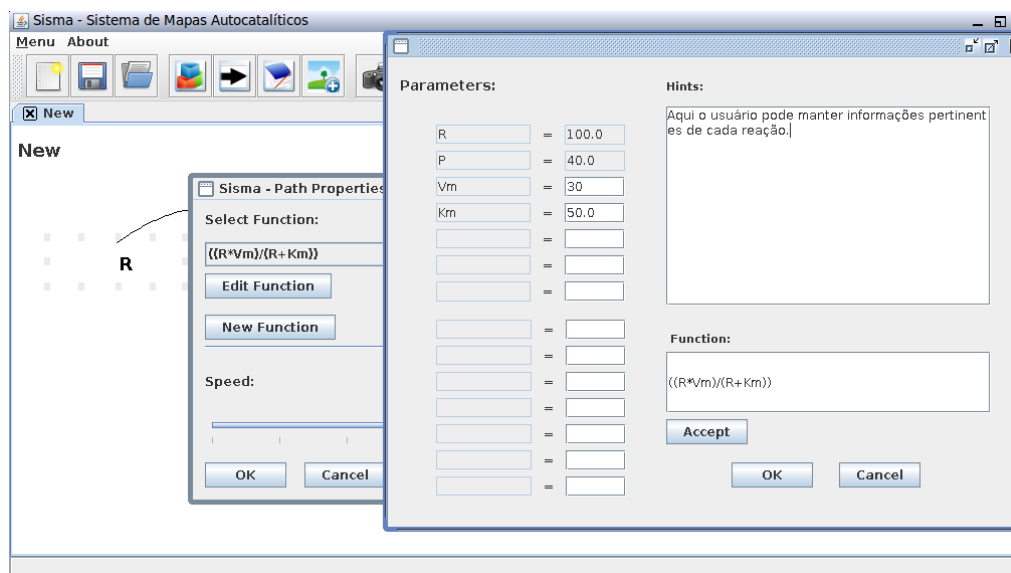


Figura 3.3: Janela secundária do editor de equações do *path*.

Como um exemplo final, encerramos essa introdução ao *Sisma* com um mapa representado por um hiperciclo formado por três ciclos interligados na Figura 3.4.

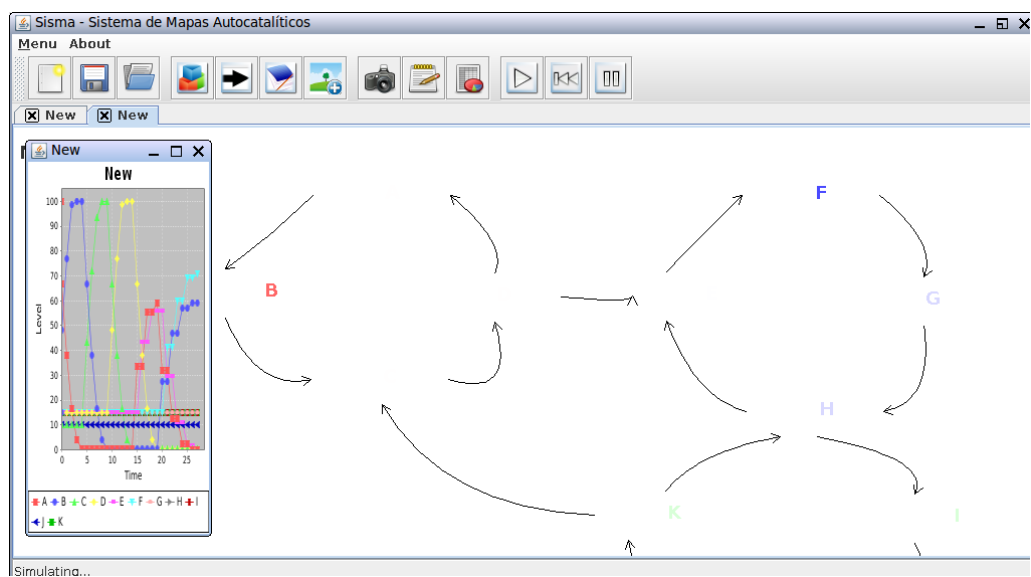


Figura 3.4: Simulação de um hiperciclo composto por três ciclos interligados e seu gráfico de progresso.

1 Constante de Velocidade e Ordem de Reações

O Sisma permite visualizar e avaliar a **ordem de uma reação** bem como sua **constante de velocidade**. Assim, para uma **reação de primeira ordem**, a função inserida (*Write a new function*) deverá obedecer a equação 4.1 abaixo, descrita pela **lei das velocidades integradas**, e na qual a velocidade é diretamente proporcional à concentração do reagente:

$$v = -\frac{dR}{dt} = k * R \quad (4.1)$$

,onde k representa a constante de velocidade da reação.
Para tanto, elabore o que está representado na Figura 4.1.

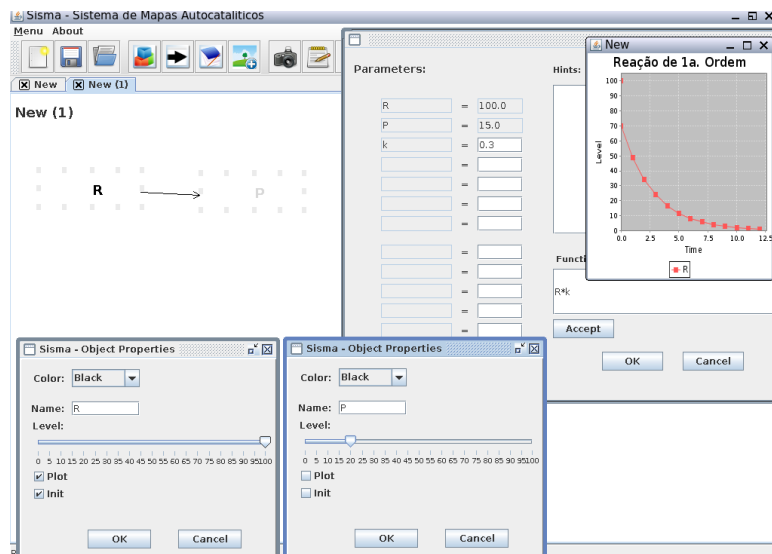


Figura 4.1: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de 1a. ordem. Observe os níveis e caixas selecionadas, bem como a curva resultante.

Uma reação de primeira ordem exhibe linearidade num gráfico de tempo *versus* $\ln R$, com valor da inclinação dada pela constante de velocidade. Para testar isso, exporte os dados (ícone **Export**) sem salvar, copiando-os da tabela gerada e colando-os numa planilha. Nomeie as colunas (tempo, R, P) e atribua $\ln(R)$ à próxima coluna. Plote o gráfico de tempo *versus* " $\ln R$ " resultante, observe sua linearidade e calcule a inclinação.

A inclinação do gráfico resultante pode ser calculada dividindo-se uma faixa em " $\ln R$ " pela correspondente em "tempo". O cálculo é mais preciso, contudo, se conduzido por **ajuste linear dos dados**, tal como representado na Figura 4.2, com auxílio da **planilha de distribuição livre Gnumeric**.

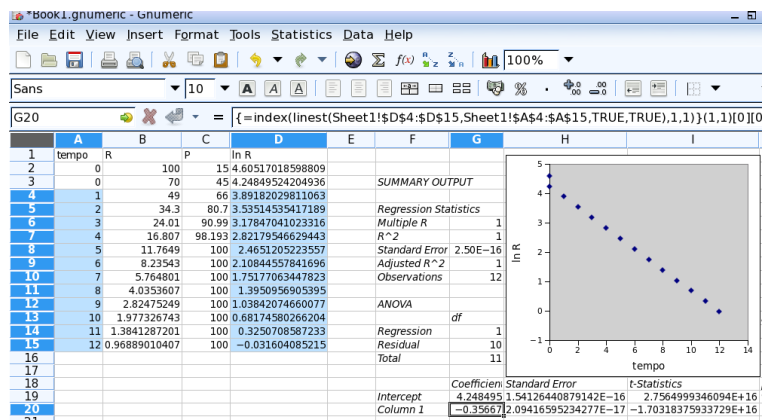


Figura 4.2: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de 1a. ordem (Equação 4.1). Veja que o valor da inclinação calculada aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade. Obs: o ajuste foi realizado descontando-se os dois primeiros valores, como representado pela seleção das colunas "tempo" e "ln R".

Da mesma forma, uma **reação de segunda ordem** pode ser simulada no Sisma, seguindo-se a equação 4.2, e na qual a velocidade da reação depende do quadrado da concentração do reagente:

$$v = -\frac{dR}{dt} = k * R^2 \quad (4.2)$$

Elabore uma nova reação (menu de ícones, "New") como representado na Figura 4.3, a qual também mostra o resultado da curva de progresso resultante. É necessário construir uma nova reação quando se altera a natureza da equação no *Sisma*, pois o programa retém a informação da função matemática anterior, o que pode levar a erros na simulação quando utilizada a mesma reação.

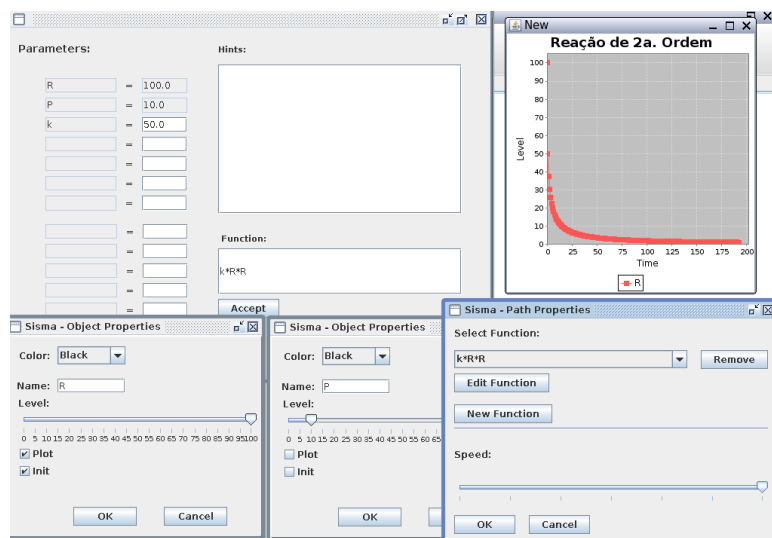


Figura 4.3: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de 2a. ordem. Observe os níveis e caixas seleccionadas, bem como a curva resultante. A reação pode ser acelerada como indicado pela barra de rolagem da janela de propriedades de caminho (*Path Properties*).

Uma reação de 2a. ordem também pode ser linearizada para obtenção de sua constante de velocidade. Nesse caso, o "tempo" é plotado contra o recíproco de "R", como representado na Figura 4.4 resultante.

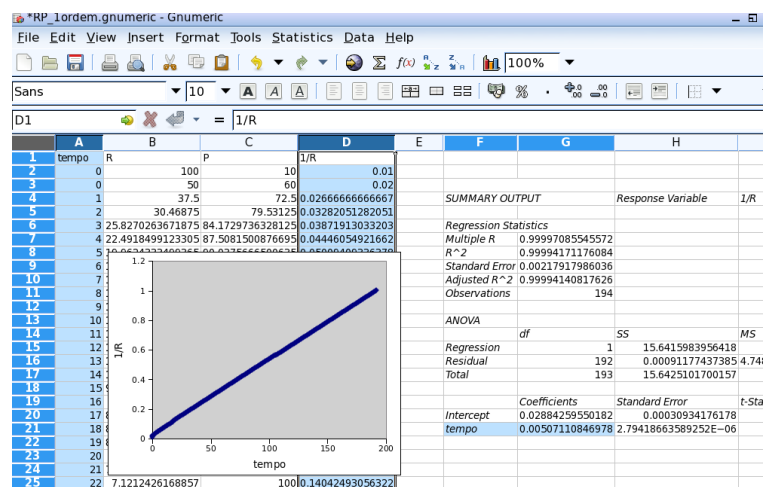


Figura 4.4: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de 2a. ordem (Equação 4.2). Note como o valor calculado pela inclinação aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade.

Seguindo-se o mesmo princípio, uma **reação de ordem zero**, onde a velocidade independe da concentração do reagente, pode ser avaliada como representado na Figura 4.5, e com valor calculado de k como consta na Figura 4.6.

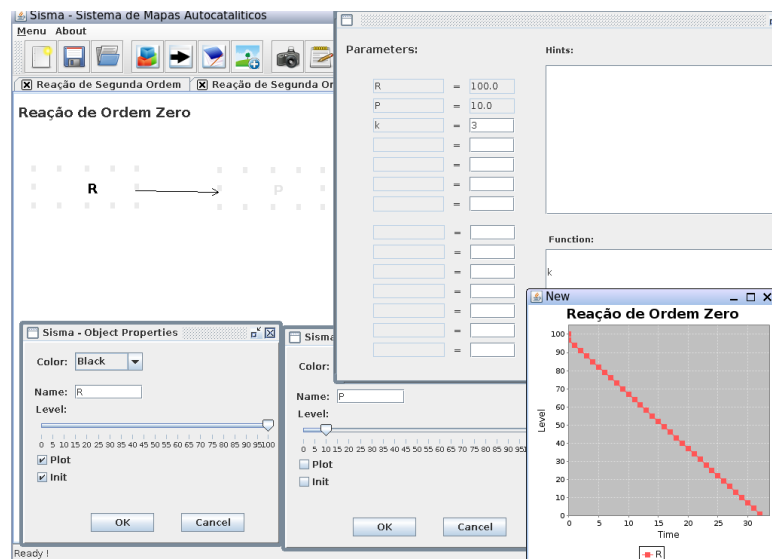


Figura 4.5: Janelas indicativas da configuração de objetos e caminhos para uma reação de ordem zero. Observe os níveis e caixas selecionadas, bem como linearidade resultante do decréscimo constante de R.

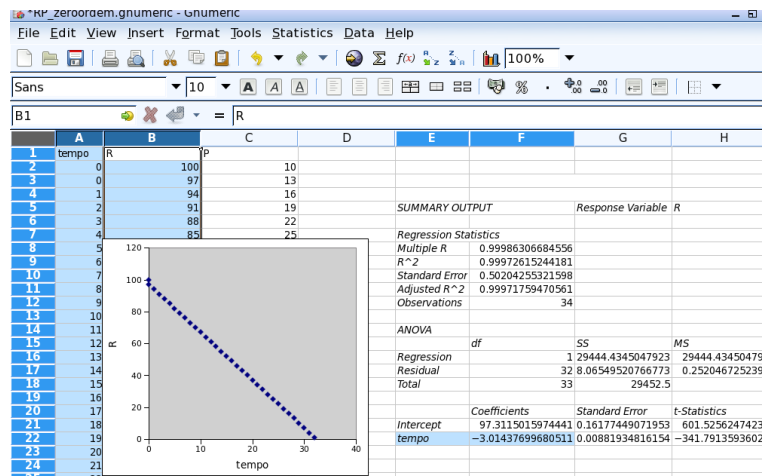


Figura 4.6: Resultado gráfico e de ajuste linear para uma reação de ordem zero. Note como o valor calculado pela inclinação aproxima-se do valor teórico proposto para a constante de velocidade.

Cinética Enzimática

O metabolismo é composto por uma diversidade ampla de enzimas que catalizam reações específicas e são da mesma forma moduladas em sua atividade. Num modelo generalizado, contudo, qualquer operação enzimática pode ser resumida como na Figura 5.1:

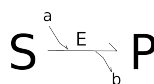


Figura 5.1: Esquema geral para a ação de uma enzima. S-substrato, P-produto, E-enzima, a-cofatores, efetores, coenzimas, b-efetores, coenzimas.

Dessa forma, é possível simular conversões enzimáticas no *Sisma* utilizando-se sequências autocatalíticas variadas, como as exemplificadas na Figura 5.2

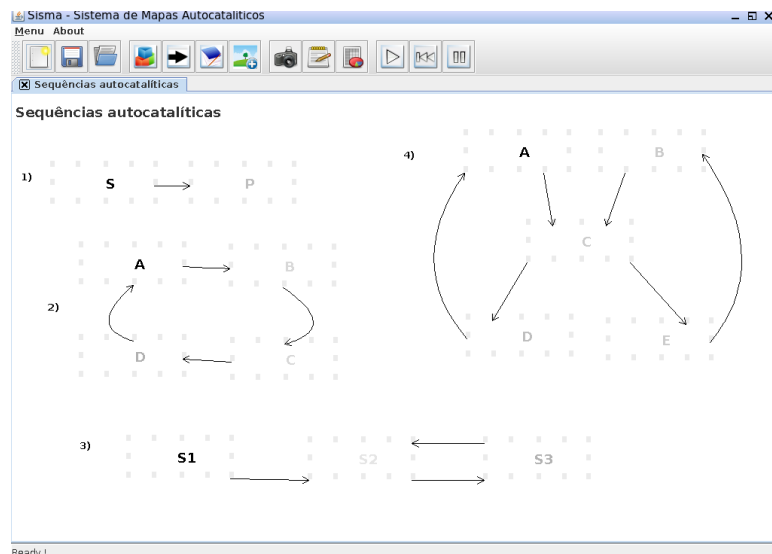
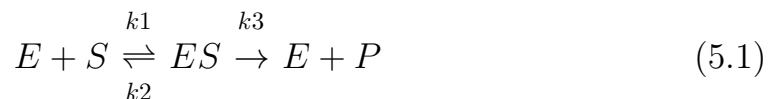


Figura 5.2: Alguns exemplos de sequências autocatalíticas entre substratos e produtos.

1 Equação de Michaelis-Menten

O comportamento cinético de uma reação na presença de uma enzima envolve etapas que a torna distinta de uma reação de primeira, segunda ou de ordem zero, embora seus componentes estejam presentes em função da concentração de um substrato ou de substratos múltiplos. Embora a enzima como catalizador não seja modificada, ela participa da reação como segue, e na qual cada taxa de reação pode ser representada por uma constante de velocidade de 1a. ordem:



O formalismo para dedução da cinética de reações enzimáticas leva em conta certas premissas, como o baixo consumo de "S" e a constância do complexo "ES" (**estado quase estacionário**). A aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane ([2]). prevê que a taxa de formação do

complexo ES seja igual à sua desconstrução, o que faz com que ES permaneça constante ao longo da reação.

É possível simular essa condição no Sisma até um determinado limite, como pode ser ilustrado pela Figura 5.3. A simulação foi executada em *speed* máximo para as três reações, e com valores das constantes de velocidade de: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$ e $k_3=0.05$. Os teores das espécies foi ajustado para: $S=100$, $ES=70$ e $P=0$, e todos clicados para inicialização simultânea (*Init*).

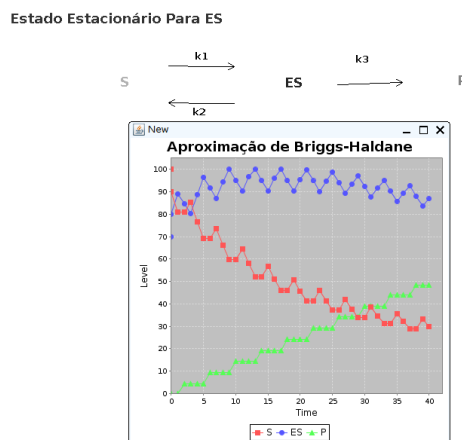


Figura 5.3: Simulação de aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane. Parâmetros: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$, $k_3=0.05$. Todos os objetos foram ajustados para inicialização simultânea.

Observe que o teor de ES mantém-se estável por determinado período, enquanto ocorre a formação de ES balanceada com sua decomposição (conversão de ES para P e reversão de ES para S). Essa situação não se mantém ao longo de toda a simulação pois, diferentemente do que ocorre experimentalmente, o desenho envolve um alto consumo de substrato ($k_1=0.1$) cuja taxa se equilibra com uma formação branda de produto ($k_3=0.05$) e a dissociação do complexo ES ($k_2=0.05$), para melhor visualização.

Numa situação real, a quantidade de ES inicia-se nula, diferente da proposta para o simulador. Isso ocorre porque a reação que forma ES é instantânea, o que no simulador inviabilizaria sua observação. Perceba que os valores somados de k_2 e k_3 propostos igualam-se ao de k_1 . Isso foi intencional, pois dessa forma obtém-se o estado estacionário por determinado período, uma vez que a taxa de formação de ES iguala-se à taxa de decom-

posição de ES. Exercite essa simulação atribuindo outros valores para as constantes de velocidade e perceba que as curvas mudam drasticamente.

Dentro dessa aproximação do estado estacionário para ES, os valores de k_3 e k_2 também serão menores do que k_1 . Isso decorre da barreira energética maior para uma reação química à formação do produto, do que a de ligações fracas diretoras da adsorção de substrato à enzima.

Mas por que o teor de ES não se mantém estável por mais tempo ? Observe que na Figura 5.3 não se faz menção à enzima na formação do complexo ES. Dessa forma, para aproximar a simulação do esquema da Equação 5.1, deve-se incluir a enzima livre, como na Figura 5.4):

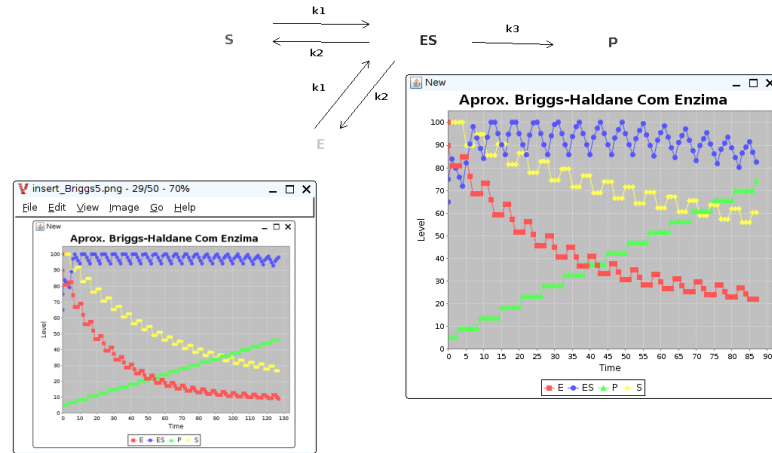


Figura 5.4: Simulação de aproximação do estado estacionário de Briggs-Haldane, com inclusão da enzima livre. Parâmetros: $k_1=0.1$, $k_2=0.05$, $k_3=0.05$. A imagem menor à esquerda representa o mesmo esquema, mas com valores de $k_2=k_3=0.02$. Todos os objetos foram ajustados para inicialização simultânea.

Observe agora pelo gráfico maior da Figura 5.4, que a permanência do teor de ES (estado estacionário) perdurou por duas vezes mais em relação ao esquema da Figura 5.3. E veja também que reduzindo-se o valor de k_2 e k_3 para 0.02 obtém-se maior estabilização ainda para ES (canto inferior da Figura 5.4). Em ambas as situações a enzima livre E sofre decaimento decorrente da diferença entre as constantes de velocidade k_1 e k_2 .

2 Curva de Michaelis-Menten e obtenção dos parâmetros cinéticos.

As constantes $k1$, $k2$ e $k3$ podem ser reunidas numa constante única para as taxas de reação, a **constante de Michaelis-Menten**, **Km**, de forma que:

$$Km = \frac{k1 + k3}{k2} \quad (5.2)$$

Dessa forma, a função que melhor define o comportamento padrão de uma enzima, e que é deduzida a partir da aproximação do estado estacionário para "ES", é a **equação de Michaelis-Menten** (Equação 5.3). Por tal razão, essa é a opção padrão (*default*) do *Sisma* quando se insere um novo caminho (*path*).

$$v = \frac{Vm * S}{Km + S} \quad (5.3)$$

A equação de Michaelis-Menten descreve uma cinética hiperbólica em função do teor de substrato. A depender das constantes cinéticas envolvidas, também pode descrever o mesmo comportamento, mas no domínio do tempo. Isso é representado na Figura 5.5, que também fornece os parâmetros para seu desenho, a **velocidade máxima (limite) da reação ou Vm**, e a **constante de Michaelis-Menten, Km**. Perceba que a opção de zerar o valor de "P" faz com que este não apareça na tela principal ao início da simulação.

Experimente reduzir o teor de S e verifique como a simulação é abreviada, simulando o efeito cinético devido a menor concentração de substrato disponível à enzima.

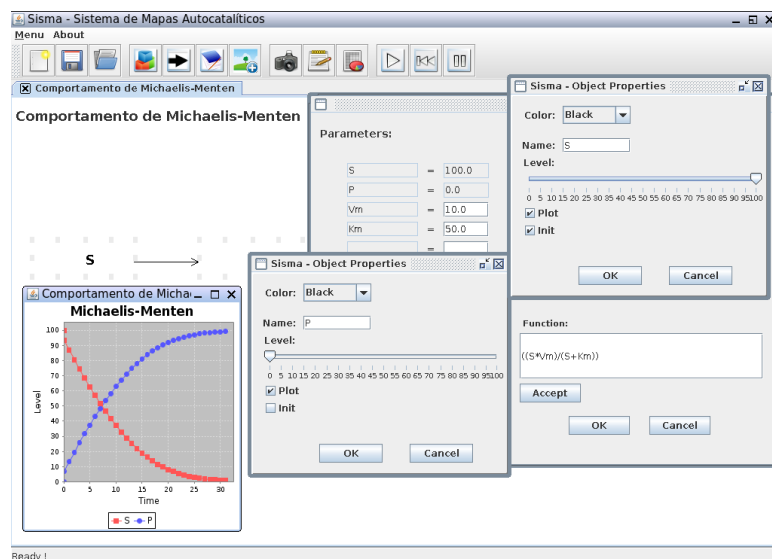


Figura 5.5: Exemplo de uma reação enzimática pela equação de Michaelis-Menten.

A equação supra possui uma forma direta de representação, o gráfico de "S" *versus* "v", **velocidade inicial** da reação, ou simplesmente gráfico de Michaelis-Menten. O método padrão para se obter uma curva de tal natureza é um tanto trabalhoso, pois faz-se necessário simular a formação de "P" no tempo em vários teores iniciais de "S" (concentrações de substrato). Obtidas essas curvas, provê-se o valor de "v" a partir da inclinação inicial de cada simulação e só aí plota-se os pontos de "S" inicial *versus* "v" obtido. A partir dessa representação, obtém-se os parâmetros de Michaelis-Menten, "Vm" e "Km", respectivamente, pela assíntota da curva no eixo das ordenadas, e pelo valor apresentado no eixo das abscissas correspondente à metade daquele valor.

3 Tratamento de dados.

3.1 Pela determinação de substrato e velocidade instantâneos.

Uma forma alternativa e simplificada para se obter a curva direta de Michaelis-Menten consiste basicamente em se calcular os valores instantâneos de substrato consumido e velocidade em cada intervalo de tempo. Para o *Sisma* essa técnica torna-se bastante útil, pois transforma os dados de *S* fornecidos pelo programa em cada tempo para *S instantâneo* e *v ins-*

tantâneo. Dessa forma, é possível analisar curvas convencionais de cinética enzimática, como o gráfico de Michaelis-Menten apresentado a seguir, bem como suas linearizações e funções não lineares decorrentes.

Para se obter os dados de S e v instantâneos a partir de S somente, você deve obter inicialmente os dados de decaimento de "S" no tempo (**curva progressiva**), tal como representado na Figura 5.6:

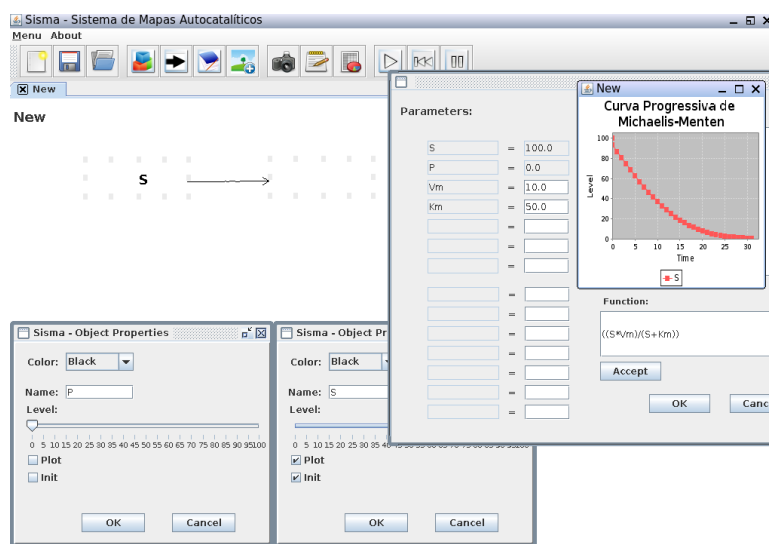


Figura 5.6: Decaimento de substrato pela equação de Michaelis-Menten. Observe os valores dos parâmetro cinéticos.

Exporte os dados, copiando-os e colando-os para uma planilha e proceda os cálculos de S *instantâneo* e v *instantâneo* como segue:

1. Ao lado da coluna de "S" da planilha, copie a mesma coluna de "S", só que descontada sua 1a. linha (Figura 5.7).
2. Atribua às colunas as etiquetas "Si" e "Sj". Considere S_m como a concentração de S no intervalo de tempo em que cada ponto da curva é gerada no Sisma (S *instantâneo*). Dessa forma, S_m equivalerá à média entre Si e Sj, ou seja, $(S_i + S_j)/2$.
3. Para a v *instantânea*, nomeie uma coluna como "v", e calcule a velocidade como dS/dt . Isso é bem simples pois, como **o intervalo de tempo entre dois pontos (Si e Sj) no Sisma é de 1 s**, basta calcular v pela diferença entre Si e Sj (Figura 5.7).

A	B	C	D	E
t	Si	Sj	Veloc. Instantânea	Substr. Instantân
0	100	99.3333333333333	$v=(S_i-S_j)/dt=-ds/dt$	$S_m=(S_i+S_j)/2$
0	99.3333333333333	96.8217054263566	6.51162790697674	96.6666666666667
1	86.8217054263566	80.4760963612008	6.34560906515581	83.6489008937787
2	80.4760963612008	74.3082159137036	6.16788044749718	77.3921561374522
3	74.3082159137036	68.3304761989538	5.97773971474977	71.3193460563287
4	68.3304761989538	62.559303343646	5.77454586458919	65.4432032666592
5	62.559303343646	56.9981662833251	5.55776405103957	59.770483088448
6	56.9981662833251	51.6711435629172	5.32702272040786	54.3346549231211
7	51.6711435629172	46.588959793543	5.0821837693742	49.1300516782301
8	46.588959793543	41.7655348500374	4.82342494350555	44.1772473217902
9	41.7655348500374	37.2142035775406	4.55133127249685	39.489869213789
10	37.2142035775406	32.9472147097865	4.26698886775411	35.0807091436635
11	32.9472147097865	28.9751446619782	3.97207004780828	30.9611796858824
12	28.9751446619782	25.306250507242	3.66899415473626	27.1406975846101
13	25.306250507242	21.9458056123247	3.36044489491723	23.6260280597833
14	21.9458056123247	18.8954810763013	3.05032453602344	20.420643344313

Figura 5.7: Colunas exportadas do Sisma (t, Si), bem como as processadas para a determinação de "S" e "v" instantâneos.

4. Agora basta montar o gráfico de "Sm" *versus* "v" para a representação direta de Michaelis-Mentem (Figura 5.8).

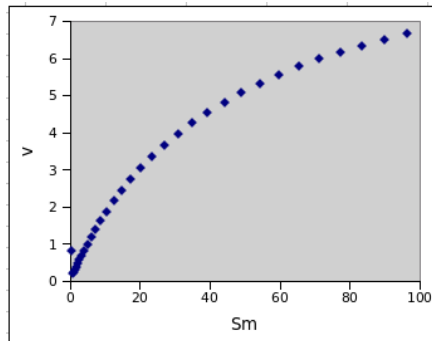


Figura 5.8: Gráfico direto de Michaelis-Mentem referente aos dados obtidos pela simulação da Figura 5.5 após obtenção de S e v instantâneos [3].

Observe que o gráfico é hiperbólico, embora não se tenha sua assíntota plenamente atingida. Isso é bastante comum nos ensaios cinéticos com enzimas e, por essa razão, a determinação de "Vm" (extrapolação assintótica da curva), e por conseguinte, de "Km" (valor de "S" projetado à metade de "Vm"), torna-se dificultada. Embora os parâmetros cinéticos possam ser determinados com auxílio de algoritmos de ajuste não linear, é comum na literatura os procedimentos de linearização para tal fim, dada a simplicidade do ajuste linear.

Dentre as linearizações mais prementes em livros didáticos e mesmo publicações científicas, encontra-se o **gráfico duplo-recíproco** (Lineweaver-Burk; [4]). Para elaborar um gráfico duplo-recíproco e obter os parâmetros cinéticos, basta criar as colunas "1/Sm" e "1/v" na planilha e plotar o resultado (Figura 5.9.)

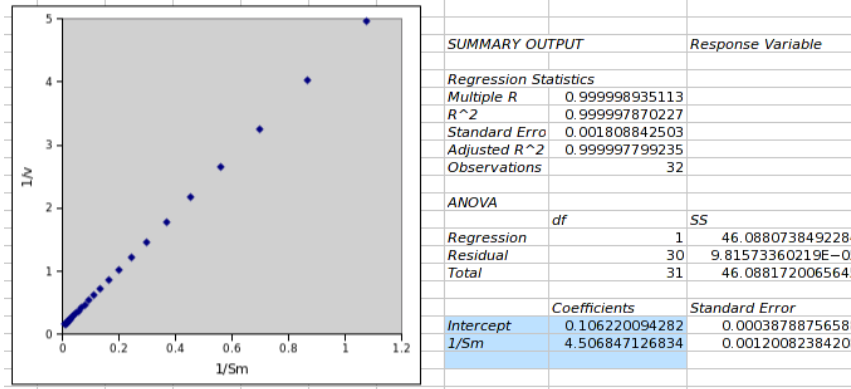


Figura 5.9: Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) referente aos dados da curva de Michaelis-Menten (Figura 5.8). As células marcadas representam o valor do intercepto ("1/Vm", *intercept*) e a inclinação ("Km/Vm", *1/Sm*) do gráfico.

Obtido o ajuste, determinam-se os parâmetros cinéticos a partir do intercepto ($1/V_m$) e da inclinação (K_m/V_m) do gráfico. No exemplo dado, os parâmetros resultaram em $V_m=9,4$ e $K_m=42,4$, valores bem próximos do simulado ($V_m=10$, $K_m=50$, Figura 5.6).

Se desejável, uma **correção de erro** para possíveis **desvios da linearidade** no duplo-recíproco, pode ser efetuada convertendo-se o valor de Sm para Sm_{corr} , como segue:

$$Sm_{corr} = \frac{Sm}{\ln\left(\frac{S_i}{S_j}\right)} \quad (5.4)$$

3.2 Pela equação integrada de Michaelis-Menten

Uma forma alternativa para a obtenção dos parâmetros cinéticos a partir do valor do substrato consumido no tempo é dada pela forma integrada

da equação de Michaelis-Menten. Uma forma para essa equação define-se como:

$$P = V_m * t - K_m * \ln \frac{S_0}{S} \quad (5.5)$$

, Onde S_0 é o teor inicial de substrato

Linerizando-se a Equação 5.5 acima obtém-se:

$$\frac{P}{t} = V_m * \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{t} * K_m \quad (5.6)$$

Dessa forma, um gráfico de $\ln S/S_0 * 1/t$ versus P/t deverá fornecer o valor de K_m como inclinação e V_m como intercepto.

Esse tratamento pode ser simulado no *Sisma*, montando-se uma reação $S \rightarrow P$ como acima, e atribuindo $V_m=10$ e $K_m=50$. Após a simulação, coleta-se os dados, elabora-se o gráfico acima e calcula-se V_m e K_m por ajuste linear, como representado na Figura 5.10.

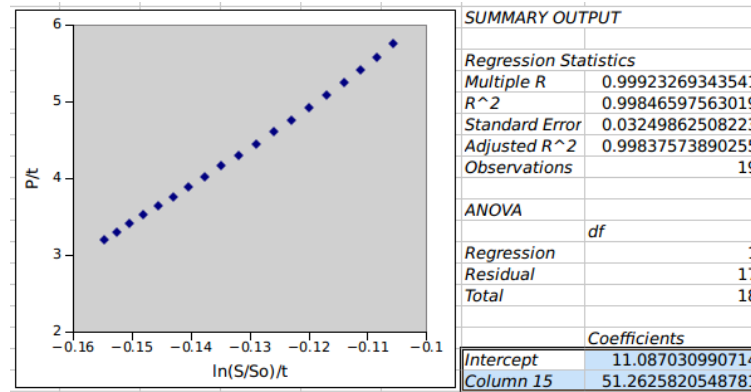


Figura 5.10: Resultado do ajuste linear para os dados de simulação ($V_m=10$, $K_m=50$) pela equação integrada de Michaelis-Menten. Obs: o ajuste foi realizado com um subconjunto da faixa linear de pontos ($n=19$) da simulação.

Percebe-se pela Figura 5.10 a estreita proximidade entre o valor teórico e o encontrado no ajuste para V_m e K_m . Não obstante, a regressão foi conduzida com um subconjunto de pontos da faixa linear (19 pontos). Se tomados todos os pontos da simulação ($n=31$), sua distribuição se encaixaria melhor na curvatura representada na Figura 5.11

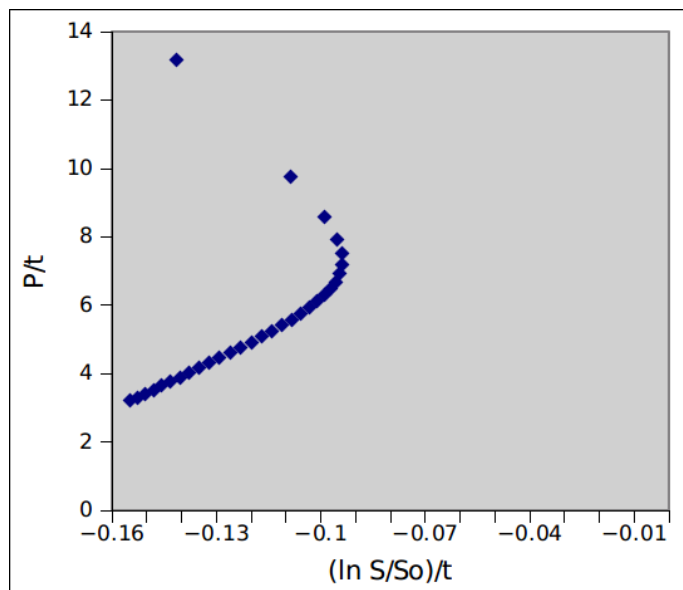


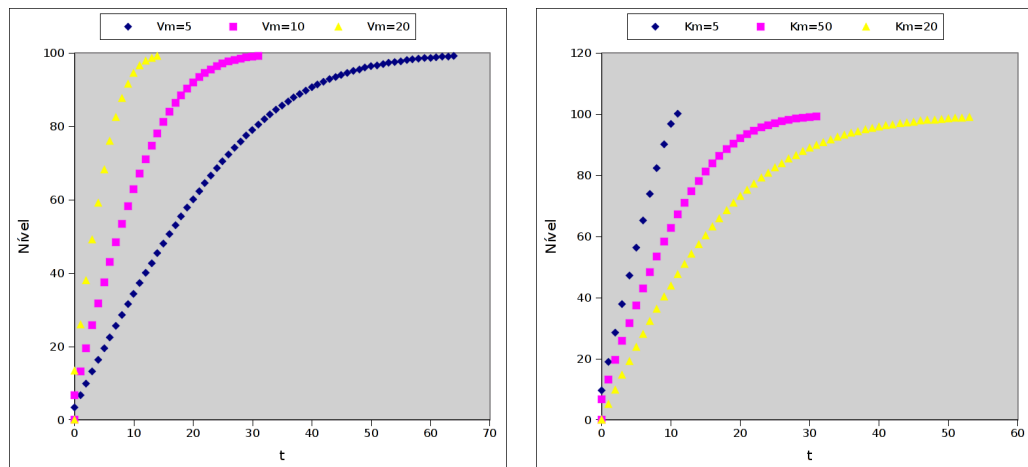
Figura 5.11: Distribuição de todos os pontos referentes à simulação da Figura 5.11 ($n=31$).

4 Os parâmetros catalíticos K_m e V_m

Variando-se os valores de K_m e V_m para a equação de conversão de S em P na simulação, é possível compreender com mais clareza o seu significado. Para isso, monte uma reação simples $S \rightarrow P$, varie os valores dos parâmetros (ex: $V_m=5, 10$ e 20 ; $K_m=5, 50$, e 100) e observe o resultado das simulações (Figura 5.12).

Como visto pela Figura 5.12, a atividade de uma enzima depende de ambos os parâmetros, K_m e V_m . Nesse sentido, uma enzima de excelência deverá possuir um baixo valor para K_m e alto para V_m . Isso define a **eficiência catalítica** de uma enzima, ou seja a razão V_m/K_m , ou **constante de especificidade**. Veja que essa razão V_m/K_m também constitui o recíproco da inclinação de um gráfico linear de Lineweaver-Burk (Figura 5.9). Dessa forma, é possível utilizar essa representação gráfica na comparação da eficiência catalítica de enzimas.

É importante mencionar que o parâmetro adequado nessas medições é **k_{cat} , constante catalítica**, a qual é obtida pela razão de V_m pela concentração da enzima. Por uma questão prática, pode-se equalizar nesses estudos V_m a k_{cat} presumindo-se um valor unitário para a concentração



(a) Variação em V_m (5, 10, 20) com $K_m=50$ (b) Variação em K_m (5, 50, 100) com $V_m=10$

Figura 5.12: Curvas progressivas obtidas com variação nos parâmetros cinéticos (a) V_m , and (b) K_m .

da enzima.

No entanto, também é possível verificar o efeito da concentração de enzima pelo , bastando alterar-se a Equação 5.3:

$$v = \frac{k_{cat} * E_o * S}{S + K_m} \quad (5.7)$$

Assim, variando-se E_o pode-se visualizar curvas de progresso mais rápidas ou mais lentas (Figura 5.13).

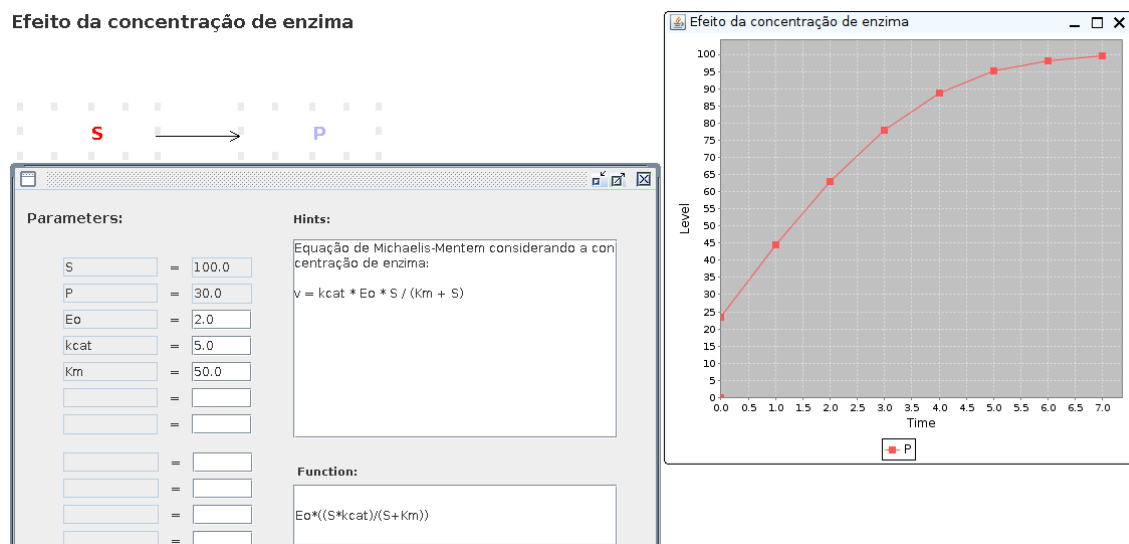


Figura 5.13: Exemplo de curva de progresso sob variação da concentração de enzima.

Uma enzima que exiba **proficiência catalítica** deverá possuir uma razão k_{cat}/K_m (no caso, V_m/K_m) numa faixa de 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Isso indica uma enzima que atinge sua capacidade máxima instantaneamente, com a catálise dependente apenas do encontro difusional entre substrato e enzima. Essa **proficiência ou perfeição catalítica** pode ser simulada para a mesma reação $S \rightarrow P$ acima, mas atribuindo valores extremos para V_m e K_m , por exemplo 1×10^7 e 0.1 , respectivamente (Figura 5.14), e considerando $E_o=1$.

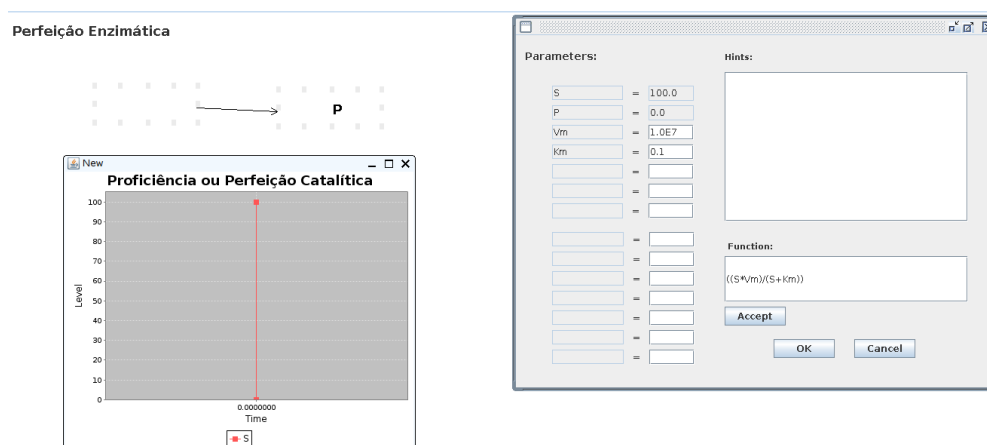


Figura 5.14: Exemplo de proficiência catalítica. Observe os valores de V_m e K_m que resultaram na conversão instantânea de substrato.

Modulação da catálise enzimática

Distinto do aspecto quantitativo de parâmetros catalíticos observados anteriormente, este capítulo tem direcionada-se mais à exemplificação didática e visual de conversões catalisadas enzimaticamente a partir de algumas fontes de interferência na velocidade de reação

1 Cofatores

Enzimas atuam comumente na presença de **íons**, geralmente metálicos, e/ou **coenzimas**, compostos orgânicos inseridos fortemente na estrutura proteica (**grupos prostéticos**) ou adsorvidos a essa (**cosubstratos**), como no exemplo abaixo:



, onde LDH representa a enzima *lactato desidrogenase* e NAD^+ o co-substrato (coenzima).

O *Sisma* pode simular a ação de coenzimas sobre uma enzima alvo. Para tanto, é necessário montar um esquema um pouco mais complexo, como o representado na Figura 6.1.



Figura 6.1: Esquema reacional para o efeito de uma coenzima. Todos os compostos devem ser inicializados para a simulação, embora só interesse a visualização gráfica do produto. ES, ESco e P devem ser ajustados para nível zero antes da simulação.

A Figura 6.2 explicita as equações bem como os parâmetros necessários à simulação. Observando-se a sequência desses parâmetros, pode concluir-se que há uma rápida formação do complexo ES ($k1=50$) embora não se tenha a conversão para produto a uma taxa significativa ($k2=1e-5$), permanecendo em alto teor até o final da reação. No entanto, a participação da coenzima na reação permite que sua interação com a enzima ($k3=5$) forneça a energia necessária para a conversão do substrato a produto (Km e Vm), completando a reação.

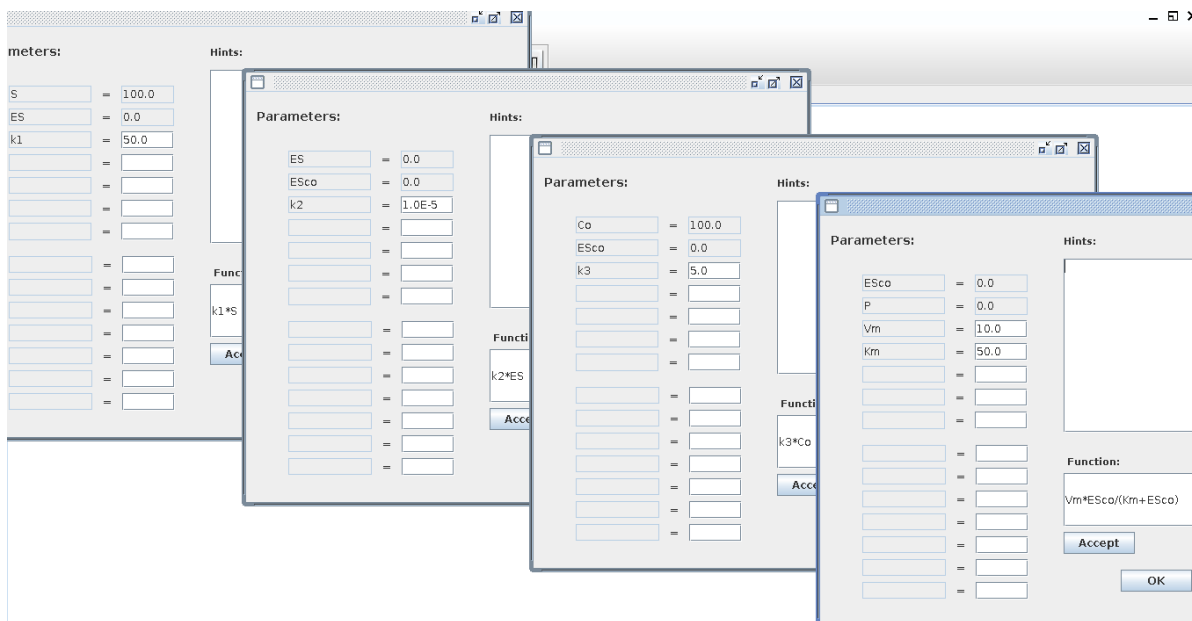


Figura 6.2: Equações e parâmetros para a simulação de reação enzimática dependente de uma coenzima (Figura 6.1).

Comparando-se a simulação para teores distintos da coenzima, a Figura 6.3 apresenta o gráfico de progresso resultante para a reação na presença de um alto teor de coenzima (A), e sob um teor baixo dessa (B).

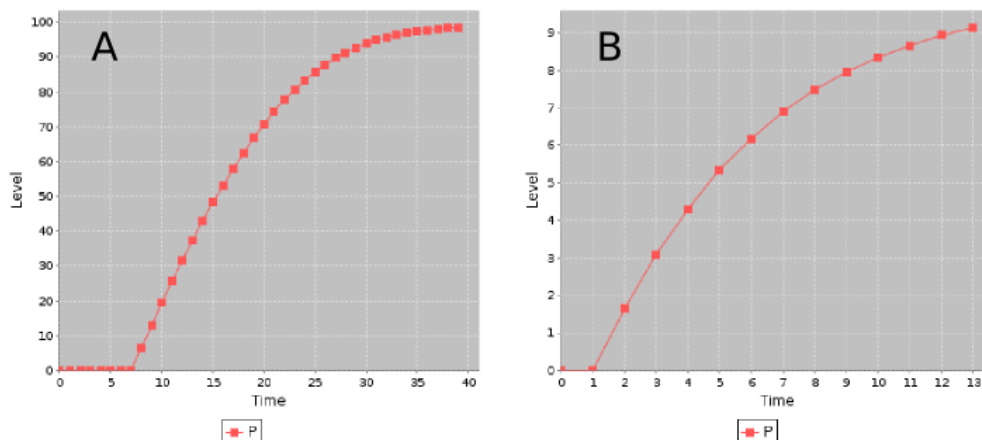


Figura 6.3: Resultado da simulação para uma enzima dependente de coenzima, tal como representado no esquema da Figura 6.1. Para demonstrar a necessidade do cosubstrato na reação, a coenzima está representada com nível 100 (A) e 15 (B).

Há que se observar que o formalismo de Michaelis-Menten só pode ser aplicado numa reação $S \rightarrow P$ e, dessa, forma, não se pode utilizá-lo para esquemas complexos como os representados pela dependência de um cosubstrato. É possível também observar uma fase *lag* entre o início da reação e o aparecimento do produto. Isso deve-se ao baixo valor da constante k_2 na conversão de $1a.$ ordem de $Co \rightarrow ESc$. Elevando-se esse valor reduz-se a fase *lag* da curva (início).

2 Vitaminas

Da mesma forma que para coenzimas apresentado na seção anterior, é possível utilizar o Sisma para a visualização da dependência de uma vitamina que converte-se à uma coenzima, essa necessária à reação. A Figura 6.4 exemplifica essa reação.

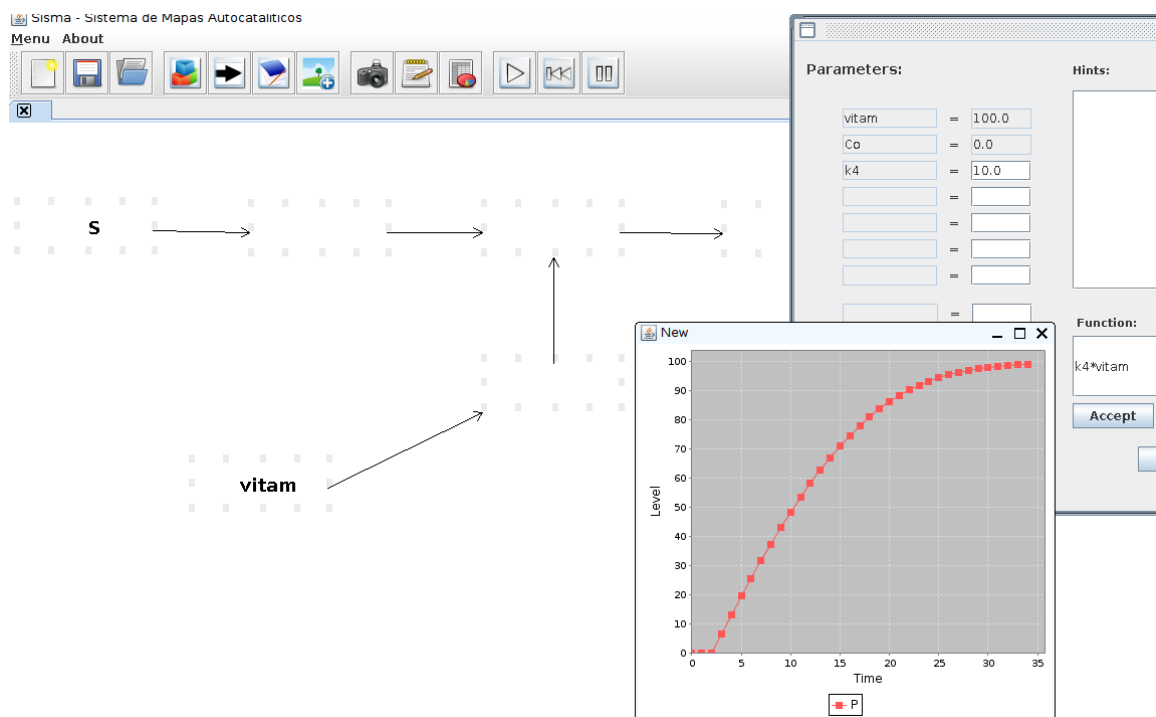
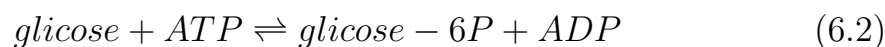


Figura 6.4: Representação da dependência de uma vitamina numa reação enzimática. O esquema apenas introduz a vitamina, a partir da reação apresentada na Figura 6.1.

3 Ajuste induzido

A cinética de Michaelis-Mentem sugere dois modelos principais para a ligação do substrato e sua conversão a produto: o **modelo chave-fechadura**, exemplificado nos itens anteriores, e o **modelo de ajuste induzido**. Nesse, a ligação do substrato à enzima promove uma mudança conformacional que resulta na forma ativa da enzima. Isso pode ser exemplificado pela conversão da **forma fechada (inativa)** da hexoquinase para a **forma aberta (ativa)**, induzida pelo substrato:



Uma ilustração da simulação acima pode ser observada na Figura 6.5. O

esquema foi elaborado com as equações e parâmetros *default* do programa. Veja que a reação procede com a ligação inicial de substrato à forma fechada da enzima (HKclose), sucedendo-se sua conversão para a forma aberta (HKopen), e consequente liberação do produto.

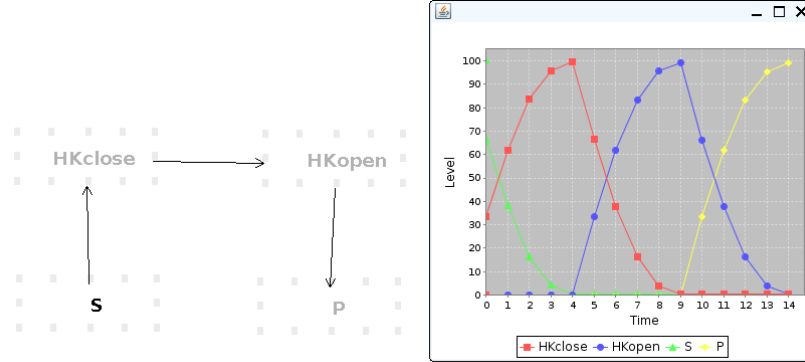


Figura 6.5: Ilustração de ajuste induzido. O produto é liberado somente após a conversão para a forma aberta da enzima, induzida pelo substrato. Para a simulação foram utilizadas as equações *default* do programa, $V_m=10$ e $K_m=50$.

4 Enzimas multiméricas

Para **enzimas multiméricas** o ajuste induzido pelo substrato e por outros ligantes também atua de modo regulatório, convertendo subunidades inativas em ativas. Nesse caso, o esquema reacional pressupõe um equilíbrio entre as **formas tensa (T)** e **forma relaxada (R)** de subunidades de uma enzima multimérica. Dessa forma, o aumento de S tende a converter a forma T inativa da enzima para a forma R capaz de formar o produto. Isso pode ocorrer de **forma sequencial**, modelo KNF (Koshland, Némethy e Filmer; [5]) ou de **forma simultânea** (em concerto), modelo MWC (Monod, Wyman e Changeaux; [6]). A Figura 6.6 exemplifica um equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ em concerto (MWC).

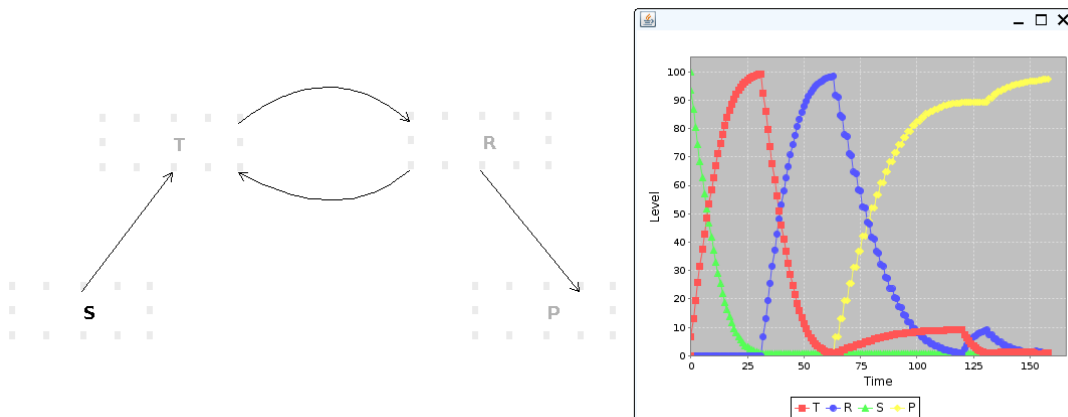


Figura 6.6: Ilustração para o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ em concerto (MWC) para uma enzima multimerica. Pressupõe-se que todas as subunidades da enzima exibem exclusivamente a forma T ou a forma R. Simulação elaborada com a equação padrão do programa, e os parâmetros $V_m=10$ e $K_m=50$, exceto para o *path* $R \rightarrow T$, onde $V_m=1$, o que resulta no perfil secundário de ascensão do produto.

Observe que o substrato liga-se à forma T das subunidades da enzima induzindo-as à forma ativa R simultaneamente (em concerto), e consequente formação do produto. Veja também que o escoamento da forma T não é total, consequência dos valores para as constantes de velocidade para o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$, com $V_m=10$ para a reação direta e $V_m=1$ para a inversa. Dessa forma, uma pequena quantidade de T ainda converte-se a R ao final, resultando no segundo ombro da liberação de produto.

Uma simulação mais elaborada desses modelos pode ser exemplificada na Figura 6.7, que ilustra o modelo sequencial de KNF com o ajuste para as formas ativas das subunidades induzido pelo substrato. Nesse caso, perceba que os "dímeros" exibem as formas R e T de forma aleatória em suas cadeias (TR ou RT). Quando as subunidades interagem com o substrato, a enzima assume a forma ativa em ambas as subunidades RR.

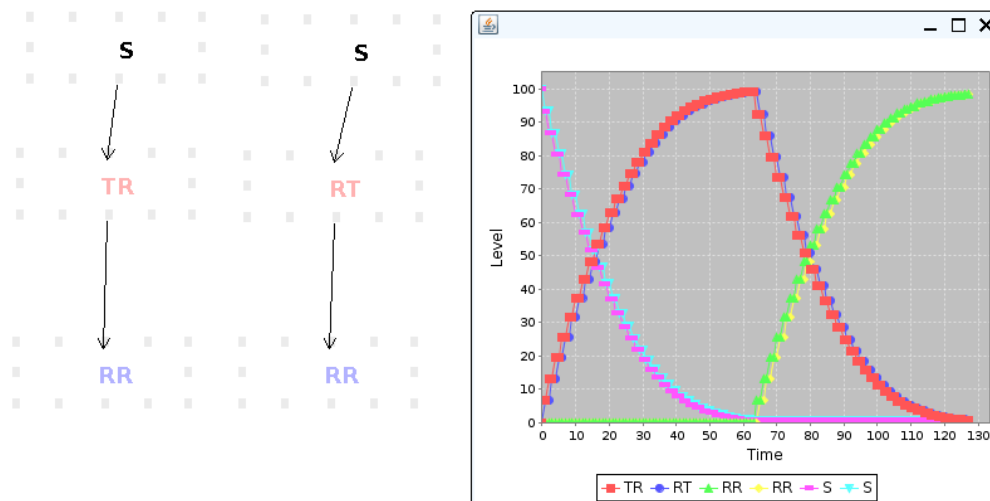


Figura 6.7: Simulação de um dímero enzimático para o modelo sequencial (KNF). A simulação foi elaborada com a equação padrão do programa, os parâmetros $V_m=10$ e $K_m=50$, e $Init$ para ambos os substratos. Por praticidade, o equilíbrio $T \rightleftharpoons R$ foi omitido em cada subunidade.

Note que na simulação o substrato converte ambas as formas diméricas da enzima (TR e RT) para seu estado ativo (RR). Nesse caso, o gráfico de progresso mostra a ascensão das formas ativas acompanhada pela redução das inativas, e em decorrência da ativação pelo substrato.

5 Modificação covalente.

Outra forma similar de regulação enzimática para a transição $T \rightleftharpoons R$ consiste na **modificação por ligação covalente**, geralmente por fosforilação ou defosforilação, embora não haja preferência de uma ação ou outra por qualquer das formas. A Figura 6.8 ilustra um diagrama simples para a inativação de *piruvato desidrogenase* por fosforilação mediada por ATP. Observe que a forma ativa da enzima (PyrDH) reduz-se progressivamente com a fosforilação por ATP, sucedendo-se a conversão à forma inativa da enzima (PyrDHP) e liberação de ADP. Como mencionado, esse esquema constitui apenas uma ilustração da reação proposta, uma vez que não há conversão autocatalítica de ATP para PyrDH, e tampouco de PyrDHP para ADP.

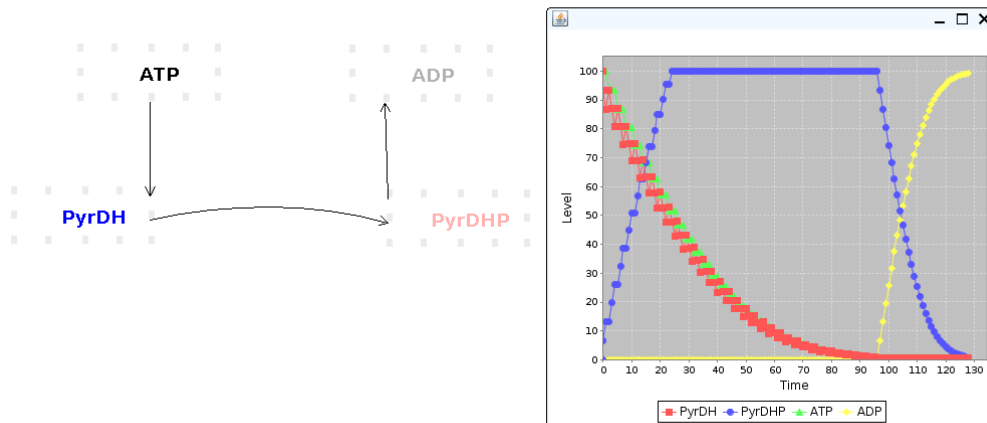


Figura 6.8: Simulação para a inativação de piruvato desidrogenase por fosforilação. Para todos os *path*, equação padrão com $V_m=10$, $K_m=50$.

6 Enzima alostérica

Compostos podem ligar-se a enzimas em **sítios alostéricos** ou **regulatórios** distintos do sítio ativo, levando a transições conformacionais que resultam na mudança da atividade enzimática. Isso pode ocorrer tanto para o substrato, como explicado acima, como para moléculas variadas. Dessa forma, **efetores alostéricos** podem ser considerados ativadores ou inibidores de uma enzima, participando de sua regulação.

A ação de um **ativador alostérico** pode ser simulado no *Sisma* como representado no gráfico de progresso da Figura 6.9, que também compara a cinética do produto formado na ausência do efetor (dados exportados para planilha). É importante que se tenha em mente que, embora o simulador apresente uma conversão do efetor Ef para o produto P como num mapa autocatalítico, tal como proposto para o *Sisma*, esse fenômeno não ocorre de fato.

Outra observação importante é que a conversão dos dados no tempo para o *tratamento de velocidade instantânea* descrito ao item 3.1 para S e v não deve resultar em qualquer diferença entre a enzima controle e aquela sob efeito do efetor alostérico, portanto não incidindo sobre os valores de

V_m ou K_m . Isto ocorre porque a equação que define a cinética entre o substrato e o produto não é modificada pelo efetor. Apenas ocorre uma aceleração (ativador) ou retardo (inibidor) na formação do produto, como representado na Figura 6.9.

E uma observação final é que a simulação do *Sisma* decorre simplesmente da alteração nos níveis de substrato e de produto no tempo. Como existem outros fenômenos temporais em cinética enzimática, e que estão fora do domínio da equação de Michaelis-Menten, só é possível discernir o comportamento catalítico frente à equação adequada. Tais fenômenos de **histerese** podem envolver, por exemplo, a **cinética de fase lag** ou de **estado pré-estacionário**.

Efetor Alostérico Positivo

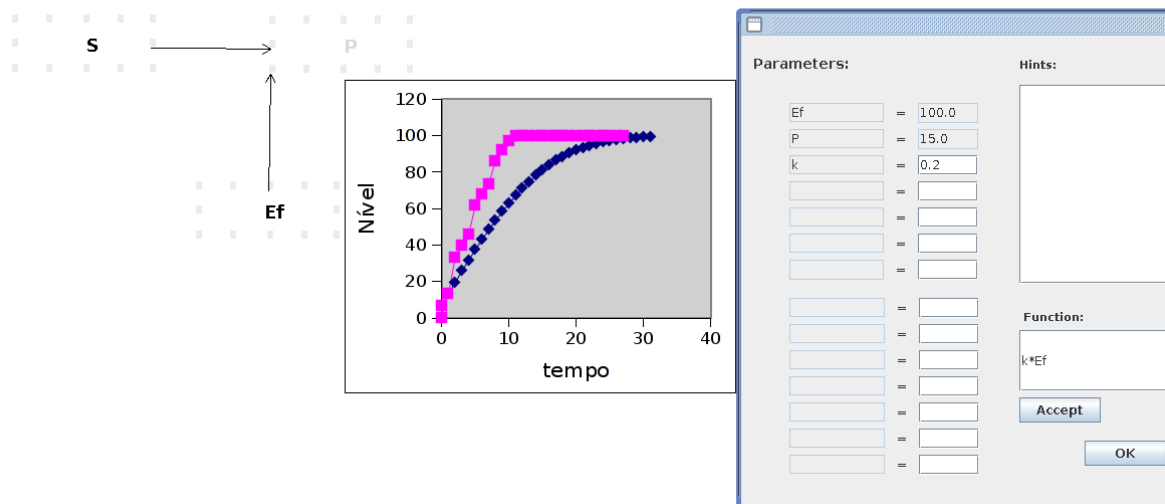


Figura 6.9: Efeito de um ativador alostérico (rosa). A equação de 1a. ordem sobre o efetor é apenas figurativa, uma vez que não há processo cinético real de conversão do efetor para o produto da reação, mas sua influência sobre a geração desse. A curva controle foi produzida utilizando-se a equação de Michaelis-Menten com $V_m = 10$ e $K_m = 50$.

Isso pode ser comprovado se tentarmos aplicar o *método das velocidades instantâneas* descrito acima para obter a curva de Michaelis-Menten. Veja pela Figura 6.10 que as curvas obtidas na ausência e presença do ativador se sobrepõem.

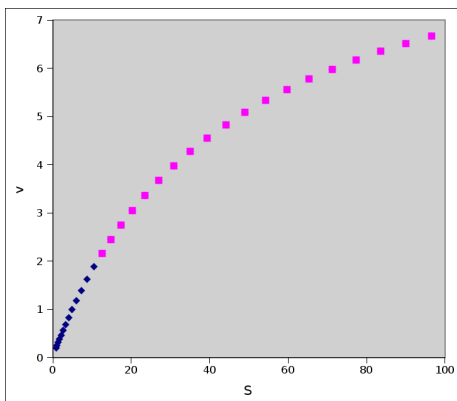


Figura 6.10: Curva de Michaelis-Menten para enzima controle (azul e sobposta) e enzima sob histerese de um ativador alostérico (rosa). Essa sobreposição decorre dos valores de K_m e V_m que permanecem inalterados na presença do efetor.

O efeito de um modulador alostérico também pode exemplificar-se pela alteração do valor da constante na equação do efetor, como representado na Figura 6.11 abaixo.

Efetor Alostérico Negativo

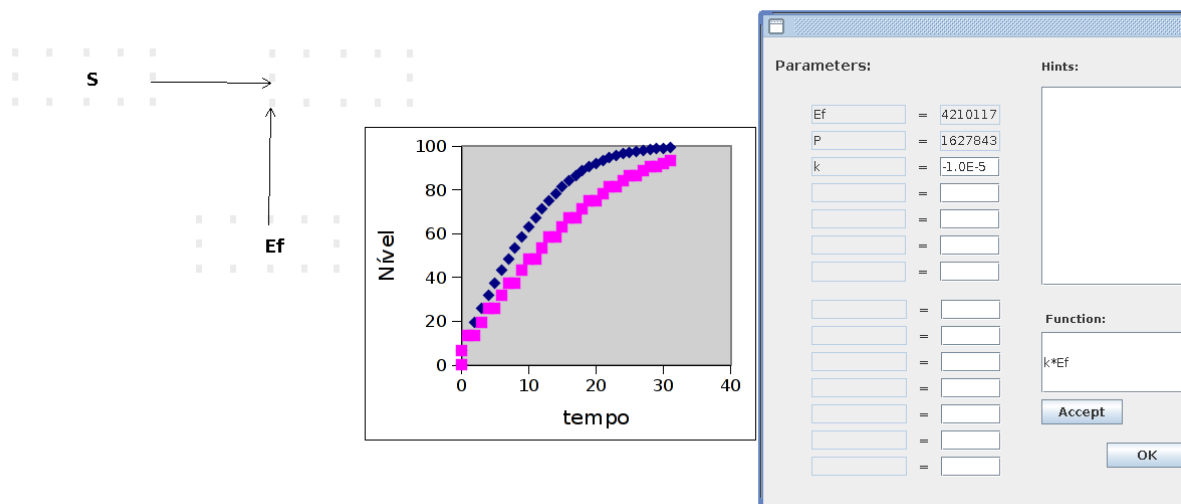


Figura 6.11: Efeito de um inibidor alostérico (rosa) no tempo. A equação de 1a. ordem sobre o efector é apenas figurativa, uma vez que não há processo cinético real de conversão do efector para produto. Observe o valor negativo da constante para o efeito de redução da atividade enzimática. A curva controle foi produzida utilizando-se a equação de Michaelis-Menten com $V_m = 10$ e $K_m = 50$.

Como forma alternativa, e mais simples, para a simulação de um efector alostérico, pode-se também aplicar a equação de Michaelis-Menten somente, porém com um fator multiplicador ao final. Assim, para um *ativador*, o fator deverá ser maior que a unidade, e para um *inibidor*, menor que essa.

6.1 Excesso de substrato

Um efector alostérico bastante comum no metabolismo é o próprio substrato da enzima, levando à **inibição por excesso de substrato**. A função que define esse efeito é dada por:

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (6.3)$$

A inibição pelo substrato pode ser simulada no *Sisma* pela introdução da Equação 7.4, tal como exemplificado na Figura 6.12:

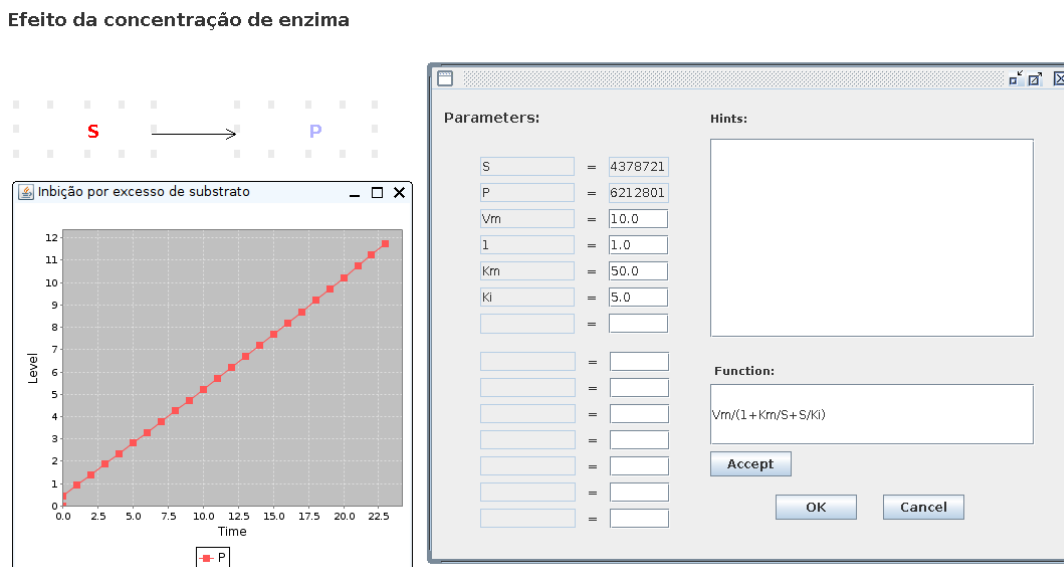


Figura 6.12: Exemplo de Inibição por excesso de substrato.

7 Cooperatividade

Enzimas alostéricas podem exibir atividades distintas em função de sua **interação cooperativa** com moléculas de substrato ou outros ligantes. Assim, a enzima apresenta-se na forma *T* na ausência de substrato, mas converte-se progressivamente à forma *R* com a ligação sucessiva de moléculas desse em suas subunidades. A função geral que define o comportamento de cooperatividade na atividade enzimática, **equação de Hill**, é dada por:

$$v = \frac{Vm * S^{nH}}{Ks^{nH} + S^{nH}} \quad (6.4)$$

, onde n^H representa um índice de cooperatividade (Hill) e Ks a constante de dissociação do complexo ES. Conceitualmente, o parâmetro Ks

pode ser considerado como Km quando n_H for igual à unidade, ou uma aproximação desse, para valores de n_H distantes dessa.

O *Sisma* também pode simular o efeito de cooperatividade, embora a versão atual não permita o uso de expoentes na equação. Dessa forma, na introdução de uma função com uma ativação por cooperatividade (**cooperatividade positiva**), basta introduzir a Equação 6.4 convertendo o expoente como produto da quantidade desejada. Exemplificando, para S^n deve-se fazer $S*S$ n vezes.

Para ilustrar o efeito de cooperatividade no *Sisma*, monte e execute o diagrama reacional da Figura 6.13. Perceba que a curva de progresso resultante atinge a assíntota mais rapidamente do que na ausência do efeito cooperativo (curva de uma enzima não alostérica). Ressalta-se, portanto, que a função de Michaelis-Menten, por si, não é capaz de explicar o comportamento alostérico e, por consequência, cooperativo de uma enzima.

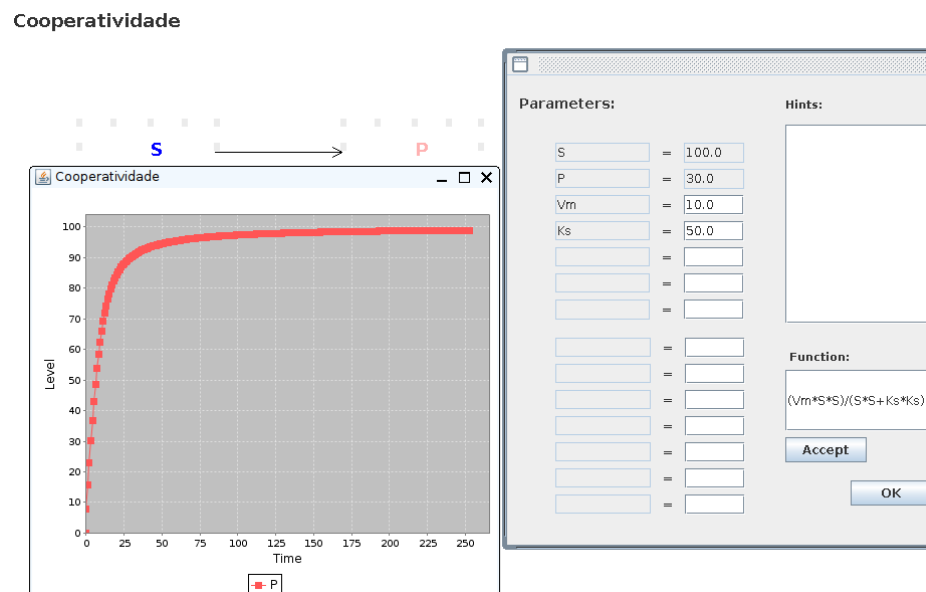


Figura 6.13: Simulação para o efeito de cooperatividade positiva para uma enzima alostérica ($n_H=2$). Perceba que a equação representa uma função de Michaelis-Menten com S e K_s elevados ao segundo expoente, de acordo com a Equação 6.4.

Convertendo-se os valores da curva de progresso para velocidade instantânea, como já explorado, pode-se visualizar o efeito da cooperatividade positiva. Nesse caso, para uma ilustração mais robusta, a Figura 6.14

apresenta os resultados dessa transformação a partir de simulações com distintos valores para K_s (50 e 100), e em duas representações diferentes: gráfico direto de Michaelis-Menten gráfico e duplo-recíproco.

Observe que no gráfico direto (Figura 6.14A) um teor crescente de substrato é necessário para converter a enzima em sua forma ativa (equilíbrio $T \rightleftharpoons R$), elevando por consequência sua taxa de reação. A Figura 6.14B representa o gráfico duplo-recíproco curvilinear resultante. Pode-se verificar também que o valor crescente de K_s impacta fortemente no duplo-recíproco.

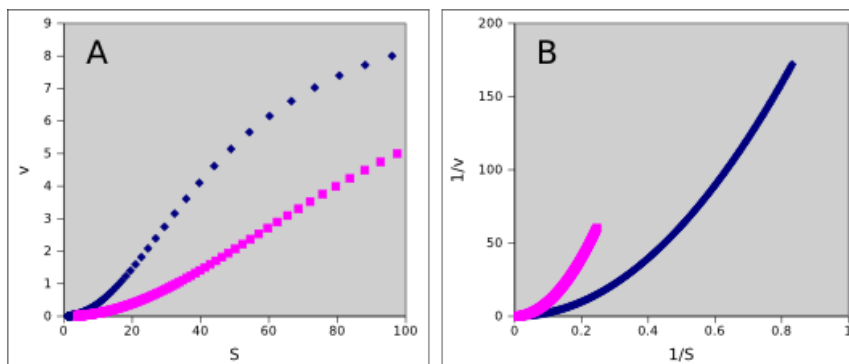


Figura 6.14: Cooperatividade apresentada por uma enzima alostérica com valor de $n_H=2$, tal como obtido a partir da transformação para velocidade instantânea dos dados exportados da Figura 6.13. A - gráfico direto. B - gráfico de Lineweaver-Burk.

Uma representação quantitativa da cooperatividade reside na **linearização da Equação 6.4 de Hill** acima, e subsequente determinação do valor de seu índice, n_H :

$$\ln\left(\frac{v}{V_m - v}\right) = n_H * \ln S - n_H * \ln K_s \quad (6.5)$$

, Onde K_s representa uma constante de dissociação, originalmente deduzida a partir de estudos de ligação de oxigênio a hemoglobina.

Para um modelo cooperativo puro a inclinação do gráfico resultante representa o índice de cooperatividade de Hill (n_H). Assim, tomando-se como exemplo os dados de cooperatividade para $K_s=100$ e $V_m=10$ do exemplo acima (Figura 6.14, perfil rosa), a linearização de Hill para a Equação 6.4 resulta na Figura 6.15 abaixo.

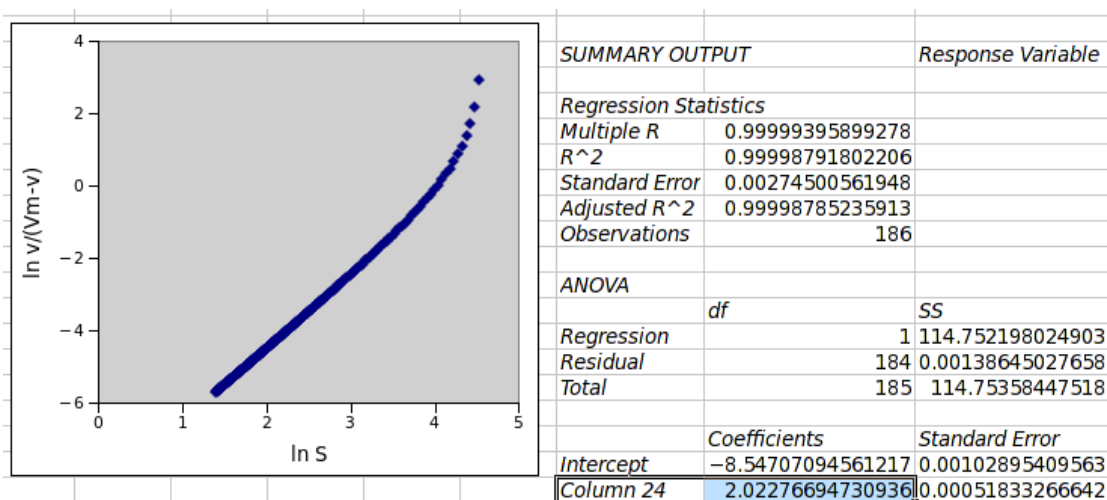
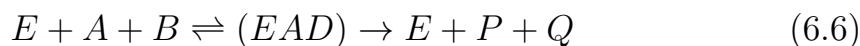


Figura 6.15: Gráfico de Hill e determinação do índice de cooperatividade homônimo para o exemplo da Figura 6.14, com $V_m=10$ e $K_s=100$ (dados da curva de progresso convertidos pelo método de velocidades instantâneas).

Para se determinar o parâmetro de cooperatividade de Hill, n_H , basta obter-se a inclinação da curva resultante na faixa linear. No caso, esse valor foi de 2,02 ($n=186$, Figura 6.15), muito próximo portanto do esperado a partir da equação de velocidade inserida com expoente quadrático para S (Equação 6.4, Figura 6.13). Complementarmente, pelo intercepto da curva extrai-se o valor da constante dissociação do modelo. Para o exemplo (Figura 6.15), $K_s=68,8$, relativamente próximo do valor teórico ($K_s=50$) oferecido à simulação.

8 Substratos múltiplos

Algumas reações enzimáticas dependem de mais de um substrato para sua realização. Exemplificando, a reação 6.6 abaixo envolve a conversão de dois substratos, A e B, nos produtos, P e Q.



Essa reação de bisubstrato pode ocorrer num **modelo sequencial** (ordenado ou aleatório), ou num **modelo ping-pong**. Esses modelos também

podem ser representados no *Sisma*. Para tanto, pode-se utilizar as equações *default* de Michaelis-Menten, sem qualquer alteração, uma vez que se busca sua observação dinâmica, mais do que seu formalismo cinético.

Dessa forma, ilustrando para o *modelo sequencial*, monte o esquema da Figura 6.16 abaixo, zerando o nível dos compostos, exceto para E, A e B. E aloque uma inicialização simultânea para esses (E, A e B). Se quiser representar a reação mais rapidamente, aloque a barra de rolagem de todos os *path* para a velocidade mais alta.

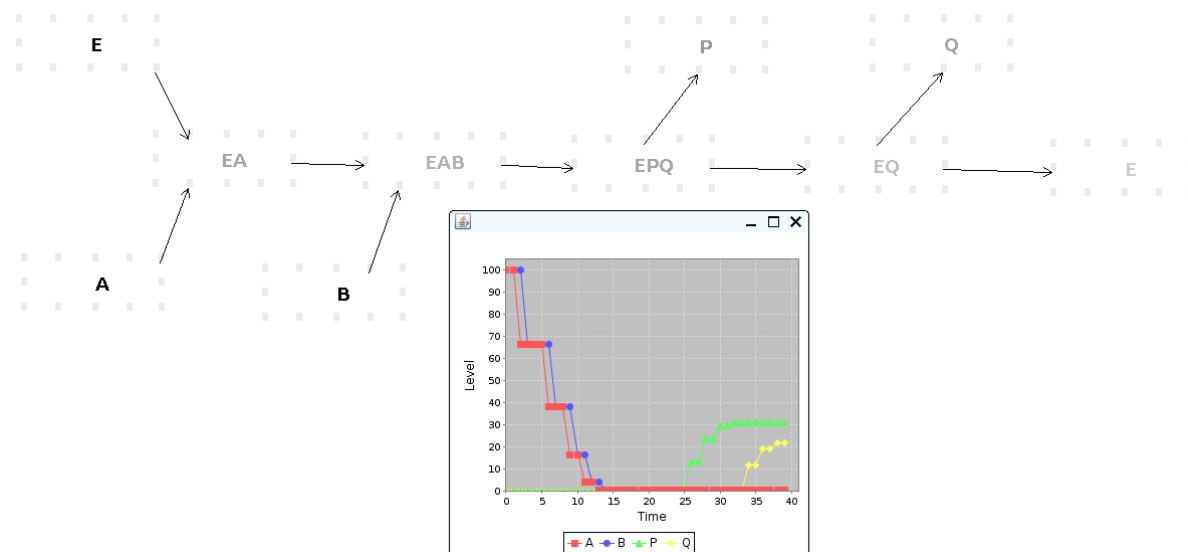


Figura 6.16: Reação de bisubstrato para um modelo sequencial ordenado. Todos os substratos (A e B) são ligados à enzima antes da liberação dos produtos (P e Q). Para reproduzir o gráfico de progresso, selecione para *Plot* apenas A, B, P e Q, mantenha as equações e parâmetros padrão do programa, mas altere o valor de V_m para 20 em $EPQ \rightarrow P$ e $EQ \rightarrow Q$.

Uma ilustração curiosa para o modelo sequencial pode ser pensada de modo iterativo, com conversão dos produtos a substratos, tornando a via cíclica. Isso é comum no metabolismo, e pode ser exemplificado para o *Sisma* bastando-se unir cada produto a seu substrato, concomitante à recuperação da enzima. A Figura 6.17 ilustra o esquema reacional, enquanto que a Figura 6.18 apresenta o resultado para uma simulação de 30 minutos.

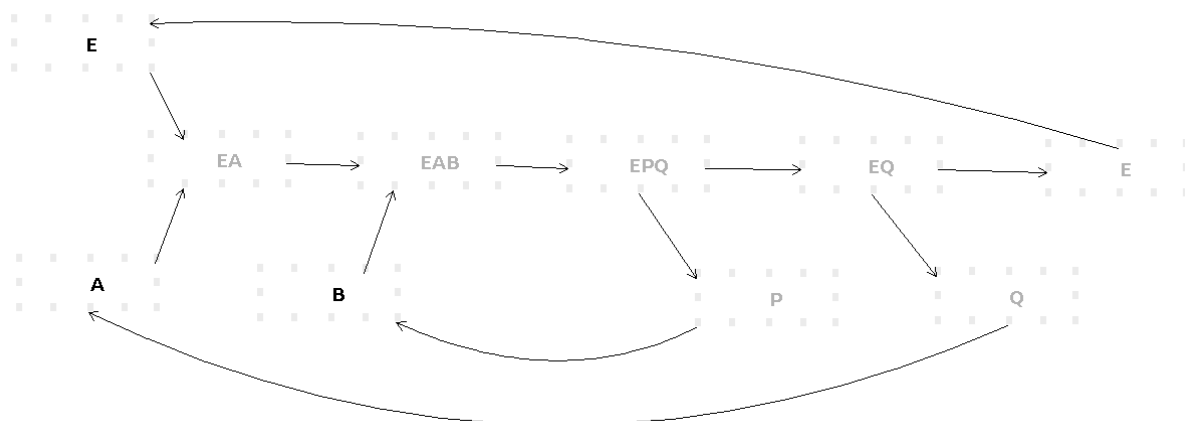


Figura 6.17: Diagrama reacional para ciclagem do esquema sequencial apresentado na Figura 6.16.

Perceba que ocorre uma estabilização dos níveis dos produtos após um período de tempo, simulando o que ocorre em reações mais complexas na célula.

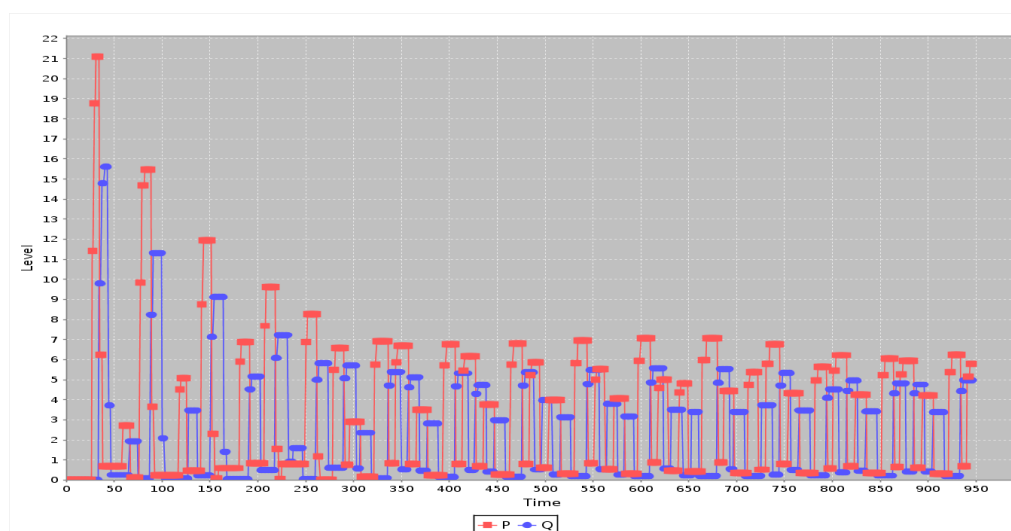


Figura 6.18: Curva de progresso da simulação apresentada na Figura 6.17. Observe a tendência ao equilíbrio dos teores de produtos após um período.

Também é possível simular o *modelo ping-pong*, no qual a liberação de um segundo produto depende da liberação de um primeiro. Para isso, monte e rode o esquema da Figura 6.19, permitindo a visualização gráfica apenas de A (1o. substrato), F (forma intermediária da enzima), P (primeiro produto), e Q (segundo substrato). Anule os níveis das espécies enzimáticas e dos produtos para uma melhor percepção do fluxo de reagentes, e atribua $V_m=30$ para a liberação de Q ($EQ \rightarrow P$). Perceba que o segundo produto (Q) só é liberado após a transição da enzima (E) para uma forma substituída (F) induzida pelo primeiro substrato (A). Isso permite a liberação do 2o. produto (Q) após a ligação ao 2o. substrato (B). Não é possível a visualização do consumo do 2o. substrato nessa simulação, pois a opção *Init* nesse faz com que seja consumido ao início da reação, contrariando o modelo proposto.

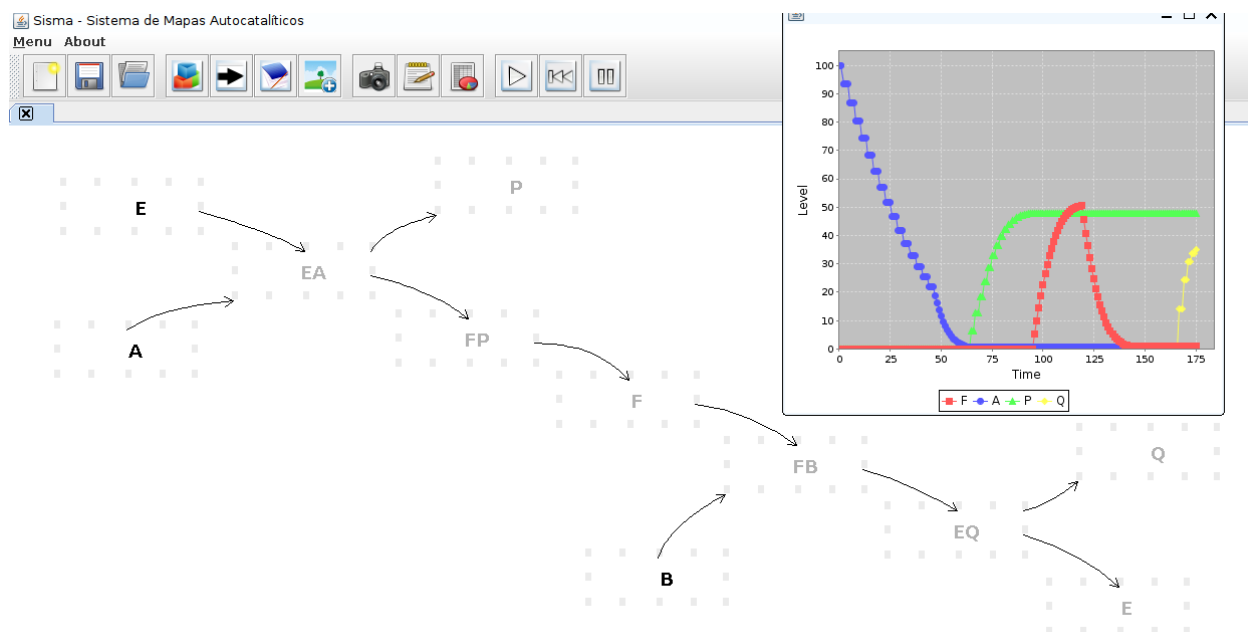


Figura 6.19: Reação de bisubstrato para um modelo ping-pong. Um produto (P) é liberado após a ligação com um substrato (A), sucedendo-se a liberação de um segundo produto (Q) após a ligação do segundo substrato (B) à enzima modificada pela primeira ligação (F). Observe que o aumento do período entre a liberação dos produtos é devido à conversão da forma substituída F da enzima. Para reproduzir o gráfico de progresso, selecione para *Plot* apenas A, B, P e Q, mantenha as equações e parâmetros padrão do programa, mas altere o valor de V_m para 30 em $EQ \rightarrow Q$.

Inibição Enzimática

A inibição de compostos sobre a atividade enzimática pode dar-se de modo irreversível (ligações covalentes, por exemplo, alquilação ou acilação no sítio ativo ou secundário) ou reversível (adsorção de compostos no sítio ativo ou não). Existem diversos arranjos para uma inibição reversível dos quais os principais estão ilustrados na Figura 7.1.

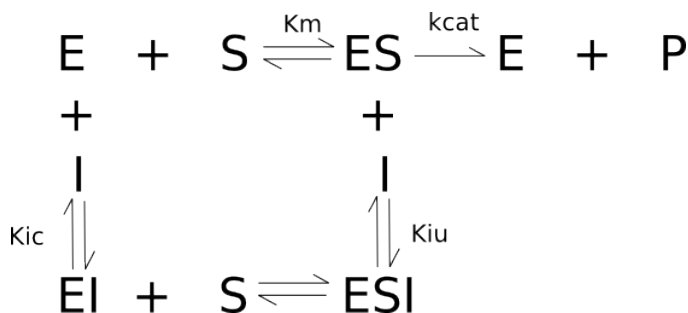


Figura 7.1: Diagrama de reações de inibição enzimática. K_m - constante de Michaelis-Menten; k_{cat} - constante catalítica; K_{ic} - constante de inibição competitiva; K_{iu} - constante de inibição incompetitiva.

Os modelos de inibição podem ser distinguidos, na prática, pelos valores de V_m e K_m aparentes encontrados na presença do inibidor. A Tabela 7.1 abaixo explicita como identificá-los:

Tabela 7.1: Variação dos parâmetros cinéticos em função do tipo de inibição enzimática.

Parâmetro	Compet.	Incompet.	Não Comp. Puro	Não Comp. Misto
V_m	-	↓	↓	↓
K_m	↑	↓	-	↑

Para se avaliar uma inibição enzimática pelo Sisma, portanto, basta comparar simulações obtidas com variação dos parâmetros cinéticos. Exemplificando, para uma *inibição competitiva*, V_m permanece constante e K_m eleva-se, como representado na Figura 7.2.

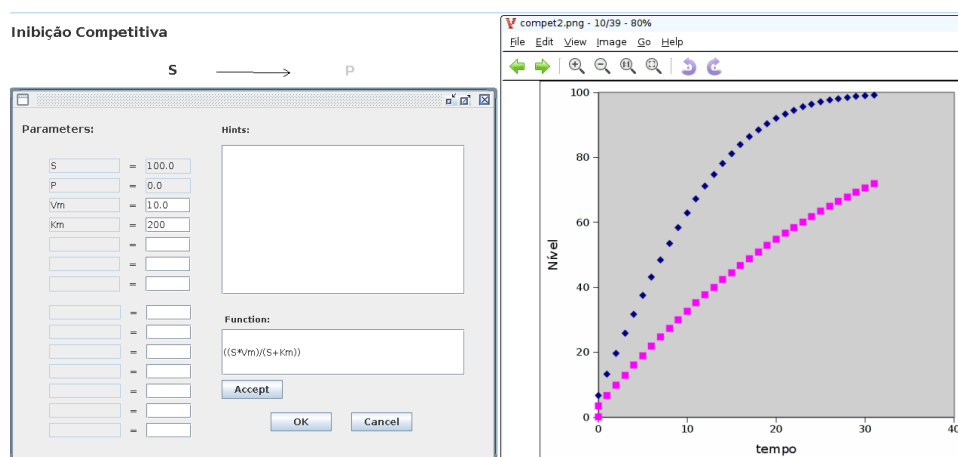


Figura 7.2: Inibição competitiva. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

A partir do mesmo raciocínio, para uma *inibição incompetitiva*, V_m e K_m decrescem proporcionalmente, de tal modo que a razão K_m/V_m aparentes iguala-se à K_m/V_m na ausência do inibidor (enzima controle). Em termos práticos, fazendo $K_m=50$ e $V_m=10$ para a curva controle, um inibidor incompetitivo poderá ter, por exemplo, $K_m=10$ e $V_m=2$ (Figura 7.3), já que ambas as razões, com e sem inibidor, resultam no mesmo valor.

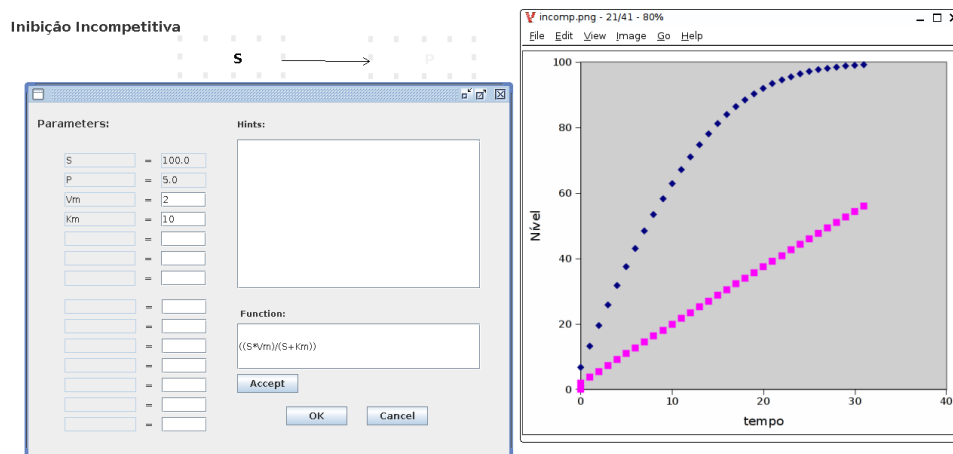


Figura 7.3: Inibição incompetitiva. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

Por sua vez, *uma inibição não competitiva pura apresenta um valor de K_m inalterado mas de V_m reduzido*, em relação à enzima controle, como exemplificado na Figura 7.4.

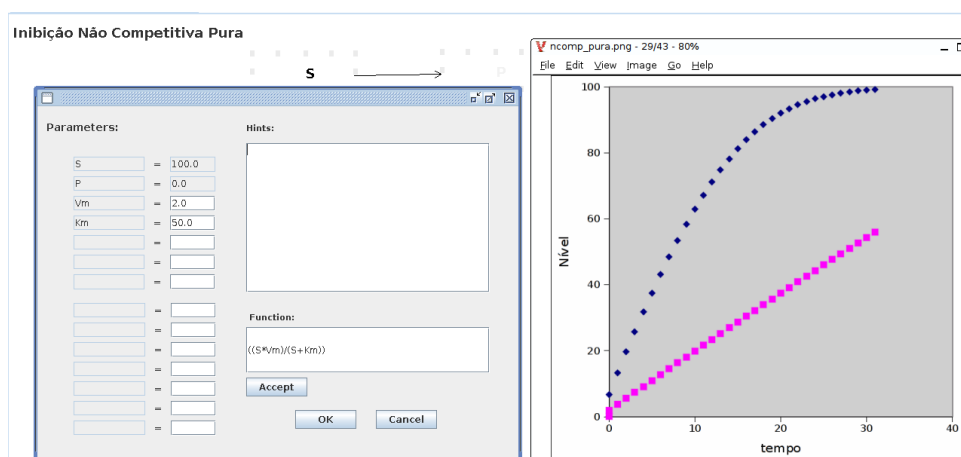


Figura 7.4: Inibição não competitiva pura. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

Por fim, uma *inibição não competitiva mista* apresenta uma redução no valor de V_m e aumento no de K_m (Figura 7.5).

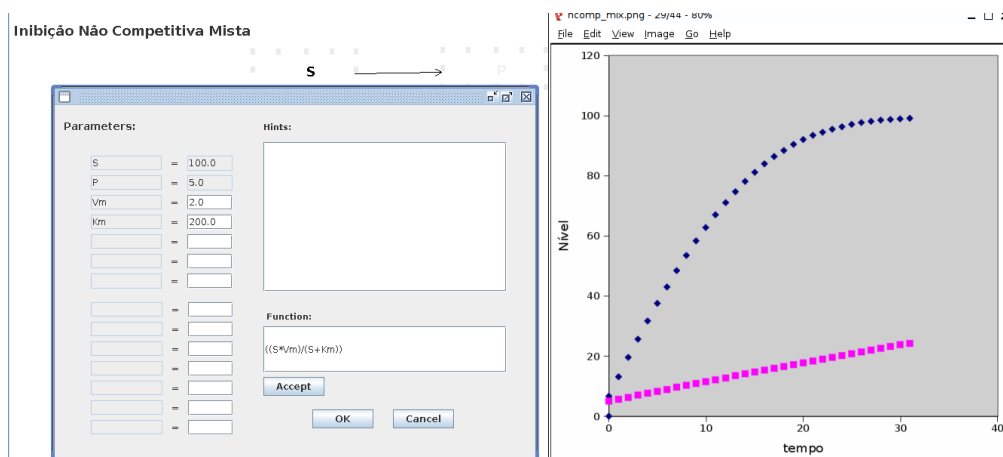


Figura 7.5: Inibição não competitiva mista. Observe o perfil da curva na presença do inibidor (rosa) e os parâmetros cinéticos utilizados. Para a curva controle (azul) foi utilizado $V_m=10$ e $K_m=50$. As curvas foram feitas em planilha após colagem dos dados exportados do Sisma.

1 Diagnóstico de Inibição

A literatura reporta um grande espectro de técnicas experimentais, de modelagem computacional e mesmo procedimentos gráficos para o discernimento dos modos de inibição enzimática. A identificação desses modos (competitivo, incompetitivo, não competitivo) é fundamental para o desenvolvimento de compostos para alvos enzimáticos drogáveis. Dentre as diversas técnicas, a observação do perfil de um gráfico duplo-recíproco (Figura 5.9) é frequentemente reportada.

Para o diagnóstico do tipo de inibição pelo gráfico duplo-recíproco, faz-se necessária sua construção para a enzima controle e a enzima inibida, numa mesma representação. Assim, tomando-se os resultados obtidos para inibição competitiva, incompetitiva, não competitiva pura e não competitiva mista, respectivamente às Figuras 7.2, 7.3, 7.4, e 7.5, e aplicando-se o *método das velocidades instantâneas* explicado ao item 3.1 desse texto, pode-se obter os valores instantâneos de v e S , e cujos gráficos recíprocos são representados à Figura 7.6.

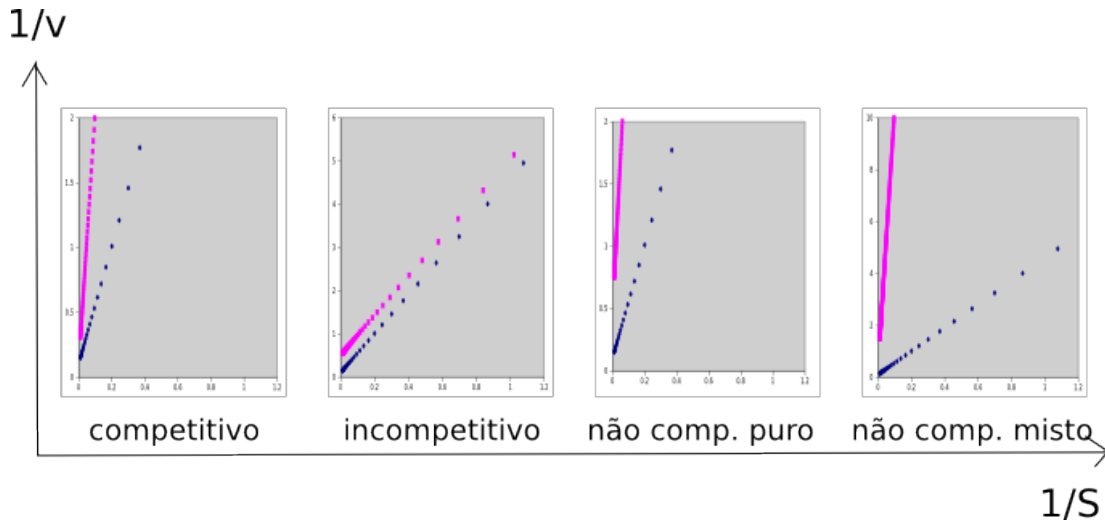


Figura 7.6: Diagnóstico de modelos de inibição enzimática. Os pontos representam a enzima controle (azul) e inibida (rosa). Os dados foram calculados a partir de simulações no Sisma variando-se os parâmetros cinéticos (vide texto).

2 Constantes de Inibição

As alterações nos valores de V_m e K_m na presença de um inibidor retratados na Tabela 7.1 acima originam, por consequência, uma alteração na própria equação de Michaelis-Menten (Equação 5.3). Dessa forma, a equação geral para os modelos de inibição retratados na Figura 7.1 transforma-se em:

$$v = \frac{V_m * S}{\alpha * K_m + \alpha' * S} \quad (7.1)$$

Onde,

$$\alpha = 1 + \frac{I}{K_{ic}} \quad e \quad \alpha' = 1 + \frac{I}{K_{iu}} \quad (7.2)$$

Com K_{ic} como a constante de *inibição competitiva* e K_{iu} como a constante de *inibição incompetitiva*. Para a *inibição não competitiva* são atri-

buidos valores a ambas. Deve-se ter em mente que, à excessão de $kcat$, as constantes de inibição presentes na Figura 7.1 reportam constantes de dissociação de seus complexos.

Por esse procedimento é possível determinar as constantes de inibição de cada modelo, tendo em vista sua magnitude, tal como representado na Tabela 7.2:

Tabela 7.2: Tipos de inibição enzimática e magnitude das constantes de inibição correlatas.

Tipo	Constantes
Sem inibidor	K_{ic} e $K_{iu} = \infty$
Competitivo	$K_{iu} = \infty$
Incompetitivo	$K_{ic} = \infty$
Não Compet. Puro	$K_{iu} = K_{ic} \neq \infty$
Não Compet. Misto	$K_{iu} \neq K_{ic} \neq \infty$

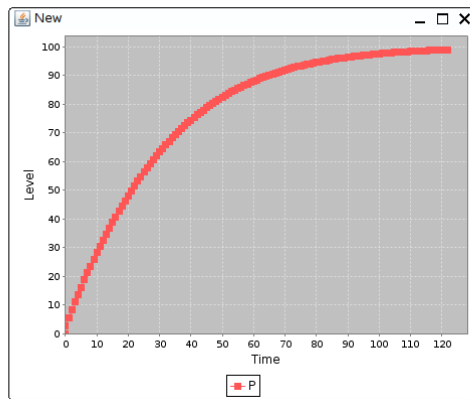
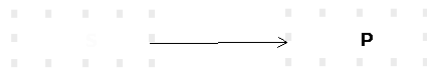
As constantes de inibição referem-se a constantes de dissociação. Assim, se uma constante tende ao infinito (∞), isso indica que não há ligação do composto.

Por outro lado, também é possível **simular uma inibição específica** fornecendo a equação apropriada. Exemplificando no *Sisma* para uma inibição competitiva: monte um esquema simples ($S \rightarrow P$), forneça nível 100 para S (só *Init*) e zero para P (só *Plot*), e utilize a seguinte *equação para inibição competitiva*:

$$v = \frac{V_m * S}{(alpha * K_m + S)} \quad (7.3)$$

Considere $\alpha=5$, $V_m=10$ e $K_m=50$, insira a equação como representado na Figura 7.7 e "rode" a simulação. Faça o mesmo para e enzima controle, como dantes, ou compare com um dos gráficos já representados dessa.

Equação Para Inibição Competitiva



Parameters:

S	=	2728236
P	=	0172714
Vm	=	10.0
alfa	=	5.0
Km	=	50.0
	=	
	=	
	=	
	=	
	=	
	=	
	=	
	=	

Hints:

Function:

$Vm * S / (alfa * Km + S)$

Accept

OK
Cancel

Figura 7.7: Simulação de cinética enzimática na presença de um inibidor competitivo.

Convertendo-se os dados pelo tratamento de velocidade instantânea, os resultados do gráfico de Michaelis-Menten resultante e duplo-recíproco para a enzima controle e inibida estão ilustrados na Figura 7.8.

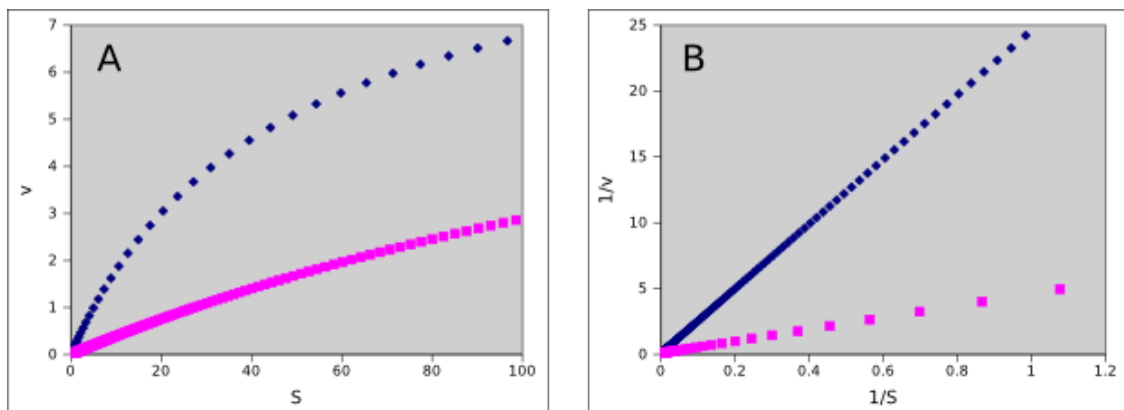


Figura 7.8: Gráfico de Michaelis-Menten (A) e Lineweaver-Burk (B) dos dados de inibição competitiva, tal como calculados a partir do emprego da Equação 7.3 (vide texto). A enzima controle está representada em azul e a inibida, em rosa.

Agora, para se comparar o valor teórico da constante de inibição inserida na equação, com o obtido pela simulação e tratamento subsequente dos dados, calcula-se o valor de K_m da enzima controle pelo duplo-recíproco ($V_m=9,4$ e $K_m=42,4$; ítem 3.1), e compara-se com o K_m obtido na presença do inibidor, ou K_m aparente, ou $\alpha * K_m$. Isso resulta em α que, pela equação 7.2, fornece o valor da constante de inibição para o modelo competitivo, K_{ic} .

OK, vamos lá: a inclinação do duplo-recíproco com inibidor ($K_m * \alpha / V_m$) resulta em $\alpha=24,5$. Tomando-se o valor de V_m e K_m da enzima controle obtém-se $\alpha=5,43$. Veja que esse valor é bem próximo do proposto na simulação para α (5,0).

Se desejar calcular a *constante de inibição para o modelo competitivo*, basta reportar-se à Equação 7.2 para determinado valor de I , concentração do inibidor. Essa estratégia pode ser igualmente empregada para os outros modelos de inibição reversível.

3 Inibição por substrato

Além da retroinibição pelo produto, a enzima também pode inibir-se na presença de um excesso de substrato. Nessa situação, vale a Equação 7.4 que segue:

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (7.4)$$

O *Sisma* pode simular essa situação, como na Figura 7.9 que segue:

Inibição por substrato

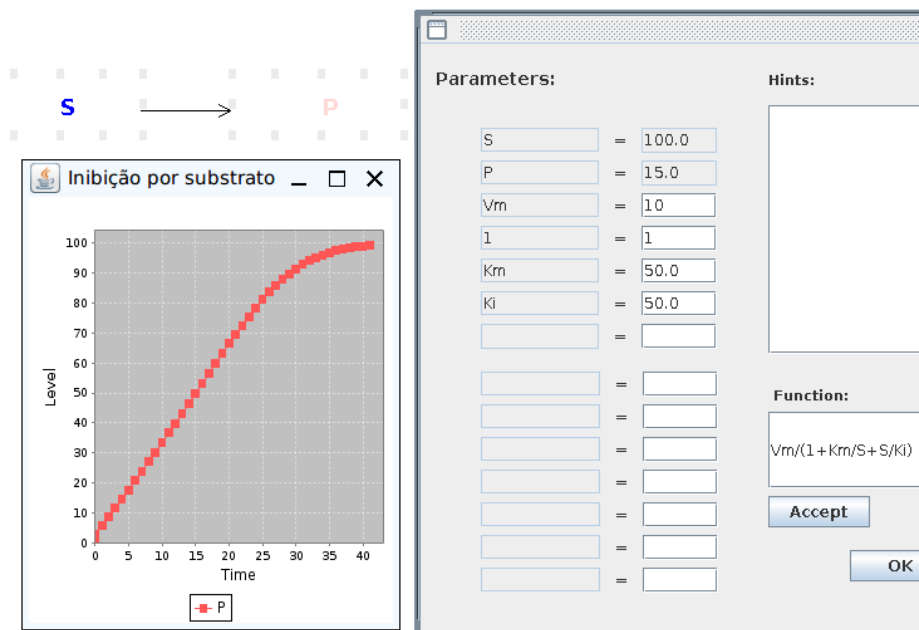


Figura 7.9: Parâmetros e curva de progresso para simulação de inibição por substrato.

Aplicando-se o método de velocidades instantâneas para os dados gerados, obtém-se a curva direta e o duplo-recíproco, tal como representado na Figura 7.10.

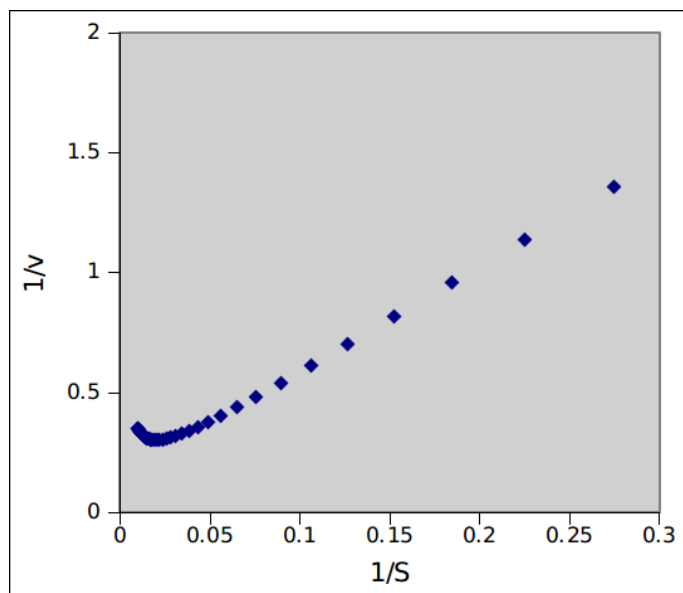


Figura 7.10: Linearização de Lineweaver-Burk para os dados de simulação da Figura 7.9.

Introdução ao metabolismo: Fenilcetonúria

Os seres vivos mantêm sua homeostasia graças aos diversos processos envolvidos no **catabolismo** e **anabolismo** celulares. Esse equilíbrio de fluxos é regulado por **processos autocatalíticos** cuja estabilidade depende de reagentes, enzimas e compostos regulatórios.

Dessa forma pode-se considerar um organismo ou suas células vivas como um **sistema de não-equilíbrio** auto-organizado [7]. Esse sistema evolui para uma organização limite por meio de flutuações que desafiam suas **estruturas dissipativas**. Nesse ponto, o **metabolismo celular** reflete um instantâneo fotográfico desse equilíbrio.

Para ilustrar no *SISMA* o equilíbrio de forças e fluxos presentes no metabolismo celular, pode-se observar o que ocorre no estabelecimento de um quadro clássico de *fenilcetonúria*. Essa disfunção metabólica decorre da ausência, ineficiência ou baixa expressão da enzima *fenilalanina hidroxilase*, bem como de *tetrahidrobiopterina* como coenzima. O quadro pode envolver demência ou alterações neurológicas em detrimento de catecolaminas derivadas de *Tyr*, produto metabólico da fenilalanina hidroxilase. Nessa condição também ocorre a elevação de compostos de alta solubilidade frente à barreira hematoencefálica, como *fenilpiruvato* e *fenilacetato*, também comprometendo a função tecidual por suas elevadas dissociações em pH fisiológico.

A Figura 8.1 exemplifica um pequeno mapa metabólico específico em que atua a fenilalanina hidroxilase.

Normal

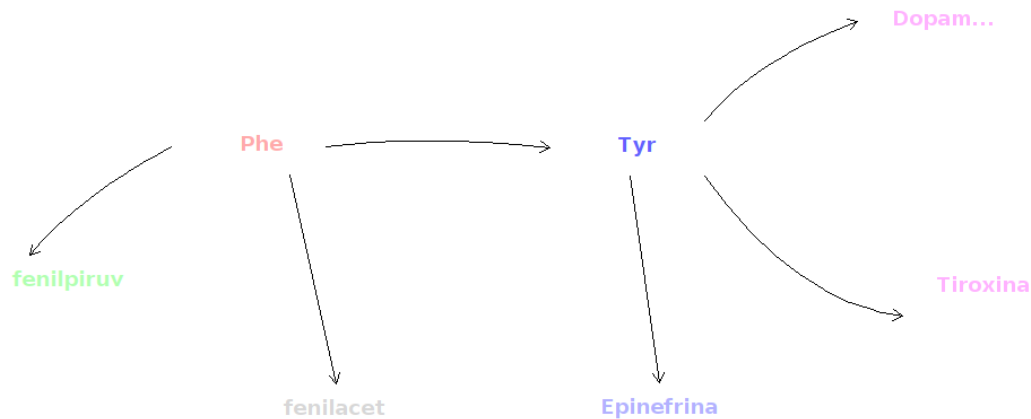


Figura 8.1: Simulação de uma disfunção metabólica envolvendo o quadro de fenilcetonúria. O mapa apresenta um instantâneo do equilíbrio entre reagentes e produtos na ausência da condição.

Para simular a condição de um indivíduo hígido (normal), altere o nível de fenilpiruvato e fenilacetato para 5. Eleve também o valor de K_m das enzimas correlatas para 200 (síntese reduzida dos compostos). Mantenha os demais compostos em 30, e os *Path* inalterados. E salve o mapa !!!

Ao rodar esse pequeno mapa do metabolismo em torno da *fenilalanina hidroxilase* é possível obter-se a imagem da Figura 8.2

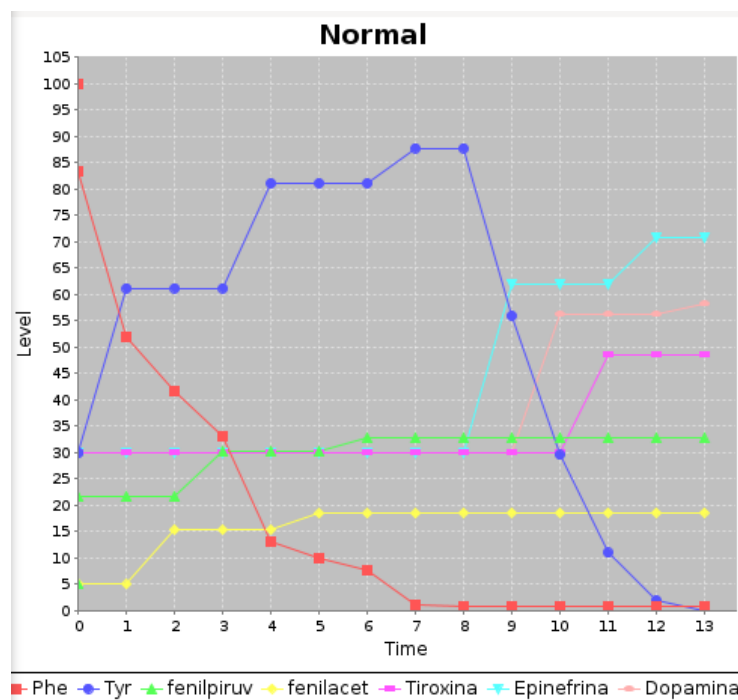


Figura 8.2: Resultado da simulação metabólica em torno da fenilalanina hidroxilase em condição fisiológica.

Perceba que os compostos tóxicos (fácil solubilidade pela barreira hema-toencefálica e consequente acidose metabólica) fenilpiruvato e fenilacetato mantêm-se reduzidos ao longo da simulação. Em oposição, os derivados metabólicos de *Tyr*, dopamina, epinefrina e tiroxina, elevam-se ao longo de sua conversão a partir do aminoácido.

Agora, para simular uma condição fenilcetonúrica, pode-se alterar os valores de K_m (elevação) ou V_m (redução) para o *Path* de fenilalanina hidroxilase. Ou, de forma mais simples e abrupta, reduzir a barra de rolagem do *Path* a zero. O resultado da janela gráfica é ilustrado pela Figura 8.3.

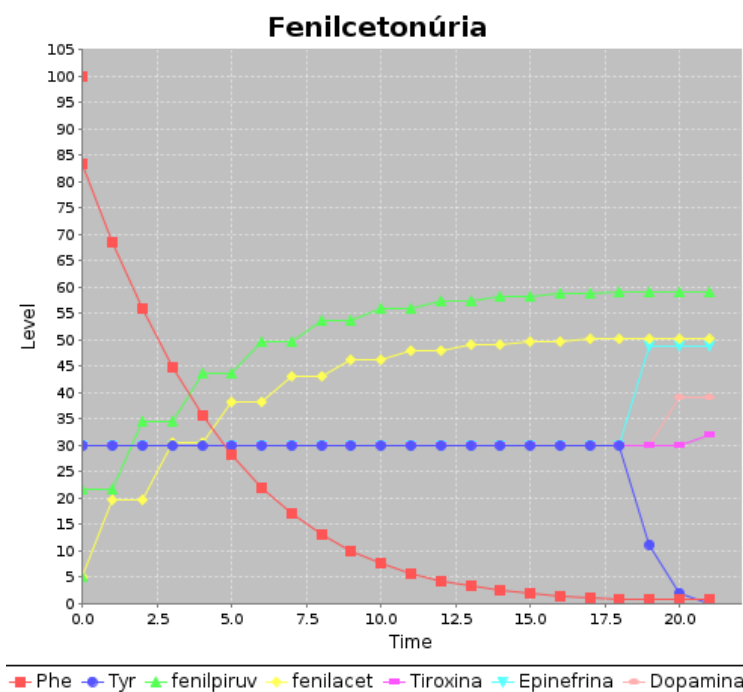


Figura 8.3: Resultado da simulação metabólica em torno da fenilalanina hidroxilase assumindo-se o quadro de fenilcetonúria por ausência da enzima.

Observe agora que as catecolaminas derivadas de *Tyr* mantêm-se ao longo da simulação quase sem alteração, sugerindo sua biossíntese reduzida em detrimento da ausência de fenilalanina hidroxilase. Também é nítido pela Figura a elevação assintótica dos compostos tóxicos fenilpiruvato e fenilacetato, uma vez que a *Phe* represada para a síntese de *Tyr* é metabolicamente desviada para esses compostos.

Observa-se, portanto, um potencial do *SISMA* para a simulação pequenas vias bioquímicas e mesmo de quadros fisio-patológicos. Inúmeras condições fisio-patológicas podem ser simuladas no *SISMA*, tais como a exemplificada para a fenilcetonúria. Essas situações podem ou não embasar-se em um formalismo mais realista dos parâmetros cinéticos ou de teores relativos dos compostos, ou simplesmente oferecer um panorama didático-pedagógico para o quadro. Os capítulos a seguir descrevem algumas dessas situações.

Metabolismo de carboidratos

O metabolismo celular é composto por diversas rotas bioquímicas, enzimas, compostos, além de um conjunto extenso de regulações. Para ilustrar o grau de complexidade metabólica, a atividade abaixo busca simular o metabolismo de carboidratos com algumas de suas principais rotas metabólicas: glicólise, ciclo de Krebs, gliconeogênese, glicogênese, glicogenólise, e via das Pentoses.

Como ilustração, pode-se elaborar um mapa metabólico resumido das principais vias metabólicas acima para carboidratos (13 compostos e 20 reações bioquímicas), e mesmo simular algumas condições fisio-patológicas, tal como descrito a seguir.

Para uma avaliação inicial, pode-se atribuir o valor de 50 para o nível de todos os compostos, exceto para glicose (100). A Figura 9.1 exemplifica esse mapa.

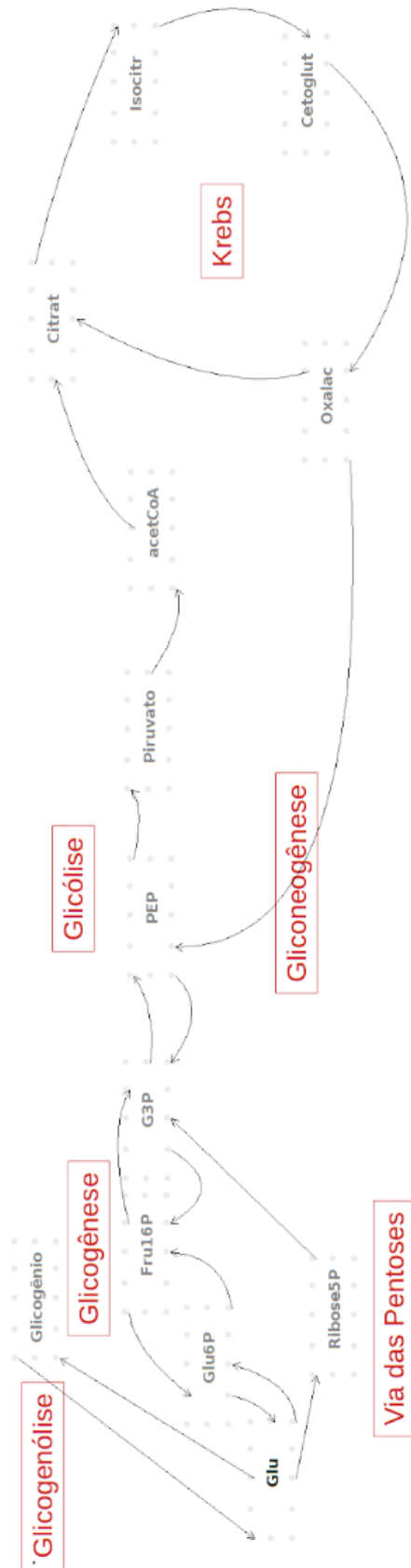


Figura 9.1: Um exemplo de mapa metabólico para as vias bioquímicas de carboidratos no SISMA.

Segue um racional para a construção do mapa da Figura 9.1:

- Abra a janela gráfica e rode o mapa, observando as variações nos teores. Se estiver muito confuso, edite alguns compostos para que não apareçam no gráfico (*Plot*).
- Regule o metabolismo de carboidratos em simulação alterando o *Speed* dos *Path* pela barra de rolagem de cada.

Nesse caso, role a barra ao *Speed* máximo para todos os compostos envolvidos na oxidação da glicose (glicogenólise, glicólise, via das Pentoses, e ciclo de Krebs), mantendo os demais sem alteração (glicogênese e gliconeogênese).

- Altere também a barra de rolagem para 10% para a glicogênese (síntese lenta de glicogênio).
- Salve e rode o mapa, observando agora como a simulação ficou mais rápida.
- Salve uma janela gráfica que exemplifique a situação fisiológica simulada.

1 Algumas condições patológicas

Para simular condições fisio-patológicas, pode-se alterar alguma barra de *Speed* ao mínimo, como segue. Para cada simulação, deve-se retornar ao início (*ícone* | <<).

1.1 Intoxicação por arsênico

- Deslize a barra de rolagem ao mínimo para o *Path* de alguma desidrogenase do ciclo de Krebs (isocitrato, c
- Salve o mapa com outro nome, pra não sobrepor-se ao original !
- Rode o mapa e observe as alterações.
- Salve a janela gráfica e compare com a janela de simulação fisiológica anterior.

1.2 Doença de depósito de glicogênio

- Repita o procedimento acima, mas agora com a glicogenólise (não esqueça de reverter o *Speed* no ciclo de Krebs).
- Salve o mapa com outro nome, pra não sobrepor-se ao original !
- Rode o mapa e observe as alterações. Salve a janela gráfica e compare com a janela de simulação fisiológica anterior.

1.3 Diabetes mellitus

- Com os *Speed* revertidos da simulação anterior, deslize ao mínimo a conversão de glicose a Glu6P.
- Salve o mapa com outro nome, pra não sobrepor-se ao original !
- Rode o mapa e observe as alterações. Salve a janela gráfica e compare com a janela de simulação fisiológica anterior.

2 Controle secundário por Km

Vias metabólicas são primariamente reguladas por:

1. Oferta de substrato;
2. Controle alostérico;
3. Modulação covalente (fosforilação de enzimas)
4. Modulação neuroendócrina
5. Expressão genômica

Por outro lado, algumas rotas metabólicas são reguladas secundariamente por enzimas que atuam sobre um mesmo substrato em pontos de bifurcação importantes às células. Por esse mecanismo, o substrato é convertido em função dos valores de Km de cada uma. Exemplo disso é a conversão de isocitrato em plantas oleaginosas pela *isocitrato desidrogenase* do ciclo de Krebs e pela *isocitrato liase* do ciclo do Glioxilato [8].

Para simular essa modulação, elabore um trecho do ciclo de Krebs contendo o ciclo do Glioxilato, tal como ilustrado na Figura 9.2, e descrito a seguir (e salve o mapa !!).

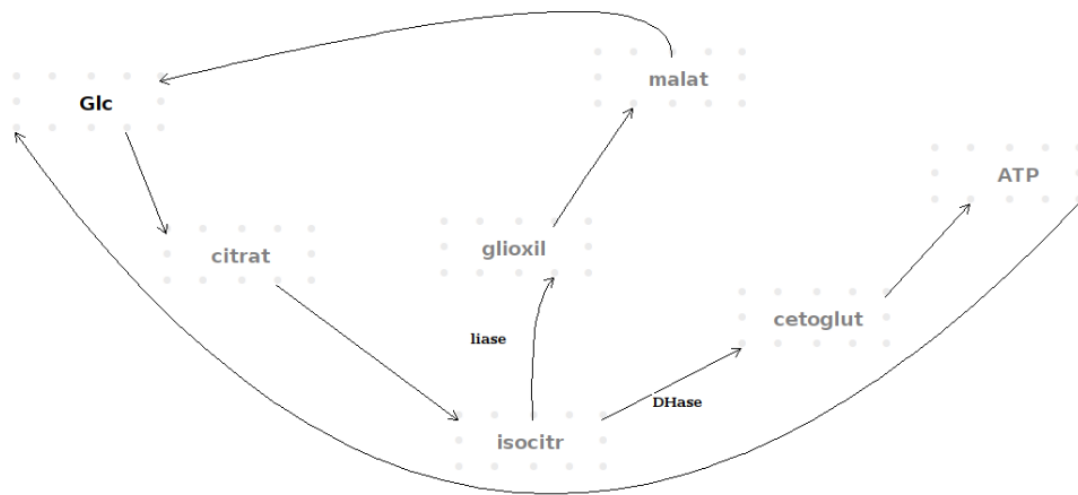


Figura 9.2: Mapa para simulação do controle secundário pelo isocitrato do ciclo de Krebs-Glioxilato.

1. Mantenha todos os níveis em 50, exceto para glicose (100).
2. Para reduzir a poluição visual da janela gráfica, selecione para visualização apenas glicose, isocitrato, cetoglutarato e glioxilato (desselecionando em *Plot*).
3. Salve o mapa e abra a janela gráfica, permitindo visualizá-la em paralelo ao mapa.
4. Rode o programa e interrompe-o pela janela gráfica (*Pause*) após alguns segundos, quando perceber flutuações em cetoglutarato e glioxilato.
5. Salve a janela gráfica para comparação futura.
6. Retorne ao início da simulação (ícone de retrocesso | <<).
7. Agora altere os valores de Km para as seguintes enzimas dos *Path*, conforme abaixo:

Para glioxilato (liase): 600

Para cetoglutarato (desidrogenase): 8

8. Salve o mapa !!
9. Rode o SISMA novamente, e observe as variações de teores, e em especial, junto às enzimas que atuam sobre isocitrato.
10. Salve a janela gráfica conforme item anterior e avalie as diferenças em relação àquela.

Metabolismo de lipídios

Como o *SISMA* permite a adição de objetos e caminhos elaborados em mapas anteriores, utilize o mapa de metabólico de carboidratos desenvolvido na seção anterior para sua extensão ao metabolismo de lipídios. Para isto:

- Elabore o mapa da Figura 10.1.
- Mantenha os valores de *Speed* dos novos *Path* ao máximo.
- Mantenha os novos objetos em nível 50.
- Salve o mapa com nome distinto do anterior, para não ter de ajustar configurações futuras.
- Retire a visualização de todos os compostos do metabolismo de carboidratos, ou seja, aqueles que não foram adicionados para o metabolismo de lipídios.
- Nos *Paths* do metabolismo de lipídios, mantenha apenas a *beta-oxidação de ácidos graxos* presente, retirando a lipogênese (*Speed* ao mínimo).
- Salve novamente o mapa !!
- Abra o gráfico de progresso e ajuste-o na tela.
- Rode o mapa e, após cerca de 2 min (observados no eixo de tempo do gráfico), observe os níveis dos compostos do metabolismo de lipídios.
- Trace algumas conclusões bioquímicas.

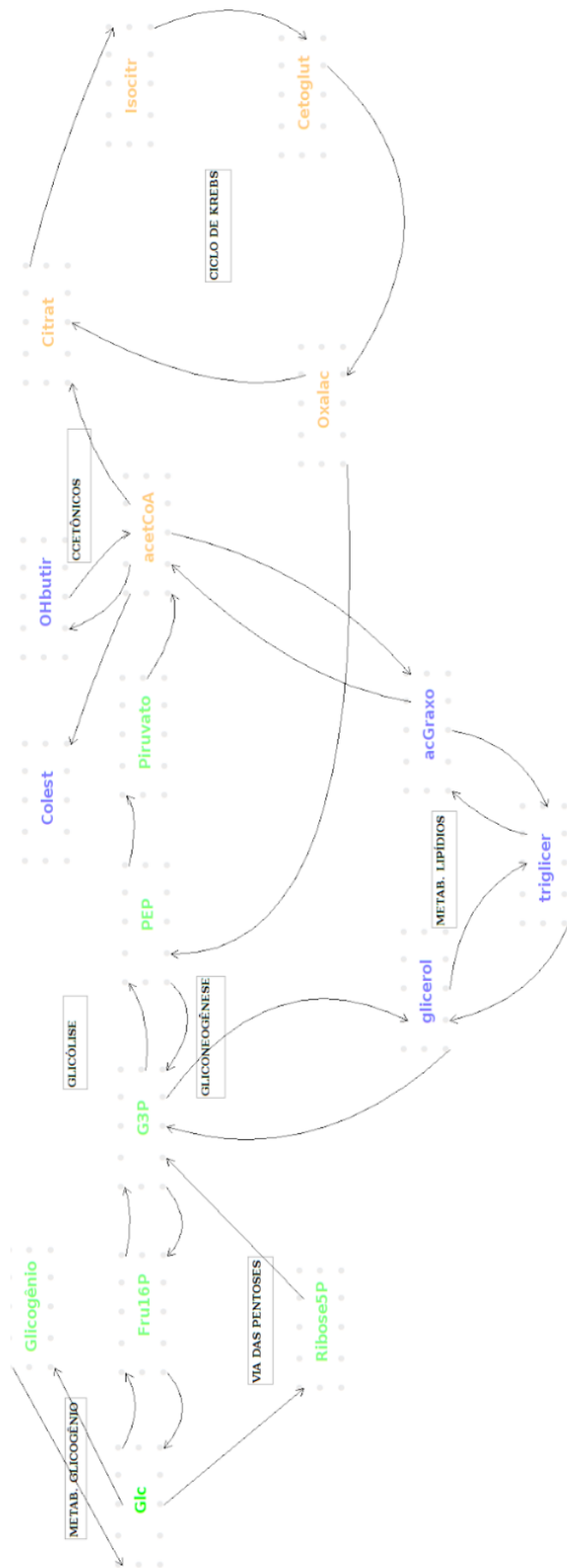


Figura 10.1: Simulação do metabolismo de lipídios e sua influência recíproca no de carboidratos.

1 Efeito de uma disfunção do metabolismo de carboidratos sobre o metabolismo de lipídios

Como antes, é possível observar pelo gráfico de progresso do *SISMA* em paralelo às mudanças de luminosidade dos compostos envolvidos, um efeito da natureza explicitada acima. Para isto:

- Simule uma condição patológica da via glicolítica, interrompendo o fluxo da Glicólise nas suas enzimas (*Speed* ao mínimo), com auxílio do mapa original (sem bloqueio da síntese de lipídios).
- Retire a visualização dos compostos da Glicólise, ciclo de Krebs, Via das Pentoses, e metabolismo do Glicogênio (mas mantenha a visualização da glicose).
- Salve o mapa, mas com nome distinto, identificando a condição metabólica (ex: semGlicolise), e evitando que se tenha de modificar os *Paths* novamente para sua configuração original em outras simulações.
- Abra o gráfico de progresso, e ajuste-o na tela.
- Rode o mapa.
- Após cerca de 2 min (eixo do gráfico), observe como estão os níveis dos compostos e deduza as razões metabólicas para:

Colesterol

Ribose5P

Glicose

Triacilglicerol

Ácidos graxos

Corpos cetônicos

Piruvato

Compostos da via glicolítica

Metabolismo de aminoácidos e nucleotídios & Mapa Metabólico Dinâmico

Elevando-se um pouco mais a complexidade do últimos mapas metabólicos construídos, pode-se inserir informações acerca de rotas bioquímicas para grupos nitrogenados, tais como aminoácidos e nucleotídios (Figura 11.1).

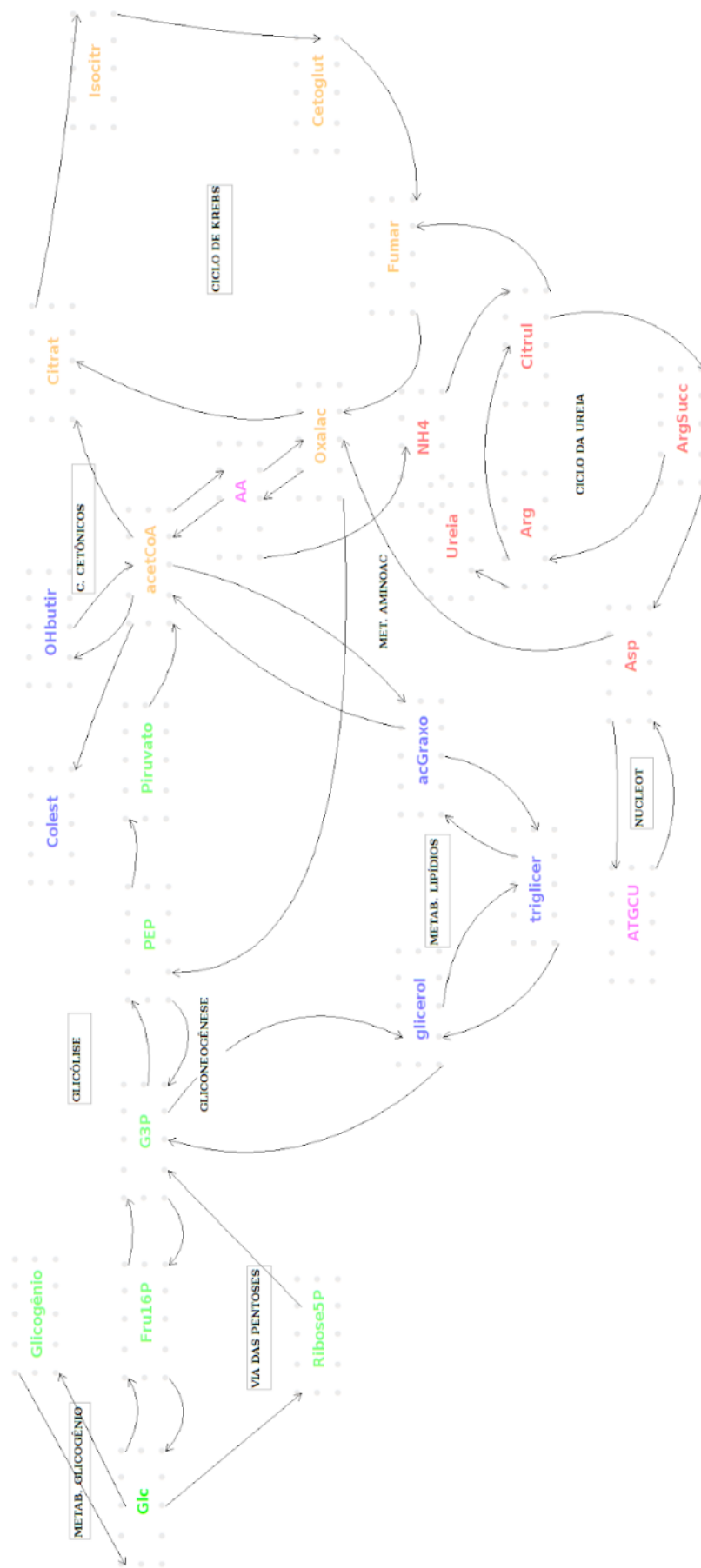


Figura 11.1: Mapa metabólico contendo 26 compostos (*Object*) e 45 reações (*Path*). A simulação contempla algumas rotas do metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos.

Segue um pequeno racional para ilustrar o metabolismo celular como um todo, incluindo aminoácidos e nucleotídios, a partir da 11.1:

- Mantenha todos os compostos em nível 50 e *Speed* máximo.
- Rode o mapa e observe como o metabolismo de carboidratos, lipídios, e agora de aminoácidos, ocorre de forma dinâmica e integrada na simulação do metabolismo basal.
- Observe a formação crescente da ureia, que ocorre após aproximadamente 300 s observados no eixo de tempo do gráfico (não o tempo real, já que os *Path* estão acelerados ao máximo).
- Observe também o nível de glicose no período.

1 Intervenções no Mapa Metabólico Dinâmico

Com o mapa metabólico elaborado como na 11.1, é possível avaliar-se um grande número de intervenções, ativações, inibições, condições fisiológicas específicas ou de Patobioquímica. Os exemplos a seguir apenas tangenciam essas possibilidades.

1.1 Bloqueio na produção de ureia

Simule uma condição na qual a ureia não é produzida:

- Leve ao nível zero o caminho de formação de citrulina a partir de NH_4 .
- Leve ao nível zero os compostos do ciclo da ureia, exceto NH_4 .
- Salve o mapa com outro nome e abra a janela gráfica.
- Rode o mapa e observe como fica a produção de ureia após 300 s de simulação.

1.2 Bicicleta de Krebs

A bicicleta de Krebs compreende um hiperciclo metabólico que interliga diretamente o fumarato do ciclo de Krebs e indiretamente o aspartato, ao Ciclo da Ureia. Nesse sentido é interessante comparar-se o funcionamento do hiperciclo a uma disfunção nele gerada. Para ilustrar isso:

- Retorne o último mapa a seu início ($| <<$).

- Libere a visualização de Cetoglutarato do ciclo de Krebs.
- Abra a janela de progresso e rode o mapa novamente até 425 s.
- Copie a imagem gráfica e cole-a num editor (Word, por ex).
- Abra o mapa original sem o bloqueio do Ciclo da Ureia (ou retire o bloqueio deste).
- Repita as operações de abrir a janela de progresso, rodar o mapa, e copiar a imagem num editor.
- Compare os níveis de Cetoglutarato produzidos.

1.3 Conversões simultâneas

Como *default* o *SISMA* atribui a um primeiro composto sua inicialização no mapa (*Init*, retirando dos seguintes essa condição. Dessa forma obtém-se um mapa sequencial de reações e cujo ordenamento é ditado pelos *Paths*. O metabolismo, contudo, não obedece essa lógica sequencial, mas uma multiplicidade de conversões simultâneas para os analitos que o compõe.

Para simular esse paralelismo de reações e reduzir ligeiramente o artificialismo das conversões metabólicas estudadas com o *SISMA*, permita que alguns compostos possam também inicializar as reações simultaneamente (por exemplo, acetilCoA, Glicerol, Cetoglutarato, Piruvato, Ác. Graxo, Fumarato, Citrulina, e Ribose5P). ¹

Para isso:

- Abra a janela do composto que se deseja inicializar e clique em *Init*.
- Salve o mapa com outro nome e rode-o por cerca de 425 s, repetindo as operações anteriores de colagem da figura do mapa em editor, para comparação.
- Compare com o mapa em que apenas a Glicose é permitida reagir inicialmente, observando:

Os níveis de compostos nos primeiros segundos da simulação.

A flutuação de Glicose ao longo do período.

Algum composto cuja flutuação fora distinta ²

¹Apesar de mais realista, a inicialização simultânea exige por consequência um maior consumo de memória RAM para rodar o mapa.

²Um maior realismo pode agregar-se também com valores de Km e Vm distintos para as reações metabólicas, bem como o teor de cada composto, obtidos da literatura.

Como funciona o SISMA

O software foi escrito na linguagem de programação Java e distribuído como um pacote *JAR* (*Java ARchive*). Uma característica da escolha do *Java* foi a possibilidade de execução multiplataforma, tendo sido testado nas plataformas Windows e Linux. Como o objetivo do software é representar fluxos e reações complexas, um dos desafios do desenvolvimento foi a simulação por eventos discretos (SED), já que os estados mudam de valor em pontos discretos no tempo.

A versão atual do software utiliza a estrutura de filas (*FIFO* - *First in First out*) para o controle da execução, e na qual os primeiros objetos são analisados e adicionados para a fila de execução no próximo tempo discreto se possuírem vias de transferência de valores para outros objetos.

Assim são formados os tempos discretos da simulação, nos quais podem ocorrer mais de uma transferência de valores no mesmo momento, e que são os eventos da simulação do modelo. A representação do mapa pode ser facilmente traduzida em um arquivo *XML* (*eXtensible Markup Language*), uma linguagem de marcação utilizada na *web* para transferência de dados.

1 A lógica das conversões no SISMA

No que tange ao formalismo matemático que permite ao *SISMA* as transformações entre objetos interligados por caminhos, ressalta-se que a relação é bastante simples, e mesmo limitada, embora permita simulações de relativa complexidade.

Para ilustrar essa relação de forma quantitativa, suponha uma reação simples e univetorial de conversão de *R* em *P*. Partindo-se de nível 100 para *R*, 0 para *P* no tempo inicial, e atribuindo-se o valor de 50 para ambos *V_m* e *K_m*, o *SISMA* aplica a equação de Michaelis-Mentem (Equação 5.3).

Uma simplificação da simulação de reações decorre da natureza da equação

de Michaelis-Mentem como função *default* do programa, a qual fornece a velocidade inicial de uma reação enzimaticamente catalisada. No *SISMA*, contudo, as conversões possuem o nível (ou teor) de cada composto como resultado de saída, grandeza de unidade distante da velocidade. Não obstante, a simulação se dá por filas e com saída discreta de dados, e a um intervalo de tempo relativo a 1 s de execução computacional. Embora isso constitua uma limitação em relação ao formalismo da cinética enzimática (teor ao invés da razão de teor sobre tempo), a simulação permite tangenciar aquele devido ao intervalo unitário de tempo. Alternativamente, na busca de uma solução mais adequada, o usuário pode introduzir equações que melhor se ajustem conceitualmente à solução de um problema específico.

1.1 Exemplo numérico de uma simulação

Como resultado para a primeira iteração da simulação descrita nos parágrafos anteriores, um cálculo simples mostra que P eleva-se para 33,33 enquanto R reduz para a diferença entre esse valor e o nível prévio de 100, ou seja, 66,67. Para os tempos posteriores de simulação, a mesma regra simples é aplicada. Ou seja, para o tempo de 1 s, por exemplo, o valor de R cai para 38,10 enquanto que o de P sobe para 61,90.

É particularmente interessante a simulação comparativa desse mecanismo iterativo com um aplicativo matemático que permita programação, como o R , por exemplo (<https://cran.r-project.org/>). O R é um software gratuito desenvolvido para computação estatística e gráficos. Pode ser rodado em diversas interfaces de usuário (GUI), dentre as quais destaca-se o *RStudio* (<https://www.rstudio.com/>), um ambiente de desenvolvimento integrado (IDE) também gratuito.

O *script* que segue desenvolvido no R e *RStudio* ilustra a mesma simulação descrita acima pelo *SISMA*.


```

# Script de simulação do SISMA - reação R <--> P
Rv<-c(100)
Pv <- c(0)
R=100
P=0
Vm=50
Km=50

for(i in 1:2) {
  while (R>0) {
    diff=Vm*R/(Km+R)
    R=R-diff
    Rv<-append(Rv,R)
    P=P+diff
    Pv<-append(Pv,P)
  }

  while (P>0) {
    diff=Vm*P/(Km+P)
    P=P-diff
    Pv<-append(Pv,P)
    R=R+diff
    Rv<-append(Rv,R)
  }
}

t=seq(1,length(Rv))
plot(t,Rv,col=1,type="l",ylab="composto")
points(t,Pv,col=2,type="l")

```

Figura 12.1: Script de simulação da reação reversível $R \rightleftharpoons P$ do *SISMA* elaborada no *R*.

Como resultado, obtém-se uma simulação pelo *R* e *Studio* comparável a do *SISMA*, tal como ilustrado pela Figura 12.2.

A simulação gráfica pelo script da Figura 12.1 pode ser comparada à do próprio *SISMA*, tal como representado abaixo.

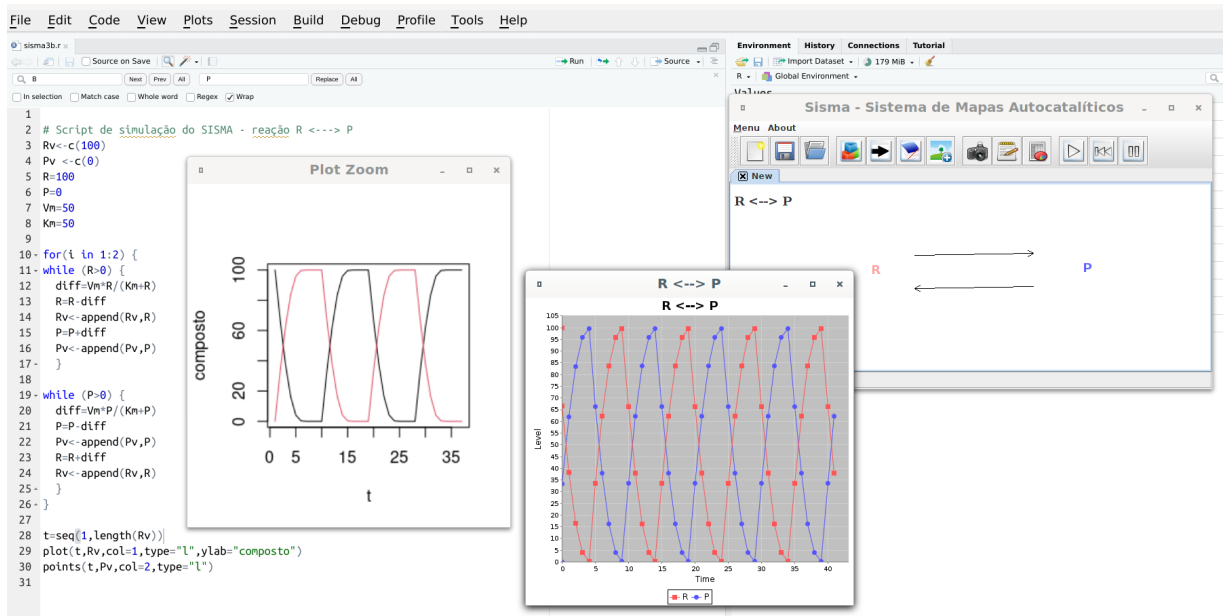


Figura 12.2: Comparação das saídas gráficas do *SISMA* e do *RStudio* (à esquerda) para o script da Figura 12.1.

1.2 Informações da simulação por Terminal

O *Terminal* refere-se a um interpretador de linha de comando, como o *CMD* para *Windows* ou *shell* para *Linux*, que recebe os comandos do usuário a partir do teclado e os repassa ao sistema operacional. Acessando-se o *SISMA* por *Terminal* é possível acompanhar algumas informações suplementares de uma simulação que não são visíveis pelo executável do programa nos respectivos sistemas operacionais.

Essas informações referem-se às equações e consequentes dados quantitativos obtidos ao longo da execução do mapa. A Figura 12.3 ilustra essa característica em um *Terminal Linux*, utilizando-se as informações coletadas durante a simulação a que se refere a Figura 12.2. Perceba que a execução do *SISMA* pelo *Terminal* deu-se no diretório *dist* do programa, e pelo comando de execução *Java "java -jar Sisma-Realese_1.1.jar"*

```

zema@antix1:~/Dropbox/pesq22/Sisma2/Sisma/dist
$ java -jar Sisma_Realese_1.1.jar
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
taxa atual: 33.333333333333336
taxa atual: 28.571428571
taxa atual: 21.621621621
taxa atual: 12.391093901
taxa atual: 3.7743455539
taxa atual: 33.299020947
taxa atual: 28.521008547
taxa atual: 21.549459720
taxa atual: 12.305307156
taxa atual: 3.7182966760
taxa atual: 33.300074883
taxa atual: 28.522557297
taxa atual: 21.551675581
taxa atual: 12.307937629

taxa atual: 3.7199582575593793
1.0.0 New
-----|
Composto: R do Grupo: Black
Volume:100.0
Numero de Vias: 12
-----|
Composto: P do Grupo: Black
Volume:0.0
Numero de Vias: 12
-----|

((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
((A*C)/(A+D))
taxa atual: 33.333333333333336
taxa atual: 28.57142857142857

```

Figura 12.3: Exemplo de saída por *Terminal* Linux, das informações referentes à execução do mapa da Figura 12.2 pelo *SISMA*.

2 Editando o arquivo de mapa

Uma característica interessante da construção de mapas dinâmicos pelo *SISMA* reside no arquivo ***.sis** gerado. Trata-se de arquivo de texto facilmente editável em qualquer processador de mesma natureza (Notepad, Word, Gedit, etc). Isso confere a um mapa criado no *SISMA* a possibilidade de sua modificação no próprio arquivo de texto, em contraposição ao uso de janelas por clique de mouse.

Se por um lado a inserção e edição de objetos e caminhos no mapa encerra um formato visual (*WYSIWYG* - "*What You See Is What You Get*"; *formatações são relevantes*), por outro a edição do arquivo do mapa para os mesmos fins pode ser realizada sem qualquer abertura e fechamento de ja-

nelas (*WYSIWYM* - "*What You See Is What You Mean*"; informações são relevantes), o que agrega vantagem quando se deseja alterações múltiplas num mapa.

Ilustrando-se essa edição, elabore um mapa simples no *SISMA*, apenas com *R* e *P* conectados por um *Path*, com *P* em vermelho, e salve-o (12.4.

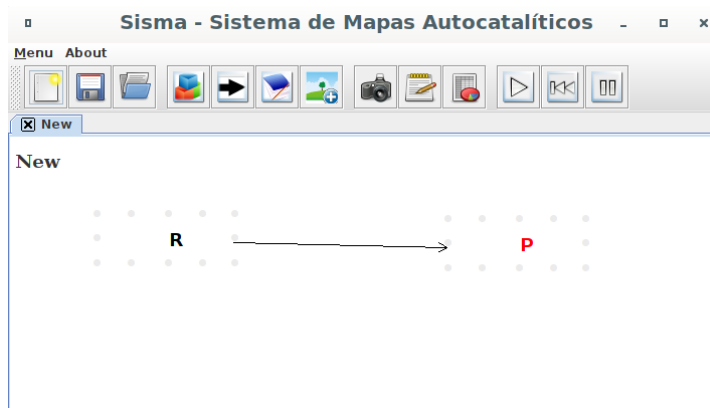


Figura 12.4: Tela do SISMA apresentando uma conversão simples entre reagente (R) e produto (P).

Agora localize o arquivo do mapa. A edição do arquivo **.sis* gerado deverá produzir um conteúdo tal como observado na Figura 12.5 abaixo.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<mapa versao="1.0.0" nome="New">
  <compostos>
    <composto id="1" nome="R" cor="Black" level="100.0" plot="true" init="true"
posX="62" posY="88" />
    <composto id="2" nome="P" cor="Red" level="100.0" plot="true" init="false"
posX="411" posY="93" />
  </compostos>
  <vias>
    <via idCompostoA="1" idConectorA="4" ctrlX="429" ctrlY="80" idCompostoB="2"
idConectorB="3" interferenciaQuantidade="3" interferenciaExiste="true"
equation="((R*Vm)/(R+Km))" infoEq="">
      <variaveis>
        <variavel nome="Vm" valor="50.0" />
        <variavel nome="Km" valor="50.0" />
      </variaveis>
    </via>
  </vias>
  <DrawAreasTexto />
  <DrawImagens />
</mapa>

```

Figura 12.5: Visualização do arquivo de texto *.sis gerado pelo SISMA.

Observe que o arquivo produzido contém todas as informações necessárias à criação do mapa, entre as quais:

1. O nome do mapa;
2. Os objetos, com nome, cor, nível, opção de inicialização, e posição no ecrã;
3. O caminho entre os objetos e sua descrição (*idConector*);
4. A equação *default* do *Path* (Michaelis-Menten);
5. Os parâmetros da equação e seus valores (*default*).

Se desejar alterar qualquer atribuição elencada acima para o mapa, basta editar esse arquivo e armazená-lo com outro nome. A Figura 12.6 exemplifica essa ação, com alteração simultânea no nome do mapa, de um objeto, sua cor e posição.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<mapa versao="1.0.0" nome="Editado">
  <compostos>
    <composto id="1" nome="Res" cor="Orange" level="100.0" plot="true" init="true"
posX="22" posY="18" />
    <composto id="2" nome="P" cor="Red" level="100.0" plot="true" init="false"
posX="411" posY="93" />
  </compostos>
  <vias>
    <via idCompostoA="1" idConectorA="4" crtLX="429" crtLY="80" idCompostoB="2"
idConectorB="3" interferenciaQuantidade="3" interferenciaExiste="true"
equation="((R*Vm)/(R+Km))" infoEq="">
      <variaveis>
        <variavel nome="Vm" valor="50.0" />
        <variavel nome="Km" valor="50.0" />
      </variaveis>
    </via>
  </vias>
  <DrawAreasTexto />
  <DrawImagens />
</mapa>

```

Figura 12.6: Visualização do arquivo de texto *.sis apresentado na Figura 12.5, e editado para modificação em nomes, posição e cores de objetos.

Abrindo-se esse arquivo editado no *SISMA* obtém-se o mapa modificado, tal como representado na Figura 12.7.

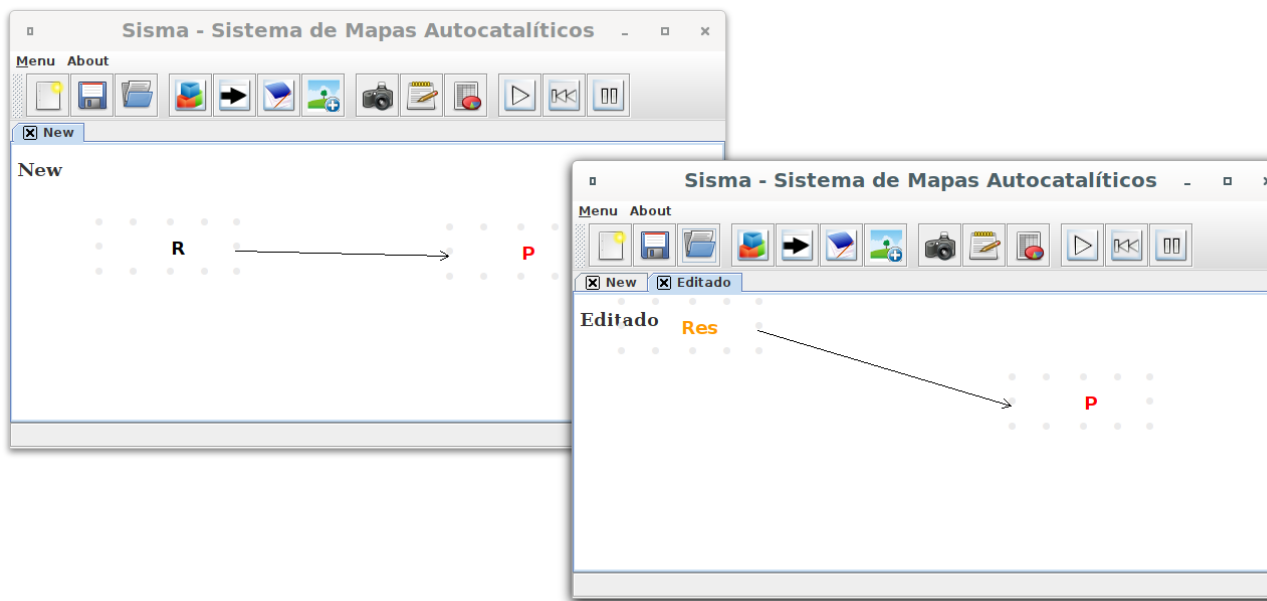


Figura 12.7: Telas do *SISMA* contrapondo-se o mapa original da Figura 12.4 (esquerda) com o editado em arquivo de texto **.sis*, conforme a Figura 12.6 (direita).

A vantagem em se editar a informação de um mapa no *SISMA* tem mais significância quando se deseja alterar uma determinada característica, como cor, nível, ou equação, para um conjunto de objetos & caminhos. Se a edição se der pra cada ítem isoladamente, será necessário utilizar o mouse para abertura e fechamento em diversos momentos. Se por outro lado a edição puder se concretizar a partir do arquivo original de texto, então pode-se alterar as características acima apenas com atalhos comuns de busca no texto.

Exemplificando para o mapa metabólico geral apresentado na Figura 11.1, pode substituir-se simultaneamente todas os parâmetros cinéticos V_m por k_{cat} , bem como as cores em laranja do ciclo de Krebs para preto.¹

¹Em editores de texto comuns, por exemplo, o atalho de substituição em sistemas Windows ou Linux costuma ser Ctrl+R, e o de busca Ctrl+F.

Bibliografia

- [1] Kenneth A Johnson and Roger S Goody. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, 50(39):8264–8269, 2011.
- [2] John A Dudek. Review of the 1925 Briggs-Haldane Enzyme Kinetics Paper Including a Typographic Error Correction. 2022.
- [3] Shyun-Long Yun and Clarence H Suelter. A simple method for calculating K_m and V from a single enzyme reaction progress curve. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 480(1):1–13, 1977.
- [4] Hans Lineweaver and Dean Burk. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3):658–666, 1934.
- [5] Athel Cornish-Bowden. Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes. *The FEBS journal*, 281(2):621–632, 2014.
- [6] Jacque Monod, Jeffries Wyman, and Jean-Pierre Changeux. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 12(1):88–118, 1965.
- [7] Eric Karsenti. Self-organization in cell biology: a brief history. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3):255–262, 2008.
- [8] Constance S Stueland, Keith Gorden, and David C LaPorte. The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle. Identification of the primary rate-limiting step. *Journal of Biological Chemistry*, 263(36):19475–19479, 1988.