

QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo

Guia de estudos

Aula 6: Enzimas 2

A aula de enzimas foi dividida em duas partes. A parte da leitura básica que aborda sobre cinética enzimática já foi adicionada ao guia da aula 5 e deve ser lido agora. Na figura 5.6 página 12 entenda que o equilíbrio é na verdade o “estado estacionário” e o termo usado pode levar a equívocos. Além desta leitura já indicada anteriormente, nesta aula será colocado apenas mais um pequeno texto sobre enzimas alostéricas e regulação por modificação covalente. Estes são importantes aspectos sobre enzimas e como elas regulam o metabolismo.

19 Estratégias de Regulação do Metabolismo

A estabilidade da massa corpórea e do aspecto geral de um indivíduo adulto e sadio esconde as grandes flutuações diárias de seu metabolismo. De fato, a ingestão periódica de alimentos submete o organismo humano a situações opostas que se alternam: abundância e escassez de nutrientes. A adaptação a esta variação deriva de sistemas reguladores capazes, não só de reconhecer a situação nutricional vigente, como de responder apropriadamente a ela. Após uma refeição, as moléculas absorvidas são convertidas em compostos de reserva, utilizados nos períodos de jejum, além de seguirem outros destinos metabólicos. A glicose, por exemplo, poderá ser oxidada a CO_2 e H_2O , mas poderá também gerar o esqueleto de carbono de aminoácidos não essenciais, ser polimerizada a glicogênio ou ser convertida a gordura.

As vias metabólicas não funcionam sempre com a mesma velocidade. Ao contrário, cada via será acionada com intensidade variada, segundo a situação fisiológica considerada, que depende não apenas de estados nutricionais diferentes, mas, também, de demandas energéticas diferentes, como no repouso ou sob exercício vigoroso. A adequação do metabolismo às diferentes condições fisiológicas é obtida graças a processos que, em conjunto, são chamados de *regulação metabólica*. Os eventos de regulação não são isolados; cada um deles atua como um gerador primário de sinais, captados por geradores secundários, capazes de retransmiti-los até atingir toda a rede metabólica e repercutir, à distância, em outros órgãos. A complexidade do processo é enorme, mas justifica-se por permitir um ajuste sensívelíssimo do metabolismo a diferentes situações, propiciando uma resposta pronta e logicamente organizada.

Diante desta complexidade, *a regulação metabólica é descrita nas seguintes etapas:*

- 1ª) **Estratégias** de que o organismo dispõe para regular o metabolismo — este capítulo (Capítulo 19)
- 2ª) **Regulação das vias metabólicas** apresentadas na *Parte 3 | Metabolismo: Vias Principais*, Capítulo 20
- 3ª) **Regulação metabólica integrada** — Capítulo 21. Os dados recolhidos em cada uma das vias são combinados para descrever a regulação metabólica integrada, frente a situações escolhidas como exemplos: abundância e escassez de nutrientes, e diabetes. Esta descrição compreende o metabolismo de alguns órgãos e a influência dos hormônios considerados mais relevantes
- 4ª) **Contração muscular** — Capítulo 22. São analisadas as fontes de energia utilizadas pelo organismo para o exercício e as adaptações do metabolismo a esta situação.

Invariavelmente a regulação metabólica é feita por interferência em determinadas reações químicas que compõem o metabolismo, aumentando ou diminuindo sua velocidade. O resultado imediato desta alteração de velocidade é o aumento da oferta de substratos para as reações subsequentes ou o acúmulo de metabólitos, o que, indiretamente, irá afetar outras reações relacionadas. Assim, o efeito é propagado para todas as vias metabólicas.

As formas mais decisivas de interferir na velocidade de uma reação catalisada são, naturalmente, alterar a *concentração* ou a *eficiência* do seu catalisador.

19.1 Alteração da concentração de enzimas

Início da leitura básica

No caso das reações biológicas, o catalisador — a enzima — é produzido pelas próprias células e sua concentração pode ser alterada por variação na velocidade de sua síntese ou na velocidade de sua degradação. Este é um mecanismo de regulação a longo prazo, manifestando-se em tempos da ordem de horas ou dias. O controle da síntese de enzimas é exercido, basicamente, sobre a transcrição do gene que codifica a enzima: pode ser ativada ou inibida, levando à indução ou à repressão da síntese da enzima, respectivamente. A regulação da transcrição gênica é complexa, podendo ser exercida por fatores que vão desde a concentração do substrato sobre o qual a enzima atua, até hormônios específicos. Por exemplo, uma dieta rica em carboidratos provoca aumento da expressão de genes que codificam enzimas da glicólise. Estas alterações, em alguns casos, resultam de interação da própria glicose com sequências reguladoras dos promotores dos

genes e, em outros, são devidas à atuação de efetores ativados nas vias de sinalização da insulina (Seção 19.4), cuja secreção é estimulada por glicose.

A velocidade de degradação de uma enzima também sofre controle rigoroso, embora pouco conhecido. O tempo de permanência das enzimas nas células varia, ou seja, têm meias-vidas diferentes (Tabela 17.1, Seção 17.1). Em geral, as enzimas que catalisam reações-chave do metabolismo têm meias-vidas curtas.

Esta contínua síntese e degradação proteica deve ser entendida como um processo de adaptação do metabolismo, que permite drenar o fluxo metabólico em uma ou outra direção, de acordo com as condições fisiológicas prevalentes. Tais desvios seriam dificultados se a concentração das enzimas permanecesse constante em qualquer condição.

Ao longo dos capítulos subsequentes, são apresentados muitos exemplos de mudanças do conteúdo celular de enzimas, que constituem respostas do organismo a situações fisiológicas diversas. A Tabela 21.1 (Seção 21.1) contém um resumo de enzimas importantes cuja síntese é passível de indução.

19.2 Alteração da atividade das enzimas

Além da alteração na concentração da enzima, outro nível de regulação manifesta-se a curto prazo, em tempos da ordem de segundos ou minutos. Mesmo quando a concentração de uma enzima é mantida constante, a velocidade da reação que ela catalisa pode ser aumentada ou diminuída como resultado de mudanças conformacionais da própria enzima, provocadas por ligação de compostos ou grupos à cadeia polipeptídica. Esta ligação pode ser do tipo não covalente (*regulação alostérica*) ou do tipo covalente (*regulação por modificação covalente*). A regulação alostérica da atividade das enzimas depende da concentração celular de compostos que são claros indicadores das condições metabólicas da célula. A regulação por modificação covalente está sob influência indireta da ação hormonal, que coordena a resposta do organismo como um todo. O alvo destas regulações são enzimas-chave presentes nas vias metabólicas, as *enzimas reguladoras*, cuja atividade é decisiva para o funcionamento de toda a via.

As regulações alostérica e por modificação covalente têm seus princípios gerais descritos a seguir.

19.2.1 Regulação alostérica

As enzimas reguladas por modificação não covalente são chamadas *alostéricas*. Este tipo de enzima é encontrado em quase todas as vias metabólicas, catalisando geralmente uma reação irreversível localizada no início da via. Estruturalmente, são proteínas oligoméricas, com um sítio ativo em cada cadeia polipeptídica. A ligação do substrato ao sítio ativo de uma subunidade afeta a conformação das demais, facilitando a ligação das moléculas de substrato aos outros sítios ativos. A cooperatividade estabelecida entre os sítios catalíticos é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de velocidade da reação em função da concentração de substrato é uma *curva sigmoide*, em vez da *curva hiperbólica* de Michaelis-Menten (Figura 19.1 a). Trata-se do mesmo tipo de cooperatividade, exibida por uma curva sigmoide, encontrada na ligação do oxigênio à hemoglobina, também uma proteína oligomérica, com um sítio de ligação para o oxigênio, o grupo heme, em cada subunidade. Em contraposição, a ligação do oxigênio à mioglobina, uma proteína monomérica, com um único grupo heme, segue uma cinética hiperbólica, como a das enzimas michaelianas, que apresentam, geralmente, uma única cadeia polipeptídica, com um só sítio ativo. Mesmo enzimas oligoméricas podem apresentar cinética michaeliana, desde que não exista efeito cooperativo entre suas subunidades.

As enzimas alostéricas são sensíveis reguladores do metabolismo graças à possibilidade de ligarem-se a determinados metabólitos, o que provoca grandes alterações de sua atividade. Estes metabólitos, os *efetadores* ou *moduladores alostéricos*, são chamados *positivos* (*ativadores alostéricos*) ou *negativos* (*inibidores alostéricos*), segundo provoquem aumento ou redução da velocidade da reação catalisada (Figura 19.1 b). O efetador alostérico liga-se a um nicho específico da estrutura tridimensional da enzima, chamado *centro* ou *sítio alostérico*, que é tão específico para o efetador quanto o sítio ativo é para o substrato.

As enzimas alostéricas caracterizam-se por apresentarem duas conformações espaciais diferentes e interconvertíveis, com alta ou baixa afinidade pelo substrato. O efeito dos efetadores alostéricos pode ser explicado por sua ligação preferencial a uma das formas, muito ativa ou pouco ativa, da enzima. Como esta ligação estabiliza a enzima em uma dada forma, os efetadores alostéricos atuam como ativadores ou inibidores da reação enzimática.

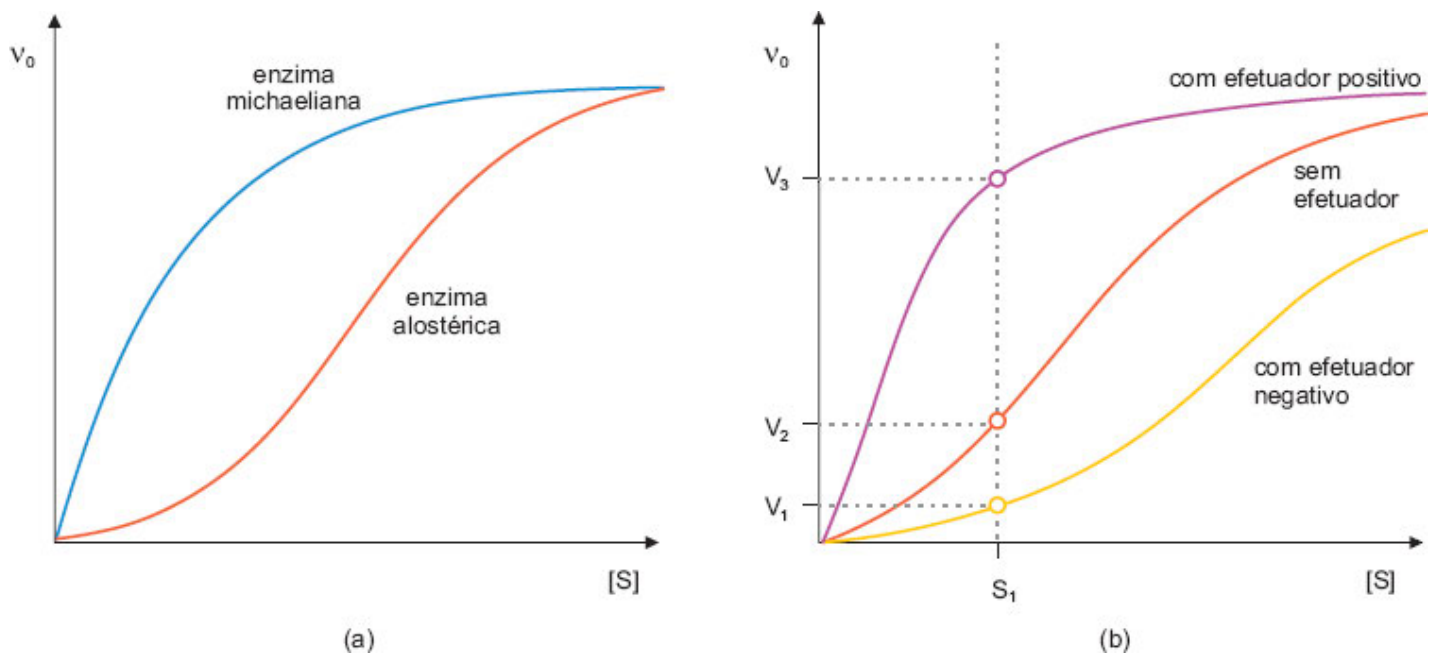


Figura 19.1 a) Gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima alostérica e para uma enzima michaeliana. A curva sigmoideal exibida pela enzima alostérica é o reflexo da cooperatividade apresentada pelas suas subunidades; as enzimas monoméricas, michaelianas, têm cinética hiperbólica. b) Cinética da reação catalisada por uma enzima alostérica na presença e na ausência de efetadores alostéricos. Com igual concentração de substrato (S_1), a velocidade da reação varia dependendo da presença de efetadores.

Como a ligação dos efetadores à enzima é não covalente e reversível, o percentual de enzima que se encontra na forma ativa ou inativa depende da concentração do efetador alostérico. Considere-se o esquema simplificado de ligação de uma enzima alostérica a seu efetador:



Em uma situação fisiológica em que a concentração do efetador alostérico negativo é baixa, praticamente todas as moléculas de enzima estarão ativas; à medida que a concentração do efetador aumenta, percentuais crescentes de enzima estarão a ele ligados e, então, inativos. Quando o inibidor alostérico, que é um produto do metabolismo, for consumido por outra reação celular e sua concentração decrescer, percentuais cada vez maiores de enzima voltarão à forma ativa.

Uma mesma enzima alostérica pode ser regulada por efetadores alostéricos positivos e negativos, que poderão estar presentes em diferentes concentrações. A velocidade da reação que ela catalisa poderá variar em uma larga faixa: a menor velocidade será obtida na presença de concentrações altas do efetador negativo, e a maior velocidade, na presença de grandes concentrações do efetador positivo. Desta forma, *para uma mesma concentração de substrato e mesma concentração de enzima*, a velocidade da reação catalisada por uma enzima alostérica pode apresentar grande variação. Notem-se, na Figura 19.1 b, os valores diferentes de velocidade (v_1 , v_2 , v_3), obtidos com a concentração S_1 de substrato.

Nas vias metabólicas é frequente que um produto final atue como efetador alostérico negativo de uma enzima alostérica que catalisa uma das primeiras reações da via (Figura 19.2). Quando a concentração celular deste produto aumenta, sua atuação como inibidor alostérico faz diminuir a velocidade da via, restringindo sua própria produção. Este é o mecanismo conhecido como *inibição por feedback* ou *retroinibição*. À medida que o metabólito é consumido por outras seqüências metabólicas e sua concentração diminui, percentuais crescentes de enzima voltam à forma ativa, aumentando a velocidade da via. A participação da enzima reguladora em uma etapa inicial da via é estratégica, constituindo um fator de economia celular, por impedir o acúmulo indevido de compostos intermediários que poderiam interferir de modo negativo sobre outras vias. Muitas vezes, o produto final de uma via atua também como efetador alostérico positivo em outra via metabólica que utiliza o mesmo substrato inicial. Naturalmente, a regulação desta segunda via irá interferir em uma terceira via, e assim por diante. O resultado final desta série de interferências é o rigoroso ajuste da produção de cada composto ao seu consumo e o funcionamento harmônico e coordenado das reações que compõem o metabolismo.

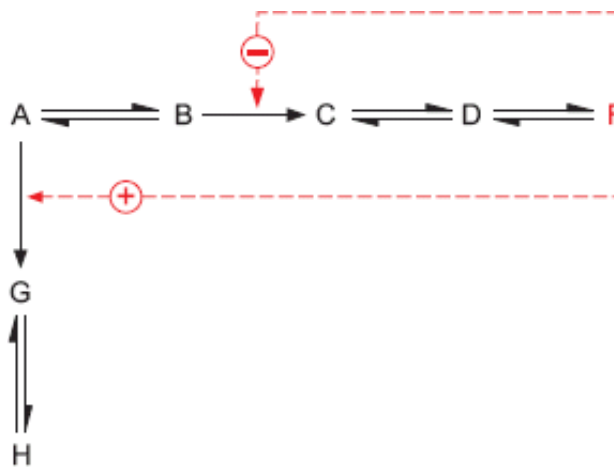


Figura 19.2 Regulação alostérica de duas vias metabólicas hipotéticas. O composto F é efetor alostérico negativo da enzima que catalisa a conversão de B em C e efetor alostérico positivo da enzima que converte A em G — a oferta de A resulta em síntese aumentada de H.

Algumas coenzimas são efetores alostéricos importantes

A função de modulador alostérico não é exercida apenas por compostos intermediários do metabolismo, sendo muito frequente que coenzimas também desempenhem este papel. Uma coenzima pode participar de uma reação exercendo o seu papel precípua de coenzima, ligando-se ao sítio ativo da enzima ou atuar como efetor alostérico de outra enzima, ligando-se ao sítio alostérico e alterando a velocidade da reação — o NADH, além de ser uma coenzima transportadora de hidrogênio, atua como efetor alostérico de enzimas do ciclo de Krebs regulando a velocidade do ciclo. Casos mais complexos ocorrem quando a coenzima de uma reação atua como inibidor alostérico da enzima que catalisa a reação, sendo reconhecida tanto pelo sítio ativo como pelo sítio alostérico. O exemplo clássico é o ATP na reação catalisada pela fosfofrutoquinase 1. Este caso constitui um aparente paradoxo, pois a ligação da coenzima ao sítio alostérico impediria sua ligação ao sítio ativo, inviabilizando a reação. Na realidade, a afinidade da coenzima pelo sítio ativo é muito maior do que pelo sítio alostérico. Em baixas concentrações da coenzima, a ligação com o sítio ativo é favorecida; em altas concentrações, a ligação com o sítio alostérico torna-se possível e a reação passa a ser inibida.

A Tabela 19.1 alista as enzimas alostéricas mais relevantes e seus principais efetores positivos e negativos.

Tabela 19.1 Enzimas alostéricas e seus efetores.

Enzima	Efeutores alostéricos	
	Negativos	Positivos
Fosfofrutoquinase 1	ATP, Citrato	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase	Alanina	Frutose 1,6-bisfosfato
Piruvato carboxilase		Acetil-CoA
Piruvato desidrogenase	Acetil-CoA, NADH	Piruvato
Isocitrato desidrogenase	NADH	ADP
α -Cetoglutarato desidrogenase	Succinil-CoA, NADH, ATP	
Carnitina acil transferase I	Malonil-CoA	
Citrato liase	Acil-CoA	
Acetil-CoA carboxilase	Acil-CoA	Citrato

As coenzimas, mesmo quando não agem como efetores alostéricos, podem determinar a velocidade das reações das quais participam em função de sua concentração. Em cada reação a coenzima é utilizada em quantidade

estequiometricamente equivalente à do substrato e, como as concentrações celulares das coenzimas são muito inferiores às dos substratos, elas são limitantes da velocidade da reação. A ação contínua das coenzimas é viabilizada pelo fato de oscilarem constantemente entre suas duas formas possíveis: NAD⁺ e NADH, ATP e ADP etc. As mesmas coenzimas participam de vias metabólicas diferentes, algumas das quais consomem a forma oxidada da coenzima, e outras, a forma reduzida. É o caso do ciclo de Krebs, que utiliza a forma oxidada de NAD⁺ e FAD e produz as respectivas formas reduzidas; em contrapartida, a cadeia de transporte de elétrons recebe as coenzimas reduzidas e oxida-as. Estas vias podem, então, trabalhar em associação utilizando uma pequena quantidade de coenzimas, reciclando-as permanentemente. É também o que ocorre com a via das pentoses-fosfato e a síntese de ácidos graxos. O NADPH, a forma predominante da coenzima no citosol, inibe as desidrogenases da via das pentoses-fosfato; somente quando processos de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos, fazem diminuir a concentração citosólica de NADPH e aumentar a de NADP⁺, as desidrogenases e, por consequência, a via das pentoses podem funcionar.

Tendo em vista que a soma das concentrações celulares das duas formas de uma coenzima — (NAD⁺ + NADH), (ATP + ADP) etc. — é constante, o aumento da concentração de uma das formas é sempre acompanhado pela diminuição da outra forma. Adicionalmente, a proporção entre as duas formas varia com o compartimento celular.

As coenzimas constituem indicadores sensíveis da fisiologia celular, e pequenas alterações na concentração de uma de suas formas são imediatamente percebidas pelas reações que se processam naquele compartimento celular e, subsequentemente, pelos ciclos metabólicos de outros compartimentos. Quando, por exemplo, a fibra muscular executa contração intensa, com um aporte insuficiente de oxigênio, o aumento da concentração mitocondrial de NADH é refletido no citosol, desviando a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da formação de lactato, regenerando NAD⁺ (Seção 9.1.1).

A localização intracelular aprimora o controle da atividade de enzimas

Nas células eucarióticas, a existência de organelas propicia uma forma adicional de controle enzimático. Uma enzima pode ser expressa em dois compartimentos celulares diferentes e ser deslocada de um para o outro, segundo o estado fisiológico vigente, como acontece com a glicoquinase (Seção 20.2). As organelas proveem microambientes diferenciados nos quais as concentrações de substratos ou efetadores alostéricos podem ser mais estritamente reguladas, por meio do controle de suas transferências através de membranas.

19.2.2 Regulação por modificação covalente

A atividade de uma enzima pode ser drasticamente alterada pela ligação covalente de certos grupos à cadeia polipeptídica. A modificação resultante em sua conformação provoca desde mudanças na afinidade pelo substrato ou na sensibilidade a efetadores alostéricos, até sua completa inativação.

A modificação covalente constitui uma reação química catalisada por enzimas, ao contrário da ligação não covalente de efetadores alostéricos. A mudança de atividade não é definitiva, pois este sistema de controle inclui enzimas capazes de catalisar a retirada do grupo adicionado, devolvendo a enzima modificada à sua conformação original. Várias são as modificações possíveis (metilação, adenilação, acetilação etc.), mas a mais frequente consiste na fosforilação da cadeia polipeptídica.

A fosforilação é catalisada por *proteína quinases* (*PK*, de *Protein Kinase*)¹ e a transferência do grupo fosfato terminal do ATP é feita para resíduos específicos de serina, treonina ou tirosina, formando uma ligação éster fosfórico:



Em cada tecido há determinadas proteínas que são substratos das proteína quinases. A fosforilação pode transformá-las de inativas em ativas, ou vice-versa (Tabela 19.2). As próprias proteína quinases estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos, mediados por AMP cíclico, fosfolípidios, íons Ca²⁺ etc. (Seção 19.4).

A retirada do grupo fosfato, introduzido pela ação das proteína quinases, é catalisada pelas *fosfoproteína fosfatases* (*PP*, de *Phosphoprotein Phosphatases*), por hidrólise:



Tabela 19.2 Modificação da atividade enzimática por fosforilação.

Via metabólica	Enzima fosforilada	Forma
Glicogenólise	Glicogênio fosforilase quinase	Ativa

	Glicogênio fosforilase	Ativa
Glicogênese	Glicogênio sintase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	6-Fosfofruto-2-quinase	Inativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Ativa
	Piruvato quinase	Inativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Inativa
Lipólise	Lipase	Ativa
Lipogênese	Citrato liase	Inativa
	Acetil-CoA carboxilase	Inativa
	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	Inativa

O controle da atuação das fosfoproteína fosfatases (designadas 1, 2 etc.) é menos conhecido do que o das proteína quinases.

A predominância de uma das formas — fosforilada ou desfosforilada — de uma dada proteína dependerá da enzima que estiver ativada: proteína quinase ou fosfoproteína fosfatase. Exemplos destas possibilidades são mostrados neste e no próximo capítulo.

Nos animais superiores, a modificação covalente de enzimas constitui o resultado de vias de regulação metabólica, que efetuam o que se costuma chamar de “transdução” de sinal.

Término da leitura básica

19.3 Transdução de sinal

Transdução (transformação, tradução) de sinal é o processo que confere às células a capacidade de receber e processar estímulos originados do meio ambiente (luz, odorantes) ou do próprio organismo (hormônios, neurotransmissores). Qualquer que seja o estímulo, o circuito que integra este processo é formado por componentes comuns: o sinal inicial, o receptor do sinal, a transdução propriamente dita, que consiste na transformação do estímulo em um composto químico, e a resposta celular. As respostas geradas são variadas e podem incidir sobre a atividade de enzimas, a expressão gênica e a transmissão do impulso nervoso. A maioria das vias de transdução de sinal compreende a interação de estímulos físicos ou químicos com receptores situados na membrana plasmática.

Os *receptores* são proteínas integradas da membrana celular, geralmente contendo três motivos: um imerso na bicamada lipídica e dois expostos nas porções externa e interna da membrana; transmitem a informação recebida do exterior para o meio intracelular, sem que o estímulo inicial penetre na célula. Os receptores são específicos para cada estímulo e, quando o sinal é um composto químico, guarda com ele a mesma relação de especificidade de uma enzima com seu substrato; são ainda característicos de determinados órgãos ou tecidos. Em muitos receptores, a cadeia polipeptídica atravessa várias vezes a membrana, formando sete α -hélices, sendo chamados de *receptores hepta-helicoidais* ou *7TM* (de *seven transmembrane helical regions*) (Figura 2.12). Esta classe de receptores constitui uma família com mais de 1.000 representantes em mamíferos e são a “antena” para o recebimento de sinais externos, como fótons (no caso da visão), substâncias voláteis (estímulo para o olfato), moléculas não voláteis (relacionadas ao paladar) ou sinais de origem endógena, como hormônios e neurotransmissores. Estes sinais são transmitidos para o interior das células, onde provocam mudanças na fisiologia celular, devidas à alteração da conformação de proteínas, por fosforilação ou ligação com íons cálcio, ou modificação do funcionamento (abertura ou fechamento) de canais iônicos.

A transdução de sinais endógenos está descrita na Seção seguinte, que trata da ação hormonal; as vias de transdução de estímulos luminosos e olfatórios estão resumidas na Seção 19.5.

19.4 Ação hormonal

Os mamíferos têm seu metabolismo regulado de forma global e integrada. Nestes organismos, há uma especialização de funções, distribuídas pelos diferentes órgãos ou tecidos, como consequência da diferenciação celular. O conjunto de enzimas sintetizadas em um órgão atribui a ele capacidades metabólicas específicas. Por exemplo, os hepatócitos são capazes de sintetizar e degradar lipídios; as fibras musculares apenas degradam estes compostos e hemácias nem sintetizam nem degradam lipídios. Embora desempenhando papéis específicos, os tecidos não são autônomos, devendo agir de forma concertada. A coordenação das respostas dos diversos órgãos e tecidos ao mesmo sinal depende de sistemas de comunicação, que permitem a reação adequada do organismo como um todo — o sistema endócrino e o sistema nervoso