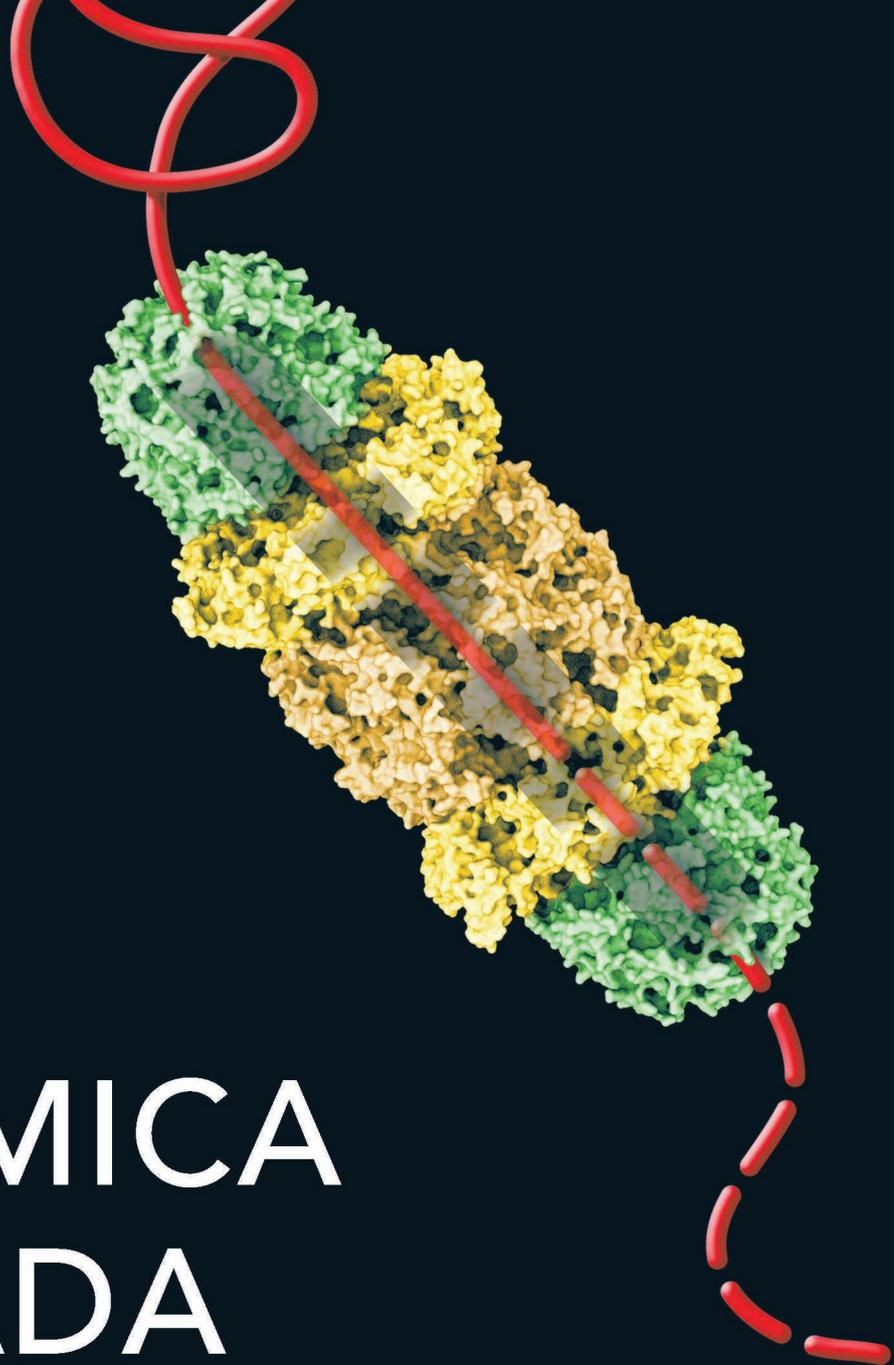


Victor W. Rodwell
David A. Bender
Kathleen M. Botham
Peter J. Kennelly
P. Anthony Weil



BIOQUÍMICA ILUSTRADA DE **HARPER**

30ª Edição

Mc
Graw
Hill
Education



LANGE®

Equipe de tradução

Luís Fernando Marques Dorvillé
Maria Elisabete Costa Moreira
Simone Kobe de Oliveira

Revisão técnica desta edição

Guilhian Leipnitz

Professor adjunto do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.



B615 Bioquímica ilustrada de Harper [recurso eletrônico] / Victor W. Rodwell ... [et al.] ; [tradução: Luís Fernando Marques Dorvillé, Maria Elisabete Costa Moreira, Simone Kobe de Oliveira ; revisão técnica: Guilhian Leipnitz]. – 30. ed. – Porto Alegre : AMGH, 2017.

Editado como livro impresso em 2017.
ISBN 978-85-8055-595-0

1. Bioquímica. 2. Rodwell, Victor W.

CDU 577.1

Catálogo na publicação: Poliana Sanchez de Araujo – CRB 10/2094

Um livro médico LANGE

Victor W. Rodwell, Ph.D.

*Professor (Emeritus) of Biochemistry
Purdue University
West Lafayette, Indiana*

David A. Bender, Ph.D.

*Professor (Emeritus) of Nutritional Biochemistry
University College London
London, United Kingdom*

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc.

*Emeritus Professor of Biochemistry
Department of Comparative Biomedical Sciences
Royal Veterinary College
University of London
London, United Kingdom*

Peter J. Kennelly, Ph.D.

*Professor and Head
Department of Biochemistry
Virginia Tech
Blacksburg, Virginia*

P. Anthony Weil, Ph.D.

*Professor
Department of Molecular Physiology & Biophysics
Vanderbilt University
Nashville, Tennessee*

BIOQUÍMICA ILUSTRADA DE HARPER

30ª Edição

Versão impressa
desta obra: 2017

**Mc
Graw
Hill
Education**



AMGH Editora Ltda.

2017

Obra originalmente publicada sob o título *Harper's illustrated biochemistry, 30th edition*
ISBN 0071825347 / 9780071825344

Original edition copyright © 2015, McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC,
New York, New York 10121. All rights reserved.

Portuguese language translation copyright ©2017 AMGH Editora Ltda., a Grupo A Educação S.A. Company.
All rights reserved.

Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

Colaboraram nesta edição:

Editora: *Simone de Fraga*

Capa: *Márcio Monticelli*

Preparação de originais: *Caroline Castilhos Melo*

Leitura final: *Magda Regina Schwartzaupt Chaves, Sandra da Câmara Godoy e Marquieli de Oliveira*

Editoração: *Estúdio Castellani*

Nota

A bioquímica está em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a própria experiência ampliam o nosso conhecimento, novas descobertas são realizadas. Os autores desta obra consultaram as fontes consideradas confiáveis, em um esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da sua publicação.

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
AMGH EDITORA LTDA., uma parceria entre GRUPO A EDUCAÇÃO S.A. e MCGRAW-HILL EDUCATION
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana
90040-340 Porto Alegre RS
Fone: (51) 3027-7000 Fax: (51) 3027-7070

Unidade São Paulo
Rua Doutor Cesário Mota Jr., 63 – Vila Buarque
01221-020 São Paulo SP
Fone: (11) 3221-9033

SAC 0800 703-3444 – www.grupoa.com.br

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

Coautores

Peter L. Gross, M.D., M.Sc., F.R.C.P.(C)

Associate Professor
Department of Medicine
McMaster University
Hamilton, Ontario, Canada

Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D.

Professor and Chair
Department of Biochemistry
Christian Medical College
Vellore, Tamil Nadu, India

Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

Emeritus Professor of Veterinary Biochemistry
Royal Veterinary College
University of London
London, United Kingdom

Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

Emeritus Professor of Biochemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario

Margaret L. Rand, Ph.D.

Senior Associate Scientist
The Hospital for Sick Children
Toronto, and Professor
Department of Laboratory Medicine & Pathobiology
University of Toronto, Toronto, Canada

Joe Varghese, M.B.B.S., M.D., D.N.B.

Associate Professor
Department of Biochemistry
Christian Medical College
Vellore, Tamil Nadu

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Prefácio

Temos o prazer de apresentar a 30ª edição do *Bioquímica ilustrada de Harper*. A 1ª edição deste livro, intitulada *Bioquímica de Harper*, foi publicada, em 1939, sob a autoria única do Dr. Harold Harper da University of California School of Medicine, São Francisco, Califórnia. Atualmente intitulado *Bioquímica ilustrada de Harper*, o livro continua, como pretendia originalmente, oferecendo uma apresentação concisa dos aspectos mais relevantes da bioquímica para o estudo da medicina. Vários autores contribuíram para as edições posteriores desta obra, que já completou mais de 7 décadas de vida!

Ilustração da capa desta edição

A ilustração de capa mostra o proteossomo e a degradação proteolítica inicial de uma proteína intracelular ubiquitinada. O proteossomo consiste em um complexo macromolecular de subunidades 14α e 14β (representadas em verde e em amarelo, respectivamente) dispostas como quatro anéis empilhados $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$. Eles formam uma câmara oca em formato de tubo que contém proteases imobilizadas. Um polipeptídeo marcado para degradação (mostrado em vermelho) entra no proteossomo (parte superior, à esquerda) e é hidrolisado em fragmentos de peptídeos por proteases internas do proteossomo. Após sua saída do proteossomo (parte inferior, à direita), as proteases extracelulares degradam esses fragmentos de peptídeos em aminoácidos.

A degradação de proteínas intracelulares realizada de modo controlado e no momento exato é importante para processos biológicos fundamentais, como a diferenciação e a divisão celulares. A capacidade de reconhecer e descartar proteínas desnaturadas ou danificadas é essencial para a saúde, uma vez que o acúmulo de agregados proteicos contribui significativamente para a etiologia de várias doenças humanas, incluindo vários distúrbios neurológicos. Pela descoberta da degradação de proteínas mediada por ubiquitina, Aaron Ciechanover e Avram Hershko, de Israel, e Irwin Rose, dos Estados Unidos, receberam o Prêmio Nobel de Química de 2004.

Mudanças nesta edição

A 30ª edição comemorativa do livro *Bioquímica ilustrada de Harper* continua a sua atualização periódica e integrada do

conhecimento bioquímico, com repetida ênfase na sua relação com doenças genéticas, na informação clínica e na prática da medicina. Essa edição inclui novas ilustrações e tabelas coloridas e vários exemplos médicos relevantes que apresentam uma revisão clara e sucinta dos fundamentos de bioquímica que um estudante precisa compreender para ser bem-sucedido na faculdade de medicina. Além da atualização periódica do seu conteúdo, a ordem de apresentação dos conceitos passou por uma importante revisão. Os atuais 58 capítulos estão organizados em uma lista expandida de 11 seções. Os capítulos e tópicos nessas seções enfatizam a cobertura integrada de doenças bioquímicas e de informação clínica. Uma alteração importante foi que, após a aposentadoria do Dr. Murray, a autoria e revisão dos seus 13 capítulos foi assumida pelos Drs. Bender, Botham, Kennelly e Rodwell. Por exemplo, a Seção X contém um novo capítulo sobre leucócitos, e a Seção XI apresenta nove casos clínicos abertos inteiramente novos, que enfatizam a relevância clínica e que testam tanto os conhecimentos quanto a compreensão. A fim de facilitar a apreensão pelo estudante de cada grupo de conceitos, as questões de revisão aparecem agora após cada uma das 11 novas seções. Foram adicionadas muitas questões novas, e um banco de respostas pode ser encontrado após o último capítulo. Uma novidade desta edição é a inclusão, no banco de respostas, de explicações detalhadas de várias respostas.

Organização do livro

Todos os 58 capítulos da 30ª edição enfatizam a relevância médica da bioquímica. Os tópicos são organizados em 11 títulos principais. Para facilitar a retenção da informação, questões para estudo acompanham cada Seção, e um banco de respostas é localizado antes do Índice.

A **Seção I** inclui uma breve história da bioquímica e enfatiza as inter-relações entre a bioquímica e a medicina. Água e pH são revisados, e são abordados os vários níveis de organização proteica.

A **Seção II** começa com um capítulo sobre hemoglobina, três capítulos abordam a cinética, o mecanismo de ação e a regulação metabólica de enzimas. Um capítulo sobre

bioinformática e biologia computacional reflete a importância sempre crescente desses tópicos na bioquímica, na biologia e na medicina modernas.

A **Seção III** aborda a bioenergética e o papel dos fosfatos de alta energia na captura e na transferência de energia, as reações de oxidação-redução envolvidas na oxidação biológica e os detalhes metabólicos da captura de energia via cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.

A **Seção IV** considera o metabolismo de carboidratos via glicólise, o ciclo do ácido cítrico, a via das pentoses-fosfato, o metabolismo do glicogênio, a gliconeogênese e o controle da glicemia.

A **Seção V** destaca a natureza dos lipídeos simples e complexos, o transporte e o armazenamento de lipídeos, a biossíntese e a degradação de ácidos graxos e lipídeos mais complexos e as reações e a regulação metabólica da biossíntese de colesterol e do transporte em seres humanos.

A **Seção VI** discute o catabolismo de proteínas, a biossíntese de ureia e o catabolismo de aminoácidos e enfatiza os distúrbios metabólicos significativos do ponto de vista médico associados a seu catabolismo incompleto. O capítulo final considera a bioquímica das porfirinas e dos pigmentos biliares.

A **Seção VII** destaca primeiramente a estrutura e a função de nucleotídeos e ácidos nucleicos e, em seguida, detalha a replicação e o reparo do DNA, a síntese e a modificação de RNA, a síntese proteica, os princípios da tecnologia do DNA recombinante e a regulação da expressão gênica.

A **Seção VIII** reúne aspectos da comunicação intracelular e extracelular. Tópicos específicos incluem a estrutura e a

função da membrana, as bases moleculares das atuações dos hormônios e a transdução de sinais.

As **Seções IX, X e XI** abordam 14 tópicos de significativa importância médica.

A **Seção IX** discute nutrição, digestão e absorção, micronutrientes, incluindo vitaminas, radicais livres e antioxidantes, glicoproteínas, o metabolismo de xenobióticos e bioquímica clínica.

A **Seção X** aborda o tráfego intracelular e a separação de proteínas, a matriz extracelular, músculo e citoesqueleto, proteínas plasmáticas e imunoglobulinas e a bioquímica de hemácias e leucócitos.

A **Seção XI** inclui homeostasia e trombose, uma visão geral do câncer e a bioquímica do envelhecimento.

Agradecimentos

Agradecemos a Michael Weitz por seu papel no planejamento desta edição e a Regina Y. Brown por seu papel fundamental na preparação desta edição para publicação. Agradecemos também a Shruti Awasthi, do Cenveo Publisher Services, por sua atuação na etapa de editoração e com as ilustrações desta obra. Sugestões de estudantes e colaboradores de todo o mundo foram muito úteis na elaboração desta edição – esperamos receber estímulos semelhantes no futuro! Por fim, agradecemos a Robert Murray por sua liderança e contribuições às edições anteriores deste livro.

Victor W. Rodwell
David A. Bender
Kathleen M. Botham
Peter J. Kennelly
P. Anthony Weil

Sumário

S E Ç Ã O



Estruturas e funções de proteínas e enzimas 1

- 1** Bioquímica e medicina 1
Victor W. Rodwell, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 2** Água e pH 6
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 3** Aminoácidos e peptídeos 15
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 4** Proteínas: determinação da estrutura primária 25
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 5** Proteínas: ordens de estrutura superiores 36
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

S E Ç Ã O



Enzimas: cinética, mecanismo, regulação e bioinformática 51

- 6** Proteínas: mioglobina e hemoglobina 51
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 7** Enzimas: mecanismo de ação 60
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 8** Enzimas: cinética 73
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 9** Enzimas: regulação das atividades 87
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

- 10** Bioinformática e biologia computacional 97
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

S E Ç Ã O



Bioenergética 113

- 11** Bioenergética: a função do ATP 113
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 12** Oxidação biológica 119
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 13** Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa 126
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

S E Ç Ã O



Metabolismo dos carboidratos 139

- 14** Visão geral do metabolismo e do suprimento de combustíveis metabólicos 139
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 15** Carboidratos de importância fisiológica 152
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 16** O ciclo do ácido cítrico: a via central do metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de aminoácidos 161
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

- 17** Glicólise e oxidação do piruvato 168
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 18** Metabolismo do glicogênio 176
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 19** Gliconeogênese e o controle da glicemia 185
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 20** Via das pentoses-fosfato e outras vias do metabolismo das hexoses 196
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

S E Ç Ã O

V

Metabolismo dos lipídeos 211

- 21** Lipídeos de importância fisiológica 211
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 22** Oxidação dos ácidos graxos: cetogênese 223
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 23** Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides 232
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 24** Metabolismo de acilgliceróis e esfingolipídeos 245
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 25** Transporte e armazenamento de lipídeos 253
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 26** Síntese, transporte e excreção do colesterol 266
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

S E Ç Ã O

VI

Metabolismo de proteínas e aminoácidos 281

- 27** Biossíntese dos aminoácidos nutricionalmente não essenciais 281
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 28** Catabolismo das proteínas e do nitrogênio dos aminoácidos 287
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 29** Catabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos 297
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 30** Conversão dos aminoácidos em produtos especializados 313
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 31** Porfirinas e pigmentos biliares 323
Victor W. Rodwell, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

S E Ç Ã O

VII

Estrutura, função e replicação de macromoléculas informacionais 339

- 32** Nucleotídeos 339
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 33** Metabolismo dos nucleotídeos de purinas e pirimidinas 347
Victor W. Rodwell, Ph.D.
- 34** Estrutura e função dos ácidos nucleicos 359
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 35** Organização, replicação e reparo do DNA 370
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 36** Síntese, processamento e modificação do RNA 394
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 37** A síntese de proteínas e o código genético 413
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 38** Regulação da expressão gênica 428
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 39** Genética molecular, DNA recombinante e tecnologia genômica 451
P. Anthony Weil, Ph.D.

S E Ç Ã O

VIII

Bioquímica da
comunicação extracelular
e intracelular 477

- 40** Membranas: estrutura e função 477
Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e P. Anthony Weil, Ph.D.
- 41** A diversidade do sistema endócrino 498
P. Anthony Weil, Ph.D.
- 42** Ação dos hormônios e transdução de sinais 518
P. Anthony Weil, Ph.D.

S E Ç Ã O

IX

Tópicos especiais (A) 537

- 43** Nutrição, digestão e absorção 537
David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.
- 44** Micronutrientes: vitaminas e minerais 546
David A. Bender, Ph.D.
- 45** Radicais livres e nutrientes antioxidantes 564
David A. Bender, Ph.D.
- 46** Glicoproteínas 569
David A. Bender, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 47** Metabolismo de xenobióticos 583
David A. Bender, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 48** Bioquímica clínica 589
David A. Bender, Ph.D., Joe Varghese, M.B.B.S., M.D., Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

S E Ç Ã O

X

Tópicos especiais (B) 607

- 49** Tráfego intracelular e seleção de proteínas 607
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 50** Matriz extracelular 627
Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 51** Músculo e citoesqueleto 647
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 52** Proteínas plasmáticas e imunoglobulinas 668
Peter J. Kennelly, Ph.D., Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D. e Joe Varghese, M.B.B.S., M.D.
- 53** Hemácias 689
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.
- 54** Leucócitos 700
Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

S E Ç Ã O

XI

Tópicos especiais (C) 711

- 55** Homeostasia e trombose 711
Peter L. Gross, M.D., M.Sc., F.R.C.P.(C), Robert K. Murray, M.D., Ph.D., P. Anthony Weil, Ph.D. e Margaret L. Rand, Ph.D.
- 56** Câncer: considerações gerais 722
Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D., Joe Varghese, M.B.B.S., M.D., Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e P. Anthony Weil, Ph.D.
- 57** Histórias de casos bioquímicos 746
David A. Bender, Ph.D.
- 58** Bioquímica do envelhecimento 755
Peter J. Kennelly, Ph.D.

Banco de respostas 771

Índice 777

Aspectos essenciais da 30ª edição de *Bioquímica Ilustrada de Harper*

A melhor referência para a compreensão dos aspectos clínicos da bioquímica

- Apresenta uma revisão clara e sucinta dos fundamentos de bioquímica que o estudante precisa compreender para ser bem-sucedido na faculdade de medicina
- Todos os 58 capítulos enfatizam a relevância médica da bioquímica
- Combina mais de 600 ilustrações coloridas de alta qualidade, com uma visão integrada das doenças bioquímicas
- Questões de revisão ao final de cada uma das 11 Seções
- Estudos de casos inteiramente novos enfatizam a relevância clínica e relacionam a teoria à prática
- Cada capítulo inclui uma seção sobre Importância Biomédica e um Resumo dos assuntos abordados
- Informações sobre aminoácidos tóxicos de ocorrência natural; biomoléculas extraterrestres; desenvolvimento de medicamentos com auxílio do computador; o papel da cascata do complemento na infecção bacteriana e viral; mediadores secretados de sinalização célula-célula entre leucócitos; o papel dos mastócitos, basófilos e eosinófilos; e o risco de antioxidantes que regulam para baixo a sinalização de radicais para apoptose e aumentam o risco de câncer

Mais de 600
ilustrações coloridas

690 SEÇÃO X Tópicos especiais (B)

classificadas como **embrionárias** ou **adultas**. Como as células-tronco adultas são mais limitadas em relação à sua capacidade de diferenciação, intensos esforços estão sendo feitos para superar essa restrição.

A diferenciação de células-tronco hematopoiéticas é regulada por uma série de glicoproteínas secretadas, chamadas de citocinas. Um fator de células-tronco (SCF) e vários fatores estimuladores de colônias (CSF) colaboram com as interleucinas 1, 3 e 6 para estimular a proliferação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e seu comprometimento, para se diferenciar em um dos vários tipos de células mielóides (Figura 53-1). A ligação à **eritropoietina** ou à **trombopoietina** direciona as células progenitoras mielóides a se diferenciarem eventualmente em hemácias ou plaquetas, respectivamente.

AS HEMÁCIAS SÃO ALTAMENTE ESPECIALIZADAS

As hemácias maduras não possuem organelas internas

A estrutura e a composição das hemácias refletem a sua função altamente especializada: liberar a máxima quantidade possível

de oxigênio para os tecidos e auxiliar na remoção de dióxido de carbono, um resíduo da respiração celular, e de ureia. O interior da hemácia contém concentração maciça de hemoglobina, cerca de um terço do peso (30-34 g/dl em um adulto). Essa extraordinária capacidade da hemoglobina foi alcançada, em parte, pela adoção de estrutura celular raramente simplificada. As hemácias maduras não possuem as organelas intracelulares encontradas nas outras células eucarióticas (p. ex., núcleo, lisossomo, aparelho de Golgi, mitocôndrias). Como consequência, as hemácias **enucleadas** são incapazes de se reproduzir.

As hemácias possuem uma extensa rede de citoesqueleto responsável pela manutenção de sua configuração bicôncava (Figura 53-2). O seu formato incomum aumenta a troca de oxigênio e dióxido de carbono entre as hemácias e os tecidos de duas maneiras. Primeiramente, a sua configuração em formato de disco apresenta proporção muito mais alta da área superficial em relação ao volume do que as formas geométricas mais esféricas. Em segundo lugar, ela permite que as hemácias se dobrem e se comprimam através de estreitos capilares cujo diâmetro é menor do que a própria hemácia. Minimizando a distância a ser percorrida, esses fatores promovem a troca gaseosa eficiente entre as paredes capilares e a movimentação rápida (até 2 mm/s) das hemácias.

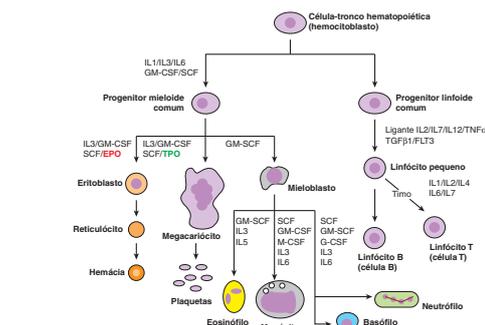


FIGURA 53-1 Hematopoiese. É mostrado um esquema simplificado e bastante abreviado indicando as vias pelas quais as células-tronco hematopoiéticas se diferenciam para produzir muitos dos leucócitos e hemácias quantitativamente mais proeminentes. São mostrados apenas os intermediários do desenvolvimento selecionados. A denominação de cada tipo celular está indicada em **negrito**. Os núcleos celulares estão evidenciados em **rosa**. Cada seta resume uma transição de vários estágios. Os hormônios e as citocinas que estimulam cada transição estão listados próximo às setas. As siglas utilizadas incluem IL, interleucina; SCF, fator de células-tronco; GM-CSF, fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagicas; M-CSF, fator estimulador de colônias macrófagicas; GM-CSF, fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagicas; ligante FLT3, ligante da tirosina-cinase 3 semelhante a FMS; TNF-α, fator de necrose tumoral α; TGF-β1, fator de transformação do crescimento β1; EPO, eritropoietina; TPO, trombopoietina.

Questões para estudo

Seção II – Enzimas: cinética, mecanismo, regulação e biotecnologia

- Respiração rápida e superficial pode levar a hiperventilação, uma condição em que o dióxido de carbono é exalado dos pulmões mais rapidamente do que é produzido pelos tecidos. Explique como a hiperventilação pode levar ao aumento do pH sanguíneo.
- Um bioquímico deseja alterar o sítio ativo da quinimetraína de forma que ela divida a ligação peptídica do lado carbônico de resíduos aspartil e glutâmil. O bioquímico terá mais chance de sucesso se ele substituir o aminoácido hidrofóbico na parte interior do bolso do centro ativo por:
 - Fenilalanina.
 - Treonina.
 - Cisteína.
 - Leucina.
 - Prolina.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Muitas proteínas mitocondriais são covalentemente modificadas pela acetilação de grupos amino- ϵ -podem de resíduos de lisina.
 - A acetilação peptídica é um exemplo de uma modificação covalente que pode ser "reversível" em condições fisiológicas.
 - Alto nível de acet-CoA tendem a favorecer a acetilação peptídica.
 - A acetilação aumenta o volume espacial das cadeias laterais de aminoácidos que são submetidos a esse tipo de modificação.
 - A acetilação lateral de um resíduo lisil acetilado é uma base mais forte do que um resíduo lisil não acetilado.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - A catálise acido-básica é a característica predominante do mecanismo catalítico da protease do HIV.
 - O modelo chave e fechadura de Fischer explica a função de estabelecimento do estado de transição na catálise enzimática.
 - A hidrólise de ligações peptídicas pelas serinas proteases envolve a formação transitória de uma enzima modificada.
 - Muitas enzimas empregam íons metálicos como grupos prostéticos ou cofatores.
 - Em geral, as enzimas ligam-se a análogos de estado de transição mais fortemente do que a análogos de substratos.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Para calcular a K_m , a constante de equilíbrio de uma reação, divide-se a velocidade inicial da reação direta (velocidade = V_0) pela velocidade inicial da reação reversa (velocidade = $-V_0$).
 - A presença de uma enzima não possui efeito sobre a K_m .
 - Para uma reação controlada à temperatura constante, a fração de moléculas de reagente que possui energia cinética suficiente para ultrapassar a energia de ativação da reação é uma constante.

- As enzimas e outros catalisadores reduzem a energia de ativação das reações.
 - O sinal algébrico de ΔG , a variação de energia livre de Gibbs para a reação, indica a direção em que a reação seguirá.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Como utilizado na bioquímica, a concentração do estado-partido dos produtos e reagentes, que não sejam prótons, é de 1 molar.
 - A ΔG é uma função do logaritmo de K_m .
 - Como utilizado em reações químicas, o termo "spontaneidade" refere-se ao fato de a reação como escrita ser favorecida para avançar da esquerda para a direita.
 - A ΔG representa a variação de energia livre que acompanha a transição de estado-partido até o equilíbrio.
 - Quando atingem o equilíbrio, as velocidades das reações direta e reversa caem para zero.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - As enzimas reduzem a energia de ativação de uma reação.
 - As enzimas, com frequência, reduzem a energia de ativação, desestabilizando o intermediário do estado de transição.
 - Resíduos histidil do sítio ativo, em geral, auxiliam na catálise, atuando como doadores ou aceptores de prótons.
 - A catálise covalente é empregada por algumas enzimas para fornecer uma via alternativa de reação.
 - A presença de uma enzima não tem efeito sobre a ΔG .
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Para a maioria das enzimas, a velocidade inicial da reação, v_0 , tem uma dependência hipérbolica da [S].
 - Quando a [S] é muito menor que o K_m , o termo $K_m + [S]$ da equação de Michaelis-Menten se aproxima muito do K_m . Sob essas condições, a velocidade de catálise é uma função linear da [S].
 - As concentrações molares dos substratos e dos produtos são iguais quando a velocidade de uma reação catalisada por enzima atinge metade de seu valor potencial máximo ($V_{max}/2$).
 - Diz-se que uma enzima se tornou saturada com o substrato quando o aumento sucessivo da [S] não produz aumento significativo no v_0 .
 - Quando é medida a velocidade no estado de equilíbrio, a concentração dos substratos deve exceder muito aquela da enzima catalisadora.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Algumas enzimas monoméricas exibem cinética de velocidade inicial sigmoidal.
 - A equação de Hill é utilizada para realizar análises quantitativas do comportamento cooperativo das enzimas ou de catalisadores prostéticos, como hemoglobina ou calmodulina.
 - Para uma enzima que sofre ligação cooperativa com o substrato, o valor de n (o coeficiente de Hill) maior que uma unidade significa cooperatividade positiva.
 - Uma enzima que catalisa uma reação entre dois ou mais substratos é conhecida por operar por um mecanismo sequencial se for necessário que os substratos se liguem em uma ordem fixa.

Questões de revisão ao final das seções

SEÇÃO VI

Metabolismo de proteínas e aminoácidos

Biossíntese dos aminoácidos nutricionalmente não essenciais

CAPÍTULO 27

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar por que a ausência de certos aminoácidos na dieta, que estão presentes na maioria das proteínas, não é prejudicial para a saúde humana.
- Avaliar a distinção entre os termos aminoácido "essencial" e aminoácido "nutricionalmente essencial" e identificar os aminoácidos que são nutricionalmente não essenciais.
- Nomes os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da glicólise que são precursores do aspartato, asparagins, glutamato, glutamina, glicina e serina.
- Ilustrar a função essencial das transaminases no metabolismo dos aminoácidos.
- Explicar o processo pelo qual são formados o 4-hidroxiacetoil-CoA e o 5-hidroxiacetoil-CoA em proteínas como o colágeno.
- Descrever a apresentação clínica do escorbuto e fornecer uma explicação bioquímica do motivo por que a privação grave de vitamina C (ácido ascórbico) resulta numa disfunção nutricional.
- Reconhecer que, apesar da toxicidade do selênio, a selenocisteína é um componente essencial de várias proteínas de mamíferos.
- Definir e delimitar a reação catalisada pela oxidase de função mista.
- Identificar o papel da tetra-hidropterina na biossíntese de tirrosina.
- Indicar o papel de um tRNA modificado na inserção cotranslacional da selenocisteína em proteínas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os estados de deficiência de aminoácidos podem ocorrer se aminoácidos nutricionalmente essenciais estiverem ausentes da dieta ou estiverem presentes em quantidades inadequadas. Exemplos, em certas regiões da África Ocidental, incluem o kwashiorkor, que ocorre quando uma criança é desmamada para uma dieta baseada em amido e pobre em proteínas, e o marasmo, em que tanto a ingestão calórica quanto a de aminoácidos específicos estão deficientes. Os pacientes com síndrome do intestino curto, que são incapazes de absorver quantidades suficientes de calorias e nutrientes, apresentam anomalias nutricionais e metabólicas significativas. Tanto

o distúrbio nutricional conhecido como escorbuto, uma deficiência dietética de vitamina C, quanto distúrbios genéticos específicos estão associados a uma redução da capacidade de o tecido conectivo formar hidroxiprolina e hidroxilisina. A consequente instabilidade na conformação do colágeno resulta em sangramento das gengivas, edema das articulações, cicatrização deficiente de feridas e, por fim, morte. A síndrome de Menkes, caracterizada por pelos crespos e retardado no crescimento, resulta da deficiência de cobre na dieta, um cofator essencial para a enzima lisil oxidase que atua na formação das ligações covalentes cruzadas que dão força às fibras de colágeno. Os distúrbios genéticos da biossíntese de colágeno incluem várias formas de osteogênese imperfeita, caracterizada por

Descrição dos objetivos na abertura do capítulo

550 SEÇÃO IX Tópicos essenciais (A)

TABELA 44-4 Ingestão recomendada de nutrientes para vitaminas, FAO, 2001

Idade	VL A (µg)	VL D (µg)	VL K (mg)	VL B ₁ (mg)	VL B ₂ (mg)	Niacina (mg)	VL B ₆ (µg)	VL B ₁₂ (µg)	VL C (mg)	Folato (µg)	VL E (µg)	VL C (mg)	Panto (µg)	Biotina (µg)
0-6 meses	375	5	5	0,2	0,3	2	0,1	80	0,4	25	1,7	5		
7-12 meses	400	5	10	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	30	1,8	6		
1-3 anos	400	5	15	0,5	0,5	6	0,5	100	0,9	30	2,0	8		
4-6 anos	400	5	20	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2	30	3,0	12		
7-9 anos	500	5	25	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	35	4,0	20		
Homens														
10-18 anos	600	5	35-55	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	40	5,0	30		
19-30 anos	600	5	65	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	45	5,0	30		
30-65 anos	600	10	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30		
> 65 anos	600	15	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30		
Mulheres														
10-18 anos	600	5	35-55	1,1	1,0	16	1,2	400	2,4	40	5,0	25		
19-30 anos	600	5	35	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	40	5,0	30		
30-65 anos	600	10	35	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30		
> 65 anos	600	15	35	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30		
Gestantes	800	5	35	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	55	6,0	30		
Um fase de lactação	800	5	55	1,5	1,6	17	2,0	600	2,8	60	7,0	35		

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Human Vitamins and Mineral Requirements, FAO, 2001.

TABELA 44-5 As vitaminas

Vitamina	Funções	Doença por deficiência
Lipossolúveis		
A	Retinol, β -caroteno	Pigmento visual da retina; regulação da expressão dos genes e diferenciação celular (o β -caroteno é um antioxidante)
D	Calciferol	Mantém o equilíbrio do cálcio; aumenta a absorção intestinal do Ca^{2+} ; modula a mineralização; regulação da expressão gênica e da diferenciação celular
E	Tocoferóis, tocotrienóis	Antioxidante; particularmente nas membranas celulares; funções na sinalização celular
K	Filóquinona; menaquinonas	Cofatores na formação do γ -carboxiglutamato em enzimas da coagulação sanguínea e da matriz óssea
Hidrossolúveis		
B ₁	Tiamina	Cofatores das piruvato e α -cetoglutarato desidrogenases e transacetilase; regula o canal de Cl^- na corrente nervosa
B ₂	Riboflavina	Cofatores nas reações de oxidação e redução (FAD e FMN); pigmento amarelo das flavoproteínas
Niacina	Ácido nicotínico, nicotinamida	Cofatores nas reações de oxidação e redução; parte funcional do NAD e do NADP; desempenha um papel na regulação do cálcio intracelular e na sinalização celular
B ₆	Piridoxal, piridoxol, piridoxina	Cofatores na transaminação e na descarboxilação dos aminoácidos e da glicogênese; modula a ação dos hormônios esteróides
Ácido fólico	Cofatores na transferência de fragmentos de 1 carbono	Anemia megaloblástica
B ₁₂	Cobalamina	Cofatores na transferência de 1 carbono e no metabolismo do ácido fólico
Ácido pantotênico	Parte funcional da CoA e da proteína carreadora de acil	Anemia perniciosa; anemia megaloblástica com degeneração da medula óssea
H	Biotina	Cofatores nas reações de carboxilação; glicosilação; síntese dos ácidos graxos; desempenha um papel na regulação do ciclo celular
C	Ácido ascórbico	Cofatores na hidroxilação da prolina e de lisina na síntese do colágeno; antioxidante; aumenta a absorção do ferro

Tabelas destacam informações relevantes

SEÇÃO VII

Bioenergética

Bioenergética: a função do ATP

CAPÍTULO 11

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Relatar a primeira e a segunda leis da termodinâmica e compreender como elas se aplicam aos sistemas biológicos.
- Explicar o que significam os termos energia livre, entropia, entalpia, energética e endergônica.
- Observar como as reações endergônicas podem ser favorecidas por meio do acoplamento a reações que são exergônicas nos sistemas biológicos.
- Compreender o papel dos fosfatos de alta energia, do ATP e de outros nucleotídeos trifosfato na transferência de energia livre dos processos exergônicos para os endergônicos, possibilitando que atuem como "moedas energéticas" das células.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioenergética, ou termodinâmica bioquímica, é o estudo das alterações de energia que acompanham as reações bioquímicas. Os sistemas biológicos são essencialmente biotérmicos e utilizam energia química para ativar os processos vivos. A manobra como um animal obtém o combustível adequado a partir da sua alimentação para o funcionamento dessa energia é fundamental para a compreensão da nutrição normal e do metabolismo. A morte por inanção ocorre quando as reservas de energia disponíveis são esgotadas, sendo que determinadas formas de desnutrição estão associadas ao desequilíbrio da energia (marasmo). Os hormônios da tireóide controlam as taxas metabólicas (velocidade de energia liberada), e seu mau funcionamento leva ao desenvolvimento de doenças. O armazenamento excessivo de energia sobrepõe a produção e a utilização, uma condição cada vez mais comum na sociedade ocidental, e que predispõe a muitas doenças, inclusive à doença cardiovascular e ao diabetes melito tipo 2, além de diminuir a expectativa de vida.

A ENERGIA LIVRE É ENERGIA ÚTIL EM UM SISTEMA

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é a porção da variação total de energia no sistema que está disponível para realizar trabalho – isto é, a energia útil, também conhecida como potencial químico.

Os sistemas biológicos adaptam-se às leis gerais da termodinâmica

A primeira lei da termodinâmica declara que a energia total de um sistema, inclusive em seus arredores, permanece constante. Isso significa que, dentro do sistema total, a energia não é perdida nem adquirida durante qualquer alteração. No entanto, a energia pode ser transferida de uma parte do sistema para outra ou ainda ser transformada em outra forma de energia. Nos sistemas vivos, a energia química pode ser transformada em calor ou em energia elétrica, radiante ou mecânica.

Cada capítulo inclui uma seção sobre importância biomédica

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Bioquímica e medicina

Victor W. Rodwell, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Entender a importância da habilidade de extratos de levedura livres de células fermentarem açúcares, uma observação que possibilitou a descoberta dos intermediários da fermentação, da glicólise e de outras vias metabólicas.
- Reconhecer a abrangência da bioquímica e seu papel central nas ciências da vida, e que a bioquímica e a medicina são disciplinas intimamente relacionadas.
- Compreender que a bioquímica integra conhecimentos de processos químicos em células vivas com estratégias para se manter saudável, entender doenças, identificar terapias em potencial e aumentar o entendimento sobre as origens da vida na Terra.
- Descrever como as abordagens genéticas têm sido cruciais para a elucidação de muitas áreas da bioquímica e como o Projeto Genoma Humano promoveu ainda mais avanços em vários aspectos da biologia e da medicina.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioquímica e a medicina desfrutam de uma relação mutuamente cooperativa. Os estudos bioquímicos esclareceram muitos aspectos da saúde e da doença, e o estudo de vários aspectos da saúde e da doença fizeram surgir novas áreas da bioquímica. A relevância médica da bioquímica em situações normais e anormais é enfatizada ao longo deste livro. A bioquímica traz significativas contribuições para áreas da biologia celular, fisiologia, imunologia, microbiologia, farmacologia e toxicologia, assim como para as áreas de inflamação, dano celular e câncer. Essas relações íntimas enfatizam que a vida, como a conhecemos, depende de reações e processos bioquímicos.

A BIOQUÍMICA TEVE INÍCIO COM A DESCOBERTA DE QUE EXTRATOS DE LEVEDURAS LIVRES DE CÉLULAS PODEM FERMENTAR AÇÚCAR

O conhecimento de que leveduras podem converter os açúcares em álcool etílico antecede os registros históricos. No entanto, foi somente durante os primeiros anos do século XX que esse processo levou diretamente à ciência da bioquímica. Apesar de suas investigações inspiradoras da fabricação de cerveja e de vinificação, o grande microbiologista Louis Pasteur acreditava que o processo de fermentação só poderia ocorrer em células

intactas. O seu erro foi demonstrado, em 1899, pelos irmãos Büchner, que descobriram que a fermentação pode, de fato, ocorrer em extratos livres de células. Essa revelação resultou do armazenamento de um extrato de levedura em um pote de solução concentrada de açúcar adicionada como conservante. Ao longo da noite, o conteúdo do pote fermentado, que deram sobre a bancada do laboratório e no chão, demonstrou que, sem dúvida alguma, a fermentação pode prosseguir na ausência de células intactas. Essa descoberta possibilitou uma série de investigações rápidas e altamente produtivas nos primeiros anos do século XX que deram início à ciência da bioquímica. Essas investigações revelaram o papel vital do fosfato inorgânico, do ADP, do ATP e do NAD(H) e, por fim, identificaram os açúcares fosforilados e as reações químicas e enzimas (Gk “em leveduras”) que convertem glicose em piruvato (glicólise) ou em etanol e CO₂ (fermentação). Pesquisas subsequentes realizadas nos anos 1930 e 1940 identificaram os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da biossíntese da ureia e forneceram uma visão sobre as funções essenciais de certos cofatores derivados de vitaminas ou “coenzimas”, como tiamina pirofosfato, riboflavina e, finalmente, coenzima A, coenzima Q e coenzimas cobamida. Os anos 1950 revelaram como carboidratos complexos são sintetizados, e quebrados a açúcares simples, e delineararam as vias para a biossíntese das pentoses e da quebra de aminoácidos e de lipídeos.

Modelos animais, órgãos intactos perfundidos, fatias de tecidos, homogenatos de células e suas subfrações e enzimas purificadas foram utilizados para isolar e identificar metabólitos e enzimas. Esses avanços foram possíveis devido ao desenvolvimento, no fim dos anos 1930 e início dos anos 1940, de técnicas, como ultracentrifugação analítica, cromatografia em papel e outras formas de cromatografia, e a disponibilidade, após a Segunda Guerra Mundial, de radioisótopos, principalmente ¹⁴C, ³H e ³²P, como “marcadores” para identificar os intermediários em vias complexas, como a via que leva à biossíntese de colesterol e outros isoprenoides e às vias de biossíntese e catabolismo de aminoácidos. A cristalografia de raios X foi, então, utilizada para resolver estruturas tridimensionais, primeiro da mioglobina e, subsequentemente, de várias proteínas, polinucleotídeos, enzimas e diversos vírus, incluindo o do resfriado comum. Os avanços genéticos que se seguiram à constatação de que o DNA é uma dupla-hélice inclui a reação em cadeia

da polimerase e animais transgênicos ou com genes *knockouts*. Os métodos utilizados para preparar, analisar, purificar e identificar metabólitos e as atividades de enzimas naturais e recombinantes e suas estruturas tridimensionais são discutidos nos capítulos seguintes.

A BIOQUÍMICA E A MEDICINA ESTIMULARAM AVANÇOS MÚTUOS

As duas principais preocupações para os pesquisadores das ciências da saúde – particularmente os médicos – são a compreensão e a manutenção da saúde, bem como a compreensão e o tratamento efetivo das doenças. A bioquímica abrange essas duas preocupações fundamentais, e a inter-relação entre a bioquímica e a medicina é uma via ampla e de duas mãos. Os estudos bioquímicos esclareceram muitos aspectos da saúde e da doença e, em contrapartida, o estudo de vários aspectos da saúde e da doença abriram novas áreas da bioquímica (**Figura 1-1**). O conhecimento da estrutura e da função das proteínas foi necessário para identificar e entender a diferença individual na sequência de aminoácidos da hemoglobina normal e da hemoglobina falciforme, e a análise de numerosas variantes de hemoglobinas falciformes e outras hemoglobinas contribuiu significativamente para o entendimento da estrutura e da função da hemoglobina normal e de outras proteínas. Durante o início dos anos 1900, o médico inglês Archibald Garrod estudou pacientes com doenças relativamente raras – alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria – e estabeleceu que essas condições eram geneticamente determinadas. Garrod chamou essas condições de **erros inatos do metabolismo**. As suas percepções proporcionaram uma base importante para o desenvolvimento do campo da genética bioquímica humana. Um exemplo mais recente foi a investigação das bases genéticas e moleculares da hipercolesterolemia familiar, uma doença que resulta no início precoce de aterosclerose. Além de esclarecer as mutações responsáveis por essa doença, esse estudo forneceu um entendimento mais profundo de receptores celulares e mecanismos de captação não apenas do colesterol, mas de como outras moléculas atravessam as membranas celulares. Estudos de **oncogenes** e dos **genes supressores de tumor** em células cancerosas direcionaram a atenção para os

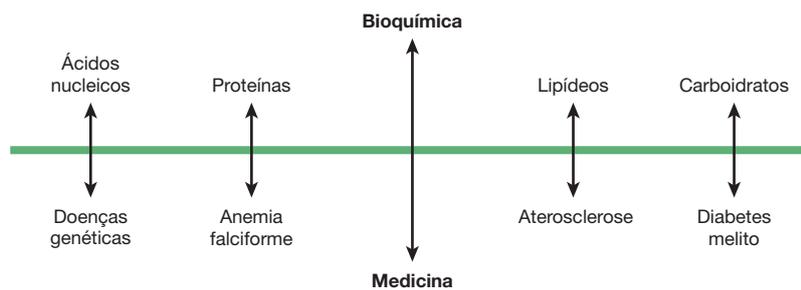


FIGURA 1-1 Uma via de mão dupla conecta a bioquímica e a medicina. O conhecimento de tópicos de bioquímica mostrados na parte superior da linha verde do diagrama esclareceu o nosso entendimento das doenças mostradas na parte inferior da linha verde. Além disso, a análise das doenças elucidou muitas áreas da bioquímica. A anemia falciforme é uma doença genética, e tanto a aterosclerose quanto o diabetes melito possuem componentes genéticos.

mecanismos moleculares envolvidos no controle do crescimento da célula normal. Esses exemplos ilustram como o estudo das doenças pode abrir áreas de investigação bioquímica básica. A ciência fornece aos médicos e a outros profissionais da saúde e da biologia uma base que impacta a prática, estimula a curiosidade e promove a adoção de abordagens científicas para o aprendizado contínuo. Enquanto o tratamento médico estiver firmemente fundamentado no conhecimento de bioquímica e de outras ciências básicas, a prática da medicina terá uma base racional capaz de acomodar e adaptar novos conhecimentos.

OS PROCESSOS BIOQUÍMICOS NORMAIS SÃO A BASE DA SAÚDE

A pesquisa bioquímica tem efeito na nutrição e na medicina preventiva

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define saúde como estado de “bem-estar físico, mental e social completo, e não simplesmente a ausência de doença e enfermidade”. Do ponto de vista bioquímico, a saúde pode ser considerada a situação em que todas as milhares de reações intracelulares e extracelulares que ocorrem no organismo o fazem em taxas proporcionais com a sobrevivência do organismo sob a pressão dos desafios internos e externos. A manutenção da saúde requer a ingestão otimizada de um certo número de produtos químicos; dentre eles estão as **vitaminas**, certos **aminoácidos** e **ácidos graxos**, vários **minerais** e **água**. O entendimento da nutrição depende, em grande parte, do conhecimento de bioquímica, e as ciências da bioquímica e da nutrição compartilham o foco nessas substâncias químicas. Recentemente, tem sido dada grande ênfase sobre as tentativas sistemáticas com o objetivo de manter a saúde e prevenir a doença, ou **medicina preventiva**, que inclui abordagens nutricionais para a prevenção de doenças, como aterosclerose e câncer.

A maioria das doenças possui uma base bioquímica

Com exceção de organismos infecciosos e poluentes ambientais, muitas doenças são manifestações de anormalidades em genes, proteínas, reações químicas ou processos bioquímicos, sendo que cada uma dessas anormalidades pode afetar negativamente uma ou mais funções bioquímicas essenciais. Exemplos de distúrbios da bioquímica humana responsáveis por doenças ou outras condições debilitantes incluem desequilíbrio eletrolítico, ingestão ou absorção deficiente de nutrientes, desequilíbrio hormonal, agentes químicos ou biológicos tóxicos e doenças genéticas. Para abordar esses desafios, a pesquisa bioquímica continua a ser entrelaçada com estudos em disciplinas como genética, biologia celular, imunologia, nutrição, patologia e farmacologia. Além disso, muitos bioquímicos estão extremamente interessados em contribuir para soluções de problemas fundamentais, como a sobrevivência da humanidade e a educação da população para o uso de métodos científicos na solução de problemas ambientais e de outros grandes problemas com os quais somos confrontados.

O impacto do Projeto Genoma Humano na bioquímica, na biologia e na medicina

O rápido progresso no fim dos anos 1990 no sequenciamento do genoma humano levou ao anúncio, em meados dos anos 2000, de que mais de 90% do genoma tinha sido sequenciado. Esse esforço foi liderado pelo International Human Genome Sequencing Consortium (Consórcio Internacional para o Sequenciamento do Genoma Humano) e pela Celera Genomics, uma companhia privada. Exceto por algumas lacunas, o sequenciamento completo do genoma humano foi finalizado, em 2003, apenas 50 anos após a descrição da natureza de dupla-hélice do DNA por Watson e Crick. As implicações para a bioquímica, a medicina e, de fato, para toda a biologia são praticamente ilimitadas. Por exemplo, a habilidade de isolar e sequenciar um gene e de investigar sua estrutura e função por meio de experimentos de sequenciamento, e, com o gene *knockout*, revelaram genes previamente desconhecidos e seus produtos, além de novas ideias a respeito da evolução humana e de procedimentos para identificar genes relacionados a doenças humanas.

Os principais avanços na bioquímica e no entendimento da saúde e da doença humana continuam a ser feitos por mutação dos genomas de organismos-modelo, como levedura e eucariotos, como a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, e o verme *Caenorhabditis elegans*. Cada organismo tem tempo de geração curto e pode ser geneticamente manipulado para fornecer conhecimentos sobre as funções de genes individuais. Esses avanços podem ser traduzidos potencialmente em abordagens que ajudam os seres humanos, fornecendo dicas para curar doenças humanas, como câncer e doença de Alzheimer. A **Figura 1-2** salienta áreas que foram desenvolvidas ou aceleradas como resultado direto do progresso feito com o Projeto Genoma Humano (PGH). Os novos campos da “-ômica” surgiram, e cada um deles concentra-se no estudo abrangente das estruturas e das funções das moléculas relacionadas a cada um deles. As definições dessas áreas mencionadas a seguir estão no Glossário deste capítulo. Os produtos dos genes (moléculas de RNA e proteínas) estão sendo estudados por meio das técnicas de **transcriptômica** e **proteômica**. Um exemplo espetacular da velocidade do progresso na transcriptômica é a ampliação de conhecimentos sobre pequenas moléculas de RNA como reguladoras da atividade gênica. Outros campos -ômica incluem **glicômica**, **lipidômica**, **metabolômica**, **nutrigenômica** e **farmacogenômica**. Para manter o ritmo com as informações geradas, a **bioinformática** tem recebido muita atenção. Os outros campos relacionados para os quais o impulso decorrente do PGH transitou são a **biotecnologia**, a **bioengenharia**, a **biofísica** e a **bioética**. A **nanotecnologia** é uma área ativa que pode, por exemplo, envolver novos métodos de diagnóstico e tratamento para o câncer e outras patologias. A **biologia de células-tronco** está no centro de grande parte da pesquisa atual. A **terapia gênica** ainda tem que cumprir a promessa oferecida, mas parece que isso finalmente ocorrerá. Muitos **exames diagnósticos moleculares** foram desenvolvidos em áreas como os exames e diagnósticos genéticos, microbiológicos e imunológicos. A **biologia dos sistemas** também está em desenvolvimento. Os resultados das pesquisas nas várias áreas supramencionadas terão enorme impacto sobre o futuro da biologia, da

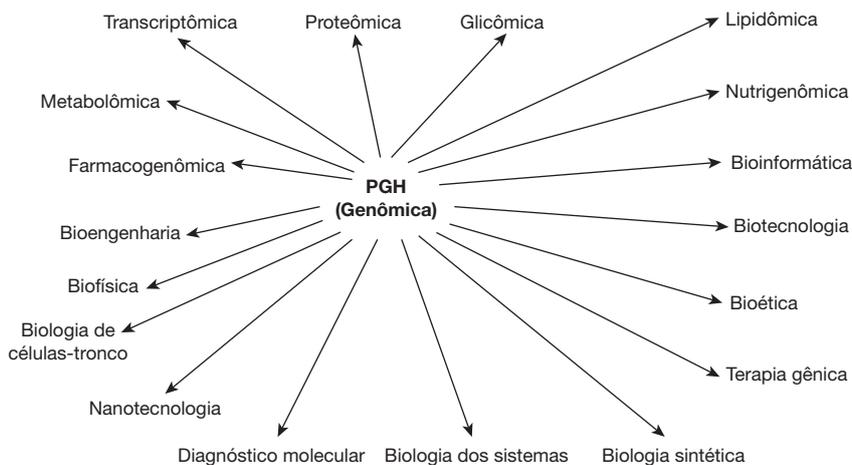


FIGURA 1-2 O Projeto Genoma Humano (PGH) influenciou muitas disciplinas e áreas de pesquisa. A bioquímica não está listada, já que ela antecede ao início do PGH, mas disciplinas como bioinformática, genômica, glicômica, lipidômica, metabolômica, diagnóstico molecular, proteômica e transcriptômica estão, por serem áreas ativas de pesquisa bioquímica.

medicina e das ciências da saúde. A **biologia sintética** oferece o potencial de criar organismos vivos, inicialmente pequenas bactérias, a partir de material genético *in vitro*, que possam realizar tarefas específicas, como a limpeza de derramamentos de petróleo. Todos os itens citados fazem do século XXI um período emocionante para os que estão diretamente envolvidos na biologia e na medicina.

RESUMO

- A bioquímica é a ciência dedicada ao estudo de várias moléculas que ocorrem em células e organismos vivos, das reações químicas individuais e de suas catálises enzimáticas e da expressão e regulação de cada um dos processos metabólicos. Como a vida depende de reações bioquímicas, a bioquímica tornou-se a linguagem básica de todas as ciências biológicas.
- Apesar de este texto ter a bioquímica humana como foco, a bioquímica dedica-se ao espectro completo das formas vivas, desde vírus relativamente simples e bactérias até eucariotos complexos, como os seres humanos.
- A bioquímica, a medicina e outras disciplinas de cuidados à saúde estão intimamente relacionadas. A saúde em todas as espécies depende de um equilíbrio harmonioso das reações bioquímicas que ocorrem no organismo, sendo que a doença reflete as anormalidades nas biomoléculas, nas reações bioquímicas ou nos processos bioquímicos.
- Os avanços no conhecimento bioquímico elucidaram muitas áreas da medicina, e, com frequência, o estudo das doenças revela aspectos previamente não percebidos da bioquímica.
- As abordagens bioquímicas são, frequentemente, fundamentais para que se esclareçam as causas das doenças e para que se projetem terapias adequadas, e vários testes laboratoriais bioquímicos representam um componente integral do diagnóstico e do acompanhamento do tratamento.
- Um conhecimento adequado da bioquímica e de outras disciplinas básicas correlatas é essencial para a prática racional da medicina e das ciências da saúde associadas.

- Os resultados do PGH e da pesquisa em áreas relacionadas terão profunda influência no futuro da biologia, da medicina e de outras ciências da saúde.
- A pesquisa genômica em organismos-modelo, como as leveduras, a mosca-da-fruta, *D. melanogaster*, e o verme *C. elegans*, fornece pistas sobre o entendimento das doenças humanas.

REFERÊNCIAS

- Alberts B: Model organisms and human health. *Science* 2010; 330:1724.
- Alberts B: Lessons from genomics. *Science* 2011;331:511.
- Cammack R, Attwood T, Campbell P, et al (editors): *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. Oxford University Press, 2006.
- Cooke M: Science for physicians. *Science* 2010;329:1573.
- Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS: Genomic medicine—an updated primer. *N Engl J Med* 2010;362:2001.
- Gibson DG, Glass JL, Lartigue C, et al: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010;329:52.
- Kornberg A: Centenary of the birth of modern biochemistry. *FASEB J* 1997;11:1209.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University & National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001. Available online and updated as *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* at www.ommbid.com.
- Weatherall DJ: Systems biology and red cells. *N Engl J Med* 2011;364:376.

GLOSSÁRIO

- Bioengenharia:** aplicação da engenharia na biologia e na medicina.
- Bioética:** área da ética que se relaciona com a aplicação dos princípios morais e éticos à biologia e à medicina.

Biofísica: aplicação da física e suas técnicas à biologia e à medicina.

Bioinformática: disciplina relacionada com a coleta, o armazenamento e a análise de dados biológicos, principalmente as sequências de DNA e proteína (ver Capítulo 10).

Biologia das células-tronco: células-tronco são células indiferenciadas que possuem o potencial para autorrenovação e diferenciação em qualquer uma das células adultas de um organismo. A biologia das células-tronco preocupa-se com a biologia dessas células e seu potencial para o tratamento de várias doenças.

Biologia de sistemas: campo que se refere aos sistemas biológicos complexos estudados como entidades integradas.

Biologia sintética: campo que combina as técnicas biomoleculares com as condutas de engenharia para construir novas funções e sistemas biológicos.

Biotecnologia: campo em que a bioquímica, a engenharia e outras abordagens são combinadas para desenvolver produtos biológicos de uso na medicina e na indústria.

Diagnóstico molecular: refere-se ao uso de abordagens moleculares, como sondas de DNA, para auxiliar no diagnóstico de várias condições bioquímicas, genéticas, imunológicas, microbiológicas e de outras condições médicas.

Farmacogenômica: uso de informações genômicas e tecnologias para otimizar a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos e alvos de fármacos.

Genômica: o genoma é o conjunto completo de genes de um organismo, e a genômica é o estudo minucioso das estruturas e das funções dos genomas.

Glicômica: o glicoma é o conteúdo total de carboidratos simples e complexos em um organismo. Glicômica é o estudo sistemático das estruturas e das funções de glicomas, como o glicoma humano.

Lipidômica: o lipidoma é o conteúdo completo de lipídeos encontrados em um organismo. A lipidômica é o estudo aprofundado das estruturas e das funções de todos os membros do lipidoma e de suas interações, tanto na saúde quanto na doença.

Metabolômica: o metaboloma é o conteúdo completo dos metabólitos (pequenas moléculas envolvidas no metabolismo) encontrados em um organismo. A metabolômica é o estudo aprofundado de suas estruturas, funções e alterações nos vários estados metabólicos.

Nanotecnologia: desenvolvimento e aplicação na medicina e em outras áreas de dispositivos, como as nanocápsulas, que têm apenas poucos nanômetros de comprimento (10^{-9} m = 1 nm).

Nutrigenômica: estudo sistemático dos efeitos dos nutrientes sobre a expressão genética e também dos efeitos das variações genéticas sobre o metabolismo dos nutrientes.

Proteômica: o proteoma é o conjunto completo das proteínas de um organismo. Proteômica é o estudo sistemático das estruturas e das funções dos proteomas e de suas variações na saúde e na doença.

Terapia gênica: aplica-se ao uso de genes geneticamente modificados para tratar várias doenças.

Transcriptômica: estudo abrangente do transcriptoma, o conjunto completo de transcritos de RNA produzidos pelo genoma durante um determinado período de tempo.

Água e pH

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as propriedades da água que contribuem para sua tensão superficial, viscosidade, estado líquido na temperatura ambiente e poder solvente.
- Utilizar fórmulas estruturais para representar vários compostos orgânicos que podem servir como aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio.
- Explicar o papel desempenhado pela entropia na orientação, em um meio aquoso, das regiões polares e apolares das macromoléculas.
- Indicar as contribuições quantitativas das pontes salinas, das interações hidrofóbicas e das forças de van der Waals para a estabilidade das macromoléculas.
- Explicar a relação do pH com a acidez, a alcalinidade e os determinantes quantitativos que caracterizam os ácidos fracos e fortes.
- Calcular a variação no pH que ocorre durante a adição de uma determinada quantidade de ácido ou base ao pH de uma solução tampoadada.
- Descrever o que os tampões fazem, como eles atuam e as condições nas quais um tampão é mais efetivo fisiologicamente ou em outras condições.
- Ilustrar como a equação da Henderson-Hasselbach pode ser utilizada para calcular a carga líquida sobre um polieletrólito em um determinado pH.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A água é o componente químico predominante nos organismos vivos. As suas propriedades físicas únicas, que incluem a capacidade de solvatar uma ampla gama de moléculas orgânicas e inorgânicas, derivam da sua estrutura dipolar e da excepcional capacidade de interação para formar ligações de hidrogênio. A maneira como a água interage com uma molécula solúvel influencia as estruturas da biomolécula e da própria água. Sendo um nucleófilo excelente, a água é um reagente ou produto em muitas reações metabólicas. A regulação do equilíbrio da água depende de mecanismos hipotalâmicos que controlam a sede, do hormônio antidiurético (ADH, do inglês, *antidiuretic hormone*), da retenção ou excreção da água pelos rins e da perda por evaporação. O diabetes insípido nefrogênico, que envolve a incapacidade de concentrar a urina ou se ajustar a alterações sutis na osmolaridade do líquido extracelular, resulta da falta de responsividade dos osmorreceptores tubulares renais ao ADH.

A água apresenta ligeira propensão para se dissociar em íons hidróxido e prótons. A concentração dos prótons, ou **acidez**, das soluções aquosas geralmente é descrita com o uso da escala logarítmica do pH. O bicarbonato e outros

tampões normalmente mantêm o pH do líquido extracelular entre 7,35 e 7,45. A suspeita de distúrbios do equilíbrio ácido-base é verificada pela medição do pH do sangue arterial e do conteúdo de CO_2 do sangue venoso. As causas de acidose (pH sanguíneo $< 7,35$) incluem a cetose diabética e a acidose láctica. A alcalose (pH $> 7,45$) pode suceder ao vômito do conteúdo gástrico ácido.

A ÁGUA É UM SOLVENTE BIOLÓGICO IDEAL

As moléculas de água formam dipolos

Uma molécula de água é um tetraedro irregular, ligeiramente torcido, com o oxigênio em seu centro (**Figura 2-1**). Os dois hidrogênios e os elétrons não compartilhados dos dois orbitais sp^3 -hibridizados remanescentes ocupam os cantos do tetraedro. O ângulo de 105° entre os dois átomos de hidrogênio difere levemente do ângulo tetraédrico ideal, $109,5^\circ$. A amônia também é tetraédrica, com um ângulo de 107° entre seus três hidrogênios. O átomo de oxigênio fortemente eletronegativo de uma molécula de água atrai os elétrons para longe dos

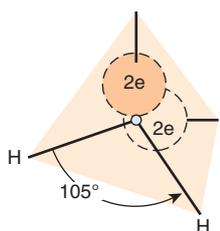


FIGURA 2-1 A molécula de água apresenta geometria tetraédrica.

núcleos de hidrogênio, deixando-os com uma carga parcial positiva, ao passo que seus dois pares de elétrons não compartilhados constituem uma região de carga local negativa.

Uma molécula com carga elétrica distribuída de maneira assimétrica ao redor de sua estrutura é referida como um **dipolo**. O dipolo forte da água é responsável por sua elevada **constante dielétrica**. Conforme descrito quantitativamente pela lei de Coulomb, a força de interação F entre partículas com cargas opostas é inversamente proporcional à constante dielétrica ϵ do meio circundante. A constante dielétrica no vácuo é essencialmente 1; para o hexano é 1,9; para o etanol, 24,3; e para a água a 25°C é 78,5. Portanto, a água diminui muito a força de atração entre espécies carregadas e polares em relação aos ambientes sem água com constantes dielétricas menores. Seu dipolo forte e a constante dielétrica alta possibilitam que ela dissolva grandes quantidades de compostos carregados, como os sais.

As moléculas de água formam ligações de hidrogênio

Um núcleo de hidrogênio parcialmente desprotegido, ligado de modo covalente a um átomo de oxigênio ou de nitrogênio captador de elétron, pode interagir com um par de elétron não compartilhado em outro átomo de oxigênio ou nitrogênio para formar uma **ligação de hidrogênio**. Como as moléculas de água contêm essas duas características, a ligação de hidrogênio favorece a autoassociação das moléculas de água em arranjos ordenados (**Figura 2-2**). A ligação de hidrogênio influencia profundamente as propriedades físicas da água e contribui para sua viscosidade, tensão superficial e ponto de ebulição relativamente altos. Em média, cada molécula em água líquida associa-se através de ligações de hidrogênio a outras 3,5 moléculas. Essas ligações são relativamente fracas e transitórias, com tempo de meia-vida de alguns picossegundos.

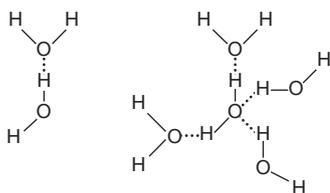


FIGURA 2-2 Moléculas de água associam-se através de ligações de hidrogênio. Associação de duas moléculas de água (à esquerda) e um agrupamento das ligações de hidrogênio de quatro moléculas de água (à direita). A água pode servir simultaneamente como doador e aceptor de hidrogênio.

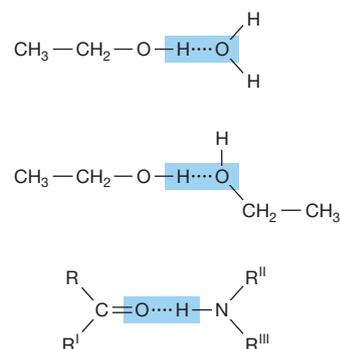


FIGURA 2-3 Os grupamentos polares adicionais participam na ligação de hidrogênio. As ligações de hidrogênio formadas entre álcool e água, entre duas moléculas de etanol e entre o oxigênio da carbonila de um peptídeo e o hidrogênio do nitrogênio do peptídeo de um aminoácido adjacente.

A ruptura de uma ligação de hidrogênio em água líquida requer apenas cerca de 4,5 kcal/mol, menos de 5% da energia necessária para romper uma ligação O—H covalente.

As ligações de hidrogênio possibilitam que a água dissolva muitas biomoléculas orgânicas que contêm grupamentos funcionais que podem participar das ligações de hidrogênio. Os átomos de oxigênio de aldeídos, cetonas e amidas, por exemplo, fornecem pares solitários de elétrons que podem servir como aceptores de hidrogênio. Alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas podem servir tanto como aceptores de hidrogênio quanto como doadores de átomos de hidrogênio desprotegidos para a formação de ligações de hidrogênio (**Figura 2-3**).

A INTERAÇÃO COM A ÁGUA INFLUENCIA A ESTRUTURA DE BIOMOLÉCULAS

Ligações covalentes e não covalentes estabilizam as moléculas biológicas

A ligação covalente é a ligação mais forte que mantém as moléculas unidas (**Tabela 2-1**). As forças não covalentes, embora de menor magnitude, fazem contribuições significativas para a estrutura, a estabilidade e a competência funcional das

TABELA 2-1 Energias de ligação para átomos de significado biológico

Tipo de ligação	Energia (kcal/mol)	Tipo de ligação	Energia (kcal/mol)
O — O	34	O=O	96
S — S	51	C—H	99
C — N	70	C=S	108
S — H	81	O—H	110
C — C	82	C=C	147
C — O	84	C=N	147
N — H	94	C=O	164

macromoléculas nas células vivas. Essas forças, que tanto podem ser de atração quanto de repulsão, envolvem interações tanto dentro da biomolécula quanto entre ela e a água que forma o principal componente do ambiente adjacente.

As biomoléculas dobram-se para posicionar os grupamentos polares e carregados em suas superfícies

A maioria das biomoléculas é **anfipática**; isto é, possui regiões ricas em grupamentos funcionais carregados ou polares, assim como regiões com caráter hidrofóbico. As proteínas tendem a se dobrar com os grupamentos R dos aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas no interior. Os aminoácidos carregados ou as cadeias laterais de aminoácidos polares (p. ex., arginina, glutamato, serina; ver Tabela 3-1) geralmente estão presentes na superfície em contato com a água. Um perfil similar prevalece em uma bicamada fosfolipídica onde os “grupos cabeça” carregados de fosfatidilserina ou fosfatidiletanolamina entram em contato com a água, ao passo que as suas cadeias laterais acilgraxo hidrofóbicas se agregam, excluindo a água (ver Figura 40-5). Esse padrão maximiza as oportunidades para a formação de interações energeticamente favoráveis carga-dipolo, dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio entre os grupamentos polares na biomolécula e na água. Ele também minimiza os contatos energeticamente desfavoráveis entre a água e os grupamentos hidrofóbicos.

Interações hidrofóbicas

A interação hidrofóbica refere-se à tendência dos compostos não polares para se autoassociar em um ambiente aquoso. Essa autoassociação não é dirigida por atração mútua, nem pelo que é por vezes referido de maneira incorreta como “ligações hidrofóbicas”. A autoassociação minimiza a ruptura de interações energeticamente favoráveis entre moléculas de água adjacentes.

Embora os hidrogênios de grupamentos apolares, como os grupamentos metileno dos hidrocarbonetos, não formem ligação de hidrogênio, eles realmente afetam a estrutura da água que os circunda. As moléculas de água adjacentes a um grupamento hidrofóbico apresentam um número restrito de orientações (graus de liberdade) que permitem que elas participem do número máximo de ligações de hidrogênio energeticamente favoráveis. A formação máxima de múltiplas ligações de hidrogênio, o que maximiza a entalpia, pode ser mantida apenas ao aumentar a ordem das moléculas de água adjacentes, com diminuição concomitante na entropia.

A segunda lei da termodinâmica diz que a energia livre ótima de uma mistura entre hidrocarboneto e água é função tanto da entalpia máxima (a partir das ligações de hidrogênio) quanto da entropia mais elevada (graus máximos de liberdade). Desse modo, as moléculas apolares tendem a formar gotículas que minimizam a área de superfície exposta e reduzem o número de moléculas de água, cuja liberdade de movimento se torna restrita. De modo similar, no ambiente aquoso da célula viva, as porções hidrofóbicas dos biopolímeros tendem a ficar dentro da estrutura da molécula ou dentro de uma dupla camada lipídica, minimizando o contato com a água.

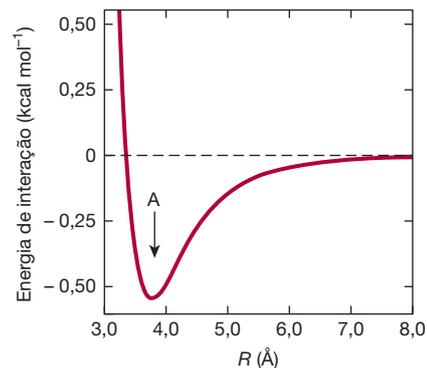


FIGURA 2-4 A força das interações de van der Waals varia com a distância, R , entre as espécies que interagem. A força da interação entre as espécies aumenta com a diminuição da distância entre elas, até que estejam separadas pela distância de contato de van der Waals (ver a seta marcada com A). A repulsão decorrente da interação entre os elétrons de cada átomo ou molécula acontece em seguida. Enquanto interações de van der Waals são extremamente fracas, seu efeito cumulativo é, no entanto, substancial para macromoléculas, como o DNA e as proteínas, que têm muitos átomos em contato próximo.

Interações eletrostáticas

As interações entre grupamentos carregados ajudam a modelar a estrutura biomolecular. As interações eletrostáticas entre grupamentos carregados com cargas opostas dentro ou entre biomoléculas são denominadas **pontes salinas**. As pontes salinas são comparáveis em força às ligações de hidrogênio, mas agem em distâncias maiores. Por conseguinte, elas frequentemente facilitam a ligação de íons e moléculas carregadas com proteínas e ácidos nucleicos.

Forças de van der Waals

As forças de van der Waals originam-se das atrações entre dipolos transitórios produzidos pelo movimento rápido dos elétrons de todos os átomos neutros. Muito mais fracas que as ligações de hidrogênio, porém muito numerosas, as forças de van der Waals diminuem como a sexta potência da distância, separando os átomos (Figura 2-4). Assim, elas atuam em distâncias muito curtas, geralmente de 2 a 4 Å.

As múltiplas forças estabilizam as biomoléculas

A dupla-hélice do DNA ilustra a contribuição das múltiplas forças para a estrutura das biomoléculas. Embora cada fita individual do DNA seja mantida unida por ligações covalentes, as duas fitas da hélice são mantidas juntas exclusivamente por interações não covalentes, como as ligações de hidrogênio entre as bases nucleotídicas (pareamento de bases de Watson-Crick) e as interações de van der Waals entre as bases purínicas e pirimidínicas empilhadas. A dupla-hélice apresenta grupamentos fosfato carregados e grupamentos hidroxila polares dos açúcares-ribose da estrutura do DNA voltados para a água, enquanto desloca para seu interior as bases nucleotídicas relativamente hidrofóbicas. A estrutura alongada maximiza a distância entre os fosfatos carregados negativamente, minimizando as interações eletrostáticas desfavoráveis (ver Figura 34-2).

A ÁGUA É UM EXCELENTE NUCLEÓFILO

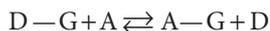
As reações metabólicas frequentemente envolvem o ataque por pares isolados de elétrons que residem em moléculas ricas em elétrons, denominadas **nucleófilos**, sobre átomos deficientes em elétrons, denominados **eletrófilos**. Os nucleófilos e os eletrófilos não têm necessariamente uma carga formal negativa ou positiva. A água, cujos dois pares isolados de elétrons sp^3 carregam uma carga negativa parcial (ver Figura 2-1), é um nucleófilo excelente. Outros nucleófilos de importância biológica incluem os átomos de oxigênio dos fosfatos, dos álcoois e dos ácidos carboxílicos; o enxofre dos tióis; o nitrogênio das amidas; e o anel imidazólico da histidina. Os eletrófilos comuns incluem os carbonos carbonila em amidas, ésteres, aldeídos e cetonas e os átomos de fósforo dos fosfoésteres.

O ataque nucleofílico pela água resulta, normalmente, na clivagem das ligações de amida, de glicosídeo ou de éster que mantêm unidos os biopolímeros. Esse processo é chamado de **hidrólise**. Em contrapartida, quando as unidades monoméricas são unidas para formar biopolímeros, como as proteínas ou o glicogênio, a água é um produto, como, por exemplo, durante a formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos.

Embora a hidrólise seja uma reação favorecida do ponto de vista termodinâmico, as ligações amida e fosfoéster dos polipeptídeos e oligonucleotídeos são estáveis no meio aquoso da célula. Esse comportamento, aparentemente paradoxal, reflete o fato de que a termodinâmica que controla o ponto de equilíbrio de uma reação não determina a *velocidade* em que ela prossegue em direção ao seu ponto de equilíbrio. Na célula, os catalisadores de proteína, chamados de **enzimas**, aceleram a velocidade das reações hidrolíticas quando necessário. As **proteases** catalisam a hidrólise, de proteínas em seus aminoácidos componentes, ao passo que as **nucleases** catalisam a hidrólise das ligações fosfodiéster em moléculas de DNA e RNA. O controle cuidadoso das atividades dessas enzimas é necessário para assegurar que elas atuem apenas em períodos apropriados.

Muitas reações metabólicas envolvem a transferência do grupamento

Muitas das reações enzimáticas responsáveis pela síntese e clivagem de biomoléculas envolvem a transferência de um grupamento químico G de um doador D para um receptor A, de modo a formar um grupamento receptor complexo, A—G:



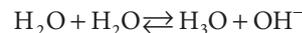
A hidrólise e a fosforólise do glicogênio, por exemplo, envolvem a transferência de grupamentos glicosila para a água ou para o ortofosfato. A constante de equilíbrio para a hidrólise de ligações covalentes favorece significativamente a formação de produtos de clivagem. Por outro lado, muitas reações de transferência de grupo responsáveis pela biossíntese de macromoléculas envolvem a formação de ligações covalentes que são termodinamicamente desfavorecidas. As enzimas catalisadoras desempenham um papel primordial na superação dessas barreiras em virtude de sua capacidade de unir diretamente duas reações normalmente distintas. Ao acoplar uma reação de transferência de grupamento energeticamente desfavorável a uma reação

termodinamicamente favorável, como a hidrólise do ATP, uma nova reação acoplada pode ser gerada, cuja variação líquida *global* na energia livre favorece a síntese do biopolímero.

Diante do caráter nucleofílico da água e da sua alta concentração nas células, por que os biopolímeros, como as proteínas e o DNA, são relativamente estáveis? E como a síntese de biopolímeros pode ocorrer em um ambiente aquoso que favorece a hidrólise? No centro dessas questões estão as propriedades das enzimas. Na ausência de catalisadores enzimáticos, nem mesmo as reações que são altamente favorecidas do ponto de vista termodinâmico ocorrem necessariamente de maneira rápida. O controle preciso e diferencial da atividade enzimática e o sequestro de enzimas em organelas específicas determinam as circunstâncias fisiológicas em que um determinado biopolímero será sintetizado ou degradado. A habilidade do sítio ativo de uma enzima em sequestrar substratos em um ambiente em que a água pode ser excluída facilita a síntese de biopolímeros.

As moléculas de água exibem uma tendência discreta, porém importante, à dissociação

A capacidade da água de ionizar, embora discreta, é de importância fundamental para a vida. Uma vez que a água pode atuar tanto como ácido quanto como base, a sua ionização pode ser representada como uma transferência de próton intermolecular que forma um íon hidrônio (H_3O^+) e um íon hidróxido (OH^-):



O próton transferido está associado, na verdade, a um agrupamento de moléculas de água. Os prótons existem em solução não somente como H_3O^+ , mas também como multímeros, como $H_5O_2^+$ e $H_7O_3^+$. Apesar disso, o próton é rotineiramente representado como H^+ , ainda que esteja, na verdade, altamente hidratado.

Como os íons hidrônio e hidróxido se recombinam continuamente para formar moléculas de água, não se pode dizer que um hidrogênio ou um oxigênio *individual* está presente como um íon ou como parte de uma molécula de água. Em um instante, ele é um íon; um instante depois, ele é parte de uma molécula de água. Portanto, íons ou moléculas individuais não são considerados. Em vez disso, refere-se à *probabilidade* de, em um instante qualquer no tempo, um determinado hidrogênio estar presente como um íon ou como parte de uma molécula de água. Como 1 g de água contém $3,46 \times 10^{22}$ moléculas, a ionização da água pode ser descrita por meios estatísticos. Dizer que a probabilidade de um hidrogênio estar na forma de íon é de 0,01 significa que, em um determinado momento no tempo, um átomo de hidrogênio apresenta 1 chance em 100 de ser um íon, e 99 chances em 100 de ser parte de uma molécula de água. A probabilidade real de um átomo de hidrogênio em água pura existir como um íon hidrogênio é de aproximadamente $1,8 \times 10^{-9}$. Então, a probabilidade de ele ser parte de uma molécula de água é quase 100%. Dito de outra maneira, para cada íon hidrogênio ou íon hidróxido em água pura, existe 0,56 bilhão ou $0,56 \times 10^9$ moléculas de água. Entretanto, os íons hidrogênio e os íons hidróxido contribuem significativamente para as propriedades da água.

Para a dissociação da água,

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$$

em que os colchetes representam as concentrações molares (falando de forma estrita, as atividades molares) e K é a **constante de dissociação**. Como 1 mol de água pesa 18 g, 1 litro (L) (1.000 g) de água contém $1.000/18 = 55,56$ moles. Dessa maneira, a concentração de água pura é 55,56 molares. Uma vez que a probabilidade de um hidrogênio na água pura existir como íon hidrogênio é de $1,8 \times 10^{-9}$, a concentração molar de íons H^+ (ou de íons OH^-) na água pura é o produto da probabilidade, $1,8 \times 10^{-9}$, vezes a concentração molar da água, 55,56 mol/L. O resultado é $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

Agora, é possível calcular a constante de dissociação K da água pura:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{[10^{-7}][10^{-7}]}{[55,56]} \\ = 0,018 \times 10^{-14} = 1,8 \times 10^{-16} \text{ mol/L}$$

A concentração molar da água, 55,56 mol/L, é muito grande para ser afetada de forma significativa pela dissociação. Portanto, considera-se que ela é essencialmente constante. Essa constante pode, por conseguinte, ser incorporada à constante de dissociação K para fornecer uma nova constante K_a útil, denominada **produto iônico** da água. A relação entre K_a e K é mostrada a seguir:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = 1,8 \times 10^{-16} \text{ mol/L} \\ K_a = (K) [\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \\ = (1,8 \times 10^{-16} \text{ mol/L})(55,56 \text{ mol/L}) \\ = 1,00 \times 10^{-14} (\text{mol/L})^2$$

Observe que as dimensões de K são moles por litro, e as de K_a são moles² por litro². Como o nome sugere, o produto iônico K_a é numericamente igual ao produto das concentrações molares de H^+ e OH^- :

$$K_a = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

A 25°C, $K_a = (10^{-7})^2$, ou 10^{-14} (mol/L)². Em temperaturas abaixo de 25°C, K_a é um pouco inferior a 10^{-14} , sendo que, em temperaturas acima de 25°C, é um pouco superior a 10^{-14} . Dentro das limitações estabelecidas de temperatura, K_a é igual a 10^{-14} (mol/L)² para todas as soluções aquosas, inclusive soluções de ácidos e bases. Utiliza-se K_a para calcular o pH de soluções ácidas e básicas.

O pH É O LOGARITMO NEGATIVO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO

O termo **pH** foi introduzido, em 1909, por Sørensen, que definiu o pH como o logaritmo negativo da concentração do íon hidrogênio:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Essa definição, embora não rigorosa, é suficiente para muitos propósitos bioquímicos. Para calcular o pH de uma solução:

1. Calcular a concentração do íon hidrogênio $[\text{H}^+]$.
2. Calcular o logaritmo com base 10 de $[\text{H}^+]$.
3. O pH é o negativo do valor encontrado na etapa 2.

Por exemplo, para a água pura a 25°C,

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = -\log 10^{-7} = -(-7) = 7,0$$

Esse valor também é conhecido como *power* (em inglês), *puissant* (em francês) ou *potenz* (em alemão) do expoente – daí o uso do termo “p”.

Os valores de pH baixos correspondem a altas concentrações de H^+ , e os valores de pH altos correspondem a concentrações baixas de H^+ .

Os ácidos são **doadores de prótons**, e as bases são **aceptores de prótons**. Os **ácidos fortes** (p. ex., HCl, H_2SO_4) dissociam-se totalmente em ânions e prótons, inclusive em soluções fortemente ácidas (pH baixo). Os **ácidos fracos** dissociam-se apenas de modo parcial nas soluções ácidas. De modo similar, as **bases fortes** (p. ex., KOH, NaOH), mas não as **bases fracas** como $\text{Ca}(\text{OH})_2$, são completamente dissociadas até mesmo em pH alto. Muitas substâncias bioquímicas são ácidos fracos. As exceções incluem os intermediários fosforilados, cujo grupamento fosforil contém dois prótons dissociáveis, dos quais o primeiro é fortemente ácido.

Os exemplos a seguir ilustram como calcular o pH de soluções ácidas e básicas.

Exemplo 1: Qual é o pH de uma solução cuja concentração de íon hidrogênio é de $3,2 \times 10^{-4}$ mol/L?

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \\ = -\log (3,2 \times 10^{-4}) \\ = -\log (3,2) - \log (10^{-4}) \\ = -0,5 + 4,0 \\ = 3,5$$

Exemplo 2: Qual é o pH de uma solução cuja concentração de íon hidróxido é de $4,0 \times 10^{-4}$ mol/L? Primeiramente, define-se uma quantidade de **pOH** que é igual a $-\log [\text{OH}^-]$ e que pode ser derivada da definição de K_a :

$$K_a = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

Portanto,

$$\log [\text{H}^+] + \log [\text{OH}^-] = \log 10^{-14}$$

ou

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

Solucionando o problema por esta abordagem:

$$[\text{OH}^-] = 4,0 \times 10^{-4} \\ \text{pOH} = -\log [\text{OH}^-] \\ = -\log (4,0 \times 10^{-4}) \\ = -\log (4,0) - \log (10^{-4}) \\ = -0,60 + 4,0 \\ = 3,4$$

Agora

$$\begin{aligned} \text{pH} &= 14 - \text{pOH} = 14 - 3,4 \\ &= 10,6 \end{aligned}$$

Os exemplos anteriores ilustram como a escala logarítmica de pH facilita o registro e a comparação das concentrações de íon hidrogênio que diferem por ordens de magnitude entre si, isto é, 0,00032 M (pH 3,5) e 0,00000000025 M (pH 10,6).

Exemplo 3: Quais são os valores de pH de (a) $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L de KOH e de (b) $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L de KOH? O OH^- origina-se de duas fontes, KOH e água. Como o pH é determinado por $[\text{H}^+]$ total (e o pOH, por $[\text{OH}^-]$ total), ambas as fontes devem ser consideradas. No primeiro caso (a), a contribuição da água para $[\text{OH}^-]$ total é desprezível. Todavia, isso não se aplica ao segundo caso (b):

	Concentração (mol/L)	
	(a)	(b)
Molaridade da KOH	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-6}$
$[\text{OH}^-]$ da KOH	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-6}$
$[\text{OH}^-]$ da água	$1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-7}$
Total $[\text{OH}^-]$	$2,00001 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-6}$

Uma vez alcançada uma decisão sobre o significado da contribuição da água, o pH pode ser calculado conforme mostrado anteriormente.

Os exemplos anteriores supõem que a base forte KOH está totalmente dissociada na solução e que a concentração dos íons OH^- era, dessa maneira, igual à concentração decorrente do KOH mais aquela presente inicialmente na água. Essa suposição é válida para soluções diluídas de ácidos ou bases fortes, mas não para ácidos ou bases fracas. Como os eletrólitos fracos se dissociam apenas discretamente em solução, deve-se utilizar a **constante de dissociação** para calcular a concentração de $[\text{H}^+]$ (ou $[\text{OH}^-]$) produzida por uma determinada molaridade de um ácido (ou base) fraco antes de calcular $[\text{H}^+]$ total (ou $[\text{OH}^-]$ total) e, subsequentemente, o pH.

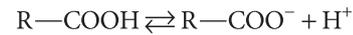
Os grupamentos funcionais que são ácidos fracos apresentam grande significado fisiológico

Muitas substâncias bioquímicas possuem grupamentos funcionais que são ácidos ou bases fracas. Os grupamentos carboxílicos, os grupamentos amino e os ésteres de fosfato, cuja segunda dissociação cai dentro da faixa fisiológica, estão presentes nas proteínas e nos ácidos nucleicos, na maioria das coenzimas e na maioria dos metabólitos intermediários. O conhecimento da dissociação de ácidos e bases fracas é, dessa forma, fundamental para a compreensão da influência do pH intracelular sobre a estrutura e a atividade biológica. As separações baseadas na carga das moléculas, como a eletroforese e a cromatografia de troca iônica, também são mais bem compreendidas em termos do comportamento de dissociação dos grupamentos funcionais.

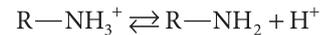
O **ácido** é chamado de espécie protonada (p. ex., HA ou $\text{R}-\text{NH}_3^+$), e sua **base conjugada**, de espécie não protonada

(p. ex., A^- ou $\text{R}-\text{NH}_2$). De modo similar, pode-se referir a uma **base** (p. ex., A^- ou $\text{R}-\text{NH}_2$) e seu **ácido conjugado** (p. ex., HA ou $\text{R}-\text{NH}_3^+$).

As forças relativas dos ácidos e bases fracas são expressas em termos de suas constantes de dissociação. A seguir, são mostradas as expressões da constante de dissociação (K_a) para dois ácidos fracos representativos, $\text{R}-\text{COOH}$ e $\text{R}-\text{NH}_3^+$.



$$K_a = \frac{[\text{R}-\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R}-\text{COOH}]}$$



$$K_a = \frac{[\text{R}-\text{NH}_2][\text{H}^+]}{[\text{R}-\text{NH}_3^+]}$$

Como os valores numéricos da K_a para os ácidos fracos são números exponenciais negativos, K_a é expressa como $\text{p}K_a$, em que

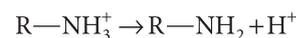
$$\text{p}K_a = -\log K_a$$

Observe que $\text{p}K_a$ está relacionado com K_a , assim como o pH está com $[\text{H}^+]$. Quanto mais forte for o ácido, mais baixo é o valor de seu $\text{p}K_a$.

Os ácidos fracos representativos (à esquerda), suas bases conjugadas (centro) e os valores do $\text{p}K_a$ (à direita) incluem:

$\text{R}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{CH}_2\text{COO}^-$	$\text{p}K_a = 4-5$
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	$\text{p}K_a = 9-10$
H_2CO_3	HCO_3^-	$\text{p}K_a = 6,4$
H_2PO_4^-	HPO_4^{2-}	$\text{p}K_a = 7,2$

O $\text{p}K_a$ é usado para expressar as forças relativas de ácidos e bases. Para qualquer ácido fraco, seu conjugado é uma base forte. De modo similar, o conjugado de uma base forte é um ácido fraco. **As forças relativas das bases são expressas em termos de $\text{p}K_a$ de seus ácidos conjugados.** Para compostos polipróticos contendo mais de um próton dissociável, um expoente numérico é atribuído a cada dissociação, numerado a partir da unidade em ordem decrescente de acidez relativa. Para uma dissociação do tipo



o $\text{p}K_a$ é o pH em que a concentração do ácido $\text{R}-\text{NH}_3^+$ é igual àquela da base $\text{R}-\text{NH}_2$.

A partir das equações anteriores que relacionam K_a a $[\text{H}^+]$ e às concentrações do ácido não dissociado e de sua base conjugada, quando

$$[\text{R}-\text{COO}^-] = [\text{R}-\text{COOH}]$$

ou quando

$$[\text{R}-\text{NH}_2] = [\text{R}-\text{NH}_3^+]$$

então

$$K_a = [\text{H}^+]$$

Assim, quando as espécies associadas (protonadas) e dissociadas (base conjugada) estão presentes em concentrações iguais, a concentração de íon hidrogênio $[\text{H}^+]$ que prevalece

é numericamente igual à constante de dissociação, K_a . Se forem considerados os logaritmos de ambos os lados da equação anterior, e ambos os lados multiplicados por -1 , as expressões seriam:

$$K_a = [H^+] \\ -\log K_a = -\log [H^+]$$

Como $-\log K_a$ é definido como pK_a , e $-\log [H^+]$ define o pH, a equação pode ser reescrita como:

$$pK_a = \text{pH}$$

isto é, o pK_a de um grupo ácido é o pH em que as espécies protonadas e não protonadas estão presentes em concentrações iguais. O pK_a de um ácido pode ser determinado com o acréscimo de 0,5 equivalente de álcali por equivalente de ácido. O pH resultante será igual ao pK_a do ácido.

A equação de Henderson-Hasselbach descreve o comportamento de ácidos fracos e tampões

A equação de Henderson-Hasselbach está derivada a seguir.

Um ácido fraco, HA, ioniza da seguinte maneira:



A constante de equilíbrio para essa dissociação é

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

A multiplicação cruzada fornece

$$[H^+][A^-] = K_a [HA]$$

Divide-se ambos os lados por $[A^-]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Obtém-se o log de ambos os lados:

$$\log [H^+] = \log \left(K_a \frac{[HA]}{[A^-]} \right) \\ = \log K_a + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Multiplica-se por -1 :

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substitui-se o pH e o pK_a por $-\log [H^+]$ e $-\log K_a$ respectivamente; então

$$\text{pH} = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

A inversão do último termo remove o sinal negativo e origina a **equação de Henderson-Hasselbach**

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

A equação de Henderson-Hasselbach tem grande valor preditivo nos equilíbrios protônicos. Por exemplo,

1. Quando um ácido é neutralizado exatamente pela metade, $[A^-] = [HA]$. Sob essas condições,

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_a + \log \left(\frac{1}{1} \right) = pK_a + 0$$

Portanto, na neutralização pela metade, $\text{pH} = pK_a$.

2. Quando a proporção $[A^-]/[HA] = 100:1$,

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$\text{pH} = pK_a + \log (100/1) = pK_a + 2$$

3. Quando a proporção $[A^-]/[HA] = 1:10$,

$$\text{pH} = pK_a + \log (1/10) = pK_a + (-1)$$

Quando a equação for avaliada nas proporções de $[A^-]/[HA]$ variando de 10^3 a 10^{-3} e os valores do pH calculados forem plotados, o gráfico resultante descreverá a curva de titulação para um ácido fraco (**Figura 2-5**).

Soluções de ácidos fracos e seus sais tamponam as alterações no pH

As soluções de bases ou ácidos fracos e seus conjugados apresentam capacidade de **tampão**, que é a capacidade de resistir a uma alteração no pH após a adição de base ou ácido forte. Muitas reações metabólicas são acompanhadas pela liberação ou captação de prótons. O metabolismo oxidativo produz CO_2 , o anidrido do ácido carbônico, que, se não fosse tamponado, produziria acidose grave. A manutenção de um pH constante envolve o tampão por fosfato, bicarbonato e proteínas, que aceitam ou liberam prótons para evitar uma mudança no pH. Para experimentos laboratoriais usando extratos de tecidos ou enzimas, o pH constante é mantido pela adição de tampões, como MES ([ácido 2-N-morfolino]-

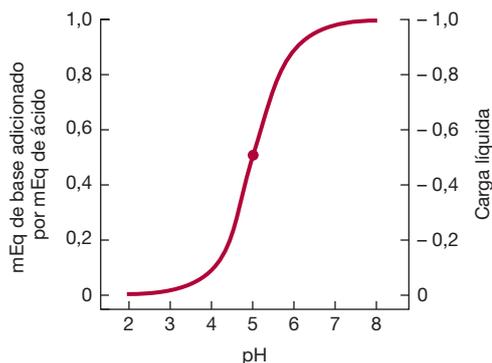


FIGURA 2-5 Curva de titulação para um ácido do tipo HA. O ponto no centro da curva indica o pK_a 5,0.

-etanossulfônico, pK_a 6,1), ortofosfato inorgânico (pK_{a2} 7,2), HEPES (ácido *N*-hidroxiethylpiperazina-*N'*-2-etanossulfônico, pK_a 6,8), ou Tris (tris[hidroximetil]aminometano, pK_a 8,3). O valor de pK_a relativo ao pH desejado é o principal determinante de qual tampão será selecionado.

O tamponamento pode ser observado ao se utilizar um medidor de pH durante a titulação de uma base ou ácido fraco (Figura 2-5). Também é possível calcular a variação do pH que acompanha a adição de ácido ou base a uma solução tamponada. No exemplo a seguir, a solução tamponada (um ácido fraco, $pK_a = 5,0$, e sua base conjugada) está, inicialmente, em um dos quatro valores de pH. Será calculada a variação do pH resultante quando 0,1 mEq de KOH é adicionado a 1 mEq de cada solução:

pH inicial	5,00	5,37	5,60	5,86
$[A^-]_{inicial}$	0,50	0,70	0,80	0,88
$[HA]_{inicial}$	0,50	0,30	0,20	0,12
$([A^-]/[HA])_{inicial}$	1,00	2,33	4,00	7,33
A adição de 0,1 mEq de KOH produz				
$[A^-]_{final}$	0,60	0,80	0,90	0,98
$[HA]_{final}$	0,40	0,20	0,10	0,02
$([A^-]/[HA])_{final}$	1,50	4,00	9,00	49,0
$\log([A^-]/[HA])_{final}$	0,18	0,60	0,95	1,69
pH final	5,18	5,60	5,95	6,69
ΔpH	0,18	0,60	0,95	1,69

Observe que, a Δ pH, que é a variação do pH por miliequivalente do OH^- adicionado, depende do pH inicial. A solução resiste a alterações no pH de modo mais efetivo em valores de pH próximos ao pK_a . **Uma solução de um ácido fraco e sua base conjugada tamponam, de maneira mais efetiva, o pH na faixa de $pK_a \pm 1,0$ unidade de pH.**

A Figura 2-5 também ilustra como a carga líquida de uma molécula de ácido varia com o pH. Uma carga fracionada de $-0,5$ não significa que uma molécula individual comporte uma carga fracionada, mas, sim, que a *probabilidade* é de 0,5 de que uma determinada molécula tenha uma unidade de carga negativa em um momento qualquer no tempo. A consideração da carga líquida de macromoléculas como uma função do pH fornece o princípio de técnicas de separação, como cromatografia de troca iônica e eletroforese (ver Capítulo 4).

A força do ácido depende da estrutura molecular

Muitos ácidos de interesse biológico possuem mais de um grupamento dissociável. A presença de uma carga negativa local dificulta a liberação de prótons de grupos ácidos próximos, aumentando seu pK_a . Isso está ilustrado pelos valores de pK_a dos três grupos dissociáveis do ácido fosfórico e do ácido cítrico (Tabela 2-2). O efeito da carga adjacente diminui com a distância. O segundo pK_a para o ácido succínico, que possui dois grupamentos metileno entre seus grupamentos carboxila, é de 5,6, ao passo que o segundo pK_a para o ácido glutárico, que possui um grupamento metileno adicional, é de 5,4.

TABELA 2-2 Forças relativas de ácidos de significado biológico

Ácidos monoproticos		
Fórmico	pK	3,75
Láctico	pK	3,86
Acético	pK	4,76
Íon amônio	pK	9,25
Ácidos diproticos		
Carbônico	pK_1	6,37
	pK_2	10,25
Succínico	pK_1	4,21
	pK_2	5,64
Glutárico	pK_1	4,34
	pK_2	5,41
Ácidos triproticos		
Fosfórico	pK_1	2,15
	pK_2	6,82
	pK_3	12,38
Cítrico	pK_1	3,08
	pK_2	4,74
	pK_3	5,40

Nota: os valores tabulados são os valores de pK_a ($-\log$ da constante de dissociação) de ácidos monoproticos, diproticos e triproticos selecionados.

Os valores de pK_a dependem das propriedades do meio

O pK_a de um grupamento funcional também é profundamente influenciado pelo meio adjacente. O meio pode aumentar ou reduzir o pK_a em relação ao seu valor na água, dependendo de se a espécie carregada é o ácido não dissociado ou a sua base conjugada. O efeito da constante dielétrica sobre o pK_a pode ser observado ao se adicionar etanol à água. O pK_a de um ácido carboxílico *umenta*, ao passo que o de uma amina *diminui* porque o etanol reduz a capacidade da água de solvatar uma espécie carregada. Os valores de pK_a dos grupamentos dissociáveis no interior das proteínas são, dessa maneira, profundamente afetados por seu ambiente local, incluindo a presença ou a ausência de água.

RESUMO

- A água forma agrupamentos ligados por ligações de hidrogênio com outras moléculas de água e com outros doadores ou aceptores de prótons. As ligações de hidrogênio contribuem para a tensão superficial, a viscosidade, o estado líquido na temperatura ambiente e o poder solvente da água.
- Os compostos que contêm O ou N podem servir como doadores e/ou aceptores de ligações de hidrogênio.
- As forças entrópicas fazem as macromoléculas exporem as regiões polares para a interface aquosa e aprofundarem as regiões apolares.

- Pontes salinas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals participam da manutenção da estrutura molecular.
- O pH é o log negativo de $[H^+]$. Um pH baixo caracteriza uma solução ácida, e um pH alto denota uma solução básica.
- A força de ácidos fracos é expressa pelo pK_a , o log negativo da constante de dissociação do ácido. Os ácidos fortes apresentam valores de pK_a baixos, e os ácidos fracos possuem valores de pK_a altos.
- Os tampões resistem a uma alteração no pH quando prótons são produzidos ou consumidos. A capacidade máxima de tamponamento ocorre ± 1 unidade de pH em ambos os lados do pK_a . Os tampões fisiológicos incluem bicarbonato, ortofosfato e proteínas.

REFERÊNCIAS

- Reese KM: Whence came the symbol pH. *Chem & Eng News* 2004; 82:64.
- Segel IM: *Biochemical Calculations*. Wiley, 1968.
- Skinner JL: Following the motions of water molecules in aqueous solutions. *Science* 2010;328:985.
- Stillinger FH: Water revisited. *Science* 1980;209:451.
- Suresh SJ, Naik VM: Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. *J Chem Phys* 2000; 113:9727.
- Wiggins PM: Role of water in some biological processes. *Microbiol Rev* 1990;54:432.

Aminoácidos e peptídeos

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Esquematizar as estruturas e escrever as designações de três letras e de uma letra de cada um dos aminoácidos presentes em uma proteína.
- Descrever a contribuição de cada tipo de grupamento R dos aminoácidos comuns para suas propriedades químicas.
- Listar funções fundamentais dos aminoácidos e explicar como certos aminoácidos presentes em sementes de plantas podem impactar gravemente a saúde humana.
- Nomear os grupos ionizáveis dos aminoácidos proteicos e listar seus valores aproximados de pK_a como aminoácidos livres em solução aquosa.
- Calcular o pH de uma solução aquosa não tamponada de um aminoácido poli-funcional e a mudança que ocorre no pH após a adição de uma determinada quantidade de ácido ou base forte.
- Explicar como o pH, o pK_a e o pI podem ser utilizados para prever a mobilidade de um polieletrólito, como um aminoácido, em um campo elétrico de corrente direta.
- Descrever a direcionalidade, a nomenclatura e a estrutura primária dos peptídeos.
- Descrever as consequências conformacionais do caráter de dupla ligação parcial da ligação peptídica e identificar as ligações no esqueleto peptídico que são livres para girar.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além de fornecer as unidades monoméricas a partir das quais são sintetizadas as longas cadeias polipeptídicas das proteínas, os L- α -aminoácidos e seus derivados participam em funções celulares diversas, como a transmissão nervosa e a biossíntese de porfirinas, purinas, pirimidinas e ureia. O sistema neuro-endócrino emprega curtos polímeros de aminoácidos, chamados de *peptídeos*, como hormônios, fatores liberadores de hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores. Os seres humanos e outros animais superiores não são capazes de sintetizar 10 dos L- α -aminoácidos presentes em proteínas em quantidades adequadas para suprir o crescimento infantil ou para manter um adulto saudável. Como consequência, a dieta humana deve conter as quantidades adequadas desses aminoácidos *nutricionalmente essenciais*. A cada dia, os rins filtram mais de 50 g de aminoácidos livres do sangue arterial renal. No entanto, apenas traços de aminoácidos livres normalmente aparecem na urina, uma vez que os aminoácidos são quase

totalmente reabsorvidos no túbulo proximal, conservando-os para a síntese de proteínas e para outras funções vitais. Contudo, nem todos os aminoácidos são benéficos. Enquanto suas proteínas contêm apenas L- α -aminoácidos, alguns microrganismos secretam misturas de D-aminoácidos. Muitas bactérias produzem peptídeos que contêm tanto D quanto L- α -aminoácidos, dos quais vários possuem valor terapêutico, incluindo os antibióticos bacitracina e gramicidina A e o agente antitumoral bleomicina. Já outros peptídeos microbianos são tóxicos. Os peptídeos microcistina e nodularina das cianobactérias são letais em grandes doses, ao passo que pequenas quantidades promovem a formação de tumores hepáticos. A ingestão de certos aminoácidos presentes em sementes de leguminosas do gênero *Lathyrus* resulta em latirismo, uma trágica doença irreversível em que indivíduos perdem o controle de seus membros. Os aminoácidos das sementes de algumas outras plantas também têm sido implicados em doenças neurodegenerativas em nativos de Guam.

PROPRIEDADES DOS AMINOÁCIDOS

O código genético especifica

20 L- α -aminoácidos

Embora existam mais de 300 aminoácidos na natureza, as proteínas são sintetizadas quase exclusivamente a partir de um grupo de 20 L- α -aminoácidos codificados por tríades de nucleotídeos, chamados de **códons**, (ver Tabela 3-1). Enquanto o código genético de três letras poderia potencialmente acomodar mais de 20 aminoácidos, o código genético é redundante, já que vários aminoácidos são especificados por múltiplos códons. Frequentemente, os cientistas representam as sequências dos peptídeos e das proteínas usando abreviações de uma ou três letras para cada aminoácido (Tabela 3-1). Esses aminoácidos podem ser caracterizados como hidrofílicos ou hidrofóbicos (Tabela 3-2), propriedades que afetam a sua localização na conformação madura da proteína (ver Capítulo 5). Algumas proteínas contêm aminoácidos adicionais que surgem por modificações **pós-traducionais** de um aminoácido presente em um peptídeo. Os exemplos incluem a conversão da peptidil-prolina e da peptidil-lisina em

4-hidroxi-prolina e 5-hidroxi-lisina; a conversão do peptidil-glutamato em γ -carboxiglutamato; e a metilação, a formilação, a acetilação, a prenilação e a fosforilação de determinados resíduos aminoacil. Essas modificações estendem significativamente a diversidade biológica das proteínas por alterar a solubilidade, a estabilidade, a atividade catalítica e as interações com outras proteínas.

Selenocisteína, o 21º L- α -aminoácido proteico

A selenocisteína (Figura 3-1) é um L- α -aminoácido encontrado nas proteínas de todos os domínios da vida. Os seres humanos contêm aproximadamente duas dúzias de selenoproteínas, que incluem determinadas peroxidases e redutases, a selenoproteína P que circula no plasma e as iodotironina deiodinases responsáveis por converter o pró-hormônio tireoxina (T4) no hormônio tireóideo 3,3',5-tri-iodotironina (T3) (ver Capítulo 41). Como o próprio nome indica, um átomo de selênio substitui o enxofre em seu análogo elementar, a cisteína. A selenocisteína não é o produto de uma modificação pós-traducional, ela é inserida diretamente em

TABELA 3-1 L- α -Aminoácidos presentes nas proteínas

Nome	Símbolo	Fórmula estrutural	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Com cadeias laterais alifáticas			α -COOH	α -NH ₃ ⁺	Grupamento R
Glicina	Gli (G)		2,4	9,8	
Alanina	Ala (A)		2,4	9,9	
Valina	Val (V)		2,2	9,7	
Leucina	Leu (L)		2,3	9,7	
Isoleucina	Ile (I)		2,3	9,8	
Com cadeias laterais contendo grupamentos hidroxílicos (OH)					
Serina	Ser (S)		2,2	9,2	Cerca de 13
Treonina	Tre (T)		2,1	9,1	Cerca de 13
Tirosina	Tir (Y)	Ver a seguir.			

(continua)

TABELA 3-1 L- α -Aminoácidos presentes nas proteínas (continuação)

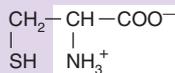
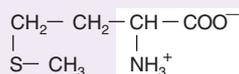
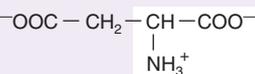
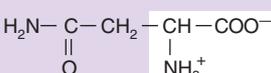
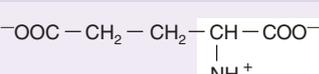
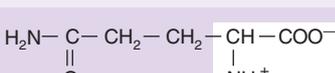
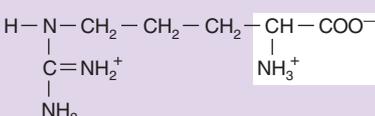
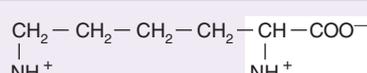
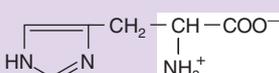
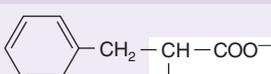
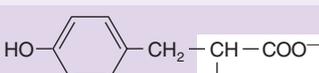
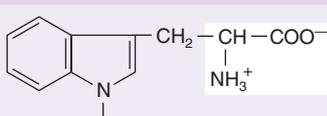
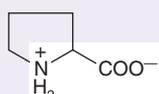
Nome	Símbolo	Fórmula estrutural	pK ₁	pK ₂	pK ₃
Com cadeias laterais contendo átomos de enxofre			α -COOH	α -NH ₃ ⁺	Grupamento R
Cisteína	Cis (C)		1,9	10,8	8,3
Metionina	Met (M)		2,1	9,3	
Com cadeias laterais contendo grupamentos ácidos ou suas amidas					
Ácido aspártico	Asp (D)		2,1	9,9	3,9
Asparagina	Asn (N)		2,1	8,8	
Ácido glutâmico	Glu (E)		2,1	9,5	4,1
Glutamina	Gln (Q)		2,2	9,1	
Com cadeias laterais contendo grupamentos básicos					
Arginina	Arg (R)		1,8	9,0	12,5
Lisina	Lis (K)		2,2	9,2	10,8
Histidina	His (H)		1,8	9,3	6,0
Contendo anéis aromáticos					
Histidina	His (H)	Ver anteriormente			
Fenilalanina	Phe (F)		2,2	9,2	
Tirosina	Tir (Y)		2,2	9,1	10,1
Triptofano	Trp (W)		2,4	9,4	
Iminoácido					
Prolina	Pro (P)		2,0	10,6	

TABELA 3-2 Aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos

Hidrofílicos	Hidrofóbicos
Arginina	Alanina
Asparagina	Isoleucina
Ácido aspártico	Leucina
Cisteína	Metionina
Ácido glutâmico	Fenilalanina
Glutamina	Prolina
Glicina	Triptofano
Histidina	Tirosina
Lisina	Valina
Serina	
Treonina	

Essa distinção está baseada na tendência de se associar ou minimizar o contato com um ambiente aquoso.

uma cadeia polipeptídica em crescimento durante a tradução. Por essa razão, a selenocisteína é frequentemente chamada de “21º aminoácido”. No entanto, ao contrário dos outros 20 aminoácidos proteicos, a incorporação da selenocisteína é especificada por um elemento genético grande e complexo para o tRNA incomum, chamado de tRNA^{Sec}, que utiliza o anticódon UGA que normalmente sinaliza TÉRMINO. No entanto, o mecanismo de síntese proteica pode identificar um códon UGA específico para selenocisteína pela presença de uma estrutura em alça, o elemento de inserção de selenocisteína, na região não traduzida do mRNA (ver Capítulo 27).

Estereoquímica dos aminoácidos proteicos

Com exceção da glicina, o α -carbono de todos os aminoácidos é quiral. Embora alguns aminoácidos proteicos sejam dextrorrotatórios e alguns sejam levorrotatórios, todos compartilham a configuração absoluta do L-gliceraldeído e, assim, são definidos como L- α -aminoácidos. Ainda que quase todos os aminoácidos proteicos sejam (R), a falta de uso dos termos (R) ou (S) para expressar a estereoquímica absoluta não é mera aberração histórica. A L-cisteína é (S), uma vez que a massa atômica do átomo de enxofre em C-3 excede a massa do grupo amino em C-2. Mais significativamente em mamíferos, as reações bioquímicas dos L- α -aminoácidos, de seus precursores e de seus catabólitos são catalisadas por enzimas que são exclusivamente L-isômeros, independentemente de suas configurações absolutas.

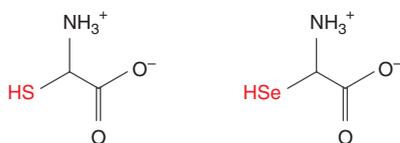


FIGURA 3-1 Cisteína (à esquerda) e selenocisteína (à direita). O pK_3 para o próton selenil da selenocisteína é de 5,2. Como são 3 unidades de pH menor do que o da cisteína, a selenocisteína representa um melhor nucleófilo em pH 7,4 ou menor.

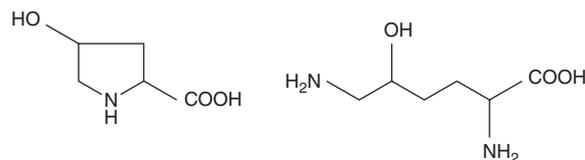


FIGURA 3-2 4-Hidroxi prolina e 5-hidroxi lisina.

As modificações pós-traducionais conferem propriedades adicionais

Enquanto alguns procaríotos incorporam pirrolisina nas proteínas, e as plantas podem incorporar ácido azetidina-2-carboxílico, um análogo da prolina, um grupo de apenas 21 L- α -aminoácidos é claramente suficiente para a formação da maioria das proteínas. As modificações pós-traducionais podem, no entanto, gerar novos grupos R que conferem outras propriedades. No colágeno, por exemplo, resíduos de prolina e lisina da proteína são convertidos em 4-hidroxi prolina e 5-hidroxi lisina (Figura 3-2). A carboxilação de resíduos glutamílicos de proteínas da cascata de coagulação a resíduos γ -carboxiglutamílicos (Figura 3-3) forma um grupo quelante de íon cálcio, essencial para a coagulação sanguínea. As cadeias laterais dos aminoácidos das histonas são submetidas a várias modificações, incluindo acetilação e metilação de lisina e metilação e desaminação de arginina (ver Capítulos 35 e 37). Atualmente, em laboratório, também é possível introduzir em proteínas, geneticamente, muitos aminoácidos não naturais diferentes, gerando proteínas por meio de expressão gênica recombinante com propriedades novas ou aumentadas, proporcionando uma nova forma de explorar as relações estrutura-atividade das proteínas.

Aminoácidos extraterrestres foram detectados em meteoritos

Em fevereiro de 2013, a explosão de um meteoro de aproximadamente 20 mil toneladas no céu da cidade de Chelyabinsk, na Sibéria Ocidental, demonstrou drasticamente o potencial poder destrutivo desses corpos extraterrestres. No entanto, nem todos os efeitos dos meteoros são necessariamente indesejáveis. Alguns meteoritos remanescentes de asteroides que atingiram a Terra contêm traços de vários α -aminoácidos. Entre eles, estão os aminoácidos proteicos Ala, Asp, Glu, Gli, Ile, Leu, Phe, Ser, Tre, Tir e Val, assim como os importantes α -aminoácidos não proteicos, N-metilglicina (sarcosina) e β -alanina.

Os aminoácidos extraterrestres foram primeiramente relatados em 1969, após a análise do famoso meteorito Murchison do sudeste da Austrália. A presença de aminoácidos em outros

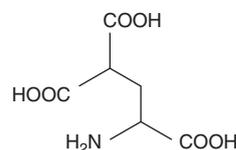


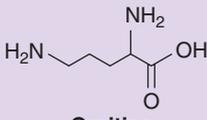
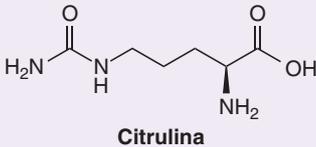
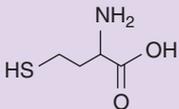
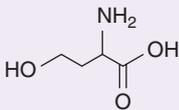
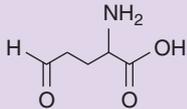
FIGURA 3-3 Ácido γ -carboxiglutmâmico.

meteoritos, incluindo alguns exemplos primitivos da Antártica, foi amplamente confirmada. Ao contrário dos aminoácidos terrestres, esses meteoritos contêm misturas racêmicas de isômeros D e L de aminoácidos de 3 a 5 carbonos, assim como muitos aminoácidos adicionais que não possuem equivalentes terrestres de origem biótica. Além disso, nucleobases, fosfatos ativados e moléculas relacionadas aos açúcares também foram detectados em meteoritos. Essas descobertas geram potenciais ideias sobre a química pré-biótica da Terra e têm efeito sobre a busca de vida extraterrestre. Alguns especulam que, mediante a “entrega” de moléculas orgânicas extraterrestres à Terra primordial, os meteoritos podem ter contribuído para a origem da vida em nosso planeta.

Os L- α -aminoácidos possuem funções metabólicas adicionais

Os L- α -aminoácidos desempenham funções metabólicas vitais, além de servirem como “blocos de construção” das proteínas. Como discutido em capítulos anteriores, os hormônios da tireoide são formados a partir de tirosina; o glutamato serve como neurotransmissor, além de ser o precursor de ácido γ -aminobutírico (GABA); ornitina e citrulina são intermediários na biossíntese de ureia; e homocisteína, homoserina e glutamato- γ -semialdeído participam do metabolismo intermediário dos aminoácidos proteicos (Tabela 3-3). Os aminoácidos proteicos fenilalanina e tirosina são precursores de epinefrina, norepinefrina e DOPA (di-hidroxifenilalanina).

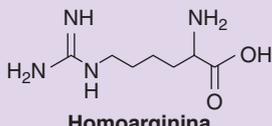
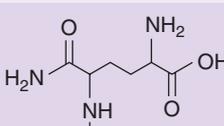
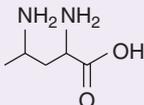
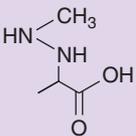
TABELA 3-3 Exemplos de L- α -aminoácidos não proteicos

Aminoácido	Função
 <p>Ornitina</p>	Intermediário da síntese da ureia (Figura 28-13).
 <p>Citrulina</p>	Intermediário da síntese da ureia (Figura 28-13).
 <p>Homocisteína</p>	Intermediário da biossíntese da cisteína (Figura 27-9).
 <p>Homoserina</p>	Produto da biossíntese da cisteína (Figura 27-9).
 <p>Glutamato-γ-semialdeído</p>	Catabólito da serina (Figura 29-3).

Alguns L- α -aminoácidos de plantas podem causar impacto negativo na saúde humana

O consumo de certos aminoácidos não proteicos presentes em plantas pode impactar negativamente a saúde humana. As sementes e os produtos das sementes de três espécies da leguminosa *Lathyrus* têm sido relacionadas com a causa do neurolatirismo, uma condição neurológica profunda caracterizada por paralisia espástica, progressiva e irreversível das pernas. O latirismo ocorre amplamente em períodos de fome, quando as sementes de *Lathyrus* representam a principal contribuição à dieta. Os L- α -aminoácidos que têm sido relacionados aos distúrbios neurológicos humanos, principalmente ao neurolatirismo (Tabela 3-4), incluem L-homoarginina e ácido β -N-oxalil-L- α , β -diaminopropiônico (β -ODAP). As sementes da “ervilha doce”, uma leguminosa *Lathyrus* que é amplamente utilizada em períodos de fome, contêm o osteolatirogênio γ -glutamil- β -aminopropionitrila (BAPN), um derivado β -aminopropionitrila da glutamina (estrutura não mostrada). As sementes de certas espécies de *Lathyrus* também contêm ácido α , γ -diaminobutírico, um análogo da ornitina, que inibe a enzima ornitina transcarbamoilase hepática do ciclo da ureia. O bloqueio resultante do ciclo da ureia leva à toxicidade por amônia. Por fim, a L- β -metilaminoalanina, um aminoácido

TABELA 3-4 L- α -Aminoácidos potencialmente tóxicos

L- α -Aminoácidos não proteicos	Relevância médica
 <p>Homoarginina</p>	Clivado pela arginase, formando L-lisina e ureia. Relacionado com o neurolatirismo humano.
 <p>Ácido β-N-oxalil diaminopropiônico (β-ODAP)</p>	É uma neurotoxina. Relacionada com o neurolatirismo humano.
 <p>β-N-Glutamilaminopropionitrila (BAPN)</p>	É um osteolatirogênio.
 <p>Ácido 2,4-diaminobutírico</p>	Inibe a ornitina transcarbamilase, resultando em toxicidade por amônia.
 <p>β-Metilaminoalanina</p>	É um possível fator de risco para doenças neurodegenerativas.

neurotóxico presente nas sementes de *Cycad*, tem sido relacionado como fator de risco para doenças neurodegenerativas, incluindo o complexo parkinsonismo-esclerose lateral amiotrófica que ocorre em nativos de Guam, os quais consomem morcegos que se alimentam de frutas cicadáceas ou de farinha feita a partir de sementes de cicadáceas.

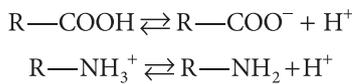
D-Aminoácidos

Os D-aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem a D-serina e o D-aspartato livres no tecido cerebral, a D-alanina e o D-glutamato nas paredes celulares de bactérias gram-positivas, e os D-aminoácidos em determinados peptídeos e antibióticos produzidos por bactérias, fungos, répteis e outras espécies não mamíferas. O *Bacillus subtilis* secreta D-metionina, D-tirosina, D-leucina e D-triptofano para provocar a desmontagem do biofilme, e o *Vibrio cholerae* incorpora D-leucina e D-metionina no componente peptídico de sua camada peptidoglicana.

PROPRIEDADES DOS GRUPOS FUNCIONAIS DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos podem ter carga líquida positiva, negativa ou zero

Em solução aquosa, as formas carregadas e não carregadas dos grupos ácidos fracamente ionizáveis —COOH e —NH_3^+ existem em um equilíbrio protônico dinâmico:



Embora tanto o R—COOH quanto o R—NH_3^+ sejam ácidos fracos, o R—COOH é muito mais forte que o R—NH_3^+ . Assim, em pH fisiológico (pH 7,4), os grupamentos carboxila existem quase totalmente como R—COO^- , e grupamentos amino, predominantemente como R—NH_3^+ . O grupamento imidazol da histidina e o grupamento guanidino da arginina existem como híbridos de ressonância com carga positiva distribuída entre os dois nitrogênios (histidina) ou por todos os três nitrogênios (arginina) (Figura 3-4). As Figuras 3-5 e 3-6 ilustram o efeito do pH do ambiente aquoso sobre o estado carregado do ácido aspártico e da lisina, respectivamente.

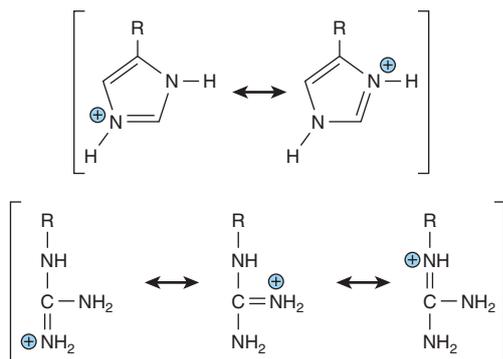
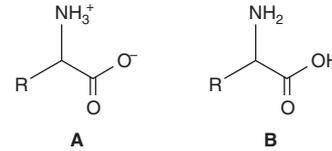


FIGURA 3-4 Híbridos de ressonância dos grupos R protonados da histidina (parte superior) e da arginina (parte inferior).

As moléculas que contêm um número igual de grupos negativa e positivamente carregados não têm qualquer carga líquida. Essas espécies neutras ionizadas são chamadas de **zwitterions**. Os aminoácidos no sangue e na maioria dos tecidos devem ser representados como em **A**, a seguir.



A estrutura **B** não pode existir em uma solução aquosa porque, em qualquer pH suficientemente baixo para protonar o grupamento carboxila, o grupamento amina também seria protonado. De modo similar, em qualquer pH suficientemente alto para que predomine um grupamento amino sem carga, o grupamento carboxila estará presente como R—COO^- . A representação não carregada **B** é, no entanto, frequentemente utilizada quando escrevemos reações que não envolvem equilíbrio protônico.

Os valores do pK_a expressam a força dos ácidos fracos

A força dos ácidos fracos é expressa como seus pK_a . Para moléculas com múltiplos prótons dissociáveis, o pK_a de cada grupamento ácido é designado substituindo o subscrito “a” por um número. A carga líquida de um aminoácido – a soma algébrica de todos os grupamentos carregados positiva e negativamente – depende dos valores do pK_a de seus grupamentos funcionais e do pH do meio adjacente. Em laboratório, a alteração da carga dos aminoácidos e de seus derivados pela variação do pH facilita a separação física de aminoácidos, peptídeos e proteínas (ver Capítulo 4).

Em seu pH isoeletrico (pI), um aminoácido não possui carga líquida

Os *zwitterions* constituem um exemplo de uma espécie **isoeletrica** – a forma de uma molécula que possui uma quantidade igual de cargas positivas e negativas e, dessa forma, é neutra do ponto de vista elétrico. O pH isoeletrico, também chamado de pI, é o pH a meio caminho entre os valores de pK_a para as ionizações em ambos os lados das espécies isoeletricas. Para um aminoácido como a alanina, que possui apenas dois grupamentos dissociáveis, não existe ambiguidade. O primeiro pK_a (R—COOH) é de 2,35, e o segundo (R—NH_3^+) é de 9,69. Dessa maneira, o pH isoeletrico (pI) da alanina é

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2,35 + 9,69}{2} = 6,02$$

Para os ácidos polipróticos, o pI também é o pH a meio caminho entre os valores de pK_a em ambos os lados da espécies isoionicas. Por exemplo, o pI para o ácido aspártico é

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2,09 + 3,96}{2} = 3,02$$

Para a lisina, o pI é calculado a partir de:

$$pI = \frac{pK_2 + pK_3}{2}$$

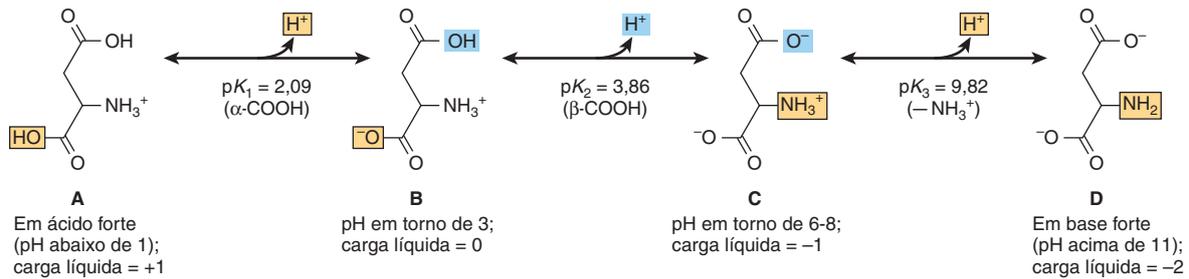


FIGURA 3-5 Os equilíbrios protônicos do ácido aspártico

Considerações similares aplicam-se a todos os ácidos polipróticos (p. ex., proteínas), independentemente do número de grupamentos dissociáveis existentes. Em laboratório clínico, o conhecimento do pI orienta a seleção de condições para as separações eletroforéticas. Por exemplo, dois aminoácidos simples (com um grupo COOH e um NH_3^+) podem ser separados por eletroforese em pH ácido ou básico que explore diferenças sutis na carga líquida com base em pequenas diferenças nos valores de pK_1 e pK_2 . Considerações similares aplicam-se à compreensão de separações cromatográficas em suportes iônicos, como o dietilaminoetil (DEAE) celulose (ver Capítulo 4).

Os valores de pK_a variam com o ambiente

O ambiente de um grupo dissociável afeta seu pK_a (Tabela 3-5). Um ambiente apolar, que possui menor capacidade que a água de estabilizar espécies carregadas, *umenta* o valor de pK_a de um grupo carboxila, tornando-o um ácido *mais fraco*, mas *reduz* o pK_a de um grupo amino, tornando-o um ácido *mais forte*. De maneira similar, a presença adjacente de um grupo de carga *oposta* pode *estabilizar*, ou um grupo *similarmente* carregado pode *desestabilizar*, uma carga em desenvolvimento. Portanto, os valores de pK_a dos grupos R de aminoácidos livres em solução aquosa (ver Tabela 3-1) fornecem apenas um valor aproximado de seus valores de pK_a quando presentes em proteínas. O pK_a da cadeia lateral de um aminoácido dependerá de sua localização em uma determinada proteína. Os valores de pK_a que divergem da solução aquosa em no máximo 3 unidades de pH são comuns nos sítios ativos de enzimas. Um exemplo extremo, um ácido aspártico da tiorredoxina, possui um pK_a acima de 9 – um desvio de mais de 6 unidades de pH.

TABELA 3-5 Variação típica de valores de pK_a de grupos ionizáveis em proteínas

Grupamento dissociante	Faixa de pK_a
α -Carboxila	3,5-4,0
COOH não α de Asp ou Glu	4,0-4,8
Imidazol de His	6,5-7,4
SH de Cis	8,5-9,0
OH de Tir	9,5-10,5
α -Amino	8,0-9,0
ϵ -Amino de Lis	9,8-10,4
Guanidínio de Arg	~12,0

A solubilidade dos aminoácidos reflete seu caráter iônico

As cargas conferidas por grupamentos funcionais dissociáveis dos aminoácidos asseguram que eles sejam prontamente solvatados por $-$ e, portanto, são solúveis em $-$ solventes polares, como a água e o etanol, mas são insolúveis em solventes apolares, como benzeno, hexano ou éter.

Os aminoácidos não absorvem a luz visível e, assim, são incolores. Contudo, a tirosina, a fenilalanina e principalmente o triptofano absorvem luz ultravioleta com elevado comprimento de onda (250-290 nm). Como ele absorve, de maneira eficiente, 10 vezes mais luz ultravioleta do que a fenilalanina e a tirosina, o triptofano é o principal responsável pela habilidade da maioria das proteínas em absorver luz na região de 280 nm (Figura 3-7).

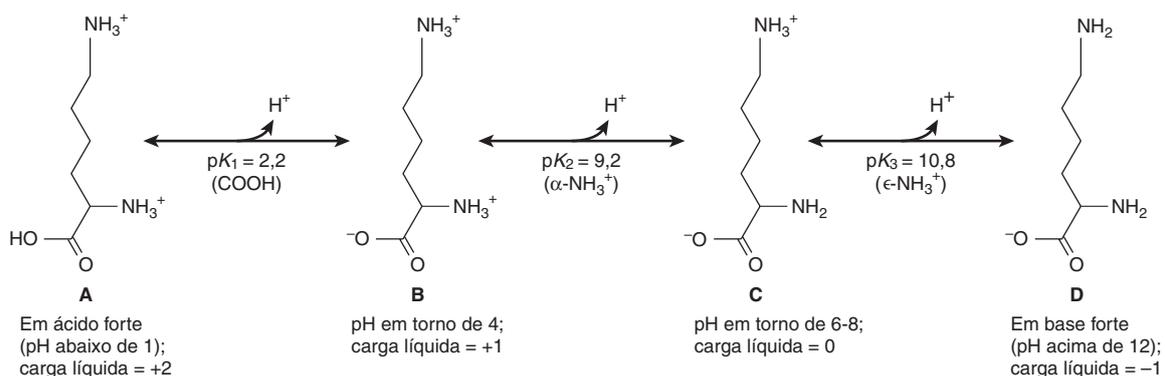


FIGURA 3-6 Equilíbrios protônicos da lisina.

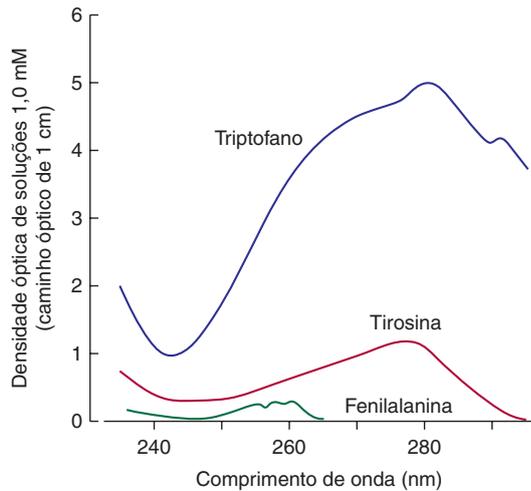


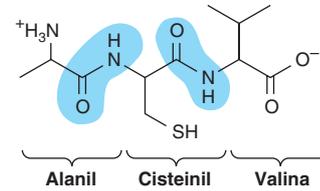
FIGURA 3-7 Espectros de absorção ultravioleta de triptofano, tirosina e fenilalanina.

OS GRUPOS α -R DETERMINAM AS PROPRIEDADES DOS AMINOÁCIDOS

Cada grupamento funcional de um aminoácido exibe a totalidade de suas reações químicas características. Para os grupamentos de ácido carboxílico, essas reações incluem a formação de ésteres, amidas e anidridos ácidos; para os grupamentos amino, a acilação, a amidação e a esterificação; e para os grupamentos $-\text{OH}$ e $-\text{SH}$, a oxidação e a esterificação. Como a glicina, o menor aminoácido, pode ser acomodada em locais inacessíveis a outros aminoácidos, ela frequentemente ocorre onde os peptídeos se curvam de maneira aguda. Os grupamentos R hidrofóbicos de alanina, valina, leucina e isoleucina e os grupamentos R aromáticos de fenilalanina, tirosina e triptofano situam-se, em geral, principalmente no interior das proteínas citosólicas. Os grupamentos R carregados de aminoácidos básicos e ácidos estabilizam conformações proteicas específicas através de interações iônicas ou de pontes salinas. Essas interações também funcionam nos sistemas de “retransmissão de carga” durante a catálise enzimática e no transporte de elétrons na respiração mitocondrial. A histidina desempenha papéis únicos na catálise enzimática. O pK_a de seu próton imidazólico permite que a histidina atue em pH neutro como um catalisador básico ou ácido, sem a necessidade de qualquer alteração induzida pelo ambiente. O grupamento álcool primário da serina e o grupamento tioálcool ($-\text{SH}$) primário da cisteína são excelentes nucleófilos, podendo atuar como tais durante a catálise enzimática. O pK_3 da selenocisteína, 5,2, é 3 unidades menor do que o da cisteína, de forma que ele é, em princípio, um nucleófilo melhor. Contudo, não se sabe se o grupamento álcool secundário da treonina, embora seja um bom nucleófilo, realiza um papel análogo na catálise. Os grupos $-\text{OH}$ da serina, da tirosina e da treonina frequentemente servem como pontos de acoplamento covalente de grupos fosforil que regulam a função da proteína (ver Capítulo 9).

A sequência de aminoácidos determina a estrutura primária

Os aminoácidos são unidos por ligações peptídicas.



O número e a ordem de todos os resíduos de aminoácidos em um polipeptídeo constituem sua estrutura primária. Os aminoácidos presentes em peptídeos são chamados de resíduos aminoacil e são designados pela substituição dos sufixos *-ato* ou *-ina* dos aminoácidos livres por *-il* (p. ex., alanil, aspartil, tirosil). Os peptídeos são, então, denominados como derivados do resíduo aminoacil *carboxiterminal*. Por exemplo, Lis-Leu-Tir-Gln é chamado de *lisil-leucil-tirosil-glutamina*. A terminação *-ina* no resíduo carboxiterminal (p. ex., glutamina) indica que seu grupo α -carboxílico *não* está envolvido em uma ligação peptídica. As abreviaturas com três letras ligadas por linhas retas representam uma estrutura primária ímpar. As linhas são omitidas quando são utilizadas as abreviações de uma letra.

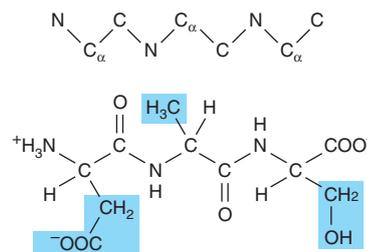
Glu-Ala-Lis-Gli-Tir-Ala

E A K G Y A

Prefixos como *tri-* ou *octa-* denotam peptídeos com três ou oito **resíduos**, respectivamente. Por convenção, os peptídeos são escritos com o resíduo que comporta um grupamento α -amino livre à esquerda. Essa convenção foi adotada muito tempo antes da descoberta de que os peptídeos são sintetizados *in vivo*, iniciando pelo resíduo aminoterminal.

As estruturas peptídicas são fáceis de desenhar

Para desenhar um peptídeo, utilize um zigue-zague para representar a cadeia principal ou o esqueleto. Acrescente os átomos da cadeia principal, que ocorrem na ordem repetida: nitrogênio α , carbono α , carbono da carbonila. Agora, acrescente um átomo de hidrogênio a cada carbono α e a cada nitrogênio do peptídeo, além de um átomo de oxigênio ao carbono da carbonila. Por fim, acrescente os grupamentos R apropriados (sombreados) a cada átomo de carbono α .



Alguns peptídeos contêm aminoácidos incomuns

Em mamíferos, os hormônios peptídicos típicos contêm apenas os 20 α -aminoácidos especificados pelos códons unidos

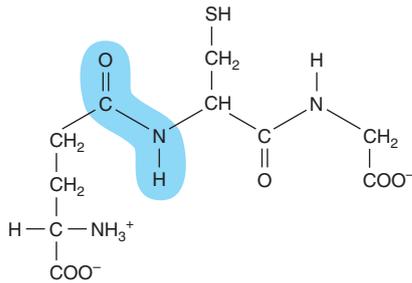
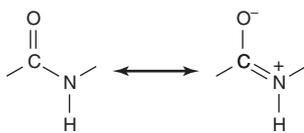


FIGURA 3-8 Glutathiona (γ -glutamil-cisteinil-glicina). Observe a ligação peptídica não α que liga Glu a Cis.

por ligações peptídicas padrão. Contudo, outros peptídeos podem conter aminoácidos não proteicos, derivados de aminoácidos proteicos ou aminoácidos ligados por uma ligação peptídica atípica. Por exemplo, o glutamato aminoterminal da glutathiona, um tripeptídeo que participa do metabolismo de xenobióticos (ver Capítulo 47) e da redução de ligações dissulfeto, não está ligado à cisteína por uma ligação α -peptídica (Figura 3-8). O glutamato aminoterminal do hormônio liberador de tireotrofina (TRH, *thyrotropin-releasing hormone*) é ciclizado em ácido piroglutâmico, ao passo que o grupamento carboxila do resíduo proil carboxiterminal é amidado. Os aminoácidos não proteicos D-fenilalanina e ornitina estão presentes no peptídeo cíclico dos antibióticos tirocidina e gramicidina S, ao passo que os opioides heptapeptídicos dermorfina e deltoforina da pele das pererecas da América do Sul contêm D-tirosina e D-alanina.

A ligação peptídica tem caráter de dupla ligação parcial

Embora as estruturas peptídicas sejam escritas como se uma ligação simples unisse os átomos da carboxila α e nitrogênio α , na verdade, essa ligação exibe caráter de dupla ligação parcial.



Conseqüentemente, não há liberdade de rotação em torno da ligação que une o carbono da carbonila e o nitrogênio de uma ligação peptídica. Por conseguinte, os átomos O, C, N e H de uma ligação peptídica são coplanares. A semirrígidez imposta da ligação peptídica traz importantes conseqüências para a maneira como os peptídeos e as proteínas se dobram para gerar estruturas de ordem superior. As setas marrons circulares indicam a rotação livre sobre as ligações restantes da cadeia polipeptídica (Figura 3-9).

As forças não covalentes restringem as conformações de peptídeos

O dobramento de um peptídeo provavelmente ocorre de forma simultânea à sua biossíntese (ver Capítulo 37). A conformação madura e fisiologicamente ativa reflete as contribuições coletivas da sequência de aminoácidos, das interações não covalentes

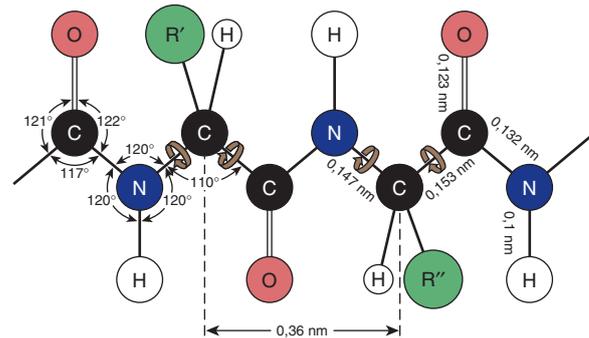


FIGURA 3-9 Dimensões de uma cadeia polipeptídica totalmente estendida. Os quatro átomos da ligação peptídica são coplanares. A rotação livre pode acontecer em torno das ligações que conectam o carbono α ao nitrogênio α e ao carbono da carbonila α (setas marrons). Assim, a cadeia polipeptídica estendida é uma estrutura semirrígida com dois terços dos átomos do esqueleto mantidos em uma relação planar fixa entre si. A distância entre os átomos de carbono α adjacentes é de 0,36 nm (3,6 Å). As distâncias interatômicas e os ângulos de ligação, que não são equivalentes, também são mostrados. (Redesenhada e reproduzida, com permissão, de Pauling L, Corey LP, Branson HR: The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc Natl Acad Sci USA 1951;37:205.)

(p. ex., ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas) e da minimização do impedimento estérico entre os resíduos. Conformações repetitivas comuns incluem α -hélices e as folhas β -pregueadas (ver Capítulo 5).

Os peptídeos são polieletrólitos

A ligação peptídica não tem carga em qualquer pH de interesse fisiológico. A formação de peptídeos a partir de aminoácidos é, portanto, acompanhada por uma perda líquida de uma carga positiva e de uma carga negativa em conseqüência da ligação peptídica formada. Apesar disso, os peptídeos possuem carga no pH fisiológico devido a seus grupamentos carboxi e aminoterminalis e, quando presentes, a seus grupamentos R ácidos ou básicos. Da mesma maneira que para os aminoácidos, a carga líquida de um peptídeo depende do pH de seu ambiente e dos valores de pK_a de seus grupamentos dissociáveis.

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS EM MATERIAIS BIOLÓGICOS

Como discutido no Capítulo 4, o conteúdo de aminoácidos das proteínas geralmente é inferido a partir da sequência de DNA do gene que a codifica, ou diretamente analisada por espectrometria de massa. O material que segue, sendo basicamente de interesse histórico, ainda pode encontrar aplicações, por exemplo, na detecção de quantidades anormais de aminoácidos na urina na falta de equipamentos modernos. Os aminoácidos livres liberados pela clivagem de ligações peptídicas em ácido clorídrico aquecido podem ser separados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou por cromatografia em camada delgada (CCD) que empregam uma fase móvel

composta por uma mistura de componentes polares e apolares (p. ex., *n*-butanol, ácido fórmico e água). À medida que a fase móvel se move para cima na camada delgada ou para baixo na coluna, ela torna-se progressivamente enriquecida nos constituintes menos polares. Os aminoácidos apolares (p. ex., Leu e Ile), portanto, movem-se mais, ao passo que os aminoácidos polares (p. ex., Glu e Lis) movem-se menos. Então, os aminoácidos podem ser visualizados usando-se ninhidrina, que forma produtos purpúreos com a maior parte dos α -aminoácidos, porém adutos amarelos com prolina e hidroxiprolina.

RESUMO

- Tanto D-aminoácidos quanto aminoácidos não α ocorrem na natureza, porém as proteínas são sintetizadas usando apenas L- α -aminoácidos. Os D-aminoácidos, contudo, possuem funções metabólicas não apenas em bactérias, mas também em seres humanos.
- Os L- α -aminoácidos possuem funções metabólicas vitais além da síntese de proteínas. Alguns exemplos incluem a biossíntese de ureia, heme, ácidos nucleicos e hormônios, como epinefrina e DOPA.
- A presença em meteoritos de traços de muitos dos aminoácidos proteicos dá credibilidade à hipótese de que a queda de asteroides pode ter contribuído para o desenvolvimento da vida na Terra.
- Certos L- α -aminoácidos presentes em sementes de plantas podem ter efeitos nocivos à saúde humana, como, por exemplo, no latirismo.
- Os grupamentos R dos aminoácidos determinam suas funções bioquímicas próprias. Os aminoácidos são classificados como básicos, ácidos, aromáticos, alifáticos ou contendo enxofre, com base na composição e nas propriedades de seus grupos R.
- O caráter de ligação dupla parcial da ligação que une o carbono da carbonila e o nitrogênio de um peptídeo torna os quatro átomos da ligação peptídica *coplanares* e, conseqüentemente, restringe o número de possíveis conformações peptídicas.
- Os peptídeos são denominados pelo número de resíduos de aminoácidos existente e como derivados do resíduo carboxiterminal. A estrutura primária de um peptídeo é a sua seqüência de aminoácidos, iniciando pelo resíduo aminoterminal, que é a direção em que os peptídeos são, de fato, sintetizados *in vivo*.
- Todos os aminoácidos possuem pelo menos dois grupamentos funcionais fracamente ácidos, R-NH₃⁺ e R-COOH. Muitos também possuem grupamentos funcionais fracamente ácidos adicionais, como -OH fenólico, -SH, porções guanidino ou imidazol.
- Os valores de pK_a de todos os grupos funcionais de um aminoácido ou de um peptídeo determinam a sua carga líquida em um determinado pH. O pI, pH isoelétrico, é o pH em que um aminoácido não tem qualquer carga líquida, e, por isso, não se move em um campo elétrico.
- Os valores de pK_a dos aminoácidos livres, na melhor das hipóteses, apenas se aproximam dos valores de pK_a em uma proteína, que podem ser bastante diferentes devido à influência do ambiente em uma proteína.

REFERÊNCIAS

- Bell EA: Nonprotein amino acids of plants. Significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J Agric Food Chem* 2003;51:2854.
- Bender, DA: *Amino Acid Metabolism*, 3rd ed. Wiley, 2012.
- Burton AS, Stern JC, Elsil JE, et al: Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites. *Chem Soc Rev* 2012;41:5459.
- Kolodkin-Gal I: D-Amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 2010;328:627.
- Kreil G: D-Amino acids in animal peptides. *Annu Rev Biochem* 1997;66:337.
- deMunck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, et al: β -N-Methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:243.
- Nokihara K, Gerhardt J: Development of an improved automated gas-chromatographic chiral analysis system: application to nonnatural amino acids and natural protein hydrolysates. *Chirality* 2001;13:431.
- Papp LV: From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9:775.
- Wilson NA et al: Aspartic acid 26 in reduced *Escherichia coli* thioredoxin has a pK_a greater than 9. *Biochemistry* 1995;34:8931

Proteínas: determinação da estrutura primária

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os múltiplos métodos cromatográficos comumente empregados para o isolamento de proteínas a partir de materiais biológicos.
- Descrever como a eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser utilizada para determinar a pureza da proteína, a massa relativa e o ponto isoelétrico.
- Descrever a base na qual os espectrofotômetros quadrupolo e por tempo de voo determinam a massa molecular.
- Fornecer três motivos pelos quais a espectrometria de massa (MS, do inglês, *mass spectrometry*) suplantou, em grande parte, os métodos químicos para a determinação da estrutura primária das proteínas e para a detecção das modificações pós-traducionais.
- Explicar como a MS pode identificar modificações pós-traducionais indetectáveis pelo sequenciamento de Edman ou pelo sequenciamento de DNA.
- Descrever como a clonagem do DNA e a biologia molecular tornam a determinação das estruturas primárias das proteínas muito mais rápida e eficiente.
- Explicar o que significa “proteoma” e citar exemplos de seu último potencial significado.
- Descrever as vantagens e limitações dos microarranjos como ferramentas para o monitoramento da expressão proteica.
- Descrever três estratégias para purificar proteínas e peptídeos individuais a partir de amostras biológicas complexas para facilitar sua identificação por MS.
- Comentar sobre as contribuições da genômica, dos algoritmos computacionais e das bases de dados para a identificação de fases de leitura aberta (ORFs, do inglês, *open reading frames*) que codificam uma determinada proteína.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas são macromoléculas complexas dos pontos de vista físico e funcional que realizam múltiplos papéis criticamente importantes. Por exemplo, uma rede proteica interna, o citoesqueleto (ver Capítulo 51), mantém o formato e a integridade física da célula. Os filamentos de actina e miosina formam a maquinaria contrátil do músculo (ver Capítulo 51). A hemoglobina transporta oxigênio (ver Capítulo 6), ao passo que anticorpos circulantes defendem o organismo contra invasores externos (ver Capítulo 52). As enzimas catalisam as reações que geram energia, sintetizam e degradam as biomoléculas, replicam e transcrevem os genes, processam os mRNAs,

etc. (ver Capítulo 7). Os receptores capacitam as células a sentir e responder aos hormônios e a outros fatores ambientais (ver Capítulos 41 e 42). As proteínas estão sujeitas a alterações físicas e funcionais que refletem o ciclo de vida do organismo em que elas residem. Uma proteína típica “nasce” durante o processo de tradução (ver Capítulo 37), torna-se madura por meio de eventos de processamento pós-traducional, como proteólise seletiva (ver Capítulos 9 e 37), alterna entre estados de trabalho e repouso por meio da intervenção de fatores reguladores (ver Capítulo 9), envelhece por meio de reações de oxidação, desaminação, etc. (ver Capítulo 58), e “morre” quando degradada a seus aminoácidos constituintes (ver Capítulo 29). Uma meta importante da medicina molecular consiste em identificar

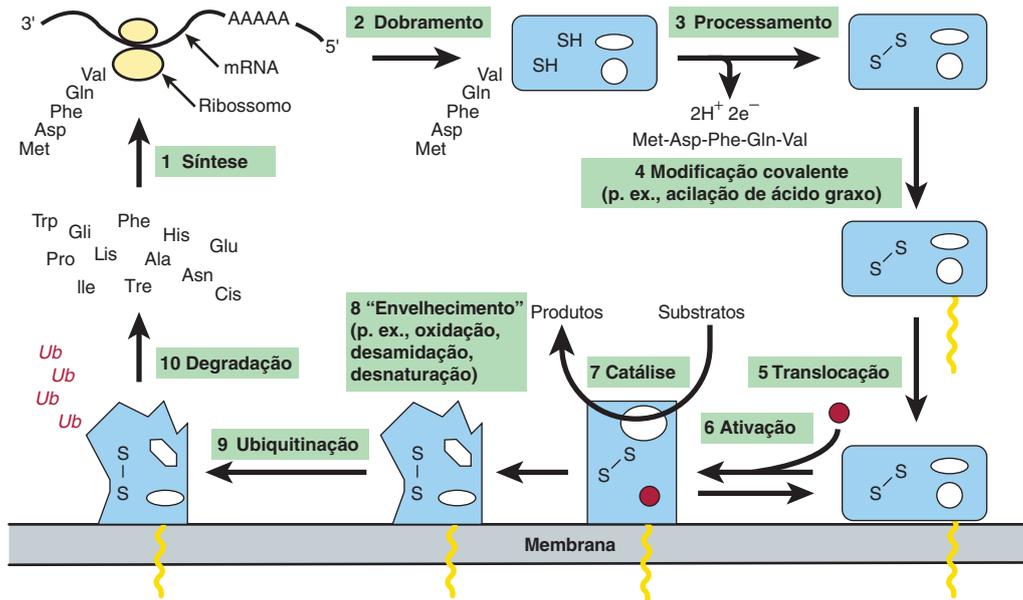


FIGURA 4-1 Representação diagramática do ciclo de vida de uma proteína hipotética. (1) O ciclo de vida começa com a síntese em um ribossomo de uma cadeia polipeptídica, cuja estrutura primária é ditada por um mRNA. (2) À medida que a síntese prossegue, o polipeptídeo começa a se dobrar em sua conformação original (em azul). (3) O dobramento pode ser acompanhado pelos eventos de processamento, como a clivagem proteolítica de uma sequência-líder *N*-terminal (Met-Asp-Phe-Gln-Val) ou pela formação de ligações dissulfeto (S—S). (4) As modificações covalentes subsequentes podem, por exemplo, acoplar uma molécula de ácido graxo (em amarelo) para (5) translocar a proteína modificada para uma membrana. (6) A ligação de um efetor alostérico (em vermelho) pode levar a proteína a adotar uma conformação cataliticamente ativa. (7) Com o passar do tempo, as proteínas são danificadas por ataques químicos, desamidação ou desnaturação e (8) podem ser “marcadas” pela ligação covalente de diversas moléculas de ubiquitina (*Ub*). (9) A proteína ubiquitinada é subsequentemente degradada em seus aminoácidos componentes, os quais se tornam disponíveis para a síntese de novas proteínas.

biomarcadores, como as proteínas e/ou as modificações das proteínas cuja presença, ausência ou deficiência está associada a doenças ou estados fisiológicos específicos (Figura 4-1).

PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DEVEM SER PURIFICADOS ANTES DA ANÁLISE

A proteína altamente purificada é essencial para o exame detalhado de suas propriedades físicas e funcionais. As células possuem milhares de proteínas diferentes, cada uma em quantidades muito variadas. O isolamento de uma proteína específica em quantidades suficientes para a análise de suas propriedades representa, assim, um desafio formidável que pode exigir a aplicação sucessiva de múltiplas técnicas de purificação. A precipitação seletiva explora as diferenças na solubilidade relativa das proteínas individuais como uma função do pH (precipitação isoelétrica), da polaridade (precipitação com etanol ou acetona) ou da concentração de sal (*salting out* com sulfato de amônio). As técnicas cromatográficas separam uma proteína de outra com base na diferença de seu tamanho (cromatografia de exclusão por tamanho), carga (cromatografia de troca iônica), hidrofobicidade (cromatografia por interação hidrofóbica) ou capacidade de se ligar a um ligante específico (cromatografia por afinidade).

Cromatografia em coluna

Na cromatografia em coluna, a matriz da fase estacionária consiste em pequenas esferas carregadas em um recipiente

cilíndrico de vidro, de plástico ou de aço, chamado de coluna. As fritas permeáveis ao líquido confinam as esferas dentro desse espaço, enquanto permitem que o líquido da fase móvel flua ou permeie pela coluna. As esferas da fase estacionária podem ser quimicamente derivadas para cobrir sua superfície com grupamentos ácidos, básicos, hidrofóbicos ou semelhantes a ligantes necessários para as cromatografias de troca iônica, de interação hidrofóbica ou por afinidade. À medida que o líquido da fase móvel emerge da coluna, ele é automaticamente coletado em uma série de pequenas porções, denominadas frações. A Figura 4-2 demonstra a disposição básica de um sistema de cromatografia de bancada simples.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As matrizes de cromatografia em coluna de primeira geração consistiam em polímeros de oligossacarídeos longos e entrelaçados moldados em esferas com cerca de um décimo de milímetro de diâmetro. Infelizmente, seu tamanho relativamente grande conturbava o fluxo da fase móvel e limitava a área de superfície disponível. A redução do tamanho da partícula propiciou o potencial para aumentar muito a resolução. No entanto, a resistência criada pela matriz mais firmemente empacotada exige o uso de pressões muito altas que esmagariam os grânulos feitos de materiais macios e esponjosos, como polisacarídeos ou acrilamida. Mais adiante, foram desenvolvidos métodos para fabricar partículas de silicone com o tamanho e o formato necessários, derivatizar sua superfície com diversos grupamentos funcionais e embalar-las em colunas de aço

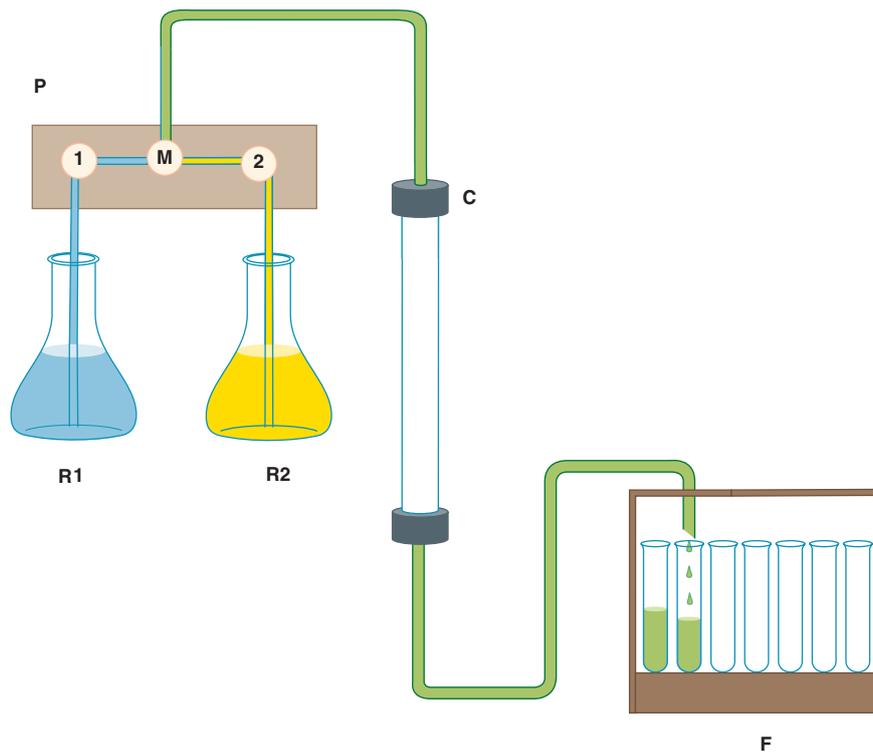


FIGURA 4-2 Componentes de um típico mecanismo de cromatografia líquida. R1 e R2: Reservatórios do líquido da fase móvel. P: Sistema de bombeamento programável contendo duas bombas, 1 e 2, e um compartimento de mistura, M. O sistema pode ser ativado para bombear o líquido de apenas um reservatório, mudar os reservatórios em algum ponto predeterminado para gerar um gradiente acentuado, ou para misturar os líquidos a partir de dois reservatórios em proporções que variam com o tempo, de modo a criar um gradiente contínuo. C: Coluna de vidro, metal ou plástico contendo a fase estacionária. F: Coletor fracionado para coletar porções, chamadas de *frações*, do líquido eluente em tubos de ensaio separados.

inoxidável capazes de suportar pressões de vários milhares de psi. Devido a seus maiores poderes de resolução, os sistemas de HPLC substituíram as antigas colunas de vidro comuns em laboratório de purificação de proteína.

Cromatografia de exclusão por tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho – ou de filtração em gel – separa as proteínas com base em seu **raio de Stokes**, o raio da esfera que elas ocupam conforme entram em solução. O raio de Stokes é uma função da massa molecular e do formato. Quando rapidamente em solução, uma proteína alongada ocupa um volume efetivo maior do que uma proteína esférica de mesma massa. A cromatografia de exclusão por tamanho emprega esferas porosas (Figura 4-3). Os poros são análogos às indentações na margem de um rio. À medida que os objetos se movem para baixo, os que entram em uma indentação ficam retidos até que retornem para a corrente principal. De modo similar, as proteínas com raio de Stokes muito grande para entrar nos poros (proteínas excluídas) permanecem no fluxo da fase móvel e emergem *antes* das proteínas capazes de entrar nos poros (proteínas incluídas). Assim, as proteínas emergem de uma coluna de filtração em gel na ordem decrescente de seus raios de Stokes.

Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, as proteínas interagem com a fase estacionária por meio de interações entre cargas.

As proteínas com carga líquida positiva em um determinado pH irão aderir firmemente às esferas com grupamentos funcionais carregados negativamente como carboxilatos ou sulfatos (trocaadores de cátions). De maneira similar, as proteínas com carga líquida negativa aderem às esferas com grupamentos funcionais positivamente carregados, geralmente aminas terciárias ou quaternárias (trocaadores de ânions). As proteínas não aderentes fluem pela matriz e são eluídas. As proteínas ligadas são seletivamente deslocadas por meio da elevação gradual na força iônica da fase móvel, enfraquecendo, dessa forma, as interações entre cargas. As proteínas eluem em ordem inversa à força de suas interações com a fase estacionária.

Cromatografia por interação hidrofóbica

A cromatografia por interação hidrofóbica separa as proteínas com base em suas tendências para se associar com uma matriz de fase estacionária revestida com grupamentos hidrofóbicos (p. ex., fenil Sepharose, octil Sephadex). As proteínas com superfícies hidrofóbicas expostas aderem à matriz por meio de interações hidrofóbicas que são acentuadas pelo emprego de uma fase móvel de força iônica elevada. Após as proteínas não aderidas serem lavadas, a polaridade da fase móvel é reduzida gradualmente, diminuindo sua concentração de sal. Quando a interação entre a proteína e a fase estacionária é particularmente forte, o etanol ou o glicerol podem ser adicionados à fase móvel para diminuir sua polaridade e enfraquecer ainda mais as interações hidrofóbicas.

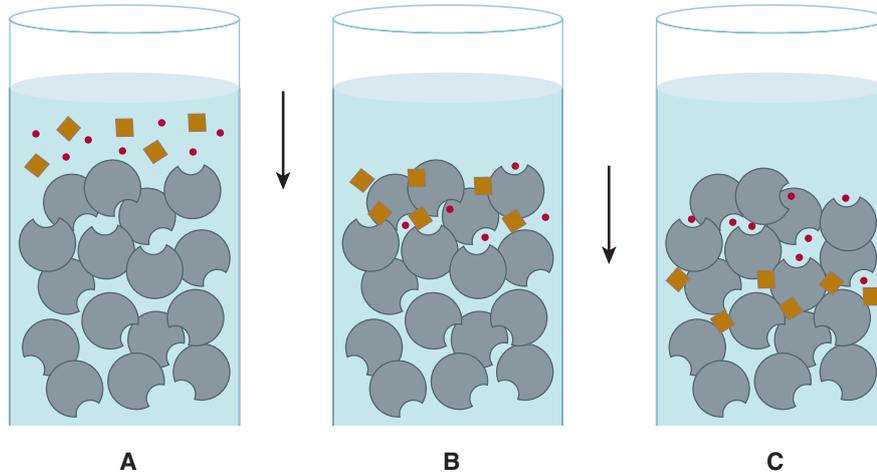


FIGURA 4-3 Cromatografia de exclusão por tamanho. A: Uma mistura de grandes moléculas (em marrom) e pequenas moléculas (em vermelho) é aplicada no alto de uma coluna de filtração em gel. B: Ao entrar na coluna, as pequenas moléculas penetram nos poros da matriz da fase estacionária (em cinza), a partir da qual as grandes moléculas são excluídas. C: À medida que a fase móvel (em azul) flui para baixo na coluna, as grandes moléculas excluídas fluem com ela, ao passo que as pequenas moléculas, que são temporariamente protegidas do fluxo quando estão dentro dos poros, ficam cada vez mais distantes.

Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade explora a elevada seletividade da maioria das proteínas por seus ligantes. As enzimas podem ser purificadas por cromatografia de afinidade usando substratos imobilizados, produtos, coenzimas ou inibidores. Na teoria, apenas as proteínas que interagem com o ligante imobilizado ficam aderidas. As proteínas ligadas são eluídas pela competição com o ligante solúvel livre ou, de modo menos seletivo, pelo rompimento das interações proteína-ligante usando ureia, cloridrato de guanidina, pH levemente ácido ou altas concentrações de sal. As matrizes de fase estacionária comercialmente disponíveis contêm ligantes como NAD^+ ou análogos do ATP. A purificação das proteínas expressas de forma recombinante é frequentemente facilitada ao se modificar o gene clonado, acrescentando um novo domínio de fusão destinado a interagir com um ligante ligado a uma matriz específica (ver Capítulo 7).

A pureza da proteína é avaliada por eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE)

O método mais amplamente utilizado para determinar a pureza de uma proteína é o SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) na presença do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A eletroforese separa as biomoléculas carregadas com base nas velocidades com que elas migram em um campo elétrico aplicado. Para a SDS-PAGE, a acrilamida é polimerizada e sofre ligação cruzada para formar uma matriz porosa. O SDS liga-se às proteínas em uma proporção de uma molécula de SDS por duas ligações peptídicas, provocando o desdobramento ou a desnaturação do polipeptídeo. Quando utilizado com o 2-mercaptoetanol ou ditioneitol para reduzir e quebrar as ligações dissulfeto (Figura 4-4), o SDS-PAGE separa os polipeptídeos componentes de proteínas multiméricas. O grande número de moléculas de SDS aniônicas, cada uma com carga -1 , supera as contribuições de carga

dos grupamentos funcionais dos aminoácidos endógenos nos polipeptídeos. Como a relação de carga/massa de cada complexo SDS-polipeptídeo é aproximadamente igual, a resistência física que cada peptídeo encontra à medida que ele se move através meio da matriz de acrilamida determina a velocidade da migração. Grandes complexos encontram maior resistência, levando à separação dos polipeptídeos com base em sua massa molecular relativa (M_r). Os polipeptídeos individuais aprisionados no gel de acrilamida após a retirada do campo elétrico são visualizados por coloração com corantes, como o azul de Coomassie (Figura 4-5).

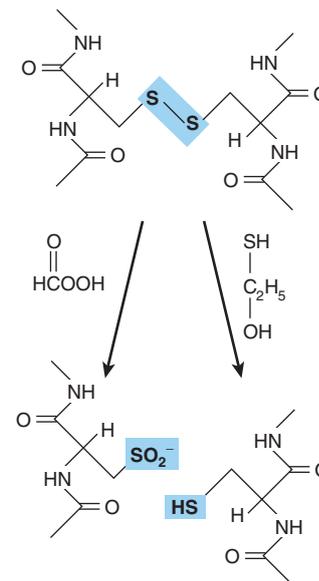


FIGURA 4-4 A clivagem oxidativa das cadeias polipeptídicas adjacentes ligadas por ligações dissulfeto (em azul) pelo ácido per fórmico (à esquerda) ou por clivagem redutora com β -mercaptoetanol (à direita) forma dois peptídeos que contêm os resíduos de ácido cisteico ou resíduos de cisteinil, respectivamente.

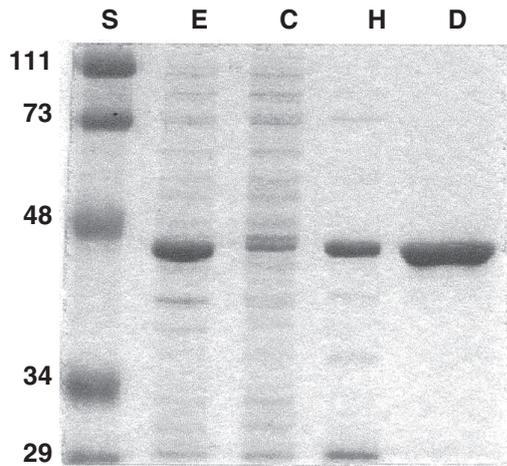


FIGURA 4-5 Uso do SDS-PAGE para observar a purificação sucessiva de uma proteína recombinante. O gel foi corado com azul de Coomassie. Estão mostrados os padrões de proteína (linha S) com as M_r indicadas, em kDa, extrato de células bruto (E), citosol (C), sobrenadante da centrifugação de alta velocidade (H) e fração de DEAE-Sepharose (D). A proteína recombinante possui massa de aproximadamente 45 kDa.

Focalização isoeétrica (IEF)

Tampões iônicos, chamados de anfólitos, e um campo elétrico são usados para gerar um gradiente de pH dentro de uma matriz de poliacrilamida. As proteínas aplicadas migram até que alcancem a região da matriz onde o pH corresponde ao seus pontos isoeletrônicos (pI), o pH em que a carga líquida de uma molécula é 0. A focalização isoeletrica (IEF, do inglês, *isoelectric focusing*) é utilizada em conjunto com o SDS-PAGE para a eletroforese bidimensional, separando os polipeptídeos

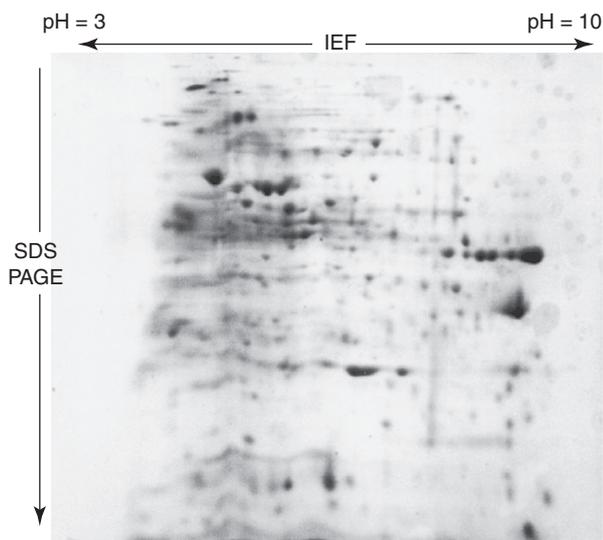


FIGURA 4-6 IEF bidimensional SDS-PAGE. O gel foi corado com azul de Coomassie. Um extrato bruto de bactérias foi primeiramente submetido à focalização isoeletrica (IEF) em um gradiente de pH de 3 a 10. O gel da IEF foi, então, posicionado horizontalmente em cima de um gel de SDS-PAGE, e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE. Observe a resolução muito melhorada de polipeptídeos distintos em relação ao gel de SDS-PAGE comum (Figura 4-5).

com base no pI em uma dimensão e com base na M_r na outra (Figura 4-6). A eletroforese bidimensional é particularmente adequada para separar os componentes de misturas complexas de proteínas.

SANGER FOI O PRIMEIRO A DETERMINAR A SEQUÊNCIA DE UM POLIPEPTÍDEO

A insulina madura consiste em uma cadeia A de 21 resíduos e em uma cadeia B com 30 resíduos ligadas por ligações dissulfeto. Frederick Sanger reduziu as ligações dissulfeto (Figura 4-4), separou as cadeias A e B e clivou cada cadeia em peptídeos menores usando tripsina, quimiotripsina e pepsina. Os peptídeos resultantes foram isolados e hidrolisados, formando uma mistura de peptídeos menores pelo tratamento com ácido. Cada peptídeo da mistura foi isolado e tratado com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger), que reage com os grupos α -amino expostos dos resíduos aminoterminais. O conteúdo de aminoácido de cada peptídeo foi determinado, e o aminoácido aminoterminal foi identificado. O grupo ϵ -amino da lisina também reage com o reagente de Sanger; porém, como uma lisina aminoterminal reage com 2 moles do reagente de Sanger, ela é prontamente diferenciada de uma lisina no interior de um peptídeo. Trabalhando a partir de dipeptídeos e tripeptídeos com fragmentos progressivamente maiores, Sanger foi capaz de reconstruir a sequência completa da insulina, feito pelo qual ele recebeu um Prêmio Nobel, em 1958. Sanger, que recebeu seu segundo Prêmio Nobel pelo desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA, morreu em 2013, com 95 anos.

A REAÇÃO DE EDMAN POSSIBILITA QUE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS SEJAM SEQUENCIADOS

Pebr Edman introduziu o fenilisotiocianato (reagente de Edman) para marcar seletivamente o resíduo aminoterminal de um peptídeo. Em contrapartida ao reagente de Sanger, o derivado feniltioidantoína (PTH, do inglês, *phenylthiohydantoin*) pode ser removido sob condições brandas, formando um novo resíduo aminoterminal (Figura 4-7). Séries sucessivas de derivatização com o reagente de Edman podem, portanto, ser empregadas para sequenciar muitos resíduos de uma única amostra de peptídeo. Mesmo assim, a determinação da sequência completa de uma proteína por métodos químicos permanece um processo demorado e de intenso trabalho.

As propriedades químicas heterogêneas dos aminoácidos denotam que cada etapa no procedimento representa um compromisso entre a eficiência para qualquer aminoácido ou conjunto de aminoácidos em particular e a flexibilidade necessária para acomodar todos os 20 aminoácidos. Por conseguinte, cada etapa no processo age com eficiência menor que 100%, o que leva ao acúmulo de fragmentos polipeptídicos com N -terminais variados. Portanto, torna-se impossível diferenciar, dos contaminantes, o aminoácido PTH correto para aquela posição no

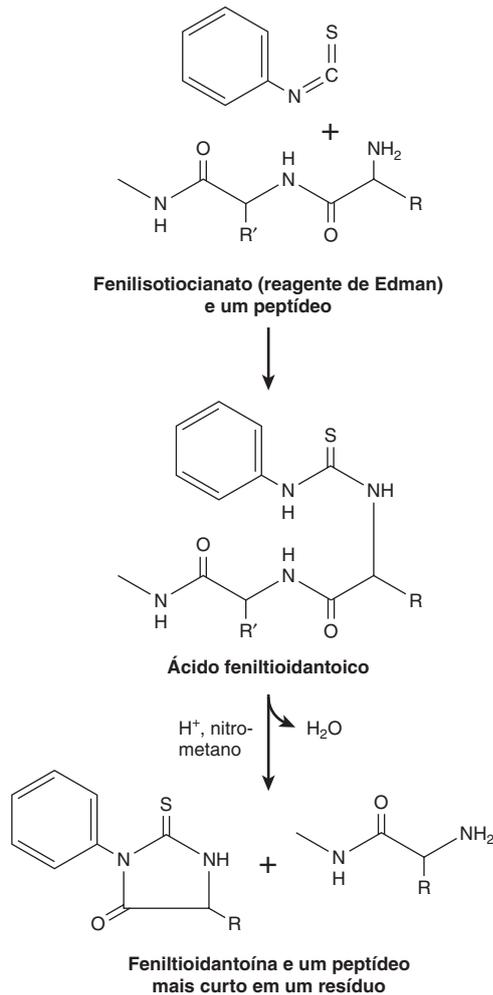


FIGURA 4-7 A reação de Edman. O fenilisotiocianato derivatiza o resíduo aminoterminal de um peptídeo como um ácido feniltioídantóico. O tratamento com ácido em um solvente não hidroxílico libera uma feniltioídantóina, que é subsequentemente identificada por sua mobilidade cromatográfica, e um peptídeo menor em um resíduo. Em seguida, o processo é repetido.

peptídeo. Consequentemente, o comprimento de leitura para o sequenciamento de Edman varia de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, dependendo da quantidade e da pureza do peptídeo.

A fim de determinar a sequência completa de um polipeptídeo com várias centenas de resíduos de comprimento, uma proteína deve ser primeiramente clivada em peptídeos menores, utilizando-se uma protease ou um reagente, como o brometo de cianogênio. Esses peptídeos são analisados pelo sequenciamento de Edman após a purificação por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase inversa. Para reunir essas sequências peptídicas curtas e solucionar a sequência completa do polipeptídeo intacto, é necessário analisar os peptídeos cujas sequências se sobrepõem entre si. Isso é feito ao se gerar múltiplos conjuntos de peptídeos usando mais de um método de clivagem. As grandes quantidades de proteína purificada necessárias para testar a fragmentação proteica múltipla e as condições de purificação de peptídeos constituem o segundo grande obstáculo das técnicas de sequenciamento proteico químico direto.

A BIOLOGIA MOLECULAR REVOLUCIONOU A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA

Enquanto as reações que sequencialmente derivatizam e clivam aminoácidos PTH a partir da extremidade aminoterminal de um peptídeo são conduzidas em um sequenciador automatizado, o sequenciamento de DNA é muito mais rápido e econômico. Técnicas recombinantes permitem que os pesquisadores produzam um suprimento praticamente infinito de DNA a partir de quantidades mínimas de molde presente na amostra original (ver Capítulo 39). Os métodos de sequenciamento de DNA, cuja química subjacente também foi desenvolvida por Sanger, rotineiramente permitem que sequenciadores automatizados “leiam” sequências de vários milhares de desoxirribonucleotídeos de comprimento. A sequência do polipeptídeo codificado é determinada simplesmente traduzindo a sequência da tríade de nucleotídeos codificada pelo gene. Por outro lado, os primeiros biólogos moleculares idealizaram sondas de oligonucleotídeos complementares para identificar o clone de DNA contendo o gene de interesse ao inverter esse processo e utilizar um segmento da sequência de aminoácidos quimicamente determinada como molde. O advento da clonagem do DNA preconizou, dessa maneira, o uso disseminado de uma conduta híbrida, na qual a química de Edman foi empregada para sequenciar uma pequena porção da proteína, explorando, assim, essa informação para determinar a sequência restante pela clonagem e pelo sequenciamento do DNA.

A GENÔMICA POSSIBILITA QUE AS PROTEÍNAS SEJAM IDENTIFICADAS A PARTIR DE PEQUENAS QUANTIDADES DE DADOS DA SEQUÊNCIA

Atualmente, o número de organismos para os quais foi feito o sequenciamento completo do DNA de seus genomas, e que estão disponíveis para a comunidade científica, alcança a casa das centenas (ver Capítulo 10). Assim, para a maioria dos cientistas, particularmente os que trabalham com “organismos-modelo” comumente utilizados, como *Homo sapiens*, camundongo, rato, *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, leveduras, etc., a sequência das proteínas com as quais eles estão trabalhando já foi determinada e se encontra disponível em bancos de dados, como o GenBank (ver Capítulo 10). Tudo o que o cientista precisa é adquirir informações suficientes sobre a sequência de aminoácidos a partir da proteína, às vezes com apenas cinco ou seis resíduos consecutivos, para fazer uma identificação inequívoca. Embora o requisito da informação da sequência de aminoácidos possa ser obtido usando a técnica de Edman, a atual espectrometria de massa (MS) surgiu como o método preferido para a identificação da proteína.

TABELA 4-1 Aumentos de massa resultantes de modificações pós-traducionais comuns

Modificação	Aumento de massa (Da)
Fosforilação	80
Hidroxilação	16
Metilação	14
Acetilação	42
Miristoilação	210
Palmitoilação	238
Glicosilação	162

A ESPECTROMETRIA DE MASSA PODE DETECTAR MODIFICAÇÕES COVALENTES

A superior sensibilidade, velocidade e versatilidade da MS substituiu a técnica de Edman como o principal método para determinar as sequências de peptídeos e proteínas. A MS é muito mais sensível e tolerante a respeito das variações na qualidade da amostra. Além disso, como a massa e a carga são propriedades comuns de uma ampla gama de biomoléculas, a MS pode ser empregada para analisar metabólitos, carboidratos e modificações pós-traducionais, como a fosforilação ou a hidroxilação, que acrescentam incrementos de massa prontamente identificados em uma proteína (Tabela 4-1). Essas modificações são difíceis de detectar utilizando a técnica de Edman e são indetectáveis na sequência de aminoácidos derivados do DNA.

ESPECTRÔMETROS DE MASSA SÃO FABRICADOS EM VÁRIAS CONFIGURAÇÕES

Em um espectrômetro de massa único quadrupolo simples, uma amostra é colocada sob vácuo e permite-se que ela vaporize na presença de um doador de próton para gerar uma carga positiva. Em seguida, um campo elétrico impulsiona os cátions no sentido de um tubo de fuga curvo, onde eles encontram um campo magnético, o qual os desvia em um ângulo reto da sua direção original de fuga (Figura 4-8). A força que energiza o eletromagneto é gradualmente aumentada, até que o trajeto de cada íon seja curvado o suficiente para colidir com um detector montado no fim do tubo de voo. **Para os íons com carga líquida idêntica, a força exigida para curvar sua trajetória na mesma extensão é proporcional às suas massas.**

Os espectrômetros de massa por tempo de voo (TOF, do inglês, *time-of-flight*) empregam um tubo linear de voo. Após a vaporização da amostra na presença de um doador de prótons, um campo elétrico é aplicado por curto prazo para acelerar os íons no sentido do detector no fim do tubo de fuga. **Para moléculas de cargas idênticas, a velocidade a que elas são aceleradas e, conseqüentemente, o tempo necessário para atingir o detector são inversamente proporcionais à sua massa.**

Em geral, os espectrômetros de massa quadrupolos são utilizados para determinar as massas de moléculas de 4.000 Da

ou menos, ao passo que os espectrômetros de massa por tempo de voo são empregados para determinar as grandes massas de proteínas inteiras. Diversas combinações de múltiplos quadrupolos ou a reflexão dos íons de volta para o tubo de fuga linear de um espectrômetro de massa TOF são utilizadas para criar instrumentos mais sofisticados.

Os peptídeos podem ser volatilizados para a análise por ionização do *eletrospray* ou por *dessorção à laser assistida por matriz*

A análise de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa foi inicialmente comprometida pelas dificuldades na volatilização de grandes moléculas orgânicas. Embora pequenas moléculas orgânicas possam ser prontamente volatilizadas por meio do aquecimento em vácuo (Figura 4-9), as proteínas, os oligonucleotídeos e outros eram destruídos sob essas condições. Apenas quando técnicas confiáveis foram idealizadas para dispersar peptídeos, proteínas e outras grandes biomoléculas na fase de vapor é que foi possível aplicar a MS para a análise estrutural e determinação da sequência destes. Três métodos comumente utilizados para dispersão na fase de vapor são **ionização por *eletrospray* e por *dessorção e ionização à laser assistida por matriz* (MALDI, do inglês, *matrix-assisted laser desorption and ionization*) e **bombardeamento de átomos rápidos (FAB, do inglês, *fast atom bombardment*)**. Na ionização por *eletrospray*, as moléculas a serem analisadas são dissolvidas em um solvente volátil e introduzidas na câmara de amostra em um fluxo pequeno através de um capilar (Figura 4-9). À medida que a gotícula do líquido emerge na câmara de amostra, o solvente dispersa rapidamente, deixando a macromolécula suspensa na fase gasosa. A sonda carregada serve para ionizar a amostra. A ionização por *eletrospray* é frequentemente utilizada para analisar os peptídeos e as proteínas, à medida que eluem de uma HPLC ou de outra coluna cromatográfica já dissolvida em um solvente volátil. Na MALDI, a amostra é misturada com uma matriz líquida contendo um corante absorvente de luz e uma fonte de prótons. Na câmara de amostra, a mistura é excitada com o emprego de um *laser*, provocando a dispersão da matriz adjacente em uma fase de vapor de modo tão rápido que evita aquecer os peptídeos ou as proteínas embebidos (Figura 4-9). No bombardeamento de átomos rápidos, grandes macromoléculas dispersas em glicerol ou outra matriz prótonica são bombardeadas por um feixe de átomos neutros, como, por exemplo, o xenônio, acelerado a alta velocidade. A ionização “leve” por FAB é frequentemente aplicada para volatilizar grandes macromoléculas intactas.**

Os peptídeos, dentro do espectrômetro de massa, podem ser clivados em unidades menores por colisões com os átomos neutros de hélio ou argônio (dissociação induzida por colisão), determinando as massas de cada fragmento. Como as ligações peptídicas são muito mais lábeis que as ligações entre carbonos, os fragmentos mais abundantes irão diferir entre si por unidades equivalentes a um ou dois aminoácidos. Como a massa molecular de cada aminoácido é única, com exceção (1) de leucina e isoleucina e (2) de glutamina e lisina, a sequência do peptídeo pode ser reconstruída a partir das massas de seus fragmentos.

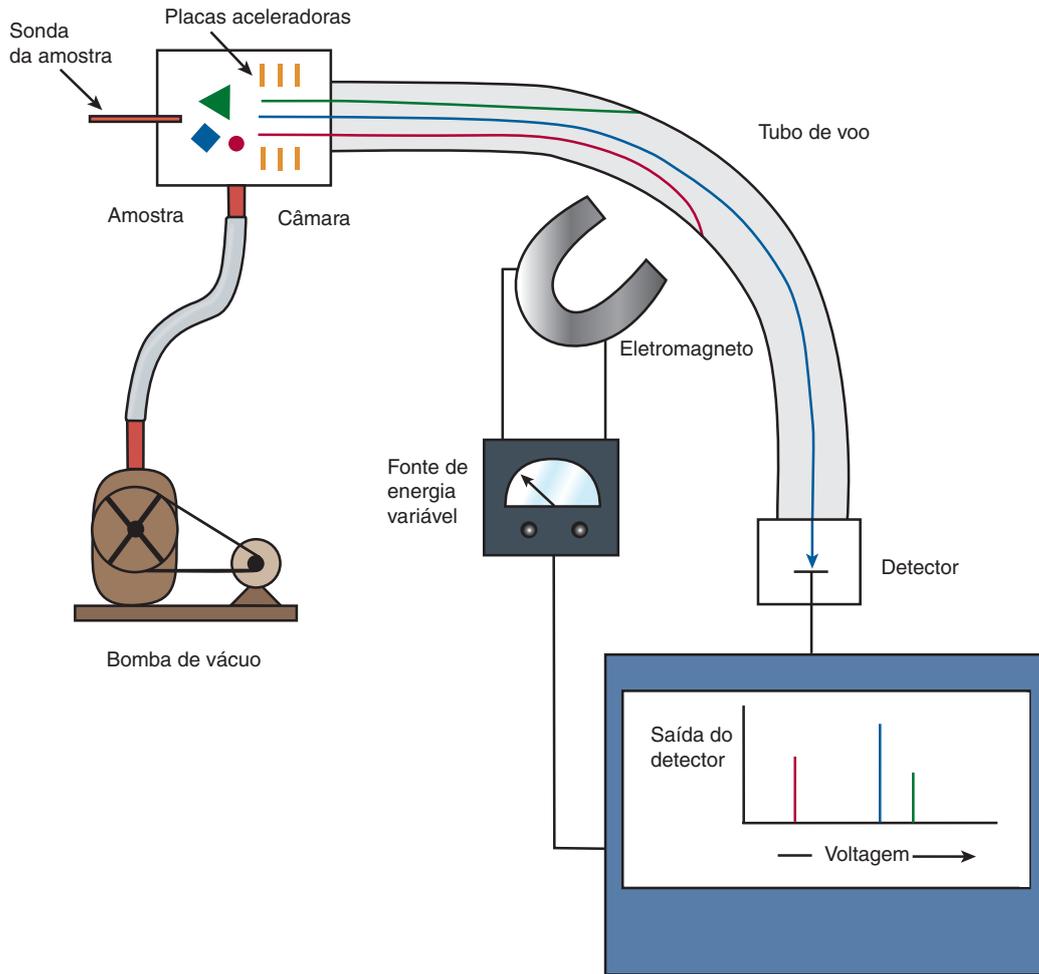


FIGURA 4-8 Componentes básicos de um espectrômetro de massa simples. Uma mistura de moléculas, representada por um círculo vermelho, um triângulo verde e um quadrado azul, é vaporizada em um estado ionizado na câmara de amostra. Essas moléculas são, então, aceleradas pelo tubo de voo por um potencial elétrico aplicado na grade aceleradora (em amarelo). Um eletromagneto com força de campo ajustável aplica um campo magnético que deflete a fuga de íons individuais até que eles colidam com o detector. Quanto maior for a massa do íon, mais alto será o campo magnético necessário para o focalizar no detector.

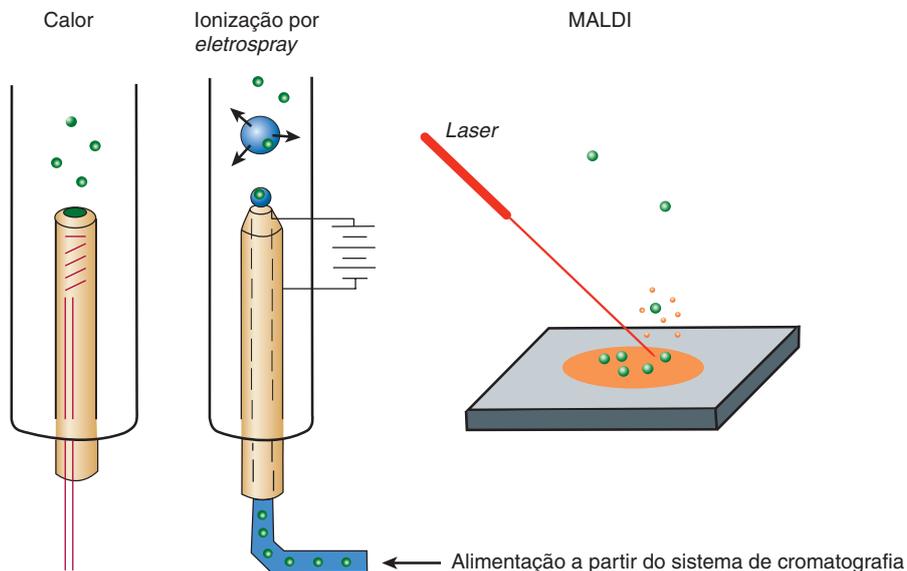


FIGURA 4-9 Três métodos comuns para vaporizar moléculas na câmara de amostra de um espectrômetro de massa.

Espectrometria de massa em *tandem*

As misturas de peptídeos complexos podem ser atualmente analisadas sem purificação prévia, pela MS em *tandem*, a qual emprega o equivalente a dois espectrômetros de massa ligados em série. Por essa razão, a análise em instrumentos em *tandem* é frequentemente chamada de **MS-MS**, ou **MS²**. O primeiro espectrômetro de massa separa cada peptídeo com base em suas diferenças de massa. Ao ajustar a força do campo do primeiro magneto, um peptídeo único pode ser direcionado para o segundo espectrômetro de massa, onde os fragmentos são produzidos e suas massas são determinadas. De modo alternativo, eles podem ser mantidos em uma **armadilha iônica** (ou **captura de íons**), posicionada entre os dois quadrupolos, e passados seletivamente para o segundo quadrupolo, em vez de serem perdidos quando o primeiro quadrupolo é definido para selecionar íons de uma massa diferente.

A MS em *tandem* pode ser empregada para triagem de amostras de sangue de recém-nascidos para analisar a presença e a concentração de aminoácidos, ácidos graxos e outros metabólitos. As anormalidades nos níveis de metabólitos podem servir como indicadores para o diagnóstico de diversas patologias genéticas, como a fenilcetonúria, a encefalopatia etilmalônica e a acidemia glutárica tipo 1.

PROTEÔMICA E O PROTEOMA

O objetivo da proteômica é identificar a totalidade do conteúdo de proteínas produzidas por uma célula sob diversas condições

Embora a sequência do genoma humano seja conhecida, o quadro fornecido pela genômica isolada é estático e incompleto. À medida que os genes são ativados e desativados, as proteínas são sintetizadas em determinados tipos de células em momentos específicos do crescimento ou da diferenciação e em resposta a estímulos externos. As células musculares expressam proteínas não expressas em células nervosas, e o tipo de subunidades existentes no tetrâmero da hemoglobina sofre alterações pré e pós-parto. Muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais durante a maturação para gerar as formas funcionalmente competentes ou como um meio de regular suas propriedades. Portanto, o conhecimento do genoma humano representa apenas o início da tarefa de descrever os organismos vivos em detalhes moleculares e de compreender a dinâmica de processos como o crescimento, o envelhecimento e a doença. Como o organismo humano contém milhares de tipos de células, cada qual contendo milhares de proteínas, o **proteoma** – conjunto de todas as proteínas expressas por uma célula em um determinado momento – representa um alvo dinâmico de dimensões formidáveis. Portanto, o conhecimento do genoma humano representa apenas o início da tarefa de descrever os organismos vivos em detalhes moleculares e de compreender a dinâmica de processos como o crescimento, o envelhecimento e a doença.

A determinação simultânea de centenas de proteínas é tecnicamente desafiadora

Uma meta da proteômica é a identificação das proteínas cujos níveis de expressão se correlacionam com eventos clinicamente significativos. A suposição é que as proteínas cujo aparecimento ou desaparecimento estão associadas a uma condição fisiológica ou doença específica estão ligadas, de forma direta ou indireta, às suas causas e mecanismos fundamentais. Embora os pesquisadores tenham desenvolvido múltiplas ferramentas para detectar e avaliar a presença e a quantidade de proteínas específicas utilizando anticorpos, ensaios enzimáticos, etc., as suas especificidades são impróprias para determinar simultaneamente centenas ou milhares de proteínas em uma amostra biológica típica. Os ensaios para determinação da concentração de proteínas, por exemplo, método de Lowry ou Bradford, e corantes, como o azul de Coomassie, ainda que universais, não fornecem informações com relação à identidade de um determinado polipeptídeo.

A proteômica de primeira geração empregava SDS-PAGE ou eletroforese bidimensional para separar as proteínas de uma amostra biológica umas das outras, seguida pela determinação da sequência de aminoácidos de suas extremidades aminoterminais pelo método de Edman. As identidades eram determinadas pela procura de sequências polipeptídicas disponíveis de proteínas que continham uma sequência N-terminal correspondente e provavelmente possuíam M_r similar, e pI similar em géis 2D.

Esses esforços iniciais foram restringidos pelo número limitado de sequências polipeptídicas disponíveis e pela dificuldade em isolar polipeptídeos em quantidades suficientes para a análise de Edman a partir dos géis. As tentativas para aumentar o poder de resolução e rendimento das amostras aumentando o tamanho dos géis foram apenas ligeiramente bem-sucedidas. Por fim, o desenvolvimento das técnicas de espectrometria de massa forneceu um meio para a determinação da sequência de proteínas cuja sensibilidade era compatível com as abordagens eletroforéticas de separação.

O conhecimento da sequência genômica do organismo em estudo facilitou muito a identificação por fornecer um amplo conjunto de sequências polipeptídicas codificadas por DNA. Esse conhecimento também forneceu dados da sequência de nucleotídeo a partir dos quais foram construídas as **matrizes genéticas, algumas vezes chamadas de microarranjos**, contendo centenas de sondas de oligonucleotídeos distintas. Esses microarranjos poderiam, então, ser usados para detectar a presença de mRNAs contendo sequências nucleotídicas complementares. Enquanto as mudanças na expressão do mRNA que codifica uma proteína não refletem, necessariamente, mudanças comparáveis no nível da proteína correspondente, as matrizes genéticas são tecnicamente menos exigentes e mais sensíveis do que a primeira geração de abordagens proteômicas, sobretudo em relação a proteínas em pouca quantidade.

A segunda geração da proteômica acopla as técnicas cromatográficas em nanoescalas, recentemente desenvolvidas com a espectrometria de massa. As proteínas em uma amostra biológica são primeiro tratadas com uma protease para as hidrolisar em peptídeos menores, que são, então, submetidos à cromatografia de fase reversa, de troca iônica ou por exclusão

de tamanho para distribuir o grande número de peptídeos em subgrupos menores, mais acessíveis à análise. Esses subgrupos são analisados ao se injetar o eluído da coluna cromatográfica diretamente em um espectrômetro de massa quadrupolo ou por tempo de voo. A **tecnologia multidimensional de identificação de proteínas** (MudPIT, do inglês, *multidimensional protein identification technology*) emprega sucessivos ciclos de cromatografia para resolver os peptídeos formados a partir da digestão de uma amostra biológica complexa em diversas frações mais simples, que podem ser analisadas separadamente por MS.

Atualmente, a suspensão de misturas complexas de peptídeos dentro do próprio espectrômetro de massa e a subsequente exportação dos pequenos subgrupos para análise final usando captura de íons permitem, frequentemente, que mesmo misturas complexas sejam analisadas diretamente por MS sem fracionamento cromatográfico anterior. Os esforços também continuam para refinar os métodos para análise de mRNA e expressão proteica em células individuais.

A bioinformática auxilia na identificação das funções da proteína

As funções de uma grande parcela de proteínas codificadas pelo genoma humano são atualmente desconhecidas. Os esforços continuam no intuito de desenvolver matrizes proteicas ou microarranjos para testar diretamente as funções em potencial de proteínas em grande escala. No entanto, enquanto a função de algumas proteínas é relativamente fácil de testar, como atividade proteásica ou esterásica, outras são muito mais complicadas de serem avaliadas. A exploração de dados por bioinformática permite que os pesquisadores comparem sequências de aminoácidos de proteínas desconhecidas com aquelas cujas funções foram determinadas. Isso fornece um meio para descobrir pistas sobre suas potenciais propriedades, papéis fisiológicos e mecanismos de ação. Os algoritmos exploram a tendência da natureza a empregar variações de um tema estrutural para realizar funções similares em várias proteínas (p. ex., o dobramento de Rossmann para a ligação de nucleotídeos como NAD(P)H, as sequências de direcionamento nuclear e o motivo mãos EF para ligar Ca^{2+}). Em geral, esses domínios são detectados na estrutura primária por meio da conservação de determinados aminoácidos em posições principais. As opiniões sobre as propriedades e o papel fisiológico de uma proteína recentemente descoberta podem ser assim deduzidas ao se comparar sua estrutura primária àquela de proteínas conhecidas.

RESUMO

- Os polímeros de aminoácidos ou polipeptídeos longos constituem a unidade estrutural básica das proteínas, e a estrutura de uma proteína fornece percepções sobre como ela exerce suas funções.
- As proteínas sofrem alterações pós-traducionais durante sua vida, as quais influenciam sua função e determinam seu destino.
- Pela geração uma nova extremidade aminoterminal, o reagente de Edman permite a determinação de longos segmentos de sequência de aminoácidos.

- Os géis de poliacrilamida fornecem uma matriz porosa para a separação de proteínas com base em suas mobilidades em um campo elétrico de corrente contínua aplicada.
- A relação quase constante na qual o detergente aniônico SDS se liga às proteínas possibilita que a técnica SDS-PAGE separe polipeptídeos predominantemente com base em seus tamanhos relativos.
- Como a massa é uma propriedade universal de todas as biomoléculas e seus derivados, a MS surgiu com uma técnica versátil aplicável à determinação da estrutura primária, à identificação de modificações pós-traducionais e à detecção de anormalidades metabólicas.
- A clonagem de DNA acoplada à química de proteínas forneceu uma abordagem híbrida que aumentou muito a velocidade e a eficiência da determinação da estrutura primária de proteínas.
- A genômica, que é a determinação de todas as sequências polinucleotídicas, fornece aos pesquisadores um modelo para cada uma das macromoléculas geneticamente codificadas em um organismo.
- A análise proteômica utiliza dados genômicos para identificar o conteúdo completo de proteínas em uma amostra biológica a partir de dados parciais de sequência de aminoácidos obtidos pelo acoplamento de métodos de separação de proteínas e peptídeos com sequenciamento por MS.
- Uma meta importante é a identificação das proteínas e de suas modificações pós-traducionais, cujo aparecimento ou desaparecimento se correlaciona com fenômenos fisiológicos, envelhecimento ou doenças específicas.
- A bioinformática refere-se ao desenvolvimento de algoritmos computacionais delineados para inferir as propriedades funcionais de macromoléculas por meio da comparação de sequências de proteínas novas com outras, cujas propriedades são conhecidas.

REFERÊNCIAS

- Anderson L: Six decades searching for meaning in the proteome. *J Proteomics* 2014;107:24.
- Barderas MG, Laborde CM, Posada M, et al: Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:790132.
- Biemann K: Laying the groundwork for proteomics: Mass spectrometry from 1958 to 1988. *J Proteomics* 2014;107:62.
- Brady PD, Vermeesch JR: Genomic microarrays: A technology overview. *Prenat Diagn* 2012;32:336.
- Deutscher MP (editor): *Guide to Protein Purification*. Methods Enzymol, vol. 182, Academic Press, 1990 (Entire volume).
- Ghafourian S, Sekawi Z, Raftari M, et al: Application of proteomics in lab diagnosis. *Clin Lab* 2013;59:465.
- Gorreta F, Carbone W, Barzagli D: Genomic profiling: cDNA arrays and oligoarrays. *Methods Mol Biol* 2012;823:89.
- LaBorde CM, Mourino-Alvarez L, Akerstrom F, et al: Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics* 2012;9:437.
- Levy PA: An overview of newborn screening. *J Dev Behav Pediatr* 2010;31:622.
- Loewenstein Y, Raimondo D, Redfern OC, et al: Protein function annotation by homology-based inference. *Genome Biol* 2009;10:207.
- Ruhaak LR, Miyamoto S, Lebrilla CB: Developments in the identification of glycan biomarkers for the detection of cancer. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:846.

- Schena M, Shalon D, Davis RW, et al: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467.
- Scopes RK: *Protein Purification. Principles and Practice*, 3rd ed. Springer, 1994.
- Sun H, Chen GY, Yao SQ: Recent advances in microarray technologies for proteomics. *Chem Biol* 2013;20:685.
- Van Riper SK, de Jong EP, Carlis JV, et al: Mass spectrometry-based proteomics: Basic principles and emerging technologies and directions. *Adv Exp Med Biol* 2013;990:1.
- Vaudel M, Sickmann A, Martens L: Introduction to opportunities and pitfalls in functional spectrometry based proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:12.
- Wood DW: New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Curr Opin Struct Biol* 2014;26:54.
- Yates JR, Ruse CI, Nakochevsky A: Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2009;11:49.
- Zhu H, Qian J: Applications of functional protein microarrays in basic and clinical research. *Adv Genet* 2012;79:123.

Proteínas: ordens de estrutura superiores

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Indicar as vantagens e desvantagens das diferentes abordagens para a classificação das proteínas.
- Explicar e ilustrar as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.
- Identificar os principais tipos de estrutura secundária reconhecidos e explicar os motivos supersecundários.
- Descrever o tipo e as potências relativas das forças que estabilizam cada ordem estrutural das proteínas.
- Descrever as informações resumidas em um gráfico de Ramachandran.
- Indicar o atual conhecimento relativo ao processo pelo qual se acredita que as proteínas atinjam a sua conformação nativa.
- Identificar os papéis fisiológicos no processo de maturação das proteínas, das chaperonas, da proteína dissulfeto isomerase e da peptidil-prolina *cis-trans*-isomerase.
- Descrever as principais técnicas biofísicas utilizadas para estudar as estruturas terciária e quaternária das proteínas.
- Explicar como os distúrbios genéticos e nutricionais da maturação do colágeno ilustram a relação próxima entre a função e a estrutura da proteína.
- Para as doenças por príon, delinear os eventos globais na patologia molecular e nomear as formas de vida que elas afetam.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Na natureza, a forma segue a função. Para que um polipeptídeo recém-sintetizado amadureça em uma proteína biologicamente funcional capaz de catalisar uma reação metabólica, induzir o movimento celular ou formar os bastões e os cabos macromoleculares que proporcionam a integridade estrutural de pelos, ossos, tendões e dentes, ele deve dobrar-se em um arranjo tridimensional específico, ou **conformação**. Além disso, durante a maturação, **modificações pós-traducionais** podem adicionar novos grupos químicos ou remover transitoriamente segmentos peptídicos necessários. As deficiências genéticas ou nutricionais que comprometem a maturação proteica são prejudiciais à saúde. Exemplos de deficiências genéticas incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob, a encefalopatia espongiforme ovina, a doença de Alzheimer e a encefalopatia espongiforme bovina (“doença da vaca louca”). Exemplos de deficiências nutricionais incluem o escorbuto (ácido ascórbico) e a síndrome

de Menkes (Cu). As terapias de próxima geração para hepatite C e outras doenças virais tentam bloquear a maturação de proteínas codificadas pelo vírus, inibindo a atividade das ciclofilinas, uma família de isomerases *cis-trans*.

CONFORMAÇÃO VERSUS CONFIGURAÇÃO

Os termos configuração e conformação são frequentemente confundidos. A **configuração** refere-se à relação geométrica entre um determinado conjunto de átomos; por exemplo, os que diferenciam os L-aminoácidos dos D-aminoácidos. A interconversão das alternativas *configuracionais* requer a ruptura (e a reformação) das ligações covalentes. A **conformação** refere-se à relação espacial de cada átomo em uma molécula. A interconversão entre *conformers* ocorre com retenção da configuração, geralmente por meio de rotação em torno de ligações simples.

AS PROTEÍNAS ERAM INICIALMENTE CLASSIFICADAS POR SUAS CARACTERÍSTICAS BRUTAS

Os cientistas inicialmente abordavam a elucidação da relação estrutura-atividade de proteínas separando-as em classes com base em suas propriedades, como solubilidade, formato ou presença de grupos não proteicos. Por exemplo, as proteínas que podem ser extraídas das células com o uso de soluções aquosas com pH e força iônica fisiológicos são classificadas como **solúveis**. A extração de **proteínas integrais de membrana** requer a dissolução da membrana com detergentes. As **proteínas globulares** são moléculas aparentemente esféricas e compactas, que apresentam **razões axiais** (a proporção entre suas dimensões mais curta e mais longa) não superiores a três. A maioria das enzimas consiste em proteínas globulares. Em contrapartida, muitas proteínas estruturais adotam conformações altamente estendidas. Essas **proteínas fibrosas** podem ter razões axiais de 10 ou mais.

As **lipoproteínas** e as **glicoproteínas** contêm lipídeos e carboidratos ligados de forma covalente, respectivamente. A mioglobina, a hemoglobina, os citocromos e muitas outras **metaloproteínas** contêm íons metálicos firmemente associados. Embora esquemas de classificação mais exatos tenham surgido com base na similaridade, ou **homologia**, na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, muitos termos de classificação antigos permanecem em uso.

AS PROTEÍNAS SÃO CONSTRUÍDAS USANDO PRINCÍPIOS MODULARES

As proteínas realizam complexas funções físicas e catalíticas ao posicionar determinados grupamentos químicos em um arranjo tridimensional específico. O esqueleto polipeptídico contendo esses grupamentos deve adotar uma conformação que seja funcionalmente eficiente e fisicamente forte. À primeira vista, a biossíntese dos polipeptídeos compostos por dezenas de milhares de átomos individuais poderia parecer extremamente desafiadora. Quando considerado que um polipeptídeo típico pode adotar $\geq 10^{50}$ conformações distintas, o dobramento na conformação adequada para a sua função biológica pareceria ser ainda mais trabalhoso. Conforme descrito nos Capítulos 3 e 4, a síntese dos esqueletos polipeptídicos das proteínas emprega um pequeno grupo de módulos ou blocos de construção comuns, os aminoácidos, unidos por uma ligação comum, a ligação peptídica. De maneira similar, um trajeto modular por etapas simplifica o dobramento e o processamento dos polipeptídeos recentemente sintetizados em proteínas maduras.

QUATRO ORDENS DE ESTRUTURA PROTEICA

A natureza modular da síntese e do dobramento da proteína está incorporada no conceito das ordens da estrutura da proteína: **estrutura primária** – a sequência de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica; **estrutura secundária** – o

dobramento de segmentos curtos (3-30 resíduos) e contíguos do polipeptídeo em unidades geometricamente ordenadas; **estrutura terciária** – a reunião das unidades estruturais secundárias em unidades funcionais maiores, como o polipeptídeo maduro e seus domínios componentes; e **estrutura quaternária** – o número e os tipos de unidades polipeptídicas de proteínas oligoméricas e seus arranjos espaciais.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA

As ligações peptídicas restringem as conformações secundárias possíveis

A livre rotação é possível apenas em torno de duas das três ligações covalentes do esqueleto polipeptídico: a ligação unindo o carbono α ($C\alpha$) ao carbono da carbonila ($C=O$) e a ligação unindo o $C\alpha$ ao nitrogênio (ver Figura 3-9). O caráter de dupla ligação parcial da ligação peptídica que liga o $C=O$ ao nitrogênio α exige que o carbono da carbonila, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio α permaneçam coplanares, impedindo, assim, a rotação. O ângulo entre a ligação $C\alpha-N$ é denominado ângulo phi (Φ), e aquele entre a ligação $C=O-C\alpha$ é o ângulo psi (Ψ). Em peptídeos, para aminoácidos diferentes da glicina, não é permitida a maioria das combinações dos ângulos phi e psi devido ao impedimento estérico (**Figura 5-1**). As conformações da prolina são ainda mais restritas, uma vez que a sua estrutura cíclica previne a livre rotação da ligação $N-C\alpha$.

As regiões de estrutura secundária ordenada originam-se quando uma série de resíduos aminoacil adota ângulos phi e psi similares. Os segmentos estendidos do polipeptídeo (p. ex., alças) podem possuir uma variedade desses ângulos. Os ângulos que definem os dois tipos mais comuns de estrutura

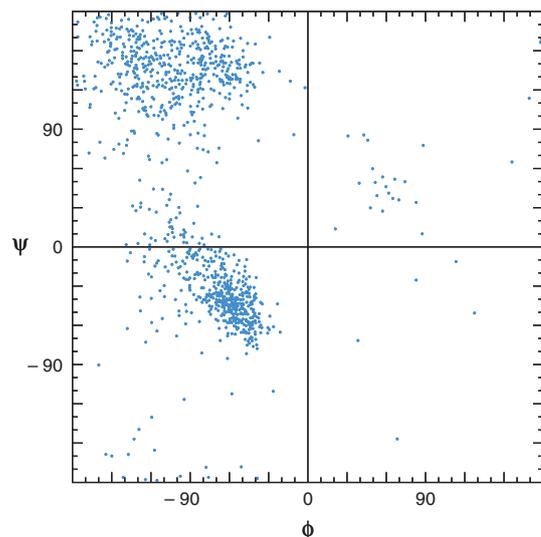


FIGURA 5-1 Gráfico de Ramachandran dos ângulos phi (Φ) e psi (Ψ) da cadeia principal para aproximadamente 1.000 resíduos não glicina em oito proteínas cujas estruturas foram solucionadas em alta resolução. Os pontos representam as combinações permitidas, e os espaços representam as combinações proibidas dos ângulos phi e psi. (Reproduzida, com permissão, de Richardson JS: The anatomy and taxonomy of protein structures. Adv Protein Chem 1981;34:167. Copyright © 1981. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.)

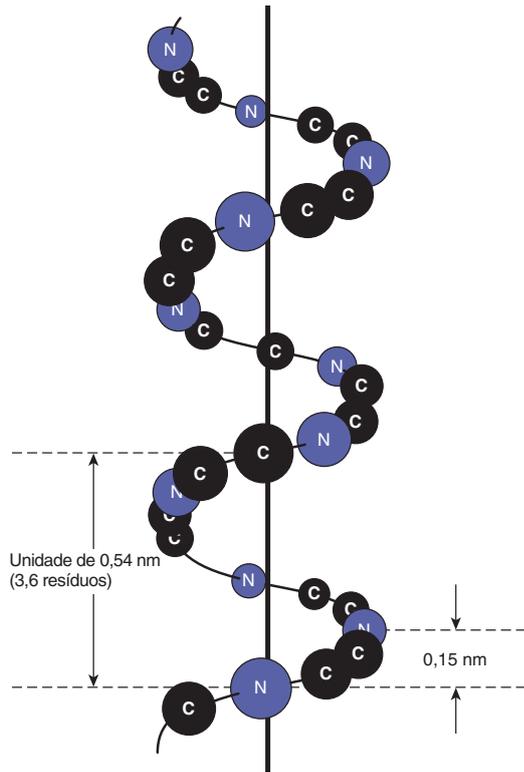


FIGURA 5-2 Orientação dos átomos da cadeia principal de um peptídeo em torno do eixo de uma α -hélice.

secundária, a α -hélice e a folha β , caem dentro dos quadrantes esquerdos inferior e superior de um gráfico de Ramachandran, respectivamente (Figura 5-1).

α -Hélice

O esqueleto polipeptídico de uma α -hélice é torcido por uma quantidade igual de cada carbono α com um ângulo phi de aproximadamente -57° e um ângulo psi de aproximadamente -47° . Uma volta completa da hélice contém em média 3,6 resíduos aminoácil, e a distância de cada volta (seu *passo*) é de 0,54 nm (Figura 5-2). Os grupamentos R de cada resíduo aminoácil em uma α -hélice ficam voltados para fora (Figura 5-3). As proteínas contêm apenas L-aminoácidos, para os quais uma α -hélice voltada para a direita é muito mais estável, e apenas as α -hélices voltadas para a direita estão presentes nas proteínas. Os diagramas esquemáticos das proteínas representam as α -hélices como molas ou cilindros.

A estabilidade de uma α -hélice origina-se principalmente das ligações de hidrogênio formadas entre o oxigênio da carbonila da ligação peptídica e o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica no quarto resíduo adiante na cadeia polipeptídica (Figura 5-4). A capacidade de formar um número máximo de ligações de hidrogênio, suplementadas pelas interações de van der Waals no núcleo dessa estrutura firmemente posicionada, proporciona a força de direcionamento termodinâmico de uma α -hélice. Uma vez que o nitrogênio da ligação peptídica da prolina carece de um átomo de hidrogênio, ela não é capaz de formar uma ligação de hidrogênio com um oxigênio da carbonila. Consequentemente, a prolina

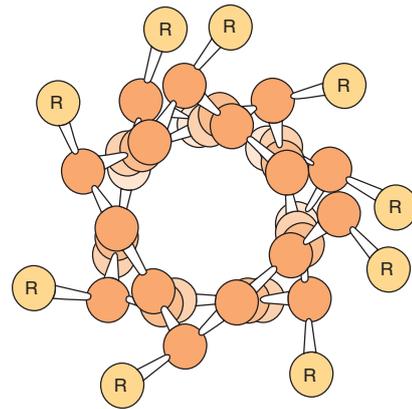


FIGURA 5-3 Visualização de cima para baixo do eixo de uma α -hélice. As cadeias laterais (R) estão no exterior da hélice. Os raios de van der Waals dos átomos são maiores que os aqui demonstrados; portanto, quase não há espaço livre dentro da hélice. (Modificada e reproduzida, com permissão, de Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*, 7th ed. Freeman, 2012. Copyright © 2012 W.H. Freeman and Company.)

só pode ser estavelmente acomodada dentro da primeira volta de uma α -hélice. Quando presente em outra posição, a prolina rompe a conformação helicoidal, produzindo uma dobra. Como possui um grupo R muito pequeno, a glicina também induz, frequentemente, curvas dentro das α -hélices.

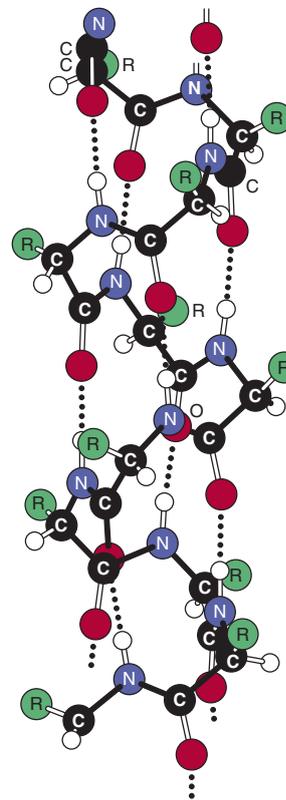


FIGURA 5-4 As ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas) formadas entre os átomos de H e O estabilizam um polipeptídeo em uma conformação α -helicoidal. (Reimpresa, com permissão, de Haggis GH, et al: *Introduction to Molecular Biology Science* 1964;146:1455-1456. Reimpresa, com permissão, de AAAS.)

Muitas α -hélices possuem grupos R predominantemente hidrofóbicos que se projetam de um lado do eixo da hélice, e grupos R predominantemente hidrofílicos que se projetam para o outro lado. Essas **hélices anfipáticas** estão bem adaptadas à formação de interfaces entre regiões polares e apolares, como o interior hidrofóbico de uma proteína e seu ambiente aquoso. Aglomerados de hélices anfipáticas podem criar *canais*, ou poros, através de membranas celulares hidrofóbicas, que permitem a passagem de moléculas polares específicas.

Folha β

A segunda (por isso, “beta”) estrutura secundária regular reconhecível nas proteínas é a folha β . Os resíduos de aminoácidos de uma folha β , quando visualizados na borda, formam um padrão de zigue-zague ou pregueado, no qual os grupamentos R dos resíduos adjacentes apontam em direções opostas. Ao contrário da estrutura compacta da α -hélice, o esqueleto peptídico da folha β é altamente estendido. Contudo, como na α -hélice, a estabilidade das folhas β resulta, em grande parte, das ligações de hidrogênio entre os oxigênios da carbonila e os hidrogênios da amida das ligações peptídicas. No entanto, quando comparadas às da α -hélice, essas ligações são formadas com os segmentos adjacentes da folha β (**Figura 5-5**).

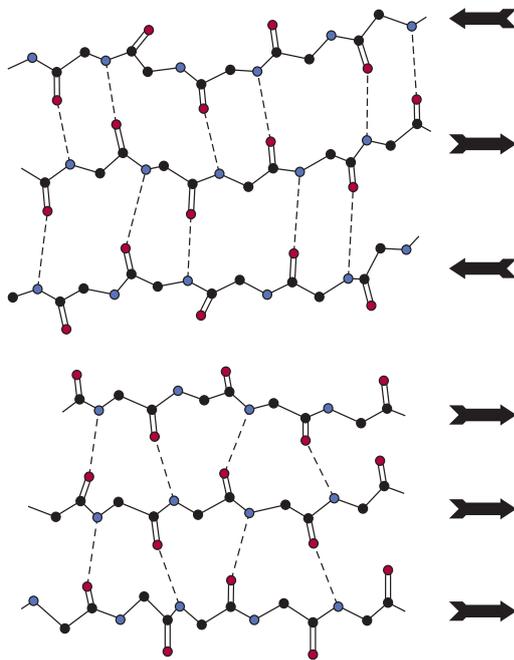


FIGURA 5-5 Espaçamento e ângulos de ligação das ligações de hidrogênio de folhas β pregueadas antiparalelas e paralelas. As setas indicam a direção de cada filamento. As ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas tracejadas entre os átomos do nitrogênio α participantes (doadores de hidrogênio) e átomos de oxigênio (aceptores de hidrogênio) mostrados em azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de carbono do esqueleto são mostrados em preto. Para a clareza da apresentação, os grupamentos R e os átomos de hidrogênio são omitidos. **Parte superior:** folha β antiparalela. Os pares de ligações de hidrogênio alternam-se entre estarem muito próximos entre si e amplamente separados e apresentam orientação quase perpendicular ao esqueleto do polipeptídeo. **Parte inferior:** folha β paralela. As ligações de hidrogênio são uniformemente espaçadas, mas se inclinam em direções alternadas.

As folhas β podem estar dispostas para formar uma folha β **paralela**, na qual os segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica prosseguem na mesma direção amino para carboxila, ou para formar uma folha **antiparalela**, na qual prosseguem em direções opostas (**Figura 5-5**). Ambas as configurações permitem o número máximo de ligações de hidrogênio entre os segmentos, ou filamentos, da folha. A maioria das folhas β não é perfeitamente plana, mas tende a apresentar uma torção para a direita. Aglomerados de cadeias torcidas de folhas β , algumas vezes chamados de barris β , formam o núcleo de muitas proteínas globulares (**Figura 5-6**). Os diagramas esquemáticos representam as folhas β como setas que apontam da direção aminoterminal para a carboxiterminal.

Alças e dobras

Quase metade dos resíduos em uma proteína globular típica reside em α -hélices ou folhas β , e metade em alças, curvaturas, dobras e outros aspectos conformacionais estendidos. Dobras e curvaturas referem-se aos segmentos curtos de aminoácidos que unem duas unidades da estrutura secundária, como os dois filamentos adjacentes de uma folha β antiparalela. Uma curvatura β envolve quatro resíduos aminoácil, na qual o primeiro resíduo está ligado ao quarto por uma ligação de hidrogênio, resultando em uma curvatura estreita de 180° (**Figura 5-7**). A prolina e a glicina estão presentes nas curvaturas β com frequência.

As alças são regiões que contêm resíduos além da quantidade mínima necessária para conectar regiões adjacentes da estrutura secundária. Com conformação irregular, as alças servem, no entanto, para importantes papéis biológicos. Para muitas enzimas, as alças que fazem ligação entre os domínios responsáveis por ligar substratos frequentemente contêm resíduos aminoácil que participam da catálise. Os **motivos hélice-alça-hélice** contêm a porção de ligação ao oligonucleotídeo de muitas proteínas de ligação ao DNA, como repressores e fatores de transcrição. Os motivos estruturais, como os motivos hélice-alça-hélice ou mãos EF da calmodulina (ver Capítulo 51), que são intermediários na escala entre as estruturas secundária e terciária, são frequentemente chamados de **estruturas supersecundárias**. Como muitas alças e dobras residem na superfície das proteínas e, dessa maneira, são expostas ao solvente, elas constituem sítios prontamente acessíveis, ou **epítopos**, para o reconhecimento e a ligação de anticorpos.

Embora as alças careçam de regularidade estrutural aparente, muitas adotam uma conformação específica estabilizada por meio de ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas com outras porções da proteína. No entanto, nem todas as porções das proteínas são necessariamente ordenadas. As proteínas podem conter regiões “desordenadas”, em geral nas extremidades aminoterminal ou carboxiterminal, caracterizadas pela alta flexibilidade conformacional. Em muitos casos, essas regiões desordenadas assumem uma conformação ordenada perante a ligação com um ligante. Essa flexibilidade estrutural capacita essas regiões a agirem como interruptores dependentes de ligantes que afetam a estrutura e a função da proteína.

Estruturas terciária e quaternária

O termo “estrutura terciária” refere-se à conformação tridimensional total de um polipeptídeo. Ele indica, no espaço

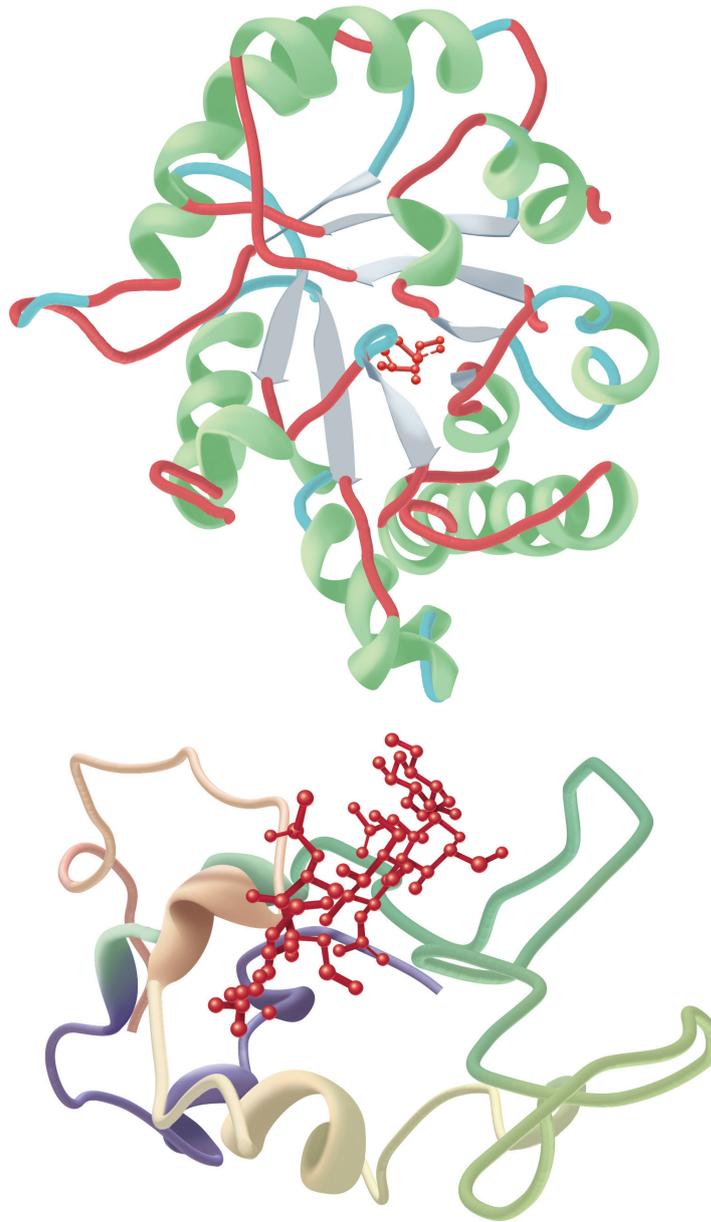


FIGURA 5-6 Exemplos da estrutura terciária das proteínas. Parte superior: A enzima triose-fosfato-isomerase forma um complexo com o substrato análogo 2-fosfoglicerato (em vermelho). Observe o arranjo elegante e assimétrico de folhas β (em azul-claro) e α -hélices (em verde) alternadas, com as folhas β formando o núcleo em barril β circundado pelas hélices. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1o5x.) **Parte inferior:** lisozima complexada com o substrato análogo penta-*N*-acetil quitopentose (em vermelho). A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o roxo (N-terminal) até o bege (C-terminal). A forma côncava do domínio forma uma bolsa de ligação para o pentassacarídeo, a falta de folha β e a alta proporção de alças e curvas. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1sfb.)

tridimensional, como as características estruturais secundárias – hélices, folhas, dobras, curvaturas e alças – reúnem-se para formar domínios e como esses domínios se relacionam espacialmente entre si. Um **domínio** é uma seção da estrutura da proteína suficiente para realizar determinada tarefa química ou física, como a ligação de um substrato ou de outro ligante. A maioria dos domínios é de natureza modular, sendo contígua na sequência primária e no espaço tridimensional (**Figura 5-8**). As proteínas simples, principalmente as que interagem com um único substrato, como a lisozima ou a triose-fosfato-isomerase (**Figura 5-6**) e a proteína de armazenamento de oxigênio, a mioglobina (ver Capítulo 6), muitas vezes consistem

em um único domínio. Em contrapartida, a lactato-desidrogenase é composta por dois domínios, um domínio N-terminal de ligação ao NAD^+ e um domínio de ligação C-terminal para o segundo substrato, o piruvato (**Figura 5-8**). A desidrogenase láctica é um componente da família das oxidoredutases que compartilha um domínio comum de ligação ao NAD(P)^+ N-terminal, conhecida como **dobra de Rossmann**. Pela fusão de um segmento de DNA que codifica uma dobra de Rossmann a um segmento codificando uma variedade de domínios C-terminais, uma grande família de oxidoredutases evoluiu e utiliza $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ para a oxidação e a redução de uma ampla gama de metabólitos. Os exemplos incluem álcool-desidrogenase,

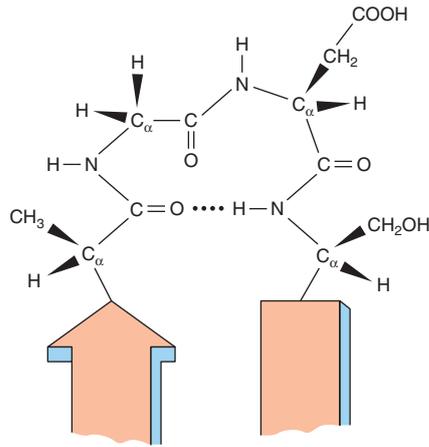


FIGURA 5-7 Uma curvatura β que liga dois segmentos de folha β antiparalela. A linha pontilhada indica a ligação de hidrogênio entre o primeiro e o quarto aminoácidos do segmento de quatro resíduos Ala-Gli-Asp-Ser.

gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, malato-desidrogenase, quinona oxidorreductase, 6-fosfogluconato-desidrogenase, D-glicerato-desidrogenase, formato desidrogenase e 3α , 20β -hidroxiesteroide-desidrogenase.

Nem todos os domínios se ligam a substratos. Os domínios de membrana hidrofóbicos ancoram proteínas nas membranas ou possibilitam que proteínas atravessem membranas. As sequências de localização direcionam as proteínas para posições subcelulares ou extracelulares específicas, como o núcleo, a mitocôndria, as vesículas secretoras, etc. Os domínios reguladores deflagram alterações na função da proteína em resposta à ligação de efetores alostéricos ou de modificações covalentes (ver Capítulo 9). A combinação do material genético que codifica módulos de domínios individuais fornece uma via fácil de gerar proteínas de grande complexidade estrutural e sofisticação funcional (Figura 5-9).

As proteínas contendo múltiplos domínios também podem ser reunidas por meio da associação de múltiplos polipeptídeos, ou protômeros. A estrutura quaternária define a composição polipeptídica de uma proteína e, para uma proteína oligomérica, as relações espaciais entre seus protômeros ou subunidades. Proteínas **monoméricas** consistem em uma única cadeia polipeptídica. As proteínas **diméricas** contêm duas cadeias polipeptídicas. Os **homodímeros** contêm duas cópias da mesma cadeia polipeptídica, ao passo que, em um **heterodímero**, os polipeptídeos diferem. As letras gregas (α , β , γ , etc.) são utilizadas para distinguir subunidades diferentes de uma proteína hetero-oligomérica, e os subscritos indicam o número de cada tipo de subunidade. Por exemplo, α_4 designa uma proteína homotetramérica, e a proteína $\alpha_2\beta_2\gamma$ tem cinco subunidades de três tipos diferentes.

Considerando que até as pequenas proteínas contêm muitos milhares de átomos, as ilustrações da estrutura da proteína que indicam a posição de cada átomo geralmente são muito complexas para serem prontamente interpretadas. Dessa maneira, os diagramas esquemáticos simplificados são utilizados para demonstrar as características principais das estruturas terciária e quaternária de uma proteína. Os diagramas em fita (Figuras 5-6 e 5-8) traçam a conformação do esqueleto

polipeptídico, com os cilindros e as setas indicando as regiões de uma α -hélice e de uma folha β , respectivamente. Em uma representação ainda mais simplificada, segmentos em linha que unem os carbonos α de cada resíduo de aminoácido indicam o caminho da cadeia polipeptídica. Com o objetivo de enfatizar relações estrutura-atividade específicas, esses diagramas esquemáticos frequentemente representam as cadeias laterais de aminoácidos selecionados.

MÚLTIPLOS FATORES ESTABILIZAM AS ESTRUTURAS TERCIÁRIA E QUATERNÁRIA

As ordens superiores da estrutura da proteína são estabilizadas principalmente – e, em geral, de maneira exclusiva – por meio de interações não covalentes. Entre estas, as principais são as interações hidrofóbicas, que direcionam a maioria das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos para o interior da proteína, longe da água circundante. Os outros contribuintes significativos incluem as ligações de hidrogênio e as pontes salinas entre os carboxilatos dos ácidos aspártico e glutâmico e as cadeias laterais de resíduos de lisil, arginil e histidil protonados com cargas opostas. Essas interações são individualmente fracas – 1 a 5 kcal/mol em relação a 80 a 120 kcal/mol de uma ligação covalente. No entanto, assim como a força cumulativa da armação de um fecho de velcro formado por uma multiplicidade de pequenos laços e ganchos de plástico, essas interações em conjunto, que são individualmente fracas, porém numerosas, conferem alto grau de estabilidade à conformação biologicamente funcional da proteína.

Algumas proteínas contêm ligações dissulfeto covalentes que ligam os grupamentos sulfidrila dos resíduos cisteinil. A formação de ligações dissulfeto envolve a oxidação de grupamentos sulfidrila cisteinil e exige oxigênio. As ligações dissulfeto intrapolipeptídicas aumentam a estabilidade da conformação dobrada de um peptídeo, ao passo que as ligações dissulfeto interpolipeptídicas estabilizam a estrutura quaternária de determinadas proteínas oligoméricas.

A ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL É DETERMINADA POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X OU POR ESPECTROSCOPIA DE RMN

Cristalografia de raios X

Após a solução da estrutura tridimensional da mioglobina por John Kendrew, em 1960, a cristalografia de raios X revelou a estrutura de milhares de macromoléculas biológicas, variando de proteínas a oligonucleotídeos e diversos vírus. Para a resolução de sua estrutura por meio da cristalografia de raios X, primeiramente uma proteína é precipitada sob condições que formam grandes cristais bem-ordenados. Para estabelecer as condições apropriadas, os estudos de cristalização empregam alguns microlitros da solução da proteína e uma matriz de variáveis (temperatura, pH, presença de sais ou solutos orgânicos, como

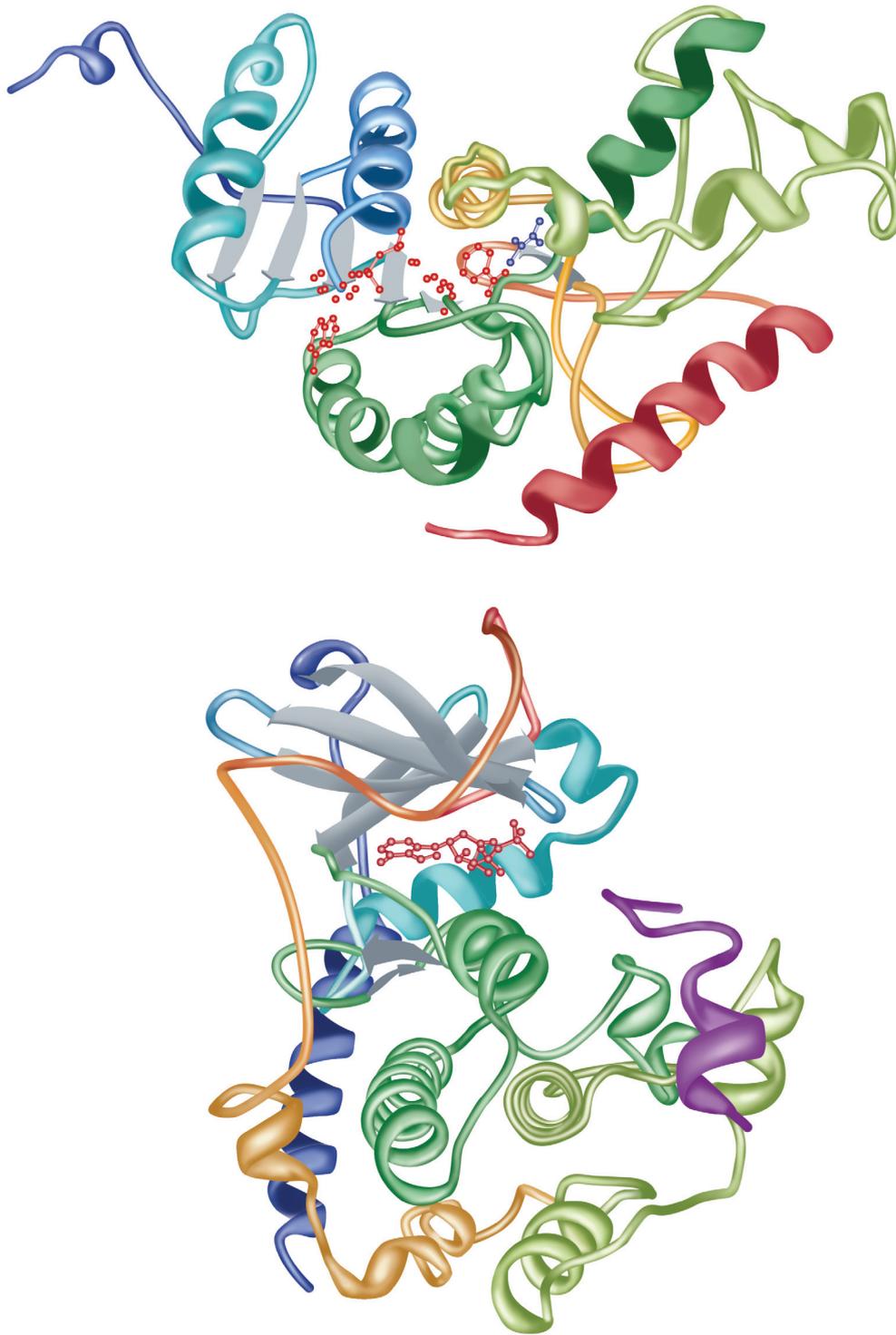


FIGURA 5-8 Polipeptídeos contendo dois domínios. Parte superior: demonstração da estrutura tridimensional de uma unidade monomérica da enzima tetramérica lactato-desidrogenase com os substratos NADH (em vermelho) e piruvato (em azul) ligados. Nem todas as ligações no NADH são exibidas. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o azul (N-terminal) até a cor de laranja (C-terminal). Observe que a porção N-terminal do polipeptídeo forma um domínio contíguo, englobando a porção esquerda da enzima, responsável por ligar o NADH. De maneira similar, a porção C-terminal forma um domínio contíguo responsável por ligar o piruvato. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 3ldh.) **Parte inferior:** é mostrada a estrutura tridimensional da subunidade catalítica da proteína-quinase dependente de cAMP (Capítulo 42) com os substratos análogos ADP (em vermelho) e o peptídeo (em roxo) ligados. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível desde o azul (N-terminal) até a cor de laranja (C-terminal). As proteínas-quinasas transferem o grupamento γ -fosfato do ATP para substratos proteicos e peptídicos (Capítulo 9). Observe que a porção N-terminal do polipeptídeo forma um domínio contíguo rico em folha β que liga ADP. De modo similar, a porção C-terminal forma um domínio rico em α -hélice contíguo, responsável pela ligação do substrato peptídico. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1jbp.)

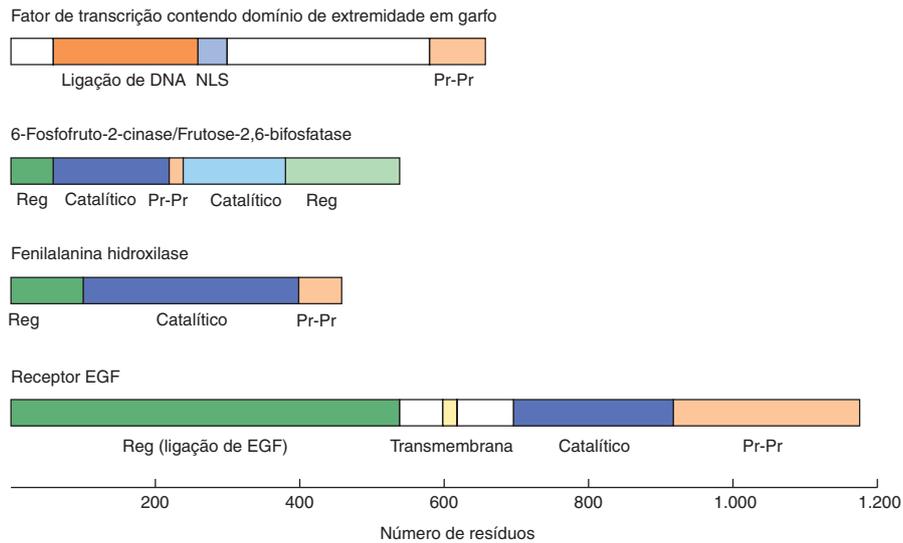


FIGURA 5-9 Algumas proteínas com múltiplos domínios. Os retângulos representam as sequências polipeptídicas de um fator de transcrição com extremidade em garfo; a 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase, uma enzima bifuncional cujas atividades são controladas de maneira recíproca por efeitos alostéricos e modificação covalente (ver Capítulo 19); a fenilalanina-hidroxilase (ver Capítulos 27 e 29), cuja atividade é estimulada por fosforilação de seu domínio regulador; e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*) (ver Capítulo 41), uma proteína transmembrana cujo domínio proteína-cinase intracelular é regulado por meio da ligação do hormônio peptídico EGF ao seu domínio extracelular. Os domínios reguladores são coloridos em verde, os domínios catalíticos, em azul-escuro e azul-claro, os domínios de interação proteína-proteína, em cor de laranja-claro, os domínios de ligação do DNA, em cor de laranja-escuro, as sequências de localização nuclear, em azul intermediário, e os domínios transmembrana, em amarelo. As atividades de cinase e bifosfatase da 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase são catalisadas pelos domínios catalíticos N-terminal e C-terminal próximos, respectivamente.

polietileno glicol) para estabelecer as condições ideais para a formação do cristal. Os cristais montados em capilares de quartzo são primeiramente irradiados com raios X monocromáticos com comprimento de onda aproximado de 0,15 nm para obter a confirmação de que eles são proteicos, e não sais. Então, os cristais de proteína podem ser congelados no nitrogênio líquido para subsequente coleta do conjunto de dados de alta resolução. Os primeiros cristalógrafos coletaram o padrão circular formado pelos raios X difratados sobre filme e os analisaram manualmente. Hoje, os perfis são registrados eletronicamente usando um detector de área e, então, analisados utilizando uma abordagem matemática, chamada de *transformada de Fourier*, que soma as funções de onda. As amplitudes da onda estão relacionadas à intensidade do ponto, porém, como as ondas não estão em fase, a relação entre as suas fases deve ser determinada para extrapolar as posições dos átomos que dão origem ao padrão de difração.

A conduta tradicional para a solução do “problema de fase” emprega a **substituição isomórfica**. Antes da irradiação, um átomo com uma “assinatura” radiográfica distinta é introduzido em um cristal em posições conhecidas na estrutura primária da proteína. Em geral, a substituição isomórfica de átomo pesado utiliza o mercúrio ou o urânio, que se ligam a resíduos de cisteína. Uma conduta alternativa emprega a expressão de proteínas recombinantes codificadas por plasmídeo, nas quais o selênio substitui o enxofre da metionina. A expressão é feita por um hospedeiro bacteriano auxotrófico para a biossíntese da metionina e um meio definido em que a selenometionina substitui a metionina. De forma alternativa, quando a estrutura desconhecida é similar a uma que já foi solucionada, a **substituição molecular** em um modelo

existente proporciona uma maneira atrativa para obter dados sem o emprego de átomos pesados. Por fim, os resultados da obtenção de dados e das transformadas de Fourier propiciam um perfil de densidade de elétron ou um mapa tridimensional de como os átomos se conectam ou estão relacionados entre si. A habilidade de algumas enzimas cristalizadas atuarem como catalisadores sugere que suas estruturas cristalinas refletem fielmente a estrutura da enzima livre em solução.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), um poderoso complemento da cristalografia de raios X, mede a absorvância da energia eletromagnética de radiofrequência emitida por determinados núcleos atômicos. Os isótopos “RMN-ativos” de elementos biologicamente relevantes incluem ^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P . A frequência, ou deslocamento químico, em que um determinado núcleo absorve a energia é uma função tanto do grupamento funcional dentro do qual ele reside quanto da proximidade de outros núcleos RMN-ativos. Antes limitada a metabólitos e a macromoléculas relativamente pequenas, ≤ 30 kDa, a RMN atualmente pode analisar proteínas e complexos de proteínas de > 100 kDa. A espectroscopia de RMN bidimensional permite que a representação tridimensional de uma proteína seja construída ao determinar a proximidade desses núcleos entre si. A espectroscopia de RMN analisa as proteínas em solução aquosa. Isso não somente extingue a necessidade de formar cristais (uma vantagem em especial quando se lida com a dificuldade de cristalizar as proteínas de membranas), como possibilita a observação em tempo real das

alterações na conformação que acompanham a ligação com o ligante ou a catálise. Ela também oferece a possibilidade de talvez ser capaz de observar a estrutura e a dinâmica das proteínas (e dos metabólitos) dentro de células vivas.

Microscopia crioeletrônica

O desenvolvimento do microscópio nos anos 1600 por **van Leeuwenhoek** desencadeou uma revolução na biologia. Pela primeira vez, os cientistas foram capazes de obter imagens bidimensionais que revelaram a natureza celular dos tecidos vivos e a existência de microrganismos. No entanto, a resolução das análises microscópicas era limitada pelo comprimento de onda relativamente longo das fontes de radiação eletromagnéticas disponíveis, geralmente luz visível ($4\text{-}7 \times 10^{-7}$ m). Revestindo materiais, espalhados em uma monocamada, com acetato de urânio ou com algum outro composto contendo metal pesado, a **microscopia eletrônica** (ME) pode gerar imagens de projeções bidimensionais a uma resolução de poucos angstroms utilizando elétrons de alta energia com comprimentos de onda de $1 \text{ a } 10 \times 10^{-12}$ m, em vez de luz visível.

Embora a resolução da ME seja suficientemente alta para visualizar vírus e grandes complexos macromoleculares, a exposição a feixes de elétrons de alta energia destrói rapidamente materiais orgânicos, como proteínas e polinucleotídeos. A **microscopia crioeletrônica** (crio-ME) estende a resolução da ME para materiais biológicos por meio do emprego de agentes criogênicos, como nitrogênio líquido e hélio líquido, para proteger a matéria orgânica da degradação. Embora ainda não seja capaz de alcançar a resolução em nível atômico da cristalografia de raios X e da espectroscopia de RMN, a habilidade da crio-ME em resolver e analisar macromoléculas individuais torna-a adequada para a detecção de complexos e de estados conformacionais. Além disso, a sua resolução macromolecular capacita a crio-ME a ser aplicada à análise de componentes individuais em amostras heterogêneas, ao passo que a cristalografia e a RMN requerem grandes quantidades de analitos altamente purificados.

Modelagem molecular

Um adjunto valioso para a determinação empírica da estrutura tridimensional das proteínas reside na utilização da tecnologia computadorizada para a modelagem molecular. Quando se conhece a estrutura tridimensional, os programas de **dinâmica molecular** podem ser empregados para simular a dinâmica conformacional de uma proteína e a maneira como fatores, como a temperatura, o pH, a força iônica ou as substituições de aminoácidos, influenciam esses movimentos. Os programas de **ancoragem molecular** simulam as interações que ocorrem quando uma proteína encontra um substrato, um inibidor ou outro ligante. A triagem virtual para moléculas prováveis de interagir com os sítios principais em uma proteína de interesse biomédico é utilizada de forma extensa para facilitar a descoberta de novos medicamentos.

A modelagem molecular também é empregada para deduzir a estrutura das proteínas para as quais ainda não estão disponíveis as estruturas por cristalografia de raios X ou de RMN. Os algoritmos de estrutura secundária avaliam a tendência de resíduos específicos serem incorporados em α -hélices ou folhas β nas proteínas previamente estudadas, de modo a prever

a estrutura secundária de outros polipeptídeos. Na **modelagem por homologia**, a estrutura tridimensional conhecida de uma proteína é utilizada como molde sobre o qual se constrói um modelo da *provável* estrutura de uma proteína correlata. Os cientistas estão trabalhando para idealizar programas de computador que irão prever, de forma segura, a conformação tridimensional de uma proteína diretamente a partir de sua sequência primária, permitindo, assim, a determinação das estruturas de muitas proteínas desconhecidas, para as quais atualmente faltam os moldes.

DOBRAMENTO PROTEICO

As proteínas são moléculas conformacionalmente dinâmicas que podem se dobrar em suas conformações funcionalmente competentes em um espaço de tempo de milissegundos. Além disso, com frequência, elas podem se dobrar outra vez, caso sua conformação tenha sido interrompida, um processo chamado de renaturação. Como são atingidas as notáveis velocidade e fidelidade do processo de dobramento proteico? Na natureza, o dobramento ao estado nativo ocorre muito rapidamente para ser o produto de uma busca aleatória e desordenada de todas as estruturas possíveis. As proteínas desnaturadas não são apenas molas aleatórias. Os contatos nativos são favorecidos, e as regiões da estrutura original persistem mesmo no estado desnaturado. A seguir, são discutidos fatores que facilitam e que constituem características mecânicas básicas do dobramento-redobramento proteico.

A conformação nativa de uma proteína é favorecida do ponto de vista termodinâmico

A quantidade de combinações distintas dos ângulos phi e psi que especificam potenciais conformações, inclusive de polipeptídeos relativamente pequenos – 15 kDa – é inacreditavelmente vasta. As proteínas são orientadas por meio do grande labirinto de possibilidades pela termodinâmica. Como a conformação biologicamente relevante – ou nativa – de uma proteína geralmente é aquela mais favorecida do ponto de vista energético, o conhecimento da conformação nativa é especificado na sequência primária. Contudo, se fosse esperar para que um polipeptídeo encontrasse sua conformação nativa pela exploração aleatória de todas as possíveis conformações, o processo exigiria bilhões de anos para ser concluído. Claramente, na natureza, o dobramento proteico ocorre de maneira mais ordenada e orientada.

O dobramento é modular

Em geral, o dobramento da proteína ocorre por meio de um processo em etapas. No primeiro estágio, à medida que o polipeptídeo recentemente sintetizado emerge do ribossomo, os segmentos curtos dobram-se nas unidades estruturais secundárias, que formam regiões locais de estrutura organizada. Então, o dobramento é reduzido para a seleção de um arranjo apropriado desse número relativamente pequeno de elementos estruturais secundários. No segundo estágio, as regiões hidrofóbicas segregam-se para o interior da proteína, longe do solvente, formando um “glóbulo fundido”, um polipeptídeo parcialmente dobrado, no qual os módulos da estrutura secundária se rearranjam até que seja atingida a conformação

madura da proteína. Esse processo é ordenado, porém não é rígido. Há considerável flexibilidade na maneira e na ordem em que os elementos da estrutura secundária podem ser rearranjados. Em geral, cada elemento da estrutura secundária ou da estrutura supersecundária facilita o dobramento apropriado ao direcionar o processo do dobramento no sentido da conformação nativa e para longe de alternativas improdutivas. Para as proteínas oligoméricas, cada protômero tende a se dobrar antes que se associe a outras subunidades.

As proteínas auxiliares ajudam no dobramento

Sob condições laboratoriais apropriadas, muitas proteínas se dobrarão novamente de maneira espontânea depois de serem **desnaturadas** (i.e., desdobradas) pelo tratamento com ácido ou base, agentes caotrópicos ou detergentes. Contudo, a recomposição do dobramento sob essas condições é lenta – de minutos a horas. Além disso, muitas proteínas falham no redobramento espontâneo *in vitro*. Em vez disso, elas formam **agregados** insolúveis, complexos desordenados de polipeptídeos desdobrados ou parcialmente dobrados mantidos juntos predominantemente por interações hidrofóbicas. Os agregados representam resultados improdutivos no processo de dobramento. As células empregam proteínas auxiliares para acelerar o processo de dobramento e para orientar no sentido de uma conclusão produtiva.

Chaperonas

As **chaperonas** participam no dobramento de mais da metade de todas as proteínas de mamíferos. A Hsp70 (do inglês, *70 kDa heat shock protein* [proteína de choque térmico de 70 kDa]) da família das chaperonas liga sequências curtas de aminoácidos hidrofóbicos que emergem enquanto um novo polipeptídeo está sendo sintetizado, protegendo-o do solvente. As chaperonas impedem a agregação, propiciando, dessa maneira, uma oportunidade para a formação dos elementos estruturais secundários apropriados e sua subsequente coalescência em um glóbulo fundido. A família hsp60 de chaperonas, às vezes chamadas de **chaperoninas**, diferem em sequência e estrutura da Hsp70 e seus homólogos. A hsp60 age mais adiante no processo de dobramento, frequentemente em conjunto com uma chaperona Hsp70. A cavidade central da chaperona hsp60 em formato de anel proporciona um ambiente protegido, no qual um polipeptídeo pode se dobrar até que todas as regiões hidrofóbicas sejam posicionadas em seu interior, prevenindo qualquer tendência no sentido da agregação.

Proteína dissulfeto isomerase

As ligações dissulfeto entre e dentro dos polipeptídeos estabilizam as estruturas terciária e quaternária. O processo é iniciado pela enzima proteína sulfidril-oxidase, que catalisa a oxidação de resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto. No entanto, a formação de ligações dissulfeto não é específica – uma determinada cisteína pode formar uma ligação dissulfeto com qualquer resíduo de cisteína disponível. Ao catalisar a troca de dissulfeto, a ruptura de uma ligação S—S e sua reformação com uma cisteína parceira diferente, a proteína dissulfeto isomerase facilita a formação de ligações dissulfeto que estabilizam a conformação nativa de uma proteína. Como muitas

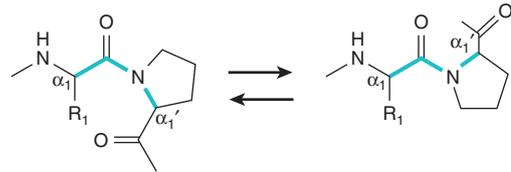


FIGURA 5-10 Isomerização da ligação peptídica N- α_1 prolina de uma configuração *cis* para uma configuração *trans* em relação ao esqueleto do polipeptídeo.

enzimas sulfidril-oxidase eucarióticas, elas são dependentes de flavina, e a deficiência de riboflavina na dieta frequentemente é acompanhada pelo aumento da incidência de dobramentos impróprios de proteínas contendo dissulfeto.

Isomerização prolina-*cis*, *trans*

Todas as ligações peptídicas X-Pro – em que X representa qualquer resíduo – são sintetizadas na configuração *trans*. No entanto, aproximadamente 6% das ligações X-Pro de proteínas maduras são *cis*. A configuração *cis* é particularmente comum nas curvaturas β . A isomerização de *trans* para *cis* é catalisada pelas prolina-*cis*, *trans*-isomerases, uma família de enzimas também conhecidas como ciclofilinas (**Figura 5-10**). Além de promover a maturação de proteínas nativas, as ciclofilinas também participam no dobramento de proteínas expressas por invasores virais. Consequentemente, as ciclofilinas estão sendo investigadas como alvos para o desenvolvimento de fármacos, como ciclosporina e Alisporivir, para o tratamento do HIV, da hepatite C e de outras doenças transmissíveis por vírus.

O dobramento é um processo dinâmico

Do ponto de vista da conformação, as proteínas são moléculas dinâmicas, que podem dobrar-se e desdobrar-se centenas ou milhares de vezes em sua existência. Uma vez desdobradas, como as proteínas tornam a se dobrar e restauram sua conformação funcional? Em primeiro lugar, o ato de se desdobrar raramente leva à randomização completa da cadeia polipeptídica dentro da célula. Em geral, as proteínas desdobradas retêm inúmeros contatos e regiões da estrutura secundária que facilitam o processo do retorno ao dobramento. Em segundo lugar, as chaperonas podem “resgatar” as proteínas desdobradas que ficaram aprisionadas, do ponto de vista termodinâmico, em dobramento totalmente errôneo, ao desdobrar as regiões hidrofóbicas e proporcionar uma segunda oportunidade para o dobramento de maneira produtiva. A glutatona pode reduzir as ligações dissulfeto inadequadas que podem ser formadas perante a exposição a agentes oxidantes como O_2 , peróxido de hidrogênio ou superóxido (ver Capítulo 54).

A IRREGULARIDADE NA CONFORMAÇÃO DE PROTEÍNAS PODE TER CONSEQUÊNCIAS PATOLÓGICAS

Príons

As encefalopatias espongiformes transmissíveis, ou **doenças por príons**, são doenças neurodegenerativas fatais caracterizadas

por alterações espongiiformes, gliomas astrocíticos e perda neuronal decorrente da deposição de agregados proteicos insolúveis nas células nervosas. Elas incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob em seres humanos, a encefalopatia espongiiforme em ovelhas (*scrapie*) e a encefalopatia espongiiforme bovina (doença da vaca louca) no gado. Uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, do inglês, *variant form of Creutzfeldt-Jakob disease*), que aflige os pacientes mais jovens, está associada a transtornos psiquiátricos e comportamentais de início precoce. As doenças por príons podem se manifestar como distúrbios infecciosos, genéticos ou esporádicos. Como nenhum gene viral ou bacteriano que codifica a proteína patológica do príon pode ser identificado, a origem e o mecanismo de transmissão da doença do príon permanecem não elucidados.

Atualmente, há o reconhecimento de que as **doenças por príons são doenças da conformação da proteína** transmissíveis por modificar a conformação e, por conseguinte, as propriedades físicas das proteínas endógenas do hospedeiro. A proteína relacionada com o príon (PrP) humano, uma glicoproteína codificada no braço curto do cromossomo 20, normalmente é monomérica e rica em α -hélice. As proteínas príons patogênicas servem de moldes para a transformação conformacional da PrP normal, conhecida como PrP_c, em PrP_{sc}. A PrP_{sc} é rica em folhas β com muitas cadeias laterais de aminoácil hidrofóbicas expostas ao solvente. À medida que se forma a nova molécula de PrP_{sc}, ela deflagra a produção de variantes ainda mais patológicas em uma reação conformacional em cadeia. Como as moléculas de PrP_{sc} se associam firmemente entre si através de suas regiões hidrofóbicas expostas, as unidades de PrP_{sc} que se acumulam coalescem, formando agregados insolúveis resistentes à protease. Como uma molécula de príon patológico ou de proteína relacionada com o príon pode servir como molde para a transformação conformacional de muitas vezes o seu número de moléculas de PrP_c, as doenças por príon podem ser transmissíveis pela proteína isolada sem o envolvimento do DNA ou do RNA.

Doença de Alzheimer

O redobramento ou o dobramento errôneo de outra proteína endógena ao tecido cerebral humano, a β -amiloide, é um aspecto proeminente da doença de Alzheimer. Embora a causa principal da doença de Alzheimer permaneça desconhecida, as placas senis e os feixes neurofibrilares característicos contêm agregados da proteína β -amiloide, um polipeptídeo de 4,3 kDa produzido pela clivagem proteolítica de uma proteína maior, denominada proteína precursora do amiloide. Nos pacientes com doença de Alzheimer, os níveis de β -amiloide estão elevados, e essa proteína sofre uma transformação conformacional a partir de um estado solúvel e rico em α -hélice, para um estado rico em folhas β e propenso à autoagregação. A apolipoproteína E foi implicada como mediador potencial dessa transformação conformacional.

β -Talassemias

As talassemias são causadas por defeitos genéticos que comprometem a síntese de uma das subunidades polipeptídicas da hemoglobina (ver Capítulo 6). Durante o período em que há o aumento acentuado de síntese da hemoglobina que ocorre

durante o desenvolvimento da hemácia, uma chaperona específica, chamada de proteína de estabilização da hemoglobina α (AHSP, do inglês, *α -hemoglobin-stabilizing protein*), liga-se às subunidades α da hemoglobina que aguardam a incorporação no multímero da hemoglobina. Na ausência dessa chaperona, as subunidades α da hemoglobina livres agregam-se, e o precipitado resultante possui efeitos citotóxicos para a hemácia em desenvolvimento. As pesquisas que utilizam camundongos geneticamente modificados sugerem que a AHSP contribui para a modulação da gravidade da β -talassemia nos seres humanos.

O COLÁGENO ILUSTRA O PAPEL DO PROCESSAMENTO PÓS-TRADUCIONAL NA MATUREZAÇÃO PROTEICA

A maturação da proteína frequentemente envolve formação e clivagem de ligações covalentes

A maturação das proteínas em seu estado estrutural final geralmente envolve a clivagem ou a formação (ou ambas) de ligações covalentes, um processo de **modificação pós-traducional**. Muitos polipeptídeos são inicialmente sintetizados como precursores maiores, chamados de **pró-proteínas**. Os segmentos polipeptídicos “extras” nessas pró-proteínas muitas vezes servem como seqüências sinais que direcionam um polipeptídeo para uma determinada organela ou facilitam sua passagem através de uma membrana. Outros segmentos garantem que a atividade potencialmente danosa de uma proteína, como as proteases tripsina e quimiotripsina, permaneça inibida até que essas proteínas alcancem o seu destino final. No entanto, quando esses requisitos transitórios são preenchidos, as novas regiões supérfluas do peptídeo são removidas pela proteólise seletiva. Outras modificações covalentes podem adicionar novas entidades químicas a uma proteína. A maturação do colágeno ilustra esses dois processos.

O colágeno é uma proteína fibrosa

O colágeno é a mais abundante dentre as proteínas fibrosas, constituindo mais de 25% da massa proteica no corpo humano. As outras proteínas fibrosas proeminentes incluem a queratina e a miosina. Essas proteínas fibrosas representam uma fonte primária de força estrutural para as células (p. ex., o citoesqueleto) e os tecidos. A força e a flexibilidade da pele são derivadas de uma rede entremeadada de fibras de colágeno e queratina, ao

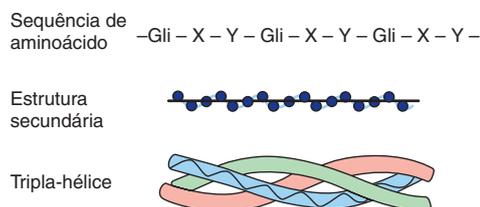


FIGURA 5-11 As estruturas primária, secundária e terciária do colágeno.

passo que os dentes e os ossos são sustentados por uma rede subjacente de fibras de colágeno análoga aos filamentos de aço no concreto reforçado. O colágeno também está presente nos tecidos conectivos, como ligamentos e tendões. O alto grau de força tênsil necessária para preencher esses papéis estruturais requer proteínas alongadas caracterizadas por sequências repetitivas de aminoácidos e uma estrutura secundária regular.

O colágeno forma uma tripla-hélice única

O tropocolágeno, a unidade repetitiva de uma fibra de colágeno madura, consiste em três polipeptídeos de colágeno, cada um deles contendo cerca de mil aminoácidos, mantidos unidos em uma configuração ímpar, a tripla-hélice do colágeno (**Figura 5-11**). Uma fibra de colágeno madura forma um bastão alongado com uma razão axial de aproximadamente 200. Três filamentos polipeptídicos entrelaçados, que se torcem para a esquerda, enrolam-se um sobre o outro no sentido direito para formar a tripla-hélice do colágeno. O sentido oposto para a direita dessa super-hélice e seus polipeptídeos componentes tornam a tripla-hélice do colágeno altamente resistente ao desenrolamento – princípio também aplicado aos cabos de aço de pontes em suspensão. Uma tripla-hélice de colágeno possui 3,3 resíduos por volta e um passo por resíduo que constitui quase o dobro daquele de uma α -hélice. Os grupamentos R de cada filamento polipeptídico da tripla-hélice agrupam-se tão intimamente que, de modo a se adaptar, um em cada três deve ser H. Dessa maneira, cada terceiro resíduo de aminoácido no colágeno é um resíduo de glicina. A coordenação dos três filamentos propicia o posicionamento apropriado das glicinas necessário por toda a hélice. O colágeno também é rico em prolina e hidroxiprolina, proporcionando um padrão Gli-X-Y repetitivo (**Figura 5-11**), no qual, em geral, o Y é a prolina ou a hidroxiprolina.

As triplas-hélices do colágeno são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os resíduos em *diferentes* cadeias polipeptídicas, processo auxiliado pelos grupamentos hidroxila dos resíduos hidroxiprolil. Estabilidade adicional é fornecida por ligações covalentes cruzadas formadas entre os resíduos lisil modificados tanto dentro quanto entre as cadeias polipeptídicas.

O colágeno é sintetizado como um precursor maior

Inicialmente, o colágeno é sintetizado como um polipeptídeo precursor maior, o pró-colágeno. Inúmeros resíduos prolil e lisil do pró-colágeno são hidroxilados pela prolil-hidroxilase e pela lisil-hidroxilase, enzimas que requerem ácido ascórbico (vitamina C; ver Capítulos 27 e 44). Os resíduos hidroxiprolil e hidroxilil proporcionam a capacidade de formar ligações de hidrogênio adicionais que estabilizam a proteína madura. Além disso, as glicosil e galactosil transferases prendem resíduos glicosil ou galactosil nos grupamentos hidroxila de resíduos hidroxilil específicos.

A porção central do polipeptídeo precursor, então, associa-se a outras moléculas para formar a tripla-hélice característica. Esse processo é acompanhado pela remoção do aminoterminal globular e das extensões carboxiterminais do polipeptídeo precursor através da proteólise seletiva. Determinados resíduos lisil são modificados pela lisil-oxidase, uma proteína contendo

cobre que converte os grupamentos ϵ -amino em aldeídos. Os aldeídos podem passar por uma condensação aldólica para formar uma dupla ligação C=C ou formar uma base de Schiff (eneimina) com o grupo ϵ -amino de um resíduo lisil inalterado, que é subsequentemente reduzido, formando uma ligação simples C—N. Essas ligações covalentes entrelaçam polipeptídeos individuais e conferem força e rigidez excepcional à fibra.

Os distúrbios nutricionais e genéticos podem prejudicar a maturação do colágeno

A complexa série de eventos na maturação do colágeno propicia um modelo que ilustra as consequências biológicas da maturação polipeptídica incompleta. O defeito mais bem conhecido na biossíntese do colágeno é o **escorbuto**, consequência da deficiência nutricional de vitamina C, necessária para a atividade da prolil e da lisil-hidroxilases. O déficit resultante no número de resíduos de hidroxiprolina e hidroxililina enfraquece a estabilidade conformacional das fibras de colágeno, levando a gengivas hemorrágicas, edema das articulações, cicatrização deficiente das feridas e, por fim, à morte. Caracterizada por pelos crespos e retardo do crescimento, a **síndrome de Menkes** reflete uma deficiência nutricional do cobre necessário pela lisil-oxidase, a qual catalisa uma etapa primordial na formação das ligações cruzadas covalentes que fortalecem as fibras de colágeno.

Os distúrbios genéticos da biossíntese do colágeno incluem diversas formas de osteogênese imperfeita, caracterizada por ossos frágeis. Na síndrome de Ehlers-Danlos, um grupo de distúrbios do tecido conectivo que envolve a integridade comprometida das estruturas de sustentação, os defeitos nos genes que codificam o colágeno-1 α , a pró-colágeno N-peptidase ou a lisil-hidroxilase resultam em articulações móveis e anormalidades cutâneas (ver Capítulo 50).

RESUMO

- As proteínas podem ser classificadas com base em sua solubilidade, formato, função ou na presença de um grupamento prostético, como a heme.
- A estrutura primária de um polipeptídeo codificada pelo gene é a sequência de seus aminoácidos. A sua estrutura secundária resulta do dobramento dos polipeptídeos em motivos unidos por ligações de hidrogênio, como a α -hélice, a folha β pregueada, as curvaturas β e as alças. As combinações desses motivos podem formar os motivos supersecundários.
- A estrutura terciária considera as relações entre os domínios estruturais secundários. A estrutura quaternária das proteínas com dois ou mais polipeptídeos (proteínas oligoméricas) diz respeito às relações espaciais entre os vários tipos de polipeptídeos.
- As estruturas primárias são estabilizadas por ligações peptídicas covalentes. As ordens superiores de estrutura são estabilizadas por forças fracas – múltiplas ligações de hidrogênio, pontes salinas (eletrostáticas) e associação de grupamentos R hidrofóbicos.
- O ângulo phi (Φ) de um polipeptídeo é o ângulo ao redor da ligação C_{α} —N; o ângulo psi (Ψ) é aquele em torno da ligação C_{α} — C_{β} . A maioria das combinações dos ângulos phi-psi não é admitida devido ao seu impedimento estérico. Os ângulos phi-psi

que formam a α -hélice e a folha β caem dentro dos quadrantes esquerdo inferior e superior de um gráfico de Ramachandran, respectivamente.

- O dobramento proteico é um processo pouco compreendido. Em termos gerais, os segmentos curtos do polipeptídeo recentemente sintetizado se dobram nas unidades estruturais secundárias. As forças que protegem as regiões hidrofóbicas contra o solvente direcionam o polipeptídeo parcialmente dobrado para um “glóbulo fundido”, no qual os módulos da estrutura secundária são rearranjados para conferir a conformação nativa da proteína.
- As proteínas que auxiliam no dobramento incluem a proteína dissulfeto isomerase, prolina-*cis*, *trans*-isomerase e as chaperonas que participam do dobramento de mais da metade das proteínas de mamíferos. As chaperonas protegem os polipeptídeos recentemente sintetizados contra o solvente e proporcionam um ambiente para que os elementos da estrutura secundária apareçam e coalesçam nos glóbulos fundidos.
- Os pesquisadores biomédicos estão atualmente trabalhando para desenvolver agentes que interferem no dobramento de proteínas virais e príons, como fármacos para o tratamento da hepatite C e de uma variedade de doenças neurodegenerativas.
- A cristalografia de raios X e a RMN são as principais técnicas utilizadas para estudar as ordens superiores da estrutura da proteína.
- Embora sem o nível de resolução atômico da cristalografia de raios X ou RMN, a crio-ME surgiu como uma ferramenta poderosa para a análise da dinâmica molecular de macromoléculas biológicas em amostras heterogêneas.
- Os príons – partículas de proteína que carecem de ácido nucleico – causam encefalopatias espongiformes fatais transmissíveis, como a doença de Creutzfeldt-Jakob, a encefalopatia espongiforme de ovelhas (*scrapie*) e a encefalopatia espongiforme bovina. As doenças por príons envolvem a alteração de uma estrutura secundária-terciária de uma proteína de ocorrência natural, a PrPc. Quando a PrPc interage com a sua isoforma patológica, PrPsc, a sua conformação é transformada de uma estrutura predominantemente α -helicoidal para a estrutura folha β característica do PrPsc.
- O colágeno ilustra uma íntima relação entre a estrutura da proteína e a função biológica. As doenças da maturação do colágeno incluem a síndrome de Ehlers-Danlos e a doença de deficiência de vitamina C, o escorbuto.

REFERÊNCIAS

- Doyle SM, Genest O, Wickner S: Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;10:617.
- Frausto SD, Lee E, Tang H: Cyclophilins as modulators of viral replication. *Viruses* 2013;5:1684.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M: Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Biol* 2009;16:574.
- Ho BK, Thomas A, Brasseur R: Revisiting the Ramachandran plot: hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Sci* 2003;12:2508.
- Jorgensen WL: The many roles of computation in drug discovery. *Science* 2004;303:1813.
- Jucker M, Walker LC: Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013;501:45.
- Kim YE, Hipp MS, Bracher A, et al: Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 2013;82:323.
- Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, et al: Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. *J Clin Invest* 2004;114:1457.
- Kwan AH, Mobli M, Gooley PR, et al: Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. *FEBS J* 2011; 278:687.
- Lee J, Kim SY, Hwang KJ, et al: Prion diseases as transmissible zoonotic diseases. *Osong Public Health Res Perspect* 2013;4:57.
- Milne JLS, Borgnia MJ, Bartesaghi A, et al: Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist. *FEBS J* 2013;280:28.
- Manthey KC, Chew YC, Zemleni J: Riboflavin deficiency impairs oxidative folding and secretion of apolipoprotein B-100 in HepG2 cells, triggering stress response systems. *J Nutr* 2005;135:978.
- Myllyharju J: Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* 2003;22:15.
- Narayan M: Disulfide bonds: Protein folding and subcellular protein trafficking. *FEBS J* 2013;279:2272.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, et al: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 2004;381:561.
- Shoulders MD, Raines RT: Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929.

Questões para estudo

Seção I – Estruturas e funções de proteínas e enzimas

1. Explique como as observações de Büchner no início do século XX levaram à descoberta dos detalhes da fermentação.
2. Cite algumas das primeiras descobertas que se seguiram à constatação de que uma preparação livre de células de levedura poderia catalisar o processo da fermentação.
3. Cite alguns dos tipos de preparações de tecidos que os bioquímicos do início do século XX empregaram para estudar a glicólise e a biossíntese de ureia e para descobrir as funções dos derivados de vitaminas.
4. Descreva como a disponibilidade de isótopos radioativos facilitaram a identificação de intermediários metabólicos.
5. Cite alguns dos “erros inatos do metabolismo” identificados pelo médico Archibald Garrod.
6. Cite um exemplo no metabolismo dos lipídeos em que a ligação entre as abordagens bioquímicas e genéticas contribuiu para o avanço da medicina e da bioquímica.
7. Cite alguns dos “organismos-modelo” cujos genomas podem ser seletivamente alterados para fornecer informações sobre os processos bioquímicos.
8. Selecione a afirmativa que está INCORRETA.

A tendência das moléculas de água de formar ligações de hidrogênio uma com a outra é o principal fator responsável por todas as propriedades a seguir, EXCETO:

 - A. O seu ponto de ebulição atipicamente alto.
 - B. O seu alto calor de vaporização.
 - C. A sua alta tensão superficial.
 - D. A sua habilidade de dissolver hidrocarbonetos.
 - E. A sua expansão quando congelada.
9. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
 - A. As cadeias laterais dos aminoácidos cisteína e metionina absorvem luz a 280 nm.
 - B. A glicina frequentemente está presente em regiões onde um polipeptídeo forma uma curva acentuada, revertendo a direção de um polipeptídeo.
 - C. Os polipeptídeos são nomeados como derivados do resíduo aminoacil C-terminal.
 - D. Os átomos de C, N, O, e H de uma ligação peptídica são coplanares.
 - E. Um pentapeptídeo linear contém quatro ligações peptídicas.
10. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
 - A. Dentre os tampões dos tecidos humanos estão o bicarbonato, as proteínas e o ortofosfato.
 - B. Um ácido fraco ou uma base fraca exibem sua maior capacidade tamponante quando o pH é igual ao seu pK_a mais uma ou menos uma unidade de pH.
 - C. O pH isoelétrico (pI) da lisina pode ser calculado utilizando-se a fórmula $(pK_2 + pK_3)/2$.
 - D. A mobilidade de um ácido fraco monoprótico em um campo elétrico de corrente direta atinge seu máximo quando o pH do ambiente é igual ao seu pK_a .
 - E. Para simplificar, a força das bases fracas é, geralmente, expressa como o pK_a de seus ácidos conjugados.
11. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
 - A. Se o pK_a de um ácido fraco é de 4,0, 50% das moléculas estarão no estado dissociado quando o pH do meio for de 4,0.
 - B. Um ácido fraco com um pK_a de 4,0 será um tampão mais efetivo em pH 3,8 do que em pH 5,7.
 - C. Em pH igual ao seu pI, um polipeptídeo não contém grupos carregados.
 - D. Ácidos e bases fracos são assim denominados porque eles sofrem dissociação completa quando dissolvidos em água.
 - E. O pK_a de um grupo ionizável pode ser influenciado pelas propriedades físicas e químicas do meio.
12. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
 - A. O principal objetivo da proteômica é identificar todas as proteínas presentes em uma célula em condições distintas, assim como suas modificações.
 - B. A espectroscopia de massas substituiu amplamente o método de Edman para o sequenciamento de peptídeos e proteínas.
 - C. O reagente de Sanger foi um aperfeiçoamento do de Edman, uma vez que ele gera uma nova extremidade amino, permitindo que ocorra diversos ciclos consecutivos de sequenciamento.
 - D. Uma vez que a massa é uma propriedade universal de todos os átomos e moléculas, a espectroscopia de massas é ideal para a detecção de modificações pós-traducionais em proteínas.
 - E. Os espectrômetros de massa de tempo de voo tiram vantagem da relação $F = ma$.
13. Por que óleo de oliva em água tende a formar gotas largas?
14. O que distingue uma base forte de uma base fraca?
15. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
 - A. A cromatografia de troca iônica separa proteínas com base no sinal e na magnitude de sua carga em um determinado pH.
 - B. A eletroforese em gel bidimensional separa proteínas primeiro com base em seus valores de pI e segundo com base na relação carga-massa utilizando SDS-PAGE.
 - C. A cromatografia por afinidade explora a seletividade das interações entre proteína-ligante para isolar uma proteína específica de uma mistura complexa.
 - D. Muitas proteínas recombinantes são expressas com um domínio adicional fusionado à sua extremidade N ou C-terminal. Um componente comum desses domínios fusionados é um sítio de ligação desenhado explicitamente para facilitar a purificação por cromatografia por afinidade.
 - E. A seguir à purificação por técnicas clássicas, a espectrometria de massas em *tandem* é, em geral, utilizada para analisar peptídeos derivados de uma mistura complexa de proteínas.

16. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
- A. O dobramento das proteínas é assistido por proteínas auxiliares especializadas, chamadas de chaperonas.
 - B. O dobramento proteico tende a ser modular, com áreas de estrutura secundária local formando-se primeiro, em seguida, aglomerando-se em um glóbulo fundido.
 - C. O dobramento das proteínas é impulsionado, antes de mais nada, pela termodinâmica das moléculas de água em torno do polipeptídeo nascente.
 - D. A formação de ligação S-S em uma proteína madura é facilitada pela enzima proteína dissulfeto isomerase.
 - E. Apenas algumas proteínas incomuns, como o colágeno, requerem processamento pós-traducional por proteólise parcial para atingir a sua conformação madura.
17. Estime o pI de um polieletrólito que contém três grupos carboxílicos e três grupos aminos cujos valores de pK_a são 4,0, 4,6, 6,3, 7,7, 8,9 e 10,2.
18. Cite uma desvantagem da categorização dos aminoácidos proteicos simplesmente como "essencial" ou "não essencial"?
19. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
- A. As modificações pós-traducionais de proteínas podem afetar sua função e seu destino metabólico.
 - B. O estado conformacional nativo, em geral, é aquele termodinamicamente favorável.
 - C. As estruturas tridimensionais complexas da maioria das proteínas são formadas e estabilizadas pelos efeitos cumulativos de um grande número de interações fracas.
 - D. Os cientistas-pesquisadores empregam matrizes gênicas para a detecção de alto rendimento da presença e do nível de expressão de proteínas.
 - E. Exemplos de interações fracas que estabilizam o dobramento proteico incluem ligações de hidrogênio, pontes salinas e forças de van der Waals.
20. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
- A. Mudanças na configuração envolvem a ruptura de ligações covalentes.
 - B. Mudanças na conformação envolvem a rotação de uma ou mais ligações simples.
 - C. O gráfico de Ramachandran ilustra o grau em que o impedimento estérico limita os ângulos permitidos das ligações simples na estrutura de um peptídeo ou proteína.
 - D. A formação de uma hélice é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o oxigênio carboxílico de cada ligação peptídica e o grupo N-H da ligação peptídica seguinte.
 - E. Na folha β os grupos R de resíduos adjacentes apontam em direções opostas em relação ao plano da folha.
21. Selecione uma das afirmativas a seguir que está INCORRETA.
- A. O descritor $\alpha_2\beta_2\gamma_3$ indica uma proteína com sete subunidades de três tipos diferentes.
 - B. As alças são regiões estendidas que conectam regiões adjacentes de estrutura secundária.
 - C. Mais da metade dos resíduos em uma proteína típica estão localizados em α -hélices ou folhas β .
 - D. A maioria das folhas β são torcidas para a direita.
 - E. Os príons são vírus que causam doenças de dobramento proteico que atingem o cérebro.
22. Qual a vantagem que o grupo ácido do ácido fosfórico associado com o pK_2 oferece para o tamponamento de tecidos humanos?
23. As constantes de dissociação para um aminoácido racêmico ainda não caracterizado descoberto em um meteoro foram determinadas como: $pK_1 = 2,0$, $pK_2 = 3,5$, $pK_3 = 6,3$, $pK_4 = 8,0$, $pK_5 = 9,8$ e $pK_7 = 10,9$:
- A. Qual grupo funcional carboxílico ou amino você esperaria estar associado à cada constante de dissociação?
 - B. Qual seria a carga líquida aproximada desse aminoácido em pH 2?
 - C. Qual seria a carga líquida aproximada em pH 6,3?
 - D. Durante a eletroforese de corrente contínua em pH 8,5, em direção de qual eletrodo este aminoácido é suscetível de se mover?
24. Um tampão bioquímico é um composto que tende a resistir a variações de pH mesmo quando ácidos ou bases são adicionados ao meio. Quais são as duas propriedades necessárias de um tampão fisiológico efetivo? Além de fosfato, quais outros compostos fisiológicos se encaixam nesse critério?
25. Nomeie dois aminoácidos cuja modificação pós-traducional confere novas propriedades significativas à proteína.
26. Explique por que dietas deficientes em (a) cobre (Cu) ou (b) ácido ascórbico leva a um processo pós-traducional incompleto do colágeno.
27. Descreva a função das sequências N-terminais na biossíntese de certas proteínas.



Proteínas: mioglobina e hemoglobina

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as semelhanças e as diferenças estruturais mais importantes entre a mioglobina e a hemoglobina.
- Esboçar as curvas de ligação para a oxigenação da mioglobina e da hemoglobina.
- Identificar as ligações covalentes e outras associações próximas entre o heme e a globina na oximioglobina e na oxi-hemoglobina.
- Explicar por que a função fisiológica da hemoglobina requer que sua curva de ligação de O_2 seja sigmoide, em vez de hiperbólica.
- Explicar o papel oculto na capacidade da hemoglobina de se ligar ao monóxido de carbono.
- Definir P_{50} e indicar seu significado no transporte e na liberação de oxigênio.
- Descrever as alterações estruturais e conformacionais da hemoglobina que acompanham sua oxigenação e subsequente desoxigenação.
- Explicar o papel do 2,3-bifosfoglicerato (BPG) na ligação e liberação de oxigênio.
- Delinear o papel da hemoglobina no transporte de CO_2 e prótons, e descrever as consequentes alterações no pK_a do grupamento imidazol relevante.
- Descrever as consequências estruturais para a HbS decorrentes da diminuição da pO_2 .
- Identificar o defeito metabólico que ocorre como consequência das α e β -talassemias.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A eficiência da entrega de oxigênio dos pulmões para os tecidos periféricos e a manutenção de tecidos de reserva para proteger contra episódios anoréxicos são essenciais à saúde. Em mamíferos, essas funções são realizadas pelas hemoproteínas homólogas, hemoglobina e mioglobina, respectivamente. A mioglobina, uma proteína monomérica do músculo vermelho, liga-se firmemente ao oxigênio como uma reserva contra a privação de oxigênio. As múltiplas subunidades da hemoglobina, uma proteína tetramérica de hemácias, interagem de forma cooperativa, o que possibilita a esse transportador descarregar uma alta quantidade de O_2 nos tecidos periféricos enquanto mantém, ao

mesmo tempo, a capacidade de ligá-lo com eficiência nos pulmões. Além de entregar O_2 , a hemoglobina retira os resíduos de produtos da respiração, CO_2 e prótons, para o transporte e, finalmente, para a eliminação nos pulmões. A entrega de oxigênio é aumentada pela ligação de 2,3-bifosfoglicerato (BPG), que estabiliza a estrutura quaternária da desoxi-hemoglobina. A hemoglobina e a mioglobina ilustram tanto as relações estrutura-atividade da proteína quanto a base molecular das doenças genéticas, como a anemia falciforme e as talassemias. O cianeto e o monóxido de carbono provocam a morte porque rompem a função fisiológica das hemoproteínas citocromo-oxidase e hemoglobina, respectivamente.

O HEME E O FERRO FERROSO CONFEREM A CAPACIDADE DE ARMAZENAR E TRANSPORTAR OXIGÊNIO

A mioglobina e a hemoglobina contêm **heme**, um tetrapirrol cíclico que consiste em quatro moléculas de pirrol ligadas por pontes de meteno. Essa rede planar de duplas ligações conjugadas absorve luz visível e colore o heme de vermelho intenso. Os substitutos nas posições β do heme são os grupamentos metil (M), vinil (V) e propionato (Pr) dispostos na ordem M, V, M, V, M, Pr, Pr, M (**Figura 6-1**). O átomo de ferro ferroso (Fe^{2+}) reside no centro do tetrapirrol planar. As outras proteínas com grupamentos prostéticos tetrapirrólicos contendo metal incluem os citocromos (Fe e Cu) e a clorofila (Mg) (ver Capítulo 31). A oxidação e a redução dos átomos Fe e Cu dos citocromos são essenciais para suas funções biológicas como transportadores de elétrons. Em contrapartida, a oxidação do Fe^{2+} da mioglobina ou da hemoglobina em Fe^{3+} destrói sua atividade biológica.

A mioglobina é rica em α -hélice

O oxigênio armazenado na mioglobina do músculo é liberado durante a privação de O_2 (p. ex., durante exercício intenso) para uso nas mitocôndrias musculares para a síntese aeróbia de ATP (ver Capítulo 13). Um polipeptídeo de 153 resíduos aminoácil (PM 17.000), a molécula de mioglobina compactadamente dobrada mede $4,5 \times 3,5 \times 2,5$ nm (**Figura 6-2**). Uma proporção incomumente alta – cerca de 75% – dos resíduos está presente nas oito α -hélices de 7 a 20 resíduos

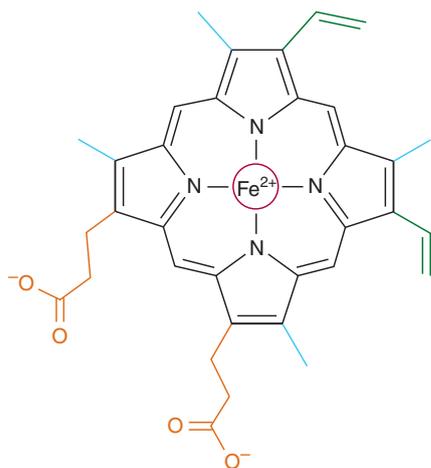


FIGURA 6-1 Heme. Os anéis pirrólicos e os carbonos da ponte de metileno são coplanares, e o átomo de ferro (Fe^{2+}) encontra-se quase no mesmo plano. A quinta e a sexta posições de coordenação do Fe^{2+} são diretamente perpendiculares – e estão diretamente acima e abaixo – ao plano do anel do heme. Observe a natureza dos grupamentos substitutos metil (em azul), vinil (em verde) e propionato (em cor de laranja) nos carbonos β dos anéis pirrólicos, o átomo de ferro central (em vermelho) e a localização do lado polar do anel do heme (na posição equivalente a 7 horas) que se defronta com a superfície da molécula de mioglobina.

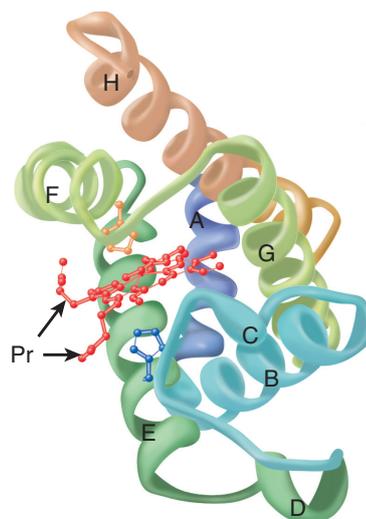


FIGURA 6-2 Estrutura tridimensional da mioglobina.

O esqueleto polipeptídico da mioglobina está demonstrado em um diagrama em fita. A cor da cadeia polipeptídica é graduada ao longo do espectro visível, desde o azul (N-terminal) até o bronze (C-terminal). O grupamento prostético heme está em vermelho. As regiões α -helicoidais são designadas de A a H. Os resíduos das histidinas distal (E7) e proximal (F8) estão destacados em azul e em cor de laranja, respectivamente. Observe como os substituintes propionato (Pr) polares se projetam para fora do heme no sentido do solvente. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1a6n.)

direcionadas para a direita. A partir da extremidade amino-terminal, essas hélices são denominadas de A a H. Típica de proteínas globulares, a superfície da mioglobina é rica em aminoácidos que contêm cadeias laterais polares e potencialmente carregadas, ao passo que – com duas exceções – o interior contém resíduos que possuem grupos R apolares (p. ex., Leu, Val, Phe e Met). As exceções são o sétimo e o oitavo resíduos nas hélices E e F, His E7 e His F8, que se encontram perto do ferro heme, onde funcionam na ligação de O_2 .

As histidinas F8 e E7 realizam funções únicas na ligação de oxigênio

O heme da mioglobina localiza-se em uma fissura entre as hélices E e F, orientado com seus grupamentos propionatos polares voltados para a superfície da globina (**Figura 6-2**). O restante reside no interior não polar. A quinta posição de coordenação do ferro é ocupada por um nitrogênio do anel imidazólico da **histidina proximal**, His F8. A **histidina distal**, His E7, localiza-se no lado do anel do heme oposto à His F8.

O ferro movimenta-se no sentido do plano do heme quando o oxigênio está ligado

O ferro da mioglobina não oxigenada se localiza a 0,03 nm (0,3 Å) fora do plano do anel do heme, no sentido de His F8. Como consequência, o heme “enruga” ligeiramente. Quando o O_2 ocupa a sexta posição de coordenação, o ferro move-se para dentro 0,01 nm (0,1 Å) do plano do anel do heme. A oxigenação da mioglobina é, dessa forma, acompanhada pelo movimento do ferro, de His F8, e dos resíduos ligados à His F8.

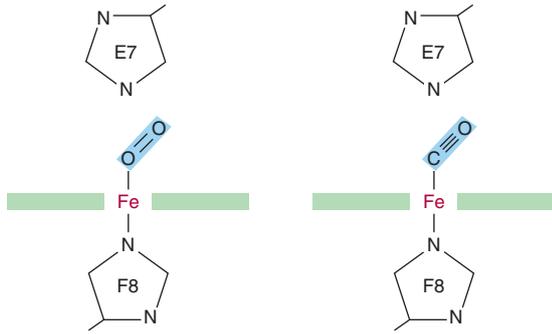


FIGURA 6-3 Ângulos para a ligação do oxigênio e do monóxido de carbono (CO) com o ferro do heme da mioglobina. A histidina distal E7 impede a ligação do CO no ângulo preferido (90°) em relação ao plano do anel do heme.

A apomioglobina fornece um ambiente oculto para o ferro do heme

Quando O_2 se liga à mioglobina, a ligação que une o primeiro e o segundo átomos de oxigênio encontra-se em um ângulo de 121° com o plano do heme, orientando o segundo oxigênio para longe da histidina distal (Figura 6-3, à esquerda). Isso possibilita a sobreposição máxima entre o ferro e um dos pares isolados de elétrons nos átomos de oxigênio hibridizados em sp^2 , os quais se situam em um ângulo de quase 120° com o eixo da dupla ligação $O=O$ (Figura 6-4, à esquerda). O heme isolado liga-se ao monóxido de carbono (CO) com força 25 mil vezes maior que o oxigênio. Então, por que o CO não desloca completamente o O_2 do ferro do heme? O CO está presente em quantidades mínimas na atmosfera e aumenta na célula a partir do catabolismo do heme. A explicação aceita é que as apoproteínas da mioglobina e da hemoglobina criam um **ambiente oculto** para os seus ligantes gasosos. Quando o CO se liga ao heme isolado, todos os três átomos (Fe, C e O) situam-se perpendicularmente ao plano do heme. Essa geometria maximiza a sobreposição entre o par isolado de elétrons do oxigênio hibridizado sp da molécula de CO e o ferro Fe^{2+} (Figura 6-4, à direita). No entanto, na mioglobina e na

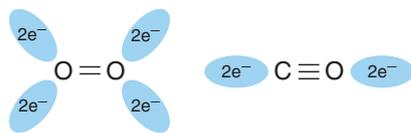


FIGURA 6-4 Orientação dos pares de elétrons isolados em relação às ligações $O=O$ e $C\equiv O$ de oxigênio e monóxido de carbono. No oxigênio molecular, a formação da dupla ligação entre os dois átomos de oxigênio é facilitada pela adoção de um estado de hibridização sp^2 pelo elétron de valência de cada átomo de oxigênio. Como consequência, os dois átomos da molécula de oxigênio e cada par de elétrons isolado são coplanares e separados por um ângulo de aproximadamente 120° (à esquerda). Em contrapartida, os dois átomos do monóxido de carbono são unidos por uma ligação tripla, a qual requer que os átomos de carbono e oxigênio adotem um estado de hibridização sp . Nesse estado, os pares de elétrons isolados e as ligações triplas estão dispostos de maneira linear, onde são separados por um ângulo de 180° (à direita).

hemoglobina, a histidina distal opõe-se estericamente a essa orientação preferida, de alta afinidade a CO, ao passo que ainda permite que O_2 atinja a sua orientação mais favorável. A ligação em um ângulo menos favorecido reduz a força da ligação heme-CO em cerca de 200 vezes em relação à ligação heme- O_2 (Figura 6-3, à direita). Portanto, o O_2 , que está presente em grande excesso em relação ao CO, normalmente domina. Apesar disso, cerca de 1% da mioglobina geralmente se apresenta combinada com o CO.

AS CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DE OXIGÊNIO PARA A MIOGLOBINA E PARA A HEMOGLOBINA ATENDEM ÀS SUAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

Por que a mioglobina não é apropriada como uma proteína de transporte de O_2 , mas se adapta bem para o armazenamento de O_2 ? A relação entre a concentração ou pressão parcial de O_2 (P_{O_2}) e a quantidade de O_2 ligado é expressa como uma curva isotérmica de saturação de O_2 (Figura 6-5). A curva de ligação de oxigênio à mioglobina é hiperbólica. Portanto, a mioglobina carrega prontamente o O_2 na P_{O_2} do leito capilar pulmonar (100 mmHg). Contudo, como a mioglobina libera apenas uma pequena fração de seu O_2 ligado nos valores da P_{O_2} , comumente encontrados no músculo ativo (20 mmHg) ou outros tecidos (40 mmHg), ela representa um veículo ineficaz para a liberação de O_2 . Quando o exercício extenuante reduz a P_{O_2} do tecido muscular para cerca de 5 mmHg, a dissociação de O_2 da mioglobina permite a síntese mitocondrial de ATP, e, conseqüentemente, a atividade muscular continua.

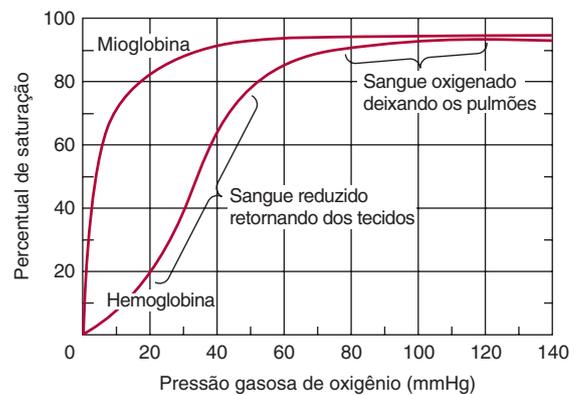


FIGURA 6-5 Curvas de ligação de oxigênio à hemoglobina e à mioglobina. A pressão de oxigênio arterial é de aproximadamente 100 mmHg; a pressão de oxigênio venoso é de cerca de 40 mmHg; a pressão de oxigênio capilar (muscular ativo) é de aproximadamente 20 mmHg; e a pressão de oxigênio mínima necessária para a citocromo-oxidase é de aproximadamente 5 mmHg. A associação das cadeias em uma estrutura tetramérica (hemoglobina) resulta em liberação muito maior de oxigênio do que seria possível com as cadeias simples. (Modificada, com permissão, de Scriver CR, et al. [editors]: *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease*, 7th ed. McGraw-Hill, 1995.)

AS PROPRIEDADES ALOSTÉRICAS DAS HEMOGLOBINAS RESULTAM DE SUAS ESTRUTURAS QUATERNÁRIAS

As propriedades das hemoglobinas individuais são consequências de suas estruturas secundária, terciária e quaternária. A estrutura quaternária da hemoglobina confere nítidas propriedades adicionais, ausentes na mioglobina monomérica, as quais a adapta aos seus papéis biológicos únicos. Além disso, as propriedades **alostéricas** da hemoglobina proporcionam um modelo para a compreensão das outras proteínas alostéricas (ver Capítulo 17).

A hemoglobina é tetramérica

As hemoglobinas são tetrâmeros compostos por pares de duas subunidades polipeptídicas diferentes (**Figura 6-6**). As letras gregas são empregadas para designar cada tipo de subunidade. As composições das subunidades das principais hemoglobinas

são $\alpha_2\beta_2$ (HbA; hemoglobina adulta normal), $\alpha_2\gamma_2$ (HbF; hemoglobina fetal), $\alpha_2\beta^s_2$ (HbS; hemoglobina falciforme) e $\alpha_2\delta_2$ (HbA₂; hemoglobina adulta menor). As estruturas primárias das cadeias β , γ e δ da hemoglobina humana são altamente conservadas.

A mioglobina e as subunidades β da hemoglobina compartilham estruturas secundárias e terciárias quase idênticas

Apesar das diferenças no tipo e na quantidade de aminoácidos presentes, a mioglobina e o polipeptídeo β da hemoglobina A possuem estruturas secundárias e terciárias quase idênticas. As semelhanças incluem a localização do heme e das regiões helicoidais, bem como a presença de aminoácidos com propriedades similares em localizações comparáveis. Embora possua sete regiões helicoidais, em vez de oito, o polipeptídeo α da hemoglobina também se assemelha muito à mioglobina.

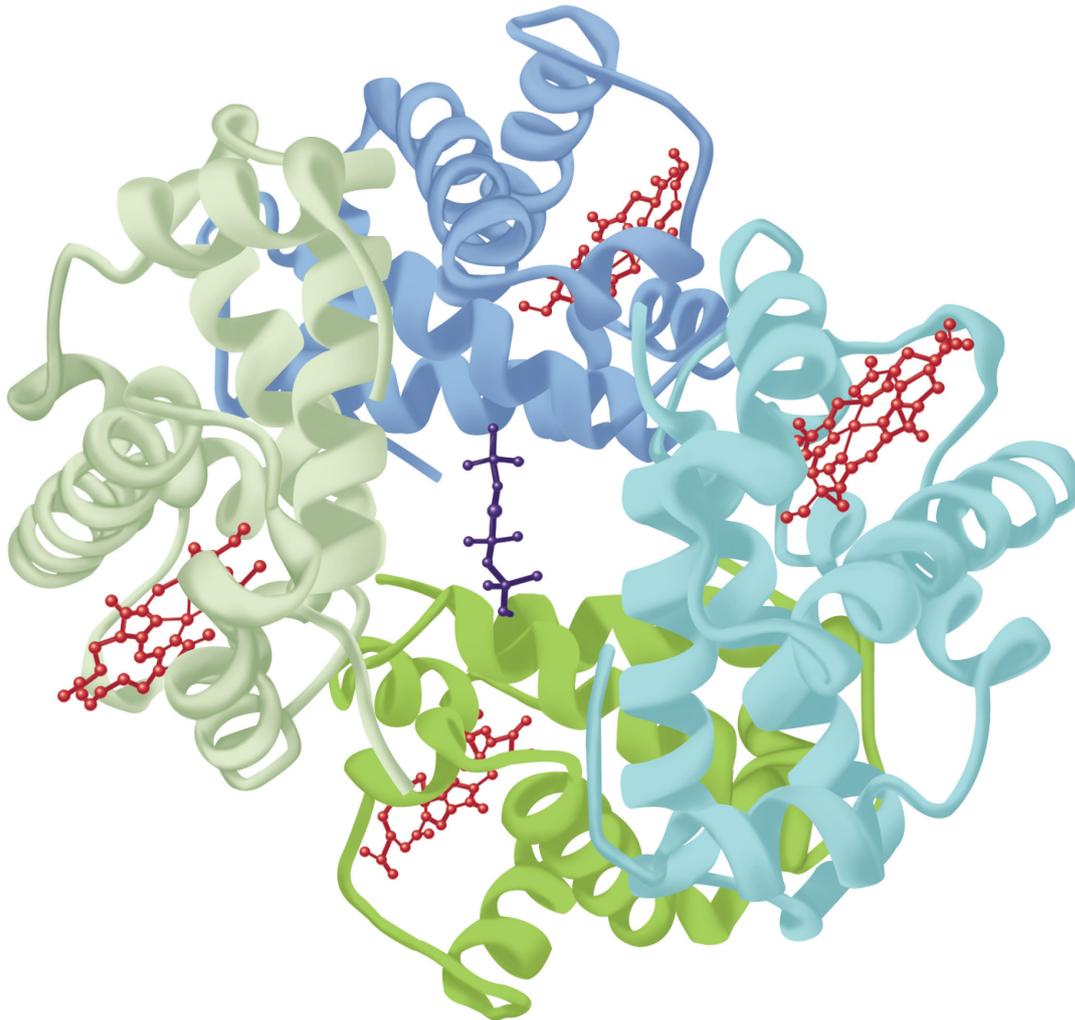


FIGURA 6-6 Hemoglobina. Está mostrada a estrutura tridimensional da desoxi-hemoglobina com uma molécula de 2,3-bisfosfoglicerato (em azul-escuro) ligada. As duas subunidades α são coloridas em tons mais escuros de verde e azul, as duas subunidades β , em tons mais claros de verde e azul, e os grupamentos prostéticos heme, em vermelho. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1b86.)

A oxigenação da hemoglobina induz as alterações conformacionais na apoproteína

As hemoglobinas ligam quatro moléculas de O₂ por tetrâmero e uma por heme. Uma molécula de O₂ liga-se a um tetrâmero da hemoglobina com maior facilidade quando outras moléculas de O₂ já estão ligadas (Figura 6-5). Denominada **ligação cooperativa**, esse fenômeno permite que a hemoglobina maximize tanto a quantidade de O₂ carregada na Po₂ dos pulmões quanto a quantidade de O₂ liberada na Po₂ dos tecidos periféricos. As interações cooperativas, uma propriedade exclusiva das proteínas *multiméricas*, são criticamente importantes para a vida aeróbia.

A P₅₀ expressa as afinidades relativas das diferentes hemoglobinas para o oxigênio

O parâmetro P₅₀, a medida da concentração de O₂, é a pressão parcial de O₂ em que uma determinada hemoglobina alcança a metade da saturação. Dependendo do organismo, a P₅₀ variará muito; porém, em todos os exemplos, ela superará a Po₂ dos tecidos periféricos. Por exemplo, os valores da P₅₀ para a HbA e a HbF são de 26 e 20 mmHg, respectivamente. Na placenta, essa diferença possibilita que a HbF extraia oxigênio da HbA do sangue materno. Contudo, a HbF é subótima no período pós-parto, pois sua elevada afinidade pelo O₂ limita a quantidade de O₂ liberada para os tecidos.

A composição de subunidades dos tetrâmeros da hemoglobina sofre alterações complexas durante o desenvolvimento. O feto humano inicialmente sintetiza o tetrâmero $\zeta_2\epsilon_2$. Ao fim do primeiro trimestre, as subunidades ζ e ϵ são substituídas pelas subunidades α e γ , formando HbF ($\alpha_2\gamma_2$), a hemoglobina da vida fetal tardia. Enquanto a síntese das subunidades β inicia no terceiro trimestre, a substituição das subunidades γ pelas subunidades β para formar HbA adulta ($\alpha_2\beta_2$) não se completa até algumas semanas após o parto (Figura 6-7).

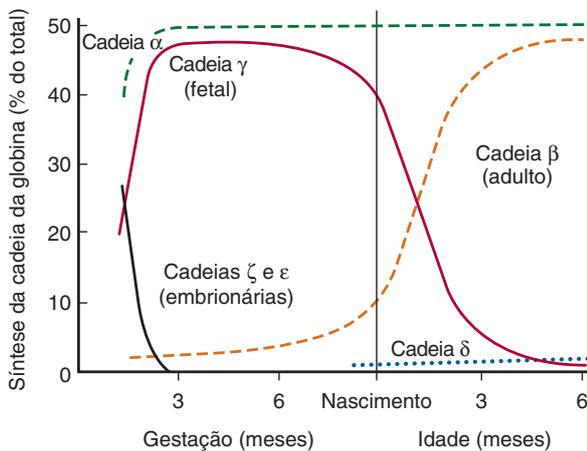


FIGURA 6-7 Padrão de desenvolvimento da estrutura quaternária das hemoglobinas fetal e neonatal. (Reproduzida, com permissão, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology*, 20th ed. McGraw-Hill, 2001.)

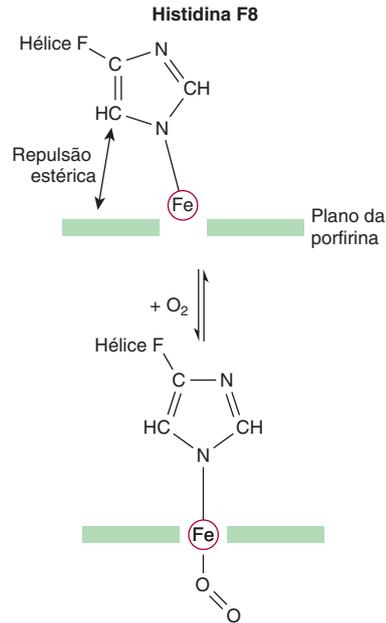


FIGURA 6-8 Na oxigenação da hemoglobina, o átomo de ferro move-se para dentro do plano do heme. A histidina F8 e seus resíduos associados são puxados juntamente com o átomo de ferro. Para uma representação desse movimento, ver <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=41>.

A oxigenação da hemoglobina é acompanhada por grandes alterações conformacionais

A ligação da primeira molécula de O₂ à desoxi-Hb desloca o ferro do heme no sentido do plano do anel do heme a partir de uma posição aproximadamente 0,04 nm além dele (Figura 6-8). Esse movimento é transmitido para a histidina proximal (F8) e para os resíduos ligados daí em diante, o que, por sua vez, provoca a ruptura das pontes salinas entre os resíduos carboxiterminais de todas as quatro subunidades. Como resultado, um par das subunidades α/β gira 15° em relação ao outro, compactando o tetrâmero (Figura 6-9). As alterações

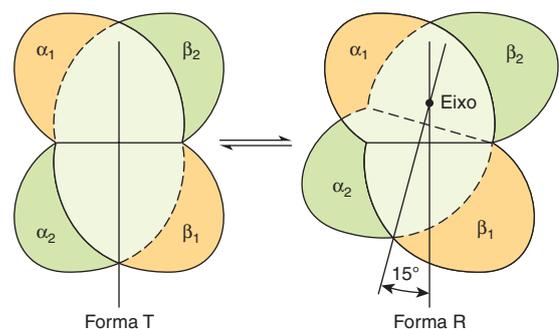


FIGURA 6-9 Durante a transição da forma T para a forma R da hemoglobina, o par de subunidades $\alpha_2\beta_2$ (em verde) gira 15° em relação ao par de subunidades $\alpha_1\beta_1$ (em amarelo). O eixo da rotação é excêntrico, sendo que o par $\alpha_2\beta_2$ também se desvia um pouco no sentido do eixo. Na representação, o par $\alpha_1\beta_1$, em amarelo é mostrado fixo, ao passo que o par de subunidades $\alpha_2\beta_2$, em verde se desloca e gira.

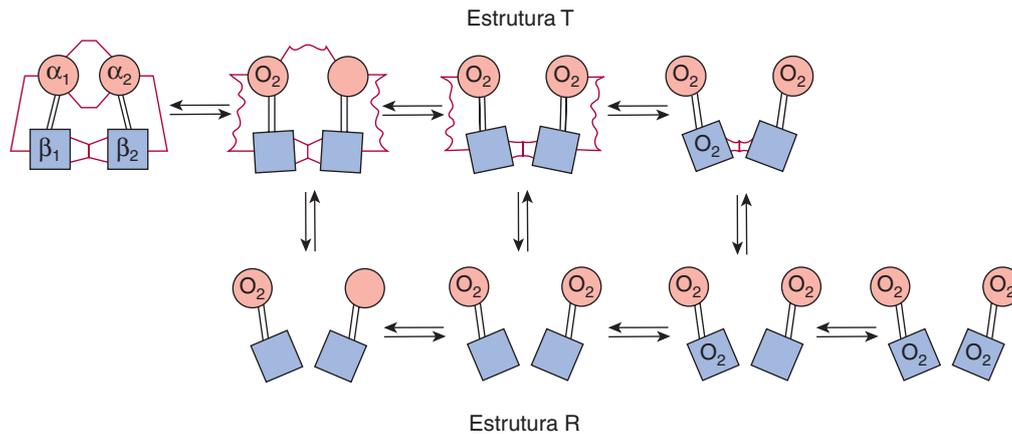
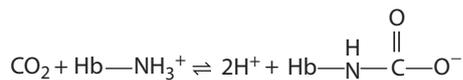


FIGURA 6-10 Transição da estrutura T para a estrutura R. Neste modelo, as pontes salinas (linhas vermelhas) que ligam as subunidades da estrutura T se quebram progressivamente à medida que o oxigênio é adicionado, sendo que as pontes salinas que ainda não foram rompidas também são progressivamente enfraquecidas (linhas vermelhas onduladas). A transição de T para R não ocorre depois que um número fixo de moléculas de oxigênio tiver se ligado, mas se torna mais provável à medida que o oxigênio se liga sucessivamente. A transição entre as duas estruturas é influenciada por prótons, dióxido de carbono, cloreto e BPG; quanto maiores forem suas concentrações, mais oxigênio deve ser ligado para induzir a transição. As moléculas totalmente oxigenadas, na estrutura T, e as moléculas totalmente desoxigenadas, na estrutura R, não são mostradas, pois são instáveis. (Modificada e redesenhada, com permissão, de Perutz MF: Hemoglobin structure and respiratory transport. Sci Am [Dec] 1978; 239:92.)

profundas nas estruturas secundária, terciária e quaternária acompanham a transição da hemoglobina induzida pelo O_2 do **estado T (tenso)**, de baixa afinidade, para o **estado R (relaxado)**, de alta afinidade. Essas alterações aumentam muito a afinidade dos hemes restantes não oxigenados pelo O_2 , pois os eventos de ligação subsequentes exigem a ruptura de menos pontes salinas (**Figura 6-10**). Os termos T e R também são utilizados para se referir às conformações de baixa e alta afinidades das enzimas alostéricas, respectivamente.

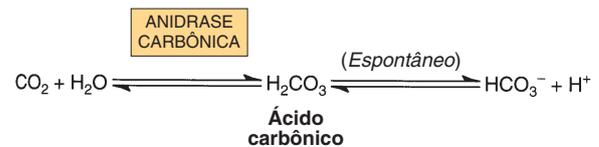
Após a liberação de O_2 nos tecidos, a hemoglobina transporta CO_2 e prótons até os pulmões

Além de transportar o O_2 dos pulmões até os tecidos periféricos, a hemoglobina transporta o CO_2 , o subproduto da respiração e os prótons dos tecidos periféricos até os pulmões. A hemoglobina carrega o CO_2 como carbamatos formados com os nitrogênios aminoterminais das cadeias polipeptídicas:



Os carbamatos mudam a carga nos terminais amino de positiva para negativa, favorecendo a formação de pontes salinas entre as cadeias α e β .

Os carbamatos da hemoglobina contribuem com aproximadamente 15% do CO_2 no sangue venoso. Grande parte do CO_2 restante é transportada como bicarbonato, que é formado nas hemácias pela hidratação do CO_2 para formar ácido carbônico (H_2CO_3), um processo catalisado pela enzima anidrase carbônica. No pH do sangue venoso, o H_2CO_3 dissocia-se em bicarbonato e em um próton.



A desoxi-hemoglobina liga um próton para cada duas moléculas de O_2 liberadas, contribuindo significativamente para a capacidade de tamponamento do sangue. O pH menor dos tecidos periféricos, ajudado pela introdução do carbamato, estabiliza o estado T e, assim, aumenta a liberação do O_2 . Nos pulmões, o processo inverte. À medida que o O_2 se liga à desoxi-hemoglobina, os prótons são liberados e combinam-se com o bicarbonato para formar ácido carbônico. A desidratação do H_2CO_3 , catalisada pela anidrase carbônica, forma CO_2 , que é exalado. Dessa maneira, a ligação do oxigênio direciona a expiração do CO_2 (**Figura 6-11**). Esse acoplamento recíproco da ligação de próton e de O_2 é denominado **efeito Bohr**. O efeito Bohr é dependente das **interações cooperativas entre os hemes do tetrâmero da hemoglobina**. Em contrapartida, a estrutura monomérica da mioglobina a impede de exibir o efeito Bohr.

Os prótons surgem pela ruptura das pontes salinas quando o O_2 se liga

Os prótons responsáveis pelo efeito Bohr surgem da ruptura de pontes salinas durante a ligação do O_2 ao estado T da hemoglobina. Nos pulmões, a conversão ao estado oxigenado R quebra as pontes salinas, envolvendo o resíduo de His 146 da cadeia β . A subsequente dissociação dos prótons da His 146 comanda a conversão do bicarbonato em ácido carbônico (**Figura 6-11**). Após a liberação do O_2 , a estrutura T e suas pontes salinas tornam a se formar. Essa alteração conformacional aumenta o pK_a dos resíduos His 146 da cadeia β , os quais ligam os prótons. Ao facilitar a reformação das pontes salinas, um

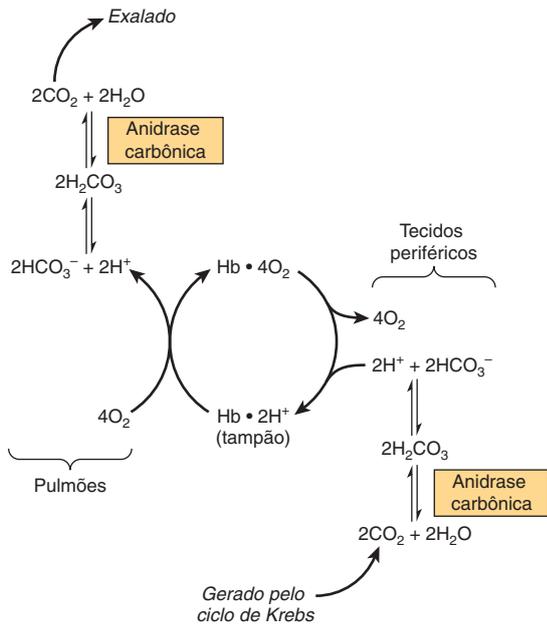


FIGURA 6-11 O efeito Bohr. O dióxido de carbono gerado nos tecidos periféricos combina-se com a água para formar o ácido carbônico, o qual se dissocia em prótons e íons bicarbonato. A desoxi-hemoglobina atua como um tampão ao se ligar aos prótons, liberando-os para os pulmões. Nos pulmões, a captação de oxigênio pela hemoglobina libera prótons, que se combinam com o íon bicarbonato, formando ácido carbônico, o qual, quando desidratado pela anidrase carbônica, transforma-se em dióxido de carbono, que é, então, exalado.

aumento na concentração de prótons estimula a liberação de O₂ a partir da hemoglobina oxigenada (estado R). Em contrapartida, um aumento na P_{O₂} promove a liberação de prótons.

O 2,3-BPG estabiliza a estrutura T da hemoglobina

A baixa P_{O₂} em tecidos periféricos promove a síntese de 2,3-bifosfoglicerato (BPG) em hemácias. O tetrâmero da hemoglobina liga-se a uma molécula de BPG na cavidade central formada por suas quatro subunidades (Figura 6-6). No entanto, o espaço entre as hélices H das cadeias β recobrando a cavidade é suficientemente amplo para acomodar o BPG apenas quando a hemoglobina está no estado T. O BPG forma pontes salinas com os grupos aminoterminais das duas cadeias β por meio de Val NA1 e com Lys EF6 e His H21 (Figura 6-12). Por conseguinte, o BPG estabiliza a hemoglobina desoxigenada (estado T) ao formar pontes salinas adicionais que devem ser rompidas antes da conversão para o estado R.

A síntese de BPG a partir do intermediário glicolítico 1,3-bifosfoglicerato é catalisada pela enzima bifuncional 2,3-bifosfoglicerato-sintase/2-fosfatase (BPGM). O BPG é hidrolisado a 3-fosfoglicerato pela atividade 2-fosfatásica da BPGM e a 2-fosfoglicerato por uma segunda enzima, a inositol-polifosfato-fosfatase múltipla (MIPP). As atividades dessas enzimas, e consequentemente o nível de BPG em hemácias, são sensíveis ao pH. Como consequência, a concentração e a ligação de BPG são influenciadas pelo, e reforçam o impacto do efeito Bohr sobre a ligação e a entrega de O₂ pela hemoglobina.

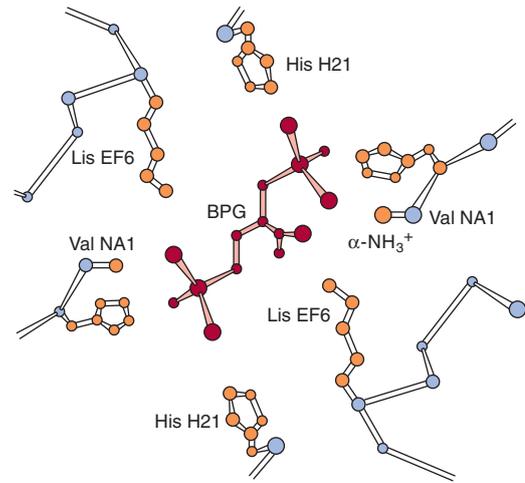


FIGURA 6-12 Modo de ligação do 2,3-bifosfoglicerato (BPG) à desoxi-hemoglobina humana. O BPG interage com três grupamentos positivamente carregados em cada cadeia β. (Baseada em Arnone A: X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. Nature 1972;237:146. Copyright © 1972. Adaptada, com permissão, de Macmillan Publishers Ltd.)

O resíduo H21 da subunidade γ da HbF é uma Ser, em vez de His. Como a Ser não pode formar uma ponte salina, o BPG liga-se mais fracamente à HbF do que à HbA. A menor estabilização conferida ao estado T pelo BPG contribui para que a HbF tenha maior afinidade pelo O₂ que a HbA.

Adaptação às altitudes elevadas

As mudanças fisiológicas que acompanham a exposição prolongada a altitudes elevadas incluem o aumento no número de hemácias, a concentração de hemoglobina dentro delas e a síntese de BPG. O BPG elevado diminui a afinidade da HbA pelo O₂ (aumenta a P₅₀), o que estimula a liberação de O₂ nos tecidos periféricos.

VÁRIAS MUTAÇÕES QUE AFETAM AS HEMOGLOBINAS HUMANAS FORAM IDENTIFICADAS

As mutações nos genes que codificam as subunidades α ou β da hemoglobina podem afetar potencialmente sua função biológica. No entanto, quase a totalidade das mais de 1.100 mutações genéticas conhecidas que afetam as hemoglobinas humanas são extremamente raras e benignas, não representando anormalidades clínicas. Quando uma mutação realmente compromete a função biológica, a condição é denominada **hemoglobinopatia**. Estima-se que mais de 7% da população mundial seja formada por portadores de distúrbios da hemoglobina. A página da internet <http://globin.cse.psu.edu/> (Globin Gene Server) fornece informações sobre – e links para – hemoglobinas normais e mutantes. Os exemplos selecionados são descritos adiante.

Metemoglobina e hemoglobina M

Na metemoglobinemia, o ferro do heme é férrico, em vez de ferroso. Dessa maneira, a metemoglobina não pode se ligar

nem transportar o O_2 . Em geral, a enzima metemoglobina-reduzase-reduz o Fe^{3+} da metemoglobina para Fe^{2+} . A metemoglobina pode surgir por meio da oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} como um efeito colateral da ação de agentes, como as sulfonamidas, sobre a hemoglobina M hereditária ou como consequência da atividade reduzida da enzima metemoglobina-reduzase.

Na hemoglobina M, a histidina F8 (His F8) é substituída pela tirosina. O ferro da HbM forma um firme complexo iônico com o ânion fenolato da tirosina que estabiliza a forma Fe^{3+} . Nas variantes da cadeia α da hemoglobina M, o equilíbrio R-T favorece o estado T. A afinidade pelo oxigênio é reduzida, e o efeito Bohr é ausente. Já as variantes da cadeia β da hemoglobina M exibem a interconversão R-T, e, conseqüentemente, o efeito Bohr está presente.

As mutações que favorecem o estado R (p. ex., na hemoglobina Chesapeake) aumentam a afinidade pelo O_2 . Essas hemoglobinas falham, portanto, em liberar o O_2 de forma adequada para os tecidos periféricos. A hipoxia tecidual resultante leva à **policitemia**, uma concentração aumentada de hemácias.

Hemoglobina S

Na HbS, o aminoácido apolar valina substitui o resíduo de superfície polar Glu6 da subunidade β , gerando uma “**área adesiva**” hidrofóbica na superfície da subunidade β tanto da oxi-HbS quanto da desoxi-HbS. A HbA e a HbS contêm uma área adesiva complementar em suas superfícies que é exposta apenas no estado T desoxigenado. Dessa forma, na Po_2 baixa, a desoxi-HbS pode polimerizar-se para formar fibras longas e insolúveis. A ligação da desoxi-HbA interrompe a polimerização das fibras, pois a HbA carece da segunda área adesiva necessária para ligar outra molécula de Hb (**Figura 6-13**). Essas fibras helicoidais torcidas distorcem a hemácia em um característico formato de foice, tornando-a vulnerável à lise nos interstícios dos sinusoides esplênicos. Elas também provocam múltiplos efeitos clínicos secundários. Uma Po_2 baixa, como aquela em altitudes elevadas, exacerba a tendência de polimerização. Os tratamentos emergentes para a anemia falciforme incluem a indução da expressão da HbF para inibir a polimerização da HbS, o transplante de células-tronco e, no futuro, a terapia gênica.

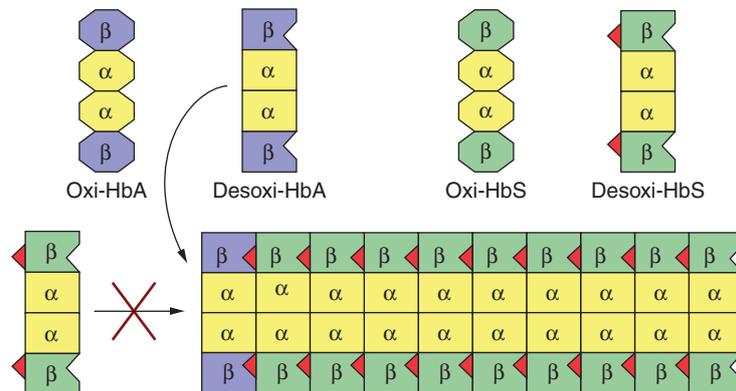


FIGURA 6-13 Polimerização da desoxi-hemoglobina S. A dissociação do oxigênio da hemoglobina S (HbS) revela uma área adesiva (triângulo vermelho) na superfície de suas subunidades β (em verde) que pode aderir a um sítio complementar nas subunidades β de outras moléculas de desoxi-HbS. A polimerização para formar um polímero fibroso é interrompida pela desoxi-HbA, cujas subunidades β (em roxo) carecem da área adesiva necessária para ligação de subunidades HbS adicionais.

IMPLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Mioglobinúria

Após uma enorme lesão por esmagamento do músculo esquelético seguido de dano renal, a mioglobina liberada pode aparecer na urina. A mioglobina pode ser detectada no plasma após um infarto do miocárdio, porém o ensaio das enzimas séricas (ver Capítulo 7) fornece um índice mais sensível da lesão miocárdica.

Anemias

As anemias, reduções no número de hemácias ou de hemoglobina no sangue, podem refletir a síntese comprometida de hemoglobina (p. ex., na deficiência de ferro; ver Capítulo 53) ou a produção comprometida de hemácias (p. ex., na deficiência de ácido fólico ou de vitamina B_{12} ; ver Capítulo 44). O diagnóstico das anemias inicia com a análise espectroscópica dos níveis de hemoglobina no sangue.

Talassemias

Os defeitos genéticos conhecidos como talassemias resultam da ausência parcial ou total de uma ou mais cadeias α ou β da hemoglobina. Mais de 750 mutações diferentes foram identificadas, porém apenas três são comuns. Tanto a cadeia α (α -talassemias) quanto a cadeia β (β -talassemias) podem ser afetadas. Um sobrescrito indica se uma subunidade está totalmente ausente (α^0 ou β^0) ou se a sua síntese está reduzida (α^- ou β^-). Excepcionalmente, o transplante de medula, o tratamento é sintomático.

Determinadas hemoglobinas mutantes são comuns em muitas populações, sendo que um paciente pode herdar mais de um tipo. Dessa maneira, os distúrbios da hemoglobina apresentam um complexo padrão de fenótipos clínicos. O emprego de sondas de DNA para seu diagnóstico é abordado no Capítulo 39.

Hemoglobina glicada (HbA_{1c})

Quando a glicose sanguínea penetra nas hemácias, ela glica o grupamento ϵ -amino dos resíduos lisil e os terminais amino da

hemoglobina. A fração da hemoglobina glicada, normalmente em torno de 5%, é proporcional à concentração de glicose no sangue. Como a meia-vida de uma hemácia é, em geral, de 60 dias, o nível da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) reflete a concentração média de glicose no sangue durante as 6 a 8 semanas anteriores. A medição da HbA_{1c} fornece, portanto, valiosas informações para o tratamento do diabetes melito.

RESUMO

- A mioglobina é monomérica; a hemoglobina é um tetrâmero de dois tipos de subunidades ($\alpha_2\beta_2$ na HbA). Embora possuam estruturas primárias distintas, a mioglobina e as subunidades da hemoglobina apresentam estruturas secundárias e terciárias quase idênticas.
- O grupamento heme, um tetrapirrol cíclico, essencialmente planar e ligeiramente enrugado, possui um Fe²⁺ central ligado a todos os quatro átomos de nitrogênio do heme, à histidina F8 e, na oxi-Mb e na oxi-Hb, também ao O₂.
- A curva de ligação de O₂ para a mioglobina é hiperbólica, mas para a hemoglobina é sigmoide, uma consequência das interações cooperativas no tetrâmero. A cooperatividade maximiza a capacidade da hemoglobina tanto para transportar O₂ na Po₂ dos pulmões quanto para liberar O₂ na Po₂ dos tecidos.
- As afinidades relativas das diferentes hemoglobinas pelo oxigênio são expressas como P₅₀, a Po₂ que as satura pela metade com O₂. As hemoglobinas saturam nas pressões parciais de seus respectivos órgãos respiratórios, como, por exemplo, os pulmões ou a placenta.
- Sobre a oxigenação da hemoglobina, o ferro e a histidina F8 movem-se em direção ao anel do heme. A variação conformacional resultante no tetrâmero da hemoglobina inclui a ruptura das pontes salinas e a perda da estrutura quaternária que facilita a ligação de um O₂ adicional.
- O 2,3-BPG na cavidade central da desoxi-Hb forma ligações salinas com as subunidades β que estabilizam a desoxi-Hb. Na oxigenação, a cavidade central se contrai, o BPG sofre extrusão e a estrutura quaternária afrouxa.
- A hemoglobina também atua no transporte de CO₂ e de prótons desde os tecidos até os pulmões. A liberação do O₂ a partir da oxi-Hb nos tecidos é acompanhada pela captação dos prótons devido à diminuição do pK_a dos resíduos de histidina.

- Na hemoglobina falciforme (HbS), a Val substitui o Glu $\beta 6$ da HbA, criando uma “área adesiva” que possui um complemento na desoxi-Hb (mas não na oxi-Hb). A desoxi-HbS polimeriza-se em baixas concentrações de O₂, formando fibras que torcem as hemácias em formato de foice.
- As α e β -talassemias são anemias que resultam da produção reduzida das subunidades α e β da HbA, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Cho J, King JS, Qian X, et al: Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5998.
- Frauenfelder H, McMahon BH, Fenimore PW: Myoglobin: The hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8615.
- Hardison RC, Chui DH, Riemer C, et al: Databases of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. *Hemoglobin* 2001;25:183.
- Lukin JA, Ho C: The structure–function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. *Chem Rev* 2004;104:1219.
- Ordway GA, Garry DJ: Myoglobin: An essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* 2004;207:3441.
- Papanikolaou E, Anagnou NP: Major challenges for gene therapy of thalassemia and sickle cell disease. *Curr Gene Ther* 2010;10:404.
- Schrier SL, Angelucci E: New strategies in the treatment of the thalassemias. *Annu Rev Med* 2005;56:157.
- Steinberg MH, Brugnara C: Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle-cell disease. *Annu Rev Med* 2003;54:89.
- Umbreit J: Methemoglobin—it’s not just blue: A concise review. *Am J Hematol* 2007;82:134.
- Weatherall DJ, Akinyanju O, Fucharoen S, et al: Inherited disorders of hemoglobin. In: *Disease Control Priorities in Developing Countries*, Jamison DT, Breman JG, Measham AR (editors). Oxford University Press and the World Bank, 2006;663–680.
- Weatherall DJ, Clegg JD: *The Thalassemia Syndromes*. Blackwell Science, 2001.
- Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, et al: The hemoglobinopathies. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 8th ed. Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors). McGraw-Hill, 2000;4571.
- Yonetani T, Laberge M: Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:1146.

Enzimas: mecanismo de ação

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Apreciar e descrever as relações estruturais entre vitaminas B específicas e certas coenzimas.
- Delinear os quatro mecanismos principais pelos quais as enzimas atingem a catálise e como esses mecanismos se combinam para a facilitar.
- Descrever o conceito de “encaixe induzido” e como ele facilita a catálise.
- Descrever os princípios dos imunoenaios ligados a enzimas.
- Descrever como o acoplamento de uma enzima à atividade de uma desidrogenase pode simplificar o ensaio da atividade de uma determinada enzima.
- Identificar as enzimas e proteínas cujos níveis plasmáticos são utilizados para o diagnóstico e o prognóstico de um infarto do miocárdio.
- Descrever a aplicação das endonucleases de restrição e dos polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição na detecção das doenças genéticas.
- Ilustrar a utilidade da mutagênese sítio-dirigida para a identificação de resíduos aminoácil envolvidos no reconhecimento de substratos ou efetores alostéricos, ou no mecanismo de catálise.
- Descrever como a adição de “caudas” de afinidade fundidas por meio da tecnologia do DNA recombinante pode facilitar a purificação de uma proteína expressa a partir de seu gene clonado.
- Indicar a função de proteases específicas na purificação por afinidade das enzimas fusionadas a uma cauda.
- Discutir os eventos que levaram à descoberta de que os RNAs podem agir como enzimas e descrever brevemente o conceito evolucionário do “mundo do RNA”.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As enzimas, que catalisam as reações químicas que tornam a vida na Terra possível, participam da quebra de nutrientes para fornecer energia e blocos químicos de construção; para a construção de proteínas, DNA, membranas, células e tecidos utilizando esses blocos químicos; e para o aproveitamento da energia para a motilidade celular, função neural e contração muscular. A grande maioria das enzimas é formada por proteínas. As exceções notáveis incluem RNAs ribossomais e algumas moléculas de RNA contendo atividade de endonuclease ou de nucleotídeo ligase, conhecidas coletivamente como ribozimas. A habilidade de detectar e quantificar a atividade de enzimas específicas no sangue, em outros tecidos ou em extratos celulares fornece informações que complementam a capacidade de diagnóstico dos médicos e de prever o prognóstico de muitas doenças. Aplicações médicas adicionais incluem mudanças nas quantidades ou na atividade catalítica de

enzimas fundamentais que podem resultar de defeitos genéticos, deficiências nutricionais, dano tecidual, toxinas ou infecções por patógenos virais ou bacterianos (p. ex., *Vibrio cholerae*). Os cientistas médicos abordam as alterações na atividade enzimática ao usar agentes farmacológicos para inibir enzimas específicas e estão investigando a terapia gênica como um meio para remediar os déficits no nível ou na função da enzima.

Além de servirem como catalisadores para todos os processos metabólicos, sua impressionante atividade catalítica, especificidade pelo substrato e estereoespecificidade capacitam as enzimas a preencher os papéis principais em outros processos relacionados com a saúde e o bem-estar do ser humano. As proteases e amilases aumentam a capacidade de detergentes em remover sujeiras e manchas, e as enzimas desempenham papéis importantes em produzir ou aumentar o valor nutricional de produtos alimentícios para seres humanos e animais. Por exemplo, a protease renina é utilizada na produção de queijos, ao passo que a lactase é empregada para remover

a lactose do leite para o benefício de pessoas intolerantes à lactose por apresentarem deficiência dessa enzima hidrolítica. Finalmente, enzimas estereoespecíficas podem ser de valor especial na biossíntese de fármacos complexos ou antibióticos.

AS ENZIMAS SÃO CATALISADORES EFETIVOS E ALTAMENTE ESPECÍFICOS

As enzimas que catalisam a conversão de um ou mais compostos (**substratos**) em um ou mais compostos diferentes (**produtos**) geralmente aumentam a velocidade das reações não catalisadas correspondentes por um fator de 10^6 ou mais. Como todos os catalisadores, as enzimas não são consumidas nem alteradas *permanentemente*, como consequência de sua participação em uma reação. Além de serem muito eficientes, as enzimas também são extremamente *seletivas*. Ao contrário da maioria dos catalisadores utilizados na química sintética, as enzimas são específicas não apenas para o tipo de reação catalisada, mas também para um único substrato ou para um pequeno grupo de substratos intimamente relacionados. As enzimas também são catalisadores estereoespecíficos e catalisam, em geral, as reações de apenas um estereoisômero de um determinado composto – por exemplo, os D-açúcares, mas não os L-açúcares; os L-aminoácidos, mas não os D-aminoácidos. Uma vez que elas ligam os substratos através de pelos menos “três pontos de acoplamento”, as enzimas também podem produzir produtos quirais a partir de substratos não quirais. O desenho na **Figura 7-1** ilustra por que a redução catalisada por enzima de um substrato não quiral, o piruvato, pode produzir exclusivamente L-lactato, não uma mistura racêmica de D-lactato e L-lactato. A excelente especificidade dos catalisadores enzimáticos confere às células vivas a capacidade de conduzir simultaneamente e controlar de maneira independente um amplo espectro de processos químicos.

AS ENZIMAS SÃO CLASSIFICADAS PELO TIPO DE REAÇÃO

Alguns dos nomes das enzimas primeiramente descritas nos primórdios da bioquímica persistem em uso até hoje. Exemplos incluem a pepsina, a tripsina e a amilase. No entanto, na maioria dos casos, os primeiros bioquímicos designavam as enzimas

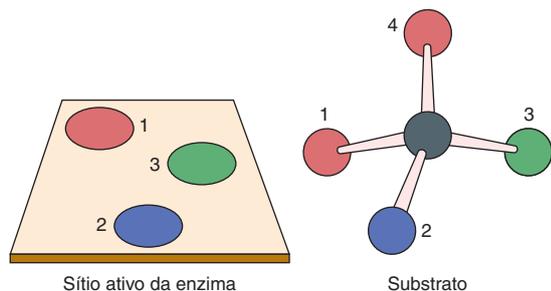


FIGURA 7-1 Representação planar do “acoplamento de três pontos” de um substrato ao sítio ativo de uma enzima. Embora os átomos 1 e 4 sejam idênticos, quando os átomos 2 e 3 se ligam aos sítios complementares na enzima, apenas o átomo 1 pode se ligar. Uma vez ligados a uma enzima, os átomos aparentemente idênticos podem ser então diferenciáveis, permitindo uma alteração química estereoespecífica.

recém-descobertas adicionando o sufixo *-ase* a uma descrição do tipo de reação catalisada. Por exemplo, as enzimas que removem átomos de hidrogênio são geralmente chamadas de desidrogenases, as enzimas que hidrolisam proteínas, de proteases, e as enzimas que catalisam rearranjos em configurações, de isomerases. O processo de dar nomes às enzimas era finalizado precedendo essas descrições gerais com termos indicando o substrato sobre o qual a enzima age (*xantina-oxidase*), a sua fonte (ribonuclease *pancreática*), o seu modo de regulação (lipase *sensível a hormônio*) ou uma característica específica de seu mecanismo de ação (*cisteína protease*). Quando necessário, são acrescentados designadores alfanuméricos para identificar as múltiplas formas de uma enzima (p. ex., RNA-polimerase *III*; proteína-cinase $C\beta$).

Embora simples e direta, à medida que outras enzimas foram descobertas, essas convenções de nomenclatura resultaram, cada vez mais, no aparecimento de vários nomes para a mesma enzima e na duplicação do nome de enzimas que exibem capacidades catalíticas semelhantes. Para abordar essas ambiguidades, a International Union of Biochemistry (IUB) desenvolveu um sistema inequívoco de nomenclatura das enzimas, no qual cada enzima possui um nome próprio e um número de código que identificam o *tipo* da reação catalisada e os *substratos* envolvidos. As enzimas são agrupadas nas seis classes a seguir.

1. **Oxidorrredutases** – enzimas que catalisam oxidações e reduções.
2. **Transferases** – enzimas que catalisam a transferência de moléculas como os grupamentos glicosil, metil ou fosforil.
3. **Hidrolases** – enzimas que catalisam a clivagem *hidrolítica* de ligações C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes.
4. **Liases** – enzimas que catalisam a clivagem de ligações C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes por meio da *eliminação de átomo*, gerando duplas ligações.
5. **Isomerases** – enzimas que catalisam alterações geométricas ou estruturais *dentro* de uma molécula.
6. **Ligases** – enzimas que catalisam a união (ligação) de duas moléculas nas reações acopladas à hidrólise do ATP.

O nome IUB da hexocinase é ATP:D-hexose-6-fosfotransferase E.C. 2.7.1.1. Esse nome identifica a hexocinase como um membro da classe 2 (transferases), subclasse 7 (transferência de um grupamento fosforil), subsubclasse 1 (o álcool é oceptor do fosforil) e “hexose-6” indica que o álcool fosforilado está no carbono 6 de uma hexose. Apesar de sua clareza, os nomes IUB são compridos e relativamente complicados, por isso, em geral, o nome tradicional da hexocinase e de muitas outras enzimas continuam a ser utilizados, ainda que, às vezes, os nomes sejam ambíguos. Por outro lado, os números E.C. são particularmente úteis para diferenciar enzimas com funções ou atividades catalíticas similares, como ilustrado pela sua utilização nos capítulos da Seção VI.

GRUPAMENTOS PROSTÉTICOS, COFATORES E COENZIMAS EXERCEM PAPÉIS IMPORTANTES NA CATÁLISE

Muitas enzimas contêm pequenas moléculas ou íons metálicos que participam diretamente da ligação ao substrato ou da

catálise. Denominados **grupamentos prostéticos, cofatores e coenzimas**, eles aumentam o repertório de capacidades catalíticas além das conferidas pelo número limitado de grupamentos funcionais presentes nas cadeias laterais aminoácil dos peptídeos.

Os grupamentos prostéticos estão firmemente integrados na estrutura de uma enzima

Os grupamentos prostéticos estão incorporados de maneira firme e estável na estrutura de uma proteína por meio de forças covalentes ou não covalentes. Exemplos incluem piridoxal-fosfato, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tiamina-pirofosfato e biotina. Os íons metálicos constituem o tipo mais comum de grupo prostético. Cerca de um terço de todas as enzimas que contêm Fe, Co, Cu, Mg, Mn e Zn ligados firmemente é chamado de **metaloenzimas**. Os íons metálicos que participam em reações redox geralmente são complexados a grupamentos prostéticos, como heme (Capítulos 6 e 31) ou centros ferro-enzofre (Capítulo 12). Os metais também podem facilitar a ligação e a orientação dos substratos, a formação de ligações covalentes com intermediários da reação (Co^{2+} na coenzima B_{12} , ver Capítulo 44) ou por atuarem como bases ou ácidos de Lewis para tornar os substratos mais **eletrofílicos** (pobres em elétrons) ou **nucleofílicos** (ricos em elétrons) e, por isso, mais reativos.

Os cofatores associam-se de maneira reversível a enzimas ou substratos

Os **cofatores** podem se associar diretamente à enzima ou na forma de um complexo cofator-substrato. Ao mesmo tempo que os cofatores desempenham funções semelhantes às dos grupamentos prostéticos, eles ligam-se de forma transitória e dissociável. Conseqüentemente, ao contrário dos grupamentos prostéticos associados, os cofatores devem estar presentes no meio que circunda a enzima para que a catálise ocorra. Os cofatores mais comuns também são íons metálicos. As enzimas que requerem um íon metálico como cofator são denominadas **enzimas ativadas por metal** para diferenciá-las das **metaloenzimas**, para as quais os íons metálicos servem como grupamentos prostéticos.

Muitas coenzimas, cofatores e grupamentos prostéticos são derivados das vitaminas B

As vitaminas B hidrossolúveis fornecem importantes componentes de inúmeras coenzimas. A **nicotinamida** é um componente das coenzimas redox NAD e NADP (Figura 7-2), ao passo que a **riboflavina** é um componente das coenzimas redox FMN e FAD. O **ácido pantotênico** é um componente do carreador de grupo acil, a **coenzima A**. Como o seu pirofosfato, a **tiamina** participa na descarboxilação de α -cetoácidos, e as coenzimas **ácido fólico** e **cobamida** atuam no metabolismo de um átomo de carbono. Além disso, várias coenzimas contêm porções adenina, ribose e fosforil de AMP ou ADP (Figura 7-2).

As coenzimas servem como transportadores de substrato

As **coenzimas** atuam como transportadores recicláveis que conduzem muitos substratos de um ponto a outro dentro da

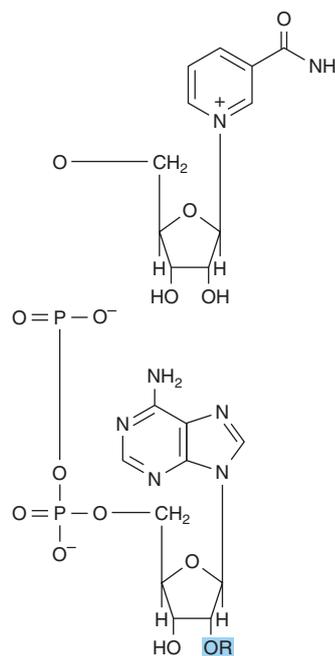


FIGURA 7-2 Estrutura de NAD⁺ e NADP⁺. Para NAD⁺, OR = —OH. Para NADP⁺, OR = —OPO₃²⁻.

célula. A função desses transportadores é dupla. Primeiro, eles estabilizam espécies como átomos de hidrogênio (FADH) ou íons hidreto (NADH) que são muito reativos para persistir durante qualquer tempo significativo na presença de água ou moléculas orgânicas que permeiam células. Segundo, eles servem como um adaptador ou uma alavanca que facilita o reconhecimento e a ligação de pequenos grupos químicos, como acetato (coenzima A) ou glicose (UDP), por suas enzimas-alvo. Outras moléculas químicas transportadas pelas coenzimas incluem os grupamentos metil (folatos) e os oligossacarídeos (dolicol).

A CATÁLISE OCORRE NO SÍTIO ATIVO

Uma importante visão do início do século XX sobre a catálise enzimática veio da observação de que a presença de substratos torna as enzimas mais resistentes aos efeitos desnaturantes das temperaturas elevadas. Essa observação levou Emil Fischer a propor que as enzimas e seus substratos interagem para formar um complexo enzima-substrato (ES), cuja estabilidade térmica era maior que a da própria enzima. Essa percepção modelou profundamente nossa compreensão da natureza química e do comportamento cinético da catálise enzimática.

Fischer argumentou que a especificidade extremamente alta com que essas enzimas discriminam seus substratos quando formam um complexo ES era análoga à maneira como uma fechadura mecânica distingue a chave apropriada. A analogia com enzimas é que a “fechadura” é formada por uma fenda ou bolso na superfície da enzima, chamado de **sítio ativo** (Figuras 5-6 e 5-8). Como está implícito no adjetivo “ativo”, o sítio ativo é muito mais do que simplesmente um sítio de reconhecimento para a ligação de substratos; ele fornece o ambiente onde a transformação química ocorre. Dentro do sítio ativo, os substratos são colocados em estreita proximidade um com

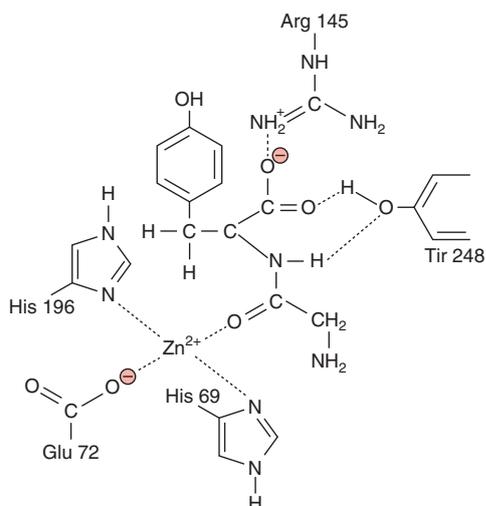


FIGURA 7-3 Representação bidimensional de um substrato dipeptídico, a glicil-tirosina, ligado dentro do sítio ativo da carboxipeptidase A.

o outro, em alinhamento ideal com os cofatores, grupamentos prostéticos e cadeias laterais de aminoácidos que participam da catálise da transformação de substratos em produtos (Figura 7-3). A catálise é adicionalmente estimulada pela capacidade de o sítio ativo proteger os substratos contra a água e produzir um ambiente cuja polaridade, hidrofobicidade, acidez ou alcalinidade podem diferir muito da do citoplasma adjacente.

AS ENZIMAS EMPREGAM MÚLTIPLOS MECANISMOS PARA FACILITAR A CATÁLISE

As enzimas utilizam uma combinação de quatro mecanismos gerais para conseguir melhorias significativas das taxas das reações químicas.

Catálise por proximidade

Para que as moléculas reajam, elas devem estar em uma distância que possibilite a formação da ligação. Quanto maior as suas concentrações, maior é a frequência com que elas irão “se encontrar” e maior será a velocidade de suas reações. Quando uma enzima liga moléculas de substrato ao seu sítio ativo, ela cria uma região de alta concentração de substrato no local, de forma que as moléculas de substrato são orientadas na posição ideal para interagirem quimicamente. Isso resulta em melhorias da taxa de pelo menos mil vezes sobre a mesma reação não catalisada enzimaticamente.

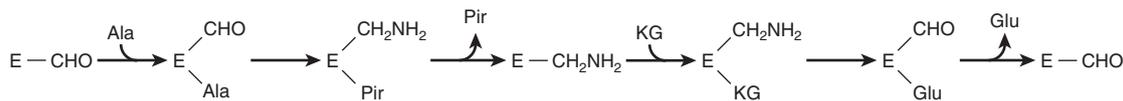


FIGURA 7-4 Mecanismo em “pingue-pongue” para a transaminação. E—CHO e E—CH₂NH₂ representam os complexos enzima-piridoxal-fosfato e enzima-piridoxamina, respectivamente. (Ala, alanina; Glu, glutamato; KG, α-cetoglutarato; Pir, piruvato.)

Catálise acidobásica

Além de contribuir para a habilidade de o sítio ativo ligar substratos, os grupamentos funcionais ionizáveis das cadeias laterais aminoácil e os grupamentos prostéticos, quando presentes, podem contribuir para a catálise ao atuarem como ácidos ou bases. Distinguem-se dois tipos de catálise acidobásica. A **catálise específica ácida ou básica** refere-se a reações para as quais os únicos *participantes* ácidos ou básicos são prótons ou íons hidróxidos. A taxa de reação, então, é sensível à variação na concentração de prótons ou íons hidróxidos, mas é *independente* da concentração de outros ácidos (doadores de prótons) ou bases (aceptores de prótons) presentes na solução ou no sítio ativo. Diz-se que as reações cujas velocidades são responsáveis a *todos* os ácidos ou bases presentes estão sujeitas à **catálise ácida geral** ou à **catálise básica geral**.

Catálise por tensão

As enzimas que catalisam reações *líticas*, transformações químicas que envolvem quebra de uma ligação covalente, geralmente ligam seus substratos em uma conformação um tanto desfavorável para a ligação-alvo de clivagem. Essa conformação imita a do **estado intermediário de transição**, uma espécie transitória que representa o estado de transição, ou o ponto intermediário na transformação de substratos em produtos. A tensão resultante estira ou distorce a ligação-alvo, enfraquecendo-a e tornando-a mais vulnerável à clivagem. O detentor do Prêmio Nobel Linus Pauling foi o primeiro a sugerir um papel para a **estabilização do estado de transição** como um mecanismo geral pelo qual as enzimas aceleram as velocidades das reações químicas. O conhecimento do estado de transição de uma reação catalisada por enzima é frequentemente explorado pelos químicos para idealizar e criar inibidores mais efetivos das enzimas, chamados de **análogos do estado de transição**, como farmacóforos potenciais.

Catálise covalente

O processo da **catálise covalente** envolve a formação de uma ligação covalente entre a enzima e um ou mais substratos. A enzima modificada, então, torna-se um reagente. A catálise covalente introduz uma nova reação, cuja energia de ativação é menor – e, portanto, a reação é mais rápida – que a trajetória da reação em solução homogênea. O estado da enzima quimicamente modificada é, no entanto, transitório. Ao término da reação a enzima retorna ao seu estado original não modificado. Dessa maneira, a sua função de catálise permanece. A catálise covalente é particularmente comum entre as enzimas que catalisam as **reações de transferência de grupamento**. Os resíduos na enzima que participam na catálise covalente geralmente são a cisteína ou a serina e, ocasionalmente, a histidina. Com frequência, a catálise covalente segue um mecanismo de “pingue-pongue”, em que o primeiro substrato é ligado e seu produto é liberado antes da ligação do segundo substrato (Figura 7-4).

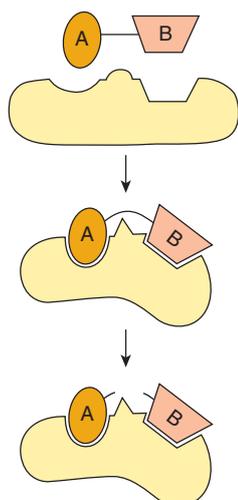


FIGURA 7-5 Representação bidimensional do modelo de ajuste induzido de Koshland do sítio ativo de uma liase. A ligação do substrato A—B induz alterações conformacionais na enzima que alinham os resíduos catalíticos que participam da catálise e tensionam a ligação entre A e B, facilitando sua clivagem.

OS SUBSTRATOS INDUZEM MUDANÇAS CONFORMACIONAIS NAS ENZIMAS

Embora o “modelo chave e fechadura” de Fischer tenha respondido pela excelente especificidade das interações enzima-substrato, a rigidez implícita do sítio ativo da enzima não explica as mudanças dinâmicas que acompanham a ligação do substrato e a catálise. Esse obstáculo foi abordado pelo **modelo de ajuste induzido** de Daniel Koshland, o qual diz que, quando os substratos se aproximam e se ligam a uma enzima, eles induzem uma alteração conformacional análoga a colocar uma mão (substrato) em uma luva (enzima) (**Figura 7-5**). A enzima, por sua vez, induz alterações recíprocas em seus substratos, mantendo a energia de ligação para facilitar a transformação dos substratos em produtos. O modelo de ajuste induzido foi amplamente confirmado por estudos biofísicos da movimentação da enzima durante a ligação com o substrato.

A PROTEASE DO HIV ILUSTRA A CATÁLISE ACIDOBÁSICA

As enzimas da **família da aspartato protease**, que inclui a enzima digestória pepsina, as catepsinas lisossomais e a protease produzida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), compartilham um mecanismo comum que emprega dois resíduos aspartil conservados como catalisadores acidobásicos. No primeiro estágio da reação, um aspartato agindo como uma base geral (Asp X, **Figura 7-6**) extrai um próton de uma molécula de água, tornando-a mais nucleofílica. O nucleófilo resultante ataca, em seguida, o carbono da carbonila eletrofílica da ligação peptídica direcionada à hidrólise, formando um **estado de transição intermediário tetraédrico**. Um segundo aspartato (Asp Y, **Figura 7-6**) facilita, então, a decomposição desse intermediário tetraédrico ao doar um próton para o grupamento amino

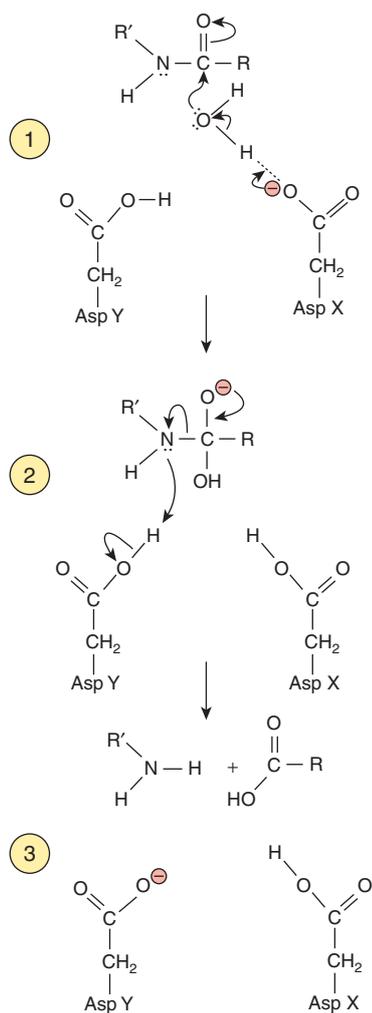


FIGURA 7-6 Mecanismo catalítico de uma aspartato protease como a protease do HIV. As setas curvas indicam as direções do movimento do elétron. ① O aspartato X age como uma base para ativar uma molécula de água ao abstrair um próton. ② A molécula de água ativada ataca a ligação peptídica, formando um intermediário tetraédrico transitório. ③ O aspartato Y age como um ácido para facilitar a clivagem do intermediário tetraédrico e para liberar os produtos de degradação ao doar um próton para o grupamento amino recentemente formado. O transporte subsequente do próton de Asp X para Asp Y restaura a protease ao seu estado inicial.

através da ruptura da ligação peptídica. Os aspartatos de dois sítios ativos diferentes podem atuar simultaneamente como uma base geral ou como um ácido geral, pois seu ambiente adjacente favorece a ionização de um, mas não do outro.

A QUIMIOTRIPSINA E A FRUTOSE-2,6-BIFOSFATO ILUSTRAM A CATÁLISE COVALENTE

Quimiotripsina

Enquanto a catálise pelas enzimas aspartato proteases envolve o ataque hidrolítico direto da água a uma ligação peptídica, a catálise pela **serina protease** quimiotripsina envolve a formação prévia de um intermediário acil-enzima covalente. Um resíduo

de serina conservado, a serina 195, é ativada por meio de interações com a histidina 57 e o aspartato 102. Embora esses três resíduos estejam muito distantes na estrutura primária, no sítio ativo da proteína madura dobrada, eles estão dentro da distância de formação de ligação entre si. Alinhado na ordem Asp 102-His 57-Ser 195, esse trio forma uma **rede de retransmissão de carga** associada que atua como um “transportador de prótons”.

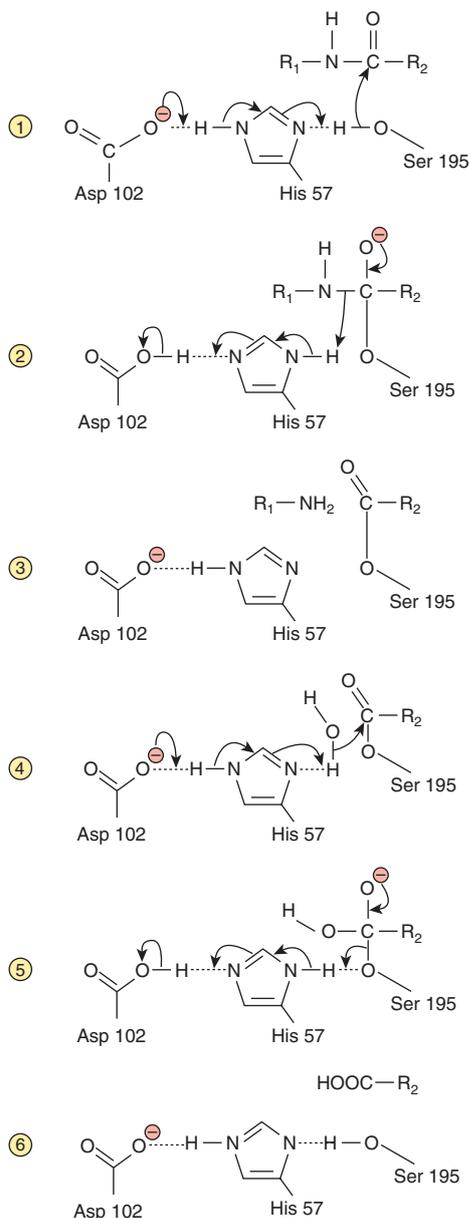


FIGURA 7-7 **Catálise por quimiotripsina.** ① O sistema de retransmissão de carga remove um próton da Ser 195, tornando-a um nucleófilo mais forte. ② A Ser 195 ativada ataca a ligação peptídica, formando um intermediário tetraédrico transitório. ③ A liberação do peptídeo aminoterminal é facilitada pela doação de um próton para o grupamento amino recentemente formado pela His 57 do sistema de retransmissão de carga, gerando um intermediário acil-Ser 195. ④ A His 57 e o Asp 102 colaboram para ativar uma molécula de água, a qual ataca o acil-Ser 195, formando um segundo intermediário tetraédrico. ⑤ O sistema de retransmissão de carga doa um próton para a Ser 195, facilitando a quebra do intermediário tetraédrico para liberar o peptídeo carboxiterminal ⑥.

A ligação do substrato inicia o deslocamento de prótons que efetivamente transferem o próton da hidroxila da Ser 195 para o Asp 102 (**Figura 7-7**). A nucleofilicidade aumentada do oxigênio da serina facilita seu ataque sobre o carbono da carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um **intermediário acil-enzima** covalente. O próton no Asp 102 move-se através da His 57 até o grupamento amino liberado quando a ligação peptídica é clivada. A porção do peptídeo original com um grupamento amino livre deixa o sítio ativo e é substituída por uma molécula de água. A rede de retransmissão de carga ativa a molécula de água ao retirar um próton por intermédio da His 57 para o Asp 102. O íon hidróxido resultante ataca o intermediário acil-enzima, e um transportador de próton reverso devolve um próton para a Ser 195, restaurando seu estado original. Embora modificada durante o processo de catálise, a quimiotripsina emerge inalterada ao término da reação. As proteases tripsina e elastase empregam um mecanismo catalítico similar, mas o número de resíduos em seu transportador de prótons Ser-His-Asp é diferente.

Frutose-2,6-bifosfatase

A frutose-2,6-bifosfatase, uma enzima reguladora da gliconeogênese (ver Capítulo 19), catalisa a liberação hidrolítica do fosfato do carbono 2 da frutose-2,6-bifosfato. A **Figura 7-8**

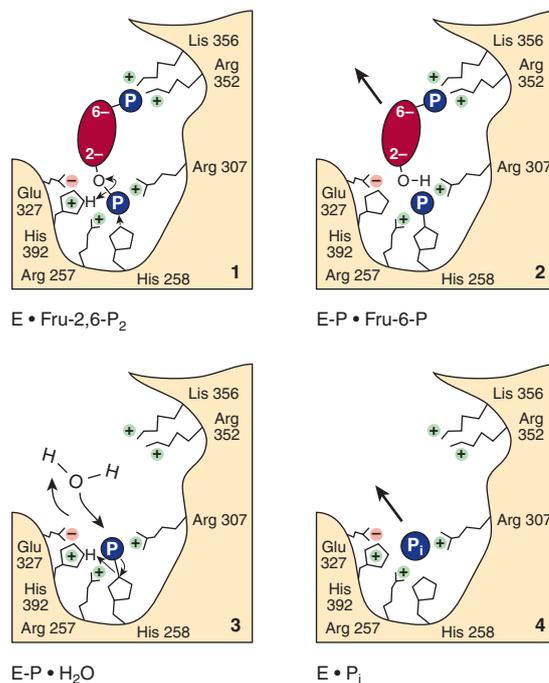


FIGURA 7-8 **Catálise pela frutose-2,6-bifosfatase.** (1) A Lis 356 e as Arg 257, 307 e 352 estabilizam a carga negativa quádrupla do substrato por meio de interações entre cargas. O Glu 327 estabiliza a carga positiva em His 392. (2) O nucleófilo His 392 ataca o grupamento fosforil C-2 e o transfere para a His 258, formando um intermediário fosforil-enzima. A frutose-6-fosfato deixa a enzima. (3) O ataque nucleofílico por uma molécula de água, possivelmente auxiliado pelo Glu 327 atuando como uma base, forma o fosfato inorgânico. (4) O ortofosfato inorgânico é liberado da Arg 257 e da Arg 307. (Reproduzida, com permissão, de Pilkis SJ, et al.: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. Annu Rev Biochem 1995;64:799. © 1995 por Annual Reviews, www.annualreviews.org.)

TABELA 7-1 Sequências de aminoácidos na vizinhança de sítios catalíticos de algumas proteases bovinas

Enzima	Sequência ao redor da serina (S)	Sequência ao redor da histidina (H)
Tripsina	D S C Q D G S G G P V V C S G	K V V S A A H C Y K S G
Quimiotripsina A	S S C M G D S G G P L V C K K	N V V T A A H G G V T T
Quimiotripsina B	S S C M G D S G G P L V C Q K	N V V T A A H C G V T T
Trombina	D A C E G D S G G P F V M K S	P V L T A A H C L L Y P

Nota: as regiões mostradas são aquelas em cada lado dos resíduos seril S e histidil H do sítio catalítico.

ilustra os papéis de sete resíduos do sítio ativo. A catálise envolve uma “tríade catalítica” de um resíduo Glu e duas His e um intermediário fosfo-histidil covalente.

OS RESÍDUOS CATALÍTICOS SÃO ALTAMENTE CONSERVADOS

Os membros de uma família de enzimas como as aspartatos ou serinas proteases empregam um mecanismo similar para catalisar um tipo de reação comum, mas agem sobre diferentes substratos. A maioria das famílias de enzimas parece ter surgido por meio de eventos de duplicação gênica que criaram uma segunda cópia do gene que codifica uma determinada enzima. Os dois genes, e conseqüentemente suas proteínas codificadas, podem então evoluir de maneira independente, formando **homólogos** divergentes que reconhecem substratos diferentes. O resultado é exemplificado pela quimiotripsina, que cliva ligações peptídicas do lado carboxiterminal de grandes aminoácidos hidrofóbicos, e pela tripsina, que cliva ligações peptídicas no lado carboxiterminal de aminoácidos básicos. Diz-se que as proteínas que se originam de um ancestral comum são **homólogas** entre si. O ancestral comum de enzimas pode ser deduzido a partir da presença de aminoácidos específicos na mesma posição em cada membro da família. Esses resíduos são chamados de **resíduos conservados**. A Tabela 7-1 mostra a conservação estrutural primária de dois componentes da rede de retransmissão de carga para diversas serinas proteases. Entre os resíduos mais altamente conservados, estão os que participam diretamente da catálise.

AS ISOENZIMAS SÃO FORMAS ENZIMÁTICAS DISTINTAS QUE CATALISAM A MESMA REAÇÃO

Com frequência, os organismos superiores elaboram diversas versões fisicamente distintas de uma determinada enzima, e cada uma delas catalisa a mesma reação. Como os membros de outras famílias de proteínas, essas proteínas catalisadoras, ou **isoenzimas**, originam-se por meio da duplicação do gene. Enquanto as proteases descritas anteriormente possuem substratos diferentes, as isoenzimas podem ter diferenças sutis em propriedades, como sensibilidade a determinados fatores reguladores (ver Capítulo 9) ou afinidade ao substrato (p. ex., a hexocinase e a glicocinase) que as adapta a tecidos ou circunstâncias específicas, em vez de especificidades a substratos

distintos. As isoenzimas que catalisam reações idênticas também podem aumentar a sobrevivência, fornecendo uma “cópia de segurança” de uma enzima essencial.

A ATIVIDADE CATALÍTICA DE ENZIMAS FACILITA SUA DETECÇÃO

As quantidades relativamente pequenas das enzimas presentes nas células complicam a determinação de sua presença e concentração. No entanto, a amplificação conferida por sua capacidade de transformar rapidamente milhares de moléculas de um substrato específico em produtos confere a cada enzima a capacidade de revelar sua presença. Os ensaios de atividade catalítica das enzimas são, muitas vezes, utilizados nos laboratórios clínicos e na pesquisa. Sob determinadas circunstâncias (ver Capítulo 8), a velocidade da reação catalítica que está sendo monitorada é proporcional à quantidade da enzima existente, o que permite a dedução da sua concentração.

Enzimologia de molécula única

A sensibilidade limitada dos ensaios enzimáticos tradicionais exige a utilização de um grande grupo, ou conjunto, de moléculas da enzima, a fim de produzir quantidades mensuráveis do produto. Portanto, os dados obtidos refletem a atividade *média* de enzimas individuais ao longo de múltiplos ciclos catalíticos. Recentes avanços na **nanotecnologia** possibilitaram a observação, na maioria das vezes por microscopia de fluorescência, de eventos catalíticos envolvendo moléculas de substrato e enzimas individuais. Conseqüentemente, os cientistas agora podem medir a velocidade de eventos catalíticos únicos e, algumas vezes, as etapas individuais da catálise por um processo chamado de **enzimologia de molécula única**. Um exemplo desse processo está ilustrado na Figura 7-9.

A descoberta de fármacos requer ensaios enzimáticos adequados para a triagem automatizada de alto rendimento

As enzimas constituem uma das principais classes de biomoléculas direcionadas para o desenvolvimento de fármacos e de outros agentes terapêuticos. Por exemplo, muitos antibióticos inibem enzimas que são específicas de patógenos microbianos. A descoberta de novos fármacos é muito facilitada quando um grande número de farmacóforos em potencial pode ser examinado de maneira rápida e automatizada – um processo referido como **triagem de alto rendimento** (HTS, do inglês,

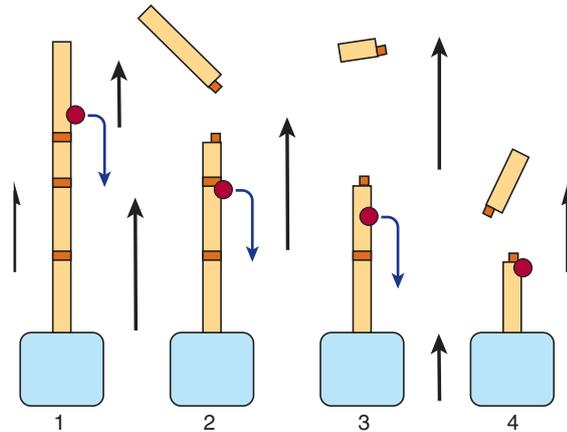


FIGURA 7-9 Observação direta de eventos de clivagem de DNA isolados catalisados por uma endonuclease de restrição.

As moléculas do DNA imobilizadas por esferas (em azul) são colocadas em um fluxo corrente de tampão (setas pretas), o que as faz assumir uma conformação estendida. A clivagem em um dos sítios de restrição (em cor de laranja) por uma endonuclease leva a um encurtamento da molécula de DNA, o que pode ser observado diretamente em um microscópio desde que as bases de nucleotídeo no DNA sejam fluorescentes. Mesmo que a endonuclease (em vermelho) não fluoresça e, por isso, seja invisível, a maneira progressiva como a molécula de DNA é encurtada (1 → 4) revela que a endonuclease se liga à extremidade livre da molécula de DNA e se movimenta ao longo dela de um sítio para outro.

high-throughput screening). A HTS tira proveito da robótica, da óptica, do processamento de dados e de microfluidos para conduzir e analisar milhares de ensaios da atividade de uma determinada enzima simultaneamente. Os dispositivos de HTS mais comumente utilizados empregam volumes de 4 a 100 μL em placas plásticas com 96, 384 ou 1.536 poços e um equipamento totalmente automatizado capaz de dispensar substratos, coenzimas, enzimas e inibidores em potencial em uma multiplicidade de combinações e concentrações. A HTS é ideal para a pesquisa dos inúmeros produtos de **química combinatoria**, a síntese simultânea de grandes bibliotecas de compostos químicos que contêm todas as possíveis combinações de um conjunto de precursores químicos. Os ensaios enzimáticos que geram produtos cromogênicos ou fluorogênicos são ideais, já que os detectores ópticos são facilmente manipulados para permitir a análise rápida de muitas amostras, frequentemente em tempo real. Conforme descrito no Capítulo 8, o uso principal é a análise de compostos inibidores, com potencial final para uso como medicamentos.

Imunoensaios ligados à enzima

A sensibilidade dos ensaios enzimáticos pode ser explorada para detectar proteínas que carecem de atividade catalítica. Os **ensaios imunoabsorventes ligados à enzima** (ELISAs, do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assays*) utilizam anticorpos ligados de forma covalente a uma “enzima repórter”, como a fosfatase alcalina ou a peroxidase, cujos produtos são prontamente detectados, em geral, pela absorvância da luz ou por emissão de fluorescência. As amostras séricas ou outras amostras biológicas a serem testadas são colocadas em uma

placa plástica de microtitulação, onde as proteínas aderem à superfície do plástico e são imobilizadas. Qualquer região plástica que permaneça exposta é subsequentemente “bloqueada” pela adição de uma proteína não antigênica, como a albumina sérica bovina. Uma solução de anticorpo ligado de forma covalente a uma enzima repórter é acrescentada em seguida. Os anticorpos aderem ao antígeno imobilizado e são, eles mesmos, imobilizados. O excesso de moléculas de anticorpo livre é removido por lavagem. A presença e a quantidade do anticorpo ligado é determinada ao acrescentar o substrato da enzima repórter.

As desidrogenases NAD(P)⁺-dependentes são analisadas por meios espectrofotométricos

As propriedades físico-químicas dos reagentes em uma reação catalisada por enzima ditam as opções para o ensaio da atividade enzimática. Os ensaios espectrofotométricos exploram a capacidade de um substrato ou de um produto de absorver luz. As coenzimas reduzidas NADH e NADPH, escritas como NAD(P)H, absorvem a luz em um comprimento de onda de 340 nm, ao passo que as suas formas oxidadas NAD(P)⁺ não o fazem (**Figura 7-10**). Assim, quando o NAD(P)⁺ é reduzido, a absorvância a 340 nm aumenta proporcionalmente – e em uma velocidade determinada pela – à quantidade do NAD(P)H produzido. Em contrapartida, para uma desidrogenase que catalisa a oxidação do NAD(P)H, será observada a diminuição na absorvância a 340 nm. Em cada caso, a variação na taxa de absorção a 340 nm será proporcional à quantidade de enzima presente.

O ensaio das enzimas cujas reações não são acompanhadas por uma alteração na absorvância ou na fluorescência geralmente é mais difícil. Em alguns casos, o produto ou o restante do substrato pode ser transformado em um composto mais prontamente detectado, embora o produto da reação possa ter que ser separado do substrato inalterado antes de ser analisado. Uma estratégia alternativa consiste em idealizar um

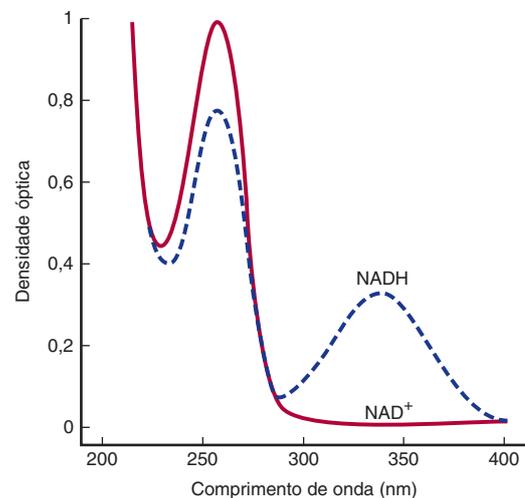


FIGURA 7-10 Espectros de absorção de NAD⁺ e NADH. As densidades são para uma solução de 44 mg/L em uma célula com caminho óptico de 1 cm. NADP⁺ e NADPH possuem espectros análogos ao NAD⁺ e ao NADH, respectivamente.

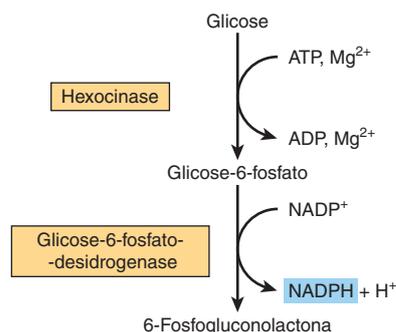


FIGURA 7-11 Ensaio enzimático acoplado para a atividade da hexocinase. A produção de glicose-6-fosfato pela hexocinase está acoplada à oxidação de seu produto pela glicose-6-fosfato-desidrogenase na presença de enzima adicionada e NADP⁺. Quando está presente um excesso de glicose-6-fosfato-desidrogenase, a velocidade de formação do NADPH, que pode ser medida a 340 nm, é controlada pela velocidade de formação da glicose-6-fosfato pela hexocinase.

substrato sintético cujo produto absorva luz ou emita fluorescência. Por exemplo, a hidrólise da ligação fosfoéster do *p*-nitrofenil-fosfato (*p*NPP, do inglês, *p-nitrophenyl phosphate*), uma molécula substrato artificial, é catalisada a uma taxa mensurável por várias fosfatases, fosfodiesterases e serinas proteases. Apesar de o *p*NPP não absorver luz visível, o monitoramento de sua hidrólise resulta no ânion *p*-nitrofenilato que absorve luz a 419 nm e, assim, pode ser quantificado.

Muitas enzimas são avaliadas por meio do acoplamento a uma desidrogenase

Outra conduta bastante genérica consiste em empregar um ensaio “acoplado” (Figura 7-11). Normalmente, uma desidrogenase cujo substrato é o produto da enzima de interesse é adicionada em excesso catalítico. A velocidade de aparecimento ou desaparecimento de NAD(P)H depende, então, da velocidade da reação da enzima à qual a desidrogenase foi acoplada.

A ANÁLISE DE CERTAS ENZIMAS AUXILIAM EM DIAGNÓSTICOS

A análise das enzimas no plasma sanguíneo tem desempenhado um papel central no diagnóstico de diversos processos patológicos. Muitas enzimas são constituintes funcionais do sangue. Os exemplos incluem a pseudocolinesterase, a lipase lipoproteica e os componentes da cascata que iniciam a coagulação sanguínea e a dissolução do coágulo. Outras enzimas são liberadas no plasma após lesão ou morte celular. Como essas últimas enzimas não realizam funções fisiológicas no plasma, elas podem servir como **biomarcadores**, moléculas cujo aparecimento ou níveis pode auxiliar no diagnóstico e no prognóstico de doenças ou de dano em algum tecido específico. Após a lesão, a concentração plasmática de uma enzima liberada pode subir de maneira precoce ou tardia, podendo diminuir de modo rápido ou lento. As proteínas que residem no citoplasma tendem a aparecer mais rapidamente do que aquelas das organelas subcelulares. Os fatores que determinam a velocidade com que as enzimas e outras proteínas são

TABELA 7-2 Principais enzimas séricas utilizadas no diagnóstico clínico

Enzima sérica	Principal uso diagnóstico
Aminotransferases	
Aspartato-aminotransferase (AST, ou SGOT)	Infarto do miocárdio
Alanina-aminotransferase (ALT, ou SGPT)	Hepatite viral
Amilase	Pancreatite aguda
Ceruloplasmina	Degeneração hepatolenticular (doença de Wilson)
Creatina-cinase	Doenças musculares e infarto do miocárdio
γ-Glutamil-transferase	Várias doenças hepáticas
Lactato-desidrogenase isoenzima 5	Doenças hepáticas
Lipase	Pancreatite aguda
β-Glicocerebrosidase	Doença de Gaucher
Fosfatase alcalina (isoenzimas)	Várias doenças ósseas, doenças hepáticas obstrutivas

Nota: muitas das enzimas acima não são específicas para a doença listada.

removidas do plasma incluem sua suscetibilidade à proteólise e sua permeabilidade nos glomérulos renais.

A análise quantitativa da atividade das enzimas liberadas ou de outras proteínas, geralmente no plasma ou no soro, mas também na urina ou em várias células, fornece informações relacionadas ao diagnóstico, ao prognóstico e à resposta ao tratamento. Os ensaios da *atividade* enzimática muitas vezes empregam ensaios cinéticos padronizados das velocidades iniciais de reação. A Tabela 7-2 lista diversas enzimas valiosas no diagnóstico clínico. No entanto, essas enzimas não são absolutamente específicas para a doença indicada. Por exemplo, os níveis sanguíneos elevados de fosfatase ácida prostática estão geralmente associados ao câncer de próstata, mas também a outros determinados cânceres e condições não cancerosas. Portanto, os dados dos ensaios enzimáticos devem ser considerados em conjunto com outros fatores percebidos por meio de um exame clínico abrangente. Os fatores a serem considerados na interpretação dos dados enzimáticos incluem a idade do paciente, o sexo, a história, o possível uso de medicamentos e a sensibilidade e especificidade diagnósticas do teste enzimático.

As enzimas auxiliam no diagnóstico do infarto do miocárdio

Uma enzima útil para a enzimologia diagnóstica deve ser relativamente específica para o tecido ou órgão sob estudo, deve aparecer no plasma ou em outro líquido em um momento útil para o diagnóstico (“janela diagnóstica”) e deve ser adequada para o ensaio automatizado. As enzimas utilizadas para confirmar um infarto do miocárdio (IM) ilustram o conceito de uma “janela diagnóstica”, além de proporcionar uma perspectiva histórica sobre a utilização de diferentes enzimas para essa finalidade.

A detecção de uma enzima deve ser possível dentro de algumas horas após o IM para confirmar um diagnóstico preliminar e permitir o início da terapia apropriada. As enzimas que aparecem no plasma apenas 12 horas ou mais depois do dano são, então, de utilidade limitada. As primeiras enzimas usadas para diagnosticar o IM foram a aspartato-aminotransferase (AST), a alanina-aminotransferase (ALT) e a lactato-desidrogenase (LDH, do inglês, *lactate dehydrogenase*). No entanto, a AST e a ALT ficam abaixo do ideal, pois surgem no plasma de maneira relativamente lenta e não são específicas para o músculo cardíaco. Embora a LDH também seja liberada de forma relativamente lenta no plasma, ela propicia a vantagem da especificidade tecidual como consequência de sua estrutura quaternária.

A LDH é uma enzima tetramérica que consiste em dois tipos de monômeros: H (para coração [*heart*]) e M (para músculo), que se combinam para fornecer cinco isoenzimas da LDH – HHHH (I_1), HHHM (I_2), HHMM (I_3), HMMM (I_4) e MMMM (I_5). As proporções relativas de cada subunidade na célula de um órgão específico é determinada pelo perfil da expressão tecido-específica dos genes H e M. A isoenzima I_1 predomina no tecido cardíaco, e a isoenzima I_5 predomina no fígado. Assim, quando aumentam os níveis de LDH no plasma, a identidade do tecido danificado pode ser inferida a partir do padrão característico de isoenzimas LDH. Em um laboratório clínico, isoenzimas individuais podem ser separadas por eletroforese e detectadas usando um ensaio acoplado (Figura 7-12). Apesar de historicamente importante, o ensaio de LDH foi substituído como marcador de IM por proteínas que aparecem no plasma mais rapidamente do que a LDH.

A creatina-cinase (CK) possui três isoenzimas: CK-MM (músculo esquelético), CK-BB (encéfalo) e CK-MB (coração e músculo esquelético). A CK-MB apresenta uma janela diagnóstica útil. Ela aparece dentro de 4 a 6 horas após um IM, com pico em 24 horas, e retorna ao nível da linha de base em 48 a 72 horas. Assim como a LDH, as isoenzimas individuais de CK são separadas por eletroforese, facilitando, assim, a detecção. O ensaio dos níveis plasmáticos de CK continua em uso para

avaliar os distúrbios da musculatura esquelética, como a distrofia muscular de Duchenne. Contudo, atualmente, na maioria dos laboratórios clínicos, a medição dos níveis plasmáticos de troponina substituiu a CK como o marcador diagnóstico preferido para o IM.

Troponinas

A **troponina** é um complexo de três proteínas envolvidas na contração muscular nos *músculos esquelético e cardíaco*, mas não na *musculatura lisa* (ver Capítulo 51). A análise imunológica dos níveis plasmáticos das troponinas cardíacas I e T proporciona indicadores sensíveis e específicos da lesão do músculo cardíaco. Os níveis de troponina aumentam em 2 a 6 horas após um IM e permanecem elevados por 4 a 10 dias. Além do IM, outras lesões do músculo cardíaco também elevam os níveis séricos de troponina. Dessa maneira, as troponinas cardíacas servem como um marcador de qualquer lesão do músculo cardíaco. A procura por marcadores adicionais da doença cardíaca, como a albumina modificada pela isquemia, e a avaliação simultânea de um espectro de marcadores diagnósticos por meio da proteômica continuam a ser áreas ativas da pesquisa clínica.

Usos clínicos adicionais das enzimas

As enzimas também podem ser empregadas em laboratório clínico como instrumentos para determinar a concentração de metabólitos críticos. Por exemplo, a glicose-oxidase é muitas vezes utilizada para medir a concentração plasmática de glicose. As enzimas são empregadas com crescente frequência como instrumentos para o tratamento da lesão e da doença. O ativador de plasminogênio tecidual (tPA, do inglês, *tissue plasminogen activator*) ou estreptocinase é usada no tratamento do IM agudo, ao passo que a tripsina tem sido usada no tratamento da fibrose cística. A infusão intravenosa de glicosilases recombinantes foi aprovada para o tratamento de diversas doenças de armazenamento lisossomal, incluindo a doença de Gaucher (β -glicosidase), doença de Pompe (α -glicosidase), doença de Fabry (α -galactosidase A) e doença de Sly (β -glicuronidase).

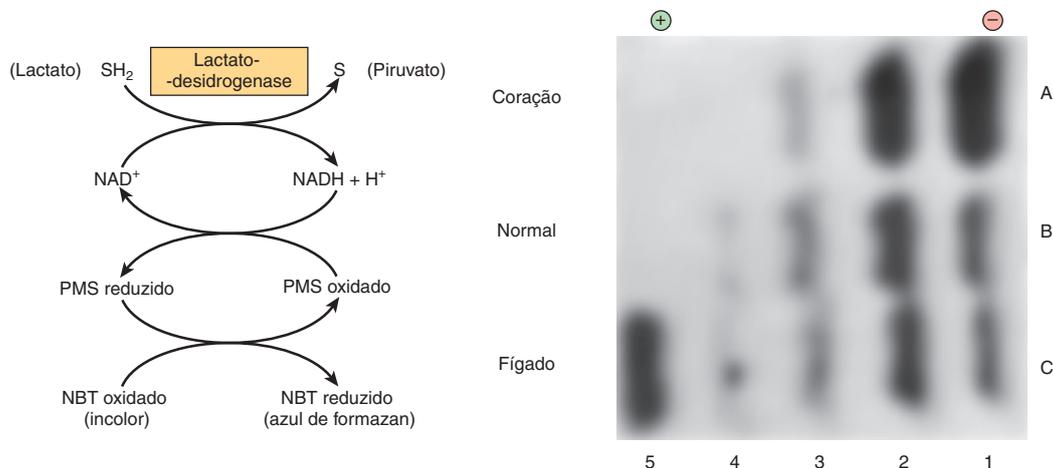


FIGURA 7-12 Padrões normal e patológico das isoenzimas da lactato-desidrogenase (LDH) em soro humano. As isoenzimas séricas da LDH foram separadas por eletroforese e visualizadas usando o esquema de reações acopladas mostrado à esquerda. (NBT, nitroazul de tetrazólio [do inglês, *nitroblue tetrazolium*]; PMS, metilssulfato de fenazina [do inglês, *phenazine methosulfate*].) À direita, está mostrado o eletroferograma marcado. O padrão A é o soro de um paciente com infarto do miocárdio; B é o soro normal; e C é o soro de um paciente com doença hepática. Os números arábicos denotam as isoenzimas específicas da LDH.

AS ENZIMAS FACILITAM O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS E INFECCIOSAS

Muitas técnicas de diagnóstico se beneficiam da especificidade e da eficiência das enzimas que atuam sobre oligonucleotídeos, como o DNA. As enzimas conhecidas como **endonucleases de restrição**, por exemplo, clivam a dupla-fita de DNA em sítios especificados por uma sequência de quatro, seis ou mais pares de bases, chamados de **sítios de restrição**. A clivagem de uma amostra de DNA com uma enzima de restrição produz um conjunto característico de fragmentos de DNA menores (ver Capítulo 39). Os desvios no padrão do produto normal, chamados de **polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição** (RFLPs, do inglês, *restriction fragment length polymorphisms*), ocorrem quando uma mutação torna um sítio de restrição irreconhecível para sua endonuclease de restrição correspondente ou, de modo alternativo, gera um novo sítio de reconhecimento. Os RFLPs são atualmente utilizados para facilitar a detecção pré-natal de inúmeros distúrbios hereditários, inclusive o traço falciforme, a β -talassemia, a fenilcetonúria do lactente e a doença de Huntington.

Aplicações médicas da reação em cadeia da polimerase

Como descrito no Capítulo 39, a **reação em cadeia da polimerase** (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) emprega uma DNA-polimerase termoestável e *primers* (iniciadores) de oligonucleotídeos apropriados para produzir milhares de cópias de um segmento de DNA definido a partir de uma quantidade muito pequena de material inicial. A PCR possibilita que os cientistas-médicos, biólogos e forenses detectem e caracterizem o DNA inicialmente presente em níveis muito baixos para a detecção direta. Além da triagem para as mutações genéticas, a PCR pode ser utilizada para detectar e identificar patógenos e parasitos, como o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas e a *Neisseria meningitidis*, o agente etiológico da meningite bacteriana, por meio da amplificação seletiva de seus DNAs.

O DNA RECOMBINANTE FORNECE UMA FERRAMENTA IMPORTANTE PARA O ESTUDO DE ENZIMAS

A tecnologia do DNA recombinante surgiu como um importante auxílio no estudo das enzimas. Amostras de enzimas altamente purificadas são necessárias para o estudo de sua estrutura e função. O isolamento de uma enzima individual, sobretudo aquela presente em baixa concentração, a partir das milhares de proteínas presentes em uma célula, pode ser extremamente difícil. Clonando o gene para a enzima de interesse, geralmente é possível produzir grande quantidade da proteína codificada em *E. coli* ou levedura. Contudo, nem todas as proteínas animais podem ser expressas em uma forma ativa nas células microbianas, nem os micróbios realizam determinadas tarefas de processamento pós-traducional. Por esses motivos,

um gene pode ser expresso em sistemas de células animais cultivadas empregando o vetor de expressão do baculovírus para transformar as células de inseto cultivadas. Para mais detalhes relacionados com as técnicas do DNA recombinante, ver Capítulo 39.

As proteínas de fusão recombinantes são purificadas por cromatografia de afinidade

A tecnologia do DNA recombinante também pode ser empregada para criar proteínas modificadas que são prontamente purificadas por meio da cromatografia de afinidade. O gene de interesse está ligado a uma sequência oligonucleotídica que codifica uma extensão carboxiterminal ou aminoterminal à proteína codificada. A proteína modificada resultante, chamada de **proteína de fusão**, contém um novo domínio adaptado para interagir com um suporte de afinidade apropriadamente modificado. Uma conduta popular consiste em prender um oligonucleotídeo que codifica seis resíduos de histidina consecutivos. A proteína com uma “cauda de His” liga-se a suportes cromatográficos que contêm íons metálicos divalentes imobilizados, como Ni^{2+} ou Cd^{2+} . Essa abordagem explora a habilidade de esses cátions divalentes ligarem resíduos de His. Uma vez ligadas, as proteínas contaminantes são lavadas, e a enzima contendo a cauda de His é eluída com tampões contendo alta concentração de histidina livre ou imidazol, que compete com as caudas de poli-histidina pela ligação aos íons metálicos imobilizados. De forma alternativa, o domínio de ligação do substrato da glutatona S-transferase (GST) pode servir como uma “cauda GST”. A **Figura 7-13** ilustra a purificação de uma

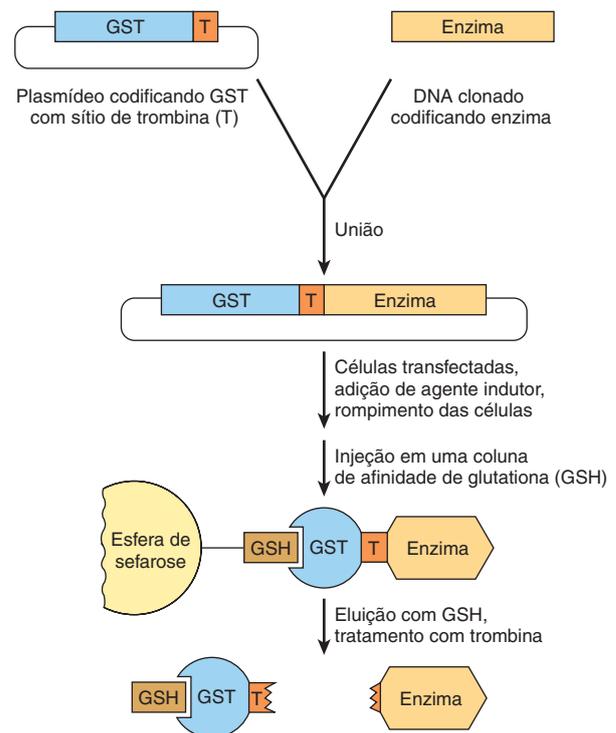


FIGURA 7-13 Uso de proteínas de fusão com a glutatona S-transferase (GST) para purificar proteínas recombinantes. (GSH, glutatona.)

proteína de fusão GST usando um suporte de afinidade contendo a glutatona ligada. A maioria dos domínios de fusão também possui um sítio de clivagem de uma protease altamente específica, como a trombina, na região que une as duas porções da proteína. Isso possibilita a remoção do domínio de fusão após a purificação por afinidade.

A mutagênese sítio-dirigida proporciona dicas sobre o mecanismo de ação

Uma vez estabelecida a capacidade de expressar uma proteína a partir de seu gene clonado, é possível empregar a **mutagênese sítio-dirigida** para modificar resíduos aminoácil por meio da alteração de seus códons. Utilizada em combinação com as análises cinéticas e com a cristalografia de raios X, essa conduta facilita a identificação das funções específicas de determinados resíduos aminoácil na ligação e na catálise do substrato. Por exemplo, a dedução de que um determinado resíduo aminoácil atua como um ácido pode ser testada ao substituí-lo por um resíduo aminoácil incapaz de doar um próton.

RIBOZIMAS: ARTEFATOS DO MUNDO DO RNA

Cech descobriu a primeira molécula de RNA catalítica

A participação de enzimas catalisadoras na maturação pós-traducional de determinadas proteínas apresenta analogias no mundo do RNA. Muitas moléculas de RNA passam por processamento que remove segmentos de oligonucleotídeos e liga os segmentos remanescentes para formar o produto maduro (ver Capítulo 36). No entanto, nem todos esses catalisadores são proteínas. Enquanto examinava o processamento das moléculas de RNA ribossomal (rRNA) no protozoário ciliado *Tetrahymena*, Thomas Cech e colaboradores observaram, no início dos anos 1980, que o processamento do rRNA 26S prosseguia tranquilamente *in vitro*, mesmo na ausência total de proteína. A origem dessa atividade de processamento foi rastreada até um segmento catalítico de 413 pb que retinha sua atividade catalítica mesmo quando replicado em *E. coli* (ver Capítulo 39). Antes desse período, pensava-se que os polinucleotídeos serviam apenas como armazenamento de informação e transmissão e que a catálise era restrita apenas às proteínas.

Várias outras ribozimas foram descobertas desde então. A grande maioria catalisa as reações de deslocamento nucleofílico que visam as ligações fosfodiéster do esqueleto do RNA. Nos RNAs pequenos autoclivantes, o nucleófilo de ataque é a água, e o resultado é a hidrólise. Para as grandes ribozimas com íntron do grupo I, o nucleófilo de ataque é a hidroxila 3' da ribose terminal de outro segmento do RNA, e o resultado é uma reação de processamento.

O ribossomo – a ribozima derradeira

O ribossomo foi o primeiro exemplo de uma “máquina molecular” a ser reconhecida. Um maciço complexo composto por grupos de subunidades de proteína e várias moléculas grandes

de RNA ribossomal, o ribossomo realiza o processo altamente complexo e de vital importância de sintetizar longas cadeias polipeptídicas seguindo as instruções codificadas nas moléculas de RNA mensageiro (ver Capítulo 37). Durante muitos anos, supôs-se que os RNAs ribossomais desempenhassem um papel estrutural passivo ou talvez ajudassem no reconhecimento dos mRNAs cognatos por meio de um mecanismo de pareamento de bases. Foi surpreendente, então, quando se descobriu que RNAs ribossomais eram necessários e suficientes para a catálise.

A hipótese do mundo do RNA

A descoberta das ribozimas teve uma profunda influência sobre a teoria da evolução. Por muitos anos, os cientistas especularam sobre como os primeiros catalisadores biológicos foram formados quando os aminoácidos contidos na sopa primordial coalesceram para formar as primeiras proteínas simples. Com a descoberta de que o RNA poderia tanto transportar informações quanto catalisar as reações químicas simples, surgiu uma nova hipótese do “mundo do RNA”, na qual o RNA constituiu a primeira macromolécula biológica. Mais adiante, o DNA surgiu como um oligonucleotídeo mais estável do ponto de vista químico para o armazenamento de informações por longo prazo, ao passo que as proteínas, em virtude de sua variedade muito maior de grupamentos químicos funcionais, dominavam a catálise. Supondo-se que algum tipo híbrido de RNA-proteína foi formado como um intermediário na transição do ribonucleotídeo para os catalisadores polipeptídicos, não é preciso olhar além do ribossomo para encontrar a suposta ligação perdida.

Por que as proteínas não assumiram a totalidade das funções catalíticas? Supostamente, no caso do ribossomo, o processo foi muito complexo e essencial para permitir muitas oportunidades para que possíveis competidores obtivessem um espaço. No caso dos RNAs pequenos autoclivantes e de íntrons de auto-*splicing*, eles podem representar um dos poucos casos em que a autocatálise do RNA é mais eficiente que o desenvolvimento de uma nova proteína catalisadora.

RESUMO

- As enzimas são catalisadores eficientes, cuja especificidade rigorosa estende-se para o tipo de reação catalisada e, em geral, para um único substrato.
- Os grupos prostéticos orgânicos e inorgânicos, os cofatores e as coenzimas exercem papéis importantes na catálise. As coenzimas, muitas delas derivadas das vitaminas B, atuam como “transportadores” para grupamento comumente usados, como aminas, elétrons e grupamentos acetil.
- Durante a catálise, as enzimas muitas vezes redirecionam as alterações conformacionais induzidas pelo substrato ligado para efetuar alterações complementares no substrato, as quais facilitam sua transformação no produto.
- Os mecanismos catalíticos empregados pelas enzimas incluem a introdução da tensão, a aproximação dos reagentes, a catálise acidobásica e a catálise covalente. A protease do HIV ilustra a catálise acidobásica; a quimiotripsina e a frutose-2,6-bifosfatase ilustram a catálise covalente.

- Os resíduos aminoacil que participam da catálise são altamente conservados entre todas as classes de uma determinada enzima. A mutagênese sítio-dirigida, usada para mudar os resíduos suspeitos de serem importantes na catálise ou na ligação ao substrato, proporciona descobertas sobre os mecanismos de ação da enzima.
- A atividade catalítica das enzimas revela sua presença, facilita sua detecção e propicia a base para os imunoenaios ligados a enzimas. Muitas enzimas podem ser analisadas por meio espectrofotométrico ao acoplá-las a uma desidrogenase NAD(P)⁺-dependente.
- A química combinatória gera extensas bibliotecas de inibidores e ativadores enzimáticos potenciais que podem ser testados por meio da triagem automatizada de alto rendimento.
- O ensaio das enzimas plasmáticas auxilia no diagnóstico e no prognóstico do infarto do miocárdio, da pancreatite aguda e de diversas patologias ósseas e hepáticas.
- As endonucleases de restrição facilitam o diagnóstico das doenças genéticas ao revelar os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição, sendo que a reação em cadeia da polimerase (PCR) amplifica o DNA inicialmente presente em quantidades muito pequenas para a análise.
- A ligação de uma cauda poli-histidil, de uma cauda glutatona S-transferase (GST) ou outra “cauda” na terminação N ou C de uma proteína recombinante facilita sua purificação por meio da cromatografia de afinidade em um suporte sólido que contenha um ligante imobilizado como um cátion divalente (p. ex., Ni²⁺) ou GST. Em seguida, proteases específicas podem remover as “caudas” de afinidade e produzir a enzima original.
- Nem todas as enzimas são proteínas. São conhecidas diversas ribozimas que podem cortar e religar as ligações fosfodiéster do RNA. No ribossomo, é o rRNA, e não os componentes polipeptídicos, o principal responsável pela catálise.

REFERÊNCIAS

- Brik A, Wong C-H: HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem* 2003;1:5.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Elsevier, 2006.
- Cornish PV, Ha T: A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem Biol* 2007;2:53.
- Doudna JA, Lorsch JR: Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nature Struct Biol* 2005;12:395.
- Frey PA, Hegeman AD: *Enzyme Reaction Mechanisms*. Oxford University Press, 2006.
- Geysen HM, Schoenen F, Wagner D, et al: Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nature Rev Drug Disc* 2003;2:222.
- Goddard J-P, Reymond J-L: Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotech* 2004;15:314.
- Gupta S, de Lemos JA: Use and misuse of cardiac troponins in clinical practice. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;50:151.
- Hedstrom L: Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 2002;102:4501.
- Knight AE: Single enzyme studies: A historical perspective. *Meth Mol Biol* 2011;778:1.
- Knudsen BR, Jepsen ML, Ho YP: Quantum dot-based biomarkers for diagnosis via enzyme activity measurement. *Expert Rev Mol Diagn* 2013;13:367.
- Melanson SF, Tanasijevic MJ: Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. *Cardiovascular Pathol* 2005;14:156.
- Parenti G, Pignata C, Vajro P, et al: New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (Review). *Int J Mol Med* 2013;31:11.
- Pereira DA, Williams JA: Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol* 2007;152:53.
- René AWF, Titman CM, Pratap CV, et al: A molecular switch and proton wire synchronize the active sites in thiamine enzymes. *Science* 2004;306:872.
- Schmeing TM, Ramakrishnan V: What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 2009;461:1234.
- Silverman RB: *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press, 2002.
- Steussy CN, Critchelow CJ, Schmidt T, et al: A novel role for coenzyme A during hydride transfer in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochemistry* 2013;52:5195.
- Sundaresan V, Abrol R: Towards a general model for protein-substrate stereoselectivity. *Protein Sci* 2002;11:1330.
- Todd AE, Orengo CA, Thornton JM: Plasticity of enzyme active sites. *Trends Biochem Sci* 2002;27:419.
- Walsh CT: *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, 1979.

Enzimas: cinética

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a abrangência e os objetivos da análise da cinética enzimática.
- Indicar se ΔG , a variação total na energia livre para uma reação, depende do mecanismo da reação.
- Indicar se ΔG é uma função da *velocidade* das reações.
- Explicar a relação entre K_{eq} , concentrações de substratos e produtos em equilíbrio e a proporção das constantes de velocidade k_1/k_{-1} .
- Definir como a concentração de íons hidrogênio, de enzima e de substrato afetam a velocidade da reação catalisada por enzima.
- Utilizar a teoria da colisão para explicar como a temperatura afeta a velocidade das reações químicas.
- Definir as condições da velocidade inicial e explicar as vantagens obtidas de medir a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima sob essas condições.
- Descrever a aplicação das formas lineares da equação de Michaelis-Menten para estimar K_m e $V_{m\acute{a}x}$.
- Fornecer uma razão pela qual a forma linear da equação de Hill é utilizada para avaliar como a ligação do substrato influencia o comportamento cinético de certas enzimas multiméricas.
- Diferenciar os efeitos de uma concentração crescente de substrato sobre a cinética da inibição competitiva e da inibição não competitiva simples.
- Descrever como os substratos são adicionados a, e os produtos são formados de, uma enzima que segue o mecanismo em pingue-pongue.
- Descrever como os substratos são adicionados a, e os produtos são formados de, uma enzima que segue o mecanismo de equilíbrio rápido.
- Fornecer exemplos da utilidade da cinética enzimática em determinar o mecanismo de ação de fármacos.

IMPORTÂNCIA MÉDICA

Um conjunto completo e balanceado de atividades enzimáticas é necessário para manter a homeostasia. A cinética enzimática, que representa a medida quantitativa da velocidade das reações catalisadas por enzimas e o estudo sistemático dos fatores que afetam essas velocidades, constitui uma ferramenta central para análise, diagnóstico e tratamento do desequilíbrio enzimático que fundamenta inúmeras doenças humanas. Por exemplo, a análise cinética pode revelar o número e a ordem das etapas individuais pelas quais as enzimas transformam os substratos em produtos e, em conjunto com a mutagênese sítio-dirigida, as análises cinéticas podem revelar detalhes do mecanismo

catalítico de uma determinada enzima. No sangue, o aparecimento ou o aumento nos níveis de enzimas em particular servem como indicadores clínicos de patologias, como infarto do miocárdio, câncer de próstata e dano hepático. O envolvimento de enzimas em quase todos os processos fisiológicos as transforma nos alvos de escolha para fármacos que curam ou melhoram doenças humanas. A cinética enzimática aplicada representa o principal instrumento pelo qual os cientistas identificam e caracterizam os agentes terapêuticos que inibem seletivamente a taxa de processos catalisados por enzimas específicas. Dessa maneira, a cinética enzimática desempenha um papel central e crítico na descoberta de fármacos, na farmacodinâmica comparativa e na determinação do modo de ação dos fármacos.

AS REAÇÕES QUÍMICAS SÃO DESCRITAS UTILIZANDO EQUAÇÕES BALANCEADAS

Uma **equação química balanceada** lista as espécies químicas iniciais (substratos) presentes e as novas espécies químicas (produtos) formadas em uma determinada reação química, todas em suas respectivas proporções ou **estequiometria**. Por exemplo, a equação balanceada (1) indica que uma molécula de cada um dos substratos A e B reage para formar uma molécula de cada um dos produtos P e Q:



As setas duplas indicam a reversibilidade, uma propriedade intrínseca de todas as reações químicas. Assim, para a reação (1), se A e B podem formar P e Q, então P e Q também podem formar A e B. A designação de um determinado reagente como um “substrato” ou “produto” é, então, um tanto arbitrária, pois os produtos para uma reação escrita em uma direção são os substratos para a reação inversa. Contudo, o termo “produto” é frequentemente utilizado para designar os reagentes cuja formação é favorecida do ponto de vista termodinâmico. As reações para as quais os fatores termodinâmicos favorecem fortemente a formação dos produtos para os quais a seta aponta geralmente são representadas com uma seta única, como se elas fossem “irreversíveis”:



As setas unidirecionais também são utilizadas para descrever as reações em células vivas em que os produtos da reação (2) são imediatamente consumidos por uma reação catalisada por uma enzima subsequente ou escapam rapidamente da célula, como, por exemplo, o CO₂. Portanto, a rápida remoção do produto P ou Q impede efetivamente a ocorrência da reação inversa, tornando a equação (2) **funcionalmente irreversível sob condições fisiológicas**.

AS VARIAÇÕES NA ENERGIA LIVRE DETERMINAM A DIREÇÃO E O ESTADO DE EQUILÍBRIO DAS REAÇÕES QUÍMICAS

A variação de energia livre ΔG de Gibbs (também chamada de energia livre ou energia de Gibbs) descreve tanto a *direção* para a qual uma reação química tende a prosseguir quanto as concentrações dos reagentes e produtos que estão presentes no equilíbrio. A ΔG de uma reação química é igual à soma das energias livres de formação dos produtos de reação, ΔG_p , subtraída pela soma das energias livres de formação dos substratos, ΔG_s . Um termo semelhante, mas diferente, designado ΔG^0 , indica a variação da energia livre que acompanha a transição do estado-padrão, no qual a concentração de substratos e produtos é de um molar até o equilíbrio. Um termo bioquímico mais útil é ΔG^0 , que define ΔG^0 em um estado-padrão de 10^{-7} M de prótons, pH 7,0. Quando a energia livre da formação dos produtos é *menor* que

aquela dos substratos, os sinais de ΔG^0 e ΔG^0 serão *negativos*, indicando que a reação, conforme escrita, é favorecida na direção da esquerda para a direita. Essas reações são referidas como **espontâneas**. O **sinal** e a **magnitude** da variação de energia livre determinam até onde prosseguirá a reação.

A equação (3) ilustra a relação entre a constante de equilíbrio, K_{eq} , e ΔG^0 :

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (3)$$

em que R é a constante gasosa (1,98 cal/mol^oK ou 8,31 J/mol^oK) e T é a temperatura absoluta em graus Kelvin. A K_{eq} é igual ao produto das concentrações dos produtos da reação, cada um elevado à potência de sua estequiometria, dividido pelo produto dos substratos, cada um elevado à potência de sua estequiometria:

Para a reação $A + B \rightleftharpoons P + Q$

$$K_{eq} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \quad (4)$$

e para a reação (5)



$$K_{eq} = \frac{[P]}{[A]^2} \quad (6)$$

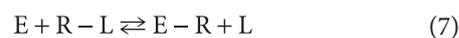
a ΔG^0 pode ser calculada a partir da equação (3) quando as concentrações molares dos substratos e produtos presentes em equilíbrio são conhecidas. Quando ΔG^0 é um número negativo, K_{eq} será maior que uma unidade, e as concentrações dos produtos em equilíbrio superarão aquelas dos substratos. Quando ΔG^0 é positivo, a K_{eq} será inferior a uma unidade, e a formação de substratos será favorecida.

Observe que, como ΔG^0 é uma função exclusivamente dos estados inicial e final das espécies reagentes, ela pode fornecer informações apenas sobre a *direção* e o *estado de equilíbrio* da reação. A ΔG^0 independe do **mecanismo** da reação e, assim, não fornece informações a respeito das **velocidades** das reações. Consequentemente – e como explicado adiante –, embora uma reação possa ter ΔG^0 ou ΔG^0 negativos grandes, ela pode, apesar disso, ocorrer em uma velocidade desprezível.

AS VELOCIDADES DAS REAÇÕES SÃO DETERMINADAS PELAS SUAS ENERGIAS DE ATIVAÇÃO

As reações prosseguem via estados de transição

O conceito do **estado de transição** é fundamental para compreender as bases químicas e termodinâmicas da catálise. A equação (7) demonstra uma reação de transferência de grupo em que o grupo de entrada E desloca o grupo de saída L, inicialmente ligado a R:



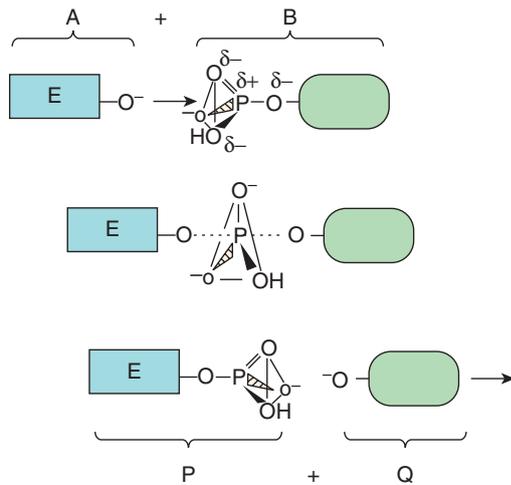
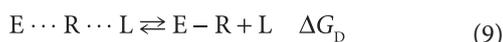


FIGURA 8-1 Formação de um estado de transição intermediário durante uma reação química simples, $A + B \rightarrow P + Q$. Estão representados três estágios de uma reação química em que um grupo fosforil é transferido do grupo doador L (em verde) para um grupo receptor E (em azul). **Parte superior:** o grupo receptor E (A) aproxima-se de outro reagente, o L-fosfato (B). Observe como os três átomos de oxigênio ligados por linhas triangulares e o átomo de fósforo do grupamento fosforil formam uma pirâmide. **Centro:** à medida que E se aproxima do L-fosfato, a nova ligação entre E e o grupamento fosforil começa a se formar (linha tracejada), ao passo que a ligação de L ao grupamento fosfato enfraquece. Essas ligações formadas parcialmente são indicadas pelas linhas tracejadas. **Parte inferior:** agora a formação do novo produto, o E-fosfato (P), está completa, enquanto o grupamento doador L (Q) sai. A geometria do grupamento fosforil difere entre o estado de transição e o substrato ou produto. Observe como o fósforo e os três átomos de oxigênio que ocupam os quatro cantos de uma pirâmide no substrato e no produto se tornam coplanares, conforme enfatizado pelo triângulo, no estado de transição.

O resultado líquido desse processo é a transferência do grupamento R de L para E. Na trajetória desse deslocamento, a ligação entre R e L foi enfraquecida, mas ainda não foi totalmente desfeita, sendo que a nova ligação entre E e R ainda não está completamente formada. Esse intermediário transitório – em que nem o substrato livre nem o produto existem – é chamado de **estado de transição**, $E \cdots R \cdots L$. As linhas pontilhadas representam as ligações “parciais” que estão sofrendo formação e ruptura. A **Figura 8-1** fornece uma ilustração mais detalhada do intermediário do estado de transição formado durante a transferência de um grupamento fosforil.

Pode-se pensar na reação (7) como sendo composta por duas “reações parciais”, com a primeira correspondendo à formação (F), e a segunda, ao decaimento (D) subsequente do intermediário do estado de transição. Assim como para todas as reações, as alterações características na energia livre, ΔG_F e ΔG_D , estão associadas a cada reação parcial:



Para a reação geral (10), ΔG é o somatório de ΔG_F e ΔG_D . Como para qualquer equação de dois termos, não é possível deduzir de sua ΔG resultante o sinal ou a magnitude de ΔG_F ou ΔG_D .

Muitas reações envolvem vários estados de transição sucessivos, cada um com uma mudança associada de energia livre. Para essas reações, o ΔG total representa o somatório de *todas* as mudanças na energia livre associadas à formação e ao decaimento de *todos* os estados de transição. **Portanto, não é possível inferir do ΔG geral o número ou o tipo de estados de transição pelos quais a reação prossegue.** Ou seja, a *termodinâmica geral da reação não diz nada sobre o mecanismo ou a cinética.*

ΔG_F define a energia de ativação

Independentemente do sinal ou da magnitude de ΔG , para a imensa maioria das reações químicas, a ΔG_F possui sinal positivo, que indica que a formação do estado de transição exige superar uma ou mais barreiras de energia. Por isso, a ΔG_F necessária para alcançar um estado de transição é frequentemente denominada **energia de ativação**, E_{at} . A facilidade – e, conseqüentemente, a frequência – com que essa barreira é superada está *inversamente* relacionada com a E_{at} . Os parâmetros termodinâmicos que determinam com qual *rapidez* uma reação acontece são os valores de ΔG_F para a formação dos estados de transição por meio dos quais a reação ocorre. Para uma reação simples, em que \propto significa “proporcional a”,

$$\text{Velocidade} \propto e^{-E_{at}/RT} \quad (11)$$

A energia de ativação para que a reação prossiga na direção oposta àquela esboçada é igual a $-\Delta G_D$.

DIVERSOS FATORES AFETAM A VELOCIDADE DE REAÇÃO

A **teoria cinética** – também chamada de **teoria da colisão** – da cinética química afirma que, para que duas moléculas reajam, elas (1) devem aproximar-se a uma distância que possibilite a formação de uma ligação entre si, ou “colidir”, e (2) devem possuir energia cinética suficiente para superar a barreira de energia para atingir o estado de transição. Portanto, as condições que tendem a aumentar a *frequência* ou a *energia* de colisão entre os substratos tendem a aumentar a velocidade da reação em que participam.

Temperatura

A elevação da temperatura ambiente aumenta a energia cinética das moléculas. Conforme ilustrado na **Figura 8-2**, a quantidade total de moléculas cuja energia cinética excede a barreira de energia E_{at} (barra vertical) para a formação dos produtos aumenta a partir da temperatura baixa (A) para a intermediária (B) até a alta (C). O aumento da energia cinética das moléculas também aumenta sua rapidez de movimento e, em conseqüência, a frequência com que elas colidem. Essa combinação de colisões mais frequentes e mais altamente energéticas e, portanto, produtivas, aumenta a velocidade da reação.

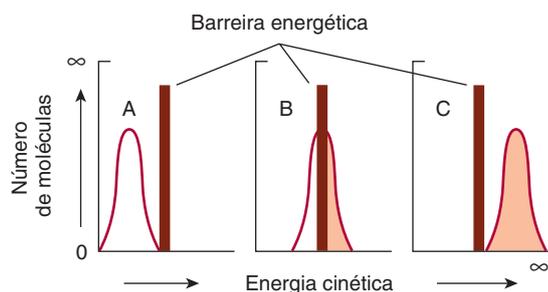


FIGURA 8-2 A barreira de energia para as reações químicas. (Ver discussão no texto.)

Concentração de reagente

A frequência com que as moléculas colidem é diretamente proporcional às suas concentrações. Para duas moléculas diferentes A e B, a frequência com que elas colidem duplicará quando a concentração de A ou B for duplicada. Quando as concentrações tanto de A quanto de B são duplicadas, a probabilidade de colisão aumentará em quatro vezes.

Para uma reação química que prossegue em temperatura constante envolvendo uma molécula de A e uma de B,



a fração de moléculas que possuem uma determinada energia cinética será constante. O número de colisões entre as moléculas cuja energia cinética combinada é suficiente para produzir produto P, conseqüentemente, será diretamente proporcional ao número de colisões entre A e B e, assim, às suas concentrações molares, representadas por colchetes:

$$\text{Velocidade} \propto [A][B] \quad (13)$$

De maneira similar, para a reação representada por



que também pode ser escrita como



A expressão da velocidade correspondente é

$$\text{Velocidade} \propto [A][B][B] \quad (16)$$

ou

$$\text{Velocidade} \propto [A][B]^2 \quad (17)$$

Para o caso geral, quando n moléculas de A reagem com m moléculas de B,



a expressão da velocidade é

$$\text{Velocidade} \propto [A]^n[B]^m \quad (19)$$

Substituir o sinal de proporcionalidade por um sinal de igualdade pela introdução de uma **constante de velocidade, k** , característica da reação sob estudo, gera as equações (20) e (21),

nas quais os subscritos 1 e -1 se referem às reações direta e inversa, respectivamente:

$$\text{Velocidade}_1 = k_1[A]^n[B]^m \quad (20)$$

$$\text{Velocidade}_{-1} = k_{-1}[P] \quad (21)$$

O somatório das proporções molares dos reagentes define a **ordem cinética** da reação. Considere a reação (5). O coeficiente estequiométrico para o único reagente, A, é 2. Portanto, a velocidade de produção de P é proporcional ao quadrado de [A], e diz-se que a reação é de *segunda ordem* em relação ao reagente A. Neste caso, a reação total também é de *segunda ordem*. Por conseguinte, k_1 é referido como uma *constante de velocidade de segunda ordem*.

A reação (12) descreve uma reação de segunda ordem simples entre dois reagentes distintos, A e B. O coeficiente estequiométrico para cada reagente é 1. Portanto, enquanto a reação é de segunda ordem, diz-se que ela é de *primeira ordem* em relação a A e de *primeira ordem* em relação a B.

Em laboratório, a ordem cinética de uma reação em relação a um determinado reagente, designado por reagente ou substrato variável, pode ser determinada mantendo-se a concentração dos outros reagentes em grande excesso em relação ao reagente variável. Sob essas *condições de pseudo primeira ordem*, a concentração do reagente “fixo” permanece quase constante. Dessa maneira, a velocidade da reação dependerá exclusivamente da concentração do reagente variável, por vezes também chamado de reagente limitante. Os conceitos da ordem de reação e das condições de pseudo primeira ordem não se aplicam apenas às reações químicas simples, mas também às reações catalisadas por enzima.

A K_{eq} é uma razão das constantes de velocidade

Embora todas as reações químicas sejam, em alguma extensão, reversíveis, as concentrações *totais* dos reagentes e produtos permanecem constantes no equilíbrio. Em equilíbrio, a velocidade de conversão dos substratos em produtos iguala-se, em conseqüência, à velocidade em que os produtos são convertidos em substratos:

$$\text{Velocidade}_1 = \text{Velocidade}_{-1} \quad (22)$$

Portanto,

$$k_1 = [A]^n[B]^m = k_{-1}[P] \quad (23)$$

e

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[P]}{[A]^n[B]^m} \quad (24)$$

A proporção entre k_1 e k_{-1} é igual à constante de equilíbrio, K_{eq} . As seguintes propriedades importantes de um sistema em equilíbrio devem ser mantidas em mente.

1. A constante de equilíbrio é uma proporção das *constantes de velocidade* da reação (não das *velocidades* de reação).
2. Em equilíbrio, as *velocidades* de reação (não as *constantes de velocidade*) das reações direta e inversa são iguais.

- O valor numérico da constante de equilíbrio, K_{eq} , pode ser calculado tanto a partir das concentrações dos substratos e produtos em equilíbrio quanto a partir da proporção k_1/k_{-1} .
- O equilíbrio é um estado *dinâmico*. Embora não exista alteração *líquida* na concentração dos substratos ou produtos, as moléculas individuais do substrato e do produto estão sob interconversão contínua. A interconversão pode ser provada pela adição de um traço de um produto radioisótopo a um sistema em equilíbrio, o que resultará no aparecimento de substrato marcado radioativamente.

A CINÉTICA DA CATÁLISE ENZIMÁTICA

As enzimas diminuem a barreira energética de ativação para uma reação

Todas as enzimas aceleram a velocidade de reação ao diminuir a ΔG_F para a formação dos estados de transição. No entanto, elas podem diferir na maneira como isso é obtido. Embora a sequência de etapas químicas no sítio ativo seja paralela às que ocorrem quando os substratos reagem na ausência de um catalisador, **o ambiente do sítio ativo reduz a ΔG_F** , estabilizando os intermediários do estado de transição. Ou seja, a enzima pode ser visualizada ligando-se mais intensamente ao intermediário do estado de transição (Figura 8-1) do que ela faz tanto com os substratos quanto com os produtos. Conforme discutido no Capítulo 7, a estabilização pode envolver (1) os grupamentos acidobásicos adequadamente posicionados para transferir prótons para ou do intermediário do estado de transição em desenvolvimento, (2) os grupamentos carregados adequadamente posicionados ou íons metálicos que estabilizam as cargas em desenvolvimento, ou (3) a imposição da tensão estérica sobre os substratos, de maneira que a geometria deles se aproxime daquela do estado de transição. A protease do HIV (ver Figura 7-6) ilustra a catálise por uma enzima que diminui a barreira de ativação ao estabilizar um intermediário do estado de transição.

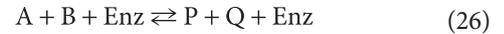
A catálise por enzimas que prossegue por meio de um mecanismo de reação *único* ocorre, em geral, quando o intermediário do estado de transição forma uma ligação covalente com a enzima (**catálise covalente**). O mecanismo catalítico da serina protease quimiotripsina (ver Figura 7-7) ilustra como uma enzima utiliza a catálise covalente para fornecer uma via de reação única possuindo uma E_{at} mais favorável.

AS ENZIMAS NÃO AFETAM A K_{eq}

Embora as enzimas sofram modificações transitórias durante o processo de catálise, elas sempre aparecem inalteradas ao término da reação. **Portanto, a presença de uma enzima não tem efeito sobre a ΔG^0 para a reação geral**, o que é uma função unicamente dos **estados inicial e final** dos reagentes. A equação (25) mostra a relação entre a constante de equilíbrio para uma reação e a mudança de energia livre padrão para aquela reação:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (25)$$

Esse princípio é talvez mais facilmente ilustrado ao incluir a presença da enzima (Enz) no cálculo da constante de equilíbrio para uma reação catalisada por enzima:



Como a enzima em ambos os lados da seta dupla está presente em quantidade igual e forma idêntica, a expressão para a constante de equilíbrio,

$$K_{eq} = \frac{[P][Q][\text{Enz}]}{[A][B][\text{Enz}]} \quad (27)$$

reduz para uma reação idêntica àquela na *ausência* da enzima:

$$K_{eq} = \frac{[P][Q]}{[A][B]} \quad (28)$$

Portanto, as enzimas não têm efeito sobre a K_{eq} .

MÚLTIPLOS FATORES AFETAM A VELOCIDADE DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

Temperatura

A elevação da temperatura aumenta a velocidade das reações, tanto das não catalisadas quanto das catalisadas por enzimas, por aumentar a energia cinética e a frequência de colisão das moléculas reagentes. No entanto, a energia calórica também pode aumentar a flexibilidade conformacional da enzima até um ponto que exceda a barreira energética para romper as interações não covalentes que mantêm sua estrutura tridimensional. Então, a cadeia polipeptídica começa a se desdobrar, ou **desnaturar**, com conseqüente perda da atividade catalítica. A faixa de temperatura sobre a qual uma enzima mantém uma conformação estável e competente do ponto de vista catalítico depende – e, em geral, excede de modo moderado – da temperatura normal das células nas quais ela reside. As enzimas dos seres humanos geralmente exibem estabilidade em temperaturas de 45 a 55°C. Em contrapartida, as enzimas de microrganismos termofílicos que residem em correntes de águas vulcânicas ou em jatos hidrotermais suboceânicos podem ser estáveis em temperaturas iguais ou superiores a 100°C.

O **coeficiente de temperatura (Q_{10})** é o fator pelo qual a velocidade de um processo biológico leva a um aumento de 10°C na temperatura. Para as temperaturas em que as enzimas são estáveis, as velocidades da maioria dos processos biológicos geralmente duplicam quando há elevação de 10°C na temperatura ($Q_{10} = 2$). As alterações nas velocidades das reações catalisadas por enzimas que acompanham uma elevação ou queda na temperatura corporal constituem um proeminente aspecto de sobrevivência para as formas de vida “de sangue frio”, como lagartos ou peixes, cujas temperaturas corporais são ditadas pelo ambiente externo. No entanto, para os mamíferos e outros organismos homeotérmicos, as alterações nas velocidades das reações enzimáticas com a temperatura assumem importância fisiológica apenas em circunstâncias como febre ou hipotermia.

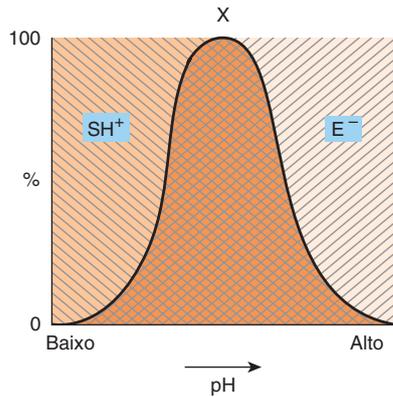


FIGURA 8-3 Efeito do pH sobre a atividade enzimática. Considere, por exemplo, uma enzima negativamente carregada (E^-) que se liga a um substrato positivamente carregado (SH^+). É mostrada a proporção (%) de SH^+ [\\/] e de E^- [///] como uma função do pH. A enzima e o substrato comportam uma carga apropriada apenas na área com hachuras cruzadas.

Concentração do íon hidrogênio

A velocidade de quase todas as reações catalisadas por enzimas exibe uma significativa dependência da concentração do íon hidrogênio. A maioria das enzimas intracelulares exibe atividade ótima em valores de pH entre 5 e 9. A relação da atividade com a concentração de íons hidrogênio (Figura 8-3) reflete o equilíbrio entre a desnaturação da enzima em pH alto ou baixo e os efeitos sobre o estado de carga da enzima, dos substratos ou de ambos. Para as enzimas cujo mecanismo envolve a catálise acidobásica, os resíduos envolvidos devem se encontrar no estado apropriado de protonação para que a reação continue. A ligação e o reconhecimento das moléculas do substrato com grupamentos dissociáveis muitas vezes também envolvem a formação de pontes salinas com a enzima. Os grupamentos carregados mais comuns são os grupamentos carboxilatos (negativos) e as aminas protonadas (positivas). O ganho ou a perda de grupamentos carregados críticos afeta, de maneira negativa, a ligação e, assim, retardará ou abolirá a catálise.

OS ENSAIOS DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS NORMALMENTE MEDEM A VELOCIDADE INICIAL

A maioria das medidas da velocidade de uma reação catalisada por enzima envolve períodos relativamente curtos, condições que são consideradas para aproximação das **condições de velocidade inicial**. Sob essas condições, apenas traços do produto se acumulam, tornando a velocidade da reação inversa desprezível. A **velocidade inicial** (v_i) da reação é, dessa forma, essencialmente idêntica à da velocidade da reação direta. Os ensaios de atividade enzimática quase sempre empregam um grande excesso molar (10^3 - 10^6) de substrato em relação à enzima. Nessas condições, v_i é proporcional à concentração da enzima, isto é, é de pseudo primeira ordem

em relação à enzima. Medir a velocidade inicial permite, portanto, estimar a quantidade de enzima presente em uma amostra biológica.

A CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO AFETA A VELOCIDADE DA REAÇÃO

A seguir, as reações enzimáticas são tratadas como se tivessem apenas um substrato e um único produto. Para as enzimas com múltiplos substratos, os princípios discutidos aplicam-se com igual validade. Ademais, ao empregar condições de pseudo primeira ordem (ver anteriormente), os cientistas podem estudar a dependência da velocidade da reação sobre um reagente individual por meio da escolha apropriada de substratos fixos e variáveis. Em outras palavras, em condições de pseudo primeira ordem, o comportamento de uma enzima multissubstrato imitará o de uma que possui um substrato. Neste exemplo, no entanto, a constante da velocidade observada será uma função tanto da constante da velocidade k_1 para a reação quanto da concentração fixa do substrato.

Para uma enzima comum, à medida que a concentração do substrato é aumentada, a v_i aumenta até que alcance um valor máximo, $V_{máx}$ (Figura 8-4). Quando o aumento adicional na concentração do substrato falha em aumentar v_i , diz-se que a enzima está “saturada” com o substrato. Observe que o formato da curva que relaciona a atividade à concentração do substrato (Figura 8-4) é **hiperbólico**. Em um determinado instante, apenas as moléculas de substrato que estão combinadas com a enzima, como um complexo enzima-substrato (ES), podem ser transformadas em produto. Como a constante de equilíbrio para a formação do complexo enzima-substrato não é infinitamente grande, apenas uma fração da enzima pode estar presente como um complexo ES, mesmo quando o substrato está presente em excesso (pontos A e B da Figura 8-5). Nos pontos A ou B, portanto, aumentar ou diminuir $[S]$ aumentará ou diminuirá o número de complexos ES com uma alteração correspondente na v_i . Contudo, no ponto C (Figura 8-5), quase toda a enzima está presente como o complexo ES. Como nenhuma enzima livre permanece disponível para formar o ES, o aumento adicional na $[S]$ não pode aumentar a velocidade da reação. **Sob essas condições de saturação, a v_i depende unicamente – e, dessa maneira, é limitada por – da rapidez em que o produto se dissocia da enzima, de modo que ela possa se combinar com mais substrato.**

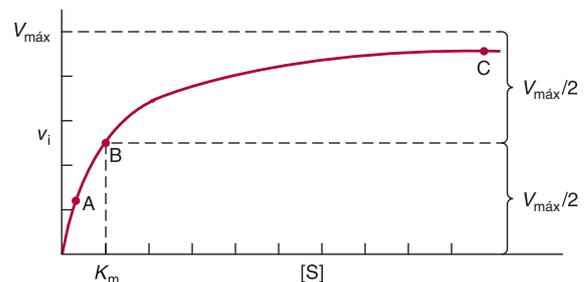


FIGURA 8-4 Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.

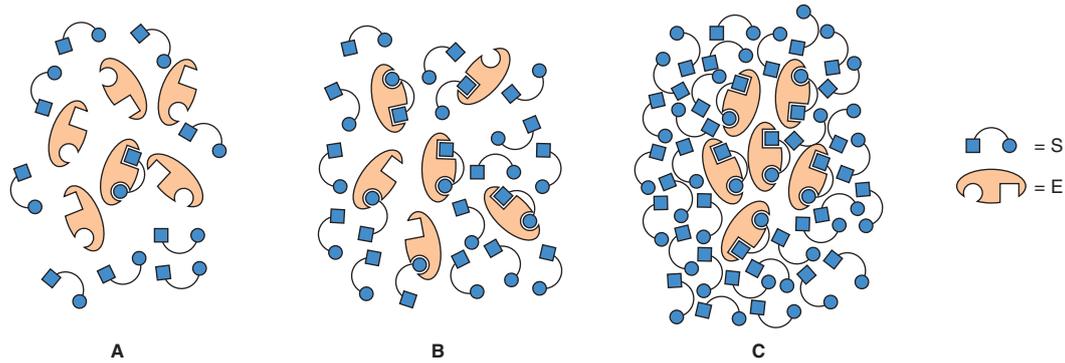


FIGURA 8-5 Representação de uma enzima na presença de uma concentração de substrato que está abaixo de K_m (A), em uma concentração igual a K_m (B) e em uma concentração muito superior a K_m (C). Os pontos A, B e C correspondem aos pontos na Figura 8-4.

AS EQUAÇÕES DE MICHAELIS-MENTEN E DE HILL MODELAM OS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Equação de Michaelis-Menten

A equação de Michaelis-Menten (29) ilustra, em termos matemáticos, a relação entre a velocidade de reação inicial v_i e a concentração do substrato $[S]$, mostrada graficamente na Figura 8-4:

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad (29)$$

A constante de Michaelis, K_m , é a concentração de substrato em que v_i é a metade da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}/2$) atingível em uma determinada concentração da enzima. Assim, K_m possui as dimensões da concentração do substrato. A dependência da velocidade inicial da reação de $[S]$ e K_m pode ser ilustrada ao se avaliar a equação de Michaelis-Menten sob três condições.

1. Quando $[S]$ é muito menor que K_m (ponto A nas Figuras 8-4 e 8-5), o termo $K_m + [S]$ é quase igual a K_m . Substituir $K_m + [S]$ por K_m reduz a equação (29) para

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad v_i \approx \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m} \approx \left(\frac{V_{\text{máx}}}{K_m} \right) [S] \quad (30)$$

em que \approx significa “aproximadamente igual a”. Como $V_{\text{máx}}$ e K_m são ambos constantes, sua proporção é uma constante. Em outras palavras, quando $[S]$ está consideravelmente abaixo de K_m , v_i é proporcional a $k[S]$. Portanto, a velocidade inicial da reação é diretamente proporcional a $[S]$.

2. Quando $[S]$ é muito maior que K_m (ponto C nas Figuras 8-4 e 8-5), o termo $K_m + [S]$ é essencialmente igual a $[S]$. Substituir $K_m + [S]$ por $[S]$ reduz a equação (29) para

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad v_i \approx \frac{V_{\text{máx}} [S]}{[S]} \approx V_{\text{máx}} \quad (31)$$

Assim, quando $[S]$ supera muito K_m , a velocidade da reação é máxima ($V_{\text{máx}}$) e não é afetada por aumentos adicionais na concentração do substrato.

3. Quando $[S] = K_m$ (ponto B nas Figuras 8-4 e 8-5):

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{2[S]} = \frac{V_{\text{máx}}}{2} \quad (32)$$

A equação (32) diz que, quando $[S]$ se iguala a K_m , a velocidade inicial é a metade da máxima. A equação (32) também revela que K_m é – e pode ser determinado de maneira experimental a partir de – a concentração do substrato em que a velocidade inicial é a metade da máxima.

Uma forma linear da equação de Michaelis-Menten é utilizada para determinar K_m e $V_{\text{máx}}$

A medição direta do valor numérico da $V_{\text{máx}}$, e, portanto, do cálculo de K_m , frequentemente requer altas concentrações de substrato impraticáveis para alcançar as condições de saturação. Uma forma linear da equação de Michaelis-Menten contorna essa dificuldade e permite que a $V_{\text{máx}}$ e a K_m sejam extrapoladas a partir dos dados da velocidade inicial obtidos em concentrações inferiores às de saturação do substrato. Deve-se iniciar com a equação (29),

$$v_i = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad (29)$$

inverter

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{máx}} [S]} \quad (33)$$

fatorar

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}} [S]} + \frac{[S]}{V_{\text{máx}} [S]} \quad (34)$$

e simplificar

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (35)$$

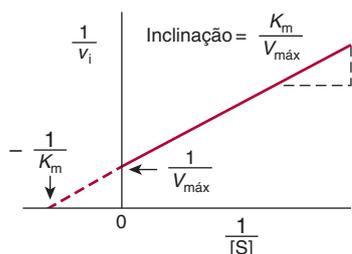


FIGURA 8-6 Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk de $1/v_i$ versus $1/[S]$ utilizado para avaliar K_m e $V_{máx}$.

A equação (35) é a equação para uma linha reta, $y = ax + b$, em que $y = 1/v_i$ e $x = 1/[S]$. Um gráfico de $1/v_i$ como y em função de $1/[S]$ como x fornece, portanto, uma linha reta, cuja interseção em y é $1/V_{máx}$ e cuja inclinação é $K_m/V_{máx}$. Esse gráfico é chamado de **gráfico de Lineweaver-Burk** ou **duplo-recíproco** (Figura 8-6). Considerando o termo y da equação (36) igual a zero e resolvendo x , revela-se que a interseção x é $-1/K_m$:

$$0 = ax + b; \text{ portanto, } x = \frac{-b}{a} = \frac{-1}{K_m} \quad (36)$$

K_m pode ser calculado a partir da inclinação e da interseção no eixo y , mas é talvez mais facilmente calculado a partir da interseção negativa com o eixo x .

A maior vantagem do gráfico de Lineweaver-Burk é a facilidade com que ele pode ser utilizado para determinar os mecanismos cinéticos dos inibidores enzimáticos (ver adiante). Contudo, ao usar um gráfico duplo-recíproco para determinar as constantes cinéticas, é importante evitar a tendência por intermédio da aglomeração de dados em valores baixos de $1/[S]$. Essa tendência pode ser prontamente evitada no laboratório da seguinte forma. Prepare uma solução de substrato cuja diluição no ensaio produzirá a concentração máxima desejada do substrato. Agora, prepare diluições da solução-estoque nas proporções de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, etc. Os dados gerados utilizando volumes iguais dessas diluições cairão no eixo $1/[S]$ em intervalos igualmente espaçados de 1, 2, 3, 4, 5, etc. Um gráfico simples-recíproco, como o de Eadie-Hofstee (v_i vs. $v_i/[S]$) ou de Hanes-Woolf ($[S]/v_i$ vs. $[S]$), também pode ser usado para minimizar a aglomeração de dados.

A constante catalítica, k_{cat}

Diversos parâmetros podem ser empregados para comparar a atividade relativa de diferentes enzimas ou de diferentes preparações da mesma enzima. A atividade de preparações da enzima impuras é, comumente, expressa como uma *atividade específica* ($V_{máx}$ dividida pela concentração da proteína). Para uma enzima homogênea, pode-se calcular seu *número de turnover* ($V_{máx}$ dividida pelo número de moles da enzima existentes). Contudo, quando se conhece o número de sítios ativos existentes, a atividade catalítica de uma enzima homogênea é mais bem expressa como sua *constante catalítica*, k_{cat} ($V_{máx}$ dividida pelo número de sítios ativos, S_t):

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{S_t} \quad (37)$$

Como as unidades de concentração se anulam, as unidades da k_{cat} são o inverso do tempo.

A eficiência catalítica, k_{cat}/K_m

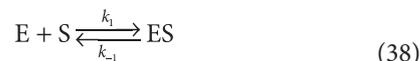
Com qual medida devem ser quantificadas e comparadas a eficiência de diferentes enzimas, de diferentes substratos para uma determinada enzima, e a eficiência com a qual uma enzima catalisa uma reação nas direções direta e inversa? Embora seja importante a capacidade máxima de uma determinada enzima converter o substrato em produto, os benefícios de uma k_{cat} alta podem ser apenas imaginados quando a K_m é suficientemente baixa. Assim, a *eficiência catalítica* das enzimas é mais bem expressa em relação à *proporção* dessas duas constantes cinéticas, k_{cat}/K_m .

Para certas enzimas, quando o substrato se liga ao sítio ativo, ele é convertido no produto e liberado tão rapidamente que torna esses eventos efetivamente instantâneos. Para esses catalisadores excepcionalmente eficientes, a etapa limitante da velocidade na catálise é a formação do complexo ES. Diz-se que essas enzimas são *limitadas por difusão*, ou cataliticamente perfeitas, já que a velocidade mais rápida possível é determinada pela velocidade com que as moléculas se movimentam ou se difundem na solução. Os exemplos de enzimas para as quais a k_{cat}/K_m se aproxima do limite de difusão de 10^8 a 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ incluem a triosefosfato-isomerase, a anidrase carbônica, a acetilcolinesterase e a adenosina-desaminase.

Nas células vivas, a aglomeração de enzimas que catalisam reações sucessivas em complexos multiméricos pode evitar as limitações impostas pela difusão. As relações geométricas das enzimas nesses complexos são tais que os substratos e os produtos não se difundem para dentro da massa da solução até que a última etapa na sequência das etapas catalíticas esteja completa. A ácido graxo-sintase estende esse conceito uma etapa adiante ao ligar de forma covalente à cadeia de ácido graxo do substrato em crescimento a uma biotina acoplada que roda de um sítio ativo para outro dentro do complexo até que a síntese de uma molécula de ácido palmítico esteja completa (ver Capítulo 23).

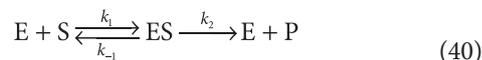
A K_m pode aproximar-se de uma constante de ligação

A afinidade de uma enzima por seu substrato é o inverso da constante de dissociação, K_d , para a dissociação do complexo enzima-substrato ES:



$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (39)$$

Ou seja, quanto *menor* for a tendência de a enzima e seu substrato se *dissociarem*, *maior* será a afinidade da enzima por seu substrato. Ao mesmo tempo que a constante de Michaelis, K_m , frequentemente aproxima a constante de dissociação, K_d , isso não deve ser assumido, visto que nem sempre é o caso. Para uma típica reação catalisada por enzima:



O valor da $[S]$ em que $v_i = V_{máx}/2$ é

$$[S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (41)$$

Quando $k_{-1} \gg k_2$, então

$$k_{-1} + k_2 \approx k_{-1} \quad (42)$$

e

$$[S] \approx \frac{k_1}{k_{-1}} = K_d \quad (43)$$

Portanto, $1/K_m$ apenas se aproxima de $1/K_d$ em condições em que a associação e a dissociação do complexo ES são rápidas em relação à catálise. Para as muitas reações catalisadas por enzimas para as quais $k_{-1} + k_2$ **não** é aproximadamente igual a k_{-1} , $1/K_m$ subestimar $1/K_d$.

A equação de Hill descreve o comportamento das enzimas que exibem ligação cooperativa do substrato

Embora a maioria das enzimas apresente a **cinética de saturação** simples exibida na Figura 8-4 e seja adequadamente descrita pela expressão de Michaelis-Menten, algumas enzimas se ligam a seus substratos de maneira **cooperativa**, análoga à ligação do oxigênio à hemoglobina (ver Capítulo 6). O comportamento cooperativo é uma propriedade *exclusiva* das enzimas multiméricas que se ligam ao substrato em múltiplos sítios.

Para as enzimas que demonstram cooperatividade positiva ao se ligar ao substrato, o formato da curva que relaciona as alterações em v_i com as alterações em $[S]$ é sigmoideal (Figura 8-7). Nem a expressão de Michaelis-Menten, nem seus gráficos derivados podem ser utilizados para avaliar a cinética cooperativa. Portanto, os enzimologistas empregam uma representação gráfica da **equação de Hill**, originalmente derivada para descrever a ligação cooperativa do O_2 à hemoglobina. A equação (44) representa a equação de Hill disposta em uma forma que prediz uma linha reta, em que k' é uma constante complexa:

$$\frac{\log v_i}{V_{\max} - v_i} = n \log[S] - \log k' \quad (44)$$

A equação (44) demonstra que, quando $[S]$ é baixa em relação a k' , a velocidade de reação inicial aumenta como a *enésima* potência de $[S]$.

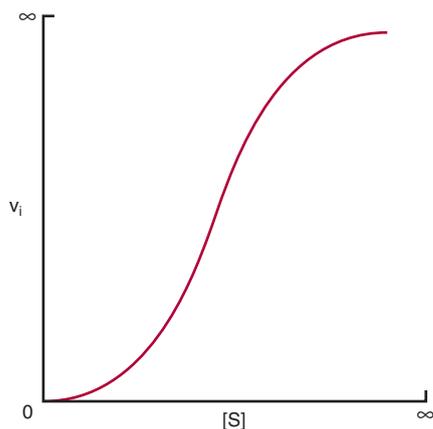


FIGURA 8-7 Representação da cinética de saturação sigmoideal do substrato.

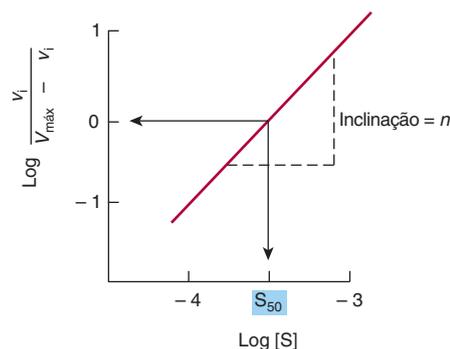


FIGURA 8-8 Uma representação gráfica de uma forma linear da equação de Hill é empregada para avaliar a S_{50} , a concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima e o grau de cooperatividade n .

Um gráfico do \log de $v_i/(V_{\max} - v_i)$ versus $\log [S]$ gera uma linha reta (Figura 8-8). A inclinação da reta, n , é o **coeficiente de Hill**, um parâmetro empírico cujo valor é uma função do número, do tipo e da força da interação dos múltiplos sítios de ligação ao substrato da enzima. Quando $n = 1$, todos os sítios de ligação se comportam de forma independente e se observa o comportamento cinético de Michaelis-Menten. Se n for maior que 1, diz-se que a enzima exibe **cooperatividade positiva**. A ligação do substrato a um sítio, então, aumenta a afinidade dos sítios restantes para ligar substratos adicionais. Quanto maior for o valor de n , maior será o grau de cooperatividade e mais acentuada será a curva sigmoide no gráfico v_i versus $[S]$. Uma perpendicular tirada desde o ponto onde o termo $y \log v_i/(V_{\max} - v_i)$ é zero faz interseção no eixo x em uma concentração de substrato denominada S_{50} , a concentração de substrato que resulta em metade da velocidade máxima. Assim, a S_{50} é análoga a P_{50} para a ligação de oxigênio na hemoglobina (ver Capítulo 6).

A ANÁLISE CINÉTICA DISTINGUE A INIBIÇÃO COMPETITIVA DA INIBIÇÃO NÃO COMPETITIVA

Os inibidores das atividades catalíticas das enzimas são tanto agentes farmacológicos quanto instrumentos de pesquisa para o estudo do mecanismo de ação da enzima. A força da interação entre um inibidor e a enzima depende de forças importantes na estrutura da proteína e na ligação do ligante (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals; ver Capítulo 5). Os inibidores podem ser classificados com base em seu sítio de ação na enzima, se modificam quimicamente a enzima, ou com base nos parâmetros cinéticos que influenciam. Os compostos que mimetizam o estado de transição de uma reação catalisada por enzima (**análogos do estado de transição**) ou que captam a vantagem do mecanismo catalítico de uma enzima (**inibidores com base no mecanismo**) podem ser inibidores particularmente potentes. Do ponto de vista cinético, diferenciam-se duas classes de inibidores com base na superação ou não da inibição, devido ao aumento da concentração de substrato.

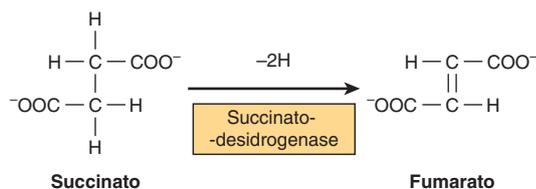


FIGURA 8-9 A reação da succinato-desidrogenase.

Os inibidores competitivos geralmente se assemelham aos substratos

Os efeitos dos inibidores competitivos podem ser superados ao elevar-se a concentração do substrato. De forma mais frequente, na inibição competitiva, o inibidor (I) liga-se à região de ligação do substrato no sítio ativo, bloqueando, assim, o acesso pelo substrato. As estruturas dos inibidores competitivos mais clássicos tendem, assim, a se assemelhar às estruturas de um substrato e, dessa maneira, são chamados de **análogos do substrato**. A inibição da enzima succinato-desidrogenase pelo malonato ilustra a inibição competitiva por um análogo do substrato. A succinato-desidrogenase catalisa a remoção de um átomo de hidrogênio de cada um dos dois carbonos metileno do succinato (Figura 8-9). Tanto o succinato quanto seu análogo estrutural malonato (OOC—CH₂—COO⁻) podem se ligar ao sítio ativo da succinato-desidrogenase, formando um complexo ES ou um complexo EI, respectivamente. No entanto, como o malonato contém apenas um carbono metileno, ele não pode sofrer desidrogenação.

A formação e a dissociação do complexo EI é um processo dinâmico descrito por



para a qual a constante de equilíbrio K_i é

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (46)$$

Na verdade, **um inibidor competitivo age ao diminuir o número de moléculas de enzima livres disponíveis para se ligar ao substrato, isto é, para formar o complexo ES e, dessa forma, mais adiante, para formar o produto**, conforme descrito adiante.

Um inibidor competitivo e o substrato exercem efeitos recíprocos sobre a concentração dos complexos EI e ES. Como a formação dos complexos ES remove a enzima livre disponível para se combinar com o inibidor, aumentar [S] *diminui* a concentração do complexo EI e *umenta* a velocidade da reação. A extensão em que [S] deve ser aumentada para superar totalmente a inibição depende da concentração de inibidor presente, de sua afinidade pela enzima (K_i) e da afinidade, K_m , da enzima por seu substrato.

Os gráficos duplo-recíprocos facilitam a avaliação dos inibidores

Em geral, os gráficos duplo-recíprocos são utilizados tanto para distinguir os inibidores competitivos dos não competitivos quanto para simplificar a avaliação das constantes de

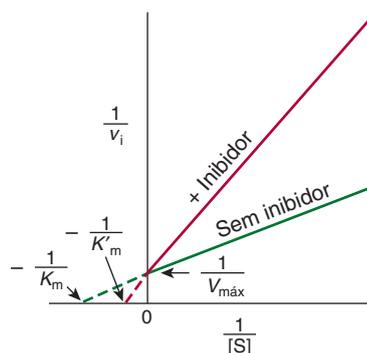


FIGURA 8-10 Gráfico de Lineweaver-Burk de inibição competitiva simples. Observe o alívio completo da inibição em alta [S] (i.e., baixo 1/[S]).

inibição. A v_i é determinada em diversas concentrações de substrato, tanto na presença quanto na ausência do inibidor. Para a inibição competitiva clássica, as linhas que conectam os pontos dos dados experimentais convergem no eixo y (Figura 8-10). Visto que a interseção com o eixo y é igual a $1/V_{\text{máx}}$, esse perfil indica que **quando $1/[S]$ se aproxima de 0, v_i é independente da presença do inibidor**. No entanto, a interseção no eixo x *varia* com a concentração do inibidor e, uma vez que $-1/K'_m$ é menor do que $-1/K_m$, K'_m (“ K_m aparente”) torna-se maior na presença de concentrações crescentes do inibidor. Dessa maneira, **um inibidor competitivo não tem efeito sobre a $V_{\text{máx}}$, porém eleva K'_m , o K_m aparente para o substrato**. Para uma inibição competitiva simples, a interseção no eixo x é

$$x = \frac{-1}{K_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (47)$$

Uma vez determinada a K_m na ausência do inibidor, K_i pode ser calculada a partir da equação (47). Os valores de K_i são utilizados para comparar diferentes inibidores da mesma enzima. Quanto *menor* for o valor de K_i , mais efetivo será o inibidor. Por exemplo, os fármacos do tipo estatina, que atuam como inibidores competitivos da HMG-CoA-redutase (ver Capítulo 26), possuem valores de K_i de várias ordens de magnitude menores que a K_m para o substrato HMG-CoA.

Os inibidores não competitivos simples diminuem a $V_{\text{máx}}$ mas não afetam a K_m

Estritamente na inibição não competitiva, a ligação do inibidor não afeta a ligação do substrato. A formação de complexos EI e EIS é, portanto, possível. No entanto, embora o complexo enzima-inibidor ainda possa se ligar ao substrato, sua eficiência para transformar o substrato em produto, refletido por $V_{\text{máx}}$, mostra-se diminuída. Os inibidores não competitivos se ligam às enzimas em sítios distintos do sítio de ligação do substrato e, em geral, comportam pouca ou nenhuma semelhança estrutural com o substrato.

Para a inibição não competitiva simples, E e EI possuem afinidades idênticas pelo substrato, e o complexo EIS gera o produto em uma velocidade desprezível (Figura 8-11). A inibição não competitiva mais complexa ocorre quando a

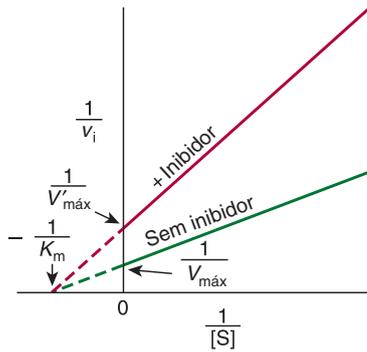


FIGURA 8-11 Gráfico de Lineweaver-Burk de uma inibição não competitiva simples.

ligação do inibidor *afeta* a afinidade aparente da enzima pelo substrato, causando a interceptação das linhas no terceiro ou quarto quadrantes de um gráfico duplo-recíproco (não mostrado). Embora determinados inibidores exibam as características de uma mistura de inibição competitiva e não competitiva, a avaliação desses inibidores excede a abrangência deste capítulo.

Gráfico de Dixon

O gráfico de Dixon é, por vezes, empregado como alternativa para o gráfico de Lineweaver-Burk para determinar as constantes de inibição. A velocidade inicial (v_i) é medida em várias concentrações do inibidor, mas em uma concentração fixa do substrato (S). Para um inibidor competitivo ou não competitivo simples, um gráfico de $1/v_i$ versus a concentração do inibidor [I] fornece uma linha reta. O experimento é repetido em diferentes concentrações fixas do substrato. O conjunto resultante de linhas faz interseção à esquerda do eixo y . Para a inibição *competitiva*, uma perpendicular traçada até o eixo x , a partir do ponto de interseção das linhas, fornece o $-K_i$ (Figura 8-12,

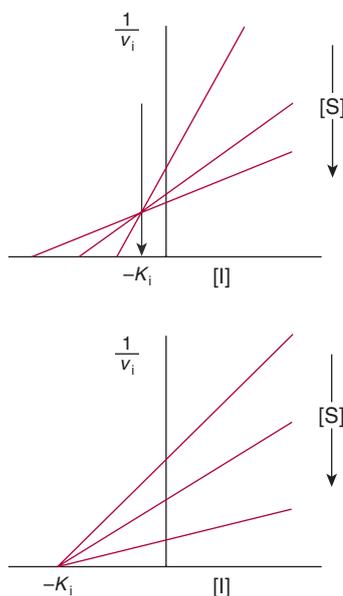


FIGURA 8-12 Aplicações dos gráficos de Dixon. Parte superior: inibição competitiva, estimativa de K_i . Parte inferior: inibição não competitiva, estimativa de K_i .

parte superior). Para a inibição *não competitiva*, a interseção no eixo x é $-K_i$ (Figura 8-12, parte inferior). Com frequência, as publicações farmacêuticas empregam os gráficos de Dixon para ilustrar a potência comparativa dos inibidores competitivos.

CI_{50}

Uma alternativa menos rigorosa ao K_i como medida da potência inibidora é a concentração do inibidor que produz 50% de inibição, a CI_{50} . Diferentemente da constante de dissociação no equilíbrio, K_i , o valor numérico da CI_{50} varia como uma função das circunstâncias específicas da concentração de substrato, etc., sob as quais ela é determinada.

Inibidores firmemente ligados

Alguns inibidores se ligam às enzimas com uma afinidade tão alta, $K_i \leq 10^{-9}$ M, que a concentração do inibidor necessária para medir K_i cai abaixo da concentração da enzima geralmente presente em um ensaio. Sob essas circunstâncias, uma fração significativa do inibidor total pode estar presente como um complexo EI. Nesse caso, isso vai contra a suposição, implícita na cinética de estado de equilíbrio clássica, de que a concentração de inibidor livre não depende da concentração da enzima. A análise cinética desses inibidores firmemente ligados requer equações cinéticas especializadas que incorporam a concentração da enzima para estimar a K_i ou a CI_{50} e para diferenciar os inibidores competitivos dos não competitivos firmemente ligados.

Os inibidores irreversíveis “envenenam” as enzimas

Nos exemplos anteriores, os inibidores formam um complexo dinâmico dissociável com a enzima. A enzima totalmente ativa pode, portanto, ser recuperada simplesmente ao remover o inibidor do meio adjacente. No entanto, vários outros inibidores agem de forma *irreversível* ao modificar quimicamente a enzima. Em geral, essas modificações envolvem fazer ou romper ligações covalentes com resíduos aminoácil essenciais para a ligação do substrato, a catálise ou a manutenção da conformação funcional da enzima. Como essas ligações covalentes são relativamente estáveis, uma enzima que foi “envenenada” por um inibidor irreversível, como um átomo de metal pesado ou um reagente acilante, permanece inibida mesmo depois da remoção do inibidor remanescente do meio adjacente.

Inibição com base no mecanismo

Os inibidores “com base no mecanismo” ou “suicidas” são análogos especializados do substrato que contêm um grupo químico que pode ser transformado pelo mecanismo catalítico da enzima-alvo. Depois de se ligar ao sítio ativo, a catálise pela enzima gera um grupamento altamente reativo que forma uma ligação covalente com **um resíduo cataliticamente essencial e bloqueia a função deste**. A especificidade e a persistência dos inibidores suicidas, que são específicos para a enzima e não são reativos fora dos limites do sítio ativo da enzima, os tornam líderes promissores para o desenvolvimento

de fármacos específicos para uma determinada enzima. A análise cinética dos inibidores suicidas está além do escopo deste capítulo. Nem a abordagem de Lineweaver-Burk nem a de Dixon são aplicáveis, pois os inibidores suicidas violam uma condição limitante primordial comum a ambas as abordagens: a atividade da enzima não diminui durante o curso do ensaio.

A MAIORIA DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS ENVOLVE DOIS OU MAIS SUBSTRATOS

Embora diversas enzimas tenham um único substrato, muitas outras possuem dois – e por vezes mais – substratos e produtos. Os princípios fundamentais anteriormente discutidos, embora ilustrados por enzimas com substrato único, também se aplicam a enzimas com múltiplos substratos. As expressões matemáticas utilizadas para avaliar as reações de múltiplos substratos são, no entanto, complexas. Embora uma análise detalhada da gama total das reações com múltiplos substratos exceda o escopo deste capítulo, alguns tipos comuns de comportamento cinético para reações de dois substratos, as reações de dois produtos (denominadas reações “Bi-Bi”), são considerados adiante.

Reações sequenciais ou de deslocamento único

Nas **reações sequenciais**, ambos os substratos devem se combinar com a enzima para formar um complexo ternário antes que a catálise possa prosseguir (Figura 8-13, parte superior). As reações sequenciais são por vezes referidas como reações de deslocamento único, porque o grupamento que sofre a transferência comumente é passado de maneira direta, em uma única etapa, de um substrato para o outro. As reações Bi-Bi sequenciais podem ser adicionalmente diferenciadas com base em se os dois substratos se somam em uma ordem **aleatória** ou em uma ordem **compulsória**. Para as reações de ordem aleatória, tanto o substrato A quanto o substrato B podem se combinar primeiramente com a enzima para formar um complexo EA ou um complexo EB (Figura 8-13, centro). Para as reações de ordem compulsória, A deve se combinar primeiramente com E antes que B possa se combinar com o complexo EA. Uma explicação sobre a razão pela qual algumas enzimas empregam mecanismos de ordem compulsória pode ser encontrada na hipótese de adaptação induzida de Koshland: a adição de A induz uma alteração conformacional na enzima que alinha os resíduos que reconhecem e ligam B.

Reações em pingue-pongue

O termo “**pingue-pongue**” aplica-se aos mecanismos em que um ou mais produtos são liberados a partir da enzima antes que todos os substratos tenham sido adicionados. As reações em pingue-pongue envolvem a catálise covalente e uma forma modificada transitória da enzima (ver Figura 7-4). As reações Bi-Bi em pingue-pongue são frequentemente referidas como **reações de deslocamento duplo**. O grupamento que sofre a

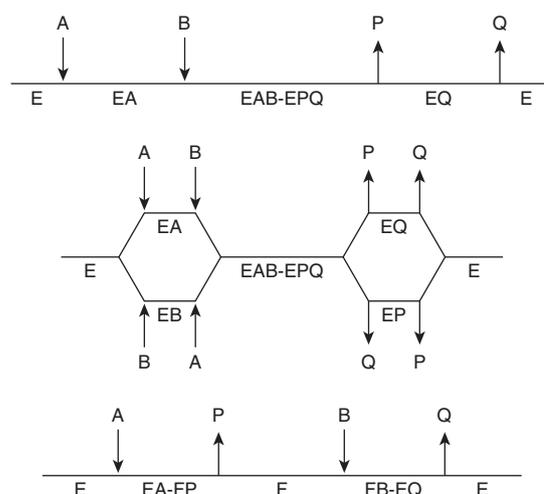


FIGURA 8-13 Representações de três classes de mecanismos de reação Bi-Bi. As linhas horizontais representam a enzima. As setas indicam a adição de substratos e a liberação de produtos. **Parte superior:** uma reação Bi-Bi ordenada, característica de muitas oxidoredutases NAD(P)H-dependentes. **Centro:** uma reação Bi-Bi aleatória, característica de muitas cinases e algumas desidrogenases. **Parte inferior:** uma reação em pingue-pongue, característica de aminotransferases e serinas proteases.

transferência é primeiramente deslocado do substrato A pela enzima para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). A transferência do grupamento subsequente de F para o segundo substrato B, formando o produto Q e regenerando E, constitui o segundo deslocamento (Figura 8-13, parte inferior).

A maioria das reações Bi-Bi obedece à cinética de Michaelis-Menten

A maioria das reações Bi-Bi obedece a uma forma um pouco mais complexa da cinética de Michaelis-Menten, na qual $V_{\text{máx}}$ se refere à velocidade da reação atingida quando *ambos* os substratos estão presentes em níveis saturantes. Cada substrato possui seu próprio valor de K_m característico, o qual corresponde à concentração que fornece metade da velocidade máxima quando o segundo substrato está presente em níveis saturantes. Da mesma forma que para as reações de substrato único, os gráficos duplo-recíprocos podem ser empregados para determinar a $V_{\text{máx}}$ e a K_m . A v_i é medida como uma função da concentração de um substrato (o substrato variável), ao passo que a concentração do outro substrato (o substrato fixo) é mantida constante. Quando as linhas obtidas para diversas concentrações de substrato fixo são plotadas no mesmo gráfico, é possível diferenciar um mecanismo de pingue-pongue, que fornece linhas paralelas (Figura 8-14), de um mecanismo sequencial, que proporciona um padrão de linhas em interseção (não mostrado).

Os **estudos de inibição de produto** são utilizados para complementar as análises cinéticas e para diferenciar entre as reações Bi-Bi ordenadas e aleatórias. Por exemplo, em uma reação Bi-Bi aleatória, cada produto agiria como um inibidor competitivo na ausência de seus coprodutos, independentemente de qual substrato é designado como o substrato variável.

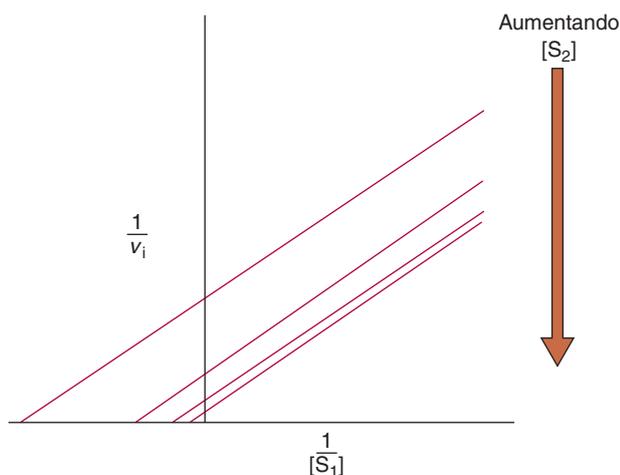


FIGURA 8-14 Gráfico de Lineweaver-Burk para uma reação em pingue-pongue de dois substratos. O aumento da concentração de um substrato (S_1), enquanto mantém constante a do outro substrato (S_2), altera a interseção com os eixos x e y , mas não a inclinação.

No entanto, para um mecanismo sequencial (Figura 8-13, parte superior), apenas o produto Q fornecerá o padrão indicativo da inibição competitiva quando A é o substrato variável, ao passo que apenas o produto P produzirá esse padrão com B como o substrato variável. As outras combinações do inibidor do produto e do substrato variável produzirão formas de inibição não competitiva complexa.

O CONHECIMENTO DE CINÉTICA, MECANISMO E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA AUXILIA NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Muitos fármacos agem como inibidores enzimáticos

O objetivo da farmacologia é identificar agentes que possam:

1. Destruir ou comprometer o crescimento, a característica invasiva ou o desenvolvimento dos patógenos invasores.
2. Estimular os mecanismos de defesa endógenos.
3. Conter ou impedir os processos moleculares anormais disparados por estímulos genéticos, ambientais ou biológicos com perturbação mínima das funções celulares normais do hospedeiro.

Em virtude de seus diversos papéis fisiológicos e do alto grau de seletividade do substrato, as enzimas constituem alvos naturais para o desenvolvimento de agentes farmacológicos que são potentes e específicos. Por exemplo, os fármacos do tipo estatina diminuem a produção de colesterol ao inibir a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A-redutase (ver Capítulo 26), ao passo que a entricitabina e o fumarato de disoproxil tenofovir bloqueiam a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ao inibir a transcriptase reversa viral (ver

Capítulo 34). O tratamento farmacológico da hipertensão frequentemente inclui a administração de um inibidor da enzima conversora da angiotensina, diminuindo, assim, o nível de angiotensina II, um vasoconstritor (ver Capítulo 42).

A cinética da enzima define as condições de triagem apropriadas

A cinética enzimática desempenha um papel crucial na descoberta de fármacos. O conhecimento do comportamento cinético da enzima de interesse é necessário, em primeiro lugar, para selecionar as condições apropriadas do ensaio para detectar a presença de um inibidor. Por exemplo, a concentração do substrato deve ser ajustada de modo que seja produzida quantidade suficiente de produto para permitir a detecção fácil da atividade da enzima, sem ser tão alta que mascare a presença do inibidor. Em segundo lugar, a cinética da enzima fornece o meio para quantificar e comparar a potência de diferentes inibidores e definir a sua modalidade de ação. Os inibidores não competitivos são particularmente desejáveis, uma vez que – em contrapartida aos inibidores competitivos – seus efeitos nunca podem ser totalmente superados por aumentos na concentração de substrato.

A maioria dos fármacos é metabolizada *in vivo*

O desenvolvimento de fármacos muitas vezes envolve mais que a avaliação cinética da interação dos inibidores com a enzima-alvo. Com o objetivo de minimizar a sua dosagem efetiva, e consequentemente o potencial para efeitos colaterais danosos, um fármaco precisa ser resistente à degradação por enzimas presentes no paciente ou no patógeno, um processo chamado de **metabolismo de fármacos**. Por exemplo, a penicilina e outros antibióticos β -lactâmicos bloqueiam a síntese da parede celular ao inativar, de forma irreversível, a enzima alanil-alanina-carboxipeptidase-transpeptidase. Contudo, muitas bactérias produzem β -lactamases que hidrolisam a função β -lactâmica crítica na penicilina e nos fármacos relacionados. Uma estratégia para superar a resistência antibiótica resultante consiste em administrar simultaneamente um inibidor da β -lactamase com um antibiótico β -lactâmico.

A transformação metabólica é, por vezes, necessária para converter um precursor medicamentoso inativo, ou **pró-fármaco**, em sua forma biologicamente ativa (ver Capítulo 47). O ácido 2'-desoxi-5-fluorouridílico, um potente inibidor da timidilato-sintase, um alvo comum da quimioterapia contra o câncer, é produzido a partir da 5-fluoruracil por meio de uma série de transformações enzimáticas catalisadas por uma fosforribosil-transferase e pelas enzimas da via de salvamento do desoxirribonucleosídeo (ver Capítulo 33). O projeto efetivo e a administração de profármacos exigem o conhecimento da cinética e dos mecanismos das enzimas responsáveis por transformá-los em suas formas biologicamente ativas.

RESUMO

- O estudo da cinética da enzima – os fatores que afetam as velocidades das reações catalisadas por enzima – revela as etapas individuais pelas quais as enzimas transformam os substratos em produtos.

- A ΔG , a variação geral na energia livre de uma reação, independe do mecanismo da reação e não fornece informações relacionadas às velocidades das reações.
- A K_{eq} , a razão das constantes de velocidade da reação, pode ser calculada a partir das concentrações de substratos e produtos em equilíbrio ou a partir da razão k_1/k_{-1} . As enzimas não afetam a K_{eq} .
- As reações prosseguem via estados de transição, cuja formação da energia de ativação é referida como ΔG_p . A temperatura, a concentração de íons hidrogênio, a concentração de enzimas, a concentração de substratos e inibidores afetam, sem exceção, as velocidades das reações catalisadas por enzimas.
- Em geral, a medida da velocidade de uma reação catalisada por enzima emprega condições de velocidade inicial, para que a virtual ausência de produtos efetivamente se oponha à ocorrência da reação inversa.
- As formas lineares da equação de Michaelis-Menten simplificam a determinação da K_m e da $V_{máx}$.
- Uma forma linear da equação de Hill é utilizada para avaliar a cinética de ligação cooperativa do substrato exibida por algumas enzimas multiméricas. A inclinação n , o coeficiente de Hill, reflete a quantidade, a natureza e a força das interações dos sítios de ligação ao substrato. Um valor de n maior que 1 indica cooperatividade positiva.
- Os efeitos dos inibidores competitivos simples, que geralmente se assemelham aos substratos, são superados pela elevação da concentração do substrato. Os inibidores não competitivos simples diminuem a $V_{máx}$, mas não afetam a K_m .
- Para inibidores competitivos e não competitivos simples, a constante de inibição K_i é igual à constante de dissociação no equilíbrio para o complexo enzima-inibidor relevante. Um termo mais simples e menos rigoroso amplamente utilizado em publicações farmacêuticas para avaliar a efetividade de um inibidor é o CI_{50} , a concentração de inibidor que produz 50% de inibição em determinadas condições de um experimento.
- Os substratos podem ser acrescentados em ordem aleatória (qualquer substrato pode se combinar em primeiro lugar com a

enzima) ou em ordem compulsória (o substrato A deve ligar-se antes do substrato B).

- Nas reações em pingue-pongue, um ou mais produtos são liberados da enzima antes que os substratos tenham sido adicionados.
- A aplicação da cinética enzimática facilita a identificação, a caracterização e a elucidação do mecanismo de ação de fármacos que inibem seletivamente uma enzima específica.
- A cinética enzimática exerce um papel fundamental na análise e na otimização do metabolismo de fármacos, um determinante essencial na eficácia de fármacos.

REFERÊNCIAS

- Cook PF, Cleland WW: *Enzyme Kinetics and Mechanism*. Garland Science, 2007.
- Copeland RA: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. John Wiley & Sons, 2005.
- Cornish-Bowden A: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press Ltd, 2004.
- Dixon M: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170.
- Dixon M: The graphical determination of K_m and K_i . *Biochem J* 1972;129:197.
- Fersht A: *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. Freeman, 1999.
- Fraser CM, Rappuoli R: Application of microbial genomic science to advanced therapeutics. *Annu Rev Med* 2005;56:459.
- Henderson PJF: A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem J* 1972;127:321.
- Schramm, VL: Enzymatic transition-state theory and transition-state analogue design. *J Biol Chem* 2007;282:28297.
- Schultz AR: *Enzyme Kinetics: From Diastase to Multi-enzyme Systems*. Cambridge University Press, 1994.
- Segel IH: *Enzyme Kinetics*. Wiley Interscience, 1975.
- Wlodawer A: Rational approach to AIDS drug design through structural biology. *Annu Rev Med* 2002;53:595.

Enzimas: regulação das atividades

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar o conceito de homeostasia corporal total e sua resposta às flutuações do ambiente externo.
- Discutir por que as concentrações celulares dos substratos para a maioria das enzimas tendem a ficar próximas de K_m .
- Listar os múltiplos mecanismos pelos quais se alcança o controle ativo do fluxo de metabólitos.
- Descrever as vantagens de determinadas enzimas serem elaboradas como pró-enzimas.
- Ilustrar os eventos fisiológicos que induzem a conversão de uma proenzima na enzima ativa correspondente.
- Especificar as alterações estruturais típicas que acompanham a conversão de uma proenzima na enzima ativa.
- Descrever as características básicas de um sítio de ligação comum para metabólitos e mensageiros secundários que regulam a atividade catalítica de determinadas enzimas.
- Indicar duas maneiras genéricas pelas quais um efetor alostérico pode modificar a atividade catalítica.
- Delinear os papéis das proteínas-cinase, das proteínas-fosfatase e de mensageiros reguladores e hormonais, bem como dos segundos mensageiros na regulação de um processo metabólico.
- Explicar como os requisitos de substrato das enzimas lisina-acetiltransferase e das sirtuínas podem desencadear alterações no grau de acetilação da lisina de enzimas metabólicas.
- Descrever duas vias pelas quais as redes reguladoras podem ser construídas nas células.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O fisiologista do século XIX Claude Bernard enunciou a base conceitual para a regulação metabólica. Ele observou que os organismos vivos respondem de maneira quantitativa e temporal apropriada que os permite sobreviverem aos múltiplos desafios impostos por mudanças em seus ambientes externo e interno. Subsequentemente, Walter Cannon cunhou o termo “homeostasia” para descrever a capacidade dos animais de manterem um ambiente intracelular constante, apesar das alterações em seus ambientes externos. Atualmente, sabe-se que os organismos respondem às alterações em seus ambientes externo e interno por meio de ajustes balanceados e

coordenados nas velocidades de reações metabólicas específicas. Os intermediários metabólicos, como 5'-AMP e NAD^+ , assim como bioprodutos, como espécies reativas de oxigênio, servem como indicadores internos do estado da célula. Cascatas de transdução de sinal conectam os receptores que “percebem” fatores externos com proteínas intracelulares apropriadas para iniciar as respostas adaptativas.

As perturbações da maquinaria sensor-resposta, responsável por manter o equilíbrio homeostático, podem ser prejudiciais à saúde humana. Câncer, diabetes, fibrose cística e doença de Alzheimer, por exemplo, são todas caracterizadas por disfunções reguladoras desencadeadas pela interação entre agentes patogênicos, mutações genéticas, insumos nutricionais

e hábitos de vida. Muitos vírus oncogênicos produzem proteínas tirosinas-cinase que modificam os eventos reguladores que controlam os padrões da expressão genética, contribuindo para o início e a progressão do câncer. A toxina do *Vibrio cholerae*, o agente etiológico do cólera, incapacita as vias de sensor-resposta nas células epiteliais intestinais por meio da ADP-ribosilação das proteínas de ligação ao GTP (proteínas G), as quais ligam os receptores da superfície celular à adenilato-ciclase. A consequente ativação da ciclase leva a um fluxo irrestrito de água para dentro do intestino, resultando em diarreia maciça e desidratação. A *Yersinia pestis*, o agente etiológico da peste, produz uma proteína tirosina-fosfatase que hidrolisa os grupamentos fosforil de proteínas citoesqueléticas primordiais. Acredita-se que as disfunções nos sistemas proteolíticos responsáveis pela degradação de proteínas defeituosas ou anormais exerçam um papel em doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson. Além de suas funções imediatas como reguladores da atividade enzimática, degradação proteica, etc., as modificações covalentes, como fosforilação, acetilação e ubiquitinação, estabelecem um código com base em proteínas para o armazenamento e a transmissão hereditária da informação (ver Capítulo 35). Esses sistemas de informação independentes de DNA são referidos como **epigenéticos**. O conhecimento dos fatores que controlam as velocidades das reações catalisadas por enzimas é, dessa forma, essencial para a compreensão da base molecular da doença e de sua transmissão. Este capítulo estabelece os padrões pelos quais os processos metabólicos são controlados e fornece exemplos ilustrativos. Os capítulos subsequentes fornecem exemplos adicionais.

A REGULAÇÃO DO FLUXO DE METABÓLITOS PODE SER ATIVA OU PASSIVA

As enzimas que operam em suas velocidades máximas não podem aumentar o rendimento para acomodar picos de disponibilidade de substrato e podem responder apenas a reduções abruptas na concentração de substrato. Os valores de K_m para a maioria das enzimas, portanto, tendem a ser próximos à concentração intracelular média de seus substratos, de modo que as alterações na concentração do substrato gerem alterações correspondentes no fluxo de metabólitos (Figura 9-1).

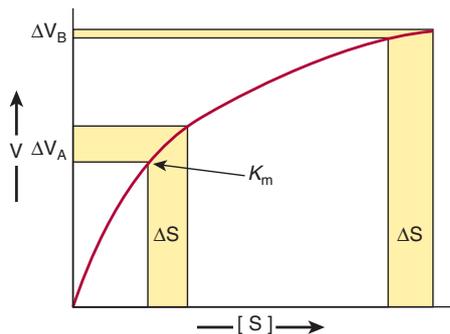


FIGURA 9-1 Resposta diferencial da velocidade de uma reação catalisada por enzima, ΔV , para a mesma mudança gradual na concentração do substrato, ΔS , em uma concentração de substrato próxima da K_m (ΔV_A) ou muito acima da K_m (ΔV_B).

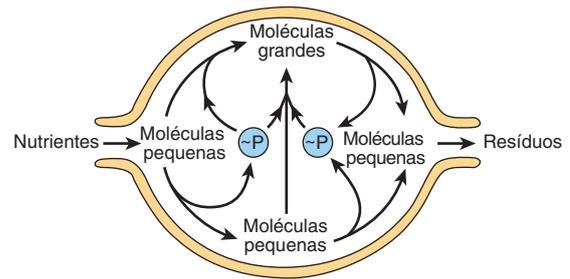


FIGURA 9-2 Uma célula idealizada em estado de equilíbrio. O fluxo de metabólitos é unidirecional.

As respostas às alterações nos níveis de substrato representam uma forma importante, mas *passiva*, de coordenar o fluxo de metabólitos. No entanto, sua capacidade de responder às mudanças em variáveis ambientais são limitadas. Os mecanismos que regulam a eficiência da enzima de maneira *ativa* em resposta aos sinais internos e externos são discutidos adiante.

O fluxo de metabólitos tende a ser unidirecional

Apesar da existência de oscilações de curto prazo nas concentrações dos metabólitos e nos níveis enzimáticos, as células vivas existem em um estado de equilíbrio dinâmico, no qual as concentrações médias dos intermediários metabólicos permanecem relativamente constantes com o tempo. Embora todas as reações químicas sejam reversíveis em alguma extensão, nas células vivas os produtos de reação servem como substratos para – e são removidos por – outras reações catalisadas por enzima (Figura 9-2). Muitas reações nominalmente reversíveis ocorrem, dessa forma, de modo unidirecional. Essa sucessão de reações metabólicas acopladas é acompanhada por uma mudança *geral* na energia livre, que favorece o fluxo unidirecional de metabólitos, análogo ao fluxo de água através de um tubo no qual uma extremidade está mais baixa do que a outra. As curvas ou dobras no cano simulam as etapas individuais catalisadas por enzimas com uma pequena variação negativa ou positiva na energia livre. Contudo, o fluxo de água pelo cano permanece unidirecional devido à variação total na altura, a qual corresponde à variação total na energia livre em um percurso (Figura 9-3).

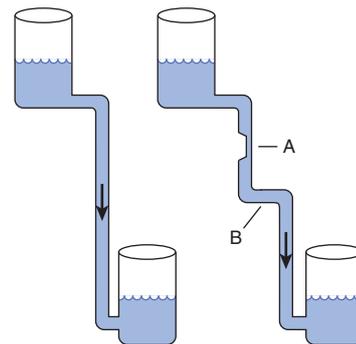


FIGURA 9-3 Analogia hidrostática para uma via com uma etapa limitante de velocidade (A) e uma etapa com um valor de ΔG próximo a 0 (B).

A COMPARTIMENTALIZAÇÃO ASSEGURA A EFICIÊNCIA METABÓLICA E SIMPLIFICA A REGULAÇÃO

Em eucariotos, as vias anabólicas e catabólicas que sintetizam e degradam biomoléculas comuns são, com frequência, fisicamente separadas uma da outra. Certas vias metabólicas residem apenas dentro de tipos celulares especializados ou em compartimentos subcelulares distintos de uma célula. Por exemplo, muitas das enzimas que degradam proteínas e polissacarídeos residem dentro de organelas, chamadas de lisossomos. De modo similar, a biossíntese dos ácidos graxos ocorre no citosol, ao passo que a oxidação dos ácidos graxos acontece dentro das mitocôndrias (ver Capítulos 22 e 23). De forma conveniente, muitas vias aparentemente antagonônicas podem coexistir na ausência de barreiras físicas, desde que a termodinâmica imponha que cada uma prosiga com a formação de um ou mais *intermediários únicos*. Para qualquer reação ou série de reações, a variação na energia total que ocorre quando o fluxo do metabólito prossegue na direção “direta” é igual em magnitude, *porém com sinal oposto*, à variação necessária para prosseguir na direção inversa. Algumas enzimas dentro dessas vias catalisam reações, como isomerizações, que podem atuar como catalisadores bidirecionais *in vivo*, pois a diferença na energia livre entre substratos e produtos fica próxima a zero. Contudo, elas representam a exceção, em vez da regra. Quase todas as vias metabólicas prosseguem por meio de uma ou mais etapas para as quais ΔG é significativo. Por exemplo, a glicólise, que é a clivagem da glicose para formar duas moléculas de piruvato, tem um ΔG total favorável de -96 kJ/mol, um valor muito grande para simplesmente operar na direção “inversa” quando se deseja converter o excesso de piruvato em glicose. Como consequência, a gliconeogênese prossegue por uma via em que as três etapas mais desfavorecidas do ponto de vista energético na glicólise são substituídas por novas reações catalisadas por enzimas distintas (ver Capítulo 19).

A capacidade das enzimas de discriminarem entre as coenzimas estruturalmente similares NAD^+ e NADP^+ também resulta em uma forma de compartimentalização. Os potenciais de redução das duas coenzimas são similares. No entanto, quase todas as enzimas que catalisam reações que geram os elétrons destinados à cadeia de transporte de elétrons reduzem NAD^+ , ao passo que as enzimas que catalisam as etapas redutoras em muitas vias biossintéticas geralmente usam NADPH como doador de elétrons.

O controle de uma enzima que catalisa uma reação limitante da velocidade regula uma via metabólica inteira

Embora o fluxo de metabólitos pelas vias metabólicas envolva a catálise por inúmeras enzimas, o controle ativo da homeostasia é realizado pela regulação apenas de um seletivo subgrupo de enzimas. A enzima ideal para a intervenção reguladora é aquela cuja quantidade ou eficiência catalítica dita que a reação por ela catalisada é lenta em relação a todas as outras na via. Diminuir a eficiência catalítica ou a quantidade do catalisador responsável pelo “gargalo” ou pela **reação limitante da velocidade** reduz imediatamente o fluxo de metabólitos por toda a via.

Em contrapartida, um aumento em sua quantidade ou em sua eficiência catalítica aumenta o fluxo pela via como um todo. Por exemplo, a acetil-CoA-carboxilase catalisa a síntese da malonil-CoA, a primeira reação comprometida com a biossíntese dos ácidos graxos (ver Capítulo 23). Quando a síntese da malonil-CoA é inibida, as reações subsequentes da síntese dos ácidos graxos cessam pela ausência de substrato. Como “controladoras” naturais do fluxo metabólico, as enzimas que catalisam as etapas limitantes da velocidade também constituem alvos eficientes para a intervenção reguladora pelos fármacos. Por exemplo, as “estatinas” são fármacos que reduzem a síntese de colesterol por inibir a HMG-CoA-redutase, enzima catalisadora da reação limitante da velocidade da colesterologênese.

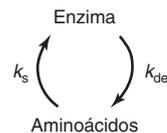
REGULAÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMAS

A capacidade catalítica da reação limitante da velocidade em uma via metabólica é o produto da concentração das moléculas de enzima e sua eficiência catalítica intrínseca. Portanto, a capacidade catalítica pode ser controlada com a variação da quantidade de enzimas presentes, com a alteração de sua eficiência catalítica intrínseca ou com a combinação de ambas.

As proteínas são sintetizadas e degradadas de maneira contínua

Ao medir as taxas de incorporação de aminoácidos marcados no ^{15}N em proteínas e as taxas de perda de ^{15}N das proteínas, Schoenheimer deduziu que as proteínas existem em um estado de “equilíbrio dinâmico” dentro de nosso organismo, onde elas são continuamente sintetizadas e degradadas – processo chamado de **turnover proteico**. Isso é válido inclusive para as proteínas **constitutivas**, cujas concentrações permanecem essencialmente constantes ao longo do tempo. Por outro lado, as concentrações de muitas enzimas são influenciadas por uma ampla gama de fatores fisiológicos, hormonais ou nutricionais.

A quantidade absoluta de uma enzima reflete o equilíbrio global entre sua velocidade de síntese e sua velocidade de degradação. Nos seres humanos, as alterações nos níveis de enzimas específicas podem ser efetuadas por uma mudança na constante de velocidade para os processos globais de síntese (k_s), degradação (k_{deg}) ou ambos.



Controle da síntese enzimática

A síntese de determinadas enzimas depende da presença de **indutores**, geralmente substratos ou compostos quimicamente relacionados, que estimulam a transcrição do gene que os codificam (ver Capítulos 36 e 37). A *Escherichia coli* cultivada em meio com glicose, por exemplo, cataboliza apenas a lactose depois da adição de um β -galactosídeo, um indutor que provoca a síntese de uma β -galactosidase e de uma galactosídeo-permease. As enzimas induzíveis dos seres humanos incluem triptofano-pirrolase, treonina-desidratase,

tirosina- α -cetoglutarato-aminotransferase, enzimas do ciclo da ureia, HMG-CoA-redutase, δ -aminolevulinato-sintase e enzimas citocromo P450. Em contrapartida, o excesso de um metabólito pode impedir a síntese de sua enzima cognata por meio da **repressão**. Tanto a indução quanto a repressão envolvem elementos *cis*, sequências de DNA específicas localizadas a montante dos genes regulados, e proteínas reguladoras *trans*. Os mecanismos moleculares de indução e repressão são discutidos no Capítulo 38. A síntese de outras enzimas pode ser estimulada por **fatores de transcrição**, cuja atividade é controlada pela interação de hormônios e outros sinais extracelulares com receptores de superfície celular específicos. As informações detalhadas sobre o controle da síntese proteica em resposta aos estímulos hormonais podem ser encontradas no Capítulo 42.

Controle da degradação de enzimas

Em animais, muitas proteínas são degradadas pela via da ubiquitina-proteossomo, cuja descoberta laureou Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose com um Prêmio Nobel. A degradação ocorre no proteossomo 26S, um complexo macromolecular constituído por mais de 30 subunidades polipeptídicas dispostas na forma de um cilindro oco. Os sítios ativos de suas subunidades proteolíticas se localizam no interior do cilindro, prevenindo a degradação indiscriminada de proteínas celulares (ver fotografia da capa). As proteínas são direcionadas para o interior do proteossomo por “ubiquitinação”, a ligação covalente de uma ou mais moléculas de ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína pequena, com aproximadamente 8,5 kDa, que é altamente conservada entre os eucariotos. A ubiquitinação é catalisada por uma grande família de enzimas, chamada de ligases E3, que ligam a ubiquitina aos grupamentos amino da cadeia lateral de resíduos lisil.

A via ubiquitina-proteossomo é responsável pela degradação regulada de proteínas celulares selecionadas, como, por exemplo, ciclinas (ver Capítulo 35), e pela remoção de espécies proteicas defeituosas ou aberrantes. A chave para a versatilidade e a seletividade do sistema ubiquitina-proteossomo reside na variedade de ligases E3 intracelulares e na capacidade de elas discriminarem entre os diferentes estados físicos ou conformacionais das proteínas-alvo. Dessa maneira, a via da ubiquitina-proteossomo pode degradar seletivamente as proteínas cujas integridade física e competência funcional foram comprometidas pela perda ou dano de um grupamento prostético, pela oxidação de resíduos de cisteína ou histidina ou pela desamidação dos resíduos asparagina ou glutamina (ver Capítulo 58). O reconhecimento pelas enzimas proteolíticas também pode ser regulado por modificações covalentes, como a fosforilação; ligação de substratos ou efetores alostéricos; ou associação a membranas, oligonucleotídeos ou outras proteínas. Um conjunto crescente de evidências sugere que as disfunções da via ubiquitina-proteossomo contribuem para o acúmulo de proteínas malformadas, características de várias doenças neurodegenerativas.

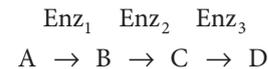
MÚLTIPLAS OPÇÕES ESTÃO DISPONÍVEIS PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA

Nos seres humanos, a indução da síntese proteica é um processo complexo de múltiplas etapas que, em geral, requer horas

para produzir alterações significativas no nível enzimático total. Em contrapartida, as alterações na eficiência catalítica intrínseca efetuadas pela ligação de ligantes dissociáveis (**regulação alostérica**) ou por **modificação covalente** levam à regulação da atividade enzimática dentro de segundos. Consequentemente, as alterações nos níveis de proteína, em geral, ocorrem em situações que requerem adaptações a longo prazo, ao passo que as alterações na eficiência catalítica são mais adequadas para as alterações rápidas e transitórias no fluxo de metabólitos.

OS EFETORES ALOSTÉRICOS REGULAM DETERMINADAS ENZIMAS

A inibição por retroalimentação refere-se ao processo pelo qual o produto final de uma via de biossíntese com múltiplas etapas se liga e inibe uma enzima que catalisa uma das etapas iniciais da via. Na maioria dos casos, inibidores por retroalimentação inibem a enzima que catalisa o primeiro passo em uma sequência biossintética em particular. No exemplo a seguir, a biossíntese de D a partir de A é catalisada pelas enzimas Enz_1 a Enz_3 :



As altas concentrações de D inibem a conversão de A em B. Nesse exemplo, o inibidor por retroalimentação D age como um **efetor alostérico negativo** da Enz_1 . A inibição resulta não do acúmulo de intermediários, mas da capacidade de D de se ligar e inibir a Enz_1 . De modo geral, D liga-se em um **sítio alostérico**, um sítio espacialmente distinto do sítio catalítico da enzima-alvo. Dessa forma, os inibidores por retroalimentação geralmente comportam pouca ou nenhuma semelhança estrutural com os substratos das enzimas que eles inibem. Por exemplo, o NAD^+ e o 3-fosfoglicerato, os substratos da 3-fosfoglicerato-desidrogenase, que catalisa a primeira etapa comprometida na biossíntese da serina, não possuem semelhança com o inibidor por retroalimentação serina. Nas vias de biossíntese ramificadas, como aquelas responsáveis pela biossíntese de nucleotídeos (ver Capítulo 33), as reações iniciais fornecem os intermediários necessários para a síntese de múltiplos produtos finais. A **Figura 9-4** mostra uma via de biossíntese ramificada hipotética, na qual as setas curvas conduzem a partir dos inibidores por retroalimentação para as enzimas cujas atividades eles inibem. Cada uma das sequências $S_3 \rightarrow A$, $S_4 \rightarrow B$, $S_4 \rightarrow C$ e $S_5 \rightarrow D$ representa as sequências de reação lineares que são inibidas por retroalimentação por seus produtos finais. Assim,

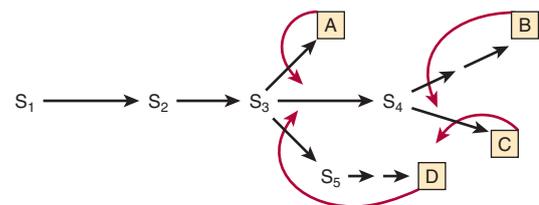


FIGURA 9-4 Sítios de inibição por retroalimentação em uma via de biossíntese ramificada. S_1 a S_5 são intermediários na biossíntese dos produtos finais A a D. As setas retas representam enzimas que catalisam as conversões indicadas. As setas curvas vermelhas representam alças de retroalimentação e indicam os sítios de inibição por retroalimentação por meio de produtos finais específicos.

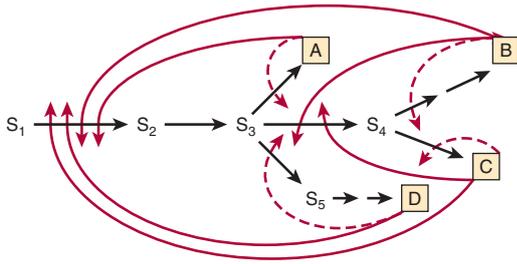


FIGURA 9-5 Múltiplas inibições por retroalimentação em uma via de biossíntese ramificada. Há sobreposição sobre as alças de retroalimentação simples (setas vermelhas tracejadas) de múltiplas alças de retroalimentação (setas vermelhas sólidas) que regulam as enzimas comuns à biossíntese de diversos produtos finais.

as enzimas dos pontos de ramificação podem ser orientadas para dirigir fases posteriores do fluxo de metabólitos.

A cinética da inibição por retroalimentação pode ser competitiva, não competitiva, parcialmente competitiva ou mista. Múltiplas alças de retroalimentação em camadas podem proporcionar um controle fino adicional. Por exemplo, conforme demonstrado na **Figura 9-5**, a presença de excesso de produto B diminui a necessidade de substrato S_2 . Contudo, o S_2 também é necessário para a síntese de A, C e D. Portanto, para essa via, o excesso de B impede a síntese de todos os quatro produtos finais, independentemente da necessidade dos outros três. Para evitar essa dificuldade potencial, cada produto final pode inibir a atividade catalítica apenas *parcialmente*. O efeito de um excesso de dois ou mais produtos finais pode ser estritamente aditivo ou, de modo alternativo, maior que os seus efeitos individuais (inibição por retroalimentação cooperativa). Como alternativa, por exemplo, da via ramificada responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em bactérias, múltiplas isoformas de uma enzima evoluíram, e cada uma delas é sensível à via de um produto final diferente. Altos níveis de qualquer um dos produtos finais inibirão a catálise por apenas uma única isoforma, reduzindo, mas não eliminando, o fluxo através da porção compartilhada da via.

A aspartato-transcarbamoilase é um modelo de enzima alostérica

A aspartato-transcarbamoilase (ATCase), o catalisador da primeira reação exclusiva para a biossíntese de pirimidinas (ver Figura 33-9), é um alvo da regulação por retroalimentação por dois nucleotídeos trifosfatos: trifosfato de citidina (CTP) e trifosfato de adenosina (ATP). O CTP, um produto final da via de biossíntese de pirimidinas, inibe a ATCase, ao passo que o nucleotídeo purínico ATP a ativa. Além disso, os altos níveis de ATP podem superar a inibição pelo CTP, possibilitando que a síntese de nucleotídeos *pirimidinas* prossiga quando os níveis de nucleotídeos *purinas* estiverem elevados.

Os sítios alostérico e catalítico são espacialmente distintos

Jacques Monod propôs a existência de sítios alostéricos que são fisicamente distintos do sítio catalítico. Ele imaginou que a falta de semelhança estrutural entre um inibidor por retroalimentação e o(s) substrato(s) da enzima cuja atividade ele(s) regula(m) indicavam que esses efetores não são **isostéricos**

com um substrato, mas **alostéricos** (“ocupam outro espaço”). Dessa maneira, as enzimas alostéricas são aquelas para as quais a catálise no sítio ativo pode ser modulada pela presença de efetores em um sítio alostérico. Desde então, a existência de sítios alostéricos e ativos espacialmente distintos foi observada em diversas enzimas pelo uso de muitas linhas de evidência. Por exemplo, a cristalografia de raios X revelou que a ATCase da *E. coli* consiste em seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras, e, nas últimas, ligam-se os nucleotídeos trifosfatos que modulam a atividade. Em geral, a ligação de um regulador alostérico influencia a catálise por induzir uma mudança conformacional que engloba o sítio ativo.

Os efeitos alostéricos podem ser sobre K_m ou sobre $V_{máx}$

Referir-se à cinética da inibição alostérica como “competitiva” ou “não competitiva” com o substrato leva a implicações errôneas sobre o mecanismo. Em vez disso, faz-se referência a duas classes de enzimas alostericamente reguladas: enzimas da série K e enzimas da série V. Para as enzimas alostéricas da série K, a cinética de saturação do substrato é competitiva, pois K_m é elevada sem um efeito sobre $V_{máx}$. Para as enzimas alostéricas da série V, o inibidor alostérico diminui a $V_{máx}$ sem afetar K_m . Com frequência, as alterações em K_m ou $V_{máx}$ são o produto das alterações conformacionais no sítio catalítico induzidas pela ligação do efetor alostérico em seu sítio. Para uma enzima alostérica da série K, essa alteração conformacional pode enfraquecer as ligações entre o substrato e os resíduos de ligação ao substrato da enzima. Para uma enzima alostérica da série V, o efeito primário pode ser alterar a orientação ou a carga dos resíduos catalíticos, diminuindo a $V_{máx}$. Os efeitos intermediários sobre K_m e $V_{máx}$, no entanto, podem ser observados como consequência dessas alterações conformacionais.

A REGULAÇÃO POR RETROALIMENTAÇÃO PODE SER ESTIMULADORA OU INIBIDORA

Tanto nas células de mamíferos quanto nas de bactérias, alguns produtos finais controlam sua própria síntese, em muitos casos pela inibição por retroalimentação de uma enzima inicial na biossíntese. Contudo, deve-se diferenciar entre **regulação por retroalimentação**, um termo que descreve um fenômeno desprovido de implicações sobre o mecanismo, e **inibição por retroalimentação**, um mecanismo para a regulação da atividade da enzima. Por exemplo, enquanto o colesterol na dieta diminui a síntese hepática de colesterol, essa **regulação** por retroalimentação não envolve a **inibição** por retroalimentação. A HMG-CoA-redutase, enzima limitante da velocidade da colesterologênese, é afetada, porém o colesterol não inibe sua atividade. Em vez disso, a regulação em resposta ao colesterol da dieta envolve a redução pelo colesterol ou por um metabólito do colesterol da expressão do gene que codifica a HMG-CoA-redutase (repressão enzimática) (ver Capítulo 26). Como mencionado anteriormente, o ATP, um produto da via dos nucleotídeos purinas, estimula a síntese de nucleotídeos pirimidinas por ativar a aspartato-transcarbamoilase, um processo algumas vezes chamado de regulação por “alimentação para a frente”.

MUITOS HORMÔNIOS ATUAM POR MEIO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS

Os impulsos nervosos e a ligação de muitos hormônios a receptores de superfície celular provocam alterações na velocidade das reações catalisadas por enzimas dentro das células-alvo ao induzir a liberação ou a síntese de efetores alostéricos especializados, chamados de **segundos mensageiros**. O mensageiro primário, ou “primeiro”, é a molécula do hormônio ou impulso nervoso. Os segundos mensageiros incluem o 3',5'-cAMP, sintetizado a partir do ATP pela enzima adenilato-ciclase em resposta ao hormônio adrenalina, e o Ca^{2+} , que é armazenado no retículo endoplasmático da maioria das células. A despolarização da membrana resultante de um impulso nervoso abre um canal de membrana que libera íons cálcio no citoplasma, onde eles se ligam a enzimas (e as ativam) envolvidas na regulação da contração muscular e na mobilização de estoques de glicose a partir de glicogênio para suprir o aumento da demanda de energia da contração muscular. Outros segundos mensageiros incluem o 3',5'-cGMP, o óxido nítrico e os polifosfoinositóis produzidos pela hidrólise de inositolfosfolipídeos por fosfolipases reguladas por hormônio. Os exemplos específicos da participação de segundos mensageiros na regulação de processos celulares podem ser encontrados nos Capítulos 18, 42 e 50.

MODIFICAÇÕES COVALENTES REGULADORAS PODEM SER REVERSÍVEIS OU IRREVERSÍVEIS

Nas células de mamíferos, ocorre uma ampla gama de modificações covalentes reguladoras. A **proteólise parcial** e a **fosforilação**, por exemplo, são frequentemente empregadas para regular a atividade catalítica das enzimas. Por outro lado, as histonas e outras proteínas de ligação ao DNA na cromatina estão sujeitas à extensa modificação por **acetilação**, **metilação**, **ADP-ribosilação**, bem como fosforilação. As últimas modificações, que modulam a maneira pela qual as proteínas dentro da cromatina interagem entre si, bem como com o próprio DNA, constituem a base para o “código histona”. As alterações resultantes na estrutura da cromatina dentro da região afetada podem tornar os genes mais acessíveis à proteína responsável por sua transcrição, facilitando a replicação de todo o genoma (ver Capítulo 38). Por outro lado, diz-se que as alterações na estrutura da cromatina que restringem a acessibilidade dos genes aos fatores de transcrição e às RNA-polimerases dependentes do DNA, etc., inibindo, assim, a transcrição, **silenciam** a expressão genética.

O código histona

O “código histona” representa um exemplo clássico da **epigenética**, a transmissão hereditária de informação por meio diferente da sequência de nucleotídeos que compreendem o genoma. Nesse caso, o padrão da expressão genética dentro de uma célula-filha recentemente formada será definido, em parte, por um determinado conjunto de modificações covalentes das histonas incorporadas nas proteínas da cromatina herdadas da “célula-mãe”.

Modificação covalente reversível

A acetilação, a ADP-ribosilação, a metilação e a fosforilação são exemplos, sem exceção, de modificações covalentes

“reversíveis”. Nesse contexto, reversível refere-se ao fato de a proteína modificada poder ser recuperada ao seu estado original, sem modificação, e não ao mecanismo pelo qual ocorre a restauração. A termodinâmica dita que, se a reação catalisada por enzima em que uma modificação foi introduzida é termodinamicamente favorável, simplesmente reverter o processo será impraticável devido à correspondente mudança desfavorável de energia livre. A fosforilação de proteínas nos resíduos seril, treonil ou tirosil, catalisada por proteínas-cinase, é termodinamicamente favorecida devido à utilização de um grupamento γ -fosforil de alta energia do ATP. Os grupamentos fosfato são removidos, não por meio de recombinação do fosfato com o ADP para formar ATP, mas por uma reação hidrolítica catalisada por enzimas chamadas de proteínas-fosfatase. De forma similar, as acetiltransferases empregam um substrato doador de alta energia, o NAD^+ , ao passo que as desacetilases catalisam uma hidrólise direta que produz acetato livre.

AS PROTEASES PODEM SER SECRETADAS COMO PRÓ-ENZIMAS CATALITICAMENTE INATIVAS

Certas proteínas são sintetizadas como proteínas precursoras inativas conhecidas como **pró-proteínas**. A proteólise seletiva ou “parcial” converte uma pró-proteína, por meio de uma ou mais clivagens proteolíticas sucessivas, em uma forma que exibe a atividade característica da proteína madura, como, por exemplo, sua atividade catalítica. As formas de pró-proteína de enzimas são denominadas **pró-enzimas** ou **zimogênios**. As proteínas sintetizadas como pró-proteínas incluem o hormônio insulina (pró-proteína = proinsulina), as enzimas digestórias pepsina, tripsina e quimiotripsina (pró-proteínas = pepsinogênio, tripsinogênio e quimiotripsinogênio, respectivamente), vários fatores de coagulação sanguínea e cascatas do complemento (ver Capítulos 52 e 55), e o colágeno proteico do tecido conectivo (pró-proteína = pró-colágeno).

A ativação proteolítica de pró-proteínas constitui uma modificação fisiologicamente irreversível, visto que a religação das duas porções de uma proteína produzida pela hidrólise de uma ligação peptídica é entropicamente desfavorável. Quando uma pró-proteína é ativada, ela continuará a realizar suas funções catalíticas ou outras funções até que seja removida por degradação ou por algum outro meio. Dessa maneira, a ativação do zimogênio representa um mecanismo simples e econômico, embora unidirecional, para restringir a atividade latente de uma proteína até que as circunstâncias apropriadas sejam encontradas. Portanto, não surpreende que a proteólise parcial seja frequentemente empregada para regular proteínas que atuam no trato gastrointestinal ou na corrente sanguínea, em vez de no interior das células.

As proenzimas facilitam a mobilização rápida de uma atividade em resposta à demanda fisiológica

A síntese e a secreção das proteases como proenzimas cataliticamente inativas protegem o tecido de origem (p. ex., o pâncreas) contra a autodigestão, como pode ocorrer a pancreatite. Determinados processos fisiológicos, como a digestão, são

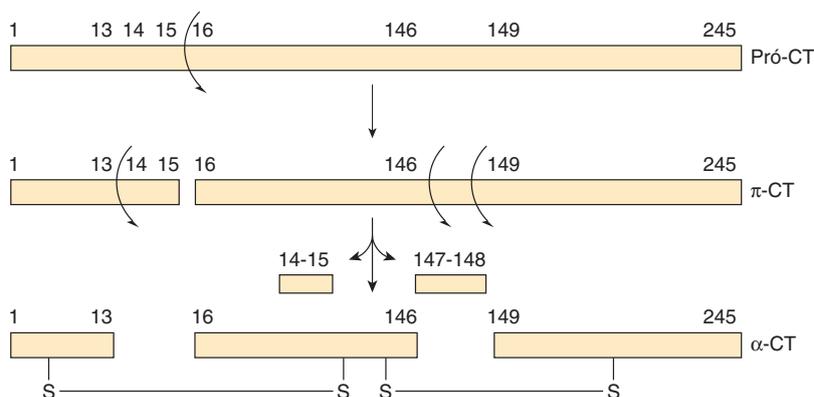


FIGURA 9-6 Representação bidimensional da sequência de eventos proteolíticos que resultam, por fim, na formação do sítio catalítico da quimiotripsina, o qual inclui a tríade catalítica Asp 102-His 57-Ser 195 (ver Figura 7-7). A proteólise sucessiva forma pró-quimiotripsina (pró-CT), π -quimiotripsina (π -Ct) e, por fim, α -quimiotripsina (α -CT), uma protease ativa cujos três peptídeos (A, B, C) permanecem associados por ligações dissulfeto covalentes intercadeia.

intermitentes, mas bastante regulares e previsíveis na frequência. Outros, como a formação do coágulo sanguíneo, dissolução do coágulo e reparação tecidual, são feitos de forma imediata apenas em resposta à necessidade fisiológica ou fisiopatológica. Os processos de formação e dissolução do coágulo sanguíneo, logicamente, devem ser coordenados sob o aspecto temporal para alcançar a homeostasia. As enzimas requisitadas de modo intermitente, mas com rapidez, muitas vezes são secretadas em uma forma inicialmente inativa, pois as novas síntese e secreção das proteínas necessárias poderiam não ser rápidas o suficiente para responder a uma demanda fisiopatológica imediata, como a perda sanguínea (ver Capítulo 55).

A ativação da pró-quimiotripsina requer a proteólise seletiva

A proteólise seletiva envolve uma ou mais clivagens proteolíticas altamente específicas que podem, ou não, ser acompanhadas pela separação dos peptídeos resultantes. Mais importante, a proteólise seletiva frequentemente resulta em alterações conformacionais que configuram corretamente o sítio ativo de uma enzima. Observe que, embora os resíduos cataliticamente essenciais His 57 e Asp 102 residam no peptídeo B da α -quimiotripsina, a Ser 195 localiza-se no peptídeo C (Figura 9-6). As alterações conformacionais que acompanham a proteólise seletiva da pró-quimiotripsina (quimiotripsinogênio) alinham os três resíduos da rede de retransmissão de carga (ver Figura 7-7), formando o sítio catalítico. O contato e os resíduos catalíticos podem estar localizados em diferentes cadeias peptídicas, mas ainda dentro da distância de formação de ligação do substrato acoplado.

MODIFICAÇÕES COVALENTE REVERSÍVEIS REGULAM PROTEÍNAS ESSENCIAIS DE MAMÍFEROS

Milhares de proteínas de mamíferos são modificadas por fosforilação covalente

As proteínas dos mamíferos constituem os alvos de uma ampla gama de processos de modificação covalente. Modificações

como a prenilação, a glicosilação, a hidroxilação e a acilação de ácidos graxos introduzem aspectos estruturais únicos em proteínas recém-sintetizadas que tendem a persistir pelo restante da vida da proteína. Dentre as modificações covalentes que regulam a função proteica, as mais comuns são a fosforilação-desfosforilação e a acetilação-desacetilação. As **proteínas-cinase** fosforilam as proteínas ao catalisar a transferência do grupamento fosforil terminal do ATP para os grupamentos hidroxila de resíduos seril, treonil ou tirosil, formando resíduos *O*-fosfoseril, *O*-fosfotreonil ou *O*-fosfotirosil, respectivamente (Figura 9-7). Algumas proteínas-cinase visam as cadeias laterais de resíduos histidil, lisil, arginil e aspartil. A forma não modificada da proteína pode ser regenerada por remoção hidrolítica do grupamento fosforil, catalisada por **proteínas-fosfatase**. Uma típica célula de mamífero possui milhares de proteínas fosforiladas e várias centenas de proteínas-cinase e proteínas-fosfatase que catalisam suas interconversões. A facilidade de interconversão de enzimas entre as suas formas fosforilada e desfosforilada responde, em parte, pela frequência com que a fosforilação-desfosforilação é utilizada como mecanismo regulador de controle. A fosforilação-desfosforilação permite que as propriedades funcionais da enzima afetada sejam alteradas apenas enquanto ela serve a uma necessidade específica. Quando a necessidade cessa, a enzima pode ser novamente convertida à sua forma original, pronta para responder ao próximo evento estimulador. Um segundo fator subjacente ao uso disseminado da fosforilação-desfosforilação proteica reside nas propriedades químicas do

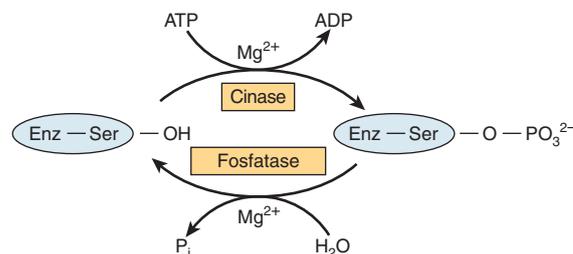


FIGURA 9-7 Modificação covalente de uma enzima regulada por fosforilação-desfosforilação de um resíduo seril.

próprio grupamento fosforil. A fim de alterar as propriedades funcionais de uma enzima, qualquer modificação de sua estrutura química deve influenciar a configuração tridimensional da proteína. A alta densidade de carga dos grupamentos fosforil ligados à proteína – geralmente -2 no pH fisiológico – e suas propensões para formar pontes salinas fortes com os resíduos arginil e lisil os transformam em agentes potentes para mudar a estrutura e a função da proteína. A fosforilação geralmente influencia a eficiência catalítica intrínseca de uma enzima ou outras propriedades ao induzir alterações na conformação. Como consequência, os aminoácidos atingidos pela fosforilação podem estar – e, em geral, estão – relativamente distantes do próprio sítio catalítico.

Acetilação de proteínas: uma modificação ubíqua de enzimas metabólicas

A acetilação-desacetilação covalente tem sido associada a histonas e a outras proteínas nucleares. Nos últimos anos, no entanto, estudos proteômicos têm revelado que milhares de outras proteínas de mamíferos são submetidas à modificação por acetilação covalente, incluindo quase todas as enzimas presentes em vias metabólicas essenciais, como glicólise, síntese de glicogênio, gliconeogênese, ciclo dos ácidos tricarbóxicos, β -oxidação de ácidos graxos e ciclo da ureia. O impacto regulador potencial da acetilação-desacetilação tem sido estabelecido apenas para algumas dessas proteínas. Todavia, elas incluem muitas enzimas importantes metabolicamente, como acetil-CoA-sintase, acil-CoA-desidrogenase de cadeia longa, malato-desidrogenase, isocitrato-desidrogenase, glutamato-desidrogenase, carbamoil-fosfato-sintase e ornitina-transcarbamoilase.

As **lisinas-acetiltransferase** catalisam a transferência de um grupamento acetil do acetil-CoA aos grupos ϵ -amino de resíduos de lisil, formando *N*-acetil-lisina. Além disso, algumas proteínas, sobretudo aquelas na mitocôndria, tornam-se acetiladas por reagir com acetil-CoA diretamente, isto é, sem a intervenção de uma enzima catalisadora. A acetilação não apenas aumenta o volume estérico da cadeia lateral da lisina, mas também transforma uma amina primária básica e potencialmente carregada positivamente em uma amida neutra e não ionizável. Duas classes de proteínas desacetilases foram identificadas: **histonas desacetilases** e **sirtuínas**. As histonas desacetilases catalisam a remoção por hidrólise de grupos acetil, regenerando a forma não modificada da proteína e o acetato como produtos. As sirtuínas, por outro lado, utilizam NAD^+ como substrato, formando *O*-acetil ADP-ribose e nicotinamida como produtos, além da proteína não modificada.

As modificações covalentes regulam o fluxo de metabólitos

Em muitos aspectos, os sítios de fosforilação da proteína e de outras modificações covalentes podem ser considerados como outra forma de sítio alostérico. No entanto, nesse caso, o “ligante alostérico” liga-se de forma covalente à proteína. A fosforilação-desfosforilação, a acetilação-desacetilação e a inibição por retroalimentação representam formas de regulação de curto prazo prontamente reversíveis do fluxo de metabólitos em resposta a sinais fisiológicos específicos. As três agem de forma independente às mudanças da expressão genética.

Em geral, tanto a fosforilação-desfosforilação quanto a inibição por retroalimentação atuam sobre as enzimas iniciais de uma via metabólica longa, e ambas atuam em sítios alostéricos, e não no sítio ativo. A inibição por retroalimentação, no entanto, envolve uma única proteína que é influenciada indiretamente, se for, por sinais hormonais ou neuronais. Em contrapartida, a regulação de enzimas de mamíferos por fosforilação-desfosforilação envolve diversas proteínas e ATP, além de estar sob controle neural e hormonal direto.

A acetilação-desacetilação, por outro lado, tem como alvo múltiplas proteínas de uma via. Há a hipótese de que o grau de acetilação de enzimas metabólicas é modulado, em grande parte, pelo estado energético da célula. Por esse modelo, o alto nível de acetil-CoA (o substrato da lisina-acetiltransferase e o reagente da acetilação não enzimática da lisina) presente em uma célula bem nutrida iria promover a acetilação da lisina. Quando os nutrientes estão em falta, os níveis de acetil-CoA caem e a razão NAD^+/NADH aumenta, favorecendo a desacetilação proteica.

A FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS É EXTREMAMENTE VERSÁTIL

A fosforilação-desfosforilação proteica é um processo altamente versátil e seletivo. Nem todas as proteínas estão sujeitas à fosforilação e, dentre os muitos grupamentos hidroxil na superfície de uma proteína, apenas um, ou um pequeno subgrupo, é visado. Embora a função enzimática mais comumente afetada seja a eficiência catalítica da proteína, a fosforilação também pode alterar sua localização dentro da célula, a suscetibilidade à degradação proteolítica ou a responsividade à regulação por ligantes alostéricos. A fosforilação pode aumentar a eficiência catalítica de uma enzima, convertendo-a em sua forma ativa em uma proteína, ao passo que a fosforilação de outra proteína a converte em uma forma intrinsecamente ineficaz ou inativa (**Tabela 9-1**).

Muitas proteínas podem ser fosforiladas em múltiplos sítios. Outras estão sujeitas à regulação por fosforilação-desfosforilação e por ligação de ligantes alostéricos, ou por fosforilação-desfosforilação e outra modificação covalente. A fosforilação-desfosforilação

TABELA 9-1 Exemplos de enzimas de mamíferos cuja atividade catalítica é alterada por fosforilação-desfosforilação covalente

Enzima	Estado de atividade	
	Baixo	Alto
Acetil-CoA-carboxilase	EF	E
Glicogênio-sintase	EF	E
Piruvato-desidrogenase	EF	E
HMG-CoA-redutase	EF	E
Glicogênio-fosforilase	E	EF
Citrato-liase	E	EF
Fosforilase-cinase β	E	EF
HMG-CoA-redutase-cinase	E	EF

Abreviações: E, desfosfoenzima; EF, fosfoenzima.

em um sítio qualquer pode ser catalisada por múltiplas proteínas-cinase ou proteínas-fosfatase. Muitas proteínas-cinase e a maioria das proteínas-fosfatase atuam sobre mais de uma proteína e são interconvertidas entre as formas ativas e inativas pela ligação de segundos mensageiros ou por modificação covalente por intermédio da fosforilação-desfosforilação.

A inter-relação entre as proteínas-cinase e as proteínas-fosfatase, entre as consequências funcionais da fosforilação em diferentes sítios, entre sítios de fosforilação e sítios alostéricos ou entre sítios de fosforilação e outros sítios de modificação covalente proporciona a base para as redes reguladoras que integram os múltiplos sinais ambientais para gerar uma resposta celular coordenada apropriada. Nessas sofisticadas redes reguladoras, as enzimas individuais respondem a diferentes sinais ambientais. Por exemplo, quando uma enzima pode ser fosforilada em um único sítio por mais de uma proteína-cinase, ela pode ser convertida de forma cataliticamente eficiente para uma forma ineficaz (inativa) ou vice-versa. Se a proteína-cinase é ativada em resposta a um sinal diferente do sinal que ativa a proteína-fosfatase, a fosfoproteína torna-se um *ponto de decisão*, cujo produto funcional, geralmente a atividade catalítica, reflete o estado de fosforilação. Esse estado ou grau de fosforilação é determinado pelas atividades relativas da proteína-cinase e da proteína-fosfatase, um reflexo da presença e da força relativa dos sinais ambientais que agem por meio de cada uma.

A capacidade de muitas proteínas-cinase e proteínas-fosfatase de visarem mais de uma proteína propicia um meio para que um sinal ambiental regule múltiplos processos metabólicos de forma coordenada. Por exemplo, as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase e acetil-CoA-carboxilase – as enzimas controladoras da velocidade para a biossíntese

de colesterol e ácidos graxos, respectivamente – são fosforiladas e inativadas pela proteína-cinase ativada por AMP. Quando essa proteína-cinase é ativada pela fosforilação por outra proteína-cinase ou em resposta ao seu ativador alostérico 5'-AMP, as duas vias principais responsáveis pela síntese de lipídeos a partir de acetil-CoA são inibidas.

OS EVENTOS REGULADORES INDIVIDUAIS SE COMBINAM PARA FORMAR REDES SOFISTICADAS DE CONTROLE

As células realizam um complexo arranjo de processos metabólicos que devem ser regulados em resposta a um amplo espectro de fatores ambientais. Portanto, as enzimas interconvertíveis e as enzimas responsáveis pela interconversão delas não agem como comutadores “ligados” e “desligados” isolados. A fim de satisfazer às demandas da manutenção da homeostasia, esses blocos de construção são ligados para formar redes reguladoras integradas.

Um exemplo bem-estudado de uma dessas redes é o ciclo da célula eucariótica que controla a divisão celular. Após a saída do estado G_0 ou quiescente, o processo extremamente complexo da divisão celular prossegue por uma série de fases específicas, designadas como G_1 , S, G_2 e M (Figura 9-8). Elaborados sistemas de monitoração, chamados de **pontos de verificação**, avaliam os principais indicadores da progressão para garantir que nenhuma fase do ciclo seja iniciada até que a fase anterior se complete. A Figura 9-8 representa, de forma simplificada, parte do pontos de verificação que controla

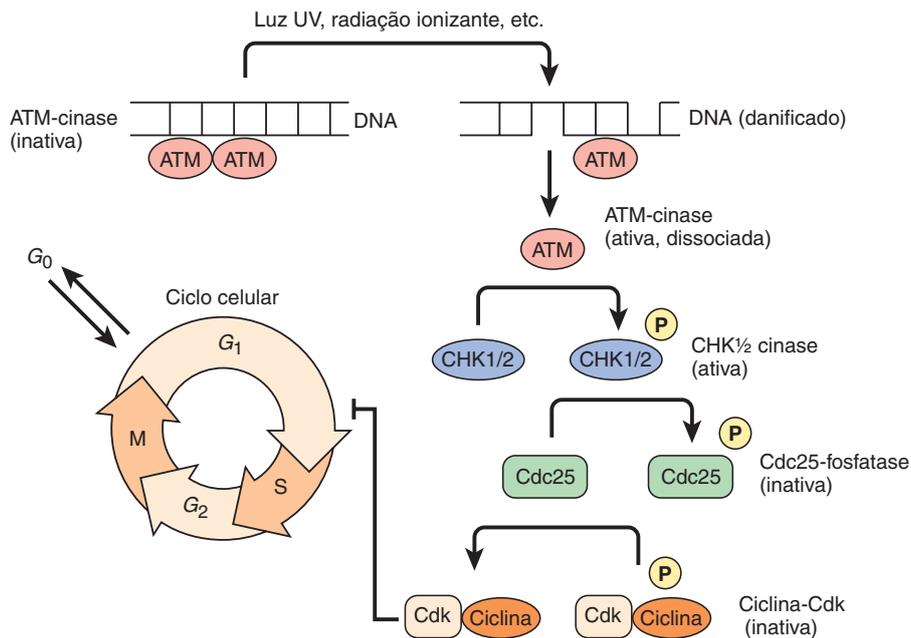


FIGURA 9-8 Representação simplificada dos pontos de verificação G_1 e S do ciclo celular eucariótico. O círculo mostra os vários estágios do ciclo celular eucariótico. O genoma é replicado durante a fase S, ao passo que as duas cópias do genoma são segregadas e ocorre a divisão celular durante a fase M. Cada uma dessas fases é separada por uma fase G, ou de crescimento, caracterizada pelo aumento no tamanho da célula e pelo acúmulo de precursores necessários para a montagem dos grandes complexos macromoleculares formados durante as fases S e M.

o início da replicação do DNA, chamada de fase S. Uma proteína-cinase chamada ATM está associada ao genoma. Se o DNA contém uma ruptura no filamento duplo, a alteração resultante na conformação da cromatina ativa a ATM. Após a ativação, uma subunidade do dímero de ATM ativado se dissocia e inicia uma série ou cascata de eventos de fosforilação-desfosforilação proteica mediada pelas proteínas-cinase CHK1 e CHK2, pela proteína-fosfatase Cdc25 e, por fim, por um complexo entre uma ciclina e uma proteína-cinase dependente de ciclina, ou Cdk. A ativação do complexo Cdk-ciclina bloqueia a transição de G_1 para S, impedindo a replicação do DNA danificado. A falha nesse ponto de verificação pode levar a mutações no DNA que podem conduzir ao câncer ou a outras doenças. Cada etapa na cascata propicia uma via para monitorar indicadores adicionais do estado celular antes de entrar na fase S.

RESUMO

- A homeostasia envolve a preservação de um ambiente intracelular e intraórgãos relativamente constante, apesar das amplas flutuações no ambiente externo. Isso é alcançado por meio das alterações apropriadas nas velocidades das reações bioquímicas em resposta à necessidade fisiológica.
 - Os substratos para a maioria das enzimas geralmente estão presentes em uma concentração próxima ao seu K_m . Isso facilita o controle passivo das velocidades de formação do produto em resposta às alterações nos níveis dos intermediários metabólicos.
 - O controle ativo do fluxo de metabólitos envolve alterações na concentração, na atividade catalítica, ou em ambas, da enzima que catalisa a reação comprometida, limitante da velocidade.
 - A proteólise seletiva de proenzimas cataliticamente inativas inicia as alterações conformacionais que formam o sítio ativo. A secreção de uma proenzima inativa facilita a rápida mobilização da atividade em resposta à lesão ou à necessidade fisiológica e pode proteger o tecido de origem (p. ex., autodigestão por proteases).
 - A ligação de metabólitos e mensageiros secundários a sítios distintos do sítio catalítico das enzimas induz alterações conformacionais que alteram a $V_{m\acute{a}x}$ ou a K_m .
- A fosforilação por proteínas-cinase, de resíduos seril, treonil ou tirosil específicos – e a subsequente desfosforilação pelas proteínas-fosfatase – regula a atividade de muitas enzimas humanas.
 - As proteínas-cinases e fosfatases que participam das cascatas reguladoras que respondem a sinais hormonais ou de mensageiros secundários constituem redes reguladoras que podem processar e integrar informações ambientais complexas para produzir uma resposta celular apropriada e abrangente.
 - Várias enzimas metabólicas são modificadas por acetilação-desacetilação de resíduos de lisina. Acredita-se que o grau de acetilação dessas proteínas seja modulado pela disponibilidade de acetil-CoA, o substrato doador de acetila para as acetiltransferases, e NAD^+ , um substrato para a sirtuína desacetilase.
 - A capacidade das proteínas-cinase, proteínas-fosfatase, lisina acetilases e lisina desacetilases de terem como alvo múltiplas proteínas e vários locais nas proteínas é essencial para a formação de redes reguladoras integradas.

REFERÊNCIAS

- Ciechanover A, Schwartz AL: The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:3.
- Elgin SC, Reuter G: In: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, et al (editors): *Epigenetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.
- Guan K-L, Xiong Y: Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:108.
- Johnson LN, Lewis RJ: Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 2001;101:2209.
- Muoio DM, Newgard CB: Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 2006;75:403.
- Stieglitz K, Stec B, Baker DP, et al: Monitoring the transition from the T to the R state in *E coli* aspartate transcarbamoylase by x-ray crystallography: crystal structures of the E50A mutant enzyme in four distinct allosteric states. *J Mol Biol* 2004;341:853.
- Tu BP, Kudlicki A, Rowicka M, et al: Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 2005;310:1152.
- Walsh CT: *Posttranslational Modification of Proteins. Expanding Nature's Inventory*, Roberts and Company Publishers, 2006.

Bioinformática e biologia computacional

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as características distintas da genômica, da proteômica e da bioinformática.
- Reconhecer o potencial e os desafios apresentados pela medicina personalizada guiada pelo genoma.
- Resumir os principais aspectos e a relevância clínica do projeto ENCODE.
- Descrever as funções disponibilizadas pelos bancos de dados HapMap, EntrezGene e dbGaP.
- Explicar como o BLAST e a elucidação do código de dobramento auxiliam os cientistas a desvendar a forma e a função de proteínas desconhecidas ou hipotéticas.
- Relatar os principais aspectos da idealização e da descoberta de fármacos auxiliadas por computador.
- Expor as possíveis aplicações futuras de modelos computacionais de vias metabólicas individuais e redes de vias metabólicas.
- Delinear a possível utilidade médica das “células virtuais”.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os primeiros modelos científicos de patogênese, como a teoria de Louis Pasteur sobre germes seminais como agentes de doença, eram de natureza binária: cada doença tinha um agente etiológico único e definido. A malária era causada pela ameba do gênero *Plasmodium*, a tuberculose, pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, a anemia falciforme, por uma mutação em um gene que codifica uma das subunidades da hemoglobina, a poliomielite, pelo poliovírus, e o escorbuto, pela deficiência de ácido ascórbico. A estratégia para tratar ou evitar a doença poderia, assim, ser reduzida a um processo direto de rastrear o agente etiológico e, em seguida, idealizar algum meio de eliminá-lo, neutralizar seus efeitos ou bloquear sua via de transmissão.

Enquanto modelos simples provam ser efetivos no entendimento e no tratamento de uma ampla gama de doenças nutricionais, infecciosas e genéticas, os esforços para identificar os agentes etiológicos distintos de doenças, como câncer, doenças cardíacas, obesidade, diabetes tipo II e doença de Alzheimer foram inúteis. As origens e a progressão dessas últimas doenças são de natureza **multifatorial**, o produto da interação complexa entre a composição genética de cada indivíduo, outros fatores hereditários ou **epigenéticos** e fatores ambientais, como dieta, estilo de vida, toxinas, vírus ou bactérias. Desvendar esses enigmas biomédicos

multidimensionalmente complexos e sutilmente amorfos exige aquisição e análise de dados em uma escala que está além da capacidade dos seres humanos para coletar, organizar e avaliar de maneira independente.

O termo **bioinformática** refere-se à aplicação de tecnologia computacional e robótica para automatizar a coleta, a recuperação e a análise de dados científicos em larga escala. O principal objetivo de muitos bioinformáticos é desenvolver algoritmos capazes de prever, de forma confiável, as estruturas tridimensionais e as propriedades funcionais de cerca de um terço de todas as proteínas codificadas geneticamente atualmente classificadas como “desconhecidas” ou “hipotéticas”. Outro objetivo é usar a tecnologia da informação para aumentar a velocidade e a efetividade com que os médicos podem diagnosticar e tratar pacientes, fornecendo acesso imediato a informações importantes, como história médica e dados de interações farmacológicas. O objetivo da **biologia computacional** é permitir aos pesquisadores a realização de experimentos *in silico* em modelos virtuais digitais de moléculas, células, órgãos e organismos. Esses modelos virtuais são uma grande promessa para melhorar o ritmo e estender a abrangência da pesquisa biomédica, libertando os cientistas das limitações materiais, econômicas, laborais, temporais e éticas da clínica e do laboratório.

GENÔMICA: UMA AVALANCHE DE INFORMAÇÃO

Os médicos e os cientistas há muito compreenderam que o genoma, o conjunto completo de informações genéticas de um organismo vivo, representava uma rica fonte de informações relacionadas com temas que variam desde o metabolismo básico, passando pela evolução até o envelhecimento. No entanto, por muitos anos, o grande tamanho do genoma humano, 3×10^9 pares de bases nucleotídicas, rendeu uma análise global além do alcance da tecnologia disponível para a aquisição e a análise da informação da sequência de DNA. Em 1990, os Estados Unidos lançaram um esforço multibilionário, o **Projeto Genoma Humano**, com o propósito expresso de desenvolver técnicas, instrumentação e *software* de exploração de dados de **alto rendimento** necessários para determinar a sequência completa do DNA do genoma do *Homo sapiens*.

A conclusão do primeiro projeto genoma humano levou 10 anos e custou centenas de milhões de dólares. No entanto, o advento de tecnologias de “próxima geração” reduziu drasticamente, desde então, o tempo e os custos necessários. Atualmente, o custo para determinar a sequência genômica de um indivíduo é inferior a R\$30.000. Como consequência, os cientistas estão agora analisando e comparando dados de sequências de DNA em grandes populações de amostras. Além disso, surgiram serviços comerciais em que indivíduos que possuem fundos suficientes podem ter seus próprios genomas determinados. Como os preços continuam a cair em direção à meta declarada pela indústria de R\$3.000 por amostra, a quantidade de pessoas à procura de conselhos e cuidados médicos personalizados com base nas informações fisiológicas, médicas e hereditárias reveladas por seus genomas crescerá em velocidade exponencial.

O Projeto Genoma Humano

O término bem-sucedido do Projeto Genoma Humano (PGH) representa o ápice de mais de seis décadas de realizações nas áreas de biologia molecular, genética e bioquímica. A cronologia a seguir lista vários eventos marcantes que levaram à determinação da totalidade da sequência do genoma humano.

- 1944 – Demonstra-se que o DNA é o material hereditário.
- 1953 – É firmado o conceito da dupla-hélice.
- 1966 – O código genético é descrito.
- 1972 – É desenvolvida a tecnologia do DNA recombinante.
- 1977 – Surge a tecnologia de sequenciamento prático do DNA.
- 1983 – É mapeado o gene para a doença de Huntington.
- 1985 – É inventada a reação em cadeia da polimerase (PCR).
- 1986 – O sequenciamento do DNA torna-se automatizado.
- 1986 – O gene da distrofia muscular de Duchenne é identificado.
- 1989 – O gene da fibrose cística é identificado.
- 1990 – O Projeto Genoma Humano é lançado nos Estados Unidos.
- 1994 – Termina o mapeamento genético humano.
- 1996 – É estabelecido o primeiro mapa genético humano.
- 1999 – É introduzida a iniciativa do polimorfismo de nucleotídeo único.

- 1999 – É completada a primeira sequência de um cromossomo humano, o número 22.
- 2000 – É completado o “primeiro esboço” do genoma humano.
- 2003 – O sequenciamento do primeiro genoma humano é completado.
- 2007 – Empresas comerciais oferecem serviços de sequenciamento do genoma pessoal.
- 2008 – Os cientistas iniciam o sequenciamento de mil genomas individuais para determinar o grau de diversidade genética nos seres humanos.
- 2010 – É finalizado o genoma do homem de Neandertal.
- 2013 – É publicado o primeiro mapa integrado das variações genéticas de 1.092 indivíduos de 14 populações.

Atualmente, a quantidade de organismos eucarióticos, procariontes e arqueias cujos genomas foram sequenciados é da ordem de muitas centenas. Essa coleção inclui mais de 40 genomas de mamíferos, como uma ou mais espécies de galinha, gato, cachorro, elefante, rato, coelho, leão, tigre, leopardo, porco, cavalo, chimpanzé, gorila, orangotango, mamutes, gambá, ornitorrinco, golfinho, morcego, panda, coala, canguru e demônio-da-tasmânia. Comparações com o genoma de homens da Neandertal sugerem que até 2% do DNA no genoma dos seres humanos atuais se originaram de homens de Neandertal ou de seus ancestrais, embora a fração seja significativamente menor em indivíduos de descendência africana. As sequências de DNA dos genomas de mais de mil indivíduos *Homo sapiens* foram determinadas. O pronto acesso a uma biblioteca crescente de sequências do genoma de organismos abrangendo todos os três domínios filogenéticos e os algoritmos poderosos necessários para a manipulação dos dados derivados dessas sequências emergiram como uma influência transformativa nas pesquisas nas áreas de biologia, microbiologia, farmacologia, evolução e bioquímica.

Genomas e medicina

A revolução genômica causará impacto na medicina no século XXI de várias formas. A mais profunda delas será a habilidade de explorar a sequência genômica de um indivíduo à procura de indicadores que prevejam a sua suscetibilidade a doenças específicas, sensibilidade a potenciais alérgenos e receptividade a intervenções farmacológicas específicas. A implementação de medidas preventivas, como regime alimentar adaptado para prevenir ou melhorar problemas de saúde em potencial muito antes de os sintomas se manifestarem deve reduzir drasticamente a ocorrência e o impacto, assim como os custos pessoais e sociais, de várias patologias. O conhecimento da sequência genômica de um paciente também pode, eventualmente, abrir caminho para a utilização da terapia gênica para prevenir, curar ou tratar doenças. A capacidade de diagnosticar e tratar os pacientes orientada pelo conhecimento de suas constituições genéticas, uma conduta popularmente conhecida como “medicina personalizada”, tornará os medicamentos mais seguros e mais efetivos.

A genômica também facilitará o desenvolvimento de antibióticos e de outros fármacos. Ao comparar os genomas de cepas patogênicas e não patogênicas de um determinado microrganismo, os genes prováveis de codificar os determinantes da virulência podem ser destacados em virtude de sua

presença apenas na cepa virulenta. De maneira similar, a comparação dos genomas de um patógeno com seu hospedeiro pode identificar os genes próprios do primeiro. Os fármacos que têm como alvo os produtos proteicos de genes específicos do patógeno devem, na teoria, produzir pouco ou nenhum efeito para o hospedeiro infectado.

Sequenciamento do exoma

O “sequenciamento do exoma” surgiu como uma alternativa para o sequenciamento do genoma inteiro, como um meio para o diagnóstico de doenças genéticas raras ou ocultas. O exoma consiste naqueles segmentos de DNA, chamados de éxons, que codificam as sequências de aminoácidos das proteínas (ver Capítulo 36). Como os éxons compreendem apenas aproximadamente 1% do genoma humano, o exoma representa um alvo muito menor e mais tratável que o genoma completo. A comparação de sequências de exomas identificou genes contendo mutações responsáveis por uma crescente lista de doenças que incluem retinite pigmentosa, síndrome de Freeman-Sheldon, síndrome de Sensenbrenner, síndrome de Miller, síndrome de Schinzel-Giedion e síndrome de Kabuki, assim como variantes de ataxia espinocerebelar, doença inflamatória intestinal, osteogênese imperfeita, doença de Charcot-Marie-Tooth, deficiência intelectual e esclerose amiotrófica lateral.

Desafios em potencial para a medicina personalizada

Embora a “medicina personalizada” com base no genoma prometa ser muito efetiva, ela também confronta a humanidade com imensos desafios nas áreas da ética, do direito e de políticas públicas. Quem tem e controla o acesso a essas informações? Uma companhia de seguro de vida ou de saúde pode negar cobertura a um indivíduo com base nos fatores de risco inferidos a partir de sua sequência genômica? Será que um potencial empregador tem o direito de saber a composição genética de um empregado atual ou em potencial? Os futuros cônjuges têm o direito de saber os fatores de risco genéticos de suas noivas ou noivos? Onde está a fronteira entre as aplicações médicas e eletivas de terapia gênica? Outras questões incluem normas para determinar o grau em que os dados científicos relativos aos polimorfismos genéticos específicos podem ser interpretados e cumpridos com segurança e confiabilidade. Por exemplo, quais previsões devem ser feitas se um paciente manifesta uma mutação em um gene onde mutações de outros nucleotídeos mostraram ter efeitos danosos? E se o único dado disponível com relação a uma mutação de um gene em particular for baseada em observações geradas em um organismo-modelo, como *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta), *Caenorhabditis elegans* (nematódeo) ou camundongo? Ironicamente, a solução desses problemas pode vir a ser um processo mais demorado e trabalhoso que a determinação da primeira sequência do genoma humano.

BIOINFORMÁTICA

A **bioinformática** explora a formidável capacidade de armazenamento e processamento de informações do computador para desenvolver instrumentos para coleta, agrupamento,

recuperação e análise de dados biológicos em grande escala. Esses muitos recursos da bioinformática (ver a seguir), passíveis de serem acessados por meio da internet, têm um impacto e alcance global. O objetivo central de um projeto de bioinformática típico consiste em reunir todas as informações disponíveis pertinentes a um determinado tema em uma única localização, frequentemente chamada de **biblioteca** ou **base de dados**, em formato uniforme, o que torna os dados passíveis de manipulação e análise por algoritmos computadorizados.

Bases de dados de bioinformática

O tamanho e as capacidades das bases de dados de bioinformática podem variar muito, dependendo do espectro e da natureza de seus objetivos. A base de dados Pubmed compila as citações para todos os artigos publicados em milhares de periódicos dedicados às pesquisas biomédica e biológica. Atualmente, o Pubmed contém mais de 24 milhões de citações. Em contrapartida, RNA Helicase Database se restringe à sequência, à estrutura e às funções bioquímica e celular de uma única família de enzimas, as RNA-helicases.

Desafios da construção de uma base de dados

A construção de uma base de dados abrangente e útil comporta muitos desafios. Em primeiro lugar, a informação biomédica existe em uma ampla variedade de formas. Por exemplo, a informação de codificação em um genoma, embora volumosa, é composta por sequências lineares simples de quatro bases de nucleotídeos. Enquanto o número de resíduos de aminoácidos que define a estrutura primária de uma proteína é pequeno em relação ao número de pares de bases em um genoma, uma descrição da estrutura radiográfica de uma proteína requer que a localização de cada átomo seja especificada no espaço tridimensional. Em segundo lugar, o idealizador deve antecipar corretamente a maneira como os usuários podem querer pesquisar ou analisar as informações dentro de uma base de dados, bem como idealizar os algoritmos para lidar com essas variáveis. Até mesmo a tarefa aparentemente simples de busca em uma base de dados de genes emprega, em geral, de modo isolado ou em várias combinações, diversos critérios, como o nome do gene, o nome da proteína que ele codifica, a função biológica do produto genético, uma sequência nucleotídica dentro do gene, uma sequência de aminoácidos dentro da proteína que ela codifica, o organismo em que está presente ou o nome dos pesquisadores que determinaram a sequência daquele gene.

A EPIDEMIOLOGIA ESTABELECEU O POTENCIAL MÉDICO DO PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO

O poder da pesquisa biomédica básica reside na capacidade de o cientista de laboratório manipular alvos de pesquisa bem definidos e homogêneos sob circunstâncias cuidadosamente controladas. A capacidade de variar de modo independente as características qualitativas e quantitativas tanto do alvo quanto

das variáveis de entrada permite que sejam determinadas as relações de causa e efeito de forma direta e confiável. Essas vantagens são obtidas, no entanto, trabalhando-se com biomoléculas purificadas ou empregando-se linhagens de células em cultura ou “organismos-modelo”, como camundongos, que atuam como figurantes dos pacientes humanos, os quais representam os alvos finais e os beneficiários dessas pesquisas. As cobaias nem sempre reagem como o *Homo sapiens*, assim como uma placa de fibroblastos, de células renais ou de outras células cultivadas não consegue replicar a incrível complexidade de um ser humano.

A observação metódica dos comportamentos no mundo real há muito tempo provou ser uma fonte importante de ideias biomédicas. Por exemplo, Hipócrates observou que, embora determinadas doenças **epidêmicas** aparecessem de maneira esporádica, as doenças **endêmicas**, como a malária, exibiam clara associação com determinados locais, grupos étnicos, etc. A **epidemiologia** refere-se ao ramo das ciências biomédicas que emprega condutas de bioinformática para estender a capacidade e aumentar a precisão com a qual se pode identificar fatores benéficos ou prejudiciais da saúde humana por meio do estudo das populações mundiais reais.

Epidemiologia inicial do cólera

Um dos primeiros estudos epidemiológicos registrados, realizado pelo Dr. John Snow, empregou a análise geoespacial simples para rastrear a origem de um surto de cólera. Epidemias de cólera, tifo e outras doenças infecciosas eram relativamente comuns nas condições insalubres de Londres, no século XIX. Ao mapear as localizações das residências das vítimas, Snow foi capaz de rastrear a origem do contágio até a contaminação de uma das fontes públicas que supriam os cidadãos com sua água potável (**Figura 10-1**). Infelizmente, a capacidade limitada dos cálculos ou gráficos manuais tornou o sucesso de análises como a de Snow muito dependente da escolha da hipótese de trabalho utilizada para selecionar as variáveis a serem medidas e processadas. Assim, embora os londrinos do século XIX também reconhecessem amplamente que os chapeleiros estavam particularmente propensos a exibir um comportamento errático e irracional (p. ex., “tão louco quanto um chapeleiro”), quase um século transcorreu até que a etiologia chegasse aos compostos de mercúrio utilizados para preparar o feltro com o qual os chapéus eram fabricados.



FIGURA 10-1 Esta versão do mapa desenhado pelo Dr. John Snow compara a localização (pontos) das residências das vítimas de uma epidemia de cólera em Londres, em 1854, com a localização (X) das bombas que forneciam água potável para esses indivíduos. Constatou-se que a água contaminada a partir de uma bomba em Broad Street, situada aproximadamente no centro do aglomerado de vítimas, era a origem da epidemia nessas vizinhanças.

Impacto da bioinformática sobre a análise epidemiológica

À medida que o processo de análise de dados se tornou automatizado, a sofisticação e a taxa de sucesso das análises epidemiológicas subiram na mesma proporção. O projeto Framingham Heart Study, que tem monitorado as histórias pessoais e médicas de mais de 5 mil indivíduos residentes em Framingham (Massachusetts, Estados Unidos) e arredores e seus descendentes por mais de seis décadas tem sido fundamental para a identificação de fatores de risco para doenças cardiovasculares. Atualmente, algoritmos computacionais complexos capacitam os pesquisadores a avaliarem a influência de uma ampla gama de parâmetros relacionados à saúde ao rastrear a identidade e a fonte ou ao reconstruir a transmissão de uma doença ou condição: altura, peso, idade, gênero; índice de massa corporal; dieta; etnia; história médica; profissão; uso de drogas, álcool ou tabaco; exercícios; pressão sanguínea; ambiente; estado civil; tipo sanguíneo; nível de colesterol sanguíneo; áreas residenciais e de turismo; etc. Igualmente importante, a bioinformática moderna logo poderá capacitar os epidemiologistas a dissecarem as identidades e interações dos múltiplos fatores envolvidos em doenças complexas, como câncer, síndrome da morte súbita infantil, doença de Alzheimer ou ebola.

O acúmulo contínuo de sequências do genoma e do exoma de seres humanos individuais introduziu uma nova dimensão poderosa à série de fatores biológicos, ambientais e comportamentais a serem comparados e contrastados com a história médica de cada pessoa. Um dos primeiros frutos desses estudos foi a identificação dos genes responsáveis por alguns dos mais de 3 mil distúrbios mendelianos conhecidos ou suspeitos, cujas anormalidades genéticas etiológicas ainda precisam ser delineadas. A capacidade de avaliar as contribuições e as interações entre a constituição genética, o comportamento, o ambiente, a dieta e o estilo de vida de uma pessoa detém a promessa de revelar, mais adiante, as respostas para a antiga pergunta de por que algumas pessoas exibem maior vitalidade, vigor, longevidade e resistência a doenças que outras – em outras palavras, as origens fundamentais da saúde e do bem-estar.

RECURSOS DA BIOINFORMÁTICA E DA GENÔMICA

A grande coleção de bases de dados que foi desenvolvida para montagem, anotação, análise e distribuição de dados biológicos e biomédicos reflete a amplitude e a variedade das pesquisas molecular, bioquímica, epidemiológica e clínica contemporâneas. Serão discutidos, a seguir, o UniProtKB, o GenBank e o Protein Database (PDB), bancos de dados complementares entre si que abordam aspectos da estrutura macromolecular.

UniProtKB

O UniProt Knowledgebase, UniProtKB, é patrocinado pelo Swiss Institute of Bioinformatics e pelo European Bioinformatics Institute. O objetivo declarado do UniProtKB é “fornecer à comunidade científica dados abrangentes, de alta qualidade e de

acesso livre sobre sequência de proteínas e informações estruturais”. Ele é organizado em duas seções. O Swiss-Prot contém itens cujas funções atribuídas, estrutura de domínios, modificações pós-traducionais, etc. foram verificadas por curadoria manual, em grande parte por meio de pesquisas de dados empíricos da literatura científica e análise por especialistas em comparações de múltiplas sequências. O TrEMBL, por outro lado, contém sequências de proteínas determinadas empiricamente e derivadas do genoma cujas funções em potencial foram atribuídas ou anotadas automaticamente – apenas com base em algoritmos computacionais. Logo, enquanto o TrEMBL inclui atualmente mais de 80 milhões de itens, o Swiss-Prot contém pouco mais de 500 mil.

GenBank

A meta do GenBank, o banco de dados de sequências gênicas do National Institutes of Health (NIH), é coletar e armazenar todas as sequências nucleotídicas biológicas conhecidas e suas traduções de forma pesquisável. Estabelecida, em 1979, por Walter Goad, de Los Alamos National Laboratory, o GenBank é atualmente mantido pelo National Center for Biotechnology Information no NIH. O GenBank constitui um dos pilares da International Sequence Database Collaboration, um consórcio que inclui o DNA Database of Japan e o European Molecular Biology Laboratory.

PDB

O Protein Data Base (PDB [Banco de Dados de Proteínas]) do RCSB é um repositório de estruturas tridimensionais de proteínas, polinucleotídeos e outras macromoléculas biológicas. O PDB contém mais de 95 mil estruturas tridimensionais para proteínas, bem como proteínas ligadas a substratos, análogos de substrato, inibidores ou outras proteínas. O usuário pode girar essas estruturas livremente no espaço tridimensional, salientar aminoácidos específicos e selecionar uma variedade de formatos, como volume atômico, fita, esqueleto polipeptídico, etc. (ver Capítulos 5 e 6 e a seguir).

SNPs e SNPs marcados

Embora as sequências do genoma de dois indivíduos quaisquer sejam 99,9% idênticas, o DNA humano contém aproximadamente 10 milhões de locais onde os indivíduos diferem em uma única base nucleotídica. Esses sítios são chamados de **polimorfismos de nucleotídeo único**, ou **SNPs**. Quando grupos de SNPs localizados no mesmo cromossomo são herdados juntos em bloco, o perfil dos SNPs em cada bloco é chamado de **haplótipo**. Ao comparar as distribuições de haplótipos entre grupos de indivíduos que diferem em alguma característica fisiológica, como a sensibilidade a uma doença, os cientistas biomédicos podem identificar SNPs que estão associados a traços fenotípicos específicos. Esse processo pode ser facilitado ao se focalizar, nos **SNPs marcados**, um subgrupo de SNPs em determinado bloco suficiente para fornecer um marcador único para determinado haplótipo. As regiões selecionadas são, então, submetidas a estudos mais detalhados para se identificarem as variações genéticas específicas que contribuem para uma doença específica ou resposta fisiológica.

HapMap

Em 2002, cientistas dos Estados Unidos, do Canadá, da China, do Japão, da Nigéria e do Reino Unido lançaram o **International Haplotype Map (HapMap) Project**, um esforço abrangente para identificar SNPs associados a doenças humanas comuns e diferentes respostas a fármacos. O objetivo do projeto a longo prazo é fornecer diagnósticos mais precoces e precisos de potenciais fatores de risco genético que levam a uma melhor prevenção e tratamento mais eficaz do paciente. O conhecimento do perfil genético de um indivíduo também será utilizado para orientar a seleção de vacinas ou fármacos mais seguros e efetivos, um processo denominado **farmacogenômica**. Esses marcadores genéticos também fornecerão rótulos para identificar e rastrear genes específicos à medida que os cientistas procuram aprender mais sobre os processos fundamentais de herança e seleção genética.

ENCODE

A identificação de todos os *elementos funcionais* do genoma expandirá muito a nossa compreensão dos eventos moleculares que fundamentam o desenvolvimento humano, a saúde e a doença. Para atender a essa meta, o National Human Genome Research Institute (NHGRI [Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano]) deu início ao **ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements [Enciclopédia de Elementos do DNA]) Project**. Com base na University of California, em Santa Cruz (Califórnia, Estados Unidos), o ENCODE é um esforço colaborativo que combina condutas laboratoriais e computadorizadas para identificar qualquer elemento funcional do genoma humano. Os pesquisadores do consórcio, com bases e conhecimentos diversificados, colaboram para o desenvolvimento e a avaliação de novas técnicas de alto rendimento, tecnologias e estratégias para abordar as atuais deficiências na capacidade de identificar os elementos funcionais.

Em 2013, o ENCODE analisou 147 tipos diferentes de células humanas usando uma variedade de métodos para identificar ou **anotar** funções. Entre eles, estão o mapeamento de locais de metilação do DNA como um possível indicador de controle regulador, avaliando a localização da metilação de histonas e a sensibilidade à hidrólise de desoxirribonucleases como indicadores de atividade transcricional (ver Capítulo 35) e marcando os locais de ligação de fatores de transcrição utilizando um sistema repórter luciferase. Com base nesses indicadores circunstanciais, estima-se que cerca de 80% do genoma humano, incluindo a maior parte do DNA não codificante “lixo”, sejam funcionalmente ativos em um ou mais tipos de células.

Entrez Gene

A **Entrez Gene**, base de dados mantida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), fornece uma variedade de informações sobre genes humanos individuais. A informação inclui a sequência do genoma no gene e ao seu redor, os limites de éxon-intron, a sequência do(s) mRNA(s) produzida a partir do gene e quaisquer fenótipos conhecidos associados a uma determinada mutação do gene em questão. O **Entrez Gene** também lista, quando conhecida, a função da proteína

codificada e o impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único conhecidos dentro de sua região de codificação.

dbGaP

A **dbGaP, Database of Genotypes and Phenotypes**, é uma base de dados do NCBI que complementa o *Entrez Gene*. A dbGaP compila os resultados de pesquisa entre genótipos e fenótipos específicos. Para proteger a confidencialidade dos dados clínicos sensíveis, as informações contidas na dbGaP são organizadas em seções de acesso aberto e restrito. O acesso aos dados sensíveis exige que o usuário se submeta à autorização de um comitê de acesso de dados.

Bases de dados adicionais

Outros bancos de dados que lidam com genética e saúde humana incluem o **OMIM** (Online Mendelian Inheritance in Man), **HGMD** (Human Gene Mutation Database), o **Cancer Genome Atlas** e o **GeneCards**, que tenta coletar todas as informações relevantes de um determinado gene a partir de bancos de dados de todo o mundo para criar um “cartão” único e abrangente para cada um.

BIOLOGIA COMPUTACIONAL

O principal objetivo da **biologia computacional** é desenvolver modelos de computador que apliquem os princípios físicos, químicos e biológicos para reproduzir o comportamento de moléculas e processos biológicos. Diferentemente da bioinformática, cujo foco principal reside na coleta e na avaliação dos dados existentes, a biologia computacional é experimental e de natureza exploradora. Realizando experimentos virtuais e análises “*in silico*”, ou seja, realizada em computador ou por simulação em computador, a biologia computacional aspira a acelerar o ritmo e a eficiência da descoberta científica.

Os biólogos computacionais estão tentando desenvolver modelos preditivos que irão (1) possibilitar que a estrutura tridimensional de uma proteína seja determinada diretamente a partir de sua sequência primária, (2) determinar a função de proteínas desconhecidas a partir de suas sequências e estruturas, (3) fazer estudo de potenciais inibidores de uma proteína *in silico* e (4) construir células virtuais que reproduzam o comportamento e predigam as respostas de seus correspondentes vivos a patógenos, toxinas, dieta e fármacos. A criação de algoritmos computadorizados que imitam com exatidão o comportamento das proteínas, enzimas, células, etc. promete aumentar a velocidade, a eficiência e a segurança da pesquisa biomédica. A biologia computacional também possibilitará que os cientistas realizem experimentos *in silico*, cujos espectros, riscos ou natureza os tornem inacessíveis ou inapropriados para o laboratório convencional ou para as condutas clínicas convencionais.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA

Um método importante para a identificação, também chamada de **anotação**, de novas proteínas e produtos gênicos

Língua	Palavra	Alinhamento
Inglês	PHYSIOLOGICAL	P H Y S I O L O G I - C A L
Francês	PHYSIOLOGIQUE	P H Y S I O L O G I - Q U E
Alemão	PHYSIOLOGISCH	P H Y S I O L O G I S C H
Holandês	FYSIOLOGISCH	F - Y S I O L O G I S C H
Espanhol	FYSIOLOGICO	F - Y S I O L O G I - C O
Polonês	FIZJOLOGICZNY	F - I Z J O L O G I - C Z N Y

FIGURA 10-2 Representação de alinhamento de múltiplas sequências. As línguas evoluem de uma maneira que imita a dos genes e proteínas. A palavra inglesa *physiological* é mostrada em diversas línguas. O alinhamento demonstra seus aspectos conservados. Identidades com a língua inglesa são mostradas em vermelho-escuro; as similaridades linguísticas, em azul-escuro. Os algoritmos de alinhamento de múltipla sequência identificam as letras dos nucleotídeos e dos aminoácidos conservados no DNA, no RNA e nos polipeptídeos de modo análogo.

consiste em comparar suas sequências de aminoácido com as de proteínas cuja função ou estrutura foi determinada previamente. Em termos práticos, as pesquisas por homologia e as comparações de múltiplas sequências operam sobre o princípio de que as proteínas que realizam funções similares compartilharão os domínios conservados ou outros aspectos de sequência ou **motivos**, e vice-versa (**Figura 10-2**). Dos muitos algoritmos desenvolvidos com esse propósito, o mais amplamente utilizado é o **BLAST** e seus derivados.

BLAST

O **BLAST** (**Basic Local Alignment Search Tool**) e outros algoritmos de alinhamento/comparação de sequências têm suas origens nos esforços dos antigos biólogos moleculares para determinar se as semelhanças observadas na sequência entre proteínas que realizam funções metabólicas similares eram indicativas de alterações progressivas em uma proteína ancestral comum. O principal problema evolucionário abordado foi se as semelhanças refletem (1) a descendência originária de uma proteína ancestral comum (**evolução divergente**) ou (2) a seleção independente de um mecanismo comum para satisfazer alguma necessidade celular específica (**evolução convergente**), como seria antecipado se uma determinada solução fosse nitidamente superior às alternativas. O cálculo do número mínimo de alterações nucleotídicas necessárias para fazer a interconversão das potenciais isoformas da proteína permite que sejam feitas deduções considerando se as semelhanças e diferenças exibem um padrão indicativo de alteração progressiva decorrente de uma origem compartilhada.

Ao longo do tempo, o BLAST evoluiu para uma família de programas otimizados para solucionar necessidades e conjuntos de dados específicos. Assim, o **blastp** compara uma sequência de *aminoácidos* com uma base de dados de sequência de *proteínas*; o **blastn** compara uma sequência de *nucleotídeos* com uma base de dados de sequência de *nucleotídeos*; o **blastx** compara uma sequência de *nucleotídeos* traduzida em todas as fases de leitura com uma base de dados de sequência de *proteínas* para revelar os produtos de tradução em potencial; o **tblastn** compara uma sequência de *proteínas* com uma base de dados de sequência de *nucleotídeos* traduzida dinamicamente em todas as seis fases de leitura; e o **tblastx** compara as traduções

em seis fases de leitura de uma sequência de *nucleotídeos* com as traduções em seis fases de leitura de uma base de dados de sequência de *nucleotídeos*. Diferentemente dos múltiplos programas de alinhamento de sequência que se fundamentam nos alinhamentos *globais*, os algoritmos **BLAST** enfatizam as regiões de alinhamento *local* para detectar as relações entre as sequências apenas com regiões isoladas de semelhança. Essa conduta proporciona velocidade e sensibilidade aumentada para relações de sequência distantes. As sequências “pesquisadas” ou de entrada são quebradas em “palavras” (tamanho-padrão de 11 para nucleotídeos e de 3 para aminoácidos). As palavras que se encaixam nas bases de dados são, então, estendidas em ambas as direções.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS “DESCONHECIDAS”

Uma porção substancial, 30 a 50%, dos genes descobertos pelos projetos de sequenciamento de genomas codifica polipeptídeos “desconhecidos” ou hipotéticos para os quais homólogos de função conhecida estão faltando. Os bioinformáticos estão trabalhando para desenvolver e refinar as ferramentas que capacitam os cientistas a deduzirem a estrutura tridimensional e a função de proteínas crípticas a partir de suas sequências de aminoácidos. A capacidade de gerar estruturas e deduzir a função *in silico* promete acelerar, de maneira significativa, a identificação de proteínas e fornecer uma visão sobre o mecanismo pelo qual as proteínas se dobram. Esse conhecimento ajudará a compreender os mecanismos fundamentais de várias doenças de dobramento de proteína, bem como auxiliará os engenheiros moleculares a idealizarem novas proteínas para realizar novas funções.

O código de dobramento

A comparação de estruturas tridimensionais de proteínas pode revelar padrões que unem características de sequências primárias específicas para estruturas primárias, secundárias e terciárias – algumas vezes chamadas de código de dobramento. Os primeiros algoritmos utilizaram a frequência com que aminoácidos individuais ocorrem em uma α -hélice, folhas β , voltas e alças para prever a quantidade e a localização desses elementos na sequência de um polipeptídeo, conhecidos como topografia da estrutura secundária. Ao estender esse processo, por exemplo, considerando-se o impacto das interações hidrofóbicas na formação do núcleo da proteína, estão sendo desenvolvidos algoritmos de considerável credibilidade preditiva. No entanto, embora os programas atuais apresentem bom desempenho para gerar as conformações das proteínas compreendidas em um único domínio, a projeção da provável estrutura das proteínas de membrana e daquelas compostas por múltiplos domínios ainda se mostra problemática.

Relacionando a estrutura tridimensional à função

Os cientistas também continuam a procurar por características recorrentes da estrutura tridimensional da proteína que se correlacionem a funções fisiológicas específicas, como ligação

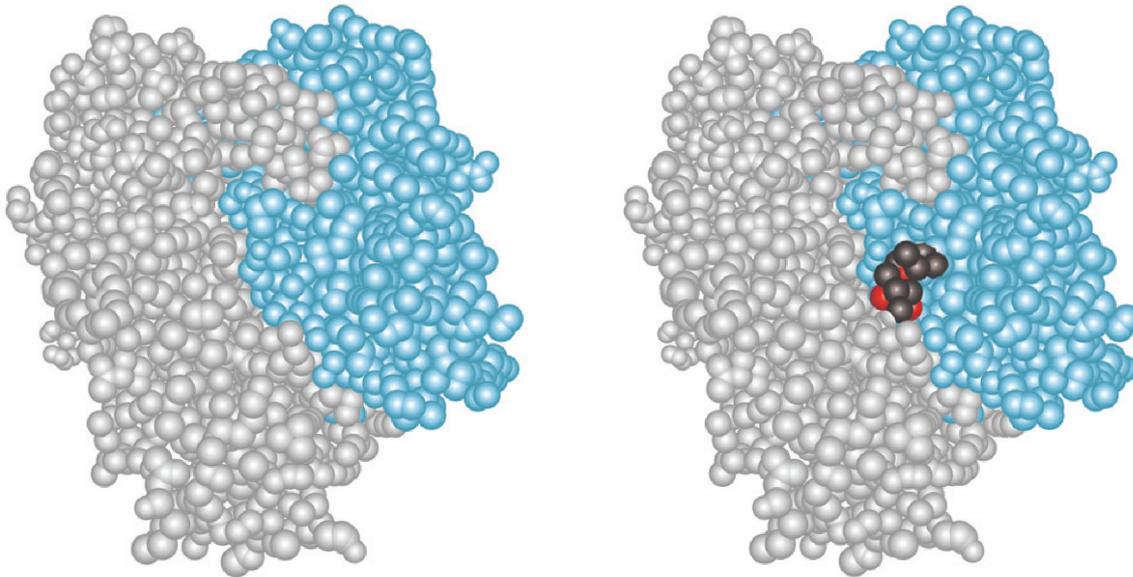


FIGURA 10-3 Representações de preenchimento de espaço da HMG-CoA-redutase homodimérica de *Pseudomonas mevalonii* com (à direita) e sem (à esquerda) o fármaco estatina lovastatina acoplado. Cada átomo é representado por uma esfera do tamanho de seu raio de van der Waals. As duas cadeias polipeptídicas estão coloridas em cinza e em azul. Os átomos de carbono da lovastatina estão em preto, e os átomos de oxigênio, em vermelho. Compare este modelo com as representações estruturais das proteínas mostradas nos Capítulos 5 e 6. (Adaptada de Protein Data Bank ID no. 1t02.)

a um determinado substrato ou a outro ligante. A representação do volume atômico da enzima HMG-CoA-redutase e de seu complexo com o fármaco lovastatina (Figura 10-3) proporciona alguma perspectiva sobre os desafios inerentes à identificação dos sítios de ligação de ligantes desde o ponto de partida. Onde uma estrutura tridimensional completa puder ser determinada ou prevista, a superfície da proteína poderá ser escaneada para os tipos de bolsas e fendas indicativos de prováveis sítios de ligação para substratos, efetores alostéricos, etc., por qualquer um dos diversos métodos, como o rastreamento de sua superfície com bolas de uma determinada dimensão (Figura 10-4). Os mapas de superfície gerados com o programa Graphical Representation and Analysis of Surface Properties, geralmente denominados **diagramas GRASP**, destacam as localizações de grupamentos funcionais neutros, com carga negativa e com carga positiva na superfície de uma proteína (Figura 10-5) para inferir um quadro mais detalhado da biomolécula que se liga ou “ancora” naquele local. A estrutura prevista dos ligantes que se ligam a uma proteína desconhecida, juntamente com outras características estruturais e motivos de sequência, pode fornecer aos cientistas os indícios necessários para fazer uma “suposição adequada” em relação às suas funções biológicas.

Enzyme Function Initiative

Em 2014, o banco de dados UniProt de sequências de proteínas declarou conter 84 milhões de registros. Embora seja uma quantidade impressionante, a utilidade dessa biblioteca de informação de sequências está gravemente limitada pela falta de evidências experimentais diretas documentando as capacidades funcionais de uma pequena porção dessas proteínas. Logo, na vasta maioria dos casos, as funções projetadas para essas proteínas foram inferidas pela procura de homólogos

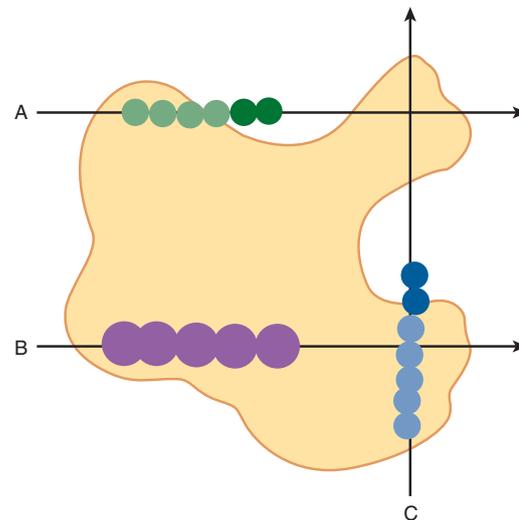


FIGURA 10-4 Representação simplificada de um programa de predição de sítio de ligante. Os programas de predição de sítio de ligante, como POCKET, LIGSITE ou Pocket-Finder, convertem a estrutura tridimensional de uma proteína em um conjunto de coordenadas dos seus átomos componentes. Uma fatia bidimensional do espaço preenchido por essas coordenadas está apresentado como um contorno de formato irregular (em cor de laranja-claro). Uma sonda arredondada é repetidamente passada por essas coordenadas ao longo de uma série de linhas paralelas a cada um dos três eixos das coordenadas (A, B, C). Os círculos com sombreado claro representam as posições da sonda onde seu raio se sobrepõe a um ou mais átomos no conjunto de coordenadas cartesianas. Os círculos com coloração intensa representam as posições onde nenhuma coordenada de átomo de proteína cai dentro do raio da sonda. A fim de qualificar como uma bolsa ou rachadura dentro da proteína, e não apenas como um espaço aberto fora dela, a sonda deve encontrar, mais adiante, átomos de proteína que se situam no outro lado da abertura (C).

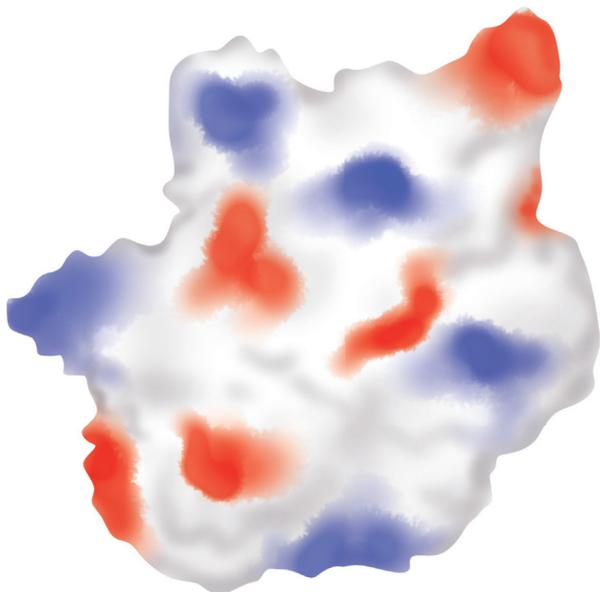


FIGURA 10-5 Representação de um diagrama GRASP indicando a topografia eletrostática de uma proteína. Evidencia-se uma representação de espaço preenchido de uma proteína hipotética. As áreas sombreadas em vermelho indicam a presença de cadeias laterais de aminoácido ou outras moléculas na superfície da proteína previstas por comportar uma carga negativa em pH neutro. O azul indica a presença dos grupamentos positivamente carregados. O branco denota as áreas previstas como neutras do ponto de vista eletrostático.

estruturais. Embora extrapolar a função a partir de uma forma possa soar teórico, em muitos casos o homólogo de sequência mais próximo é também uma proteína cuja função foi inferida a partir de um homólogo prévio. Consequentemente, a relação entre uma proteína nova e uma cujas propriedades funcionais foram experimentalmente verificadas pode ser muito distante e propensa a erros. Além disso, muitas das proteínas cujas sequências foram deduzidas a partir do sequenciamento do genoma não possuem sequer um homólogo distante de função conhecida. Estabelecida em 2010, o objetivo da Enzyme Function Initiative (Iniciativa Função Enzimática), um consórcio de cerca de 80 cientistas localizados em 9 instituições da North American Academic Institutions, é desenvolver uma nova geração de ferramentas computacionais e de bioinformática mais poderosas e confiáveis para a previsão da função a partir de sequência e estrutura de proteínas.

DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS COM AUXÍLIO COMPUTACIONAL

O objetivo do **desenvolvimento de medicamentos com auxílio computacional** (CADD, do inglês, *computer-aided drug design*) é desenvolver métodos *in silico* para identificar alvos farmacológicos em potencial com o objetivo de reduzir drasticamente os esforços investidos em abordagens de estudos laboratoriais caros e demorados. Apesar de não poder eliminar a necessidade de testes e análises empíricas, ele pode limitar o

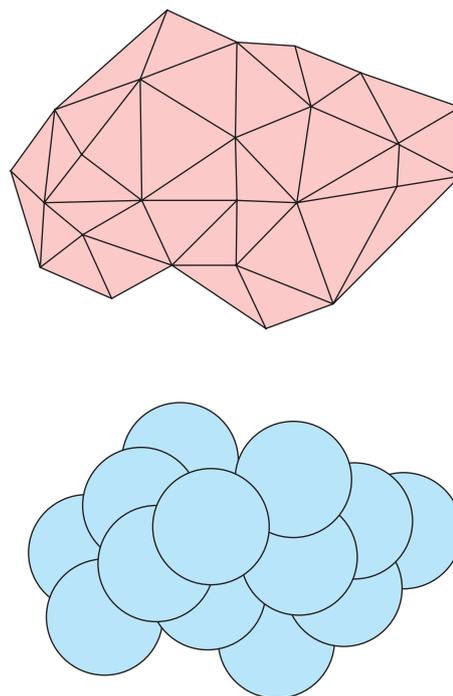


FIGURA 10-6 Representações digitais simplificadas da topografia da superfície de uma molécula usando painéis triangulares ou um conjunto de esferas.

foco em várias centenas ou milhares de vezes para encontrar “compostos-líderes” promissores.

Estudo de bibliotecas virtuais

Para proteínas com estrutura tridimensional conhecida, as condutas de ancoragem molecular empregam programas que tentam adaptar uma série de “pegs” ligantes potenciais em um sítio de ligação designado, ou “buraco”, em uma proteína-molde. Para identificar os ligantes ótimos, os programas de ancoragem devem considerar as formas apropriadas, bem como a presença e a posição de atributos hidrofóbicos, hidrofílicos e de cargas complementares. O primeiro passo nesse processo é construir uma representação digital da proteína que possa ser manipulada computacionalmente sem exceder a memória do computador e a capacidade de processamento de informação. Os métodos para atingir esse objetivo incluem representar a proteína como uma coleção de esferas ou dividir sua superfície em segmentos geométricos (Figura 10-6). A cada superfície, são atribuídos parâmetros matemáticos que resumem as características estéricas e físico-químicas da porção correspondente da proteína. O programa computacional tenta encaixar a representação digital semelhante de potenciais ligantes, calculando matematicamente o grau de ajuste, inserindo os parâmetros em uma fórmula, chamada de **função energética potencial**, que integra as interações atrativas e repulsivas entre elas.

Uma estratégia alternativa para explorar um biblioteca digitalizada de compostos conhecidos é utilizar o local-alvo na proteína como molde para construir um ligante complementar *de novo*. Nesse processo, a cavidade digitalizada é primeiro preenchida com esferas para definir o espaço estérico

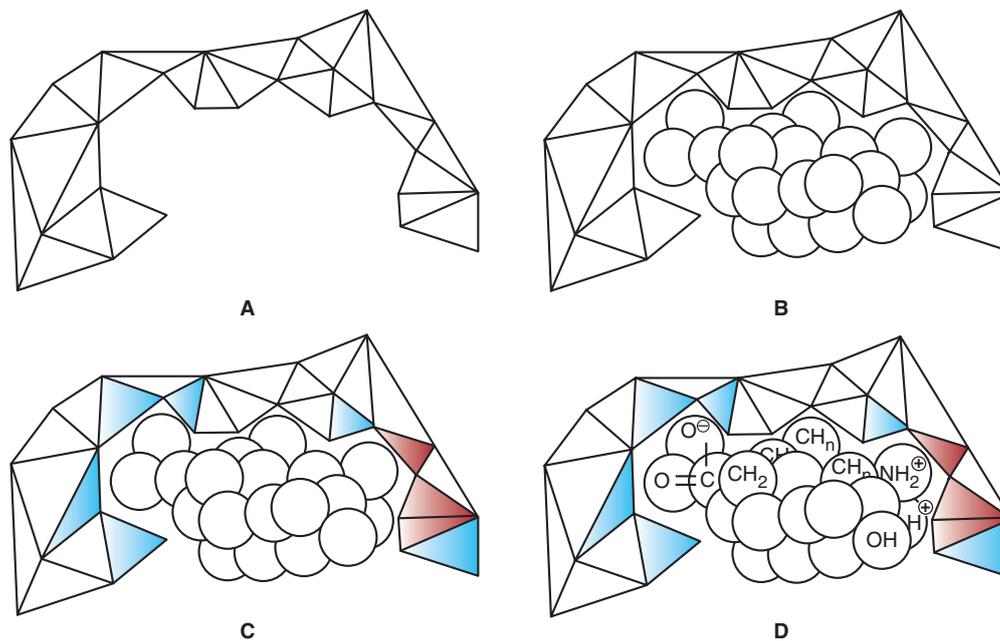


FIGURA 10-7 Engenharia reversa de um ligante *in silico*. O painel A mostra uma representação digital de um potencial sítio de ligação ao ligante. No painel B, o sítio de ligação está preenchido por unidades esféricas que definem os limites estéricos de um ligante em potencial. No painel C, características físico-químicas básicas do sítio de ligação são representadas usando branco para superfícies hidrofóbicas, vermelho para negativamente carregadas, azul para positivamente carregadas e verde para hidrofílicas não carregadas. O painel D mostra o posicionamento de grupamentos funcionais relacionados propostos para um ligante, como carboxilatos, grupamentos amino e porções hidrocarbônicas [CH_n]. O processo é finalizado pela inserção de átomos adicionais e ligações para unir os grupamentos-chave e formar uma única molécula.

disponível para o ligante. Então, grupos químicos funcionais projetados para interagir favoravelmente com a carga adjacente, “realizar” ligação de hidrogênio e interagir com outros grupamentos funcionais na superfície da proteína são posicionados em pontos-chave no modelo estérico. Por fim, o computador procura formas quimicamente viáveis para unir esses grupamentos-chave e gerar um ligante-candidato (Figura 10-7).

As afinidades de ligação dos inibidores selecionados com base em estudos anteriores de ancoragem encaixe foram decepcionantes. Um fator contribuinte foi a dificuldade em atribuir e considerar as interações estéricas, eletrostáticas e de ligações de hidrogênio utilizadas nas representações digitais de ligantes e proteínas. A segunda surgiu da natureza rígida dos modelos de primeira geração, que os tornou incapazes de replicar as mudanças conformacionais que ocorrem no ligante e na proteína como consequência da ligação e da catálise, um fenômeno chamado de “encaixe induzido” (ver Capítulo 7). No entanto, o desenvolvimento de modelos digitais de proteínas e ligantes com flexibilidade conformacional, enquanto tecnicamente viável,

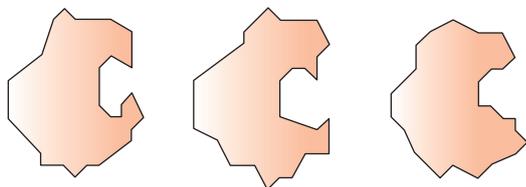


FIGURA 10-8 Representação bidimensional de um conjunto de conformêros de uma proteína. Observe como o formato do sítio de ligação se modifica.

requer imenso poder de computação. Dessa maneira, surgiram condutas híbridas que empregam um conjunto, ou a totalidade, de modelos que representam conformações ligeiramente diferentes da proteína (Figura 10-8), ou empregam os conjuntos de conformêros de ligantes (Figura 10-9) ou ligantes nos quais

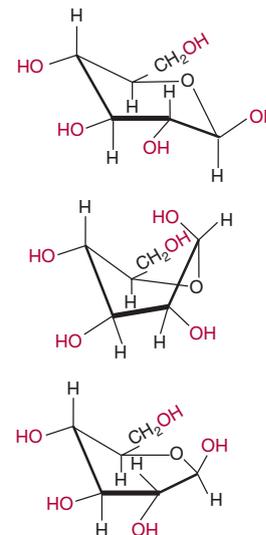


FIGURA 10-9 Conformêros de um ligante simples. São mostradas três das muitas conformações diferentes da glicose, comumente referidas como cadeira (parte superior), barco (centro) e meia cadeira (parte inferior). Observe as diferenças não apenas no formato e na compactação, mas também na presença de grupamentos hidroxil, participantes potenciais em ligações de hidrogênio, conforme destacado em vermelho.

se permite que apenas algumas ligações selecionadas girem livremente. Uma vez que o conjunto de potenciais ligantes foi restringido, análises de ancoragem mais sofisticadas podem ser realizadas para identificar ligantes de alta afinidade capazes de interagir com uma determinada proteína-alvo ao longo de seu espectro de estados conformacionais. O desenvolvimento da computação em nuvem oferece uma via em potencial para a expansão da capacidade computacional disponível para a realização de CADD.

Relações quantitativas de estrutura-atividade

Se nenhum modelo estrutural estiver disponível para a proteína de interesse, pode-se utilizar programas computacionais para auxiliar na busca de inibidores de alta afinidade, calculando e projetando as **relações quantitativas de estrutura-atividade** (QSARs, do inglês, *quantitative structure-activity relationships*). Nesse processo, dados empíricos que descrevem propriedades fundamentais dos compostos em estudo, como K_p , velocidade de absorção, taxa de metabolismo ou limiar tóxico, são plotados como uma função de uma representação digital das características estéricas, eletrostáticas e outras características das moléculas. A análise de regressão ou de rede neural da matriz multidimensional resultante é aplicada para identificar as características moleculares que têm melhor correlação com as propriedades biológicas desejadas. Essa informação pode ser usada para pesquisar as bases de dados de compostos químicos, de modo a identificar aqueles com a combinação mais promissora das características positivas *versus* negativas.

BIOLOGIA DE SISTEMAS E CÉLULAS VIRTUAIS

A biologia de sistemas visa construir diagramas de circuitos que modelam o metabolismo

O que aconteceria se um cientista pudesse detectar, em poucos momentos, o efeito de inibir determinada enzima, de substituir determinado gene, da resposta de uma célula muscular à insulina, da proliferação de uma célula cancerosa ou da produção de β -amiloide ao submeter uma pergunta adequada em um computador? E se eles pudessem realizar experimentos com um importante patógeno, como o vírus ebola, utilizando um vírus virtual completamente seguro? A meta da **biologia de sistemas** é construir o equivalente molecular dos diagramas de circuito que demonstrem fielmente os componentes de uma determinada unidade funcional e as interações entre eles em termos lógicos ou matemáticos. Essas unidades funcionais podem variar em tamanho e complexidade, desde as enzimas e os metabólitos dentro da via de biossíntese até a rede de proteínas que controla o ciclo da divisão celular e, por fim, células, órgãos e organismos inteiros. Então, esses modelos podem ser utilizados para realizar experimentos “virtuais” que podem aumentar a velocidade e a eficiência de pesquisas empíricas ao identificar as linhas mais promissoras da pesquisa e ao auxiliar na avaliação dos resultados. A habilidade de conduzir experimentos virtuais estende significativamente o alcance do investigador, dentro dos limites da exatidão do modelo, além do alcance da tecnologia empírica atual.

Já está ocorrendo um progresso significativo. Ao construir redes moleculares virtuais, os cientistas têm sido capazes de determinar como as cianobactérias montam um ciclo circadiano confiável usando apenas quatro proteínas. Os modelos da via de sinalização do receptor da célula T revelaram como seu circuito molecular foi arranjado para produzir respostas semelhantes a mudanças após a estimulação pelos peptídeos agonistas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complexes*) de uma célula apresentadora de antígeno. Os cientistas podem usar os hiatos encontrados na modelagem de sistemas moleculares e celulares para orientar a identificação e a anotação dos pedaços proteicos remanescentes, da mesma maneira que alguém que resolve um quebra-cabeça observa as peças que sobraram para identificar compatibilidade com os espaços vazios no jogo. Essa conduta de engenharia reversa foi empregada com sucesso para definir a função das gliceras-2-cinase tipo II nas bactérias e para identificar a síntese de folato “críptica” e os genes de transporte em vegetais.

Células virtuais

Recentemente os cientistas foram capazes de criar com sucesso uma rede metabólica virtual funcional composta por cerca de duas centenas de proteínas – um passo importante em direção à criação de uma **célula virtual**. O “santo graal” dos biólogos de sistemas consiste em replicar o comportamento das células humanas vivas *in silico*. Os benefícios potenciais dessas células virtuais são enormes. Elas permitirão não apenas a identificação rápida de locais promissores para intervenções terapêuticas, mas também poderão fornecer alertas antecipados de alvos para os quais a intervenção farmacológica poderia gerar efeitos colaterais danosos. A capacidade de realizar a triagem toxicológica rápida e econômica de materiais, variando desde herbicidas a cosméticos, beneficiará a saúde humana. As células virtuais também podem ajudar no diagnóstico. Ao manipular uma célula virtual para reproduzir o perfil metabólico de um paciente, as anormalidades genéticas subjacentes podem ser reveladas. A inter-relação dos diversos fatores ambientais, nutricionais e genéticos que contribuem para doenças multifatoriais, como o câncer, pode ser analisada de maneira sistemática. Os estudos preliminares de terapias genéticas potenciais podem ser avaliados com segurança e rapidez *in silico*.

A duplicação de uma célula viva *in silico* representa uma realização extremamente formidável. A célula virtual não deve apenas ter todas as proteínas e metabólitos para o tipo de célula a ser modelado (p. ex., do encéfalo, do fígado, do nervo, do músculo ou do tecido adiposo), como também devem estar presentes na concentração e na localização subcelular apropriadas. O modelo também deve considerar a dinâmica funcional de seus componentes, as afinidades de ligação, a eficiência catalítica, as modificações covalentes, etc. Fazer uma célula virtual ser capaz de se dividir ou de se diferenciar envolverá outro avanço extraordinário em complexidade e sofisticação.

Mapas de interação molecular empregam lógica simbólica

Os modelos construídos por biólogos de sistemas podem assumir diversas formas, dependendo das utilizações para as

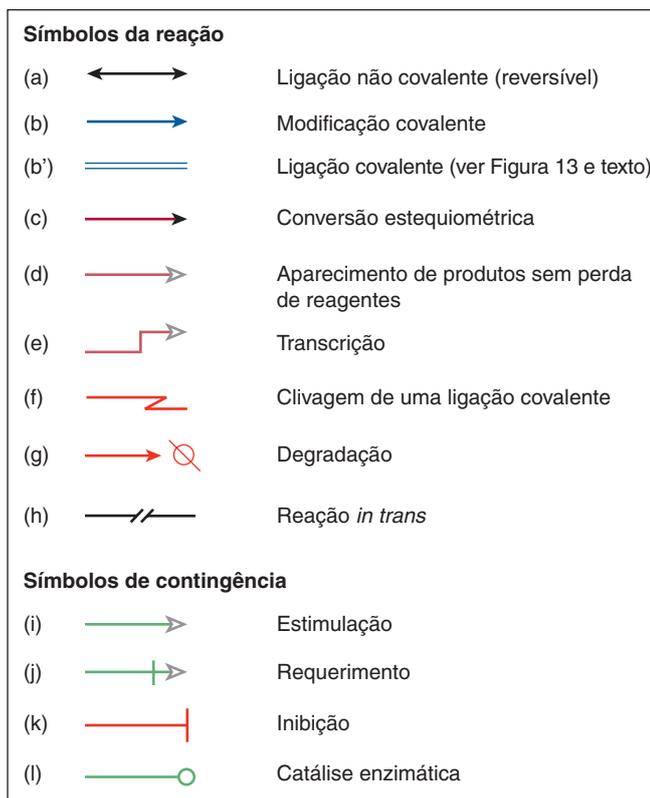
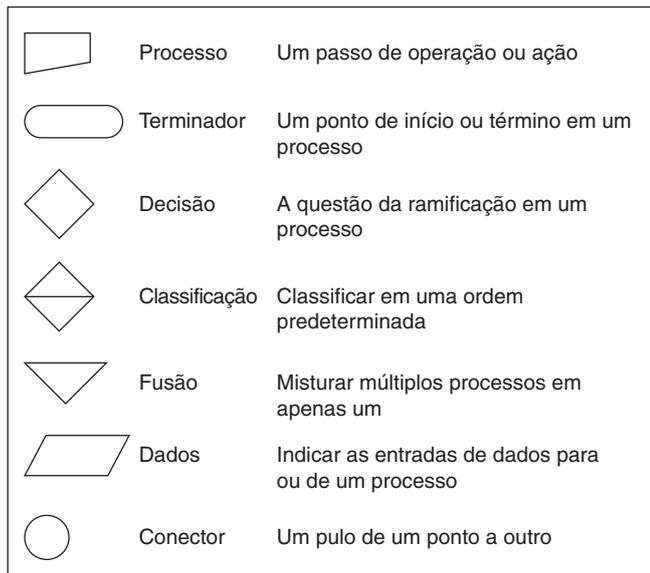


FIGURA 10-10 Símbolos empregados para construir diagramas de circuitos moleculares na biologia de sistemas. (Parte superior) Fluxograma dos símbolos das amostras. (Parte inferior) Símbolos gráficos para mapas de interação molecular. (Adaptada de Kohn KW, et al.: Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems biology. *Mol Biol Cell* 2006;17:1.)

quais eles se destinam e dos dados disponíveis para orientar sua construção. Caso haja o desejo de modelar o fluxo de metabólitos por meio das vias anabólica ou catabólica, não é suficiente conhecer as identidades e os reagentes envolvidos em cada reação catalisada por enzima. Para obter os valores

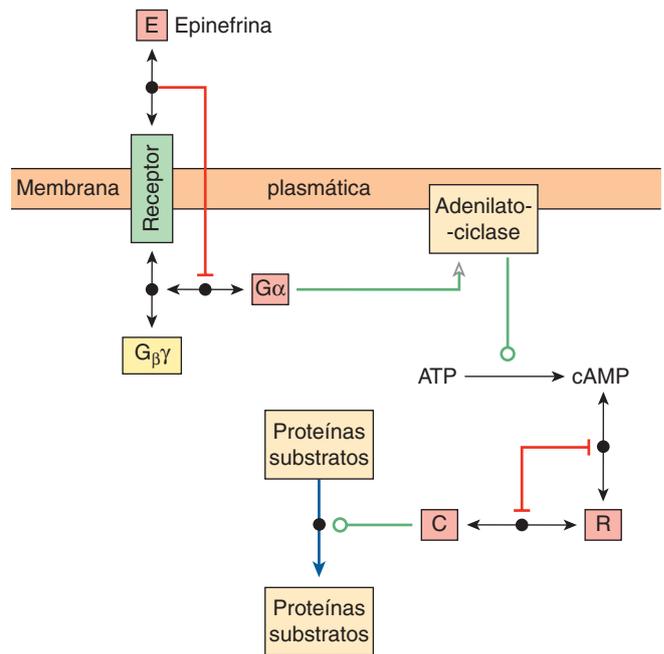


FIGURA 10-11 Representação de uma rede de interação molecular (MIN, do inglês, *molecular interaction network*) demonstrando uma cascata de transdução de sinal que leva à fosforilação das proteínas substratos pela subunidade catalítica, C, da proteína-quinase dependente de AMP cíclico em resposta à epinefrina. As proteínas são mostradas como retângulos ou quadrados. As setas de duas pontas indicam a formação de um complexo não covalente representado por um ponto no meio da seta. As linhas vermelhas com cabeças em formato de T indicam interação inibidora. A seta verde com cabeça vazada indica interação estimuladora. As linhas verdes com círculo vazado na extremidade indicam catálise. A seta azul com P indica modificação covalente por fosforilação. (Símbolos adaptados de Kohn KW, et al.: Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems biology. *Mol Biol Cell* 2006;17:1.)

matematicamente exatos, é necessário saber as concentrações dos metabólitos em questão, a quantidade de cada uma das enzimas presentes e seus parâmetros catalíticos.

Para a maioria dos usuários, é suficiente saber que um modelo descreve e prediz a natureza qualitativa das interações entre os componentes. Um ligante alostérico ativa ou inibe a enzima? A dissociação de uma proteína complexa leva à degradação de um ou mais dos seus componentes? Para esses propósitos, é necessário um conjunto de símbolos demonstrando a lógica simbólica dessas interações. As representações iniciais usavam com frequência os símbolos previamente desenvolvidos para a construção de fluxogramas para programação computacional ou para circuitos eletrônicos (Figura 10-10, parte superior). Ultimamente, no entanto, os biólogos de sistemas idealizaram símbolos próprios (Figura 10-10, parte inferior) para demonstrar esses diagramas de circuito molecular, mais comumente referidos como **Mapas de Interação Molecular (MIM)**, dos quais um exemplo é mostrado na Figura 10-11. Infelizmente, como acontece com a nomenclatura das enzimas (ver Capítulo 7), ainda é necessário um conjunto de símbolos universal e consistente.

CONCLUSÃO

A rápida evolução nas áreas da bioinformática e da biologia computacional sustenta um futuro promissor sem paralelo tanto para a medicina quanto para a biologia básica. Certas aplicações são atualmente percebidas de modo claro, algumas parecem longínquas, outras permanecem inimagináveis. Um importante objetivo dos biólogos computacionais consiste em desenvolver instrumentos de computação que aumentarão a eficiência, a eficácia e a velocidade do desenvolvimento de fármacos. Os epidemiologistas empregam computadores para, em uma população, extrair padrões indicativos de causas específicas e que contribuam tanto para a doença quanto para a saúde. Parece haver pouca dúvida de que seu impacto sobre a prática médica no século XXI será igual ou maior ao da descoberta da patogênese bacteriana no século XIX.

RESUMO

- A genômica forneceu uma enorme quantidade de informações de grande valor potencial para cientistas e médicos.
- A genômica será o catalisador para o desenvolvimento e a difusão da medicina personalizada, em que o diagnóstico e o tratamento serão guiados pelo conhecimento da sequência do DNA individual de cada paciente.
- A bioinformática envolve a idealização de algoritmos computacionais e a construção de bases de dados que possibilitem aos cientistas biomédicos o acesso e a análise da crescente avalanche de dados biomédicos.
- O objetivo da epidemiologia consiste em extrair dados médicos a partir do comportamento de populações humanas heterogêneas por meio da aplicação de instrumentos estatísticos sofisticados.
- Os principais desafios na construção de bases de dados adequadas incluem a idealização dos meios para armazenar e organizar dados complexos que acomodem uma ampla gama de critérios de pesquisa em potencial.
- O objetivo do Projeto ENCODE é identificar todos os elementos funcionais dentro do genoma humano.
- As bases de dados HapMap, Entrez Gene e dbGaP contêm dados pertinentes à relação das mutações genéticas com as condições patológicas.
- A genômica revelou as sequências de milhares de proteínas para as quais os dados relacionados à sua estrutura e função não estão disponíveis.
- O BLAST é usado para identificar os genes e as proteínas desconhecidos por meio da busca de sequências homólogas de função conhecida.
- Os biólogos computacionais estão trabalhando para desenvolver programas que prevejam a estrutura tridimensional de proteínas desconhecidas diretamente a partir de suas sequências primárias, decifrando o código de dobramento.
- O desenvolvimento de fármacos com auxílio computacional acelerou a descoberta de fármacos por testar a ancoragem de potenciais inibidores às proteínas-alvo selecionadas *in silico*.
- Os biólogos computacionais procuram aumentar a velocidade e a abrangência da pesquisa biomédica, construindo representações digitais de proteínas, vias e células, o que permitirá que os cientistas realizem experimentos virtuais *in silico*.

- A meta final dos biólogos computacionais é criar células virtuais e organismos que possam ser utilizados para diagnosticar e tratar doenças de maneira eficiente e segura, sobretudo as de natureza multifuncional.
- Os biólogos de sistemas comumente constroem representações esquemáticas, conhecidas como mapas de interação molecular, nos quais a lógica simbólica é empregada para ilustrar as relações entre os componentes que constituem uma via ou alguma outra unidade funcional.

REFERÊNCIAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al: Exome sequencing as a tool for Mendelian gene discovery. *Nature Rev Genetics* 2011;12:745.
- Bromberg Y: Building a genome analysis pipeline to predict gene risk and prevent disease. *J Mol Biol* 2013;425:3993.
- Couzin J: The HapMap gold rush: researchers mine a rich deposit. *Science* 2006;312:1131.
- Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW: Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 2008;77:383.
- Dark MJ: Whole genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infect Drug Resist* 2013;6:115.
- Ekins S, Mestres J, Testa B: *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol* 2007;152:9.
- Ekins S, Mestres J, Testa B: *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br J Pharmacol* 2007;152:21.
- Gibson DG, Glass JL, Lartigue C, et al: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010;329:52.
- Guha R: On exploring structure-activity relationships. *Methods Mol Biol* 2013;993:81.
- Kaiser J: Affordable “exomes” fill gaps in a catalog of rare diseases. *Science* 2010;330:903.
- Kohn KW, Aladjem MI, Weinstein JN, et al: Molecular interaction maps of bioregulatory networks: a general rubric for systems biology. *Mol Biol Cell* 2006;17:1.
- Laurie ATR, Jackson RM: Methods for prediction of protein–ligand binding sites for structure-based drug design and virtual ligand screening. *Curr Prot Peptide Sci* 2006;7:395.
- McInnes C: Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr Opin Cell Biol* 2007;11:494.
- Mohamed S, Syed B: Commercial prospects for genomic sequencing technologies. *Nature Rev Drug Disc* 2013;12:341.
- Oppenheimer GM: Becoming the Framingham study 1947-1950. *Am J Public Health* 2005;95:602.
- Qu H, Fang X: A brief review on the human encyclopedia of DNA elements (ENCODE) project. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013;11:135.
- Pasic MD, Samaan S, Yousef GM: Genomic medicine: New frontiers and new challenges. *Clin Chem* 2013;59:158.
- Sudmant PH, Kitzman JO, Antonacci F, et al: Diversity of human gene copy number variation and multicopy genes. *Science* 2010;330:641.
- The 1000 Genomes Project Consortium: An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2013;491:56.
- Wade CH, Tarini BA, Wilfond BS: Growing up in the genomic era: Implications of whole-genome sequencing for children, families, and pediatric practice. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:535.
- Wheeler DA, Wang L: From human genome to cancer genome: The first decade. *Genome Res* 2013;23:1054.

Questões para estudo

Seção II – Enzimas: cinética, mecanismo, regulação e bioinformática

- Respiração rápida e superficial pode levar à hiperventilação, uma condição em que o dióxido de carbono é exalado dos pulmões mais rapidamente do que é produzido pelos tecidos. Explique como a hiperventilação pode levar ao aumento do pH sanguíneo.
- Um bioquímico deseja alterar o sítio ativo da quimiotripsina de forma que ela clivará ligações peptídicas do lado carboxílico de resíduos aspartil e glutamyl. O bioquímico terá mais chance de sucesso se ele substituir o aminoácido hidrofóbico na parte inferior do bolso do centro ativo por:
 - Fenilalanina.
 - Treonina.
 - Glutamina.
 - Lisina.
 - Prolina.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Muitas proteínas mitocondriais são covalentemente modificadas pela acetilação de grupos amino-épsilon de resíduos de lisina.
 - A acetilação proteica é um exemplo de uma modificação covalente que pode ser “revertida” em condições fisiológicas.
 - Altos níveis de acetil-CoA tendem a favorecer a acetilação proteica.
 - A acetilação aumenta o volume espacial das cadeias laterais de aminoácidos que são submetidos a esse tipo de modificação.
 - A cadeia lateral de um resíduo lisil acetilado é uma base mais forte do que um resíduo lisil não modificado.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - A catálise acidobásica é a característica predominante do mecanismo catalítico da protease do HIV.
 - O modelo chave e fechadura de Fischer explica a função da estabilização do estado de transição na catálise enzimática.
 - A hidrólise de ligações peptídicas pelas serinas proteases envolve a formação transitória de uma enzima modificada.
 - Muitas enzimas empregam íons metálicos como grupos prostéticos ou cofatores.
 - Em geral, as enzimas ligam-se a análogos de estado de transição mais fortemente do que a análogos de substratos.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA.
 - Para calcular a K_{eq} , a constante de equilíbrio de uma reação, divide-se a velocidade inicial da reação direta (velocidade – 1) pela velocidade inicial da reação inversa (velocidade – 1).
 - A presença de uma enzima não possui efeito sobre a K_{eq} .
 - Para uma reação conduzida à temperatura constante, a fração de moléculas do reagente que possui energia cinética suficiente para ultrapassar a energia de ativação da reação é uma constante.
 - As enzimas e outros catalisadores reduzem a energia de ativação das reações.
 - O sinal algébrico de ΔG , a variação de energia livre de Gibbs para a reação, indica a direção em que a reação seguirá.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
 - Como utilizado na bioquímica, a concentração do estado padrão dos produtos e reagentes, que não sejam prótons, é de 1 molar.
 - A ΔG é uma função do logaritmo de K_{eq} .
 - Como utilizado em reações cinéticas, o termo “espontaneidade” refere-se ao fato de a reação como escrita ser favorecida para avançar da esquerda para a direita.
 - A ΔG° representa a variação de energia livre que acompanha a transição do estado padrão até o equilíbrio.
 - Quando atingem o equilíbrio, as velocidades das reações direta e inversa caem para zero.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
 - As enzimas reduzem a energia de ativação de uma reação.
 - As enzimas, com frequência, reduzem a energia de ativação, desestabilizando os intermediários do estado de transição.
 - Resíduos histidil do sítio ativo, em geral, auxiliam na catálise, atuando como doadores ou aceptores de prótons.
 - A catálise covalente é empregada por algumas enzimas para fornecer uma via alternativa de reação.
 - A presença de uma enzima não tem efeito sobre a ΔG° .
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
 - Para a maioria das enzimas, a velocidade inicial da reação, v_i , exibe uma dependência hiperbólica da $[S]$.
 - Quando a $[S]$ é muito menor que o K_m , o termo $K_m + [S]$ da equação de Michaelis-Menten se aproxima muito do K_m . Sob essas condições, a velocidade de catálise é uma função linear da $[S]$.
 - As concentrações molares dos substratos e dos produtos são iguais quando a velocidade de uma reação catalisada por enzima atinge metade de seu valor potencial máximo ($V_{m\acute{a}x}/2$).
 - Diz-se que uma enzima se tornou saturada com o substrato quando o aumento sucessivo da $[S]$ não produz aumento significativo em v_i .
 - Quando é medida a velocidade no estado de equilíbrio, a concentração dos substratos deve exceder muito àquela da enzima catalizadora.
- Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
 - Algumas enzimas monoméricas exibem cinética de velocidade inicial sigmoidal.
 - A equação de Hill é utilizada para realizar análises quantitativas do comportamento cooperativo das enzimas ou de carreadores proteicos, como hemoglobina ou calmodulina.
 - Para uma enzima que exibe ligação cooperativa com o substrato, o valor de n (o coeficiente de Hill) maior que uma unidade significa cooperatividade positiva.
 - Uma enzima que catalisa uma reação entre dois ou mais substratos é conhecida por operar por um mecanismo sequencial se for necessário que os substratos se liguem em uma ordem fixa.

- E. Os grupamentos prostéticos habilitam as enzimas a adicionar grupos químicos, além daqueles presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos.
10. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. O CI_{50} é um termo operacional simples para expressar a potência de um inibidor.
 - B. Os gráficos de Lineweaver-Burk e de Dixon empregam versões rearranjadas da equação de Michaelis-Menten para gerar representações lineares do comportamento cinético e da inibição.
 - C. Um gráfico de $1/v_i$ versus $1/[S]$ pode ser utilizado para avaliar o tipo e a afinidade de um inibidor.
 - D. Os inibidores não competitivos simples reduzem o K_m aparente por um substrato.
 - E. Os inibidores não competitivos de uma reação catalisada por enzima têm pouca ou nenhuma semelhança estrutural com os substratos
11. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. Para uma determinada enzima, as concentrações intracelulares de seus substratos tendem a estar próxima dos seus valores de K_m .
 - B. O confinamento de certas vias em organelas intracelulares facilita a tarefa da regulação metabólica.
 - C. O passo mais precoce em uma via bioquímica, onde o controle regulador pode ser eficientemente exercido, é a primeira etapa comprometida.
 - D. A regulação por retroalimentação refere-se ao controle alostérico de uma etapa inicial de uma via bioquímica pelo(s) produto(s) final(is) da via.
 - E. O controle metabólico é mais efetivo quando uma das etapas mais rápidas da via é alvo de regulação.
12. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. O efeito Bohr refere-se à liberação de prótons que ocorre quando oxigênio se liga à desoxi-hemoglobina.
 - B. Logo após o nascimento de um bebê, a síntese da cadeia α sofre rápida indução até que ela compreenda 50% do tetramero de hemoglobina.
 - C. A cadeia β da hemoglobina fetal está presente ao longo de toda a gestação.
 - D. O termo talassemia refere-se a qualquer defeito genético que resulte em ausência parcial ou total das cadeias α ou β da hemoglobina.
 - E. A conformação tensa da hemoglobina é estabilizada por diversas pontes salinas formadas entre as subunidades.
13. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. O impedimento estérico pela histidina E7 exerce uma função crítica em enfraquecer a afinidade da hemoglobina por monóxido de carbono (CO).
 - B. A anidrase carbônica exerce uma função crítica na respiração devido à sua capacidade de quebrar 2,3-bisfosfoglicerato nos pulmões.
 - C. A hemoglobina S distingue-se por uma mutação genética que substitui Glu6 na subunidade β por Val, criando um adesivo pegajoso na sua superfície.
 - D. A oxidação do ferro heme do estado + 2 para + 3 abole a habilidade da hemoglobina de se ligar a oxigênio.
 - E. As diferenças funcionais entre hemoglobina e mioglobina refletem, em grande escala, nas diferenças em suas estruturas quaternárias.
14. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. A posição das cargas no sítio ativo da tripsina faz da serina um nucleófilo mais forte.
 - B. A constante de Michaelis é a concentração de substrato em que a velocidade da reação é metade da máxima.
 - C. Durante as reações de transaminação, ambos os substratos estão ligados à enzima antes de qualquer produto ser liberado.
 - D. Os resíduos de histidina atuam tanto como ácido quanto como base durante a catálise por uma aspartato-protease.
 - E. Muitas coenzimas e cofatores são derivados de vitaminas.
15. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. As enzimas intercambiáveis exercem papéis-chave em redes reguladoras integradas.
 - B. A fosforilação de uma enzima, com frequência, altera a sua eficiência catalítica.
 - C. “Segundos mensageiros” atuam como extensões intracelulares ou substitutos de hormônios e impulsos nervosos, interagindo com receptores da superfície celular.
 - D. A habilidade das proteínas-cinase em catalisar a reação inversa que remove o grupamento fosforil é importante para a versatilidade desse mecanismo regulador molecular.
 - E. A ativação do zimogênio por proteólise parcial é irreversível em condições fisiológicas.
16. Selecione a afirmativa que está INCORRETA:
- A. O banco de dados HapMap foca na localização e na identidade de polimorfismo de um único nucleotídeo em seres humanos.
 - B. O Genbank é um repositório de dados dos resultados fenotípicos de genes *knockouts* em seres humanos.
 - C. O Protein Database, ou PDB, armazena as estruturas tridimensionais de proteínas, determinadas por cristalografia de raios X ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).
 - D. O objetivo do projeto ENCODE é identificar todos os elementos funcionais do genoma.
 - E. O BLAST compara sequências de proteínas e nucleotídeos para identificar regiões de similaridade.
17. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
- A. O principal obstáculo para projetar fármacos com o auxílio da informática é a demanda extraordinária de capacidade computacional necessária para permitir um grau realístico de flexibilidade conformacional das proteínas e dos ligantes.
 - B. A flexibilidade conformacional é necessária para permitir que o ligante e a proteína influenciem um ao outro, como descrito pelo modelo de chave e fechadura para a ligação proteína-ligante.
 - C. A construção de uma célula virtual forneceria os meios para detectar rápida e eficientemente muitos efeitos indesejados de fármacos em potencial sem a necessidade de testes laboratoriais onerosos.
 - D. Os sistemas biológicos destacam a maneira pela qual as conexões entre componentes enzimáticos e outros componentes de uma célula afetam o seu desempenho.
 - E. Os sistemas biológicos frequentemente empregam a lógica simbólica de programas computacionais e circuitos eletrônicos para descrever as interações entre proteínas, genes e metabólitos.

18. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:

- A. As representações GRASP destacam áreas da superfície de uma proteína que possuem características locais positivas ou negativas.
- B. As simulações de dinâmica molecular procuram modelar os tipos e a amplitude de movimentos que as proteínas conformacionalmente flexíveis sofrem.
- C. Os pesquisadores usam programas de rolagem para localizar recortes e fendas na superfície de uma proteína, uma

vez que estes representam locais prováveis para o ataque por proteases.

- D. A fim de acomodar o poder computacional disponível, simulações de ancoragem molecular, com frequência, restringem a rotação livre a apenas um pequeno conjunto de ligações.
- E. Discernir as relações evolutivas entre proteínas constitui um dos meios mais eficazes para prever as prováveis funções de um polipeptídeo recém-descoberto.



Bioenergética: a função do ATP

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Relatar a primeira e a segunda leis da termodinâmica e compreender como elas se aplicam aos sistemas biológicos.
- Explicar o que significam os termos energia livre, entropia, entalpia, exergônica e endergônica.
- Observar como as reações endergônicas podem ser favorecidas por meio do acoplamento às reações que são exergônicas nos sistemas biológicos.
- Compreender o papel dos fosfatos de alta energia, do ATP e de outros nucleotídeos trifosfato na transferência de energia livre dos processos exergônicos para os endergônicos, possibilitando que atuem como a “moeda energética” das células.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioenergética, ou termodinâmica bioquímica, é o estudo das alterações da energia que acompanham as reações bioquímicas. Os sistemas biológicos são essencialmente **isotérmicos** e utilizam energia química para ativar os processos vivos. A maneira como um animal obtém o combustível adequado a partir da sua alimentação para o fornecimento dessa energia é fundamental para a compreensão da nutrição normal e do metabolismo. A morte por **inanição** ocorre quando as reservas de energia disponíveis são exauridas, sendo que determinadas formas de desnutrição estão associadas ao desequilíbrio da energia (**marasmo**). Os hormônios da tireoide controlam as **taxas metabólicas** (velocidade de energia liberada), e seu mau funcionamento leva ao desenvolvimento de doenças. O armazenamento excessivo da energia sobressalente provoca a **obesidade**, uma condição cada vez mais comum na sociedade ocidental, e que predispõe a muitas doenças, inclusive à doença cardiovascular e ao diabetes melito tipo 2, além de diminuir a expectativa de vida.

A ENERGIA LIVRE É A ENERGIA ÚTIL EM UM SISTEMA

A variação da **energia livre** de Gibbs (ΔG) é a porção da variação total de energia no sistema que está disponível para realizar trabalho – isto é, a energia útil, também conhecida como potencial químico.

Os sistemas biológicos adaptam-se às leis gerais da termodinâmica

A primeira lei da termodinâmica declara que **a energia total de um sistema, inclusive em seus arredores, permanece constante**. Isso significa que, dentro do sistema total, a energia não é perdida nem adquirida durante qualquer alteração. No entanto, a energia pode ser transferida de uma parte do sistema para outra ou ainda ser transformada em outra forma de energia. Nos sistemas vivos, a energia química pode ser transformada em calor ou em energia elétrica, radiante ou mecânica.

A segunda lei da termodinâmica afirma que **a entropia total de um sistema deve aumentar quando um processo ocorre de forma espontânea**. A **entropia** é a extensão da desordem ou da aleatoriedade do sistema e se torna máxima quando se aproxima do equilíbrio. Sob condições de pressão e temperatura constantes, a relação entre a variação da energia livre (ΔG) de um sistema em reação e a variação na entropia (ΔS) é expressa pela seguinte equação, a qual combina as duas leis da termodinâmica:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

em que ΔH é a variação na **entalpia** (calor) e T é a temperatura absoluta.

Nas reações bioquímicas, visto a ΔH é aproximadamente igual à **variação total da energia interna da reação ou ΔE** , a relação anterior pode ser expressa da seguinte forma:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S$$

Se a ΔG é negativa, a reação prossegue espontaneamente com perda de energia livre; isto é, ela é **exergônica**. Se, além disso, a ΔG é de grande magnitude, a reação quase chega ao fim e é essencialmente irreversível. Por outro lado, se a ΔG é positiva, a reação prossegue apenas se a energia livre puder ser adquirida; isto é, ela é **endergônica**. Se, além disso, a magnitude da ΔG é grande, o sistema é estável, com pouca ou nenhuma tendência para que ocorra uma reação. Se a ΔG é zero, o sistema está em equilíbrio e não ocorre nenhuma alteração global.

Quando os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L, a ΔG^0 é a variação de energia livre padrão. Para as reações bioquímicas, um estado-padrão é definido como tendo um pH de 7,0. A variação da energia livre padrão nesse estado-padrão é indicada por $\Delta G^{0'}$.

A variação de energia livre padrão pode ser calculada a partir da constante de equilíbrio K_{eq} .

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K'_{eq}$$

em que R é a constante do gás e T é a temperatura absoluta (ver Capítulo 8). É importante observar que a ΔG real pode ser maior ou menor que $\Delta G^{0'}$, dependendo das concentrações dos diversos reagentes, inclusive do solvente, de vários íons e das proteínas.

Em um sistema bioquímico, uma enzima somente acelera a obtenção do equilíbrio; ela nunca altera as concentrações finais dos reagentes em equilíbrio.

OS PROCESSOS ENDERGÔNICOS PROSSEGUEM PELO ACOPLAMENTO COM PROCESSOS EXERGÔNICOS

Os processos vitais – por exemplo, reações de síntese, contração muscular, condução do impulso nervoso e transporte ativo – obtêm a energia pela ligação química, ou **acoplamento**, às reações oxidativas. Em sua forma mais simples, esse tipo de acoplamento pode ser representado conforme demonstrado na **Figura 11-1**. A conversão do metabólito A em metabólito B ocorre com a liberação de energia livre e está acoplada à outra reação em que

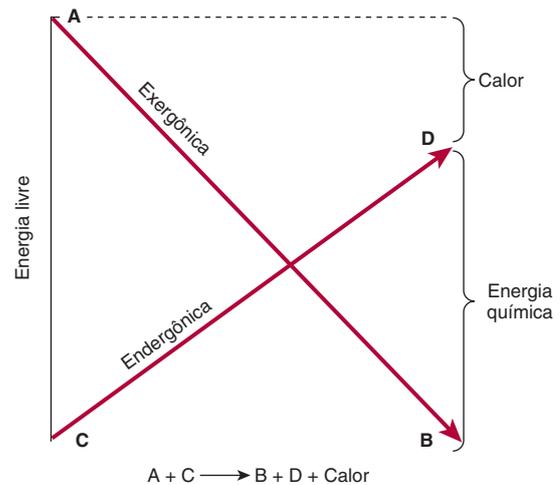
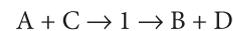


FIGURA 11-1 Acoplamento de uma reação exergônica a uma reação endergônica.

a energia livre é necessária para converter o metabólito C em metabólito D. Os termos **exergônico** e **endergônico**, em vez dos termos químicos normais “exotérmico” e “endotérmico”, são utilizados para indicar que um processo é acompanhado pela perda ou ganho, respectivamente, de energia livre em qualquer forma, não necessariamente como calor. Na prática, um processo endergônico não pode existir de forma independente, mas deve ser um componente de um sistema exergônico-endergônico acoplado no qual a alteração líquida global é exergônica. As reações exergônicas são denominadas **catabolismo** (geralmente a clivagem ou a oxidação das moléculas de combustíveis), ao passo que as reações de síntese que acumulam substâncias são denominadas **anabolismo**. Os processos catabólicos e anabólicos combinados constituem o **metabolismo**.

Se a reação mostrada na Figura 11-1 ocorre da esquerda para a direita, então o processo global deve ser acompanhado por perda de energia livre como calor. Um possível mecanismo de acoplamento poderia ser idealizado quando um intermediário (I) obrigatório comum toma parte em ambas as reações, isto é,



Algumas reações exergônicas e endergônicas nos sistemas biológicos são ligadas dessa forma. Esse tipo de sistema possui um mecanismo próprio para o controle biológico da velocidade dos processos oxidativos, pois o intermediário obrigatório comum permite que a velocidade da utilização do produto da via de síntese (D) seja determinada pela velocidade de ação da massa em que A é oxidada. Na verdade, essas relações são a base para o conceito do **controle respiratório**, o processo que impede que um organismo gaste energia fora de controle. Uma extensão do conceito de acoplamento é fornecida pelas

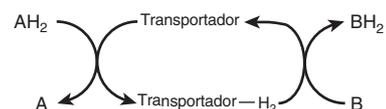


FIGURA 11-2 Acoplamento das reações de desidrogenação e hidrogenação por um transportador intermediário.

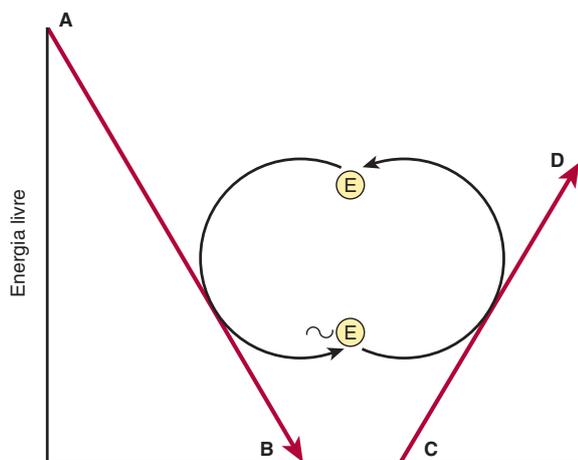


FIGURA 11-3 Transferência de energia livre de uma reação exergônica para uma reação endergônica através de um composto intermediário de alta energia ($\sim E$).

reações da desidrogenação, que estão acopladas a hidrogenações por um carreador intermediário (Figura 11-2).

Um método alternativo para acoplar um processo exergônico a um endergônico consiste em sintetizar um composto de alto potencial de energia na reação exergônica e o incorporar na reação endergônica, efetuando, assim, uma transferência de energia livre da via exergônica para a endergônica (Figura 11-3). A vantagem biológica desse mecanismo é que o composto de alto potencial de energia, $\sim E$, ao contrário de I no sistema anterior, não precisa estar estruturalmente relacionado a A, B, C ou D, possibilitando que $\sim E$ sirva como transdutor de energia de uma ampla gama de reações exergônicas para uma gama igualmente grande de processos ou reações endergônicas, como a biossíntese, a contração muscular, a excitação nervosa e o transporte ativo. Na célula viva, o principal composto carreador ou intermediário de alta energia (designado $\sim E$ na Figura 11-3) é o **trifosfato de adenosina (ATP)** (Figura 11-4).

OS FOSFATOS DE ALTA ENERGIA EXERCEM UMA FUNÇÃO CENTRAL NA CAPTURA E NA TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

Para manter os processos necessários à vida, todos os organismos devem obter suprimentos de energia livre a partir de seu ambiente. Os organismos **autotróficos** utilizam processos exergônicos simples; por exemplo, a energia da luz solar (vegetais verdes), a reação $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ (algumas bactérias). Por outro lado, os organismos **heterotróficos** obtêm a energia livre ao acoplar seu metabolismo à clivagem de moléculas orgânicas complexas em seu ambiente. Em todos esses organismos, o ATP desempenha um papel central na transferência de energia livre dos processos exergônicos para os processos endergônicos (Figura 11-3). O ATP é um nucleotídeo que consiste em um nucleosídeo adenosina (adenina ligada à ribose) e três grupos fosfatos (ver Capítulo 32). Em suas reações na célula, ele atua como complexo de Mg^{2+} (Figura 11-4).

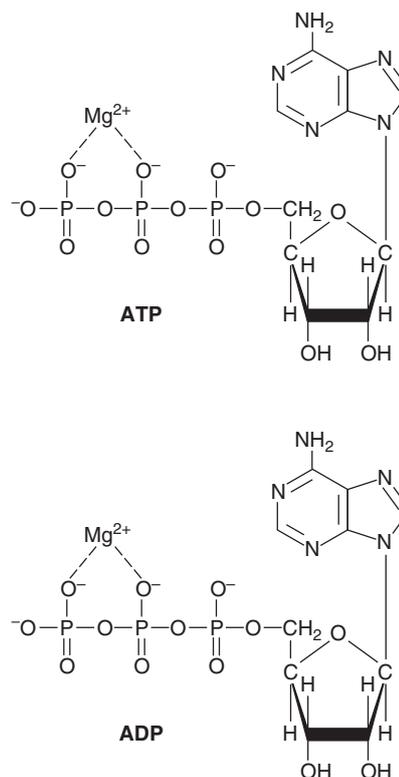


FIGURA 11-4 Trifosfato de adenosina (ATP) e difosfato de adenosina (ADP) mostrados como complexos de magnésio.

A importância dos fosfatos no metabolismo intermediário se tornou evidente com a descoberta da função do ATP, do difosfato de adenosina (ADP) (Figura 11-4) e do fosfato inorgânico (P_i) na glicólise (ver Capítulo 17).

O valor intermediário para a energia livre da hidrólise do ATP possui importante significado bioenergético

A energia livre padrão da hidrólise de inúmeros fosfatos bioquimicamente importantes está mostrada na Tabela 11-1. Uma estimativa da tendência comparativa de cada um dos grupamentos fosfato para se transferir para um acceptor adequado pode ser obtida a partir da ΔG° da hidrólise a 37°C. O valor para a hidrólise do fosfato terminal do ATP divide a lista em dois grupos. Os **fosfatos de baixa energia**, exemplificados pelos ésteres-fosfato encontrados nos intermediários da glicólise, possuem valores de G° menores que os do ATP, ao passo que nos **fosfatos de alta energia**, o valor é mais elevado que o do ATP. Os componentes desse último grupo, inclusive o ATP, são, em geral, anidridos (p. ex., o 1-fosfato do 1,3-bisfosfoglicerato), enolfosfatos (p. ex., fosfoenolpiruvato) e fosfoguanidinas (p. ex., creatina-fosfato, arginina-fosfato).

O símbolo $\sim P$ indica que o grupamento acoplado à ligação, na transferência para um acceptor apropriado, resulta em transferência de maior quantidade de energia livre. Por esse motivo, alguns preferem o termo **potencial de transferência de grupamento**, em vez de “ligação de alta energia”. Dessa maneira, o ATP contém dois grupamentos fosfato de alta

TABELA 11-1 Energia livre padrão da hidrólise de alguns organofosfatos de importância bioquímica

Composto	ΔG°	
	kJ/mol	kcal/mol
Fosfoenolpiruvato	-61,9	-14,8
Carbamoil-fosfato	-51,4	-12,3
1,3-Bisfosfoglicerato (para 3-fosfoglicerato)	-49,3	-11,8
Creatina-fosfato	-43,1	-10,3
ATP → AMP + PP _i	-32,2	-7,7
ATP → ADP + P _i	-30,5	-7,3
Glicose-1-fosfato	-20,9	-5,0
PP _i	-19,2	-4,6
Frutose-6-fosfato	-15,9	-3,8
Glicose-6-fosfato	-13,8	-3,3
Glicerol-3-fosfato	-9,2	-2,2

Abreviações: PP_i, pirofosfato; P_i, ortofosfato inorgânico.
Nota: todos os valores são provenientes de Jencks (1976), exceto o valor para o PP_i, que advém de Frey e Arabshahi (1995). Os valores diferem entre os pesquisadores, dependendo das condições exatas em que foram realizadas as medições.

energia e o ADP contém um, ao passo que o fosfato no AMP (monofosfato de adenosina) é do tipo de baixa energia, pois ele é uma ligação éster normal (Figura 11-5).

A posição intermediária do ATP permite que ele desempenhe um papel importante na transferência de energia. A alta variação de energia livre na hidrólise do ATP se deve ao alívio da repulsão de carga dos átomos de oxigênio adjacentes, carregados negativamente, e à estabilização dos produtos de reação, sobretudo o fosfato, como híbridos de ressonância (Figura 11-6). Os outros “compostos de alta energia” são os tiois-éster

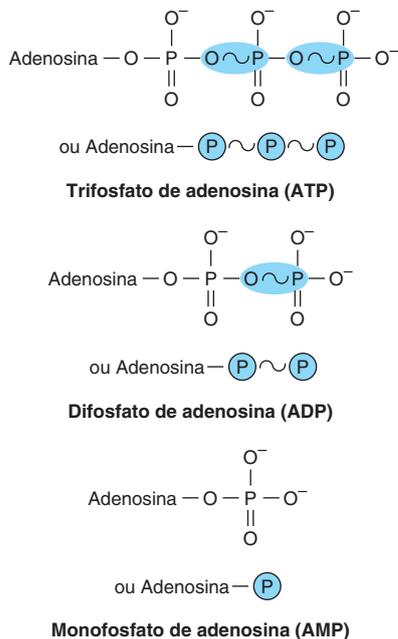


FIGURA 11-5 Estrutura do ATP, do ADP e do AMP mostrando a posição e o número dos fosfatos de alta energia (~P).

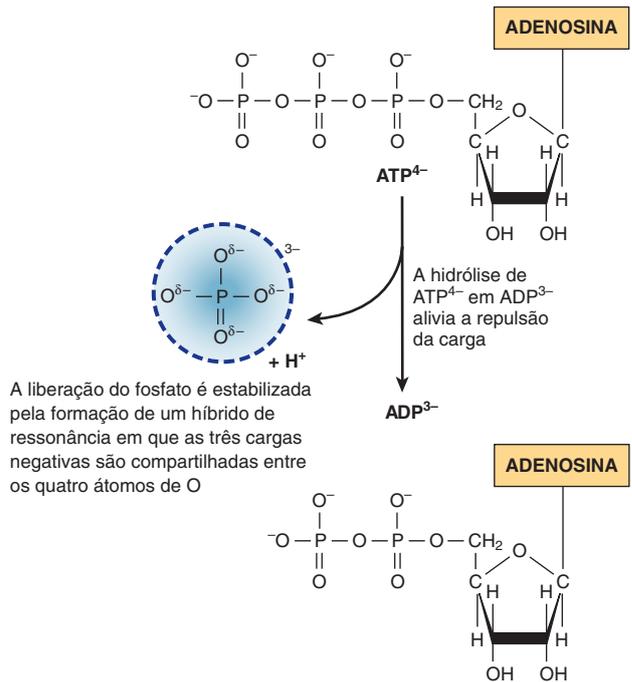


FIGURA 11-6 A variação da energia livre na hidrólise do ATP em ADP.

que envolvem a coenzima A (p. ex., acetil-CoA), as proteínas carreadoras de acilas, os ésteres de aminoácidos envolvidos na síntese proteica, a S-adenosilmetionina (metionina ativa), a UDPGlc (uridina-difosfato-glicose) e o PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato).

OS FOSFATOS DE ALTA ENERGIA ATUAM COMO A “MOEDA ENERGÉTICA” DA CÉLULA

O ATP é capaz de agir como doador de fosfato de alta energia para formar os compostos abaixo dele na Tabela 11-1. Da mesma forma, com as enzimas necessárias, o ADP pode aceitar o fosfato de alta energia para formar ATP a partir dos compostos acima do ATP na tabela. Na prática, um **ciclo de ATP/ADP** conecta os processos que geram ~P aos processos que utilizam ~P (Figura 11-7), consumindo e regenerando continuamente o ATP. Isso acontece em uma velocidade muito rápida, pois o *pool* total de ATP/ADP é extremamente pequeno e suficiente para manter um tecido ativo por apenas alguns segundos.

Existem três fontes principais de ~P que participam da **conservação de energia** ou da **captura de energia**:

- 1. Fosforilação oxidativa.** É a maior fonte quantitativa de ~P em organismos aeróbios. O ATP é gerado na matriz mitocondrial à medida que O₂ é reduzido a H₂O pela transferência de elétrons na cadeia respiratória (ver Capítulo 13).
- 2. Glicólise.** Uma formação líquida de dois ~P resulta da formação de lactato a partir de uma molécula de glicose, gerada em duas reações catalisadas pela fosfoglicerato-cinase e pela piruvato-cinase, respectivamente (ver Figura 17-2).
- 3. Ciclo do ácido cítrico.** Um ~P é gerado diretamente no ciclo na etapa da succinato-tiocinase (ver Figura 16-3).

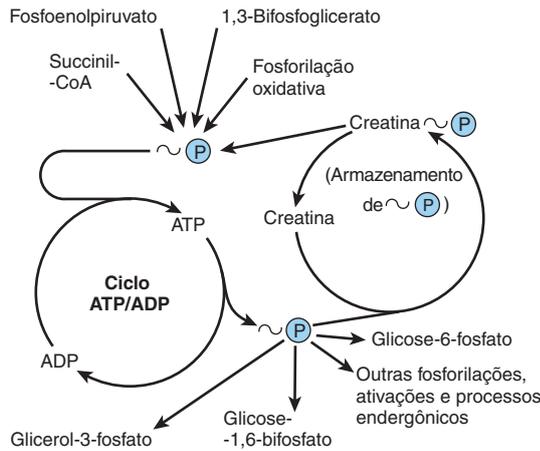
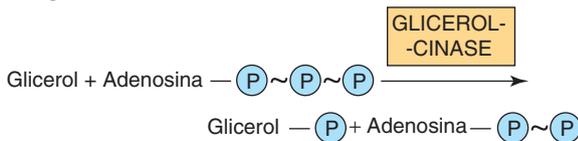


FIGURA 11-7 Papel do ciclo do ATP/ADP na transferência de fosfato de alta energia.

Os **fosfogênicos** agem como formas de armazenamento do fosfato de alta energia e incluem a **creatina-fosfato**, a qual ocorre no músculo esquelético, no coração, nos espermatozoides e no encéfalo dos vertebrados, e o **fosfato de arginina**, que ocorre no músculo de invertebrados. Quando o ATP está sendo rapidamente utilizado como fonte de energia para a contração muscular, os fosfogênicos permitem que suas concentrações sejam mantidas, mas quando a proporção de ATP/ADP é elevada, suas concentrações podem aumentar para agir como reserva de fosfato de alta energia (Figura 11-8).

Quando o ATP age como doador de fosfato para formar os compostos de menor energia livre de hidrólise (Tabela 11-1), o grupamento fosfato é invariavelmente convertido para um de baixa energia. Por exemplo, a fosforilação do glicerol para formar glicerol-3-fosfato:



O ATP permite o acoplamento de reações termodinamicamente desfavoráveis a reações favoráveis

As reações endergônicas não podem prosseguir sem a entrada de energia livre. Por exemplo, a fosforilação de glicose a glicose-6-fosfato, a primeira reação da glicólise (ver Figura 17-2):

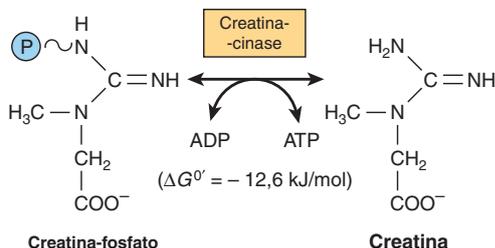
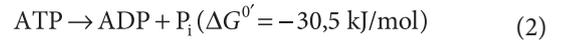


FIGURA 11-8 Transferência de fosfato de alta energia entre ATP e creatina.



$$(\Delta G^{0'}) = +13,8 \text{ kJ/mol} \quad (1)$$

é altamente endergônica e não pode prosseguir em condições fisiológicas. Assim, para ocorrer, a reação deve ser acoplada a outra reação – mais exergônica – como a hidrólise do fosfato terminal de ATP.



Quando (1) e (2) se acoplam em uma reação catalisada pela hexo-cinase, a fosforilação da glicose prossegue prontamente em uma reação altamente exergônica, que, sob condições fisiológicas, é irreversível. Muitas reações de “ativação” seguem esse padrão.

A adenilato-cinase (miocinase) interconverte nucleotídeos de adenina

Essa enzima está presente na maioria das células e catalisa a seguinte reação:

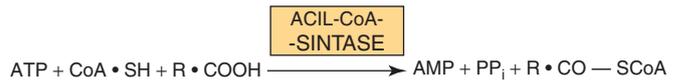


A adenilato-cinase é importante para a manutenção da homeostasia energética nas células porque ela permite:

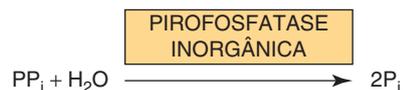
1. que o fosfato de alta energia no ADP seja utilizado na síntese do ATP;
2. que o AMP formado em consequência de reações de ativação envolvendo ATP seja refosforilado a ADP;
3. que a concentração de AMP aumente quando o ATP se torna escasso, de modo que seja capaz de atuar como um sinal metabólico (alostérico) para aumentar a velocidade das reações catabólicas, que, por sua vez, levam à geração de mais ATP (ver Capítulo 14).

Quando o ATP forma AMP, o pirofosfato inorgânico (PP_i) é produzido

O ATP também pode ser diretamente hidrolisado em AMP, com a liberação de PP_i (Tabela 11-1). Isso ocorre, por exemplo, na ativação dos ácidos graxos de cadeia longa (ver Capítulo 22).



Essa reação é acompanhada pela perda de energia livre como calor, o que assegura que a reação de ativação continuará para a direita e será adicionalmente auxiliada pela degradação hidrolítica do PP_i, catalisada pela **pirofosfatase inorgânica**, uma reação que, por si só, apresenta uma grande ΔG^{0'} de -19,2 kJ/mol. Observe que as ativações via pirofosfato resultam na perda de dois ~P, em vez de um, como ocorre quando o ADP e o P_i são formados.



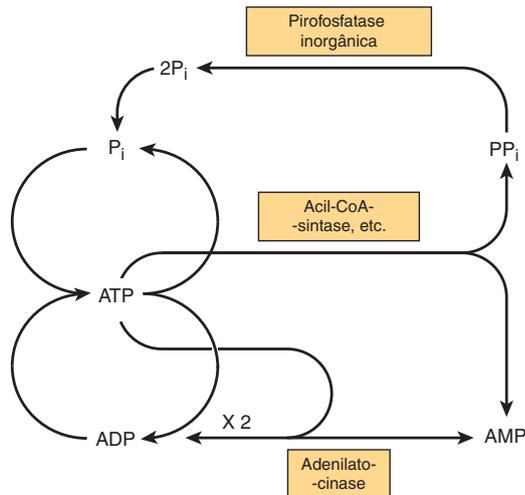
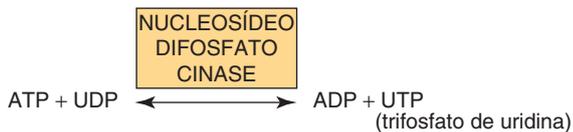


FIGURA 11-9 Ciclos de fosfato e interconversão de nucleotídeos de adenina.

Uma combinação das reações mostradas possibilita que o fosfato seja reciclado e que ocorra a interconversão de nucleotídeos de adenina (Figura 11-9).

Outros nucleosídeos trifosfatos participam na transferência de fosfato de alta energia

Por meio da enzima **nucleosídeo difosfato (NDP) cinase**, UTP, GTP e CTP podem ser sintetizados a partir de seus difosfatos; por exemplo, UDP reage com ATP para formar UTP.



Todos esses trifosfatos participam de fosforilações na célula. Do mesmo modo, as **nucleosídeo monofosfato (NMP) cinases** específicas catalisam a formação de nucleosídeos difosfato a partir dos monofosfatos correspondentes.

Assim, a adenilato-cinase é uma NMP cinase especializada.

RESUMO

- Os sistemas biológicos utilizam a energia química para impulsionar os processos vivos.
- As reações exergônicas ocorrem espontaneamente com perda de energia livre (ΔG é negativa). As reações endergônicas requerem ganho de energia livre (ΔG é positiva) e ocorrem apenas quando acopladas às reações exergônicas.
- O ATP atua como a “moeda energética” da célula, transferindo a energia livre derivada das substâncias de maior potencial de energia àquelas de menor potencial de energia.

REFERÊNCIAS

- de Meis L: The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropy energy. *Arch Biochem Biophys* 1993;306:287.
- Frey PA, Arabshahi A: Standard free-energy change for the hydrolysis of the alpha, beta-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* 1995;34:11307.
- Harris DA: *Bioenergetics at a Glance: An Illustrated Introduction*. Blackwell Publishing, 1995.
- Haynie D: *Biological Thermodynamics*. Cambridge University Press, 2008.
- Jencks WP: Free energies of hydrolysis and decarboxylation. In: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, vol 1. *Physical and Chemical Data*. Fasman GD (editor). CRC Press, 1976:296–304.
- Nicholls DG, Ferguson SJ: *Bioenergetics*, 4th ed. Elsevier, 2013.

Oxidação biológica

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender o significado do potencial redox e explicar como ele pode ser empregado para prever a direção do fluxo dos elétrons nos sistemas biológicos.
- Identificar as quatro classes de enzimas (oxidoredutases) envolvidas nas reações de oxidação e redução.
- Descrever a ação das oxidases e fornecer exemplos de onde elas desempenham um papel importante no metabolismo.
- Indicar as duas funções principais das desidrogenases e explicar a importância das desidrogenases ligadas ao NAD e à riboflavina nas vias metabólicas, como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória.
- Reconhecer os dois tipos de enzimas classificadas como hidroxidases; indicar as reações que elas catalisam e explicar por que elas são importantes.
- Determinar as duas etapas das reações catalisadas por oxigenases e identificar os dois subgrupos dessa classe de enzimas.
- Considerar o papel do citocromo P450 na detoxificação de substâncias e na síntese de esteroides.
- Descrever a reação catalisada pela superóxido dismutase e explicar como ela protege os tecidos contra a toxicidade do oxigênio.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Do ponto de vista químico, a **oxidação** é definida como a remoção de elétrons, e a **redução**, como o ganho de elétrons. Assim, a oxidação de uma molécula (o doador de elétrons) é sempre acompanhada pela redução de uma segunda molécula (o receptor de elétrons). Esse princípio da oxidação-redução se aplica igualmente aos sistemas bioquímicos e constitui um importante conceito que fundamenta a compreensão da natureza da oxidação biológica. Muitas oxidações biológicas podem ocorrer sem a participação de oxigênio molecular, como, por exemplo, as desidrogenações. A vida dos animais superiores é absolutamente dependente de um suprimento de oxigênio para a **respiração**, o processo pelo qual as células obtêm energia na forma de ATP a partir de uma reação controlada entre o hidrogênio com o oxigênio para formar água. Além disso, o oxigênio molecular é incorporado em diversos substratos por enzimas designadas como **oxigenases**; muitos fármacos, poluentes e carcinógenos químicos (xenobióticos)

são metabolizados por enzimas dessa classe, denominadas **sistema citocromo P450**. A administração de oxigênio pode salvar a vida no tratamento de pacientes com insuficiência respiratória ou circulatória.

AS VARIAÇÕES DE ENERGIA LIVRE PODEM SER EXPRESSAS EM TERMOS DE POTENCIAL REDOX

Nas reações que envolvem oxidação e redução, a variação da energia livre é proporcional à tendência dos reagentes de doar ou aceitar elétrons. Dessa forma, além de expressar a variação da energia livre em termos de $\Delta G^{0'}$ (ver Capítulo 11), é possível, de forma análoga, expressá-la numericamente como um **potencial de oxidação-redução** ou **potencial redox** (E'_0). Do ponto de vista químico, o potencial redox de um sistema (E_0) é, comumente, comparado com o potencial do eletrodo de hidrogênio (0,0 V em pH 0,0). Contudo, para os sistemas biológicos,

TABELA 12-1 Alguns potenciais redox de interesse especial em sistemas de oxidação de mamíferos

Sistema	Voltagem do E'_0
H^+/H_2	-0,42
$NAD^+/NADH$	-0,32
Lipoato; ox/red	-0,29
Acetocetato/3-hidroxiacetato	-0,27
Piruvato/lactato	-0,19
Oxalacetato/malato	-0,17
Fumarato/succinato	+0,03
Citocromo <i>b</i> ; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,08
Ubiquinona; ox/red	+0,10
Citocromo <i>c</i> ; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,22
Citocromo <i>a</i> ; Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,29
Oxigênio/água	+0,82

o potencial redox (E'_0) é normalmente expresso em pH 7,0, pH no qual o potencial do eletrodo de hidrogênio é de -0,42 V. Os potenciais redox de alguns sistemas redox de interesse especial na bioquímica de mamíferos são mostrados na Tabela 12-1. As posições relativas dos sistemas redox na tabela permitem a predição da direção do fluxo dos elétrons de um par redox para outro.

As enzimas envolvidas na oxidação e na redução são chamadas de **oxidorreduções** e são classificadas em quatro grupos: **oxidases**, **desidrogenases**, **hidroperoxidases** e **oxigenases**.

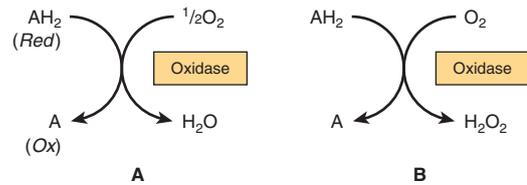
AS OXIDASES UTILIZAM OXIGÊNIO COMO ACCEPTOR DE HIDROGÊNIO

As oxidases catalisam a remoção de hidrogênio de um substrato usando oxigênio como um acceptor de hidrogênio.* Elas formam água ou peróxido de hidrogênio como produto da reação (Figura 12-1).

A citocromo-oxidase é uma hemoproteína

A **citocromo-oxidase** é uma hemoproteína amplamente distribuída em muitos tecidos, possuindo o típico grupamento prostético heme presente na mioglobina, na hemoglobina e em outros citocromos (ver Capítulo 6). É o componente terminal da cadeia de transportadores respiratórios encontrados nas mitocôndrias (ver Capítulo 13) e transfere os elétrons resultantes da oxidação das moléculas de substrato pelas desidrogenases para o seu acceptor final, o oxigênio. A ação da enzima é bloqueada pelo **monóxido de carbono**, pelo **cianeto** e pelo **sulfeto de hidrogênio**, sendo que isso causa intoxicação por impedir a respiração celular. Ela também foi denominada “citocromo a_3 ”. Contudo, sabe-se, atualmente, que o heme a_3 se combina com outro, o heme a , em uma única proteína para formar a enzima complexa

*O termo “oxidase” é, algumas vezes, usado coletivamente para denotar todas as enzimas que catalisam as reações envolvendo oxigênio molecular.

**FIGURA 12-1** Oxidação de um metabólito catalisada por uma oxidase (A) que for H_2O e (B) que for H_2O_2 .

citocromo-oxidase, sendo, então, mais correto ser chamado de **citocromo aa_3** . Ela contém duas moléculas de heme, cada qual possuindo um átomo de Fe que oscila entre Fe^{3+} e Fe^{2+} durante a oxidação e a redução. Além disso, dois átomos de Cu estão presentes, cada qual associado a uma unidade heme.

As outras oxidases são flavoproteínas

As enzimas flavoproteínas contêm **flavina mononucleotídeo (FMN)** ou **flavina adenina dinucleotídeo (FAD)** como grupamentos prostéticos. O FMN e o FAD são formados no organismo a partir da vitamina **riboflavina** (ver Capítulo 44). Em geral, o FMN e o FAD ligam-se firmemente – mas não de forma covalente – às suas respectivas proteínas apoenzimas. As metaloflavoproteínas contêm um ou mais metais como cofatores essenciais. Exemplos de flavoproteínas-oxidase incluem a **L-aminoácido-oxidase**, uma enzima encontrada nos rins com especificidade geral para a desaminação oxidativa dos L-aminoácidos de ocorrência natural; a **xantina-oxidase**, que contém molibdênio e exerce um importante papel na conversão de bases purinas em ácido úrico (ver Capítulo 33) e é de particular importância para animais uricotélicos (ver Capítulo 28); e a **aldeído-desidrogenase**, uma enzima ligada a FAD presente no fígado de mamíferos, que contém molibdênio e ferro não heme e atua sobre aldeídos e substratos N-heterocíclicos. Os mecanismos de oxidação e redução dessas enzimas são complexos. As evidências sugerem uma reação em duas etapas, conforme demonstrado na Figura 12-2.

AS DESIDROGENASES NÃO PODEM UTILIZAR OXIGÊNIO COMO ACCEPTOR DE HIDROGÊNIO

Existe um grande número de enzimas na classe das desidrogenases. Elas executam as seguintes duas funções principais:

1. Transferência de hidrogênio de um substrato para outro em uma reação de oxidação-redução acoplada (Figura 12-3). Essas desidrogenases são específicas para seus substratos, mas frequentemente utilizam coenzimas ou carreadores de hidrogênio comuns, como, por exemplo, NAD^+ . Como as reações são reversíveis, essas propriedades possibilitam que equivalentes redutores sejam livremente transferidos dentro da célula. Esse tipo de reação, que possibilita que um substrato seja oxidado à custa de outro, é particularmente útil ao permitir que ocorram processos oxidativos na ausência de oxigênio, como durante a fase anaeróbia da glicólise (ver Figura 17-2).

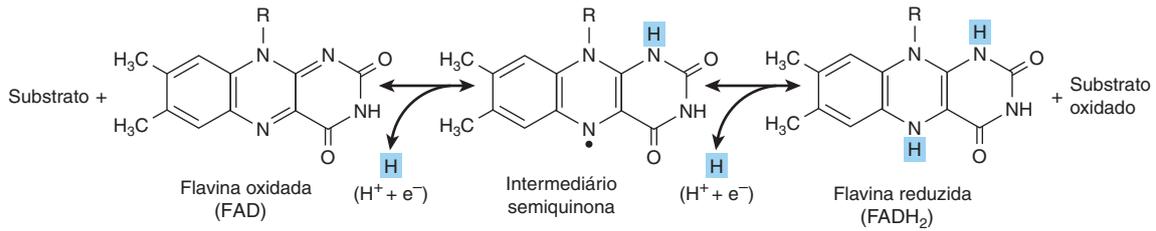


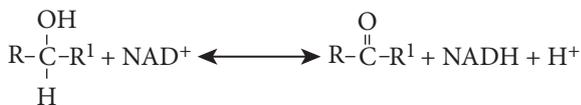
FIGURA 12-2 Oxidorredução do anel de isoaloxazina em nucleotídeos de flavina por meio de um intermediário semiquinona. Em reações de oxidação, a flavina (p. ex., FAD) aceita 2 elétrons e 2 H⁺ em 2 etapas, formando o intermediário semiquinona, seguido pela flavina reduzida (p. ex., FADH₂), e o substrato é oxidado. Na reação inversa (redução), a flavina reduzida doa 2 elétrons e 2 H⁺, de forma que ela se torna oxidada (p. ex., a FAD), e o substrato é reduzido.

2. Transferência de elétrons na **cadeia respiratória** de transporte de elétrons do substrato para o oxigênio (ver Figura 13-3).

Muitas desidrogenases dependem de coenzimas nicotinâmicas

Essas desidrogenases usam **dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD⁺)** ou **dinucleotídeo de nicotinamida adenina-fosfato (NADP⁺)** – ou ambos – que são formados no organismo a partir da vitamina **niacina** (ver Capítulo 44). A estrutura do NAD⁺ está representada na **Figura 12-4**. O NADP⁺ possui um grupamento fosfato esterificado no hidroxil 2' da porção adenosina, mas, com exceção dessa diferença, é idêntico ao NAD⁺. As formas oxidadas dos dois nucleotídeos possuem uma carga positiva no átomo de nitrogênio da porção nicotinamida, como indicado na **Figura 12-4**. As coenzimas são reduzidas pelo substrato específico da desidrogenase e reoxidadas por um aceptor de elétron adequado. Elas são capazes de se dissociar de modo livre e reversível de suas respectivas apoenzimas.

Em geral, as **desidrogenases ligadas ao NAD** catalisam reações de oxidorredução do tipo:



Quando um substrato é oxidado, ele perde 2 átomos de hidrogênio e 2 elétrons. Um H⁺ e os 2 elétrons são aceitos por NAD⁺ para formar NADH, e o outro H⁺ é liberado (Figura 12-4). Muitas dessas reações ocorrem nas vias oxidativas do metabolismo, sobretudo na glicólise (ver Capítulo 17) e no ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16). O NADH é gerado nessas vias pela oxidação de moléculas combustíveis, e o NAD⁺ é regenerado

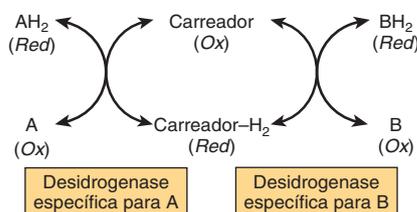
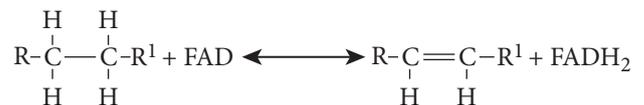


FIGURA 12-3 Oxidação de um metabólito catalisada por desidrogenases acopladas.

pela oxidação de NADH, à medida que ele transfere os elétrons para o O₂ através da cadeia respiratória na mitocôndria, um processo que leva à formação de ATP (ver Capítulo 13). As **desidrogenases ligadas ao NADP** são encontradas, em geral, em vias biossintéticas onde as reações redutoras são necessárias, como na via extramitocondrial da síntese de ácidos graxos (ver Capítulo 23) e da síntese de esteroides (ver Capítulo 26) – e também na via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20).

Outras desidrogenases dependem da riboflavina

Os **grupamentos flavina, como FMN e FAD**, estão associados às desidrogenases, bem como com as oxidases, como descrito anteriormente. O FAD é o aceptor de elétrons em reações do tipo:



O FAD aceita 2 elétrons e 2 H⁺ na reação (Figura 12-2), formando FADH₂. Os grupamentos flavina são, em geral, mais fortemente ligados às suas apoenzimas do que as coenzimas nicotinâmicas. Grande parte das **desidrogenases ligadas à riboflavina** se relaciona com o transporte de elétrons dentro da (ou para a) cadeia respiratória (ver Capítulo 13). A **NADH-desidrogenase** age como um transportador de elétrons entre o NADH e os componentes de potencial redox mais elevado (ver Figura 13-3). Outras desidrogenases, como a **succinato-desidrogenase**, a **acil-CoA-desidrogenase** e a **glicerol-3-fosfato-desidrogenase mitocondrial**, transferem equivalentes redutores diretamente do substrato para a cadeia respiratória (ver Figura 13-5). Outro papel das desidrogenases dependentes de riboflavina é na desidrogenação (por meio da **di-hidrolipoil-desidrogenase**) do lipoato reduzido, um intermediário na descarboxilação oxidativa do piruvato e do α-cetoglutarato (ver Figuras 13-5 e 17-5). A **flavoproteína transferidora de elétrons (ETF)** é um transportador intermediário de elétrons entre a acil-CoA-desidrogenase e a cadeia respiratória (ver Figura 13-5).

Os citocromos também podem ser considerados desidrogenases

Os **citocromos** são hemoproteínas portadoras do grupamento heme, nas quais o átomo de ferro oscila entre Fe³⁺ e Fe²⁺ durante

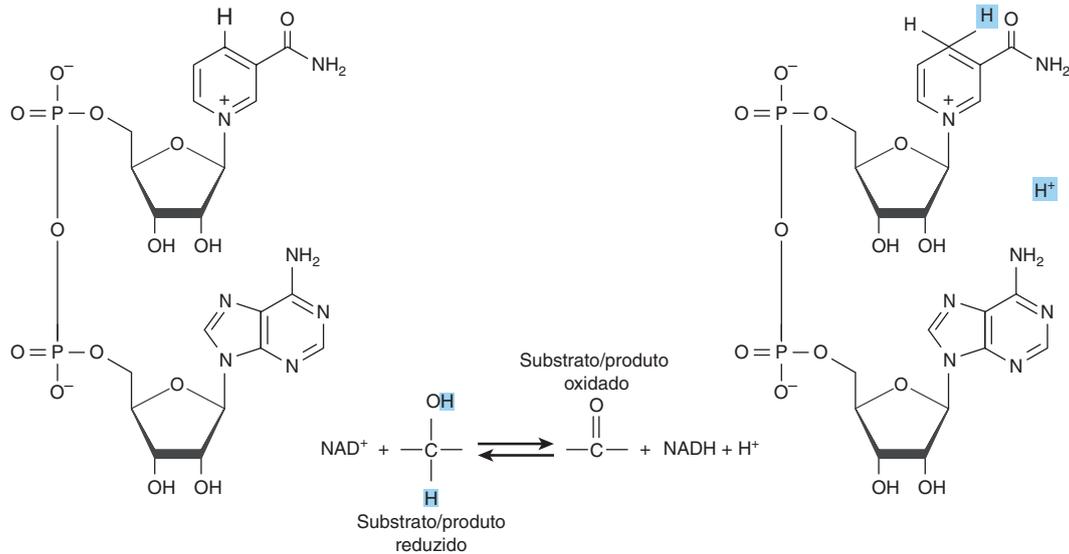


FIGURA 12-4 Oxidação e redução das coenzimas nicotinâmicas. As coenzimas nicotinâmicas consistem em um anel nicotinamida ligado a uma adenosina por uma ribose e um grupamento fosfato, formando um dinucleotídeo. NAD^+/NADH são mostrados, mas $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ são idênticos, exceto pelo fato de terem um grupamento fosfato esterificado na OH 2' da adenosina. Uma reação de oxidação envolve a transferência de dois elétrons e um H^+ do substrato para o anel nicotinâmico de NAD^+ , formando NADH e o produto oxidado. O hidrogênio remanescente do par de hidrogênios removido do substrato permanece livre como um íon hidrogênio. O NADH é oxidado a NAD^+ pela reação inversa.

a oxidação e a redução. Exceto pela citocromo-oxidase (previamente descrita), eles são classificados como desidrogenases. Na cadeia respiratória, eles atuam como transportadores de elétrons das flavoproteínas de um lado e para a citocromo-oxidase, do outro (ver Figura 13-5). Diversos citocromos identificados são encontrados na cadeia respiratória, isto é, os citocromos *b*, *c*₁, *c* e a citocromo-oxidase. Os citocromos também são encontrados em outros locais; por exemplo, no retículo endoplasmático (citocromos P450 e *b*₅) e em células vegetais, bactérias e leveduras.

AS HIDROPEROXIDASES UTILIZAM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO OU UM PERÓXIDO ORGÂNICO COMO SUBSTRATO

Dois tipos de enzimas encontradas em animais e em plantas entram na categoria de **hidroperoxidase**: as **peroxidases** e a **catalase**.

As hidroperoxidases desempenham um papel importante na proteção do organismo contra os efeitos nocivos das **espécies reativas de oxigênio (EROs)**. As EROs são moléculas contendo oxigênio altamente reativas, como os peróxidos, que são formadas durante o metabolismo normal, mas podem ser danosas se acumuladas. Acredita-se que contribuam para a ocorrência de doenças como o câncer e a aterosclerose, bem como para o processo de envelhecimento em geral (ver Capítulos 21, 44 e 54).

As peroxidases reduzem os peróxidos utilizando diversos aceptores de elétrons

As peroxidases são encontradas no leite e em leucócitos, nas plaquetas e em outros tecidos envolvidos no metabolismo de

eicosanoides (ver Capítulo 23). O grupamento prostético delas é o **proto-heme**. Na reação catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio é reduzido à custa de várias substâncias que atuam como aceptores de elétrons, como o ascorbato (vitamina C), as quinonas e o citocromo *c*. A reação catalisada pela peroxidase é complexa; a reação total, porém, é a seguinte:



Nas hemácias e em outros tecidos, a enzima **glutathiona peroxidase**, contendo **selênio** como grupamento prostético, catalisa a destruição do H_2O_2 e de hidroperóxidos lipídicos por meio da conversão da glutathiona reduzida em sua forma oxidada, protegendo os lipídeos da membrana e a hemoglobina contra a oxidação pelos peróxidos (ver Capítulo 21).

A catalase utiliza o peróxido de hidrogênio como doador e aceptor de elétrons

A **catalase** é uma hemoproteína que contém quatro grupamentos heme. Ela pode atuar como peroxidase, catalisando reações como a mostrada anteriormente, mas também é capaz de catalisar a quebra de H_2O_2 , formado pela ação das oxigenases, em água e oxigênio:



Essa reação utiliza uma molécula de H_2O_2 como substrato doador de elétrons e outra molécula de H_2O_2 como oxidante ou aceptor de elétrons. É uma das reações enzimáticas conhecidas mais rápidas, destruindo milhões de moléculas de H_2O_2 , potencialmente danosas, por segundo. Na maior parte das

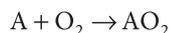
condições *in vivo*, a atividade de peroxidase da catalase parece ser favorecida. A catalase é encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, nos rins e no fígado. Os **peroxissomos** são encontrados em muitos tecidos, inclusive no fígado. Eles são ricos em oxidases e em catalase. Dessa maneira, as enzimas que produzem H_2O_2 são agrupadas com a enzima que o cliva. Contudo, os sistemas de transporte de elétrons mitocondrial e microsomal, bem como a xantina-oxidase, devem ser considerados fontes adicionais de H_2O_2 .

AS OXIGENASES CATALISAM A TRANSFERÊNCIA DIRETA E A INCORPORAÇÃO DE OXIGÊNIO EM UMA MOLÉCULA DE SUBSTRATO

As oxigenases estão relacionadas à síntese ou à degradação de muitos tipos diferentes de metabólitos. Elas catalisam a incorporação de oxigênio em uma molécula de substrato em duas etapas: (1) o oxigênio é ligado à enzima no sítio ativo e (2) o oxigênio ligado é reduzido ou transferido para o substrato. As oxigenases podem ser divididas em dois subgrupos, dioxigenases e monoxigenases.

As dioxigenases incorporam ambos os átomos do oxigênio molecular no substrato

A reação básica catalisada pelas dioxigenases é mostrada a seguir:

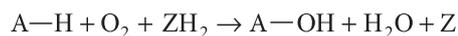


Os exemplos incluem as enzimas hepáticas, **homogentisato-dioxigenase** (oxidase) e **3-hidroxiantranilato-dioxigenase**

(oxidase), que contém ferro; e **l-triptofano-dioxigenase** (triptofano-pirolase) (ver Capítulo 29), que emprega heme.

As monoxigenases (oxidases de função mista, hidroxilases) incorporam apenas um átomo do oxigênio molecular no substrato

O outro átomo de oxigênio é reduzido à água, sendo necessário um doador de elétron adicional ou cossubstrato (Z) para essa finalidade:



Os citocromos P450 são monoxigenases importantes no metabolismo de esteroides e para a detoxificação de muitos medicamentos

Os **citocromos P450** constituem uma importante superfamília de monoxigenases portadoras de heme, sendo que foram encontradas mais de 50 dessas enzimas no genoma humano. Esses citocromos se localizam principalmente no retículo endoplasmático do fígado e dos intestinos, mas também estão nas mitocôndrias em alguns tecidos. Os citocromos participam de uma cadeia de transporte de elétrons em que NADH e NADPH podem doar equivalentes redutores. Os elétrons são passados para o citocromo P450 em dois tipos de reações envolvendo FAD ou FMN. Os sistemas de classe I consistem em uma enzima redutase contendo FAD, uma proteína ferro-enxofre (Fe_2S_2) e a hemoproteína P450, ao passo que os sistemas de classe II contêm citocromo P450-redutase que passa elétrons de $FADH_2$ para FMN (**Figura 12-5**). Os sistemas de classe I e II são bem caracterizados, mas, nos

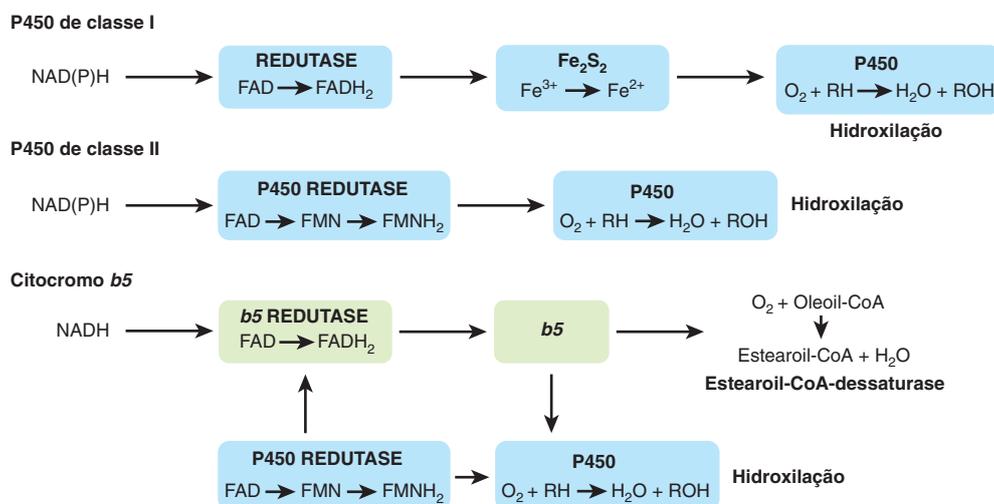


FIGURA 12-5 Citocromos P450 e b_5 no retículo endoplasmático. A maioria dos citocromos P450 é da classe I ou II. Além do citocromo P450, os sistemas de classe I contêm uma pequena redutase contendo FAD e uma proteína ferro-enxofre, e os de classe II contêm um citocromo P450-redutase, que incorpora FAD e FMN. Os citocromos P450 catalisam muitas reações de hidroxilação de esteroides e etapas de detoxificação de medicamentos. O citocromo b_5 atua junto com a citocromo b_5 -redutase contendo FAD na reação da acil-graxo-CoA-dessaturase (p. ex., estearoil-CoA-dessaturase) e também trabalham em conjunto com os citocromos P450 na detoxificação de medicamentos. Ele é capaz de aceitar elétrons da citocromo P450-redutase através da citocromo b_5 -redutase e dá-los para o citocromo P450.

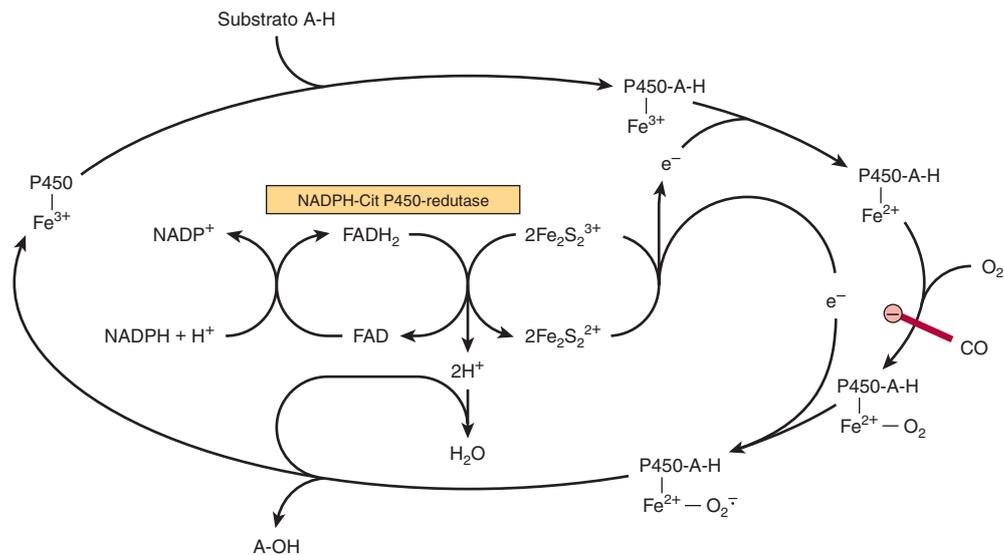


FIGURA 12-6 Ciclo do citocromo P450-hidroxilase. O sistema mostrado é típico das esteroide hidroxilases do córtex da glândula suprarrenal. A citocromo P450-hidroxilase microsossomal hepática não requer a proteína ferro-enxofre Fe_2S_2 . O monóxido de carbono (CO) inibe a etapa indicada.

últimos anos, outros citocromos P450 que não se encaixam em nenhuma das duas categorias foram identificados. Na etapa final, o oxigênio aceita os elétrons do citocromo P450 e é reduzido, com um átomo sendo incorporado na H_2O , e o outro, no substrato, geralmente resultando em sua hidroxilação. Essa série de reações enzimáticas, conhecida como **ciclo hidroxilase**, está ilustrada na **Figura 12-6**. No retículo endoplasmático do fígado, os citocromos P450 são encontrados com outra proteína contendo heme, o **citocromo b_5** (Figura 12-5), e, juntos, eles têm um importante papel no metabolismo de medicamentos e na destoxificação. O citocromo b_5 também exerce um papel importante como ácido graxo dessaturase. Juntos, os citocromos P450 e b_5 são responsáveis por cerca de 75% da modificação e degradação de fármacos que ocorre no organismo. A velocidade de destoxificação de muitas substâncias medicinais pelos citocromos P450 determina a duração de suas ações. Benzopireno, aminopirina, anilina, morfina e benzofetamina são hidroxilados, aumentando sua solubilidade e sua excreção. Muitos fármacos, como o fenobarbital, possuem a capacidade de induzir a síntese de citocromos P450.

Os sistemas citocromos P450 mitocondriais são encontrados nos tecidos esteroideogênicos, como o córtex da glândula suprarrenal, os testículos, o ovário e a placenta, e estão relacionados com a biossíntese dos hormônios esteroides a partir do colesterol (hidroxilação em C_{22} e C_{20} na clivagem da cadeia lateral e nas posições 11β e 18). Além disso, os sistemas renais que catalisam a 1α -hidroxilação e a 24-hidroxilação do 25-hidroxicalciferol no metabolismo da vitamina D – e a colesterol 7α -hidroxilase e a esterol 27-hidroxilase envolvidas na biossíntese de ácido biliar a partir do colesterol no fígado (ver Capítulos 26 e 41) – são enzimas P450.

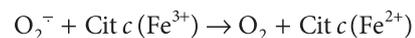
A SUPERÓXIDO DISMUTASE PROTEGE OS ORGANISMOS AERÓBIOS CONTRA A TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

A transferência de um único elétron para o O_2 gera o **radical livre ânion superóxido** (O_2^-), o qual origina reações em cadeia de radicais livres (ver Capítulo 21), amplificando seus efeitos destrutivos. A facilidade com que o superóxido pode ser formado a partir do oxigênio nos tecidos e a ocorrência da **superóxido dismutase (SOD)**, a enzima responsável por sua remoção em todos os organismos aeróbios (embora não em anaeróbios obrigatórios), indicam que a toxicidade potencial do oxigênio se deve à sua conversão em superóxido.

O superóxido é formado quando as flavinas reduzidas – presentes, por exemplo, na xantina-oxidase – são reoxidadas de modo univalente pelo oxigênio molecular:



O superóxido pode reduzir o citocromo *c* oxidado



ou ser removido pela superóxido dismutase, que catalisa a conversão do (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio.

Nessa reação, o superóxido age tanto como oxidante quanto como redutor. Dessa forma, a superóxido dismutase protege os organismos aeróbios contra os efeitos tóxicos potenciais do superóxido. A enzima ocorre em todos os principais tecidos aeróbios, nas mitocôndrias e no citosol. Embora a exposição de animais a uma atmosfera de oxigênio a 100% provoque

um aumento adaptativo na superóxido dismutase, sobretudo nos pulmões, a exposição prolongada causa lesão pulmonar e morte. Os antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E), atuam como depuradores dos radicais livres e reduzem a toxicidade do oxigênio (ver Capítulo 44).

RESUMO

- Nos sistemas biológicos, assim como nos sistemas químicos, a oxidação (perda de elétrons) sempre é acompanhada pela redução de um aceptor de elétrons.
- As oxidoredutases possuem várias funções no metabolismo; as oxidases e as desidrogenases desempenham papéis importantes na respiração; as hidroxidases protegem o organismo contra a lesão pelos radicais livres; e as oxigenases medeiam a hidroxilação de medicamentos e esteroides.

- Os tecidos estão protegidos contra a toxicidade do oxigênio causada pelo radical livre superóxido pela enzima específica superóxido dismutase.

REFERÊNCIAS

- Babcock GT, Wikstrom M: Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 1992;356:301.
- Coon MJ: Cytochrome P450: Nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;4:1.
- Dickinson BC, Chang CJ: Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chem Biol* 2011;7:504.
- Harris DA: *Bioenergetics at a Glance: An Illustrated Introduction*. Blackwell Publishing, 1995.
- Johnson F, Giulivi C: Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 2005;26.
- Nicholls DG, Ferguson SJ: *Bioenergetics*, 4th ed. Elsevier, 2013.

Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a estrutura dupla da membrana da mitocôndria e indicar a localização de várias enzimas.
- Considerar que a energia decorrente da oxidação de substratos combustíveis (lipídeos, carboidratos, aminoácidos) é quase totalmente liberada nas mitocôndrias como equivalentes redutores, os quais passam por um processo, denominado transporte de elétrons, por meio de uma série de transportadores ou complexos redox embebidos na membrana interna da mitocôndria, conhecida como cadeia respiratória, até que eles finalmente reajam com o oxigênio para formar água.
- Caracterizar os quatro complexos proteicos envolvidos na transferência de elétrons por meio da cadeia respiratória e explicar os papéis das flavoproteínas, das proteínas ferro-enxofre e da coenzima Q.
- Compreender como a coenzima Q aceita os elétrons do NADH por meio do Complexo I e do FADH₂ por meio do Complexo II.
- Indicar como os elétrons são transferidos da coenzima Q reduzida para o citocromo c por meio do Complexo III no ciclo Q.
- Explicar o processo pelo qual o citocromo c reduzido é oxidado e o oxigênio é reduzido em água por meio do Complexo IV.
- Entender como o transporte de elétrons através da cadeia respiratória gera um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, levando à formação de uma força próton-motora que gera ATP por meio do processo de fosforilação oxidativa.
- Descrever a estrutura da enzima ATP-sintase e explicar como ela atua como um motor rotatório para produzir ATP a partir de ADP e Pi.
- Identificar as cinco condições que controlam a velocidade da respiração nas mitocôndrias e compreender que a oxidação de equivalentes redutores por meio da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa estão firmemente atreladas em muitas circunstâncias, de tal maneira que uma não pode prosseguir a menos que a outra esteja funcionando.
- Indicar os exemplos de substâncias tóxicas comuns que bloqueiam a respiração ou a fosforilação oxidativa e identificar seus sítios de ação.
- Demonstrar, com exemplos, como os desacopladores podem atuar como substâncias tóxicas ao dissociar a oxidação via cadeia respiratória da fosforilação oxidativa, bem como de que maneira podem ter um papel fisiológico na geração do calor corporal.
- Explicar o papel dos transportadores de troca presentes na membrana interna da mitocôndria na troca de íons e metabólitos, enquanto preservam o equilíbrio eletroquímico e osmótico.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os organismos aeróbios são capazes de capturar uma proporção muito maior da energia livre disponível nos substratos respiratórios que os organismos anaeróbios. Grande parte disso acontece dentro das **mitocôndrias**, que foram denominadas como “geradores de energia” da célula. A respiração é acoplada à geração do intermediário de alta energia, ATP (ver Capítulo 11), pela **fosforilação oxidativa**. Inúmeros medicamentos (p. ex., **amobarbital**) e substâncias tóxicas (p. ex., **cianeto**, **monóxido de carbono**) inibem a fosforilação oxidativa, geralmente com consequências fatais. Foram relatados vários defeitos hereditários mitocondriais envolvendo os componentes da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa. Os pacientes apresentam **miopatia** e **encefalopatia**, manifestando, com frequência, **acidose láctica**.

ENZIMAS ESPECÍFICAS ESTÃO ASSOCIADAS A COMPARTIMENTOS SEPARADOS PELAS MEMBRANAS MITOCONDRIAIS

A **matriz** mitocondrial é confinada por uma **membrana dupla**. A **membrana externa** é permeável à maioria dos metabólitos, e a **membrana interna** é seletivamente permeável (Figura 13-1). A membrana externa caracteriza-se pela presença de diversas enzimas, incluindo a **acil-CoA-sintase** e a **glicerolfosfato acil-transferase**. Outras enzimas, incluindo a **adenilato-cinase** e a **creatina-cinase**, são encontradas no **espaço intermembrana**. O fosfolípido **cardiolipina** fica concentrado na membrana interna, junto às enzimas da **cadeia respiratória**, à **ATP-sintase** e a diversos **transportadores de membrana**.

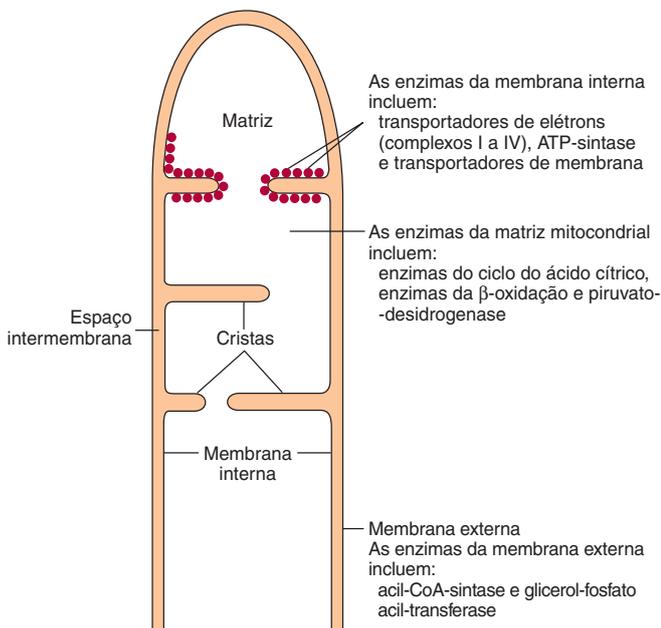


FIGURA 13-1 Estrutura das membranas mitocondriais. Observe que a membrana interna contém muitas pregas ou cristas.

A CADEIA RESPIRATÓRIA OXIDA EQUIVALENTES REDUTORES E ATUA COMO UMA BOMBA DE PRÓTONS

Grande parte da energia liberada durante a oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos é disponibilizada dentro das mitocôndrias como equivalentes redutores ($-H$ ou elétrons) (Figura 13-2). As enzimas do ciclo do ácido cítrico e da β -oxidação (ver Capítulos 22 e 16), os **complexos da cadeia respiratória** e a maquinaria para a **fosforilação oxidativa** são todos encontrados na mitocôndria. A cadeia respiratória coleta e transporta equivalentes redutores, direcionando-os para a sua reação final com o oxigênio para formar água, e a fosforilação oxidativa é o processo pelo qual a energia livre liberada é aprisionada como **fosfato de alta energia**.

Os componentes da cadeia respiratória estão contidos em quatro grandes complexos proteicos embebidos na membrana mitocondrial interna

Os elétrons fluem pela cadeia respiratória através de uma extensão redox de 1,1 V do $NAD^+/NADH$ para $O_2/2H_2O$ (ver Tabela 12-1), passando por três grandes complexos proteicos: **NADH-Q oxidorreductase (Complexo I)**, onde os elétrons são transferidos do NADH para a **coenzima Q (Q)** (também chamada de **ubiquinona**) (Figura 13-6); **Q-citocromo c-oxidorreductase (Complexo III)**, que passa os elétrons adiante para o **citocromo c**; e **citocromo c-oxidase (Complexo IV)**, que completa a cadeia, passa os elétrons para o O_2 , reduzindo-o a H_2O (Figura 13-3). Alguns substratos com potenciais redox mais positivos que o $NAD^+/NADH$ (p. ex., succinato) passam os elétrons para a Q por meio de um quarto complexo, o **succinato-Q-redutase (Complexo II)**, em vez de pelo Complexo I. Os quatro complexos estão inseridos na membrana mitocondrial interna, mas a Q e o citocromo c são móveis. A Q difunde-se rapidamente dentro da membrana, do passo que o citocromo c é uma proteína solúvel. O fluxo de elétrons pelos Complexos I, III e IV resulta no bombeamento de prótons da matriz através da membrana mitocondrial interna para dentro do espaço intermembrana (Figura 13-7).

As flavoproteínas e as proteínas ferro-enxofre (Fe-S) são componentes dos complexos da cadeia respiratória

As **flavoproteínas** (ver Capítulo 12) são componentes importantes dos Complexos I e II. A flavina nucleotídeo (FMN ou FAD) oxidada pode ser reduzida nas reações que envolvem a transferência de dois elétrons (formando $FMNH_2$ ou $FADH_2$), mas também pode aceitar um elétron e formar uma semiquinona (ver Figura 12-2). As **proteínas ferro-enxofre (proteínas sem ferro heme, Fe-S)** são encontradas nos Complexos I, II e III. Elas podem conter um, dois ou quatro átomos de Fe ligados a átomos de enxofre inorgânico e/ou por meio de grupamentos cisteína-SH à proteína (Figura 13-4).

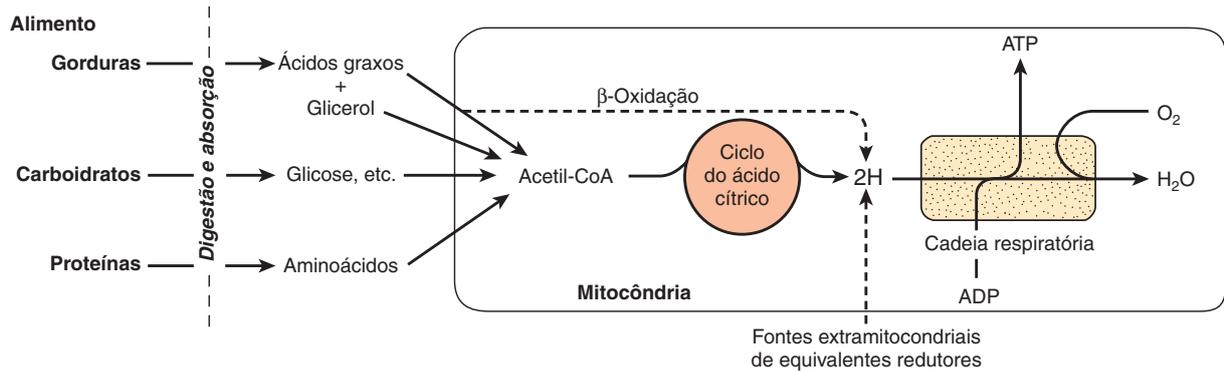


FIGURA 13-2 Papel da cadeia respiratória das mitocôndrias na conversão da energia de alimentos em ATP. A oxidação dos principais nutrientes leva à produção de equivalentes redutores (2H), que são coletados pela cadeia respiratória para oxidação e produção concomitante de ATP.

O Fe-S participa das reações de transferência de um único elétron, nas quais um átomo de Fe sofre oxidorredução entre Fe^{2+} e Fe^{3+} .

A Q aceita elétrons via Complexos I e II

A NADH-Q oxidorredutase, ou Complexo I, é uma grande proteína com múltiplas subunidades em formato de L que catalisa a transferência de elétrons do NADH para a Q, associada à transferência de quatro H^+ pela membrana:

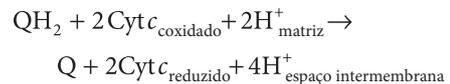


A princípio, os elétrons são transferidos do NADH para o FMN, depois para uma série de centros Fe-S e, por fim, para a Q (Figura 13-5). No Complexo II (succinato-Q-redutase), o $FADH_2$ é formado durante a conversão do succinato em fumarato no ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-3), e os elétrons são transferidos por meio de diversos centros Fe-S para a Q

(Figura 13-5). O glicerol-3-fosfato (produzido na clivagem de triacilgliceróis ou a partir da glicólise, Figura 17-2) e a acil-CoA também passam elétrons para a Q por vias diferentes, envolvendo as flavoproteínas (Figura 13-5).

O ciclo Q acopla a transferência de elétrons ao transporte de prótons no Complexo III

Os elétrons são passados do QH_2 para o citocromo *c* através do Complexo III (Q-citocromo *c*-oxidorredutase):



Acredita-se que o processo envolva os **citocromos c_1 , b_L e b_H** e uma **proteína Fe-S de Rieske** (uma proteína Fe-S incomum em que um dos átomos de Fe está ligado a dois resíduos de histidina, em vez de a dois resíduos de cisteína) (Figura 13-5)

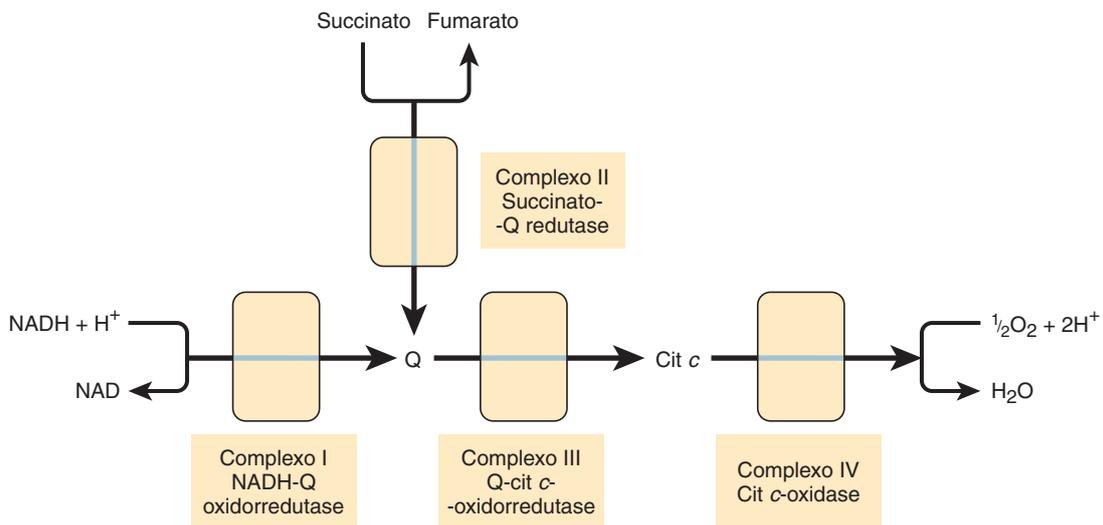


FIGURA 13-3 Visão geral do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória. (cit, citocromo; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

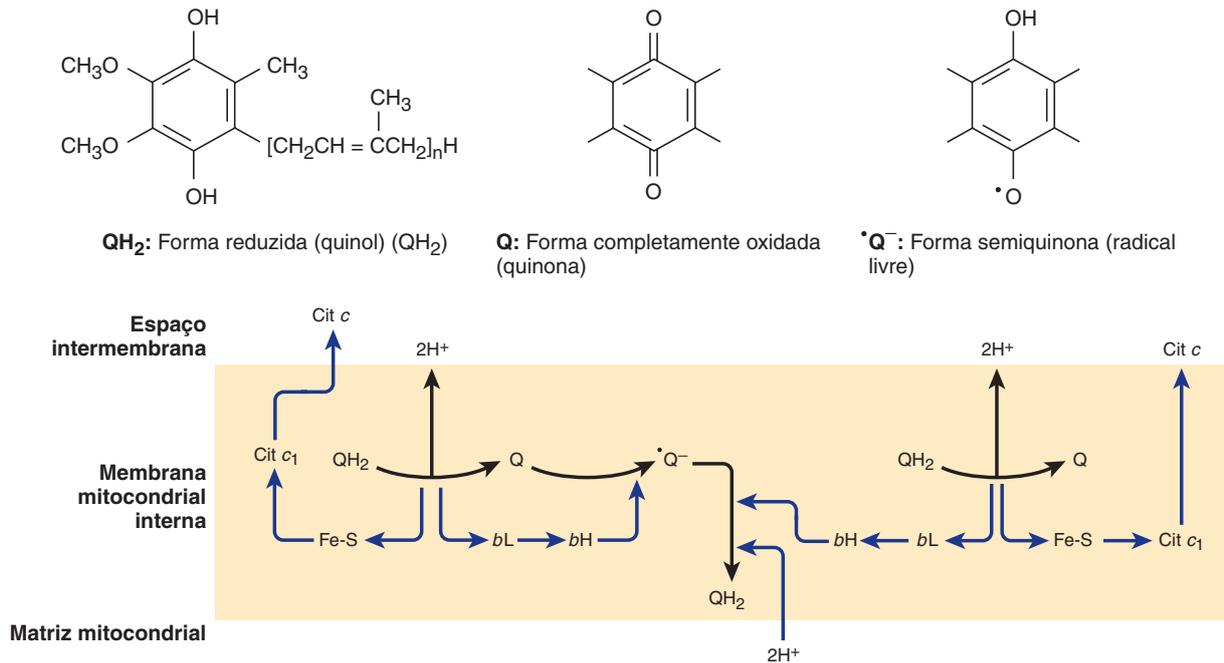
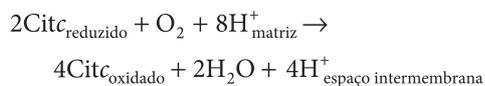


FIGURA 13-6 O ciclo Q. Durante a oxidação de QH₂ a Q, um elétron é doado para o cit *c* por meio da Fe-S Rieske e de cit *c*₁, e o segundo para uma Q para formar a semiquinona por meio de cit *b*_L e cit *b*_H, com 2H⁺ sendo liberados para dentro do espaço intermembrana. Então, um processo similar ocorre com um segundo QH₂, mas, nesse caso, o segundo elétron é doado para a semiquinona, reduzindo-a a QH₂, sendo que 2H⁺ são captados da matriz. (Cit, citocromo; Fe-S, proteína ferro-enxofre; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

O oxigênio molecular é reduzido à água por meio do Complexo IV

O citocromo *c* reduzido é oxidado pelo Complexo IV (citocromo *c*-oxidase), com a redução concomitante do O₂ a duas moléculas de água:



Essa transferência de quatro elétrons do citocromo *c* para o O₂ envolve **dois grupamentos heme, *a* e *a*₃**, e um **Cu** (Figura 13-5). Os elétrons são inicialmente passados para um centro de Cu (Cu_A), o qual contém 2 átomos de Cu ligados a dois grupamentos cisteína-SH proteicos (assemelhando-se a um Fe-S), depois em sequência ao heme *a*, heme *a*₃, um segundo centro de Cu, Cu_B, o qual está ligado ao heme *a*₃, e, por fim, ao O₂. Dos oito H⁺ removidos da matriz, quatro são empregados para formar duas moléculas de água, e quatro são bombeados para dentro do espaço intermembrana. Dessa maneira, para cada par de elétrons que continuam na cadeia desde o NADH ou FADH₂, 2H⁺ são bombeados através da membrana pelo Complexo IV. O O₂ permanece firmemente ligado ao Complexo IV até que seja totalmente reduzido, minimizando a liberação de intermediários potencialmente danosos, como ânions superóxido ou peróxido, os quais são formados quando o O₂ aceita um ou dois elétrons, respectivamente (ver Capítulo 12).

O TRANSPORTE DE ELÉTRONS PELA CADEIA RESPIRATÓRIA CRIA UM GRADIENTE DE PRÓTONS QUE DIRECIONA A SÍNTESE DE ATP

O fluxo dos elétrons pela cadeia respiratória gera ATP por meio do processo de **fosforilação oxidativa**. A **teoria quimiosmótica**, proposta por Peter Mitchell, em 1961, postula que os dois processos estão ligados por um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, de modo que a **força próton-motora** causada pela diferença do potencial eletroquímico (negativa no lado da matriz) direciona o mecanismo de síntese de ATP. Conforme observado, os Complexos I, III e IV atuam como **bombas de prótons**. Como a membrana mitocondrial interna é impermeável aos íons em geral e principalmente aos prótons, estes acumulam-se no espaço intermembrana, criando a força próton-motora predita pela teoria quimiosmótica.

Uma ATP-sintase localizada na membrana funciona como um motor rotatório para formar o ATP

A força próton-motora direciona uma **ATP-sintase** localizada na membrana que forma ATP na presença de P_i + ADP. A ATP-sintase está inserida na membrana interna, juntamente aos complexos da cadeia respiratória (Figura 13-7). Algumas subunidades da proteína assumem um formato semelhante a

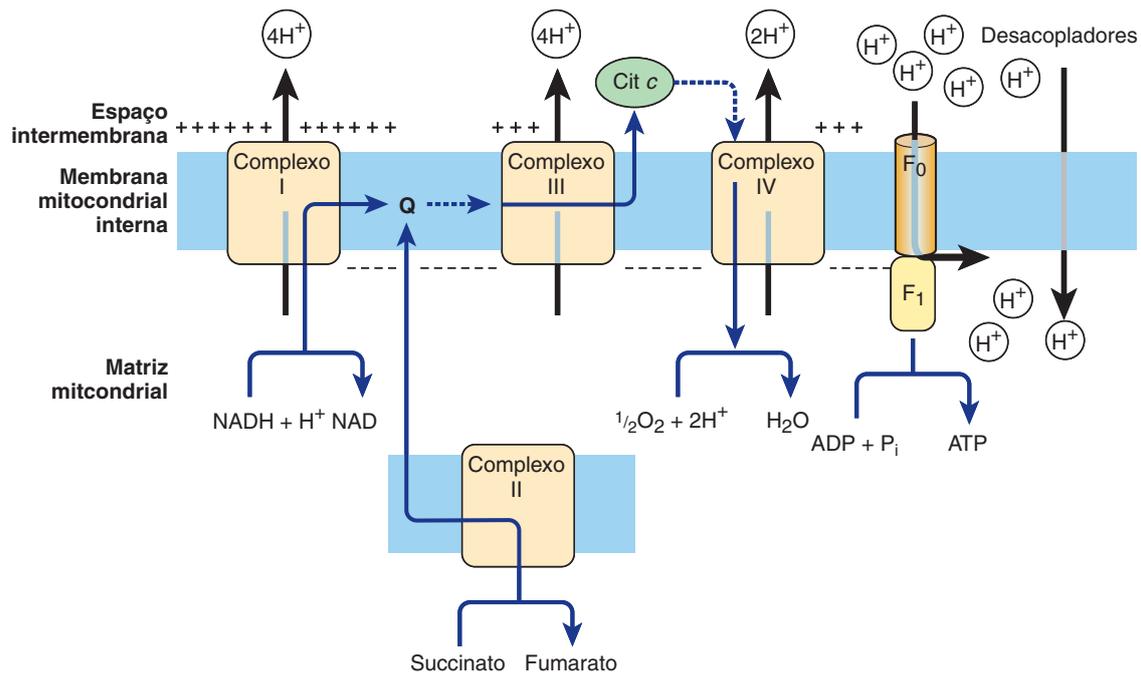


FIGURA 13-7 A teoria quimiosmótica da fosforilação oxidativa. Os Complexos I, III e IV agem como bombas de prótons, criando um gradiente de prótons através da membrana, a qual é negativa no lado da matriz. A força próton-motora gerada direciona a síntese de ATP à medida que os prótons fluem de volta para a matriz por meio da enzima ATP-sintase (ver Figura 13-8). Os desacopladores aumentam a permeabilidade da membrana aos íons, desfazendo o gradiente de prótons ao permitir que o H^+ atravesse sem precisar passar pela ATP-sintase e, dessa maneira, desacopla o fluxo de elétrons pelos complexos respiratórios da síntese de ATP. (Cit, citocromo; Q, coenzima Q ou ubiquinona.)

uma bola, dispostas ao redor de um eixo conhecido como F_1 , o qual se projeta para dentro da matriz e contém o mecanismo de fosforilação (Figura 13-8). O F_1 está ligado a um complexo proteico de membrana conhecido como F_0 , o qual também consiste em diversas subunidades proteicas. O F_0 atravessa a membrana e forma um canal de prótons. O fluxo de prótons por F_0 provoca a sua rotação, direcionando a produção de ATP no complexo F_1 (Figuras 13-7 e 13-8). Acredita-se que isso ocorra por meio de um **mecanismo de troca de ligação**, no qual a conformação das subunidades β em F_1 é modificada, à medida que o eixo gira, de uma que se liga firmemente ao ATP até aquela que libera o ATP e se liga ao ADP e ao P_i , de maneira que o próximo ATP possa ser formado. Estimativas sugerem que, para cada NADH oxidado, os Complexos I e III translocam, cada um, quatro prótons, e o Complexo IV transloca dois.

A CADEIA RESPIRATÓRIA FORNECE A MAIOR PARTE DA ENERGIA CAPTURADA DURANTE O CATABOLISMO

O ADP captura, na forma de fosfato de alta energia, uma proporção significativa da energia livre liberada por processos catabólicos. O ATP resultante é chamado de “**moeda energética**” da célula, porque transmite a energia livre para direcionar processos que requerem energia (ver Figura 11-6).

Existe uma captura direta global de dois grupamentos fosfato de alta energia nas reações glicolíticas (ver Tabela 17-1). Mais dois fosfatos de alta energia por mol de glicose são capturados no ciclo do ácido cítrico durante a conversão da succinil-CoA a succinato (ver Capítulo 16). Todas essas fosforilações ocorrem no **nível de substrato**. Para cada mol de substrato oxidado por meio dos Complexos I, III e IV na cadeia respiratória (i.e., pelo NADH), são formados 2,5 moles de ATP por 0,5 mol de O_2 consumido; isto é, a razão $P:O = 2,5$ (Figura 13-7). Por outro lado, quando 1 mol de substrato (p. ex., succinato ou 3-fosfoglicerato) é oxidado por meio dos Complexos II, III e IV, apenas 1,5 mol de ATP é formado; isto é, $P:O = 1,5$. Essas reações são conhecidas como **fosforilação oxidativa no nível da cadeia respiratória**. Considerando esses valores, pode-se estimar que quase 90% dos fosfatos de alta energia são obtidos por meio da fosforilação oxidativa contida na cadeia respiratória (ver Tabela 17-1).

O controle respiratório garante um suprimento constante de ATP

A velocidade da respiração na mitocôndria pode ser controlada por meio da disponibilidade de ADP. Isso ocorre porque a oxidação e a fosforilação estão **firmemente interligadas**; isto é, a oxidação não pode continuar por meio da cadeia respiratória sem a concomitante fosforilação do ADP. A Tabela 13-1 mostra as cinco condições que controlam a velocidade da respiração na mitocôndria. A maioria das células em estado de repouso encontra-se no **estado 4**, e a respiração é controlada pela

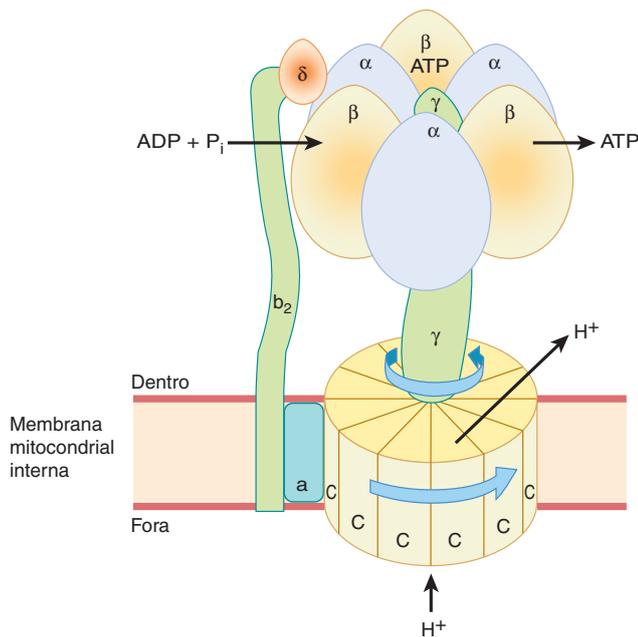


FIGURA 13-8 Mecanismo de produção de ATP pela ATP-sintase. O complexo enzimático consiste em um subcomplexo F_0 , que é um disco de subunidades de proteína “C”. Este se liga a uma subunidade γ na forma de um “eixo curvado”. Os prótons que atravessam o disco de unidades “C” causam a rotação do disco e da subunidade γ acoplada. A subunidade γ adapta-se dentro do subcomplexo F_1 de três subunidades α e três subunidades β , que estão fixadas à membrana e não giram. O ADP e o P_i são captados sequencialmente pelas subunidades β para formar o ATP, que é expulso à medida que a subunidade γ rotatória espreme cada subunidade β por vez e muda sua conformação. Dessa maneira, três moléculas de ATP são produzidas a cada giro. Para maior clareza, nem todas as subunidades que foram identificadas são mostradas – por exemplo, o “eixo” também contém uma subunidade ϵ .

disponibilidade de ADP. Quando se realiza trabalho, o ATP é convertido em ADP, possibilitando que ocorra mais respiração, o que, por sua vez, repõe a reserva de ATP. Sob determinadas condições, a concentração de fosfato inorgânico também pode afetar a velocidade de funcionamento da cadeia respiratória. À medida que a respiração se intensifica (como ocorre no exercício), a célula aproxima-se do **estado 3 ou 5**, quando a capacidade da cadeia respiratória se torna saturada ou a PO_2 diminui abaixo do K_m para o heme a_3 . Também há a possibilidade de o transportador de ADP/ATP, que facilita a entrada do ADP citosólico e a saída do ATP da mitocôndria, transformar-se no limitador da velocidade.

TABELA 13-1 Estados do controle respiratório

Condições limitadoras da velocidade da respiração	
Estado 1	Disponibilidade de ADP e substrato
Estado 2	Disponibilidade apenas de substrato
Estado 3	A capacidade da própria cadeia respiratória, quando todos os substratos e componentes estão presentes em quantidades saturantes
Estado 4	Disponibilidade apenas de ADP
Estado 5	Disponibilidade apenas de oxigênio

Assim, a maneira como os processos oxidativos biológicos permitem que a energia livre decorrente da oxidação dos alimentos seja disponibilizada e utilizada é gradual, eficiente e controlada – em vez de explosiva, ineficiente e descontrolada, como em muitos processos não biológicos. A energia livre restante que não é capturada como fosfato de alta energia é liberada como **calor**. Essa energia não precisa ser considerada “perdida”, pois ela assegura que o sistema respiratório como um todo seja suficientemente exergônico para ser tirado do equilíbrio, possibilitando o fluxo unidirecional contínuo e o fornecimento constante de ATP. Ela também contribui para a manutenção da temperatura corporal.

MUITAS SUBSTÂNCIAS TÓXICAS INIBEM A CADEIA RESPIRATÓRIA

Grande parte das informações a respeito da cadeia respiratória foi obtida por meio do uso de inibidores e, em contrapartida, isso gerou o conhecimento sobre o mecanismo de ação de diversas substâncias tóxicas (**Figura 13-9**). Elas podem ser classificadas como inibidoras da cadeia respiratória, inibidoras da fosforilação oxidativa ou desacopladoras da fosforilação oxidativa.

Os **barbitúricos**, como o amobarbital, inibem o transporte de elétrons pelo Complexo I ao bloquear a transferência de Fe-S para Q. Na dose suficiente, eles são fatais *in vivo*. A **antimicina A** e o **dimercaprol** inibem a cadeia respiratória no Complexo III. As substâncias tóxicas clássicas **H_2S** , **monóxido de carbono** e **cianeto** inibem o Complexo IV e podem, como consequência, interromper completamente a respiração. O **malonato** é um inibidor competitivo do Complexo II.

O **atractilósideo** inibe a fosforilação oxidativa ao inibir o transportador de ADP para dentro e o de ATP para fora da mitocôndria (**Figura 13-10**). O antibiótico **oligomicina** impede completamente a oxidação e a fosforilação ao bloquear o fluxo de prótons por meio da ATP-sintase (**Figura 13-9**).

Os **desacopladores** dissociam a oxidação na cadeia respiratória da fosforilação (**Figura 13-7**). Esses compostos são tóxicos *in vivo*, tornando a respiração descontrolada, pois a velocidade não é mais limitada pela concentração de ADP ou de P_i . O desacoplador que tem sido utilizado com maior frequência é o **2,4-dinitrofenol**, mas outros compostos atuam de maneira similar. A **termogenina** (ou **proteína desacopladora**) é um desacoplador fisiológico encontrado no tecido adiposo marrom que funciona para gerar o calor corporal, principalmente para recém-nascidos e durante a hibernação em animais (ver Capítulo 25).

A TEORIA QUIMIOSMÓTICA PODE SER RESPONSÁVEL PELO CONTROLE RESPIRATÓRIO E PELA AÇÃO DE DESACOPLADORES

Uma vez estabelecida como resultado da translocação de prótons, a diferença de potencial eletroquímico pela membrana inibe o transporte adicional de equivalentes redutores pela cadeia respiratória, a menos que seja dissipado pela translocação reversa de prótons pela membrana por meio da ATP-sintase. Por sua vez, isso depende da disponibilidade de ADP e P_i .

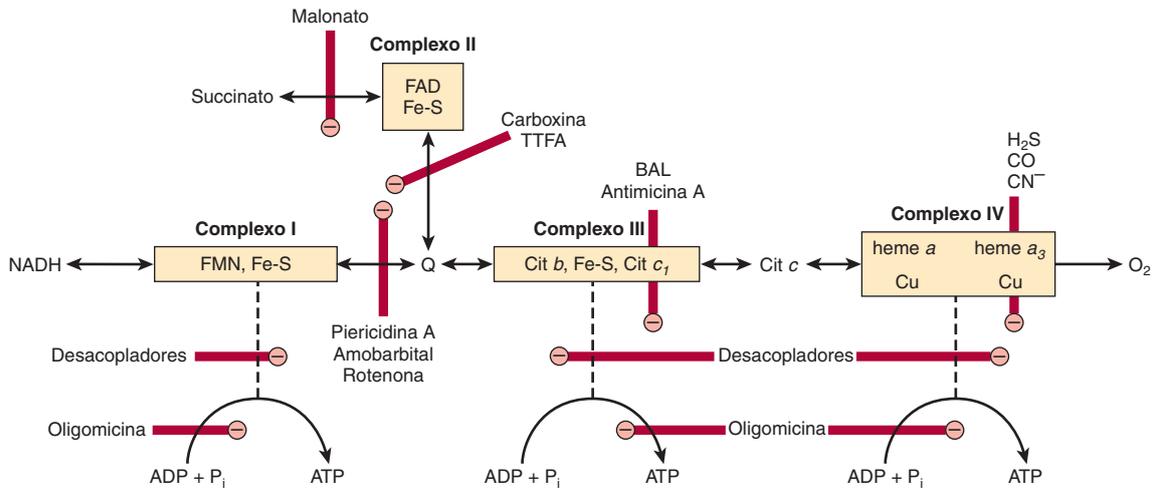


FIGURA 13-9 Locais de inibição (⊖) da cadeia respiratória por fármacos específicos, substâncias químicas e antibióticos. (BAL, dimercaprol; TTFA, um agente quelante de Fe. As outras abreviações são idênticas às da Figura 13-5.)

Os desacopladores (p. ex., dinitrofenol) são anfipáticos (ver Capítulo 21) e aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial interna lipídica aos prótons, reduzindo, assim,

o potencial eletroquímico e gerando uma falha da ATP-sintase (Figura 13-7). Dessa forma, a oxidação pode prosseguir sem a fosforilação.

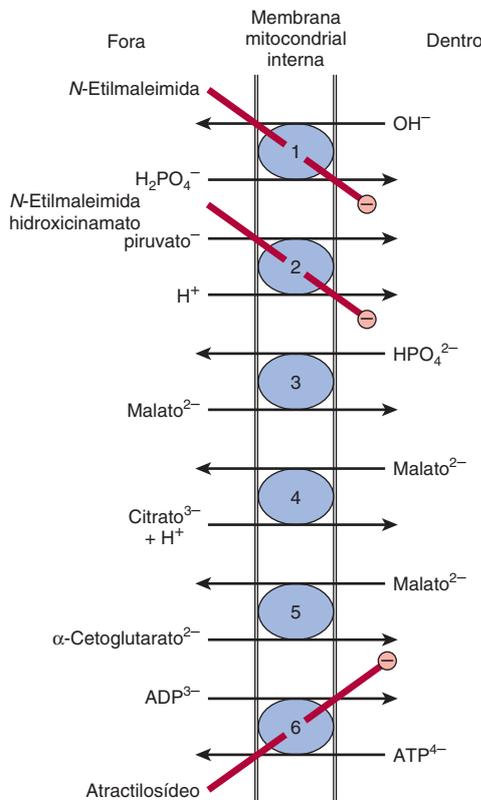


FIGURA 13-10 Sistemas de transporte na membrana mitocondrial interna. ① Transportador de fosfato, ② simporte de piruvato, ③ transportador de dicarboxilato, ④ transportador de tricarboxilato, ⑤ transportador de α -cetoglutarato, ⑥ transportador de nucleotídeo de adenina. *N*-Etilmaleimida, hidroxicinamato e atractilósideo inibem (⊖) os sistemas transportadores para glutamato/aspartato (Figura 13-13), glutamina, ornitina, aminoácidos neutros e carnitina (ver Figura 22-1).

A PERMEABILIDADE SELETIVA DA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA NECESSITA DE TRANSPORTADORES DE TROCA

Os sistemas de difusão por troca envolvendo proteínas transportadoras que atravessam a membrana estão presentes na membrana para a troca de ânions por íons OH^- e de cátions por íons H^+ . Esses sistemas são necessários para a captação e a depuração dos metabólitos ionizados, enquanto preservam os equilíbrios elétrico e osmótico. A membrana mitocondrial interna é livremente permeável a **moléculas pequenas não carregadas**, como oxigênio, água, CO_2 , NH_3 e **ácidos monocarboxílicos**, como o 3-hidroxibutírico, o acetoacético e o acético, sobretudo nas suas formas não dissociadas e mais lipossolúveis. Os **ácidos graxos de cadeia longa** são transportados para dentro das mitocôndrias por meio do sistema carnitina (ver Figura 22-1); também existe um carreador especial para o **piruvato**, envolvendo um simporte que utiliza o gradiente de H^+ de fora para dentro da mitocôndria (Figura 13-10). No entanto, **ânions dicarboxilato e tricarboxilato** (p. ex., malato, citrato) e **aminoácidos** requerem transportadores específicos ou sistemas carreadores para facilitar a passagem através da membrana.

O transporte de ânions dicarboxílicos e tricarboxílicos está intimamente ligado ao do fosfato inorgânico, o qual penetra prontamente como o íon H_2PO_4^- em troca de OH^- . A captação líquida de malato pelo transportador de dicarboxilato requer o fosfato inorgânico para a troca na direção oposta. A captação líquida de citrato, isocitrato ou *cis*-aconitato pelo transportador de tricarboxilatos requer malato em troca. O transporte de α -cetoglutarato também exige uma troca por malato. O transportador de nucleotídeo de adenina permite a

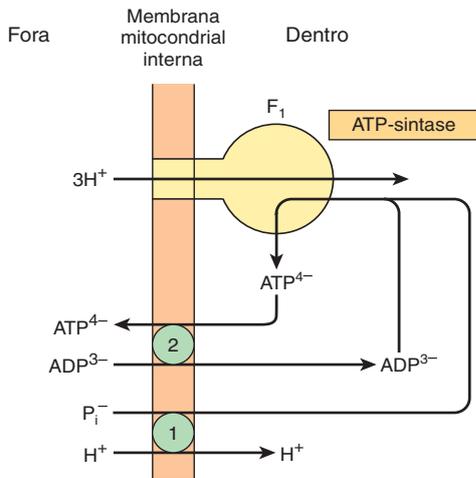


FIGURA 13-11 Combinação do transportador de fosfato ① com o transportador de nucleotídeo de adenina ② na síntese de ATP. O simporte H^+/P_i representado é equivalente ao antiporte P_i/OH^- mostrado na Figura 13-10.

troca de ATP e ADP, mas não de AMP. Isso é vital para a saída de ATP da mitocôndria para os locais extramitocondriais, onde será utilizado, e para o retorno de ADP para a produção de ATP dentro da mitocôndria (**Figura 13-11**). Como, nessa translocação, quatro cargas negativas são removidas da matriz para cada três captadas, o gradiente eletroquímico através da membrana (a força próton-motora) favorece a exportação de ATP. O Na^+ pode ser trocado pelo H^+ , dirigido pelo gradiente de prótons. Acredita-se que a captação ativa de Ca^{2+} pelas mitocôndrias ocorra com transferência de carga líquida de 1 (uniporte de Ca^{2+}), possivelmente através de antiporte Ca^{2+}/H^+ . A liberação de cálcio a partir das mitocôndrias é facilitada pela troca por Na^+ .

Os ionóforos permitem que cátions específicos penetrem nas membranas

Os **ionóforos** são moléculas lipofílicas que se complexam com cátions específicos e facilitam seu transporte através de membranas biológicas, como, por exemplo, a **valinomicina**

(K^+). Os desacopladores clássicos, como o dinitrofenol, são, na verdade, ionóforos de prótons.

Uma transidrogenase translocadora de prótons é uma fonte de NADPH intramitocondrial

A **transidrogenase ligada à energia**, uma proteína da membrana mitocondrial interna, acopla a passagem de prótons a favor do gradiente eletroquímico de fora para dentro da mitocôndria, com a transferência de H do NADH intramitocondrial para o NADPH por enzimas intramitocondriais, como a glutamato desidrogenase e as hidroxilases envolvidas na síntese de esteroide.

A oxidação do NADH extramitocondrial é mediada por lançadeiras de substrato

O NADH não consegue penetrar na membrana mitocondrial, mas é produzido de forma contínua no citosol pela 3-fosfogliceraldeído desidrogenase, uma enzima da via glicolítica (ver Figura 17-2). No entanto, sob condições aeróbias, o NADH extramitocondrial não se acumula, e presume-se que seja oxidado pela cadeia respiratória nas mitocôndrias. A transferência de equivalentes redutores através da membrana mitocondrial requer **pares de substratos** ligados por desidrogenases adequadas em cada lado da membrana mitocondrial. O mecanismo de transferência que utiliza a **lançadeira de glicerolfosfato** é mostrada na **Figura 13-12**. Como a enzima mitocondrial está ligada à cadeia respiratória por meio de uma flavoproteína, em vez de por NAD, apenas 1,5 mol de ATP, e não 2,5 moles, é formado por átomo de oxigênio consumido. Embora esse transportador esteja presente em alguns tecidos (p. ex., cérebro, músculo branco), em outros (p. ex., músculo cardíaco) ele é deficiente. Portanto, acredita-se que o sistema **lançadeira de malato** (**Figura 13-13**) apresenta uma utilidade mais universal. A complexidade desse sistema se deve à impermeabilidade da membrana mitocondrial ao oxalacetato, o qual deve reagir com o glutamato para formar aspartato e α -cetogluturato por transaminação antes do transporte através da membrana mitocondrial e da reconstituição a oxalacetato no citosol.

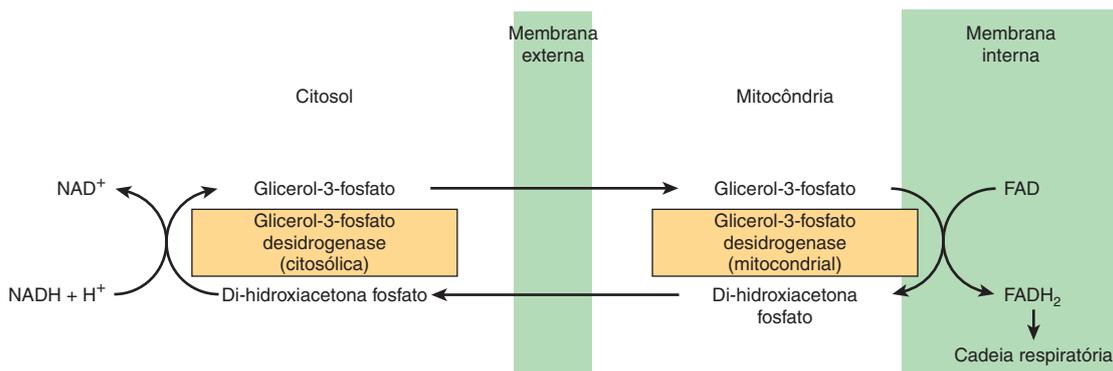


FIGURA 13-12 Lançadeira de glicerolfosfato para transferência de equivalentes redutores do citosol para dentro da mitocôndria.

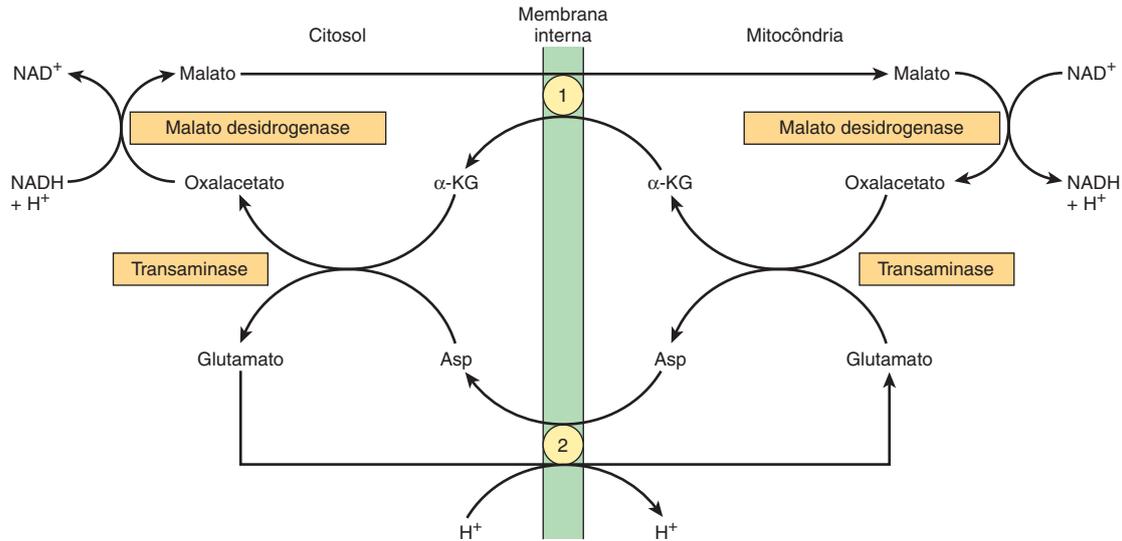


FIGURA 13-13 Lançadeira de malato para transferência de equivalentes redutores do citosol para dentro da mitocôndria. ① Transportador de α -cetoglutarato e ② transportador de glutamato/aspartato (observe o simporte de próton com glutamato).

O transporte de íons nas mitocôndrias está ligado à energia

As mitocôndrias mantêm ou acumulam cátions como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e P_i . Acredita-se que uma bomba de prótons primária direcione a troca de cátions.

A lançadeira de creatina-fosfato facilita o transporte do fosfato de alta energia a partir das mitocôndrias

A lançadeira de creatina-fosfato (Figura 13-14) aumenta as funções da **creatina-fosfato** como um tampão de energia ao agir como um sistema dinâmico para a transferência de fosfato de alta energia nas mitocôndrias dos tecidos ativos, como o coração e o músculo esquelético. Uma isoenzima da **creatina-cinase** (CK_m) é encontrada no espaço intermembrana mitocondrial, catalisando a transferência do fosfato de alta energia para a creatina a partir do ATP oriundo do transportador de nucleotídeo de adenina. Por sua vez, a creatina-fosfato é transportada para o citosol através de poros-proteicos na membrana mitocondrial externa, tornando-se disponível para a produção do ATP extramitocondrial.

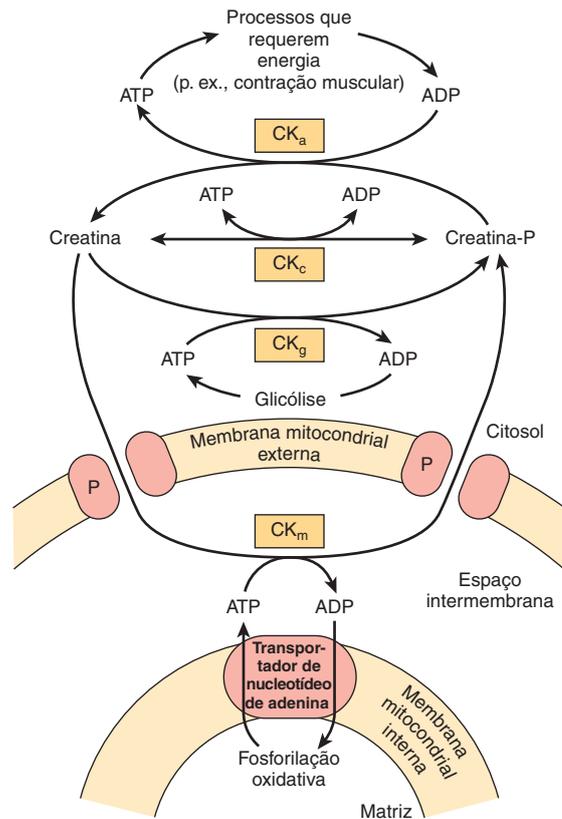


FIGURA 13-14 A lançadeira de creatina fosfato dos músculos cardíaco e esquelético. A lançadeira permite o rápido transporte do fosfato de alta energia da matriz mitocondrial para o citosol. (CK_a , creatina-cinase relacionada às grandes demandas de ATP – p. ex., contração muscular; CK_c , creatina-cinase para manter o equilíbrio entre a creatina e a creatina-fosfato e ATP/ADP; CK_g , creatina-cinase que acopla a glicólise com a síntese de creatina-fosfato; CK_m , creatina-cinase mitocondrial que medeia a produção de creatina-fosfato a partir do ATP formado na fosforilação oxidativa; P, proteína do poro na membrana mitocondrial externa.)

ASPECTOS CLÍNICOS

A condição conhecida como **miopatia mitocondrial infantil fatal e disfunção renal** envolve a grave redução ou ausência da maioria das oxidorreduzases da cadeia respiratória. O **MELAS** (encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e acidente vascular cerebral) é uma condição herdada devido à deficiência de NADH-Q oxidorreduzase (Complexo I) ou da citocromo-oxidase (Complexo IV). Ela é causada por uma mutação no DNA mitocondrial e pode estar envolvida na **doença de Alzheimer** e no **diabetes melito**. Vários fármacos e substâncias tóxicas atuam inibindo a fosforilação oxidativa (ver anteriormente).

RESUMO

- Quase toda a energia liberada a partir da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas é disponibilizada nas mitocôndrias como equivalentes redutores (—H ou e^-). Estes são afluídos na cadeia respiratória, onde são transmitidos por um gradiente redox de transportadores até sua reação final com o oxigênio para formar água.
- Os transportadores redox são agrupados em quatro complexos na cadeia respiratória da membrana mitocondrial interna. Três dos quatro complexos são capazes de usar a energia liberada no gradiente redox para bombear prótons para fora da membrana, criando um potencial eletroquímico entre a matriz e o espaço intermembrana.
- A ATP-sintase atravessa a membrana e atua como um motor giratório que emprega a energia potencial do gradiente de prótons ou a força próton-motora para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i . Dessa maneira, a oxidação está firmemente atrelada à fosforilação para satisfazer as necessidades de energia da célula.
- Como a membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons e a outros íons, os transportadores de troca especiais atravessam a membrana para permitir que íons como OH^- , ATP^{4-} , ADP^{3-} e metabólitos atravessem sem descarregar o gradiente eletroquímico através da membrana.

- Muitas substâncias tóxicas bem conhecidas, como o cianeto, paralisam a respiração por meio da inibição da cadeia respiratória.

REFERÊNCIAS

- Hinkle PC: P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 2005;1706:1.
- Kocherginsky N: Acidic lipids, H(+)-ATPases, and mechanism of oxidative phosphorylation. Physico-chemical ideas 30 years after P. Mitchell's Nobel Prize award. *Prog Biophys Mol Biol* 2009;99:20.
- Mitchell P: Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 1979;206:1148.
- Nakamoto RK, Baylis Scanlon JA, Al-Shawi MK: The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:43.
- Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S: The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2001;2:342.
- Tyler DD: *The Mitochondrion in Health and Disease*. VCH Publishers, 1992.
- Wallace DC: Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* 1997;277:22.
- Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T: ATP synthase—a marvelous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:669.

Questões para estudo

Seção III – Bioenergética

- Qual das afirmativas a seguir sobre a variação de energia livre (ΔG) em uma reação bioquímica está CORRETA?
 - Se ΔG é negativo, a reação segue espontaneamente com perda de energia livre.
 - Em uma reação exergônica, ΔG é positivo.
 - A variação de energia livre padrão quando os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L e o pH é 7,0 é representada como ΔG^0 .
 - Em uma reação endergônica, ΔG é negativo.
 - Se ΔG é 0, a reação é essencialmente irreversível.
- Se ΔG de uma reação é zero:
 - A reação se desenvolve de modo virtual, até a finalização e é essencialmente irreversível.
 - A reação é endergônica.
 - A reação é exergônica.
 - A reação se desenvolve apenas se for possível a obtenção de energia livre.
 - O sistema está em equilíbrio e não ocorre carga líquida.
- ΔG_0 é definido como a variação de energia livre padrão quando:
 - Os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L.
 - Os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L em pH 7,0.
 - Os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mmol/L em pH 7,0.
 - Os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 μ mol/L.
 - Os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L em pH 7,4.
- Qual das afirmativas a seguir sobre ATP está CORRETA?
 - Ele contém três ligações fosfato de alta energia.
 - Ele é necessário no organismo para conduzir reações exergônicas.
 - Ele é utilizado como estoque de energia no organismo.
 - Ele atua no organismo com um complexo com Mg^{2+} .
 - Ele é sintetizado pela ATP-sintase na presença de desacopladores, como UCP-1 (termogenina).
- Qual das enzimas a seguir utiliza oxigênio molecular como aceptor de hidrogênio?
 - Citocromo c-oxidase.
 - Isocitrato-desidrogenase.
 - Homogentisato-dioxigenase.
 - Catalase.
 - Superóxido-dismutase.
- Qual das afirmativas a seguir sobre citocromos está INCORRETA?
 - Eles são hemoproteínas que participam de reações de oxidorredução.
 - Eles contêm ferro que oscila entre Fe^{3+} e Fe^{2+} durante as reações que eles participam.
 - Eles atuam como transportadores de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.
 - Eles possuem uma importante função na hidroxilação de esteroides no retículo endoplasmático.
 - Todos eles são enzimas desidrogenases.
- Qual das afirmativas a seguir sobre citocromos P450 está INCORRETA?
 - Eles são capazes de aceitar elétrons oriundos de NADH ou NADPH.
 - Eles são encontrados apenas no retículo endoplasmático.
 - Eles são enzimas monooxigenases.
 - Eles exercem função fundamental na destoxificação de drogas no fígado.
 - Em algumas reações, eles funcionam em conjunto com o citocromo b5.
- À medida que uma molécula de NADH é oxidada na cadeia respiratória:
 - 1,5 molécula de ATP é produzida no total.
 - 1 molécula de ATP é produzida, à medida que os elétrons passam pelo Complexo IV.
 - 1 molécula de ATP é produzida, à medida que os elétrons passam pelo Complexo II.
 - 1 molécula de ATP é produzida, à medida que os elétrons passam pelo Complexo III.
 - 0,5 de uma molécula de ATP é produzida, à medida que os elétrons passam pelo Complexo I.
- O número de moléculas de ATP produzidas por cada molécula de FADH₂ oxidada na cadeia respiratória é:
 - 1
 - 2,5
 - 1,5
 - 2
 - 0,5
- Numerosos compostos inibem a fosforiação oxidativa – a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico – ligada à oxidação de substratos na mitocôndria. Qual das alternativas a seguir descreve a ação da oligomicina?
 - Ela desfaz o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna.
 - Ela desfaz o gradiente de prótons da membrana mitocondrial externa.
 - Ela inibe a cadeia de transporte de elétrons diretamente por se ligar a um dos transportadores de elétrons na membrana mitocondrial interna.
 - Ela inibe o transporte de ADP para dentro, e de ATP para fora, da matriz mitocondrial.
 - Ela inibe o transporte de prótons de volta para a matriz mitocondrial através da ATP-sintase.
- Numerosos compostos inibem a fosforiação oxidativa – a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico – ligada à oxidação de substratos na mitocôndria. Qual das alternativas a seguir descreve a ação de um desacoplador?
 - Ele desfaz o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna.
 - Ele desfaz o gradiente de prótons da membrana mitocondrial externa.
 - Ele inibe a cadeia de transporte de elétrons diretamente por se ligar a um dos transportadores de elétrons na membrana mitocondrial interna.

- D. Ele inibe o transporte de ADP para dentro, e de ATP para fora, da matriz mitocondrial.
- E. Ele inibe o transporte de prótons de volta para a matriz mitocondrial através da haste da partícula primária.
12. Uma estudante aceita alguns comprimidos, oferecidos a ela em uma discoteca, e sem perguntar o que são, ela os engole. Pouco tempo depois, ela começa a hiperventilar e torna-se muito quente. Qual é a ação mais provável dos comprimidos que ela tomou?
- A. Um inibidor da síntese de ATP mitocondrial.
- B. Um inibidor do transporte de elétrons mitocondrial.
- C. Um inibidor do transporte de ADP para a mitocôndria para ser fosforilado.
- D. Um inibidor do transporte de ATP para fora da mitocôndria no citosol.
- E. Um desacoplador da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa.
13. O fluxo de elétrons pela cadeia respiratória e a produção de ATP, normalmente, são firmemente acoplados. Os processos são desacoplados por qual das seguintes alternativas?
- A. Cianeto.
- B. Oligomicina.
- C. Termogenina.
- D. Monóxido de carbono.
- E. Ácido sulfídrico.
14. Qual das afirmativas a seguir sobre a ATP-sintase está INCORRETA?
- A. Ela está localizada na membrana mitocondrial interna.
- B. Ela requer uma força próton-motora para formar ATP na presença de ADP e P_i .
- C. O ATP é produzido quando parte da molécula gira.
- D. Uma molécula de ATP é formada para cada giro completo da molécula.
- E. O subcomplexo F_1 está fixado à membrana e não gira.
15. A teoria quimiosmótica de Peter Mitchell propõe um mecanismo para o acoplamento íntimo do transporte de elétrons na cadeia respiratória ao processo de fosforilação oxidativa. Qual das opções a seguir NÃO é predita pela teoria?
- A. Um gradiente de prótons ao longo da membrana mitocondrial interna, gerado pelo transporte de elétrons, impulsiona a síntese de ATP.
- B. O potencial eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial interna, causado pelo transporte de elétrons, é positivo no lado da matriz.
- C. Os prótons são bombeados pela membrana mitocondrial interna à medida que os elétrons passam pela cadeia respiratória.
- D. Um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial interna aos prótons desacopla o processo de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa.
- E. A síntese de ATP ocorre quando a diferença de potencial eletroquímico ao longo da membrana é desfeita pelo deslocamento dos prótons de volta pela membrana mitocondrial interna através da enzima ATP-sintase.

Visão geral do metabolismo e do suprimento de combustíveis metabólicos

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os conceitos das vias metabólicas anabólicas, catabólicas e anfibólicas.
- Descrever, em linhas gerais, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos no nível dos tecidos e órgãos e no nível subcelular e a interconversão dos combustíveis metabólicos.
- Caracterizar o modo como é regulado o fluxo de metabólitos através de vias metabólicas.
- Elucidar como uma provisão de combustíveis metabólicos é fornecida tanto no estado alimentado quanto no jejum, assim como a formação de reservas de combustíveis metabólicos no estado alimentado e a sua mobilização durante o jejum.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Metabolismo é o termo empregado para descrever a interconversão dos compostos químicos presentes no organismo, as vias percorridas pelas moléculas individualmente, suas inter-relações e os mecanismos que regulam o fluxo de metabólitos através dessas vias. As vias metabólicas são classificadas em três categorias. (1) **Vias anabólicas**, que estão envolvidas na síntese de compostos maiores e mais complexos a partir de precursores menores – por exemplo, a síntese de proteínas a partir de aminoácidos e a síntese de reservas de triacilgliceróis e glicogênio. As vias anabólicas são endotérmicas. (2) **Vias catabólicas**, que estão envolvidas na quebra de moléculas grandes, comumente envolvendo reações oxidativas; elas são exotérmicas, produtoras de equivalentes redutores e ATP, principalmente pela cadeia respiratória (ver Capítulo 13). (3) **Vias anfibólicas**, que ocorrem no “cruzamento” do metabolismo, atuando como pontos de união entre as vias anabólicas e catabólicas; por exemplo, o ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16).

O conhecimento do metabolismo normal é essencial para o entendimento das anormalidades que fundamentam a doença. O metabolismo normal inclui a adaptação aos períodos

de jejum, fome e exercício, bem como à gravidez e à lactação. A ocorrência de anormalidades no metabolismo pode resultar de deficiência nutricional, de deficiências enzimáticas, da secreção anormal de hormônios ou de ações de fármacos e toxinas.

Um ser humano adulto de 70 kg requer cerca de 8 a 12 MJ (1.920-2.900 kcal) de combustíveis metabólicos por dia, dependendo da atividade física. Animais maiores requerem menos por quilograma de peso corporal, ao passo que animais menores requerem mais. Crianças e animais em crescimento possuem necessidades proporcionalmente maiores devido ao custo energético do crescimento. Para seres humanos, essas necessidades energéticas são encontradas em carboidratos (40-60%), lipídeos (principalmente triacilglicerol, 30-40%) e proteínas (10-15%), assim como no álcool. A mistura de carboidratos, lipídeos e proteínas que estão sendo oxidados varia conforme o estado do indivíduo – alimentado ou jejum –, bem como de acordo com a duração e a intensidade do trabalho físico.

Existe uma necessidade constante de combustíveis metabólicos ao longo do dia; a atividade física média aumenta a taxa metabólica apenas em cerca de 40 a 50% acima da taxa metabólica basal ou em repouso. No entanto, a maioria das pessoas consome a sua ingestão diária de combustíveis metabólicos em

duas ou três refeições, de forma que existe a necessidade de formar reservas de carboidratos (glicogênio no fígado e no músculo), lipídeos (triacilglicerol no tecido adiposo) e estoques de proteínas variáveis durante o período após uma refeição, para uso no intervalo de tempo em que não há consumo de alimentos.

Se a ingestão de combustíveis metabólicos for consistentemente maior do que o gasto energético, o excesso é armazenado, em grande parte, na forma de triacilgliceróis no tecido adiposo, levando ao desenvolvimento de **obesidade** e seus riscos associados à saúde. Em contrapartida, se a ingestão de combustíveis metabólicos for consistentemente menor do que o gasto energético, haverá uma reserva insignificante de gordura e carboidratos, e os aminoácidos que surgem do *turnover* proteico serão utilizados no metabolismo energético, em lugar de seu uso na síntese de proteínas para reposição, levando ao **emagrecimento**, perda muscular e, por fim, à morte (ver Capítulo 43).

No estado alimentado, após uma refeição, existe um amplo suprimento de carboidratos, e a fonte de energia metabólica para a maioria dos tecidos é a glicose. Em condições de jejum, a glicose precisa ser preservada para uso pelo sistema nervoso central (que depende, em grande parte, da glicose) e pelas hemácias (que dependem unicamente da glicose). Por conseguinte, os tecidos que podem utilizar fontes de energia diferentes da glicose o fazem; o músculo e o fígado oxidam ácidos graxos, e o fígado sintetiza corpos cetônicos a partir de ácidos graxos destinados à exportação para o músculo e outros tecidos. À medida que os estoques de glicogênio se esgotam, os aminoácidos provenientes do *turnover* proteico são usados para a **gliconeogênese** (ver Capítulo 19).

A formação e a utilização das reservas de triacilgliceróis e de glicogênio e o grau com que os tecidos captam e oxidam a glicose são, em grande parte, controlados pelos hormônios **insulina** e **glucagon**. No **diabetes melito**, há comprometimento na síntese e na secreção de insulina (diabetes melito tipo 1, algumas vezes denominado diabetes de início juvenil ou diabetes dependente de insulina) quanto na redução da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina (diabetes melito tipo 2, algumas vezes denominado diabetes de início tardio ou diabetes dependente de insulina), resultando em grave distúrbio metabólico. Em bovinos, as demandas da lactação intensa podem levar ao desenvolvimento de cetose, assim como as demandas de gestação gemelar em ovelhas.

VIAS QUE PROCESSAM OS PRINCIPAIS PRODUTOS DA DIGESTÃO

A natureza da alimentação estabelece o padrão básico de metabolismo. Existe uma necessidade de processar os produtos da digestão dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas da alimentação. Esses produtos da digestão consistem principalmente em glicose, ácidos graxos e glicerol e aminoácidos, respectivamente. Nos ruminantes (e, em menor grau, em outros herbívoros), a celulose da alimentação é fermentada por microrganismos simbióticos em ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, butírico), e o metabolismo desses animais está adaptado para utilizar esses ácidos graxos como principais

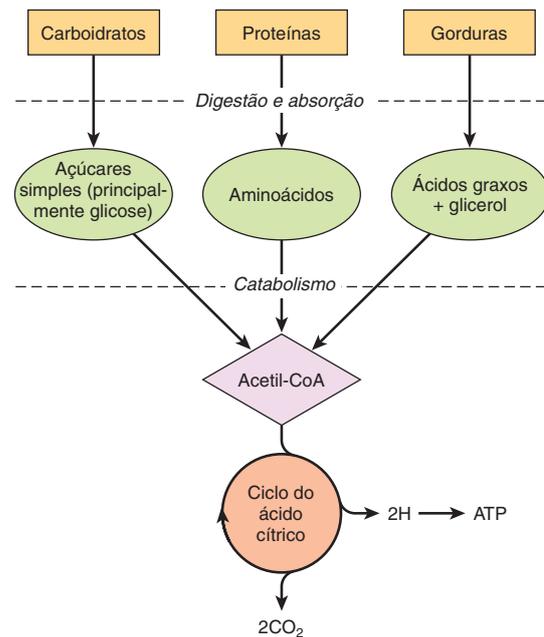


FIGURA 14-1 Resumo das vias para o catabolismo dos carboidratos, das proteínas e da gordura da alimentação. Todas essas vias levam à produção de acetil-CoA, que é oxidada no ciclo do ácido cítrico, produzindo, por fim, ATP pelo processo de fosforilação oxidativa.

substratos. Todos os produtos da digestão são metabolizados a um **produto comum**, a **acetil-CoA**, que é, então, oxidada pelo **ciclo do ácido cítrico** (ver Capítulo 16) (Figura 14-1).

O metabolismo dos carboidratos concentra-se no suprimento e no destino da glicose

A glicose é o principal combustível da maioria dos tecidos (ver Figura 14-2). Ela é metabolizada a piruvato pela via da **glicólise** (ver Capítulo 17). Os tecidos aeróbios metabolizam o piruvato à **acetil-CoA**, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico para oxidação completa a CO_2 e H_2O , ligados à formação de ATP no processo de **fosforilação oxidativa** (ver Figura 13-2). A glicólise também pode ocorrer de modo anaeróbico (i.e., na ausência de oxigênio) quando o produto final é o lactato.

A glicose e seus metabólitos também participam em outros processos – por exemplo, na síntese do polímero de armazenamento, o **glicogênio**, no músculo esquelético e no fígado (ver Capítulo 18) e na **via das pentoses-fosfato**, uma parte alternativa da via glicolítica (ver Capítulo 20). Ela é uma fonte de equivalentes redutores (NADPH) para a síntese de ácidos graxos (ver Capítulo 23) e a fonte de **ribose** para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos (ver Capítulo 33). Os intermediários trioses-fosfato na glicólise originam a **porção glicerol** dos triacilgliceróis. O piruvato e os intermediários do ciclo do ácido cítrico fornecem os esqueletos de carbono para a síntese dos **aminoácidos** não essenciais ou dispensáveis (ver Capítulo 27), e a acetil-CoA é o precursor dos **ácidos graxos** (ver Capítulo 23) e do **colesterol** (ver Capítulo 26) e, conseqüentemente, de todos os hormônios esteroides sintetizados no corpo. A **gliconeogênese** (ver Capítulo 19) é o processo de síntese da glicose a partir de precursores não carboidratos, como lactato, aminoácidos e glicerol.

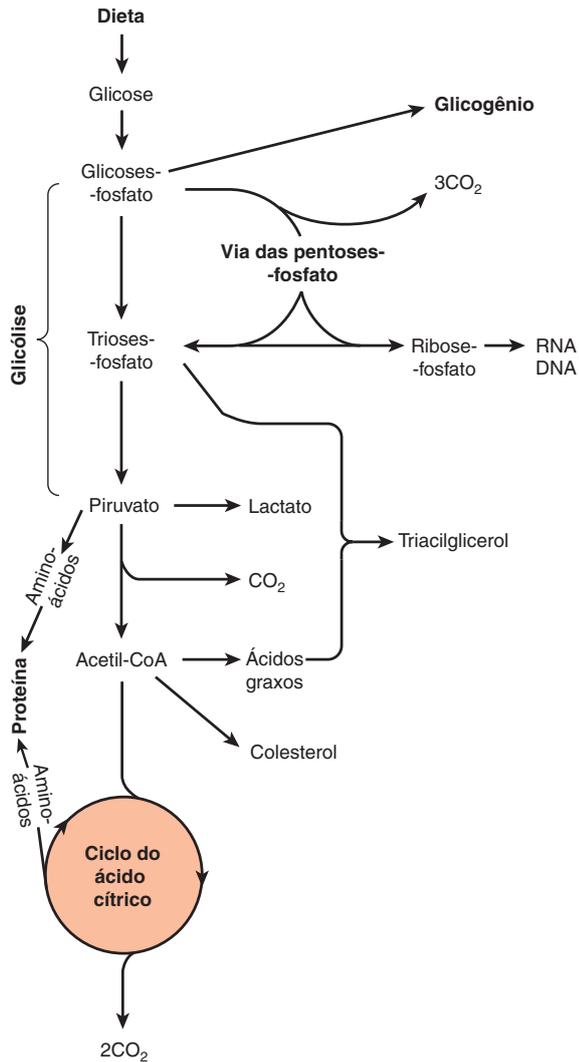


FIGURA 14-2 Visão geral do metabolismo dos carboidratos, mostrando as principais vias e os produtos finais. A gliconeogênese não é mostrada.

O metabolismo dos lipídeos está envolvido principalmente com os ácidos graxos e o colesterol

Os ácidos graxos de cadeia longa originam-se de lipídeos da alimentação ou da síntese *de novo* a partir da acetil-CoA derivada dos carboidratos ou dos aminoácidos. Os ácidos graxos podem ser oxidados à acetil-CoA (β -oxidação) ou esterificados com glicerol, formando **triacilglicerol** (gordura) como principal reserva de energia.

A acetil-CoA formada pela β -oxidação de ácidos graxos pode ter três destinos (**Figura 14-3**):

1. Como a acetil-CoA que se origina da glicólise, ela é **oxidada** a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ pelo ciclo do ácido cítrico.
2. É a precursora na síntese de **colesterol** e de outros **esteroides**.
3. No fígado, é utilizada para formar **corpos cetônicos**, acetacetato e 3-hidroxiacetato (ver Capítulo 22), que são importantes combustíveis durante o jejum prolongado e a inanição.

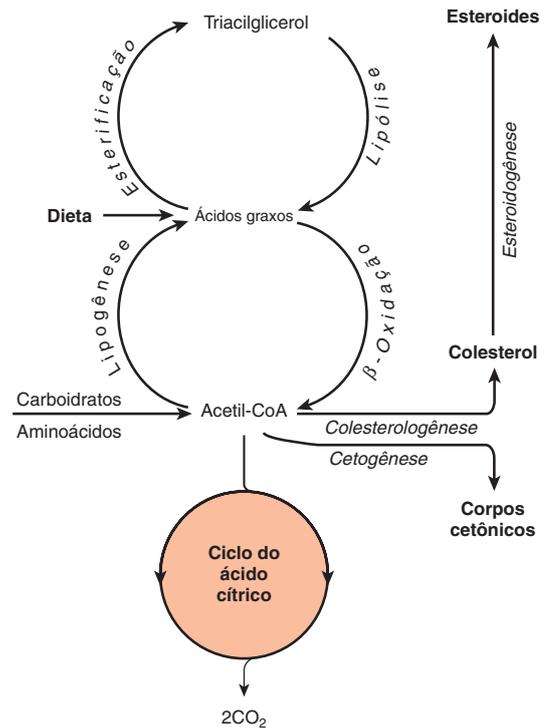


FIGURA 14-3 Visão geral do metabolismo dos ácidos graxos, mostrando as principais vias e os produtos finais. Os corpos cetônicos são acetacetato, 3-hidroxiacetato e acetona (que é formada não enzimaticamente pela descarboxilação do acetacetato).

Grande parte do metabolismo dos aminoácidos envolve a transaminação

Os aminoácidos são necessários para a síntese de proteínas (**Figura 14-4**). Alguns precisam ser supridos na alimentação (os **aminoácidos essenciais ou indispensáveis**), uma vez que não podem ser sintetizados pelo organismo. Os restantes são **aminoácidos não essenciais ou dispensáveis**, que são supridos pela alimentação, mas que também podem ser formados a partir de intermediários metabólicos por **transaminação**, utilizando o grupamento amino de outros aminoácidos (ver Capítulo 27). Após a **desaminação**, o nitrogênio amino é excretado na forma de **ureia**, e os esqueletos de carbono que permanecem após a transaminação podem (1) ser oxidados a CO_2 pelo ciclo do ácido cítrico, (2) ser utilizados na síntese de glicose (gliconeogênese) ou (3) formar corpos cetônicos ou acetil-CoA, que pode ser oxidada ou utilizada na síntese de ácidos graxos (ver Capítulo 28).

Vários aminoácidos também são precursores de outros compostos, como, por exemplo, purinas, pirimidinas, hormônios, como a epinefrina e a tiroxina, e neurotransmissores.

AS VIAS METABÓLICAS PODEM SER ESTUDADAS EM DIFERENTES NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO

Além dos estudos no organismo como um todo, a localização e a integração das vias metabólicas são reveladas por estudos realizados em vários níveis de organização. Em **nível de**

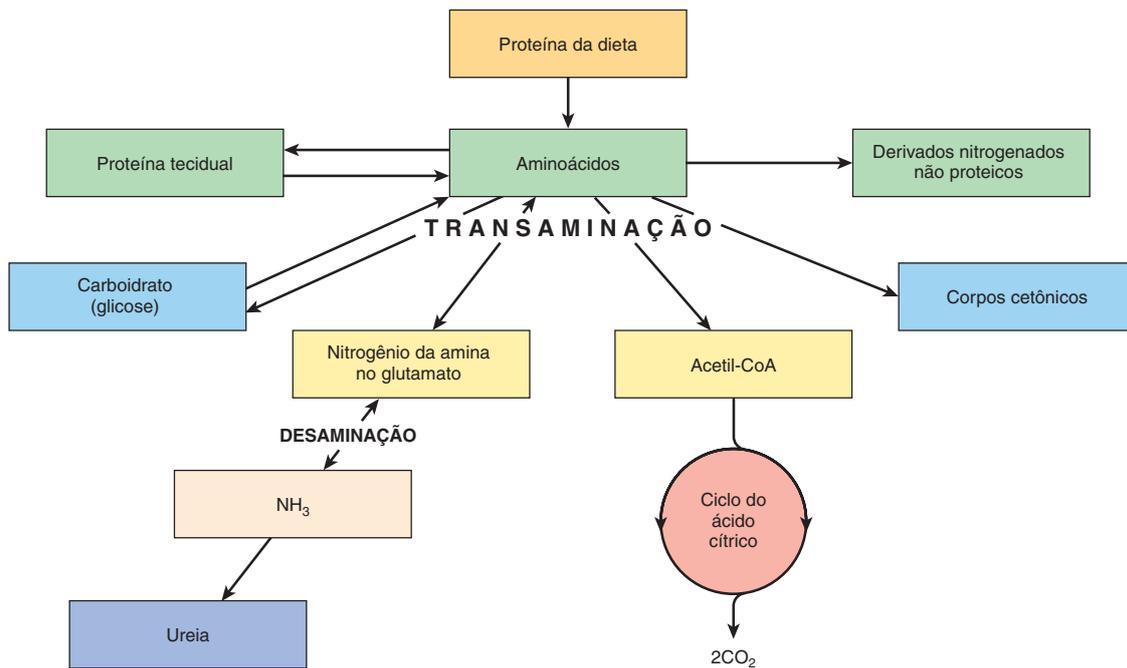


FIGURA 14-4 Visão geral do metabolismo dos aminoácidos, mostrando as principais vias e os produtos finais.

tecidos e órgãos, a natureza dos substratos que entram e dos metabólitos que saem dos tecidos e órgãos pode ser medida. Em **nível subcelular**, cada organela celular (p. ex., a mitocôndria) ou compartimento (p. ex., o citosol) desempenha papéis específicos que fazem parte de um padrão subcelular de vias metabólicas.

Em nível de tecidos e órgãos, a circulação sanguínea integra o metabolismo

Os **aminoácidos** resultantes da digestão das proteínas da dieta e a **glicose** proveniente da digestão dos carboidratos são absorvidos pela veia porta do fígado. O fígado desempenha a função

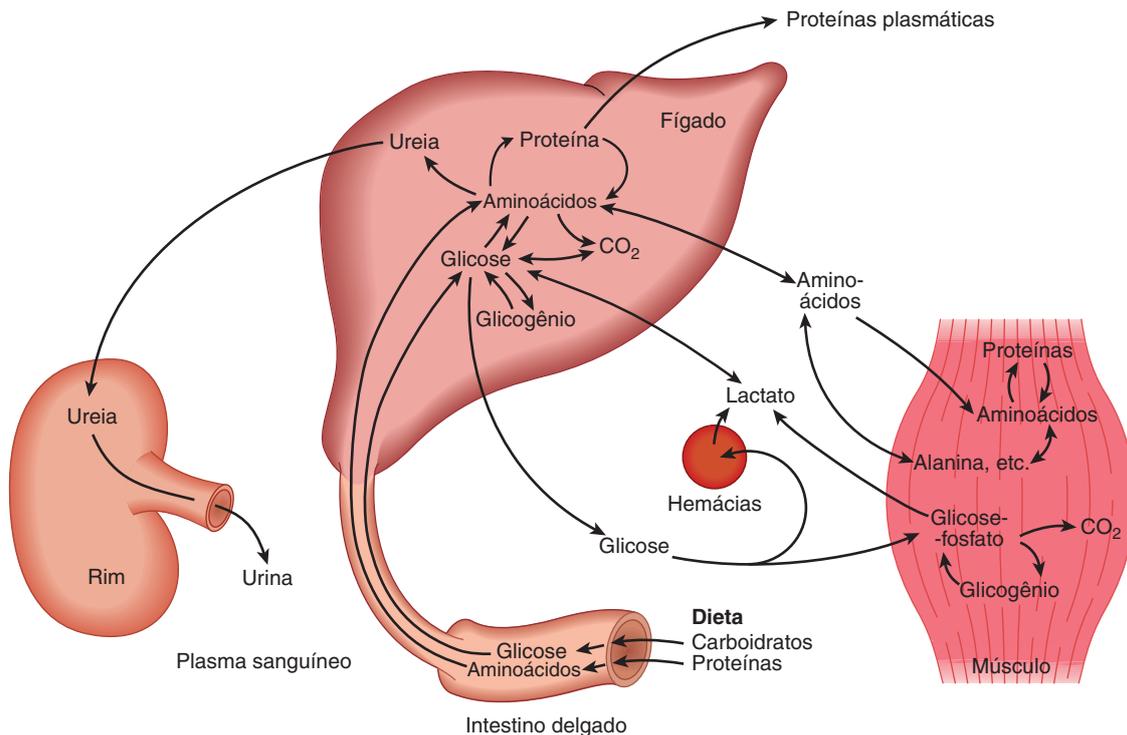


FIGURA 14-5 Transporte e destino dos principais substratos e metabólitos dos carboidratos e dos aminoácidos. Observe que há pouca glicose livre no músculo, uma vez que ela é rapidamente fosforilada após a captação.

de regular a concentração sanguínea desses metabólitos hidrossolúveis (**Figura 14-5**). No caso da glicose, isso é obtido pela captação de glicose em quantidades superiores às necessidades imediatas e pelo seu uso na síntese de glicogênio (**glicogênese**; Capítulo 18) ou de ácidos graxos (**lipogênese**; Capítulo 23). Entre as refeições, o fígado atua para manter o nível da glicemia a partir da degradação do glicogênio (**glicogenólise**; ver Capítulo 18) e, com o rim, converter os metabólitos não carboidratos, como lactato, glicerol e aminoácidos, em glicose (**gliconeogênese**; ver Capítulo 19). A manutenção de uma concentração sanguínea adequada de glicose é essencial para os tecidos em que ela é o principal combustível (o encéfalo) ou o único combustível (as hemácias). O fígado também **sintetiza as principais proteínas plasmáticas** (p. ex., albumina) e **desamina os aminoácidos** que estão acima das necessidades, produzindo ureia, que é transportada até o rim e excretada (ver Capítulo 28).

O **músculo esquelético** utiliza a glicose como fonte de energia tanto de modo aeróbio, formando CO_2 , quanto de modo anaeróbio, formando lactato. O músculo esquelético armazena glicogênio como substrato energético para uso durante a contração muscular e sintetiza proteína muscular a partir dos aminoácidos plasmáticos. O músculo responde por cerca de 50% da massa corporal e, conseqüentemente, representa uma considerável reserva de proteína, que pode ser empregada para suprir aminoácidos para a gliconeogênese em caso de inanição (ver Capítulo 19).

Os **lipídeos** da alimentação (**Figura 14-6**) são principalmente triacilgliceróis e são hidrolisados a monoacilgliceróis

e ácidos graxos no intestino, sendo, então, reesterificados na mucosa intestinal. Na mucosa intestinal, eles são empacotados com proteínas e secretados no sistema linfático e, após, na corrente sanguínea como **quilomícrons**, a maior das **lipoproteínas** plasmáticas (ver Capítulo 25). Os quilomícrons também contêm outros nutrientes lipossolúveis, incluindo as vitaminas A, D, E e K (ver Capítulo 44). Ao contrário da glicose e dos aminoácidos absorvidos no intestino delgado, o triacilglicerol dos quilomícrons não é captado diretamente pelo fígado. Ele é inicialmente metabolizado por tecidos que apresentam a **lipase lipoproteica**, a enzima que hidrolisa o triacilglicerol, liberando ácidos graxos, que são incorporados aos lipídeos teciduais ou oxidados como substratos energéticos. Os remanescentes de quilomícrons são depurados pelo fígado. A outra principal fonte de ácidos graxos de cadeia longa é a síntese (**lipogênese**), a partir de carboidratos, no tecido adiposo e no fígado (ver Capítulo 23).

O triacilglicerol no tecido adiposo representa a principal reserva de substrato energético do organismo. Ele é hidrolisado (**lipólise**), e o glicerol e os ácidos graxos livres são liberados na circulação. O glicerol é um substrato para a gliconeogênese (ver Capítulo 19). Os ácidos graxos são transportados ligados à albumina sérica; são captados pela maioria dos tecidos (mas não pelo encéfalo nem pelas hemácias) e esterificados a triacilgliceróis para serem armazenados ou oxidados como substratos energéticos. No fígado, o triacilglicerol recém-sintetizado e o triacilglicerol dos remanescentes de quilomícrons (ver Figura 25-3) são secretados na circulação na **lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)**. Esse triacilglicerol

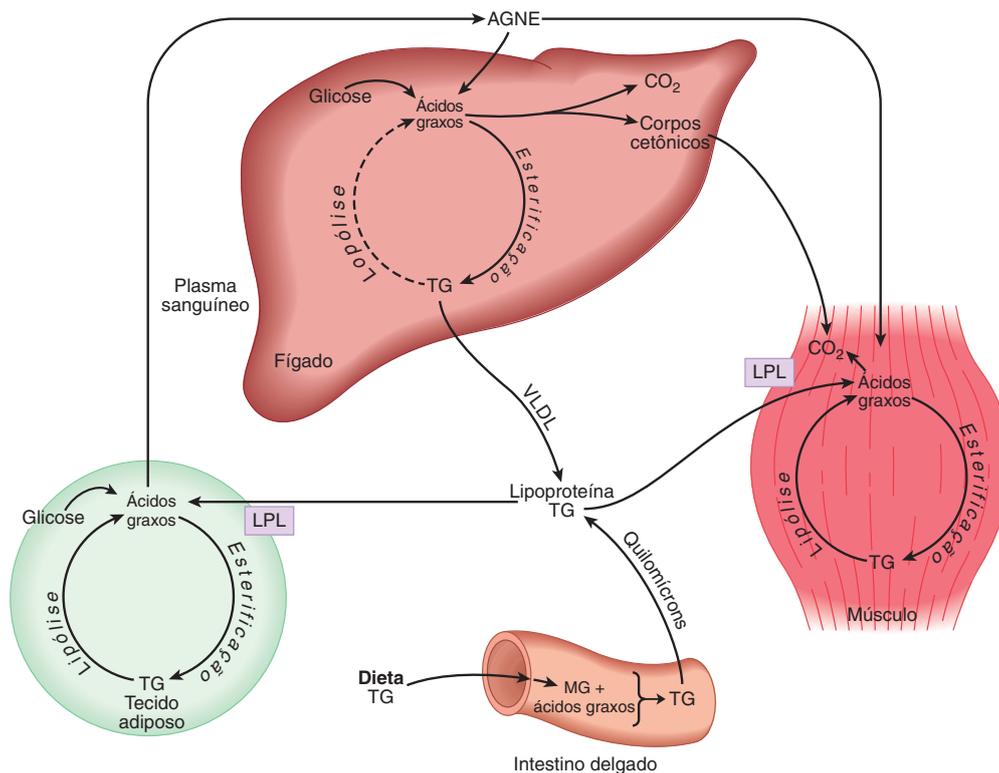


FIGURA 14-6 Transporte e destino dos principais substratos e metabólitos dos lipídeos. (LPL, lipase lipoproteica; MG, monoacilglicerol; AGNE, ácidos graxos não esterificados; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.)

tem um destino semelhante ao dos quilomícrons. A oxidação parcial de ácidos graxos no fígado leva à produção de **corpos cetônicos** (cetogênese; Capítulo 22). Os corpos cetônicos são exportados para os tecidos extra-hepáticos, onde fornecem energia durante o jejum prolongado e a inanição.

Em nível subcelular, a glicólise ocorre no citosol, e o ciclo do ácido cítrico, nas mitocôndrias

A compartimentalização das vias em compartimentos subcelulares separados ou organelas possibilita a integração e a regulação do metabolismo. Nem todas as vias têm igual importância em todas as células. A **Figura 14-7** ilustra a comparti-

mentalização subcelular das vias metabólicas em uma célula do parênquima hepático.

O papel central da **mitocôndria** é imediatamente evidente, visto que ela atua como foco do metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos. Ela contém as enzimas do ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16), da β -oxidação dos ácidos graxos e da cetogênese (ver Capítulo 22), assim como as da cadeia respiratória e a ATP-sintase (ver Capítulo 13).

A glicólise (ver Capítulo 17), a via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20) e a síntese dos ácidos graxos (ver Capítulo 23) ocorrem no citosol. Na gliconeogênese (ver Capítulo 19), substratos como o lactato e o piruvato, que são formados no citosol, entram na mitocôndria para produzir **oxalacetato** como precursor para a síntese de glicose no citosol.

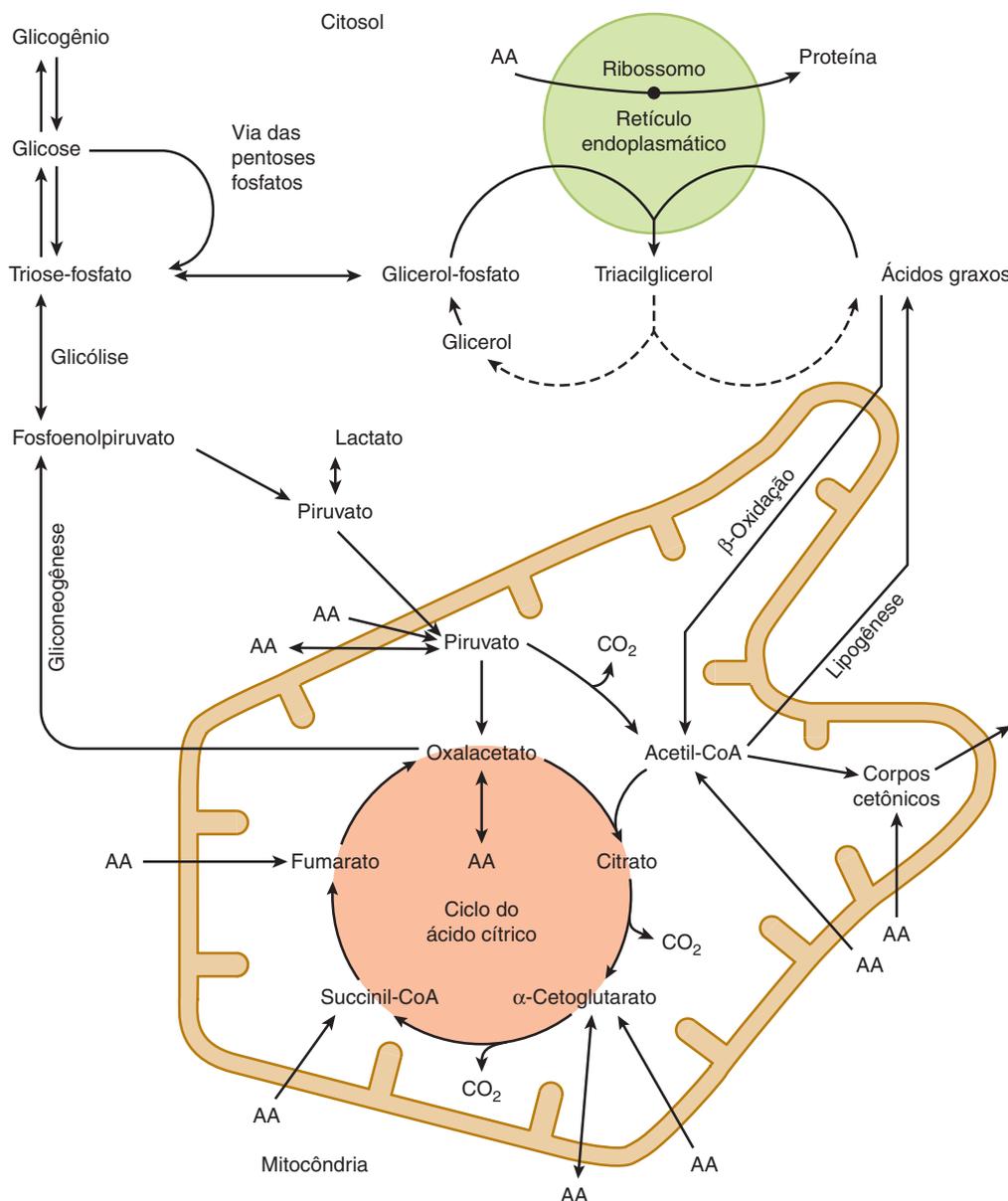


FIGURA 14-7 Localização intracelular e visão geral das principais vias metabólicas em uma célula do parênquima hepático. (AA →, metabolismo de um ou mais aminoácidos essenciais; AA ↔, metabolismo de um ou mais aminoácidos não essenciais.)

As membranas do **retículo endoplasmático** contêm o sistema enzimático para a **síntese de triacilgliceróis** (ver Capítulo 24), e os **ribossomos** são responsáveis pela **síntese proteica** (ver Capítulo 37).

O FLUXO DE METABÓLITOS PELAS VIAS METABÓLICAS DEVE SER REGULADO DE FORMA COORDENADA

A regulação do fluxo global por uma via é importante para assegurar um suprimento apropriado dos produtos dessa via. Ela é obtida pelo controle de uma ou mais reações essenciais da via catalisadas por **enzimas reguladoras**. Os fatores físico-químicos que controlam a velocidade de uma reação catalisada por enzima, como a concentração de substrato, são muito importantes para o controle da velocidade global de uma via metabólica (ver Capítulo 9).

As reações fora do equilíbrio constituem potenciais pontos de controle

Em uma reação em equilíbrio, as reações direta e inversa ocorrem em velocidades iguais, e, portanto, não existe nenhum fluxo efetivo em qualquer direção.



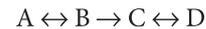
Em condições de “equilíbrio dinâmico” *in vivo*, existe um fluxo efetivo da esquerda para a direita, pois ocorre um suprimento contínuo de A e a remoção de D. Na prática, existem normalmente uma ou mais reações que **não estão em equilíbrio** em uma via metabólica, em que os reagentes estão presentes em concentrações que estão longe do equilíbrio. Na tentativa de alcançar o equilíbrio, ocorrem grandes perdas de energia livre, tornando esse tipo de reação essencialmente irreversível. Essa via apresenta fluxo e direção. As enzimas que catalisam as reações fora do equilíbrio estão geralmente presentes em baixas concentrações e sujeitas a uma variedade de mecanismos reguladores. Entretanto, a maioria das reações nas vias metabólicas não pode ser classificada como em equilíbrio ou fora de equilíbrio, situando-se em algum ponto entre esses dois extremos.

A reação de geração de fluxo é a primeira reação em uma via saturada com substrato

A reação de geração de fluxo pode ser identificada como uma reação que não está em equilíbrio em que o K_m da enzima é consideravelmente menor do que a concentração normal do substrato. A primeira reação na glicólise, que é catalisada pela hexocinase (ver Figura 17-2), é uma etapa de geração de fluxo, visto que o valor de K_m para a glicose, de 0,05 mmol/L, é bem inferior ao nível normal de glicemia, de 3 a 5 mmol/L. As reações posteriores controlam a velocidade de fluxo pela via.

OS MECANISMOS ALOSTÉRICOS E HORMONAIIS SÃO IMPORTANTES NO CONTROLE METABÓLICO DAS REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS

Na via metabólica mostrada na **Figura 14-8**,



as reações $A \leftrightarrow B$ e $C \leftrightarrow D$ são reações em equilíbrio e $B \rightarrow C$ é uma reação fora do equilíbrio. O fluxo por esse tipo de via pode ser regulado pela disponibilidade do substrato A. Isso depende de seu suprimento a partir do sangue, o qual, por sua vez, depende da ingestão de alimento ou de reações fundamentais que liberam substratos das reservas teciduais na corrente sanguínea – por exemplo, a glicogênio-fosforilase no fígado (ver Figura 18-1) e a lipase sensível a hormônio no tecido adiposo (ver Figura 25-8). Isso também depende do transporte do substrato A para dentro da célula. Os músculos e o tecido adiposo captam glicose da corrente sanguínea apenas em resposta ao hormônio insulina.

O fluxo também é determinado pela remoção do produto final D e pela disponibilidade de cossubstratos ou cofatores representados por X e Y. As enzimas que catalisam reações que não estão em equilíbrio são, com frequência, proteínas alostéricas sujeitas às ações rápidas de controle por “retroalimentação” ou “alimentação anterógrada” pelos **modificadores alostéricos** em resposta imediata às necessidades da célula (ver Capítulo 9). Com frequência, o produto final de uma via de biossíntese inibe a enzima que catalisa a primeira reação da via. Outros mecanismos de controle dependem da ação dos **hormônios** que respondem às necessidades do organismo como um todo; eles podem atuar rapidamente ao modificar a atividade das moléculas existentes de enzimas, ou lentamente ao alterar a velocidade de síntese das moléculas de enzimas (ver Capítulo 42).

MUITOS COMBUSTÍVEIS METABÓLICOS SÃO INTERCONVERSÍVEIS

Os carboidratos em quantidades acima das necessárias para o metabolismo e para a produção imediata de energia e a formação das reservas de glicogênio no músculo e no fígado podem ser prontamente utilizados para a síntese de ácidos graxos e, portanto, de triacilglicerol, tanto no tecido adiposo quanto no fígado (a partir do qual é exportado em lipoproteínas de densidade muito baixa). A importância da lipogênese em seres humanos não está clara; em países ocidentais, a gordura da dieta fornece 35 a 45% da energia consumida, ao passo que, em países menos desenvolvidos, onde os carboidratos podem prover 60 a 75% da energia consumida, a ingestão total de alimentos é tão baixa que há pouco excedente para a lipogênese. Uma alta ingestão de gordura inibe a lipogênese no tecido adiposo e no fígado.

Os ácidos graxos (e os corpos cetônicos formados a partir deles) não podem ser utilizados para a síntese de glicose.

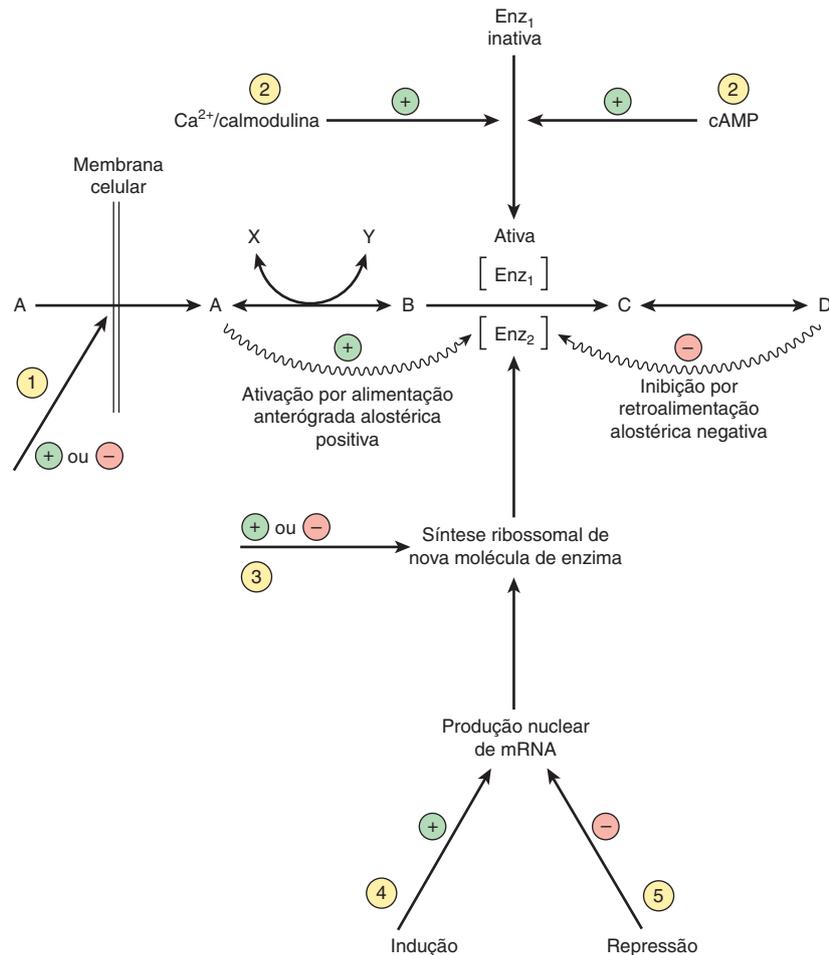


FIGURA 14-8 Mecanismos de controle de uma reação catalisada por enzima. Os números dentro de círculos indicam os possíveis locais de ação de hormônios: ① alteração da permeabilidade de membrana; ② conversão de uma enzima inativa em ativa, geralmente envolvendo reações de fosforilação/desfosforilação; ③ alteração da taxa de tradução do mRNA em nível ribossomal; ④ indução da formação de novos mRNAs; e ⑤ repressão da formação de mRNA. ① e ② são rápidos, ao passo que ③, ④ e ⑤ são mecanismos mais lentos de regulação.

A reação da piruvato-desidrogenase, que forma acetil-CoA, é irreversível, e, para cada unidade de dois carbonos da acetil-CoA que entra no ciclo do ácido cítrico, há perda de dois átomos de carbono na forma de dióxido de carbono antes que o oxalacetato seja novamente formado. Isso significa que a acetil-CoA (e, portanto, qualquer substrato que a produza) nunca pode ser utilizada na gliconeogênese. Os ácidos graxos (relativamente raros) com número ímpar de átomos de carbono produzem propionil-CoA como produto do ciclo final da β -oxidação, podendo ser um substrato para a gliconeogênese, assim como o glicerol liberado pela lipólise das reservas de triacilgliceróis do tecido adiposo.

A maior parte dos aminoácidos em quantidades acima das necessárias para a síntese de proteínas (que provêm da alimentação ou do *turnover* proteico teciduais) produz piruvato ou intermediários de quatro e cinco carbonos do ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 29). O piruvato pode ser carboxilado a oxalacetato, que constitui o principal substrato para a gliconeogênese, e os outros intermediários do ciclo também resultam em um aumento efetivo na formação de oxalacetato, que, em seguida, torna-se disponível para a gliconeogênese. Esses aminoácidos são classificados como **glicogênicos**. Dois

aminoácidos (lisina e leucina) produzem apenas acetil-CoA na oxidação e, assim, não podem ser utilizados para a gliconeogênese, ao passo que outros quatro (fenilalanina, tirosina, triptofano e isoleucina) dão origem à acetil-CoA e aos intermediários que podem ser usados na gliconeogênese. Esses aminoácidos que dão origem à acetil-CoA são designados como **cetogênicos**, visto que, durante o jejum prolongado e a inanição, grande parte da acetil-CoA é utilizada para a síntese de corpos cetônicos no fígado.

UM SUPRIMENTO DE COMBUSTÍVEIS METABÓLICOS É FORNECIDO NOS ESTADOS ALIMENTADO E DE JEJUM

A glicose é sempre necessária para o sistema nervoso central e para as hemácias

As hemácias carecem de mitocôndrias e, portanto, dependem exclusivamente da glicólise (anaeróbia) e da via das pentoses-

-fosfato. O encéfalo pode metabolizar corpos cetônicos para suprir cerca de 20% de suas necessidades energéticas; o restante deve ser fornecido pela glicose. As variações metabólicas que ocorrem nos estados de jejum e de inanição servem para preservar a glicose e as limitadas reservas de glicogênio corporal para o uso pelo encéfalo e pelas hemácias, e para fornecer combustíveis metabólicos alternativos para outros tecidos. Durante a gestação, o feto necessita de uma quantidade significativa de glicose, assim como a síntese de lactose na lactação (Figura 14-9).

No estado alimentado, ocorre acúmulo de reservas de combustíveis metabólicos

Durante várias horas após uma refeição, enquanto os produtos da digestão estão sendo absorvidos, ocorre um suprimento abundante de combustíveis metabólicos. Nessas condições, a glicose constitui a principal fonte de energia para a oxidação na maioria dos tecidos; isso é observado na forma de aumento do quociente respiratório (a razão entre dióxido de carbono produzido e oxigênio consumido) de cerca de 0,8 no estado de jejum para quase 1 (Tabela 14-1).

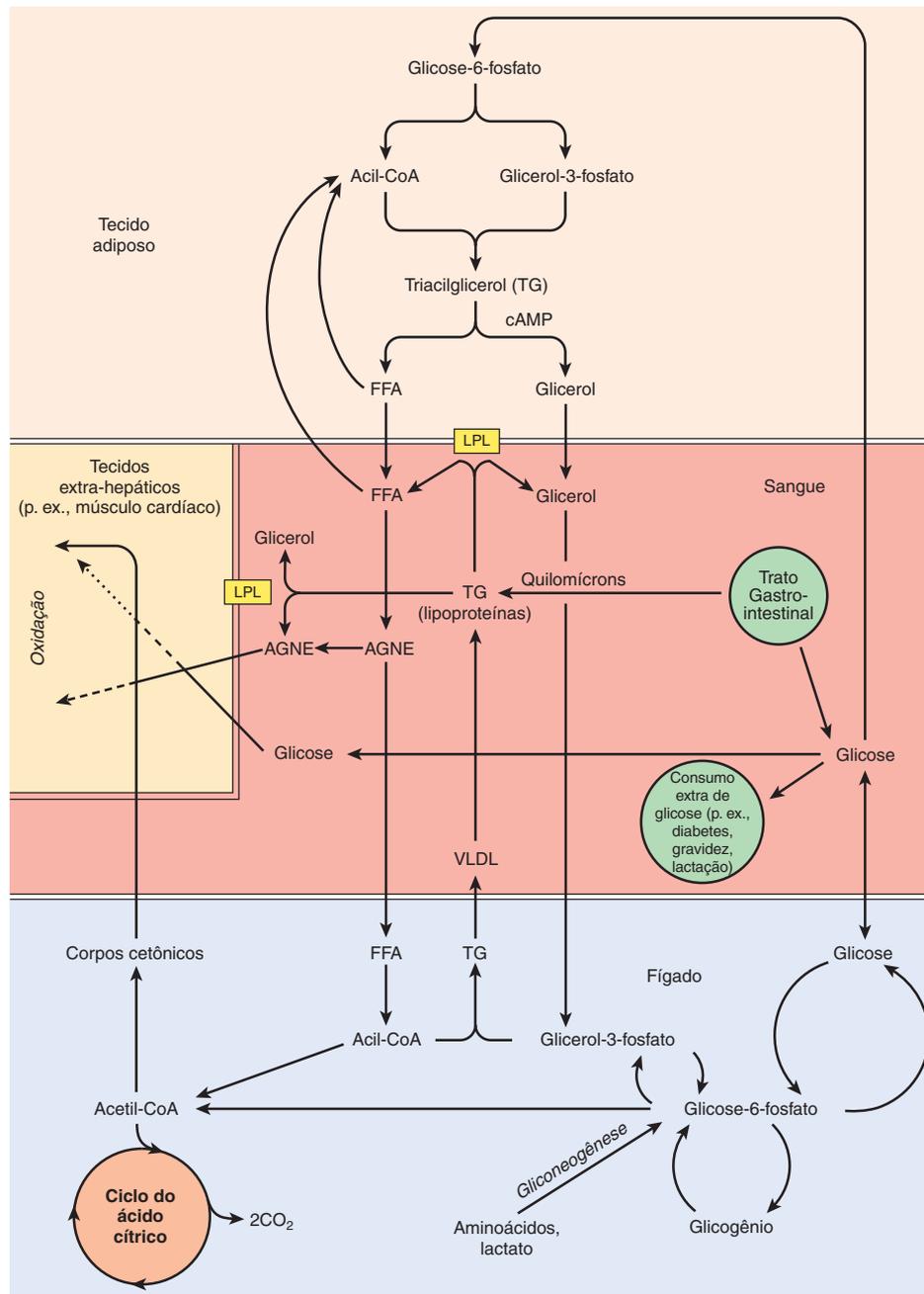


FIGURA 14-9 Inter-relações metabólicas entre o tecido adiposo, o fígado e os tecidos extra-hepáticos. Em tecidos como o coração, os combustíveis metabólicos são oxidados na seguinte ordem de preferência: corpos cetônicos > ácidos graxos > glicose. (LPL, lipase lipoproteica; AGNE, ácidos graxos não esterificados; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa.)

TABELA 14-1 Produção de energia, consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono na oxidação de substratos energéticos metabólicos

	Produção de energia (kJ/g)	O ₂ consumido (L/g)	CO ₂ produzido (L/g)	Quociente respiratório (CO ₂ produzido/O ₂ consumido)	Energia (kJ)/L O ₂
Carboidratos	16	0,829	0,829	1,00	~20
Proteínas	17	0,966	0,782	0,81	~20
Lipídeos	37	2,016	1,427	0,71	~20
Álcool	29	1,429	0,966	0,66	~20

A captação de glicose no músculo e no tecido adiposo é controlada pela **insulina**, que é secretada pelas células β das ilhotas do pâncreas em resposta a uma concentração aumentada de glicose no sangue portal. No estado de jejum, o transportador de glicose do músculo e do tecido adiposo (GLUT-4) encontra-se em vesículas intracelulares. Uma resposta inicial à insulina consiste na migração dessas vesículas para a superfície celular, onde se fundem com a membrana plasmática, expondo os transportadores ativos de glicose. Esses tecidos sensíveis à insulina captam glicose da corrente sanguínea em qualquer grau significativo apenas na presença do hormônio. À medida que a secreção de insulina diminui no estado de jejum, os receptores são novamente internalizados, reduzindo a captação de glicose. Todavia, no músculo esquelético, o aumento na concentração citoplasmática de íons cálcio, em resposta à estimulação nervosa, provoca a migração das vesículas para a superfície celular e a exposição dos transportadores ativos de glicose, independentemente da presença ou da ausência de estimulação significativa da insulina.

A captação de glicose no fígado é independente da insulina, porém o fígado possui uma isoenzima da hexocinase (glicocinase) com alto valor de K_m , de modo que, à medida que a concentração de glicose que entra no fígado aumenta, também ocorre aumento com a velocidade de síntese de glicose-6-fosfato. Isso representa um excesso em relação à demanda hepática para o metabolismo de produção de energia e é usado principalmente na síntese de **glicogênio**. Tanto no fígado quanto no músculo esquelético, a insulina atua para estimular a glicogênio-sintase e inibir a glicogênio-fosforilase. Parte da glicose adicional que entra no fígado também pode ser utilizada para a lipogênese e, portanto, para a síntese de triacilglicerol. No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose, sua conversão em ácidos graxos e sua esterificação a triacilglicerol. Ela inibe a lipólise intracelular e a liberação de ácidos graxos não esterificados.

Os produtos da digestão dos lipídeos entram na circulação como **quilomícrons**, a maior das lipoproteínas plasmáticas, particularmente ricas em triacilglicerol (ver Capítulo 25).

No tecido adiposo e no músculo esquelético, a lipase lipoproteica extracelular é sintetizada e ativada em resposta à insulina; os ácidos graxos não esterificados resultantes são captados, em grande parte, pelo tecido e utilizados para a síntese de triacilglicerol, ao passo que o glicerol permanece na corrente sanguínea e é captado pelo fígado e utilizado para a gliconeogênese e para a síntese de glicogênio ou lipogênese. Os ácidos graxos que permanecem na corrente sanguínea são captados pelo fígado e reesterificados. Os remanescentes de quilomícrons com menor quantidade de lipídeos são depurados pelo fígado, e o triacilglicerol remanescente é exportado, com aquele sintetizado no fígado, na **lipoproteína de densidade muito baixa**.

Em condições normais, a velocidade do catabolismo proteico tecidual é mais ou menos constante durante o dia; a velocidade aumentada do catabolismo proteico ocorre apenas na **caquexia** associada ao câncer avançado e a outras doenças. Existe um catabolismo proteico líquido no estado de jejum, quando a taxa de síntese de proteínas cai, e uma síntese líquida de proteínas no estado alimentado, quando a taxa de síntese aumenta em 20 a 25%. A velocidade aumentada da síntese proteica em resposta à maior disponibilidade de aminoácidos e combustível metabólico representa, novamente, uma resposta à ação da insulina. A síntese proteica é um processo que consome energia; pode ser responsável por até 20% do gasto energético em repouso após uma refeição, mas por apenas 9% no estado de jejum.

As reservas de combustíveis metabólicos são mobilizadas no estado de jejum

Observa-se uma pequena queda da glicose plasmática no estado de jejum e também pouca alteração à medida que o jejum se prolonga até o estado de inanição. Os ácidos graxos livres plasmáticos aumentam durante o jejum; todavia, em seguida, ocorre pouca elevação adicional de ácidos graxos plasmáticos na inanição. Quando o jejum é prolongado, a concentração plasmática de corpos cetônicos (acetacetato e 3-hidroxibutirato) aumenta acentuadamente (**Tabela 14-2, Figura 14-10**).

TABELA 14-2 Concentração plasmática de substratos energéticos metabólicos (mmol/L) nos estados alimentado e de jejum

	Alimentado	40 h de jejum	7 Dias de inanição
Glicose	5,5	3,6	3,5
Ácidos graxos não esterificados	0,30	1,15	1,19
Corpos cetônicos	Quantidade desprezível	2,9	4,5

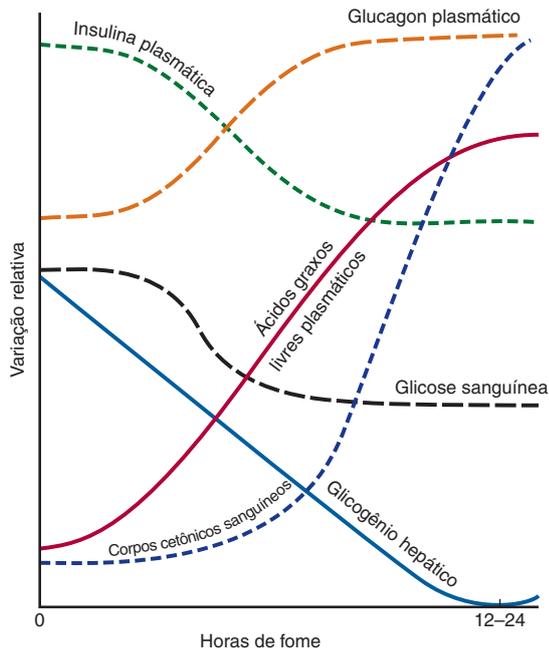


FIGURA 14-10 Variações relativas em hormônios plasmáticos e combustíveis metabólicos durante o início da inanição.

No estado de jejum, à medida que a concentração de glicose no sangue portal vindo do intestino delgado cai, a secreção de insulina diminui, e o músculo esquelético e o tecido adiposo captam menos glicose. O aumento na secreção de **glucagon** pelas células α do pâncreas inibe a glicogênio-sintase e ativa a glicogênio-fosforilase no fígado. A glicose-6-fosfato é hidrolisada pela glicose-6-fosfatase, e glicose é liberada na corrente sanguínea para o uso pelo encéfalo e pelas hemácias.

O glicogênio muscular não pode contribuir diretamente para a glicose plasmática, uma vez que os músculos carecem da enzima glicose-6-fosfatase e o principal uso do glicogênio muscular é fornecer uma fonte de glicose-6-fosfato para o metabolismo energético do próprio músculo. Todavia, a acetil-CoA formada pela oxidação dos ácidos graxos no músculo inibe a piruvato-desidrogenase, levando a um acúmulo de piruvato. A maior parte desse piruvato sofre transaminação em alanina, à custa dos aminoácidos que provêm da degradação da proteína muscular. A alanina e grande parte dos cetoadácidos resultantes dessa transaminação são exportados do músculo e captados pelo fígado, onde a alanina é transaminada para gerar piruvato. Os aminoácidos resultantes são, em grande parte, exportados de volta para o músculo, a fim de fornecer grupamentos amino para a formação de mais alanina, ao passo que o piruvato é um importante substrato para a gliconeogênese no fígado.

No tecido adiposo, a diminuição da insulina e o aumento do glucagon resultam em inibição da lipogênese, inativação e internalização da lipase lipoproteica e ativação da lipase sensível a hormônio intracelular (ver Capítulo 25). Isso leva à liberação, pelo tecido adiposo, de quantidades aumentadas de glicerol (que é um substrato para a gliconeogênese no fígado) e de ácidos graxos livres, que são utilizados pelo fígado, pelo coração e pelo músculo esquelético como seus substratos energéticos metabólicos preferidos, poupando, assim, a glicose.

Apesar de o músculo captar e metabolizar, preferencialmente, ácidos graxos livres no estado de jejum, esse tecido não pode suprir todas as necessidades energéticas pela β -oxidação. Em contrapartida, o fígado apresenta maior capacidade de β -oxidação do que a necessária para satisfazer as suas próprias necessidades energéticas e, à medida que o jejum se torna mais prolongado, o fígado forma mais acetil-CoA do que pode ser oxidada. Essa acetil-CoA é utilizada na síntese de **corpos cetônicos** (ver Capítulo 22), que constituem os principais combustíveis metabólicos para os músculos esquelético e cardíaco, podendo suprir até 20% das necessidades energéticas do encéfalo. Na inanição prolongada, a glicose pode representar menos de 10% do metabolismo produtor de energia de todo o organismo.

Se não houvesse nenhuma outra fonte de glicose, o glicogênio hepático e muscular estaria esgotado após cerca de 18 horas de jejum. À medida que o jejum se torna mais prolongado, uma quantidade crescente dos aminoácidos liberados em consequência do catabolismo das proteínas é utilizada no fígado e nos rins para a gliconeogênese (Tabela 14-3).

ASPECTOS CLÍNICOS

Na inanição prolongada, quando ocorre depleção das reservas do tecido adiposo, observa-se considerável aumento na velocidade efetiva de catabolismo das proteínas para fornecer aminoácidos, não apenas como substratos para a gliconeogênese, mas também como principal combustível metabólico de todos os tecidos. Ocorre morte quando as proteínas teciduais essenciais são catabolizadas e não são substituídas. Em pacientes com **caquexia** resultante da liberação de **citocinas** em resposta a tumores e patologias, há aumento na taxa no catabolismo de proteínas teciduais, assim como aumento considerável da taxa metabólica, logo, eles apresentam um estado de inanição avançado. Mais uma vez, ocorre morte quando as proteínas teciduais essenciais são catabolizadas e não são substituídas.

A alta demanda de glicose pelo feto e da síntese de lactose na lactação pode levar ao desenvolvimento de cetose. Ela pode se manifestar como cetose discreta com hipoglicemia nos seres humanos; nas vacas em lactação e nas ovelhas em gestação gemelar, podem ocorrer cetose muito pronunciada e hipoglicemia profunda.

No **diabetes melito** tipo 1 fracamente controlado, os pacientes podem tornar-se hiperglicêmicos como resultado da falta de insulina para estimular a captação e a utilização de glicose, e, devido à ausência de insulina para antagonizar as ações do glucagon, a gliconeogênese a partir de aminoácidos no fígado está aumentada. Ao mesmo tempo, a falta de insulina para antagonizar as ações do glucagon resulta em aumento da lipólise no tecido adiposo, e os ácidos graxos não esterificados resultantes são substratos para a cetogênese no fígado.

A utilização desses corpos cetônicos no músculo (e em outros tecidos) pode estar comprometida devido à falta de oxalacetato (todos os tecidos requerem algum metabolismo da glicose para manter uma quantidade adequada de oxalacetato para a atividade do ciclo do ácido cítrico). No diabetes não controlado, a cetose pode ser grave o suficiente para resultar em acidose pronunciada (**cetoacidose**); o acetacetato e

TABELA 14-3 Resumo das principais características metabólicas dos principais órgãos

Órgão	Principais vias	Principais substratos	Principais produtos exportados	Enzimas especializadas
Fígado	Glicólise, gliconeogênese, lipogênese, β -oxidação, ciclo do ácido cítrico, cetogênese, metabolismo das lipoproteínas, metabolismo de fármacos, síntese de sais biliares, ureia, ácido úrico, colesterol, proteínas plasmáticas	Ácidos graxos livres, glicose (no estado alimentado), lactato, glicerol, frutose, aminoácidos, álcool	Glicose, triacilglicerol em VLDL ^a , corpos cetônicos, ureia, ácido úrico, sais biliares, colesterol, proteínas plasmáticas	Glicocinase, glicose-6-fosfatase, glicerol-cinase, fosfoenolpiruvato-carboxicinase, frutocinase, arginase, HMG-CoA-sintase, HMG-CoA-liase, álcool-desidrogenase
Encéfalo	Glicólise, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de aminoácidos, síntese de neurotransmissores	Glicose, aminoácidos, corpos cetônicos na inanição prolongada	Lactato, produtos finais do metabolismo dos neurotransmissores	Enzimas para a síntese e para o catabolismo dos neurotransmissores
Coração	β -Oxidação e ciclo do ácido cítrico	Corpos cetônicos, ácidos graxos livres, lactato, quilomícrons e triacilglicerol das VLDL, alguma glicose	–	Lipase lipoproteica, cadeia de transporte de elétrons muito ativa
Tecido adiposo	Lipogênese, esterificação de ácidos graxos, lipólise (no jejum)	Glicose, quilomícrons e triacilglicerol das VLDL	Ácidos graxos não esterificados, glicerol	Lipase lipoproteica, lipase sensível a hormônio, enzimas da via das pentoses-fosfato
Contração muscular rápida	Glicólise	Glicose, glicogênio	Lactato (alanina e cetoácidos em jejum)	–
Contração muscular lenta	β -Oxidação e ciclo do ácido cítrico	Corpos cetônicos, quilomícrons e triacilglicerol das VLDL	–	Lipase lipoproteica, cadeia de transporte de elétrons muito ativa
Rins	Gliconeogênese	Ácidos graxos não esterificados, lactato, glicerol, glicose	Glicose	Glicerol-cinase, fosfoenolpiruvato-carboxicinase
Hemácias	Glicólise anaeróbia, via das pentoses fosfatos	Glicose	Lactato	Hemoglobina, enzimas da via das pentoses-fosfato

^aVLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

o 3-hidroxibutirato são ácidos relativamente fortes. O coma resulta tanto da acidose quanto da osmolalidade consideravelmente aumentada do líquido extracelular (principalmente em consequência da hiperglicemia e da diurese devida à excreção de glicose e corpos cetônicos na urina).

RESUMO

- Os produtos da digestão fornecem aos tecidos as unidades básicas de construção para a biossíntese de moléculas complexas, bem como os combustíveis para os processos metabólicos.
- Quase todos os produtos da digestão de carboidratos, lipídeos e proteínas são metabolizados a um metabólito comum, a acetil-CoA, antes da oxidação a CO₂ no ciclo do ácido cítrico.
- A acetil-CoA também é o precursor para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, esteroides (incluindo o colesterol) e corpos cetônicos.
- A glicose fornece os esqueletos de carbono para o glicerol dos triacilgliceróis e para os aminoácidos não essenciais.
- Os produtos hidrossolúveis da digestão são transportados diretamente até o fígado pela veia porta do fígado. O fígado regula a concentração de glicose e aminoácidos disponíveis para outros tecidos. Os lipídeos e os produtos lipossolúveis da digestão en-

tram na corrente sanguínea a partir do sistema linfático, e o fígado procede à depuração dos remanescentes após a captação dos ácidos graxos pelos tecidos extra-hepáticos.

- As vias são compartimentalizadas dentro da célula. A glicólise, a glicogênese, a glicogenólise, a via das pentoses-fosfato e a lipogênese ocorrem no citosol. As mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo do ácido cítrico e da β -oxidação de ácidos graxos, assim como a cadeia respiratória e a ATP-sintase. As membranas do retículo endoplasmático contêm as enzimas para vários outros processos, incluindo a síntese de triacilglicerol e o metabolismo de fármacos.
- As vias metabólicas são reguladas por mecanismos rápidos que afetam a atividade das enzimas existentes, isto é, pela modificação alostérica e covalente (frequentemente em resposta à ação hormonal), bem como por mecanismos lentos que afetam a síntese das enzimas.
- Os carboidratos e os aminoácidos da dieta, quando presentes em quantidades além das necessárias, podem ser usados para a síntese de ácidos graxos e, portanto, de triacilgliceróis.
- No jejum e na inanição, a glicose deve ser fornecida ao encéfalo e às hemácias; no estado inicial de jejum, essa glicose é suprida pelas reservas de glicogênio. Para poupar a glicose, o músculo e outros tecidos não captam a glicose quando a secreção de insulina está baixa; eles utilizam ácidos graxos (e, posteriormente, corpos cetônicos) como seus substratos energéticos preferidos.

- O tecido adiposo libera ácidos graxos não esterificados no estado de jejum. No jejum prolongado e na inanição, eles são usados pelo fígado para a síntese de corpos cetônicos, que são exportados para fornecer o principal substrato energético ao músculo.
- A maioria dos aminoácidos, que se originam da alimentação ou do *turnover* das proteínas teciduais, pode ser utilizada para a gliconeogênese, assim como o glicerol dos triacilgliceróis.
- Nem os ácidos graxos, provenientes da alimentação ou da lipólise do triacilglicerol do tecido adiposo, nem os corpos cetônicos, formados a partir de ácidos graxos no estado de jejum, podem fornecer substratos para a gliconeogênese.

REFERÊNCIAS

- Bender DA: *Introduction to Nutrition and Metabolism*, 5th ed. CRC Press, 2014.
- Brosnan JT: Comments on the metabolic needs for glucose and the role of gluconeogenesis. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:S107–S111.
- Frayn KN: Integration of substrate flow in vivo: some insights into metabolic control. *Clin Nutr* 1997;16:277–282.
- Frayn KN: *Metabolic Regulation: A Human Perspective*, 3rd ed. Wiley-Blackwell, 2010.
- Zierler K: Whole body metabolism of glucose. *Am J Physiol* 1999;276:E409–E426.

Carboidratos de importância fisiológica

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar o significado de glicoma, de glicobiologia e da ciência da glicômica.
- Explicar o significado dos termos monossacarídeo, dissacarídeo, oligossacarídeo e polissacarídeo.
- Ilustrar as diferentes maneiras pelas quais as estruturas da glicose e de outros monossacarídeos podem ser representadas e descrever os diversos tipos de isomerismo dos glicídeos e as estruturas anelares piranose e furanose.
- Descrever a formação dos glicosídeos e as estruturas de dissacarídeos e polissacarídeos importantes.
- Explicar o significado do índice glicêmico de um carboidrato.
- Descrever os papéis dos carboidratos nas membranas celulares e nas lipoproteínas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os carboidratos estão amplamente distribuídos nos vegetais e nos animais; eles possuem papéis estruturais e metabólicos importantes. Nos vegetais, a glicose é sintetizada a partir do dióxido de carbono e da água por fotossíntese e é armazenada como amido ou utilizada para sintetizar a celulose das paredes celulares dos vegetais. Os animais podem sintetizar carboidratos a partir de aminoácidos, porém a maior parte deriva, por fim, dos vegetais. A **glicose** é o carboidrato mais importante; a maior parte dos carboidratos na dieta é absorvida para a corrente sanguínea à medida que a glicose é formada pela hidrólise do amido e dos dissacarídeos da dieta, sendo que outros glicídeos são convertidos em glicose no fígado. A glicose é o principal combustível metabólico dos mamíferos (exceto dos ruminantes) e é o combustível universal do feto. Ela é a precursora para a síntese de todos os outros carboidratos no organismo, inclusive o **glicogênio** para armazenamento; **ribose** e **desoxirribose** para os ácidos nucleicos; **galactose** para a síntese de lactose do leite, dos glicolipídeos e em combinação com a proteína nas glicoproteínas (ver Capítulo 46) e nas proteoglicanas. As doenças associadas ao metabolismo dos carboidratos incluem **diabetes melito**, **galactosemia**, **doenças de armazenamento de glicogênio** e **intolerância à lactose**.

A **glicobiologia** é o estudo das funções que os açúcares desempenham na saúde e na doença. O **glicoma** é o conteúdo completo de açúcares de um organismo, livres ou presentes em moléculas mais complexas. A **glicômica**, termo análogo à

genômica e à proteômica, refere-se ao estudo abrangente dos glicomas, incluindo os aspectos genéticos, fisiológicos, patológicos e outros.

Uma quantidade muito grande de ligações glicosídicas pode ser formada entre açúcares. Por exemplo, três hexoses diferentes podem ligar-se entre si para formar mais de mil trissacarídeos diferentes. As conformações dos açúcares nas cadeias oligossacarídicas variam, dependendo de suas ligações e das proximidades de outras moléculas com as quais os oligossacarídeos podem interagir. As cadeias oligossacarídicas codificam **informação biológica**, e isso depende de seus açúcares constituintes, de sua sequência e de suas ligações.

OS CARBOIDRATOS SÃO DERIVADOS DE ALDEÍDOS OU DE CETONAS DE ALCOÓIS POLI-HÍDRICOS

Os carboidratos são classificados da seguinte maneira:

1. **Monossacarídeos** são os açúcares que não podem ser hidrolisados em carboidratos mais simples. Eles podem ser classificados como **trioses**, **tetroses**, **pentoses**, **hexoses** ou **heptoses**, dependendo do número de átomos de carbono (3-7), e como **aldoses** ou **cetoses**, dependendo de possuírem o grupamento aldeído ou cetona. Os exemplos estão listados na **Tabela 15-1**. Além dos aldeídos e das cetonas, os alcoóis poli-hídricos (alcoóis de açúcar ou **polióis**), nos quais o

TABELA 15-1 Classificação de açúcares importantes

	Aldoses	Cetoses
Trioses (C ₃ H ₆ O ₃)	Glicose (gliceraldeído)	Di-hidroxiacetona
Tetroses (C ₄ H ₈ O ₄)	Eritrose	Eritrulose
Pentoses (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Ribose	Ribulose
Hexoses (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Glicose	Frutose
Heptoses (C ₇ H ₁₄ O ₇)	–	Sedo-heptulose

grupamento aldeído ou cetona foi reduzido a um grupamento álcool, também ocorrem naturalmente nos alimentos. Eles são sintetizados por redução de monossacarídeos para uso na elaboração de alimentos para redução de peso e para diabéticos. Eles são mal absorvidos e possuem aproximadamente metade do poder energético dos glicídeos.

- Dissacarídeos** são produtos da condensação de duas unidades monossacarídicas; por exemplo, lactose, maltose, isomaltose, sacarose e trealose.
- Oligossacarídeos** são produtos da condensação de 3 a 10 monossacarídeos. A maior parte não é digerida pelas enzimas humanas.
- Polissacarídeos** são produtos da condensação de mais de 10 unidades monossacarídicas; os exemplos são os amidos e as dextrinas, que podem ser polímeros lineares ou ramificados. Os polissacarídeos são, algumas vezes, classificados em hexosanos ou pentosanos, dependendo dos monossacarídeos constituintes (hexoses ou pentoses, respectivamente). Além dos amidos e das dextrinas (que são hexosanos), os alimentos contêm uma ampla variedade de outros polissacarídeos que são coletivamente conhecidos como polissacarídeos não amídicos; eles não são digeridos por enzimas humanas e são os principais componentes das fibras dietéticas. Exemplos são a celulose da parede celular dos vegetais (um polímero de glicose; ver Figura 15-13) e a inulina, um carboidrato de armazenamento em algumas plantas (um polímero de frutose; ver Figura 15-13).

A GLICOSE É O MONOSSACARÍDEO MAIS IMPORTANTE DO PONTO DE VISTA BIOMÉDICO

A estrutura da glicose pode ser representada de três maneiras

A fórmula estrutural de cadeia aberta (aldo-hexose; **Figura 15-1A**) pode contribuir para algumas das propriedades da glicose, porém uma estrutura cíclica (um **hemiacetal** formado pela reação entre o grupamento aldeído e um grupamento hidroxila) é favorecida do ponto de vista termodinâmico e contribui para outras propriedades. A estrutura cíclica é normalmente desenhada como mostrado na **Figura 15-1B**, a projeção de Haworth, na qual a molécula é visualizada lateralmente e acima do plano do anel; as ligações mais próximas ao observador estão em negrito e mais espessas, com os grupamentos hidroxil acima ou abaixo do plano do anel. Os átomos de hidrogênio

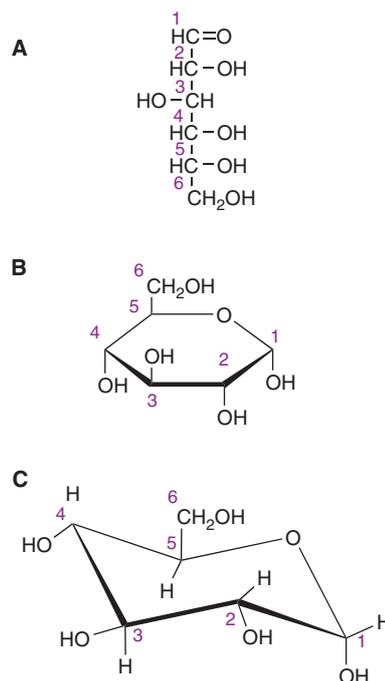


FIGURA 15-1 D-Glicose. (A) Forma em cadeia aberta. (B) α -D-Glicose; projeção de Haworth. (C) α -D-Glicose; forma de cadeira.

ligados a cada carbono não estão mostrados na figura. O anel está, na verdade, na forma de uma cadeia (**Figura 15-1C**).

Os açúcares exibem diversas formas de isomerismo

A glicose, com quatro átomos de carbono assimétrico, pode formar 16 isômeros. Os tipos mais importantes de isomerismo encontrados com a glicose são os seguintes:

- Isomerismos D e L:** a designação de um isômero glicídico como a forma D ou de sua imagem espelhada como a forma L é determinada por sua relação espacial com o composto original dos carboidratos, o açúcar de três carbonos glicose (gliceraldeído). As formas D e L desse açúcar e da glicose são mostradas na **Figura 15-2**. A orientação dos grupos —H e —OH ao redor do átomo de carbono adjacente ao carbono alcoólico terminal (carbono 5 na glicose) determina se o açúcar pertence à série D ou L. Quando o grupo —OH nesse carbono está à direita (como visto na Figura 15-2), o açúcar é o isômero D; quando ele está à esquerda, é o isômero L. A maioria dos monossacarídeos de ocorrência natural consiste em D-açúcares, e as enzimas responsáveis pelo seu metabolismo são específicas para essa configuração.
- A presença de átomos de carbono assimétricos também confere **atividade óptica** ao composto. Quando um feixe de luz polarizada atravessa uma solução de um **isômero óptico**, ele gira para a direita, dextrorrotatório (+), ou para a esquerda, levorrotatório (–). A direção da rotação da luz polarizada independe da estereoquímica do açúcar, de modo que ele pode ser designado como D(–), D(+), L(–) ou L(+). Por exemplo, a forma de ocorrência natural da

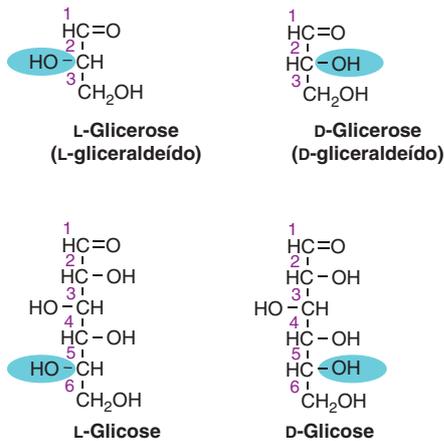


FIGURA 15-2 Isomerismos D e L de glicerose e glicose.

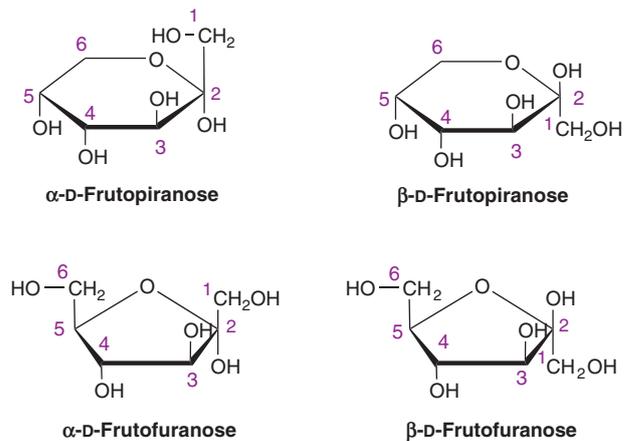


FIGURA 15-4 Formas piranose e furanose da frutose.

frutose é o isômero D(-). De forma confusa, o dextrorrotatório (+) já foi chamado de D-, e o levorrotatório (-), de L-. Essa nomenclatura é obsoleta, mas pode, às vezes, ser encontrada; ela não está relacionada ao isomerismo D- e L-. Em solução, a glicose é dextrorrotatória, e as soluções de glicose são, por vezes, conhecidas como **dextrose**.

- Estruturas anelares piranose e furanose:** as estruturas anelares dos monossacarídeos são similares às estruturas anelares do pirano (um anel com seis componentes) ou do furano (um anel com cinco componentes) (Figuras 15-3 e 15-4). Para a glicose em solução, mais de 99% estão na forma piranose.
- Anômeros alfa e beta:** a estrutura do anel de uma aldose é um hemiacetal, uma vez que ele é formado pela reação entre um aldeído e um grupamento álcool. De modo similar, a estrutura anelar de uma cetose é um hemicetal. A glicose cristalina é uma α -D-glicopiranosose. A estrutura cíclica é mantida em solução, porém o isomerismo ocorre em torno da posição 1, a carbonila ou **átomo de carbono anomérico**, para gerar uma mistura de α -glicopiranosose (38%) e β -glicopiranosose (62%). Menos de 0,3% é representado por anômeros α e β da glicofuranose.
- Epímeros:** os isômeros que diferem em consequência de variações na configuração do —OH e do —H nos átomos

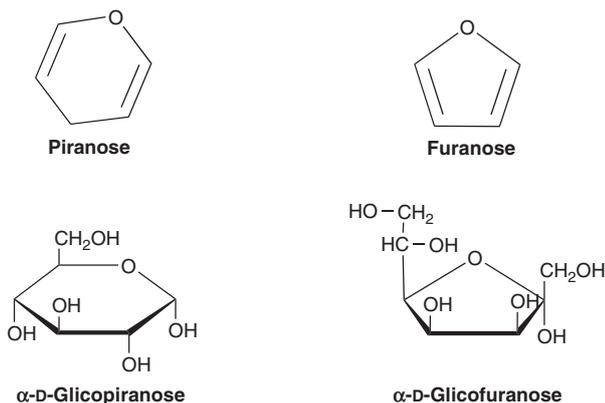


FIGURA 15-3 Formas piranose e furanose da glicose.

de carbono 2, 3 e 4 da glicose são conhecidos como epímeros. Biologicamente, os epímeros mais importantes da glicose são a manose (epimerizada no carbono 2) e a galactose (epimerizada no carbono 4) (Figura 15-5).

- Isomerismo aldose-cetose:** a frutose tem a mesma fórmula molecular da glicose, mas elas diferem quanto à existência de um potencial grupamento ceto na posição 2, o carbono anomérico da frutose, ao passo que, na glicose, há um grupo aldeído potencial na posição 1, o carbono anomérico. Exemplos de açúcares aldose e cetose estão mostrados nas Figuras 15-6 e 15-7. Do ponto de vista químico, as aldoses são compostos redutores, e são, às vezes, conhecidas como açúcares redutores. Isso é o princípio de um simples teste químico para detectar glicose na urina de pacientes com diabetes melito fracamente controlado, por meio da redução de uma solução de cobre alcalina (Capítulo 48).

Muitos monossacarídeos são fisiologicamente importantes

Os derivados das trioses, das tetoses, das pentoses e do açúcar de sete carbonos sedo-heptulose são formados como intermediários metabólicos na glicólise (ver Capítulo 17) e na via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20). As pentoses são importantes em nucleotídeos, em ácidos nucleicos e em diversas coenzimas (Tabela 15-2). Glicose, galactose, frutose e manose são, do ponto de vista fisiológico, as hexoses mais importantes (Tabela 15-3). As cetoses bioquimicamente importantes são mostradas na Figura 15-6, e as aldoses, na Figura 15-7.

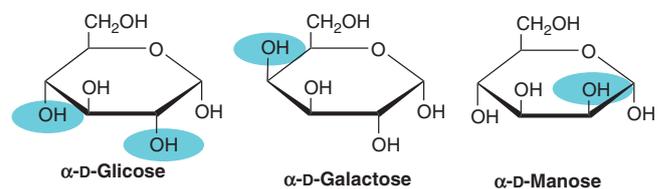


FIGURA 15-5 Epímeros da glicose.

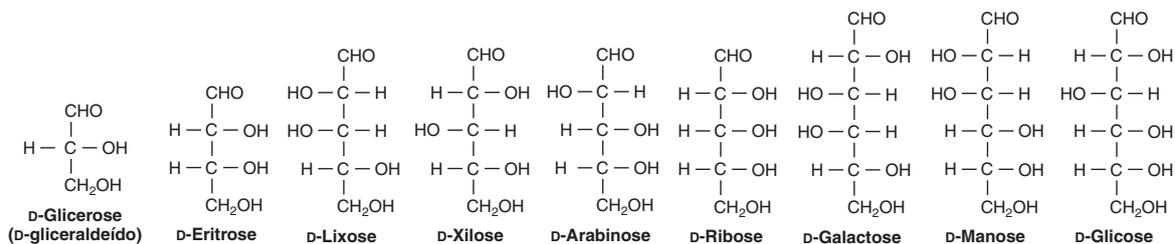


FIGURA 15-6 Exemplos de aldoses com importância fisiológica.

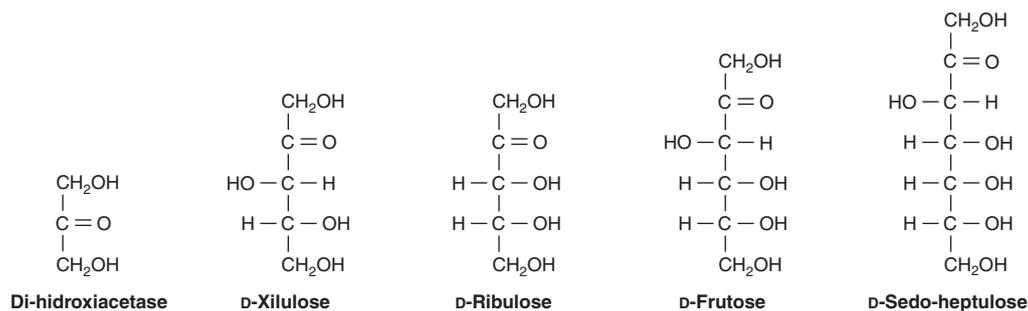


FIGURA 15-7 Exemplos de cetoses com importância fisiológica.

TABELA 15-2 Pentoses de importância fisiológica

Açúcar	Fonte	Importância bioquímica e clínica
D-Ribose	Ácidos nucleicos e intermediários metabólicos	Componente estrutural dos ácidos nucleicos e das coenzimas, incluindo ATP, NAD(P) e coenzimas de flavina
D-Ribulose	Intermediário metabólico	Intermediário na via das pentoses-fosfato
D-Arabinose	Gomas vegetais	Constituinte de glicoproteínas
D-Xilose	Gomas vegetais, proteoglicanas, glicosaminoglicanos	Constituinte de glicoproteínas
L-Xilulose	Intermediário metabólico	Excretado na urina na pentosúria essencial

Além disso, os derivados de ácido carboxílico da glicose são importantes, incluindo o D-glicuronato (para a formação da glicuronídeo e nos glicosaminoglicanos) e seus derivados metabólicos, L-iduronato (nos glicosaminoglicanos, **Figura 15-8**) e L-gulonato (um intermediário na via do ácido urônico; ver **Figura 20-4**).

Os açúcares formam glicosídeos com outros compostos e entre si

Os **glicosídeos** são formados pela condensação entre o grupo hidroxila do carbono anomérico de um monossacarídeo e um segundo composto, que pode ser outro monossacarídeo ou, no caso de uma **aglicona**, um composto não açúcar. Quando o segundo grupamento é um hidroxil, a ligação O-glicosídica é uma ligação **acetala**, uma vez que resulta de uma reação entre um grupamento hemiacetal (formado a partir de um aldeído e um grupamento —OH) e outro grupamento —OH. Quando a

TABELA 15-3 Hexoses de importância fisiológica

Açúcar	Fonte	Importância bioquímica	Significado clínico
D-Glicose	Sucos de frutas, hidrólise do amido, açúcar da cana ou da beterraba, maltose e lactose	Principal combustível metabólico para os tecidos; "açúcar do sangue"	Excretada na urina (glicosúria) no diabetes melito mal controlado devido à hiperglicemia
D-Frutose	Sucos de frutas, mel, hidrólise do açúcar da cana ou da beterraba e inulina, isomerização enzimática dos xaropes de glicose para a fabricação de alimento	Prontamente metabolizada via glicose ou por via direta	A intolerância hereditária à frutose leva ao acúmulo de frutose e à hipoglicemia
D-Galactose	Hidrólise da lactose	Prontamente metabolizada à glicose; sintetizada na glândula mamária para a síntese da lactose no leite; constituinte de glicolípídeos e glicoproteínas	A galactosemia hereditária devido à falha no metabolismo da galactose leva à catarata
D-Manose	Hidrólise de gomas mananas vegetais	Constituinte das glicoproteínas	

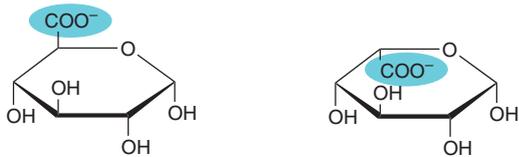


FIGURA 15-8 α -D-Glicuronato (à esquerda) e β -L-iduronato (à direita).

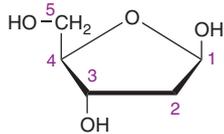


FIGURA 15-9 2-Desoxi-D-ribofuranose (forma β).

porção hemiacetal é a glicose, o composto resultante é um **glicosídeo**; quando é a galactose, um **galactosídeo**; e assim por diante. Quando o segundo grupamento é uma amina, forma-se uma ligação *N*-glicosídica, por exemplo, entre a adenina e a ribose nos nucleotídeos, como o ATP (ver Figura 11-4).

Os glicosídeos distribuem-se amplamente na natureza; a aglicona pode ser metanol, glicerol, esteroil, fenol ou uma base, como a adenina. Os glicosídeos que são importantes na medicina devido à sua ação sobre o coração (**glicosídeos cardíacos**) contêm, sem exceção, esteroides, como a aglicona. Estes incluem os derivados digitálicos e estrofantos, como a **ouabáina**, um inibidor da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ das membranas celulares. Outros glicosídeos incluem antibióticos, como a **estreptomina**.

Os desoxiaçúcares carecem de um átomo de oxigênio

Os desoxiaçúcares são aqueles em que um grupamento hidroxil foi substituído por hidrogênio. Um exemplo é a **desoxirribose** (Figura 15-9) no DNA. O desoxiaçúcar *L*-fucose (Figura 15-15) ocorre nas glicoproteínas; a 2-desoxiglicose é utilizada experimentalmente como inibidor do metabolismo da glicose.

Os aminoaçúcares (hexosaminas) são componentes das glicoproteínas, dos gangliosídeos e dos glicosaminoglicanos

Os aminoaçúcares incluem a *D*-glicosamina, um constituinte do ácido hialurônico (Figura 15-10), a *D*-galactosamina (também conhecida como condrosamina), um constituinte

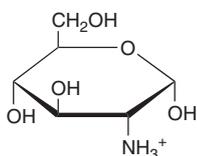


FIGURA 15-10 Glicosamina (2-amino-D-glicopiranosose) (forma α). A galactosamina é a 2-amino-D-galactopiranosose. Tanto a glicosamina quanto a galactosamina ocorrem como derivados *N*-acetil em carboidratos mais complexos como, por exemplo, as glicoproteínas.

da condroitina, e a *D*-manosamina. Diversos **antibióticos** (p. ex., **eritromicina**) contêm aminoaçúcares, os quais são importantes para a sua atividade metabólica.

Maltose, sacarose e lactose são dissacarídeos importantes

Os dissacarídeos são açúcares compostos por dois resíduos monossacarídicos ligados por uma ligação glicosídica (Figura 15-11). Os dissacarídeos fisiologicamente importantes são a maltose, a sacarose e a lactose (Tabela 15-4). A hidrólise da sacarose fornece uma mistura de glicose e frutose chamada de “açúcar invertido”, visto que a frutose é fortemente levorrotatória e muda (inverte) a ação dextrorrotatória mais fraca da sacarose.

OS POLISSACARÍDEOS POSSUEM FUNÇÕES ESTRUTURAIS E DE ARMAZENAMENTO

Os polissacarídeos incluem vários carboidratos importantes fisiologicamente.

O **amido** é um homopolímero de glicose, formando uma cadeia α -glicosídica, chamada de **glicosano** ou **glicano**. É o mais importante carboidrato na dieta, contido em cereais, batatas, legumes e em outros vegetais. Os dois constituintes principais são a **amilose** (13-20%), que possui estrutura helicoidal não ramificada, e a **amilopectina** (80-87%), que consiste em cadeias ramificadas com 24 a 30 resíduos de glicose com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ nas cadeias e ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$ nos pontos de ramificação (Figura 15-12).

A extensão em que o amido nos alimentos é hidrolisado pela amilase é determinada por sua estrutura, pelo grau de cristalização ou hidratação (o resultado do cozimento) e pelo fato de ele estar (ou não) incluso em paredes de células vegetais intactas (e indigeríveis). O **índice glicêmico** de um alimento amiláceo é uma medida de sua digestibilidade, com base na extensão em que ele eleva a concentração sanguínea de glicose em comparação com uma quantidade equivalente de glicose ou de um alimento de referência como o pão branco ou o arroz cozido. O índice glicêmico varia de 1 (ou 100%) para os amidos que são prontamente hidrolisados no intestino delgado até 0 para aqueles que não sofrem hidrólise.

O **glicogênio** é o polissacarídeo de armazenamento em animais e é, algumas vezes, chamado de amido animal. É uma estrutura mais altamente ramificada que a amilopectina, com cadeias de 12 a 15 resíduos de α -D-glicopiranosose (na ligação $\alpha 1 \rightarrow 4$ glicosídica) com ramificação por meio de ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$ glicosídicas. Os grânulos de glicogênio no músculo (partículas β) são esféricos e contêm até 60 mil resíduos de glicose; no fígado, existem grânulos semelhantes e também rosetas de grânulos de glicogênio que parecem ser partículas β agregadas.

A **inulina** é um polissacarídeo de frutose (uma frutosa-na) encontrada em tubérculos e raízes de dalias, alcachofras e dentes-de-leão. Ela é prontamente solúvel em água e é utilizada para determinar a taxa de filtração glomerular (ver Capítulo 48), mas não é hidrolisada pelas enzimas intestinais, logo não possui

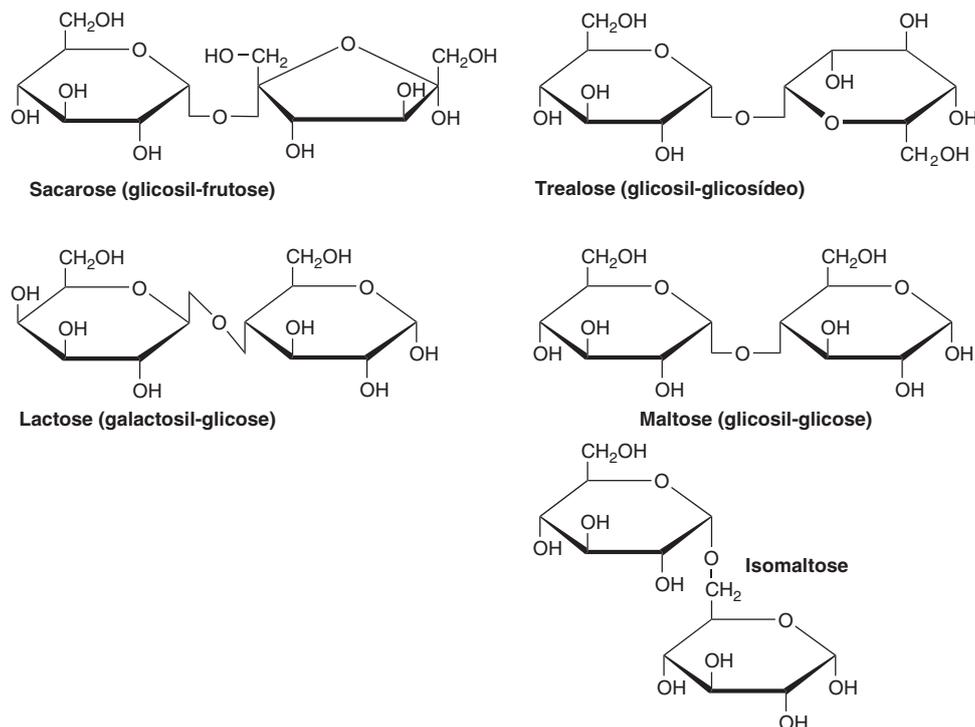


FIGURA 15-11 Estruturas de dissacarídeos nutricionalmente importantes.

TABELA 15-4 Dissacarídeos de importância fisiológica

Açúcar	Composição	Fonte	Significado clínico
Sacarose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosídeo	Açúcar da cana e da beterraba, sorgo e algumas frutas e vegetais	A doença genética rara caracterizada pela falta de sacarase leva à intolerância à sacarose – diarreia e flatulência
Lactose	O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosose	Leite (e muitas preparações farmacêuticas como filtro)	A falta da lactase (alactasia) leva à intolerância à lactose – diarreia e flatulência; pode ser excretada na urina durante a gestação
Maltose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glicopiranosose	Hidrólise enzimática do amido (amilase); cereais em germinação e malte	
Isomaltose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glicopiranosose	Hidrólise enzimática do amido (os pontos de ramificação na amilopectina)	
Lactulose	O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-frutofuranose	Leite aquecido (pequenas quantidades), principalmente sintético	Não hidrolisada por enzimas intestinais, mas fermentada por bactérias intestinais; utilizada como laxativo osmótico brando
Trealose	O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glicopiranosídeo	Leveduras e fungos; o principal açúcar da hemolinfa dos insetos	

valor nutricional. As **dextrinas** são intermediários na hidrólise do amido. A **celulose** é o principal constituinte das paredes das células vegetais. É insolúvel e consiste em unidades de β -D-glicopiranosose ligadas por ligações β 1 \rightarrow 4 para formar cadeias longas e retas fortalecidas por ligações de hidrogênio cruzadas. Os mamíferos carecem de qualquer enzima que hidrolise as ligações β 1 \rightarrow 4; portanto, não conseguem digerir a celulose. É uma importante fonte de “massa” na dieta e é o principal componente das fibras da dieta. Os microrganismos no intestino dos ruminantes e de outros herbívoros podem hidrolisar a ligação e fermentar os produtos até ácidos graxos de cadeia curta como

uma importante fonte de energia. Há algum metabolismo bacteriano da celulose no colo humano. A **quitina** é um polissacarídeo estrutural no exoesqueleto de crustáceos e insetos, assim como em cogumelos. Ela consiste em unidades de *N*-acetil-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4. A **pectina** ocorre em frutas; ela é um polímero de ácido galacturônico unido por ligações α 1 \rightarrow 4, com ramificações de galactose ou arabinose, e é parcialmente metilada (**Figura 15-13**).

Os **glicosaminoglicanos** (mucopolissacarídeos) são carboidratos complexos que contêm **aminoaçúcares** e **ácidos urônicos**. Eles podem estar ligados a uma molécula de proteína

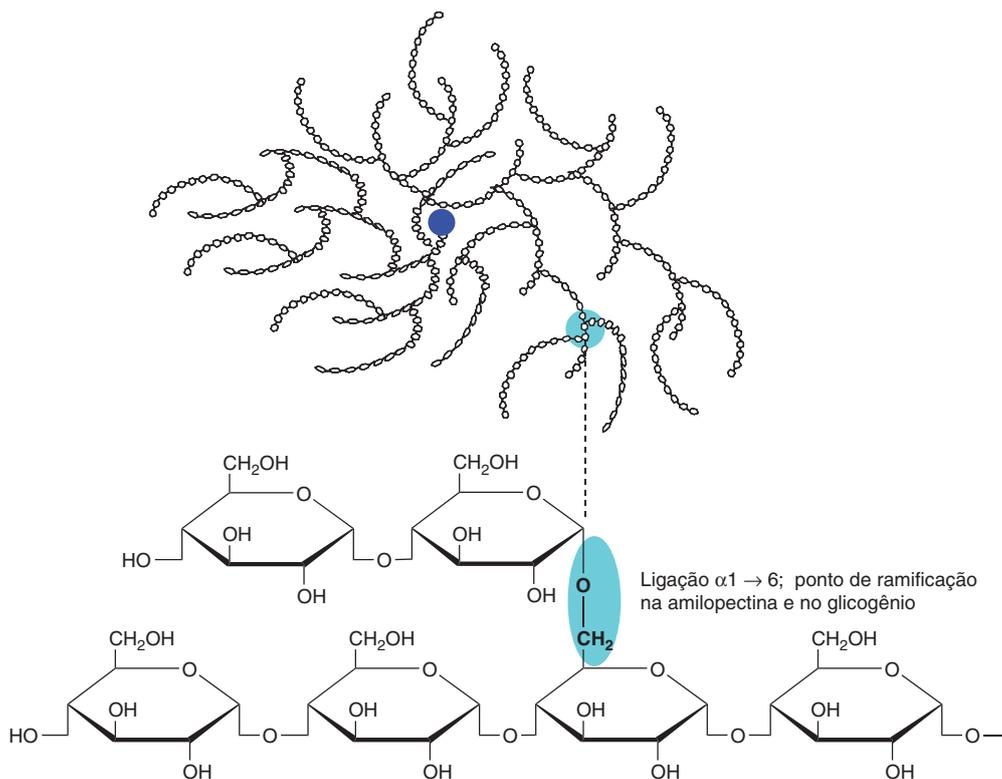


FIGURA 15-12 A estrutura do amido e do glicogênio. A amilose é um polímero linear de resíduos de glicose unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$, que se enrola em uma hélice. A amilopectina e o glicogênio consistem em cadeias curtas de resíduos de glicose unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ com pontos de ramificação formados por ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 6$. A molécula do glicogênio é uma esfera de cerca de 21 nm de diâmetro que pode ser vista em micrografias eletrônicas. Ela tem massa molecular de aproximadamente 10^7 Da e consiste em cadeias polissacarídicas, cada uma com cerca de 13 resíduos de glicose. As cadeias podem ser ramificadas, ou não, e são arranjadas em 12 camadas concêntricas. As cadeias ramificadas (cada qual com dois ramos) são encontradas nas camadas internas, e as cadeias não ramificadas, na camada externa. O ponto azul no centro da molécula de glicogênio é a glicogenina, a molécula iniciadora da síntese de glicogênio.

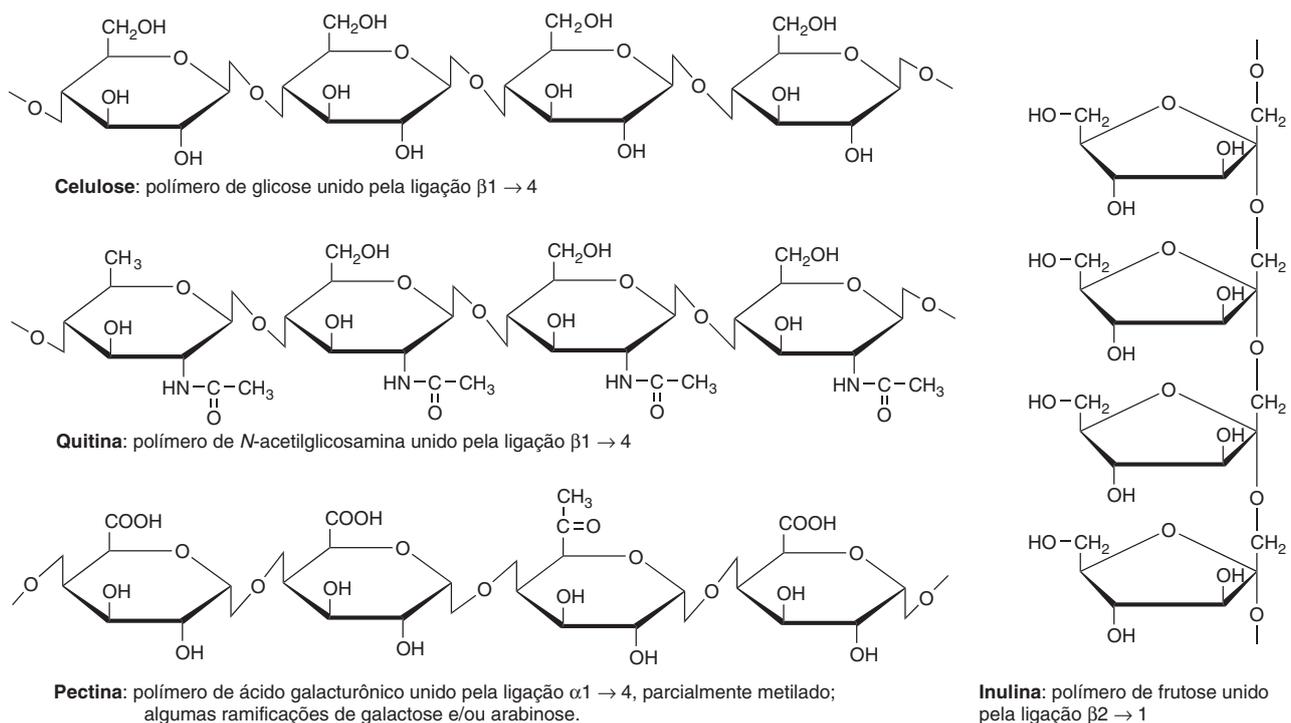


FIGURA 15-13 As estruturas de alguns polissacarídeos não amídicos importantes.

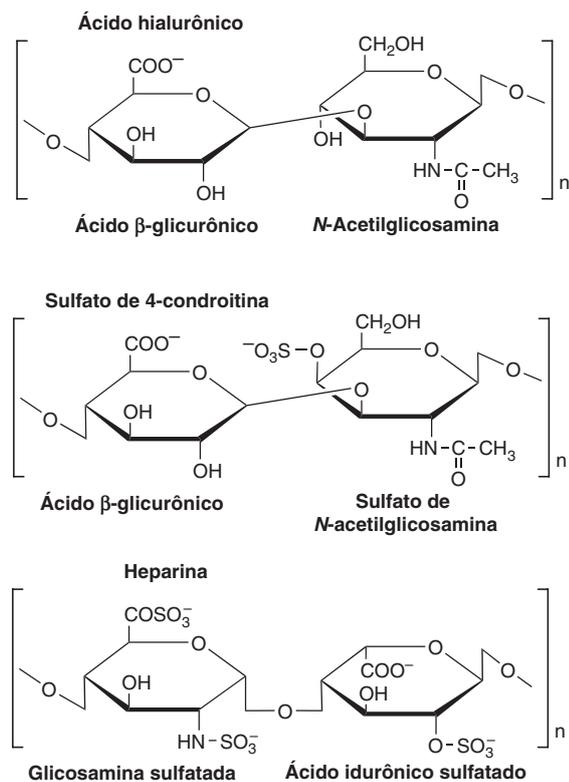


FIGURA 15-14 Estrutura de alguns polissacarídeos complexos e glicosaminoglicanos.

para formar um **proteoglicano**. Os proteoglicanos fornecem a substância fundamental ou embalagem do tecido conectivo (ver Capítulo 50). Eles detêm grandes quantidades de água e ocupam espaço, acolchoando ou lubrificando outras estruturas devido ao grande número de grupamentos —OH e às cargas negativas na molécula, que, por meio de repulsão, mantêm afastadas as cadeias de carboidratos. Os exemplos são o **ácido hialurônico**, o **sulfato de condroitina** e a **heparina** (Figura 15-14).

As **glicoproteínas** (também conhecidas como mucoproteínas) são proteínas contendo cadeias oligossacarídicas ramificadas ou não ramificadas (Tabela 15-5), incluindo **fucose** (Figura 15-15). Elas ocorrem nas membranas celulares (ver Capítulos 40 e 46) e muitas proteínas são glicosiladas. Os **ácidos siálicos** são derivados *N* ou *O*-acil do ácido neuramínico (Figura 15-15). O **ácido neuramínico** é um glicídeo de nove

TABELA 15-5 Carboidratos encontrados nas glicoproteínas

Hexoses	Manose (Man), galactose (Gal)
Acetil-hexosaminas	<i>N</i> -Acetilglicosamina (GlcNAc), <i>N</i> -acetilgalactosamina (GalNAc)
Pentoses	Arabinose (Ara), Xilose (Xil)
Metil-pentose	L-Fucose (Fuc, ver Figura 15-15)
Ácidos siálicos	Derivados <i>N</i> -acil do ácido neuramínico; o ácido siálico predominante é o ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (NeuAc, ver Figura 15-16)

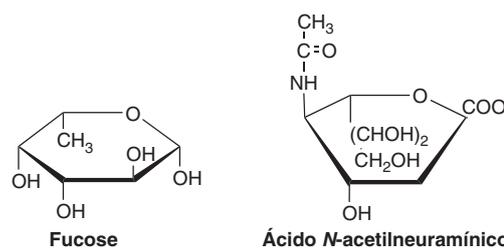


FIGURA 15-15 β-L-Fucose (6-desoxi-β-L-galactose) e ácido *N*-acetilneuramínico, um ácido siálico.

carbonos derivado da manosamina (um epímero da glicosamina) e do piruvato. Os ácidos siálicos são constituintes tanto de **glicoproteínas** quanto de **gangliosídeos**.

OS CARBOIDRATOS OCORREM NAS MEMBRANAS CELULARES E NAS LIPOPROTEÍNAS

Aproximadamente 5% do peso das membranas celulares constituem a parte de carboidratos das glicoproteínas (ver Capítulo 46) e glicolípídeos. A sua presença na superfície externa da membrana plasmática (o **glicocálice**) foi demonstrada com o emprego de **lectinas** vegetais, aglutininas proteicas que se ligam a resíduos glicosil específicos. Por exemplo, a **concanavalina A** liga-se aos resíduos α-glicosil e α-manosil. A **glicoforina** é uma glicoproteína importante integrante da membrana de hemácias humanas. Ela possui 130 resíduos de aminoácidos e atravessa a membrana lipídica, com regiões polipeptídicas para fora da membrana tanto da superfície externa quanto da interna (citoplasmática). As cadeias de carboidratos estão ligadas à porção aminoterminal na superfície externa. Os carboidratos também estão presentes na apoproteína B das lipoproteínas plasmáticas.

RESUMO

- O glicoma é o conteúdo completo de açúcares de um organismo, livres ou presentes em moléculas mais complexas. A glicômica é o estudo dos glicomas, incluindo aspectos genéticos, fisiológicos, patológicos e outros.
- Os carboidratos são os principais constituintes do alimento animal e dos tecidos animais. Eles caracterizam-se pelo tipo e pela quantidade de resíduos monossacarídicos em suas moléculas.
- A glicose é o carboidrato mais importante na bioquímica dos mamíferos, uma vez que quase todos os carboidratos no alimento são convertidos em glicose para o metabolismo.
- Os glicídeos possuem grandes quantidades de estereoisômeros, pois contêm vários átomos de carbono assimétricos.
- Os monossacarídeos com importância fisiológica incluem a glicose, o “açúcar do sangue”, e a ribose, importante constituinte de nucleotídeos e ácidos nucleicos.
- Os dissacarídeos importantes incluem a maltose (glicosil-glicose), um intermediário na digestão de amido; a sacarose (glicosil-frutose), importante como constituinte da dieta contendo frutose; e a lactose (galactosil-glicose), no leite.

- O amido e o glicogênio são os polímeros de armazenamento da glicose em vegetais e animais, respectivamente. O amido é o principal combustível metabólico da dieta.
- Os carboidratos complexos contêm outros derivados do açúcar, como os aminoaçúcares, os ácidos urônicos e os ácidos siálicos. Eles incluem os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos, os quais estão associados aos elementos estruturais dos tecidos, e as glicoproteínas, que são proteínas portadoras de cadeias de oligossacarídeos; eles são encontrados em muitas situações, inclusive na membrana celular.
- As cadeias oligossacarídicas codificam informação biológica, dependendo dos seus açúcares constituintes, de sua sequência e de suas ligações.

REFERÊNCIAS

- Champ M, Langkilde A-M, Brouns F, et al: Advances in dietary fibre characterisation. *Nutrition Res Rev* 2003;16:(1)71–82.
- Davis BG, Fairbanks AJ: *Carbohydrate Chemistry*. Oxford University Press, 2002.
- Garg HC, Cowman KM, Hales CA: *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*. Elsevier, 2008.
- Kiessling LL, Splain RA: Chemical approaches to glycobiology. *Ann Rev Biochem* 2010;79:619–653.
- Lindhorst TK, Thisbe K: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed. Wiley-VCH, 2007.
- Sinnott M: *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and Mechanisms*, Royal Society of Chemistry, 2007

O ciclo do ácido cítrico: a via central do metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de aminoácidos

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as reações do ciclo do ácido cítrico e as reações que levam à produção de equivalentes redutores, os quais são oxidados na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria para a produção de trifosfato de adenosina (ATP).
- Explicar a importância das vitaminas no ciclo do ácido cítrico.
- Explicar como o ciclo do ácido cítrico fornece uma via tanto para o catabolismo de aminoácidos quanto para a sua síntese.
- Descrever as principais vias anapleróticas que possibilitam a reposição de intermediários do ciclo do ácido cítrico e como a retirada do oxalacetato para a gliconeogênese é controlada.
- Descrever o papel do ciclo do ácido cítrico na síntese de ácidos graxos.
- Explicar como a atividade do ciclo do ácido cítrico é controlada pela disponibilidade de cofatores oxidados.
- Explicar como a hiperamoniemia pode levar à perda da consciência.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarbóxico) consiste em uma sequência de reações na mitocôndria que oxida a porção acetil da acetil-CoA a CO_2 e reduz coenzimas que são reoxidadas por meio da cadeia de transporte de elétrons (ver Capítulo 13), ligada à formação de ATP.

O ciclo do ácido cítrico é a via final comum para a oxidação dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, visto que a glicose, os ácidos graxos e a maior parte dos aminoácidos são metabolizados à acetil-CoA ou a intermediários do ciclo. O ciclo do ácido cítrico também desempenha papel central na gliconeogênese, na lipogênese e na interconversão de aminoácidos. Muitos desses processos ocorrem na maioria dos tecidos, porém o fígado é o único tecido no qual todos ocorrem em grau significativo. Assim, as repercussões são profundas, quando, por exemplo, muitas células hepáticas são lesionadas, conforme observado na **hepatite** aguda, ou são substituídas por tecido conectivo (como na **cirrose**). Os poucos defeitos genéticos das enzimas do ciclo do ácido cítrico que já foram descritos estão associados à ocorrência de lesão neurológica grave, em consequência de comprometimento considerável na formação de ATP no sistema nervoso central.

A hiperamoniemia, como a que ocorre na doença hepática avançada, leva à perda da consciência, ao coma e a convulsões devido à atividade reduzida do ciclo do ácido cítrico, resultando em diminuição na formação de ATP. A amônia causa depleção dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (ao retirar o α -cetoglutarato para a formação de glutamato e glutamina) e também inibe a descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato.

O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO FORNECE SUBSTRATOS PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA

O ciclo começa com a reação entre a porção acetil da acetil-CoA e o oxalacetato, um ácido dicarbóxico de 4 carbonos, formando um ácido tricarbóxico de 6 carbonos, o citrato. Nas reações subsequentes, são liberadas 2 moléculas de CO_2 , e o oxalacetato é regenerado (**Figura 16-1**). Apenas uma pequena quantidade de oxalacetato é necessária para a oxidação de uma grande quantidade de acetil-CoA; pode-se considerar que o oxalacetato desempenha **papel catalítico**, uma vez que é regenerado no fim do ciclo.

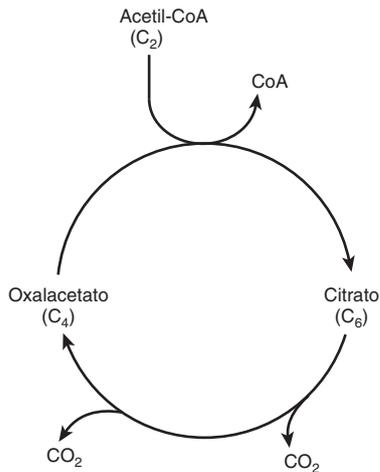


FIGURA 16-1 O ciclo do ácido cítrico, ilustrando o papel catalítico do oxalacetato.

O ciclo do ácido cítrico é a principal via para a formação de ATP ligado à oxidação de combustíveis metabólicos. Durante a oxidação de acetil-CoA, as coenzimas são reduzidas e subsequentemente reoxidadas na cadeia respiratória, em um processo ligado à formação de ATP (fosforilação oxidativa, **Figura 16-2**; ver também Capítulo 13). Esse processo é **aeróbio**, exigindo a presença de oxigênio como oxidante final das coenzimas reduzidas. As enzimas do ciclo do ácido cítrico localizam-se na **matriz mitocondrial**, na forma livre ou ancoradas à membrana mitocondrial interna e à membrana das cristas, onde também são encontradas as enzimas e as coenzimas da cadeia respiratória (ver Capítulo 13).

AS REAÇÕES DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO LIBERAM EQUIVALENTES REDUTORES E CO₂

A reação inicial entre a acetil-CoA e o oxalacetato para formar citrato é catalisada pela **citrato-sintase**, que forma uma ligação carbono-carbono entre o carbono metil da acetil-CoA e o carbono carbonil do oxalacetato (**Figura 16-3**). A ligação tioéster da citril-CoA resultante é hidrolisada, com liberação de citrato e CoASH – uma reação exotérmica.

O citrato sofre isomerização a isocitrato pela enzima **aconitase** (aconitato-hidratase). A reação ocorre em duas etapas: a desidratação a *cis*-aconitato e a reidratação a isocitrato. Embora o citrato seja uma molécula simétrica, a aconitase reage de modo assimétrico com o citrato, de modo que os 2 átomos de carbono que são perdidos em reações subsequentes do ciclo não são aqueles que foram acrescentados a partir da acetil-CoA. Esse comportamento assimétrico resulta do processo de **canalização** – a transferência direta do produto da citrato sintase para o sítio ativo da aconitase, sem necessidade de entrar em solução livre. A canalização possibilita a integração da atividade do ciclo do ácido cítrico com o fornecimento de citrato no citosol como fonte de acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos. O citrato só está disponível, livre em solução, para ser

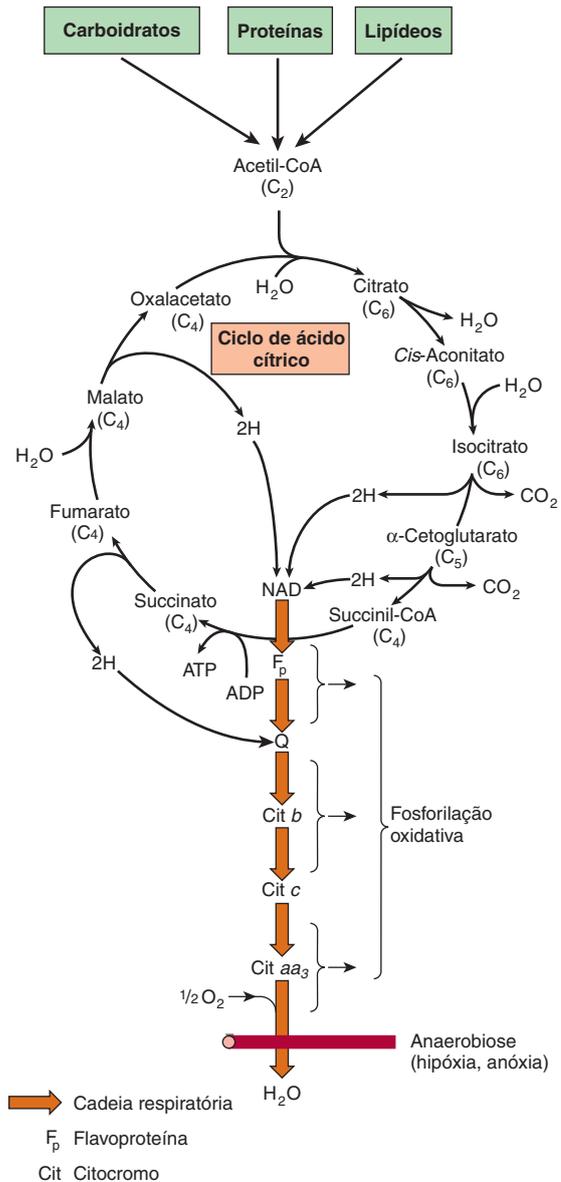


FIGURA 16-2 O ciclo do ácido cítrico: a principal via catabólica de acetil-CoA. A acetil-CoA, o produto do catabolismo de carboidratos, de proteínas e de lipídeos, entra no ciclo, formando citrato, e é oxidada a CO₂ com a redução de coenzimas. A reoxidação das coenzimas na cadeia respiratória leva à fosforilação de ADP a ATP. Para cada volta do ciclo, são geradas 9 moléculas de ATP pela fosforilação oxidativa, e surge 1 molécula de ATP (ou GTP) em nível do substrato a partir da conversão da succinil-CoA em succinato.

transportado das mitocôndrias até o citosol para a síntese de ácidos graxos, quando a aconitase é inibida pelo acúmulo de seu produto, o isocitrato.

O veneno **fluoracetato** é encontrado em algumas plantas, e o seu consumo pode ser fatal para animais de pastagem. Alguns compostos fluorados empregados como agentes antineoplásicos e substâncias químicas industriais (incluindo pesticidas) são metabolizados a fluoracetato. Trata-se de uma substância tóxica, visto que a fluoracetil-CoA se condensa com o oxalacetato para formar fluorocitrato, que inibe a aconitase, levando ao acúmulo de citrato.

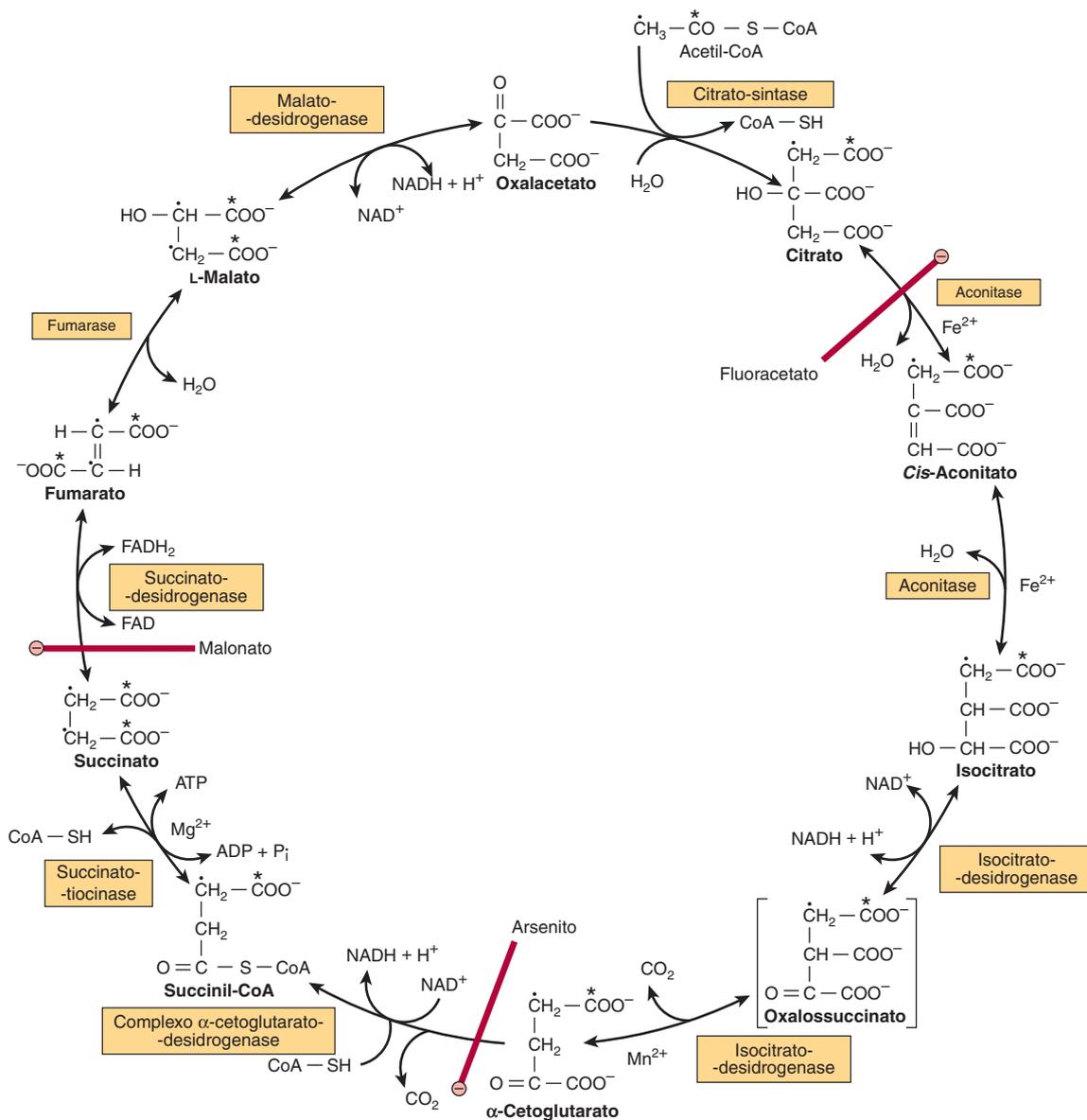


FIGURA 16-3 O ciclo do ácido cítrico (de Krebs). A oxidação de NADH e FADH₂ na cadeia respiratória leva à formação de ATP por fosforilação oxidativa. A fim de acompanhar o trajeto da acetil-CoA ao longo do ciclo, os 2 átomos de carbono da porção acetil estão marcados no carbono carboxil (*) e no carbono metil (•). Embora 2 átomos de carbono sejam perdidos como CO₂, a cada volta do ciclo, esses átomos não provêm da acetil-CoA que entrou imediatamente no ciclo, mas da parte da molécula de citrato derivada do oxalacetato. Entretanto, ao completar cada volta do ciclo, o oxalacetato regenerado está agora marcado, resultando na liberação de CO₂ marcado durante a segunda volta do ciclo. Como o succinato é um composto simétrico, ocorre “randomização” da marcação nessa etapa, de modo que todos os 4 átomos de carbono do oxalacetato aparecem marcados depois de uma volta do ciclo. Durante a gliconeogênese, parte da marcação do oxalacetato incorpora-se na glicose e no glicogênio (Figura 20-1). Estão indicados os locais de inibição (⊖) pelo fluoracetato, pelo malonato e pelo arsenito.

O isocitrato sofre desidrogenação catalisada pela **isocitrato-desidrogenase**, formando, inicialmente, oxalossuccinato, que permanece ligado à enzima e sofre descarboxilação a α -cetoglutarato. A descarboxilação requer a presença de íons Mg²⁺ ou Mn²⁺. Existem três isoenzimas da isocitrato-desidrogenase. Uma delas, que utiliza o NAD⁺, é encontrada apenas nas mitocôndrias. As outras duas utilizam o NADP⁺ e são encontradas nas mitocôndrias e no citosol. A oxidação do isocitrato ligada à cadeia respiratória ocorre por meio da enzima dependente de NAD⁺.

O α -cetoglutarato sofre **descarboxilação oxidativa** em uma reação catalisada por um complexo multienzimático semelhante ao complexo envolvido na descarboxilação oxidativa do piruvato (ver Figura 17-5). O **complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase** requer os mesmos cofatores que o complexo da piruvato-desidrogenase – tiamina-difosfato, lipato, NAD⁺, FAD e CoA – e resulta na formação de succinil-CoA. O equilíbrio dessa reação favorece tanto a formação de succinil-CoA, que ela deve ser considerada fisiologicamente

como unidirecional. Como no caso da oxidação do piruvato (Capítulo 17), o arsenito inibe a reação, causando acúmulo do substrato, o α -cetoglutarato. A presença de amônia em altas concentrações inibe a α -cetoglutarato desidrogenase.

A succinil-CoA é convertida em succinato pela enzima **succinato-tiocinase (succinil-CoA-sintase)**. Trata-se do único exemplo de fosforilação em nível do substrato no ciclo do ácido cítrico. Os tecidos onde ocorre gliconeogênese (fígado e rim) contêm duas isoenzimas da succinato-tiocinase, uma específica para o GDP, e a outra, para o ADP. O GTP formado é utilizado na descarboxilação do oxalacetato em fosfoenolpiruvato na gliconeogênese e estabelece uma ligação reguladora entre a atividade do ciclo do ácido cítrico e a retirada de oxalacetato para a gliconeogênese. Os tecidos não gliconeogênicos possuem apenas a isoenzima que fosforila ADP.

Quando os corpos cetônicos estão sendo metabolizados nos tecidos extra-hepáticos, ocorre uma reação alternativa catalisada pela **succinil-CoA-acetacetato-CoA-transferase (tioforase)**, envolvendo a transferência de CoA da succinil-CoA para o acetacetato, com formação de acetoacetil-CoA e succinato (ver Capítulo 22).

O metabolismo subsequente do succinato, que leva à regeneração do oxalacetato, segue a mesma sequência de reações químicas que ocorrem na β -oxidação dos ácidos graxos: desidrogenação para formar uma ligação dupla carbono-carbono, adição de água para formar um grupamento hidroxil e desidrogenação adicional para produzir o grupo oxo do oxalacetato.

A primeira reação de desidrogenação, que forma o fumarato, é catalisada pela **succinato-desidrogenase**, que está ligada à superfície interna da membrana mitocondrial interna. A enzima contém FAD e proteína ferro-enxofre (Fe-S), reduzindo diretamente ubiquinona na cadeia de transporte de elétrons. A **fumarase (fumarato-hidratase)** catalisa a adição de água por meio da ligação dupla do fumarato, dando origem ao malato. O malato é oxidado a oxalacetato pela **malato-desidrogenase**, ligada à redução de NAD^+ . Embora o equilíbrio dessa reação favoreça fortemente o malato, o fluxo efetivo ocorre em direção ao oxalacetato, devido à remoção contínua de oxalacetato (para formar citrato, como substrato para a gliconeogênese, ou para sofrer transaminação a aspartato) e também devido à reoxidação contínua do NADH.

SÃO FORMADOS 10 ATPs POR VOLTA DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Como resultados das oxidações catalisadas pelas desidrogenases do ciclo do ácido cítrico, são produzidas três moléculas de NADH e uma de FADH_2 para cada molécula de acetil-CoA catabolizada em uma volta do ciclo. Esses equivalentes redutores são transferidos para a cadeia respiratória (ver Figura 13-3), onde a reoxidação de cada NADH resulta na formação de cerca de 2,5 moléculas de ATP, e a reoxidação do FADH_2 forma cerca de 1,5 molécula de ATP. Além disso, 1 molécula de ATP (ou GTP) é formada por fosforilação em nível do substrato, catalisada pela succinato-tiocinase.

AS VITAMINAS EXECUTAM PAPÉIS IMPORTANTES NO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Das vitaminas B (ver Capítulo 44), quatro são essenciais no ciclo do ácido cítrico e, portanto, no metabolismo produtor de energia: a **riboflavina**, na forma de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um cofator da succinato-desidrogenase; a **niacina**, na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), o acceptor de elétrons das enzimas isocitrato-desidrogenase, α -cetoglutarato-desidrogenase e malato-desidrogenase; a **tiamina (vitamina B₁)**, como tiamina-difosfato, a coenzima da descarboxilação na reação da α -cetoglutarato-desidrogenase; e o ácido **pantotênico**, como parte da coenzima A, o cofator esterificado para “ativar” resíduos de ácidos carboxílicos: acetil-CoA e succinil-CoA.

O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO EXERCE PAPEL FUNDAMENTAL NO METABOLISMO

O ciclo do ácido cítrico não é apenas uma via para a oxidação de unidades de dois carbonos, mas também uma importante via para a interconversão de metabólitos que surgem da **transaminação** e da **desaminação** dos aminoácidos (ver Capítulos 28 e 29), fornecendo os substratos para a **síntese de aminoácidos** por transaminação (ver Capítulo 27), bem como para a **gliconeogênese** (ver Capítulo 19) e para a **síntese de ácidos graxos** (ver Capítulo 23). Em virtude de sua função em processos tanto oxidativos quanto de síntese, o ciclo é **anfibiólico** (Figura 16-4).

O ciclo do ácido cítrico participa na gliconeogênese, na transaminação e na desaminação

Todos os intermediários do ciclo são potencialmente **glicogênicos**, uma vez que podem dar origem ao oxalacetato e, portanto, à produção efetiva de glicose (no fígado e no rim, os órgãos responsáveis pela gliconeogênese; ver Capítulo 19). A enzima essencial que catalisa a transferência do ciclo para a gliconeogênese é a **fosfoenolpiruvato-carboxicinase**, que catalisa a descarboxilação do oxalacetato a fosfoenolpiruvato, sendo o GTP doador de fosfato (ver Figura 19-1). O GTP necessário para essa reação é fornecido pela isoenzima dependente de GDP da succinato-tiocinase. Isso assegura que o oxalacetato não será retirado do ciclo para a gliconeogênese, se isso levar ao esgotamento dos intermediários do ciclo do ácido cítrico e, portanto, à produção reduzida de ATP.

A transferência líquida para o ciclo ocorre como resultado de várias reações. Dentre as mais importantes dessas reações **anapleróticas** está a formação de oxalacetato pela carboxilação de piruvato, catalisada pela **piruvato-carboxilase** (Figura 16-4). Essa reação é importante para manter uma concentração adequada de oxalacetato para a reação de condensação com acetil-CoA. Se houver acúmulo de acetil-CoA, ela atuará tanto como ativador alostérico da piruvato-carboxilase quanto

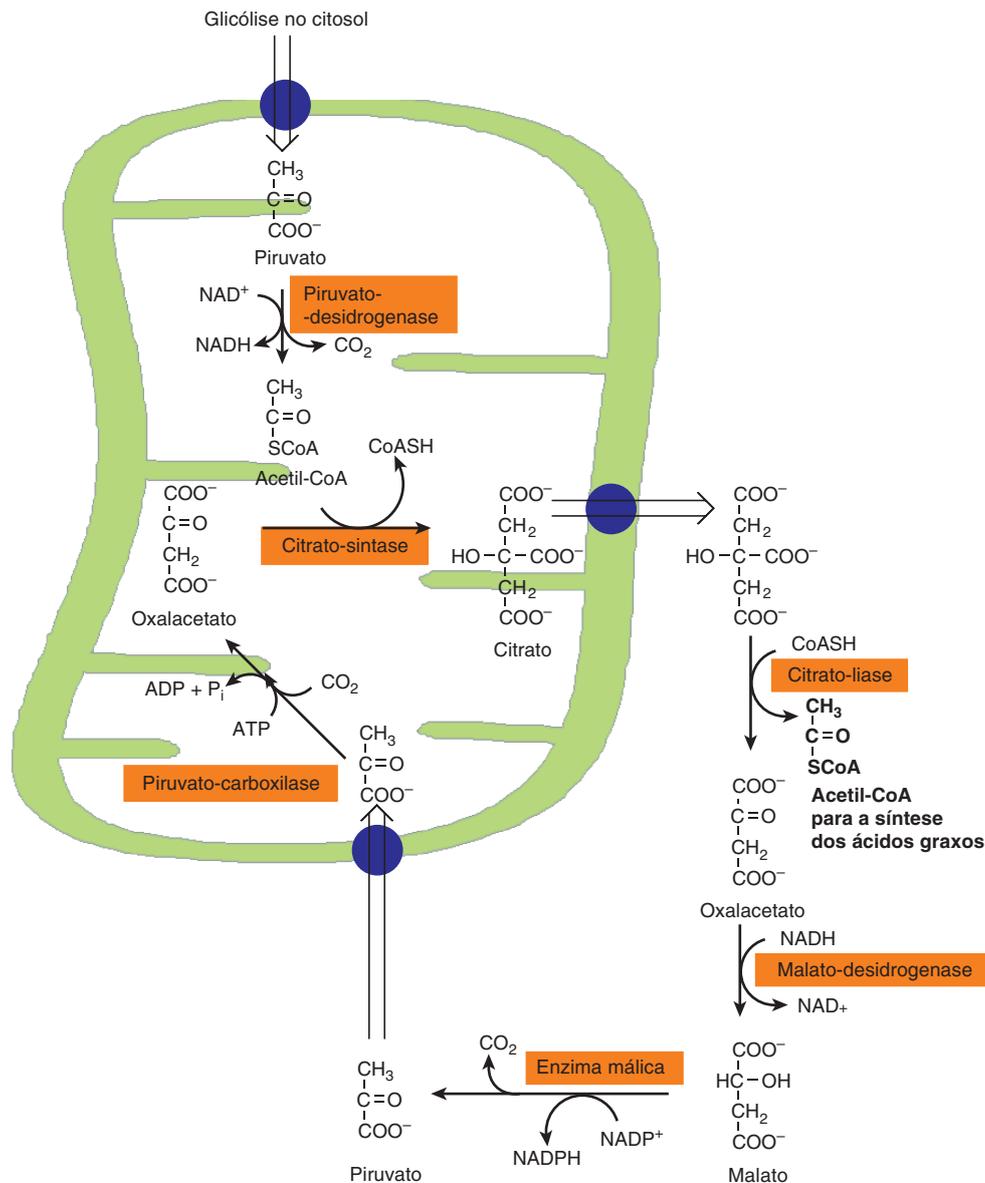


FIGURA 16-5 Participação do ciclo do ácido cítrico no fornecimento de acetil-CoA citosólica para a síntese dos ácidos graxos a partir de glicose. Ver também Figura 23-5.

reação catalisada pela **citrato-liase** (Figura 16-5). O citrato só se torna disponível para ser transportado para fora da mitocôndria quando a aconitase é inibida pelo seu produto e, portanto, está saturada com o seu substrato, de modo que o citrato não pode ser canalizado diretamente da citrato-sintase para a aconitase. Isso assegura que o citrato seja utilizado para a síntese de ácidos graxos apenas quando houver uma quantidade adequada para suprir a atividade contínua do ciclo.

O oxalacetato liberado pela citrato-liase não pode entrar novamente na mitocôndria, mas é reduzido a malato, à custa de NADH , e o malato passa por descarboxilação oxidativa a piruvato, reduzindo NADP^+ a NADPH . Essa reação, catalisada pela enzima málica, é a fonte de metade da quantidade de NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos (o restante é fornecido pela via das pentoses-fosfato, Capítulo 20).

O piruvato entra na mitocôndria e é carboxilado a oxalacetato pela piruvato-carboxilase, uma reação dependente de ATP em que a coenzima é a vitamina biotina.

A regulação do ciclo do ácido cítrico depende principalmente de um suprimento de cofatores oxidados

Na maioria dos tecidos, onde o principal papel do ciclo do ácido cítrico é o metabolismo produtor de energia, a atividade do ciclo é regulada pelo **controle respiratório**, via cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (ver Capítulo 13). Portanto, a atividade do ciclo depende imediatamente do suprimento de NAD^+ , que, por sua vez, devido ao estreito acoplamento entre a oxidação e a fosforilação, depende da disponibilidade de ADP e, por

isso, da taxa de utilização do ATP no trabalho químico e físico. Além disso, as enzimas do ciclo são reguladas individualmente. Os principais sítios de regulação são as reações que não estão em equilíbrio catalisadas pelas enzimas piruvato-desidrogenase, citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e α -cetogluturato-desidrogenase. As desidrogenases são ativadas pelo Ca^{2+} , cuja concentração aumenta durante a contração muscular e na secreção em outros tecidos, quando existe maior demanda de energia. Em um tecido como o encéfalo, que depende altamente dos carboidratos para o suprimento de acetil-CoA, o controle do ciclo do ácido cítrico pode ocorrer na piruvato-desidrogenase. Várias enzimas respondem ao estado energético, conforme demonstrado pelas razões $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ e $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$. Por conseguinte, ocorre inibição alostérica da citrato-sintase pelo ATP e pela acil graxo-CoA de cadeia longa. A ativação alostérica da isocitrato-desidrogenase mitocondrial dependente de NAD pelo ADP é contrabalançada por ATP e NADH. O complexo da α -cetogluturato-desidrogenase é regulado da mesma maneira que o complexo da piruvato-desidrogenase (Figura 17-6). A succinato-desidrogenase é inibida pelo oxalacetato, e a disponibilidade de oxalacetato, controlada pela malato-desidrogenase, depende da razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$. Como o K_m da citrato-sintase para o oxalacetato é da mesma ordem de grandeza da concentração intramitocondrial, é provável que a concentração de oxalacetato controle a taxa de formação de citrato.

A **hiperamoniemia**, que ocorre na doença hepática avançada e em algumas das doenças genéticas (raras) do metabolismo de aminoácidos, provoca perda da consciência, coma e convulsões, podendo ser fatal. Ela é devido principalmente à retirada de α -cetogluturato para a formação de glutamato (reação catalisada pela glutamato-desidrogenase) e, em seguida, glutamina (reação catalisada pela glutamina-sintase), levando à redução das concentrações de todos os intermediários do ciclo do ácido cítrico e, portanto, à produção reduzida de ATP. O equilíbrio da glutamato-desidrogenase é mantido de maneira precisa, e o sentido da reação depende da razão $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ e da concentração de íons amônio. Além disso, a amônia inibe a α -cetogluturato-desidrogenase e possivelmente também a piruvato-desidrogenase.

RESUMO

- O ciclo do ácido cítrico é a via final para a oxidação dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas. O metabólito final comum, a acetil-CoA, reage com oxalacetato para formar citrato. Por uma série de desidrogenações e descarboxilações, o citrato é degradado, com redução das coenzimas, liberação de duas moléculas de CO_2 e regeneração do oxalacetato.
- As coenzimas reduzidas são oxidadas pela cadeia respiratória ligada à formação de ATP. Assim, o ciclo constitui a principal via de formação de ATP e localiza-se na matriz mitocondrial, adjacente às enzimas da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa.

- O ciclo do ácido cítrico é anfibólico, visto que, além da oxidação, ele é importante no fornecimento de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, de acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos e na interconversão de aminoácidos.

REFERÊNCIAS

- Baldwin JE, Krebs HA: The evolution of metabolic cycles. *Nature* 1981;291:381.
- Bender DA: The metabolism of “surplus” amino acids. *Br J Nutr* 2012;108(suppl 2): S113.
- Bowtell JL, Bruce M: Glutamine: an anaplerotic precursor. *Nutrition* 2002;18:222.
- Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P, et al: Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1114.
- Brunengraber H, Roe CR: Anaplerotic molecules: current and future. *J Inher Metab Dis* 2006;29:327.
- De Meirleir L: Defects of pyruvate metabolism and the Krebs cycle. *J Child Neurol* 2002;(suppl 3):3S26.
- Depeint F, Bruce WR: Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact* 2006;163:94.
- Gibala MJ, Young ME: Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2000;168:657.
- Grunengraber H, Roe CR: Anaplerotic molecules: current and future. *J Inher Metab Dis* 2006;29:327.
- Hertz L, Kala G: Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab Brain Dis* 2007; 22:199–218.
- Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, et al: Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 2008;413:369.
- Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC: Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:843.
- Kay J, Weitzman PDJ (editors): *Krebs' Citric Acid Cycle—Half a Century and Still Turning*. Biochemical Society, 1987.
- Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:225.
- Ott P, Clemmesen O, Larsen FS: Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem Int* 2005;47:13.
- Owen OE, Kalhan SC: The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 2002;277:30409.
- Pithukpakorn M: Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle. *Mol Genet Metab* 2005;85:243.
- Proudfoot AT, Bradberry SM: Sodium fluoroacetate poisoning. *Toxicol Rev* 2006;25:2139.
- Rama Rao KV, Norenberg MD: Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2012;60:697.
- Sumegi B, Sherry AD: Is there tight channelling in the tricarboxylic acid cycle metabolon? *Biochem Soc Trans* 1991;19:1002.

Glicólise e oxidação do piruvato

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a via da glicólise e seu controle, além de explicar como a glicólise pode atuar em condições anaeróbias.
- Descrever a reação da piruvato-desidrogenase e sua regulação.
- Explicar como a inibição do metabolismo do piruvato leva à acidose láctica.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A maior parte dos tecidos tem pelo menos alguma necessidade de glicose. No encéfalo, essa necessidade é considerável, e até mesmo no jejum prolongado, o encéfalo consegue obter não mais do que cerca de 20% de sua necessidade energética a partir dos corpos cetônicos. A glicólise, que é a principal via do metabolismo da glicose, ocorre no citosol de todas as células. Ela pode funcionar tanto anaeróbia quanto aerobiamente, dependendo da disponibilidade de oxigênio e da cadeia de transporte de elétrons. As hemácias, que carecem de mitocôndrias, dependem totalmente da glicose como combustível metabólico e metabolizam-na por glicólise anaeróbia. Entretanto, para oxidar a glicose além do piruvato (o produto final da glicólise), é necessária a presença de oxigênio e de sistemas enzimáticos mitocondriais, como o complexo da piruvato-desidrogenase, o ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16) e a cadeia respiratória (ver Capítulo 13).

A glicólise é a principal rota para o metabolismo dos carboidratos. A capacidade de a glicólise produzir ATP na ausência de oxigênio é particularmente importante, uma vez que permite que o músculo esquelético realize níveis muito altos de exercícios quando o suprimento de oxigênio for insuficiente, e também porque permite que os tecidos sobrevivam durante episódios de anóxia. Todavia, o músculo cardíaco, que está adaptado ao trabalho aeróbio, apresenta atividade glicolítica relativamente baixa e sobrevive precária em condições de **isquemia**. As doenças em que ocorre deficiência de enzimas da glicólise (p. ex., piruvato-cinase) se manifestam principalmente como **anemias hemolíticas** ou, quando o defeito afeta o músculo esquelético (p. ex., fosfofrutocinase), como **fadiga**. Nas células cancerosas em crescimento rápido, a glicólise ocorre em alta velocidade, formando grandes quantidades de piruvato, que é reduzido a lactato e exportado. Isso produz um ambiente relativamente

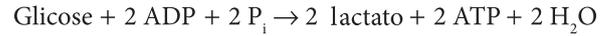
ácido no tumor, que pode ter implicações no tratamento do câncer. O lactato é utilizado para a gliconeogênese no fígado (Capítulo 19), um processo que consome muita energia e é responsável por grande parte do **hipermetabolismo** observado na **caquexia do câncer**. A **acidose láctica** tem várias causas, incluindo comprometimento da atividade da piruvato-desidrogenase, sobretudo na deficiência de tiamina (vitamina B₁).

A GLICÓLISE PODE FUNCIONAR EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

No início das pesquisas sobre a glicólise, foi constatado que a fermentação que ocorria nas leveduras era semelhante à degradação do glicogênio nos músculos. Foi observado que quando o músculo contrai em um meio anaeróbio, o **glicogênio desaparece** e o **lactato aparece**. Quando o oxigênio é reintroduzido, ocorre recuperação aeróbia, e o lactato deixa de ser produzido. Todavia, se a contração ocorre em condições anaeróbias, o lactato não se acumula, e o piruvato constitui o principal produto final da glicólise. O piruvato é oxidado subsequentemente a CO₂ e água (**Figura 17-1**). Quando o suprimento de oxigênio é fraco, a reoxidação mitocondrial do NADH formado durante a glicólise é prejudicada, e NADH é reoxidado pela redução de piruvato a lactato, permitindo, assim, que a glicólise continue. Embora a glicólise possa ocorrer em condições anaeróbias, isso tem um preço, pois o processo limita a quantidade de ATP formada por mol de glicose oxidada, de modo que uma quantidade muito maior de glicose precisa ser metabolizada em condições anaeróbias do que em condições aeróbias (Tabela 17-1). Nas leveduras e em alguns outros microrganismos, o piruvato formado na glicólise anaeróbia não é reduzido a lactato, mas, sim, descarboxilado e reduzido a etanol.

AS REAÇÕES DA GLICÓLISE CONSTITUEM A PRINCIPAL VIA DE UTILIZAÇÃO DA GLICOSE

A equação geral para a glicólise, desde a glicose até o lactato, é a seguinte:



Todas as enzimas da glicólise (**Figura 17-2**) são citosólicas. A glicose entra na glicólise pela fosforilação a glicose-6-fosfato, catalisada pela **hexocinase**, usando ATP como doador de fosfato. Em condições fisiológicas, a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato pode ser considerada irreversível. A hexocinase é inibida alostericamente pelo seu produto, glicose-6-fosfato.

Em outros tecidos além do fígado (e das células β das ilhotas pancreáticas), a disponibilidade de glicose para a glicólise (ou síntese de glicogênio no músculo, Capítulo 18, e lipogênese no tecido adiposo, Capítulo 23) é controlada pelo seu transporte na célula, o qual, por sua vez, é regulado pela **insulina**. A hexocinase tem alta afinidade (baixo valor de K_m) para a glicose e, no fígado, está saturada em condições normais, de modo que atua em velocidade constante para fornecer glicose-6-fosfato e atender às necessidades do fígado. As células hepáticas também contêm uma isoenzima da hexocinase, a **glicocinase**, cujo valor de K_m é muito mais alto do que

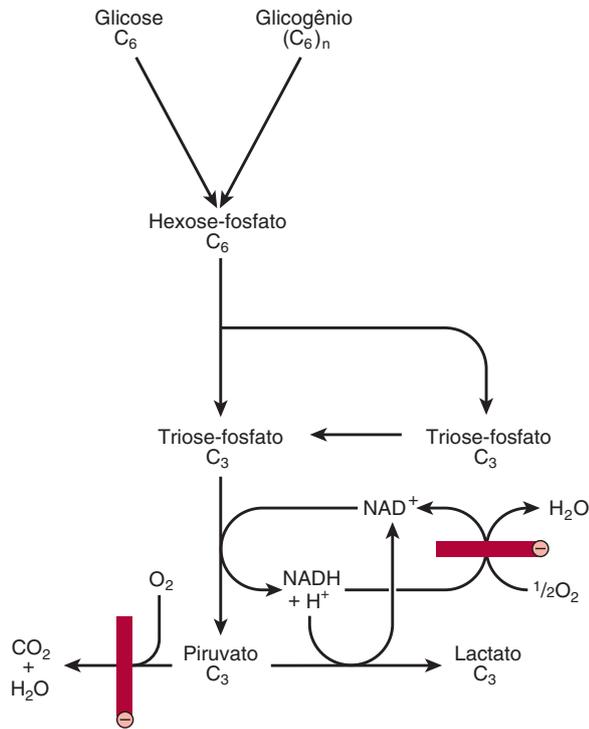


FIGURA 17-1 Resumo da glicólise. ⊖, bloqueada em condições anaeróbicas ou pela ausência de enzimas respiratórias essenciais na mitocôndria, como observado nas hemácias.

TABELA 17-1 Formação de ATP no catabolismo da glicose

Via	Reação catalisada por	Método de formação de ATP	ATP por mol de glicose
Glicólise	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5 ^a
	Fosfoglicerato-cinase	Fosforilação em nível do substrato	2
	Piruvato-cinase	Fosforilação em nível do substrato	2
			9
	Consumo de ATP para as reações da hexocinase e da fosfofrutocinase		-2
			Total líquido 7
Ciclo do ácido cítrico	Piruvato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	Isocitrato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	α -Cetoglutarato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
	Succinato-tiocinase	Fosforilação em nível de substrato	2
	Succinato-desidrogenase	Oxidação de 2 FADH ₂ na cadeia respiratória	3
	Malato-desidrogenase	Oxidação de 2 NADH na cadeia respiratória	5
			Total líquido 25
	Total por mol de glicose em condições aeróbicas		32
	Total por mol de glicose em condições anaeróbicas		2

^a Pressupõe-se que o NADH formado durante a glicólise é transportado para as mitocôndrias pela lançadeira de malato (Figura 13-13). Se for utilizada a lançadeira de glicero-fosfato, haverá formação de apenas 1,5 ATP por mol de NADH. Observe que existe uma vantagem considerável em utilizar glicogênio, em vez de glicose, para a glicólise anaeróbia nos músculos, visto que o produto da glicogênio fosforilase é glicose-1-fosfato (Figura 18-1), que é interconvertível com glicose-6-fosfato. Isso poupa o ATP que, de outro modo, seria utilizado pela hexocinase, aumentando o rendimento líquido de ATP de 2 para 3 por molécula de glicose.

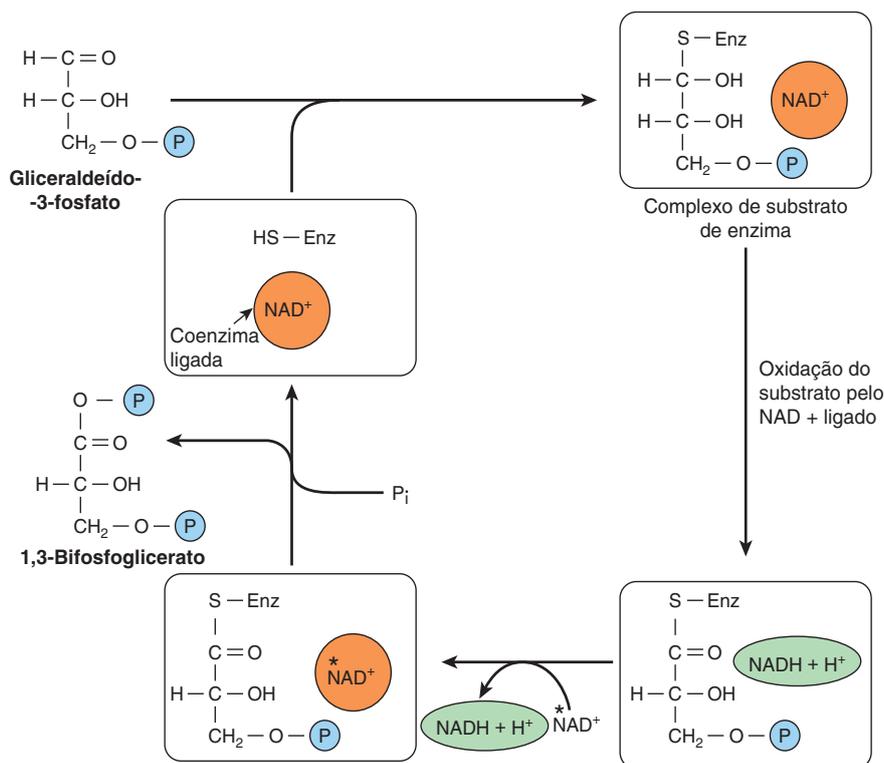


FIGURA 17-3 Mecanismo de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. (Enz, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.) A enzima é inibida pelo —SH do veneno iodoacetato, que é, assim, capaz de inibir a glicólise. O NADH produzido sobre a enzima não está firmemente ligado a ela, como o NAD^+ . Como consequência, o NADH é facilmente deslocado por outra molécula de NAD^+ .

que entra na via glicolítica. A toxicidade do arsênico decorre da competição do arsenato com o fosfato inorgânico (P_i) nessa reação, produzindo 1-arseno-3-fosfoglicerato, que sofre hidrólise espontânea a 3-fosfoglicerato, sem formar ATP. O 3-fosfoglicerato é isomerizado a 2-fosfoglicerato pela **fosfoglicerato-mutase**. É provável que o 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) seja um intermediário nessa reação.

A etapa subsequente é catalisada pela **enolase** e envolve uma desidratação, formando fosfoenolpiruvato. A enolase é inibida por **fluoreto**, e quando amostras de sangue são coletadas para dosagem de glicose, a glicólise é inibida pela coleta do sangue em tubos contendo fluoreto. A enolase também é dependente da presença de íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} . O fosfato do fosfoenolpiruvato é transferido para o ADP em outra fosforilação em nível do substrato, catalisada pela **piruvato-cinase**, formando duas moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada. A reação da piruvato-cinase é essencialmente irreversível em condições fisiológicas, em parte devido à grande variação de energia livre envolvida e, em parte, devido ao produto imediato da reação catalisada pela enzima ser o enolpiruvato, que sofre isomerização espontânea a piruvato, de modo que o produto da reação não está disponível para sofrer a reação inversa.

A disponibilidade de oxigênio determina qual das duas vias é seguida. Em **condições anaeróbias**, o NADH não pode ser reoxidado por meio da cadeia respiratória, e o piruvato é reduzido a lactato catalisado pela **lactato-desidrogenase**. Isso permite a oxidação de NADH, possibilitando que outra

molécula de glicose passe pela glicólise. Em **condições aeróbias**, o piruvato é transportado para a mitocôndria e sofre descarboxilação oxidativa à acetil-CoA seguido de oxidação a CO_2 no ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16). Os equivalentes redutores do NADH formado na glicólise são captados pela mitocôndria para oxidação através da lançadeira malato-aspartato ou da lançadeira glicerofosfato (ver Capítulo 13).

OS TECIDOS QUE FUNCIONAM EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA PRODUZEM LACTATO

Isso é verdadeiro para o músculo esquelético, sobretudo para as fibras brancas, em que a intensidade de trabalho e, portanto, a necessidade de formação de ATP, pode ultrapassar a velocidade de captação e utilização do oxigênio. A glicólise nas hemácias sempre termina em lactato, pois as reações subsequentes de oxidação do piruvato são mitocondriais, e as hemácias carecem de mitocôndrias. Outros tecidos que normalmente obtêm grande parte de sua energia a partir da glicólise e que produzem lactato incluem o encéfalo, o trato gastrointestinal (TGI), a medula renal, a retina e a pele. A produção de lactato também aumenta em caso de choque séptico, e muitos tipos de câncer também produzem lactato. O fígado, os rins e o coração geralmente captam o lactato e o oxidam, porém produzem-no apenas em condições de hipóxia.

Quando a produção de lactato está elevada, como no exercício físico vigoroso, em caso de choque séptico e na caquexia do câncer, grande parte é utilizada pelo fígado para a gliconeogênese (ver Capítulo 19), resultando em aumento da taxa metabólica para produzir o ATP e o GTP necessários. O aumento do consumo de oxigênio em consequência da oxidação aumentada de combustíveis metabólicos para fornecer o ATP e o GTP essenciais para a gliconeogênese é considerado como **débito de oxigênio** após exercício físico vigoroso.

Em algumas condições, pode haver formação de lactato no citosol; todavia, esse lactato entra nas mitocôndrias para ser oxidado a piruvato e prosseguir o seu metabolismo. Isso fornece uma via para a transferência de equivalentes redutores a partir do citosol para as mitocôndrias para a cadeia de transporte de elétrons, além das lançadeiras glicerofosfato (ver Figura 13-12) e malato-aspartato (ver Figura 13-13).

A GLICÓLISE É REGULADA EM TRÊS ETAPAS QUE ENVOLVEM REAÇÕES QUE NÃO ESTÃO EM EQUILÍBRIO

Embora a maioria das reações da glicólise seja livremente reversível, três são marcadamente exergônicas e devem, portanto, ser consideradas fisiologicamente irreversíveis. Essas reações, que são catalisadas pela **hexocinase** (e glicocinase), **fosfofrutocinase** e **piruvato-cinase**, constituem os principais locais de regulação da glicólise. A fosfofrutocinase é significativamente inibida por concentrações intracelulares normais de ATP. Conforme discutido no Capítulo 19, essa inibição pode ser rapidamente aliviada por 5' AMP que se forma à medida que o ADP começa a se acumular, sinalizando a necessidade de aumentar a velocidade da glicólise. As células com capacidade de **gliconeogênese** (que reverte a via glicolítica, Capítulo 19) possuem diferentes enzimas que catalisam reações para reverter essas etapas irreversíveis: a glicose-6-fosfatase, a frutose-1,6-bisfosfatase e, para reverter a reação da piruvato-cinase, a piruvato-carboxilase e a fosfoenolpiruvato-carboxicinas. A regulação recíproca da fosfofrutocinase na glicólise e da frutose-1,6-bisfosfatase na gliconeogênese é discutida no Capítulo 19.

A **frutose** entra na glicólise por fosforilação a frutose-1-fosfato e transpõe as principais etapas reguladoras, resultando na formação de mais piruvato e acetil-CoA do que o necessário para a formação de ATP. No fígado e no tecido adiposo, isso leva ao aumento da lipogênese, de modo que um grande consumo de frutose pode representar um fator no desenvolvimento da obesidade.

Nas hemácias, o primeiro local de formação de ATP na glicólise pode ser contornado

Nas hemácias, a reação catalisada pela **fosfoglicerato-cinase** pode ser, até certo ponto, contornada pela reação da **bifosfoglicerato mutase**, que catalisa a conversão do 1,3-bifosfoglicerato em 2,3-bifosfoglicerato, seguida de hidrólise a 3-fosfoglicerato

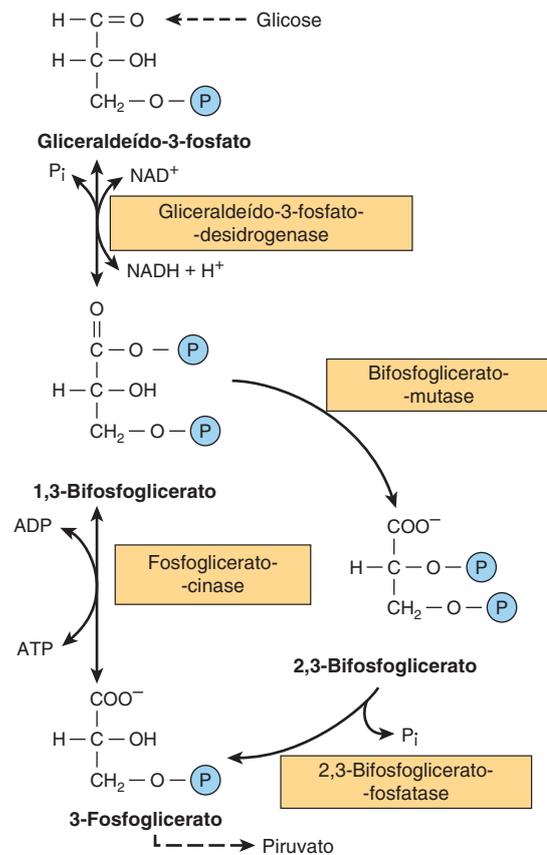


FIGURA 17-4 A via do 2,3-bifosfoglicerato nas hemácias.

e Pi, em uma reação catalisada pela **2,3-bifosfoglicerato-fosfatase** (Figura 17-4). Essa via não envolve ganho líquido de ATP da glicólise, mas fornece 2,3-bifosfoglicerato, que se liga à hemoglobina, diminuindo sua afinidade por oxigênio, tornando o oxigênio mais prontamente disponível para os tecidos (ver Capítulo 6).

A OXIDAÇÃO DE PIRUVATO À ACETIL-CoA CONSTITUI A VIA IRREVERSÍVEL DA GLICÓLISE PARA O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

O piruvato, formado no citosol, é transportado para as mitocôndrias através de um simporte de prótons. No interior das mitocôndrias, o piruvato sofre descarboxilação oxidativa à acetil-CoA por um complexo multienzimático que está associado à membrana mitocondrial interna. Esse complexo multienzimático, **complexo da piruvato-desidrogenase**, é análogo ao complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase do ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16). O piruvato é descarboxilado pelo componente **piruvato-desidrogenase** do complexo enzimático, formando um derivado hidroxietil do anel tiazólico da **timina-difosfato** ligada à enzima, que, por sua vez, reage com a lipoamida oxidada, o grupo prostético da **di-hidrolipoil-transacetilase**, formando acetil-lipoamida (Figura 17-5).

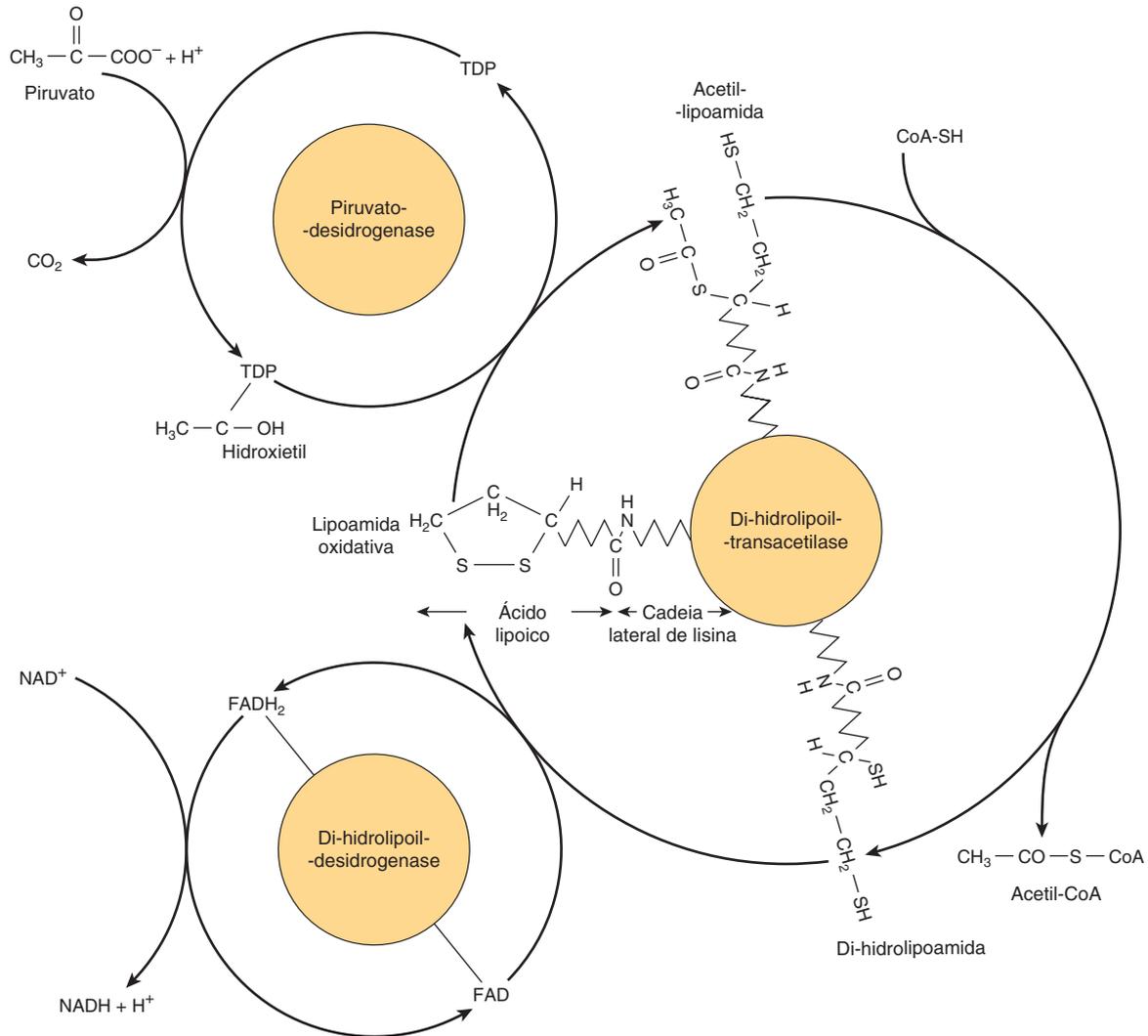


FIGURA 17-5 Descarboxilação oxidativa do piruvato pelo complexo da piruvato-desidrogenase. O ácido lipoico une-se por uma ligação amida a um resíduo de lisina do componente transacetilase do complexo enzimático. Ele forma um longo braço flexível, possibilitando a rotação sequencial do grupamento prostético ácido lipoico entre os sítios ativos de cada uma das enzimas do complexo. (FAD, flavina adenina dinucleotídeo; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo; TDP, tiamina-difosfato.)

A tiamina é a vitamina B_1 (ver Capítulo 44) e a sua deficiência compromete o metabolismo da glicose, ocorrendo acidose láctica e acidose pirúvica significativas (e potencialmente fatais). A acetil-lipoamida reage com a coenzima A para formar acetil-CoA e lipoamida reduzida. A reação é finalizada quando a lipoamida reduzida é reoxidada por uma flavoproteína, a **di-hidrolipoil-desidrogenase**, que contém FAD. Por fim, a flavoproteína reduzida é oxidada pelo NAD^+ , que, por sua vez, transfere equivalentes redutores à cadeia respiratória. A reação global é:



O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em um número de cadeias polipeptídicas de cada uma das três enzimas componentes, e os intermediários não se dissociam, eles são canalizados de um sítio enzimático para o próximo. Isso aumenta a velocidade da reação e previne reações laterais, aumentando a eficiência geral.

A piruvato-desidrogenase é regulada por inibição pelos produtos finais e por modificação covalente

A piruvato-desidrogenase é inibida pelos seus produtos, acetil-CoA e NADH (Figura 17-6). É também regulada pela fosforilação (catalisada por uma cinase) de três resíduos de serina no componente piruvato-desidrogenase do complexo multienzimático, resultando em diminuição da atividade, e por desfosforilação (catalisada por uma fosfatase), que provoca aumento da atividade. A cinase é ativada por aumentos das razões $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$, $[\text{acetil-CoA}]/[\text{CoA}]$ e $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$. Assim, a piruvato-desidrogenase – e, portanto, a glicólise – é inibida quando existe uma quantidade adequada de ATP disponível (e coenzimas reduzidas para a formação de ATP) e também quando ocorre oxidação de ácidos graxos. No jejum, quando aumentam as concentrações de ácidos graxos não esterificados, verifica-se uma diminuição na proporção da enzima na

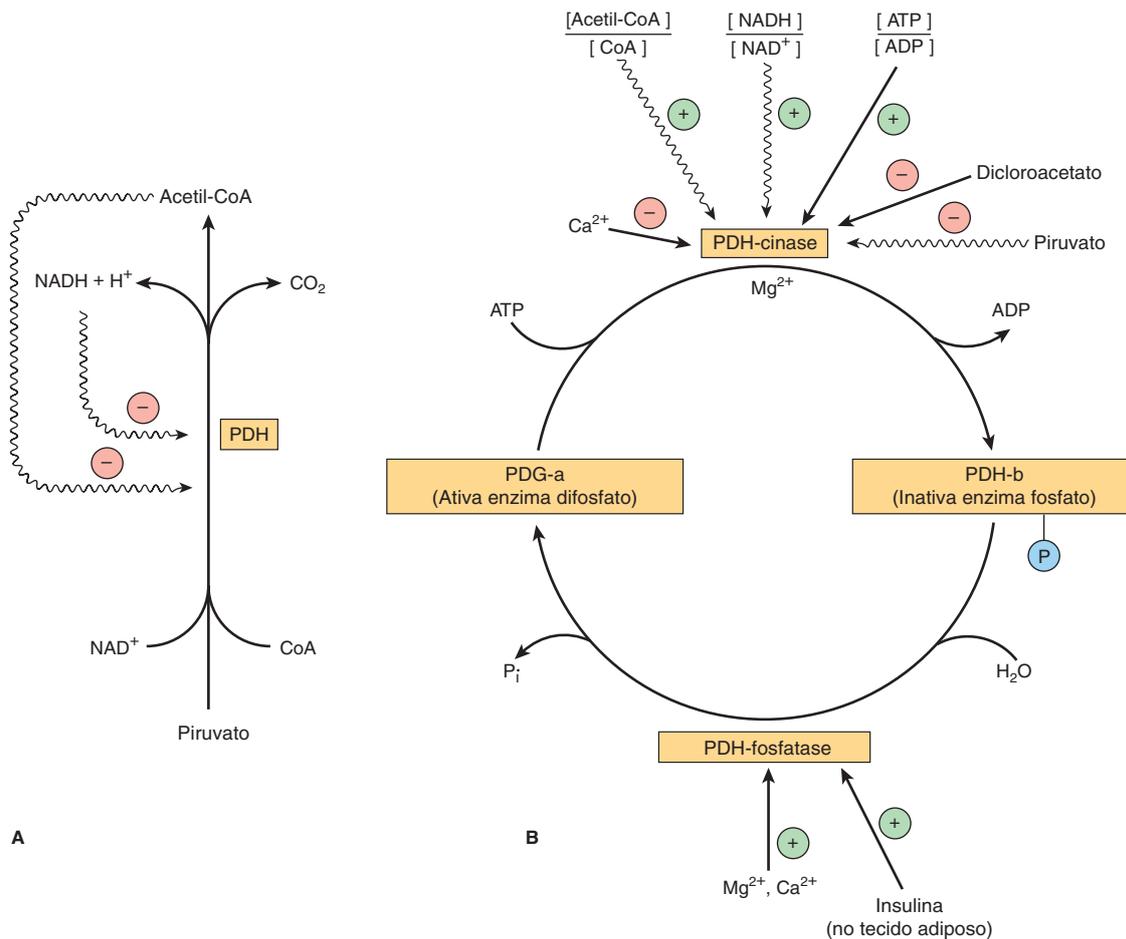


FIGURA 17-6 Regulação da piruvato-desidrogenase (PDH). As setas onduladas indicam efeitos alostéricos. **(A)** Regulação por inibição pelos produtos finais. **(B)** Regulação por interconversão entre as formas ativa e inativa.

sua forma ativa, resultando em preservação de carboidratos. No tecido adiposo, onde a glicose fornece acetil-CoA para a lipogênese, a enzima é ativada em resposta à insulina.

ASPECTOS CLÍNICOS

A inibição do metabolismo do piruvato leva à acidose láctica

Os íons arsenito e mercúrico reagem com os grupos —SH do ácido lipoico e inibem a piruvato-desidrogenase, assim como na **deficiência de tiamina na dieta** (ver Capítulo 44), levando ao acúmulo de piruvato. Muitos alcoólatras apresentam deficiência de tiamina (devido à alimentação precária e à inibição da absorção de tiamina pelo álcool) e podem desenvolver acidose pirúvica e acidose láctica, potencialmente fatais. Os pacientes com **deficiência hereditária de piruvato-desidrogenase**, que pode resultar de defeitos em um ou mais dos componentes do complexo enzimático, também apresentam acidose láctica, sobretudo após uma carga de glicose. Devido à dependência cerebral de glicose como fonte de energia, esses defeitos metabólicos frequentemente causam distúrbios neurológicos.

A deficiência hereditária de aldolase A e a deficiência de piruvato-cinase nas hemácias causam **anemia hemolítica**. Os pacientes com **deficiência de fosfofrutocinase muscular** têm baixa capacidade de efetuar exercícios físicos, particularmente quando consomem uma alimentação rica em carboidratos. A capacidade de trabalho progride quando são fornecidos lipídeos como fonte de energia alternativa, por exemplo, durante o jejum prolongado, quando os ácidos graxos livres e os corpos cetônicos no sangue estão aumentados.

RESUMO

- A glicólise é a via citosólica de todas as células de mamíferos para o metabolismo da glicose (ou do glicogênio) a piruvato e lactato.
- A glicólise pode funcionar de modo anaeróbio, regenerando o NAD⁺ oxidado (necessário na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) pela redução do piruvato a lactato.
- O lactato é o produto final da glicólise em condições anaeróbias (p. ex., no músculo em exercício) e nas hemácias, onde não há mitocôndrias para permitir a oxidação adicional do piruvato.
- A glicólise é regulada por três enzimas que catalisam reações que não estão em equilíbrio: a hexocinase, a fosfofrutocinase e a piruvato-cinase.

- Nas hemácias, o primeiro local de glicólise para a produção de ATP pode ser contornado, levando à formação de 2,3-bisfosfoglicerato, que é importante na diminuição da afinidade da hemoglobina pelo O₂.
- O piruvato é oxidado à acetil-CoA por um complexo multienzimático, a piruvato-desidrogenase, que depende de um cofator derivado de vitamina, a tiamina-difosfato.
- As condições que comprometem o metabolismo do piruvato frequentemente levam à acidose láctica.

REFERÊNCIAS

- Behal RH, Buxton DB, Robertson JG, Olson MS: Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu Rev Nutr* 1993;13:497.
- Boiteux A, Hess B: Design of glycolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981;293:5.
- Cairns SP: Lactic acid and exercise performance: culprit or friend? *Sports Med* 2006;36:279.
- Fall PJ, Szerlip HM: Lactic acidosis: from sour milk to septic shock. *J Intensive Care Med* 2005;20:255.
- Fothergill-Gilmore LA: The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem Sci* 1986;11:47.
- Gladden LB: Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol* 2004;558:5.
- Gladden LB: A lactatic perspective on metabolism. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:477.
- Kim J-W, Dang CV: Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 2005;30:142.
- Lalau JD: Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf* 2010;33:727.
- Levy B: Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006;1:315.
- Maj MC, Cameron JM, Robinson BH: Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: orphan disease or an under-diagnosed condition? *Mol Cell Endocrinol* 2006;249:1.
- Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G: Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *J Neurosci Res* 2005;79:240.
- Patel KP, O'Brien TW: The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab* 2012;105:34.
- Patel MS, Korotchkina LG: Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans* 2006;34:217.
- Philp A, Macdonald AL, Watt PW: Lactate—a signal coordinating cell and systemic function. *J Exp Biol* 2005;208:4561.
- Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, et al: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J* 2004;381:561.
- Roberts RA, Ghiasvand F, Parker D: Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol* 2004;287:R502.
- Sugden MC, Holness MJ: Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* 2006; 112:139.
- Wasserman DH: Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state. *Annu Rev Physiol* 1995;57:191.

Metabolismo do glicogênio

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a estrutura do glicogênio e a sua importância como reserva de carboidratos.
- Descrever a síntese e a degradação do glicogênio e a maneira como os processos são regulados em resposta à ação hormonal.
- Descrever os vários tipos de doenças de armazenamento de glicogênio.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O glicogênio é o principal carboidrato de armazenamento nos animais, correspondendo ao amido nas plantas. Trata-se de um polímero ramificado de α -D-glicose (ver Figura 15-12). Ocorre principalmente no fígado e nos músculos, com presença de quantidades modestas no encéfalo. Embora o teor de glicogênio no fígado seja maior do que o do músculo, cerca de 75% do glicogênio corporal total se encontram nos músculos, visto que a massa muscular do corpo é consideravelmente maior do que a do fígado (**Tabela 18-1**).

O glicogênio muscular fornece uma fonte prontamente disponível de glicose-1-fosfato para a glicólise dentro do próprio músculo. O glicogênio hepático atua como uma reserva para manter a concentração de **glicose sanguínea** em estado de jejum. A concentração hepática de glicogênio é cerca de 450 mmol/L equivalentes de glicose após uma refeição, caindo para cerca de 200 mmol/L após uma noite em jejum; depois de 12 a 18 horas de jejum, o glicogênio hepático está quase completamente esgotado. Embora o glicogênio muscular não forneça glicose livre diretamente (já que os músculos não possuem glicose-6-fosfatase), o piruvato formado pela glicólise nos músculos pode passar por transaminação à alanina, que é exportada dos músculos e utilizada na gliconeogênese hepática (ver Figura 19-4). As **doenças de armazenamento do glicogênio** constituem um grupo de distúrbios hereditários que se caracterizam pela mobilização deficiente de glicogênio ou pelo depósito de formas anormais de glicogênio, levando à lesão hepática e à fraqueza muscular; algumas doenças de armazenamento de glicogênio resultam em morte precoce.

A estrutura do glicogênio altamente ramificada (ver Figura 15-12) fornece um grande número de sítios para a glicogenólise, permitindo rápida liberação de glicose-1-fosfato para a atividade muscular. Os atletas de resistência exigem

uma liberação mais lenta e sustentada de glicose-1-fosfato. A formação de pontos de ramificação no glicogênio é mais lenta do que a adição de unidades de glicose a uma cadeia linear, e alguns atletas de resistência praticam a **carga de carboidratos** – isto é, exercício físico até a exaustão (quando o glicogênio muscular é, em grande parte, esgotado), seguido de refeição rica em carboidratos, resultando na rápida síntese de glicogênio com menos pontos de ramificação do que o normal.

A GLICOGÊNESE OCORRE PRINCIPALMENTE NOS MÚSCULOS E NO FÍGADO

A biossíntese de glicogênio envolve UDP-glicose

Como na glicólise, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato, catalisada pela **hexocinase** nos músculos e pela **glicocinase** no fígado (**Figura 18-1**). A glicose-6-fosfato é isomerizada a glicose-1-fosfato pela **fosfoglicomutase**. A própria enzima é fosforilada, e o grupamento fosfato participa de uma reação reversível em que a glicose-1,6-bisfosfato é um intermediário. A seguir, a glicose-1-fosfato reage com o trifosfato de uridina (UTP) formando o nucleotídeo ativo **uridina-difosfato-glicose (UDPGlc)** e pirofosfato (**Figura 18-2**), catalisada pela **UDPGlc-pirofosforilase**. A reação ocorre na direção da formação de UDPGlc, pois a **pirofosfatase** catalisa a hidrólise do pirofosfato a 2 × fosfato, removendo, assim, um dos produtos da reação. A UDPGlc-pirofosforilase tem uma K_m baixa para glicose-1-fosfato e está presente em quantidades relativamente grandes, de forma que não é uma etapa reguladora na síntese de glicogênio.

TABELA 18-1 Armazenamento de carboidratos em um ser humano de 70 kg

	Porcentagem de peso tecidual	Peso tecidual	Conteúdo corporal (g)
Glicogênio hepático	5,0	1,8 kg	90
Glicogênio muscular	0,7	35 kg	245
Glicose extracelular	0,1	10 L	10

As etapas iniciais na síntese de glicogênio envolvem a proteína **glicogenina**, uma proteína de 37 kDa que é glicosilada em um resíduo de tirosina específico pela UDPGlc. A glicogenina catalisa a transferência de mais sete resíduos de glicose da UDPGlc, em uma ligação 1 → 4, formando um **primer de glicogênio**, que é o substrato para a glicogênio-sintase. A glicogenina permanece no núcleo do grânulo de glicogênio (ver Figura 15-12). A **glicogênio-sintase** catalisa a formação de uma ligação glicosídica entre o C-1 da glicose da UDPGlc e o

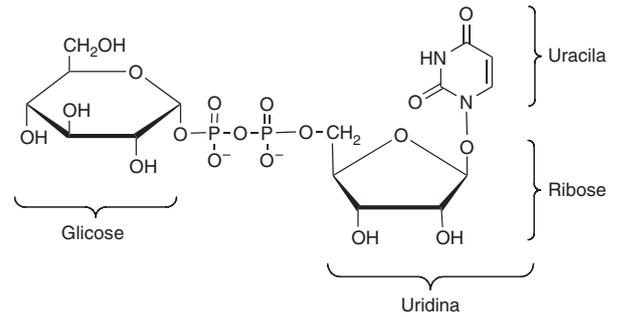


FIGURA 18-2 Uridina-difosfato-glicose (UDPGlc).

C-4 de um resíduo terminal de glicose do glicogênio, liberando difosfato de uridina (UDP). A adição de um resíduo de glicose a uma cadeia de glicogênio preexistente, ou “iniciador”, ocorre na extremidade externa não redutora da molécula, com consequente alongamento dos ramos da molécula de glicogênio à medida que são formadas as ligações 1 → 4 sucessivas (**Figura 18-3**).

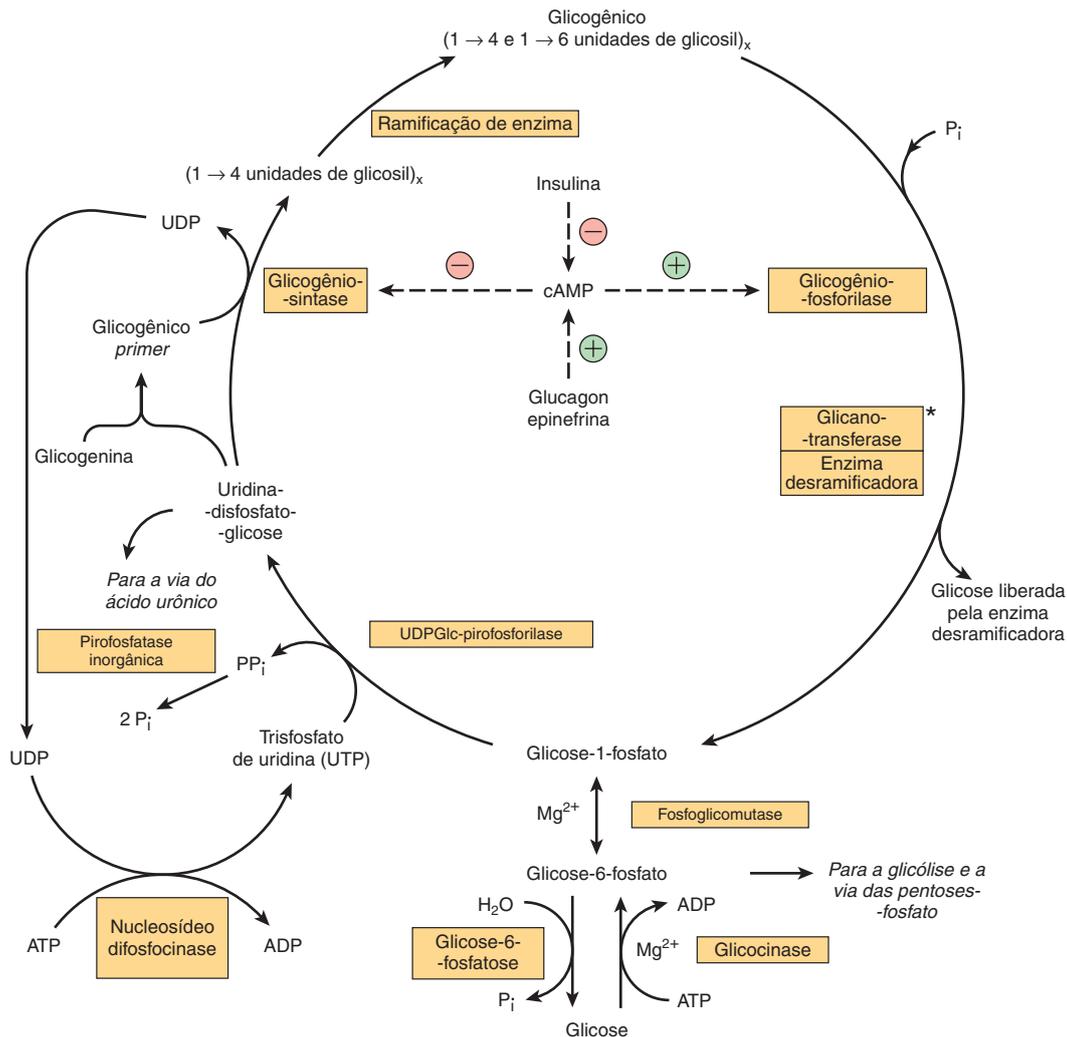


FIGURA 18-1 Vias de glicogênese e de glicogenólise no fígado. (⊕, Estimulação; ⊖, inibição.) A insulina diminui o nível de cAMP somente após ter sido elevada pelo glucagon ou pela epinefrina, isto é, ela antagoniza as suas ações. O glucagon é ativo no músculo cardíaco, mas não no músculo esquelético. *A glicano-transferase e a enzima desramificadora parecem ser duas atividades distintas da mesma enzima.

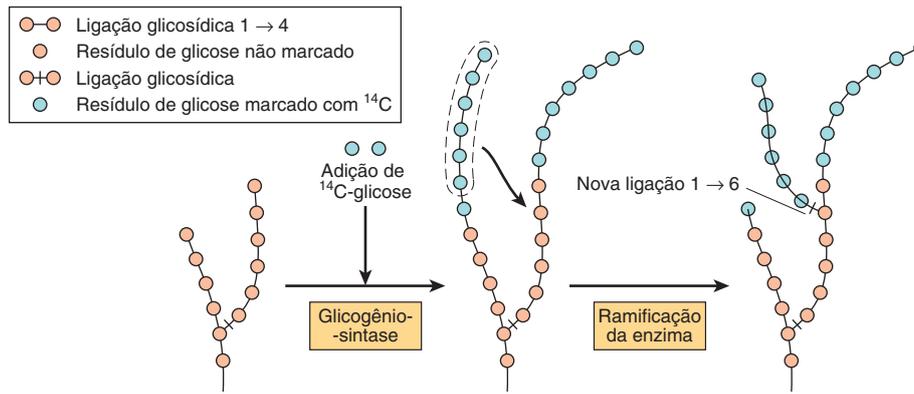


FIGURA 18-3 Biossíntese do glicogênio. Mecanismo de ramificação, conforme revelado pela ingestão de glicose marcada com ^{14}C e pelo exame do glicogênio hepático em determinados intervalos.

A ramificação envolve a separação das cadeias de glicogênio existentes

Quando a cadeia em crescimento tem um comprimento de pelo menos 11 resíduos de glicose, uma **enzima ramificadora** transfere uma parte da cadeia $1 \rightarrow 4$ (pelo menos seis resíduos de glicose) para uma cadeia adjacente, formando uma ligação $1 \rightarrow 6$, estabelecendo um **ponto de ramificação**. Os ramos crescem por adições subsequentes de unidades glicosil $1 \rightarrow 4$ e ramificações adicionais.

A GLICOGÊNOLISE NÃO É O INVERSO DA GLICOGÊNESE, MAS UMA VIA DISTINTA

A **glicogênio-fosforilase** catalisa a etapa limitadora da velocidade da glicogênólise – a clivagem fosforolítica (fosforólise; comparar com hidrólise) das ligações $1 \rightarrow 4$ do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato (**Figura 18-4**). Existem diferentes isoenzimas da glicogênio fosforilase no fígado, no músculo e no cérebro, codificadas por diferentes genes. A glicogênio-fosforilase requer a presença de piridoxal-fosfato (ver Capítulo 44) como coenzima. Ao contrário das reações do metabolismo dos aminoácidos (ver Capítulo 28), em que o grupamento aldeído da coenzima é o grupo reativo, na fosforilase, é o grupamento fosfato que é cataliticamente ativo.

Os resíduos glicosil terminais das cadeias mais externas da molécula de glicogênio são removidos de modo sequencial até restarem aproximadamente quatro resíduos de glicose em cada um dos lados de uma ramificação $1 \rightarrow 6$ (**Figura 18-4**). A **enzima desramificadora** possui dois sítios catalíticos distintos em uma única cadeia polipeptídica. Um deles é uma glicano-transferase, que transfere uma unidade trissacarídica de uma ramificação para outra, expondo o ponto de ramificação $1 \rightarrow 6$. O outro é uma 1,6-glicosidase, que catalisa a hidrólise da ligação glicosídica $1 \rightarrow 6$, com liberação de glicose livre. Então, a ação subsequente da fosforilase pode ocorrer. A ação combinada da fosforilase e dessas outras enzimas leva à degradação completa do glicogênio.

A reação catalisada pela fosfoglicomutase é reversível, de modo que a glicose-6-fosfato pode ser formada a partir de glicose-1-fosfato. No **fígado**, mas não nos músculos, a **glicose-6-fosfatase** catalisa a hidrólise de glicose-6-fosfato, formando glicose, que é exportada, levando ao aumento da concentração de glicose sanguínea. A glicose-6-fosfatase está no lúmen do retículo endoplasmático liso, e defeitos genéticos do transportador de glicose-6-fosfato podem causar uma variante da doença de armazenamento de glicogênio tipo I (**Tabela 18-2**).

Os grânulos de glicogênio também podem ser englobados por **lisossomos**, onde a maltase ácida catalisa a hidrólise do glicogênio em glicose. Isso pode ser especialmente importante na homeostasia da glicose em recém-nascidos. A falha genética da maltase ácida lisossomal causa a doença de armazenamento de glicogênio tipo II (doença de Pompe, **Tabela 18-2**). O catabolismo lisossomal do glicogênio encontra-se sob controle hormonal.

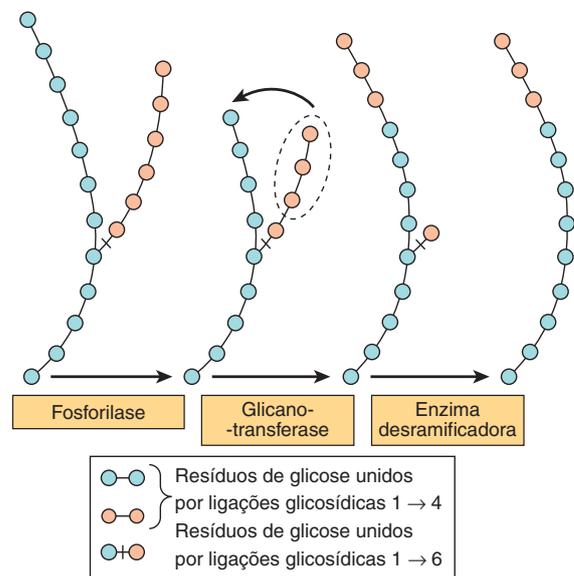


FIGURA 18-4 Etapas da glicogênólise.

TABELA 18-2 Doenças de armazenamento de glicogênio

Tipo	Nome	Deficiência enzimática	Clínicas
0	—	Glicogênio-sintase	Hipoglicemia; hipercetonemia; morte precoce Manifestações
Ia	Doença de Von Gierke	Glicose-6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio nas células hepáticas e nas células tubulares renais; hipoglicemia; acidemia láctica; cetose; hiperlipemia
Ib	—	Transportador de glicose-6-fosfato no retículo endoplasmático	Iguais às do tipo Ia; neutropenia e comprometimento da função dos neutrófilos, resultando em infecções recorrentes
II	Doença de Pompe	$\alpha_1 \rightarrow 4$ e $\alpha_1 \rightarrow 6$ glicosidases lisossomais (maltase ácida)	Acúmulo de glicogênio nos lisossomos: variante de início juvenil, hipotonia muscular, morte por insuficiência cardíaca em torno dos 2 anos de idade; variante de início adulto, distrofia muscular
IIIa	Dextrinose limite, doença de Forbe ou de Cori	Enzima desramificadora hepática e muscular	Hipoglicemia em jejum; hepatomegalia na infância; acúmulo de polissacarídeo ramificado característico (dextrina limitante); fraqueza muscular
IIIb	Dextrinose limite	Enzima desramificadora hepática	Iguais às do tipo IIIa, porém sem fraqueza muscular
IV	Amilopectinose, doença de Andersen	Enzima ramificadora	Hepatoesplenomegalia; acúmulo de polissacarídeo com poucos pontos de ramificação; morte por insuficiência cardíaca ou hepática antes dos 5 anos de idade
V	Deficiência de miofosforilase, síndrome de McArdle	Fosforilase muscular	Pouca tolerância ao exercício; glicogênio muscular anormalmente alto (2,5-4%); nível sanguíneo de lactato muito baixo após o exercício
VI	Doença de Hers	Fosforilase hepática	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
VII	Doença de Tarui	Fosfofrutocinase-1 muscular e eritrocitária	Pouca tolerância ao exercício; glicogênio muscular anormalmente alto (2,5-4%); nível sanguíneo de lactato muito baixo após o exercício; também ocorre anemia hemolítica
VIII		Fosforilase-cinase hepática	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
IX		Fosforilase-cinase hepática e muscular	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado e no músculo; hipoglicemia leve; geralmente com bom prognóstico
X		Proteína-cinase A dependente de cAMP	Hepatomegalia; acúmulo de glicogênio no fígado

O MONOFOSFATO DE ADENOSINA CÍCLICO INTEGRA A REGULAÇÃO DA GLICOGENÓLISE E DA GLICOGÊNESE

As principais enzimas que controlam o metabolismo do glicogênio – a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase – são reguladas em direções opostas por mecanismos alostéricos e modificações covalentes por fosforilação e desfosforilação reversíveis da enzima em resposta à ação hormonal (ver Capítulo 9). A fosforilação da glicogênio-fosforilase aumenta a sua atividade ao passo que a fosforilação da glicogênio-sintase reduz sua atividade.

A fosforilação aumenta em resposta ao monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (**Figura 18-5**) formado a partir do ATP pela **adenilato-ciclase**, localizada na superfície interna das membranas celulares, em resposta a hormônios como **epinefrina**, **norepinefrina** e **glucagon**. O cAMP é hidrolisado pela **fosfodiesterase**, interrompendo, assim, a ação hormonal; no fígado, a insulina aumenta a atividade da fosfodiesterase.

A regulação da glicogênio-fosforilase é diferente no fígado e no músculo

No fígado, o papel do glicogênio consiste em fornecer glicose livre para exportação, a fim de manter a glicemia; no músculo, é fornecer uma fonte de glicose-6-fosfato para a glicólise, em resposta à necessidade de ATP durante a contração muscular. Em ambos os tecidos, a enzima é ativada por fosforilação catalisada pela fosforilase-cinase (produzindo fosforilase a) e inativada por desfosforilação catalisada pela fosfoproteína-fosfatase (produzindo fosforilase b), em resposta a sinais hormonais e outros sinais.

Ocorre supressão instantânea desse controle hormonal. A fosforilase a ativa em ambos os tecidos é alostericamente inibida por ATP e glicose-6-fosfato; no fígado, mas não no músculo, a glicose livre também é um inibidor. A fosforilase muscular difere da isoenzima hepática por ter um sítio de ligação a 5' AMP (**Figura 18-5**), que atua como um ativador alostérico da forma b da enzima desfosforilada (inativa). O 5' AMP atua como um poderoso sinal do estado de energia da célula muscular; ele é formado à medida que a concentração de

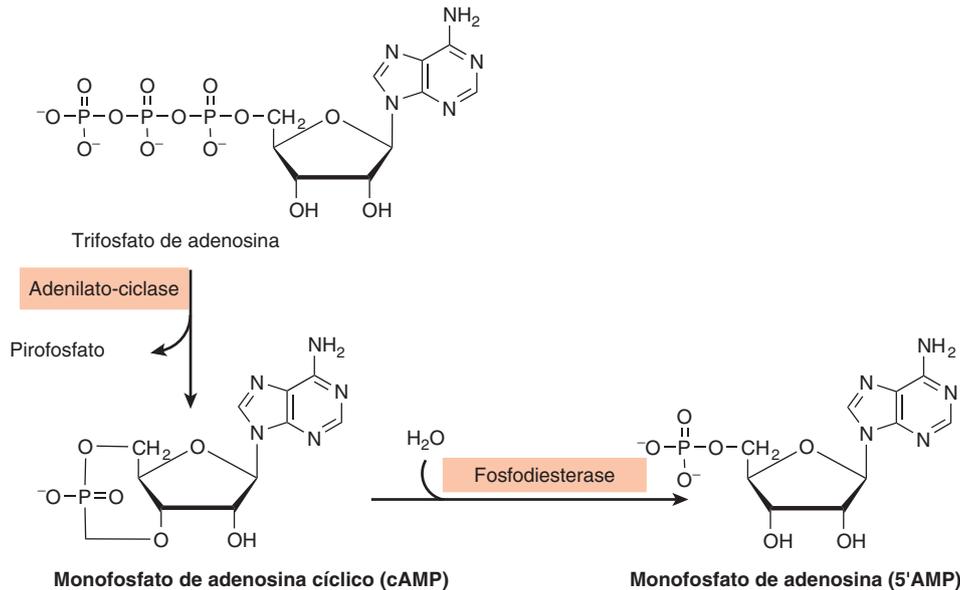


FIGURA 18-5 Formação e hidrólise de AMP cíclico (ácido 3',5'-adenílico, cAMP).

ADP começa a aumentar (indicando a necessidade de elevação do metabolismo do substrato para possibilitar a formação de ATP), em consequência à reação da adenilato-cinase: $2 \times \text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + 5' \text{ AMP}$.

cAMP ATIVA A GLICOGÊNIO FOSFORILASE

A fosforilase-cinase é ativada em resposta ao cAMP (**Figura 18-6**). O aumento da concentração de cAMP ativa a **proteína-cinase dependente de cAMP**, que catalisa a fosforilação pelo ATP da **fosforilase-cinase b** inativa à **fosforilase-cinase a** ativa, a qual, por sua vez, fosforila a fosforilase b para formar fosforilase a. No fígado, ocorre formação de cAMP em resposta ao glucagon, que é secretado em resposta à queda da glicemia. O músculo é insensível ao glucagon; no músculo, o sinal para a formação aumentada de cAMP é a ação da norepinefrina, que é secretada em resposta ao medo ou pavor, quando existe a necessidade de aumentar a glicogenólise para possibilitar uma rápida atividade muscular.

O Ca^{2+} sincroniza a ativação da glicogênio-fosforilase com a contração muscular

A glicogenólise no músculo aumenta várias centenas de vezes no início da contração; o mesmo sinal (aumento da concentração citosólica de íon Ca^{2+}) é responsável pelo início da contração e da glicogenólise. A fosforilase-cinase muscular, que ativa a glicogênio-fosforilase, é um tetrâmero constituído de quatro subunidades diferentes, α , β , γ e δ . As subunidades α e β contêm resíduos de serina, que são fosforilados pela proteína-cinase dependente de cAMP. A subunidade δ é idêntica à proteína

de ligação ao Ca^{2+} , a **calmodulina** (ver Capítulo 42), e liga-se a quatro Ca^{2+} . A ligação do Ca^{2+} ativa o sítio catalítico da subunidade γ , mesmo enquanto a enzima se encontra no estado b desfosforilado; a forma a fosforilada só é totalmente ativada na presença de altas concentrações de Ca^{2+} .

A glicogenólise no fígado pode ser independente de cAMP

No fígado, ocorre ativação da glicogenólise independente de cAMP em resposta à estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos pela epinefrina e pela norepinefrina. Isso envolve a mobilização do Ca^{2+} para o citosol, seguida de estimulação de uma **fosforilase-cinase sensível a Ca^{2+} /calmodulina**. A glicogenólise independente de cAMP também é ativada pela vasopressina, pela ocitocina e pela angiotensina II, atuando por intermédio do cálcio ou da via do fosfatidil-inositol bifosfato (ver Figura 42-10).

A proteína fosfatase-1 inativa a glicogênio-fosforilase

Tanto a fosforilase a quanto a fosforilase-cinase a são desfosforiladas e inativadas pela **proteína-fosfatase-1**. A proteína-fosfatase-1 é inibida por uma proteína, o **inibidor-1**, que está ativa apenas após ter sido fosforilada pela proteína-cinase dependente de cAMP. Assim, o cAMP controla tanto a ativação quanto a inativação da fosforilase (Figura 18-6). A **insulina** reforça esse efeito ao inibir a ativação da fosforilase b, pois, ao aumentar a captação de glicose, leva indiretamente à formação aumentada de glicose-6-fosfato, que é um inibidor da fosforilase-cinase.

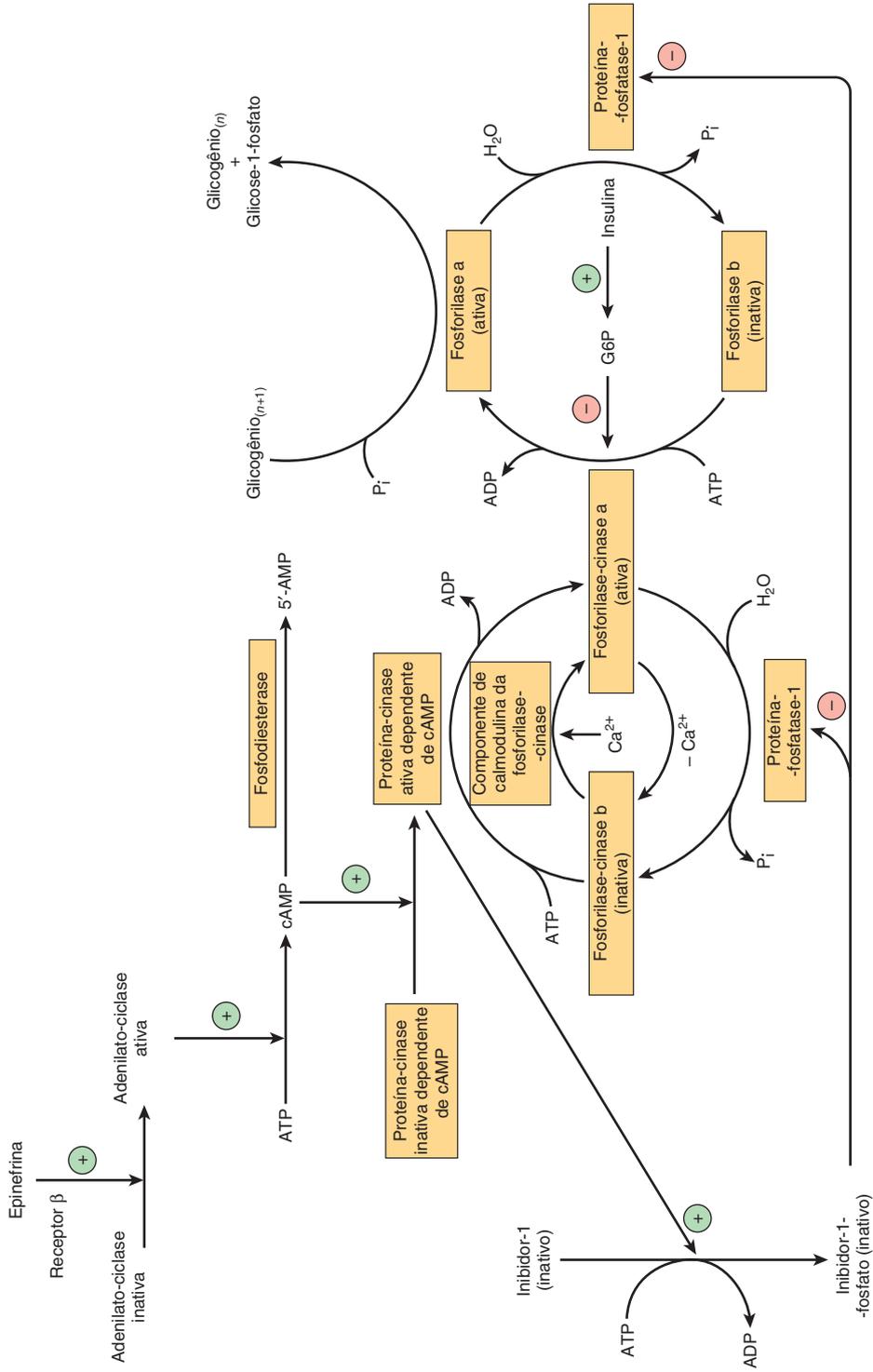


FIGURA 18-6 Controle da glicólise nos músculos. A sequência de reações distribuídas como uma cascata possibilita a amplificação do sinal hormonal a cada etapa. (G6P, glicose-6-fosfato; n , quantidade de resíduos de glicose.)

As atividades da glicogênio-sintase e da fosforilase são reciprocamente reguladas

Existem diferentes isoenzimas da glicogênio-sintase no fígado, no músculo e no encéfalo. À semelhança da fosforilase, a glicogênio-sintase existe nos estados fosforilado e não fosforilado, e o efeito da fosforilação é o inverso daquele observado na fosforilase (Figura 18-7). A **glicogênio-sintase a** ativa é desfosforilada, e a **glicogênio-sintase b** inativa é fosforilada.

Seis proteínas-cinase diferentes atuam sobre a glicogênio-sintase, e existem pelo menos nove resíduos de serina distintos na enzima que podem ser fosforilados. Duas das proteínas-cinase são dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (uma delas é a fosforilase-cinase). Outra cinase é a proteína-cinase dependente de cAMP, que permite que a ação hormonal mediada pelo cAMP iniba a síntese de glicogênio em sincronia com a ativação da glicogenólise. A insulina também promove glicogênese no músculo ao mesmo tempo em que inibe a glicogenólise por aumentar a concentração de glicose-6-fosfato, que estimula a desfosforilação e a ativação da glicogênio-sintase. A desfosforilação da glicogênio-sintase b é efetuada pela proteína-fosfatase-1, que está sob o controle da proteína-cinase dependente de cAMP.

O METABOLISMO DO GLICOGÊNIO É REGULADO POR UM EQUILÍBRIO NAS ATIVIDADES ENTRE A GLICOGÊNIO-SINTASE E A FOSFORILASE

Ao mesmo tempo em que a fosforilase é ativada pelo aumento da concentração de cAMP (via fosforilase-cinase), a glicogênio-sintase é convertida à forma inativa; ambos os efeitos são mediados pela **proteína-cinase dependente de cAMP** (Figura 18-8). Assim, a inibição da glicogenólise aumenta a glicogênese líquida, e a inibição da glicogênese aumenta a glicogenólise líquida. Além disso, a desfosforilação da fosforilase a, da fosforilase-cinase e da glicogênio-sintase b é catalisada por uma única enzima com ampla especificidade – a **proteína-fosfatase-1**. Por sua vez, a proteína-fosfatase-1 é inibida pela proteína-cinase dependente de cAMP por meio do inibidor-1. Portanto, a glicogenólise pode ser interrompida e a glicogênese pode ser estimulada, ou vice-versa, sincronicamente, visto que ambos os processos dependem da atividade da proteína-cinase dependente de cAMP. Tanto a fosforilase-cinase quanto a glicogênio-sintase podem ser reversivelmente fosforiladas

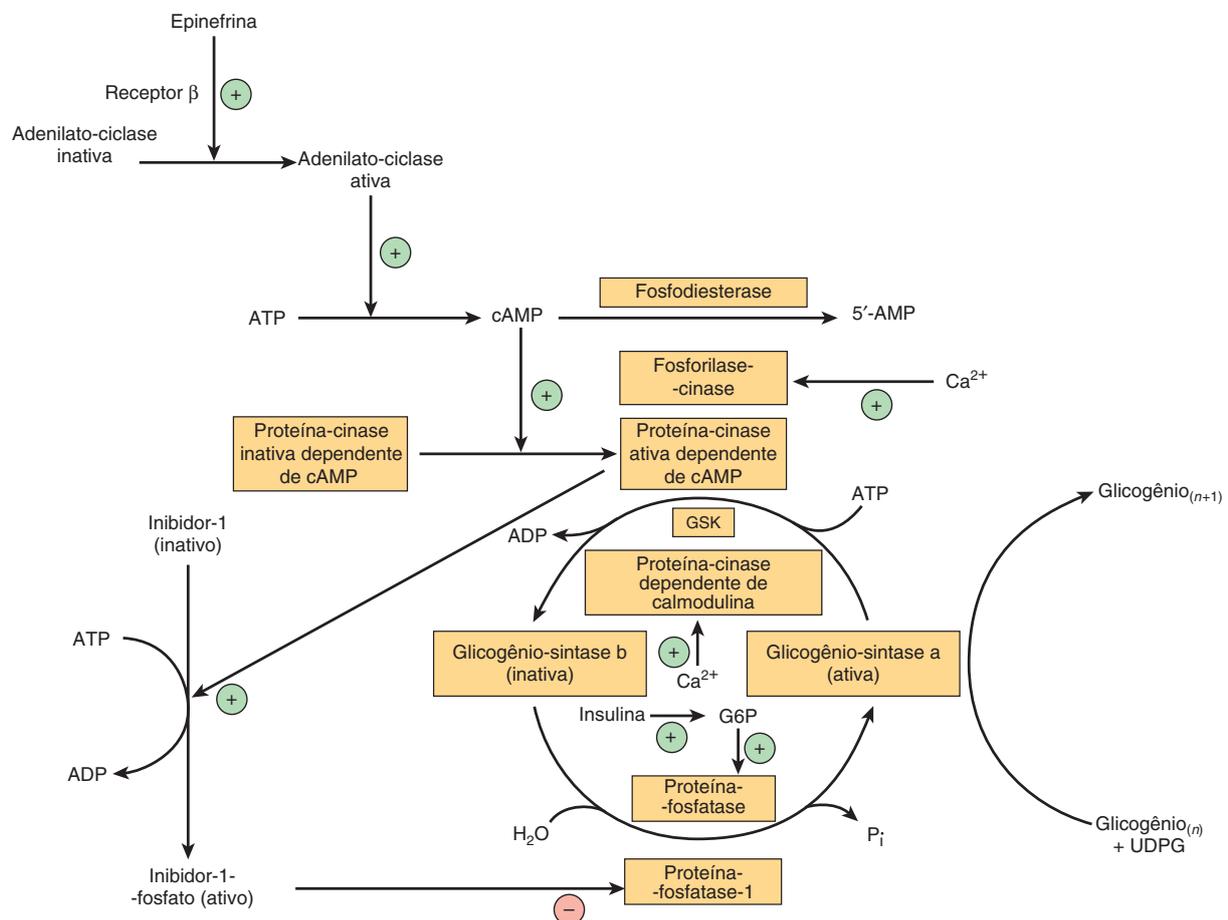


FIGURA 18-7 Controle da glicogênio-sintase no músculo. (G6P, glicose-6-fosfato; GSK, glicogênio-sintase-cinase; n , quantidade de resíduos de glicose.)

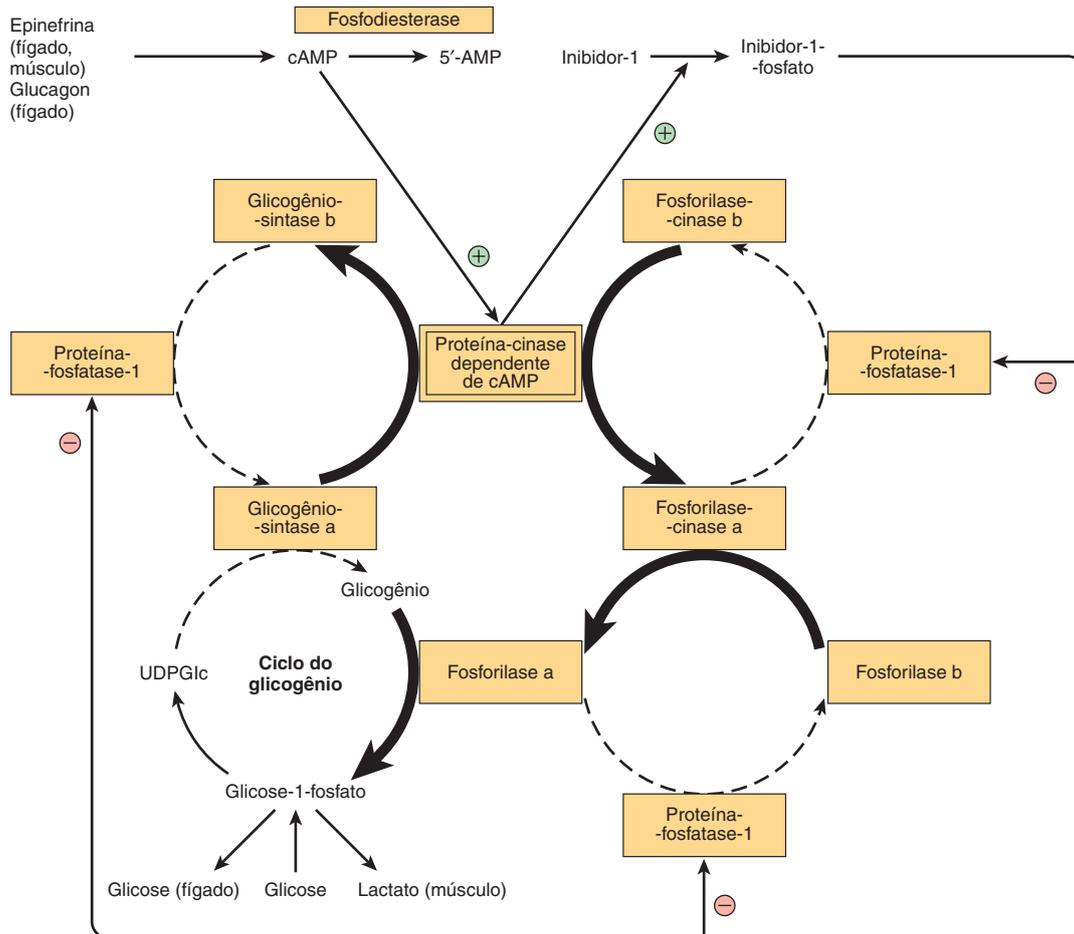


FIGURA 18-8 Controle coordenado da glicogenólise e da glicogênese pela proteína-quinase dependente de cAMP. As reações que levam à glicogenólise em consequência do aumento nas concentrações de cAMP são mostradas com setas em negrito, aquelas inibidas pela ativação da proteína fosfatase-1 são mostradas com setas tracejadas. Observa-se o inverso quando as concentrações de cAMP diminuem como resultado da atividade da fosfodiesterase, levando à glicogênese.

em mais de um sítio por cinases e fosfatases distintas. Essas fosforilações secundárias modificam a sensibilidade dos sítios primários à fosforilação e à desfosforilação (**fosforilação multissítio**). Além disso, possibilitam que a insulina, por meio da elevação da glicose-6-fosfato, exerça efeitos que atuam de modo recíproco aos do cAMP (ver Figuras 18-6 e 18-7).

ASPECTOS CLÍNICOS

As doenças de armazenamento de glicogênio são hereditárias

A “doença de armazenamento de glicogênio” é um termo genérico empregado para descrever um grupo de distúrbios hereditários, caracterizados pelo depósito de um tipo ou de quantidades anormais de glicogênio nos tecidos ou pela incapacidade de mobilizar o glicogênio. As principais doenças estão resumidas na Tabela 18-2.

RESUMO

- O glicogênio representa a principal forma de armazenamento de carboidrato no corpo, principalmente no fígado e no músculo.
- No fígado, a sua principal função consiste em fornecer glicose aos tecidos extra-hepáticos. No músculo, serve principalmente como fonte imediata de combustível metabólico para uso no próprio músculo. O músculo carece de glicose-6-fosfatase e não pode liberar glicose livre a partir de glicogênio.
- O glicogênio é sintetizado a partir da glicose pela via da glicogênese. Ele é degradado por uma via distinta, a glicogenólise.
- O cAMP integra a regulação da glicogenólise e da glicogênese, promovendo simultaneamente a ativação da fosforilase e a inibição da glicogênio-sintase. A insulina atua de modo recíproco, inibindo a glicogenólise e estimulando a glicogênese.
- As deficiências hereditárias de enzimas do metabolismo do glicogênio tanto no fígado quanto no músculo causam as doenças de armazenamento de glicogênio.

REFERÊNCIAS

- Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, et al: A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J* 1995;9:1126.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W: Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998;336:19.
- DiMauro S, Spiegel R: Progress and problems in muscle glycogenoses. *Acta Myol* 2011;30:96.
- Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, et al: Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 2003;546:127–132.
- Forde JE, Dale TC: Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1930.
- Gazzerro E, Andreu AL: Neuromuscular disorders of glycogen metabolism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:333.
- Graham TE, Yuan Z, Hill AK, et al: The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;199:489.
- Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, et al: Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1.
- Jensen J, Lai YC: Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. *Arch Physiol Biochem* 2009;115:13.
- Jensen TE, Richter EA: Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol* 2012; 590:1069.
- McGarry JD, Kuwajima M, Newgard CB, et al: From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. *Annu Rev Nutr* 1987;7:51.
- Meléndez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED: Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J* 1993;295:477.
- Ozen H: Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol* 2007;13:2541.
- Palm DC, Rohwer JM: Regulation of glycogen synthase from mammalian skeletal muscle – a unifying view of allosteric and covalent regulation. *FEBS J* 2013;280:2.
- Philp A, Hargreaves M: More than a store: regulatory roles for glycogen in skeletal muscle adaptation to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E1343.
- Radziuk J, Pye S: Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(4):250.
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA: Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 2012;441:763.
- Roden M, Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans – its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:365.
- Rybicka KK: Glycosomes – the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 1996;28:254.
- Shearer J, Graham TE: New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Can J Appl Physiol* 2002;27:179.
- Shin YS: Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:115.
- Wolfsdorf JI, Holm IA: Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:801.
- Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, et al: Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem Soc Trans* 2001;29:537.

Gliconeogênese e o controle da glicemia

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar a importância da gliconeogênese na homeostasia da glicose.
- Descrever a via da gliconeogênese, como as enzimas irreversíveis da glicólise são contornadas e como a glicólise e a gliconeogênese são reguladas de modo recíproco.
- Explicar como a concentração plasmática de glicose é mantida dentro de limites estreitos nos estados alimentado e de jejum prolongado.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A gliconeogênese é o processo de síntese de glicose ou de glicogênio a partir de precursores não carboidratos. Os principais substratos são os aminoácidos glicogênicos (ver Capítulo 29), o lactato, o glicerol e o propionato. O fígado e o rim constituem os principais tecidos gliconeogênicos; o rim pode contribuir com até 40% da síntese total de glicose em jejum e com uma maior porcentagem na condição de jejum prolongado. As enzimas essenciais da gliconeogênese são expressas no intestino delgado, porém não se sabe ao certo se ocorre produção significativa de glicose pelo intestino em jejum.

Um suprimento de glicose é necessário, principalmente para o sistema nervoso e para as hemácias. Depois de uma noite de jejum, a glicogenólise (ver Capítulo 18) e a gliconeogênese contribuem de modo aproximadamente igual para o nível de glicemia; com a depleção das reservas de glicogênio, a gliconeogênese torna-se progressivamente mais importante.

A falha da gliconeogênese é geralmente fatal. A **hipoglicemia** provoca disfunção cerebral, podendo levar ao coma e à morte. A glicose também é importante na manutenção de concentrações adequadas de intermediários do ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16), inclusive quando ácidos graxos são a principal fonte de acetil-CoA nos tecidos. Além disso, a gliconeogênese remove o lactato produzido pelo músculo e pelas hemácias, bem como o glicerol formado pelo tecido adiposo. Nos ruminantes, o propionato, um produto do metabolismo dos carboidratos no rúmen, é um importante substrato para a gliconeogênese.

Ocorre gliconeogênese excessiva em **pacientes em estado crítico** em resposta à lesão e à infecção, contribuindo para a **hiperglicemia**, a qual está associada a um prognóstico ruim. A hiperglicemia resulta em alterações da osmolalidade dos líquidos corporais, comprometimento do fluxo sanguíneo, acidose

intracelular e produção aumentada de radicais superóxidos (ver Capítulo 45), com consequente perturbação da função endotelial e do sistema imune e comprometimento da coagulação sanguínea. A gliconeogênese excessiva também é um fator que contribui para a hiperglicemia no **diabetes tipo II**, devido à regulação negativa comprometida em resposta à insulina.

A GLICONEOGÊNESE ENVOLVE A GLICÓLISE, O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO E ALGUMAS REAÇÕES ESPECIAIS ADICIONAIS

Barreiras termodinâmicas impedem a simples reversão da glicólise

Três reações que não estão em equilíbrio na glicólise (ver Capítulo 17), catalisadas pela hexocinase, pela fosfofrutocinase e pela piruvato-cinase, impedem a simples reversão da glicólise para a síntese de glicose (**Figura 19-1**). Essas reações são contornadas como mostrado a seguir.

Piruvato e fosfoenolpiruvato

A reversão da reação catalisada pela piruvato-cinase na glicólise envolve duas reações endotérmicas. A **piruvato-carboxilase** mitocondrial catalisa a carboxilação do piruvato a oxalacetato, uma reação com gasto de ATP em que a vitamina biotina é a coenzima. A biotina liga-se ao CO₂ do bicarbonato na forma de carboxibiotina antes da adição do CO₂ ao piruvato (ver Figura 44-17). O oxalacetato resultante é reduzido a malato e exportado da mitocôndria para o citosol, onde é oxidado novamente a oxalacetato. Uma segunda enzima, a

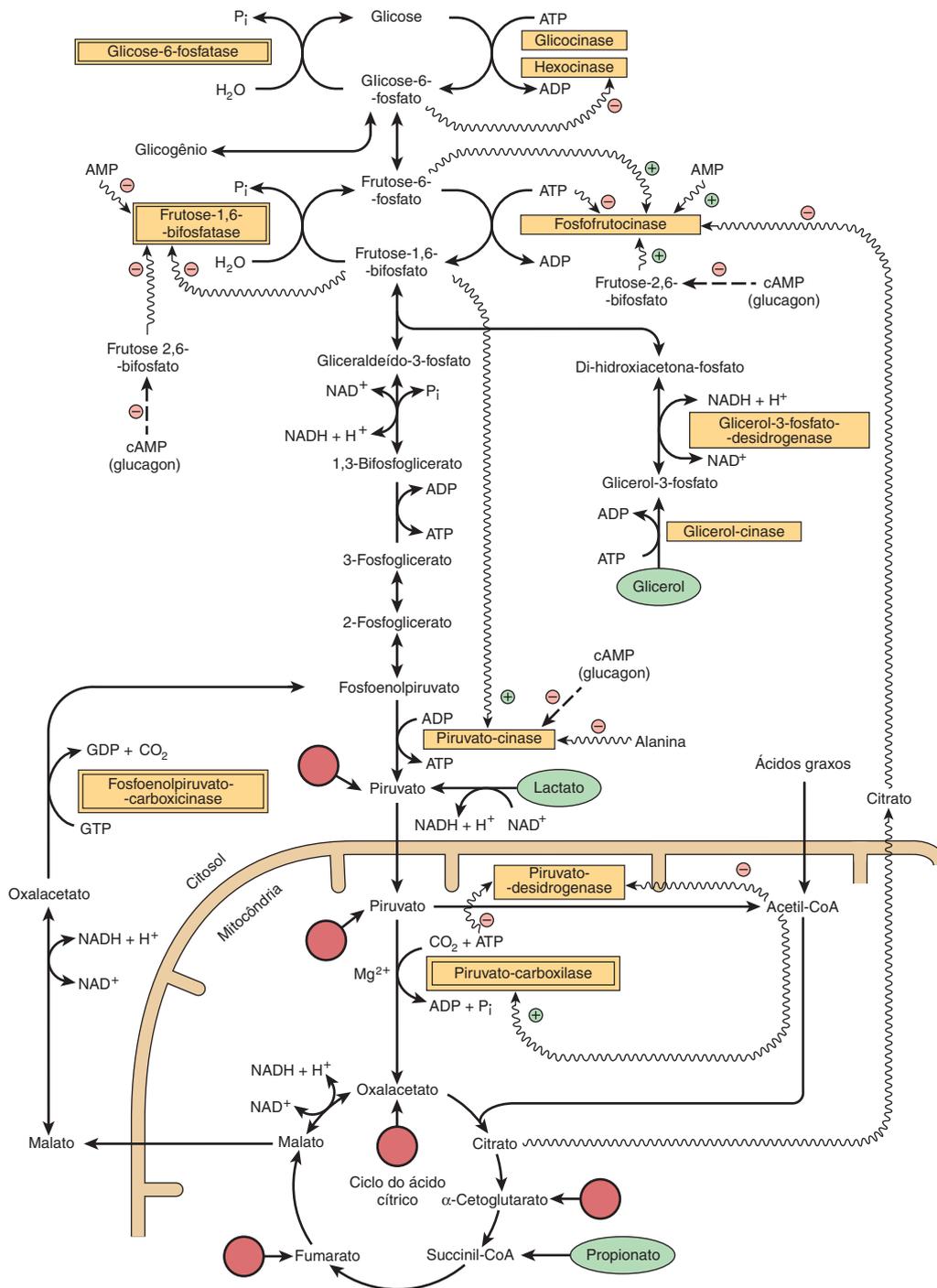


FIGURA 19-1 Principais vias e pontos de regulação da gliconeogênese e da glicólise no fígado. Os pontos de entrada dos aminoácidos glicogênicos após a transaminação estão indicados por setas que se estendem a partir dos círculos (ver também Figura 16-4). As enzimas gliconeogênicas essenciais estão encerradas nos retângulos de duplo contorno. O ATP necessário para a gliconeogênese é fornecido pela oxidação dos ácidos graxos. O propionato apresenta importância quantitativa apenas nos ruminantes. As setas onduladas indicam efeitos alostéricos; as setas tracejadas indicam modificação covalente por fosforilação reversível. A alanina em altas concentrações atua como “sinal gliconeogênico”, inibindo a glicólise na etapa da piruvato-cinase.

fosfoenolpiruvato-carboxicinase, catalisa a descarboxilação e a fosforilação do oxalacetato a fosfoenolpiruvato, utilizando GTP como doador de fosfato. No fígado e no rim, a reação da succinato-tiocinase no ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16) produz GTP (em vez de ATP, conforme observado em outros

tecidos), e o GTP é utilizado na reação da fosfoenolpiruvato-carboxicinase, estabelecendo, assim, uma ligação entre a atividade do ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese, de modo a impedir a remoção excessiva de oxalacetato para a gliconeogênese, o que comprometeria a atividade do ciclo do ácido cítrico.

Frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato

A conversão de frutose-1,6-bifosfato a frutose-6-fosfato, para a reversão da glicólise, é catalisada pela **frutose-1,6-bifosfatase**. A sua presença determina se um tecido é capaz de sintetizar glicose (ou glicogênio) não apenas a partir de piruvato, mas também de trioses-fosfato. Essa enzima está presente no fígado, no rim e no músculo esquelético, mas provavelmente está ausente no coração e no músculo liso.

Glicose-6-fosfato e glicose

A conversão de glicose-6-fosfato à glicose é catalisada pela **glicose-6-fosfatase**. Ela está presente no fígado e nos rins, mas ausente nos músculos, os quais, portanto, não podem exportar glicose para a corrente sanguínea.

Glicose-1-fosfato e glicogênio

A quebra do glicogênio a glicose-1-fosfato é catalisada pela fosforilase. A síntese de glicogênio envolve uma via diferente por meio de uridina-difosfato-glicose e **glicogênio-sintase** (ver Figura 18-1).

As relações entre a gliconeogênese e a via glicolítica estão ilustradas na Figura 19-1. Após transaminação ou desaminação, os aminoácidos glicogênicos dão origem ao piruvato ou aos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Assim, as reações anteriormente descritas podem responder pela conversão do lactato e dos aminoácidos glicogênicos em glicose ou glicogênio.

O propionato é um importante precursor da glicose nos ruminantes; ele entra na gliconeogênese através do ciclo do ácido cítrico. Após esterificação com CoA, o propionil-CoA é carboxilado a D-metilmalonil-CoA, em uma reação catalisada pela **propionil-CoA-carboxilase**, uma enzima dependente de biotina (Figura 19-2). A **metilmalonil-CoA-racemase** catalisa a conversão de D-metilmalonil-CoA em L-metilmalonil-CoA, que, a seguir, sofre isomerização à succinil-CoA, em uma reação catalisada pela **metilmalonil-CoA-mutase**. Nos animais não ruminantes, incluindo os seres humanos, o propionato surge a partir da β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia ímpar que ocorre nos lipídeos dos ruminantes

(ver Capítulo 22), bem como da oxidação da isoleucina e da cadeia lateral do colesterol, e constitui um substrato (relativamente menor) para a gliconeogênese. A metilmalonil-CoA-mutase é uma enzima dependente de vitamina B₁₂, e, na deficiência, o ácido metilmalônico é excretado na urina (**acidúria metilmalônica**).

O glicerol é liberado do tecido adiposo como resultado da lipólise da lipoproteína contendo triacilglicerol no estado alimentado; ele pode ser utilizado para a reesterificação de ácidos graxos livres a triacilglicerol, ou pode ser um substrato para a gliconeogênese no fígado. Durante o jejum, o glicerol liberado a partir da lipólise do triacilglicerol no tecido adiposo é utilizado exclusivamente como substrato para a gliconeogênese no fígado e nos rins.

A GLICÓLISE E A GLICONEOGÊNESE COMPARTILHAM A MESMA VIA, MAS EM DIREÇÕES OPOSTAS, E SÃO RECIPROCAMENTE REGULADAS

As variações na disponibilidade dos substratos são responsáveis pela maior parte das alterações do metabolismo, atuando direta ou indiretamente por meio de alterações na secreção de hormônios. Três mecanismos são responsáveis pela regulação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos: (1) alterações na velocidade de síntese das enzimas, (2) modificação covalente por fosforilação reversível e (3) efeitos alostéricos.

A indução e a repressão das enzimas essenciais exigem várias horas

As mudanças da atividade enzimática no fígado que ocorrem em várias condições metabólicas estão listadas na Tabela 19-1. As enzimas envolvidas catalisam reações fisiologicamente irreversíveis e que não estão em equilíbrio. Em geral, os efeitos

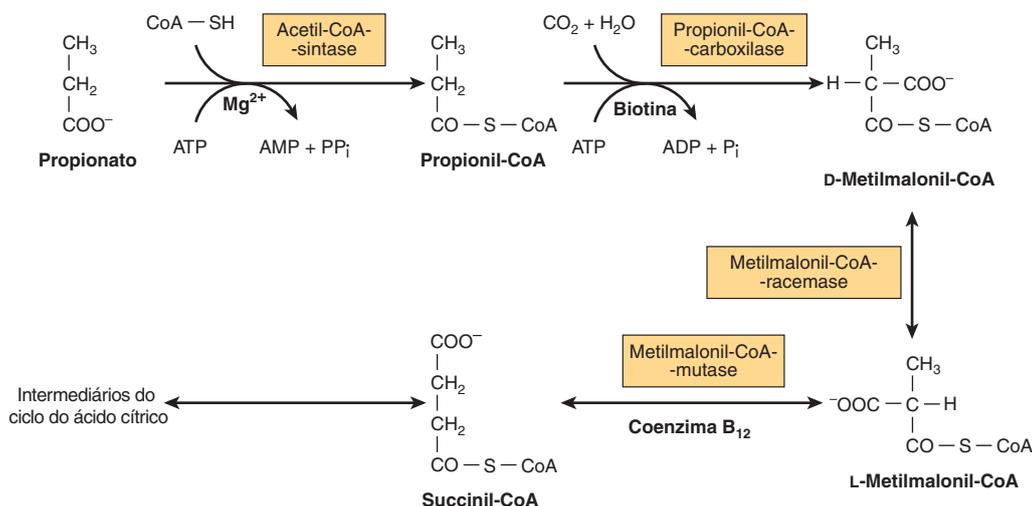


FIGURA 19-2 Metabolismo do propionato.

TABELA 19-1 Enzimas regulatórias e adaptativas associadas ao metabolismo dos carboidratos

	Atividade em		Indutor	Repressor	Ativador	Inibidor
	Ingestão de carboidratos	Jejum e diabetes				
Glicogenólise, glicólise e oxidação do piruvato						
Glicogênio-sintase	↑	↓			Insulina, glicose-6-fosfato	Glucagon
Hexocinase						Glicose-6-fosfato
Glicocinase	↑	↓	Insulina	Glucagon		
Fosfofrutocinase-1	↑	↓	Insulina	Glucagon	5' AMP, frutose-6-fosfato, frutose-2,6-bifosfato, P _i	Citrato, ATP, glucagon
Piruvato-cinase	↑	↓	Insulina, frutose	Glucagon	Frutose-1,6-bifosfato, insulina	ATP, alanina, glucagon, norepinefrina
Piruvato-desidrogenase	↑	↓			CoA, NAD ⁺ , insulina, ADP, piruvato	Acetil-CoA, NADH, ATP (ácidos graxos, corpos cetônicos)
Gliconeogênese						
Piruvato-carboxilase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina	Acetil-CoA	ADP
Fosfoenolpiruvato-carboxicinase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina	Glucagon	
Glicose-6-fosfatase	↓	↑	Glicocorticoides, glucagon, epinefrina	Insulina		

são reforçados, pois a atividade das enzimas que catalisam as reações em sentido oposto varia de modo recíproco (ver Figura 19-1). As enzimas envolvidas na utilização da glicose (i.e., as da glicólise e da lipogênese) tornam-se mais ativas quando existe um excesso de glicose, e, nessas condições, as enzimas da gliconeogênese apresentam baixa atividade. A insulina, que é secretada em resposta a um aumento da glicemia, intensifica a síntese das enzimas essenciais na glicólise. Ela também antagoniza o efeito dos glicocorticoides e do cAMP estimulado pelo glucagon, os quais induzem a síntese das enzimas essenciais da gliconeogênese.

A modificação covalente por fosforilação reversível é rápida

O **glucagon** e a **epinefrina**, hormônios que respondem a uma diminuição da glicemia, inibem a glicólise e estimulam a gliconeogênese no fígado, aumentando a concentração de cAMP. Isso, por sua vez, ativa a proteína-cinase dependente de cAMP, levando à fosforilação e à inativação da **piruvato-cinase**. Além disso, eles também afetam a concentração de frutose-2,6-bifosfato e, portanto, a glicólise e a gliconeogênese, conforme descrito adiante.

A modificação alostérica é instantânea

Na gliconeogênese, a piruvato-carboxilase, que catalisa a síntese de oxalacetato a partir do piruvato, requer acetil-CoA como **ativador alostérico**. A adição de acetil-CoA resulta em uma modificação na estrutura terciária da proteína, diminuindo o valor de K_m para o bicarbonato. Isso significa que, à medida que a acetil-CoA é formada a partir do piruvato, automaticamente assegura o fornecimento de oxalacetato e, portanto, a sua oxidação posterior no ciclo do ácido cítrico pela ativação da piruvato-carboxilase. A ativação dessa enzima e a inibição recíproca da piruvato-desidrogenase pela acetil-CoA proveniente da oxidação dos ácidos graxos explicam a ação da oxidação dos ácidos graxos na preservação da oxidação do piruvato e na estimulação da gliconeogênese. A relação recíproca entre essas duas enzimas altera o destino metabólico do piruvato à medida que o tecido passa da oxidação dos carboidratos (glicólise) para a gliconeogênese durante a transição do estado alimentado para o jejum (ver Figura 19-1). Uma função fundamental da oxidação dos ácidos graxos na promoção da gliconeogênese é suprir o ATP necessário.

A **fosfofrutocinase (fosfofrutocinase-1)** ocupa uma posição fundamental na regulação da glicólise e também está sujeita ao controle por retroalimentação. Ela é inibida pelo

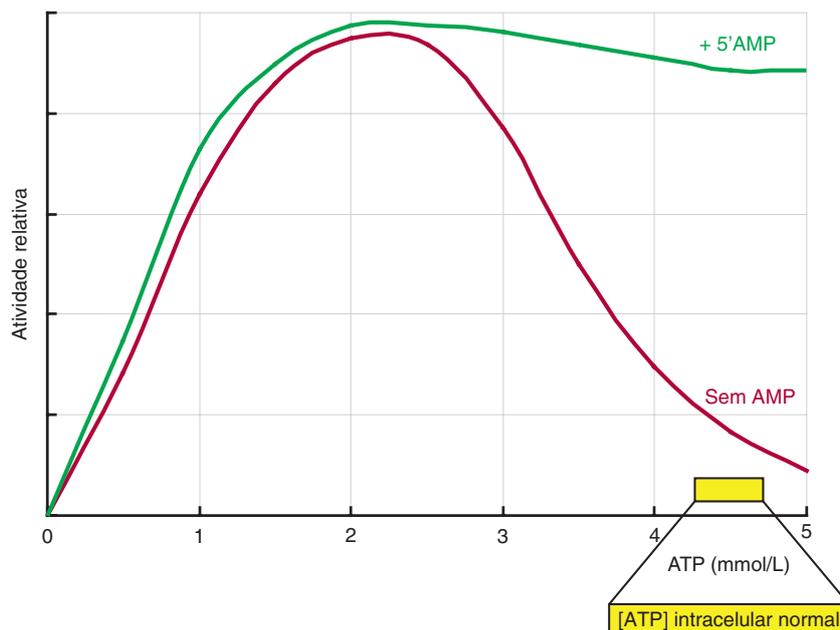


FIGURA 19-3 Inibição da fosfofrutocinase-1 por ATP e alívio da inibição por ATP.

citrato e por concentrações intracelulares normais de ATP, e é ativada pelo 5' AMP. Na [ATP] intracelular normal, a enzima está cerca de 90% inibida; essa inibição é revertida por 5' AMP (Figura 19-3).

O 5' AMP atua como indicador do estado de energia da célula. A presença de **adenilato-cinase** no fígado e em muitos outros tecidos possibilita o rápido equilíbrio da reação



Portanto, quando o ATP é utilizado em processos que necessitam de energia, resultando na formação de ADP, ocorre aumento de [AMP]. Uma redução relativamente pequena de [ATP] provoca aumento considerável de [AMP], de modo que [AMP] possa atuar como amplificador metabólico de uma pequena alteração de [ATP] e, então, como sinal sensível do estado de energia da célula. A atividade da fosfofrutocinase-1 é, assim, regulada em resposta ao estado de energia da célula para controlar a quantidade de carboidratos submetidos à glicólise antes de sua entrada no ciclo do ácido cítrico. Ao mesmo tempo, AMP ativa a glicogênio fosforilase, aumentando, assim, a glicogenólise. Uma consequência da inibição da fosfofrutocinase-1 pelo ATP é o acúmulo de glicose-6-fosfato, que, por sua vez, inibe a captação adicional de glicose em tecidos extra-hepáticos pela inibição da hexocinase.

A frutose-2,6-bifosfato desempenha um papel singular na regulação da glicólise e da gliconeogênese no fígado

O ativador alostérico positivo mais potente da fosfofrutocinase-1 e inibidor da frutose-1,6-bifosfatase no fígado é a **frutose-2,6-bifosfato**. Ela alivia a inibição da fosfofrutocinase-1 pelo ATP e aumenta a afinidade por frutose-6-fosfato; inibe

a frutose-1,6-bifosfatase ao aumentar o valor de K_m para a frutose-1,6-bifosfato. A sua concentração está sob controle do substrato (alostérico) e sob controle hormonal (modificação covalente) (Figura 19-4).

A frutose-2,6-bifosfato é formada pela fosforilação de frutose-6-fosfato pela **fosfofrutocinase-2**. A mesma enzima é também responsável pela sua quebra, uma vez que ela possui atividade **frutose-2,6-bifosfatase**. Essa **enzima bifuncional** está sob controle alostérico de frutose-6-fosfato, que estimula a cinase e inibe a fosfatase. Consequentemente, quando existe um suprimento abundante de glicose, a concentração de frutose-2,6-bifosfato aumenta, estimulando a glicólise ao ativar a fosfofrutocinase-1 e inibir a frutose-1,6-bifosfatase. Durante o jejum, o glucagon estimula a produção de cAMP, ativando a proteína-cinase dependente de cAMP, que, por sua vez, inativa a fosfofrutocinase-2 e ativa a frutose-2,6-bifosfatase por fosforilação. Então, a gliconeogênese é estimulada por uma redução da concentração de frutose-2,6-bifosfato, que inativa a fosfofrutocinase-1 e atenua a inibição da frutose-1,6-bifosfatase. A xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20), ativa a proteína-fosfatase que desfosforila a enzima bifuncional, aumentando, assim, a formação de frutose-2,6-bifosfato, bem como a taxa de glicólise. Isso leva ao aumento do fluxo através da glicólise e da via das pentoses-fosfato e à síntese aumentada de ácidos graxos (ver Capítulo 23).

Os ciclos de substratos (fúteis) possibilitam um controle fino e uma resposta rápida

Os pontos de controle na glicólise e no metabolismo do glicogênio envolvem um ciclo de fosforilação e desfosforilação catalisado pela glicocinase e glicose-6-fosfatase; pela fosfofrutocinase-1

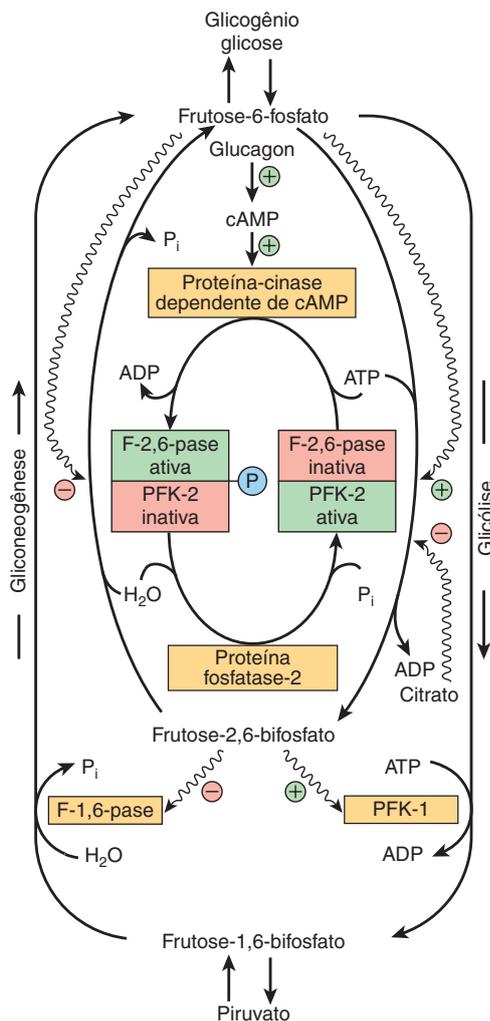


FIGURA 19-4 Controle da glicólise e da gliconeogênese no fígado pela frutose-2,6-bifosfato e pela enzima bifuncional PFK-2/F-2,6-pase (6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase). (F-1,6-pase, frutose-1,6-bifosfatase; PFK-1, fosfofrutocinase-1 [6-fosfofruto-1-cinase].) As setas onduladas indicam efeitos alostéricos.

e frutose-1,6-bifosfatase; pela piruvato-cinase, piruvato-carboxilase e fosfoenolpiruvato-carboxicinas; e pela glicogênio-sintase e fosforilase. Seria aparentemente óbvio que essas enzimas de ações opostas fossem reguladas de modo que, quando as enzimas envolvidas na glicólise estivessem ativas, aquelas envolvidas na gliconeogênese estivessem inativas, visto que, de outro modo, haveria um ciclo entre intermediários fosforilados e não fosforilados, com hidrólise líquida de ATP. Embora isso ocorra, tanto a fosfofrutocinase quanto a frutose-1,6-bifosfatase no músculo exibem alguma atividade contínua, de modo que existe, de fato, algum grau de ciclo de substratos (com desperdício). Isso permite o aumento muito rápido da taxa de glicólise necessária para a contração muscular. Em repouso, a velocidade de atividade da fosfofrutocinase é cerca de 10 vezes maior que a da frutose-1,6-bifosfatase; na antecipação da contração muscular, a atividade de ambas as enzimas aumenta, a da frutose-1,6-bifosfatase 10 vezes mais que a da fosfofrutocinase, mantendo a mesma taxa líquida

de glicólise. No início da contração muscular, a atividade da fosfofrutocinase aumenta ainda mais, ao passo que a da frutose-1,6-bifosfatase cai, elevando, assim, a taxa líquida de glicólise (e, portanto, a formação de ATP) em até mil vezes.

A CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE GLICOSE É REGULADA DENTRO DE LIMITES ESTREITOS

No estado pós-absortivo, a concentração de glicose no sangue da maioria dos mamíferos é mantida entre 4,5 e 5,5 mmol/L. Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos, a concentração pode aumentar para 6,5 a 7,2 mmol/L, e, na inanição, pode cair para 3,3 a 3,9 mmol/L. A ocorrência de uma súbita diminuição do nível de glicose (p. ex., em resposta a uma superdosagem de insulina) provoca convulsões, devido à dependência do encéfalo de um suprimento adequado de glicose. Todavia, concentrações muito mais baixas podem ser toleradas quando a hipoglicemia se desenvolve de forma suficientemente lenta para possibilitar a ocorrência de uma adaptação. O nível de glicose nas aves é consideravelmente mais alto (14,0 mmol/L) e, nos ruminantes, consideravelmente mais baixo (cerca de 2,2 mmol/L nos ovinos e 3,3 mmol/L no gado bovino). Esses níveis normais mais baixos parecem estar associados ao fato de que os ruminantes fermentam praticamente todo o carboidrato da dieta em ácidos graxos de cadeia curta, os quais substituem, em grande parte, a glicose como principal combustível metabólico nos tecidos durante o estado alimentado.

A GLICOSE SANGUÍNEA É DERIVADA DA DIETA, DA GLICONEOGÊNESE E DA GLICOGÊNOLISE

Os carboidratos digeríveis da alimentação produzem glicose, galactose e frutose, que são transportadas até o fígado pela **veia porta do fígado**. A galactose e a frutose no fígado são prontamente convertidas em glicose (ver Capítulo 20).

A glicose é formada a partir de dois grupos de compostos que sofrem gliconeogênese (ver Figuras 16-4 e 19-1): (1) os que envolvem uma conversão efetiva direta em glicose, incluindo a maioria dos **aminoácidos** e o **propionato**; e (2) os produtos do metabolismo da glicose nos tecidos. Portanto, o **lactato**, formado pela glicólise no músculo esquelético e nas hemácias, é transportado até o fígado e o rim, onde ocorre novamente a formação de glicose, que, mais uma vez, torna-se disponível para oxidação nos tecidos, por intermédio da circulação. Esse processo é conhecido como **ciclo de Cori**, ou **ciclo do ácido láctico** (Figura 19-5).

Durante o jejum, existe uma considerável liberação de alanina do músculo esquelético que ultrapassa acentuadamente a quantidade de proteínas musculares que estão sendo catabolizadas. Essa alanina é formada por transaminação do piruvato produzido pela glicólise do glicogênio muscular e exportada

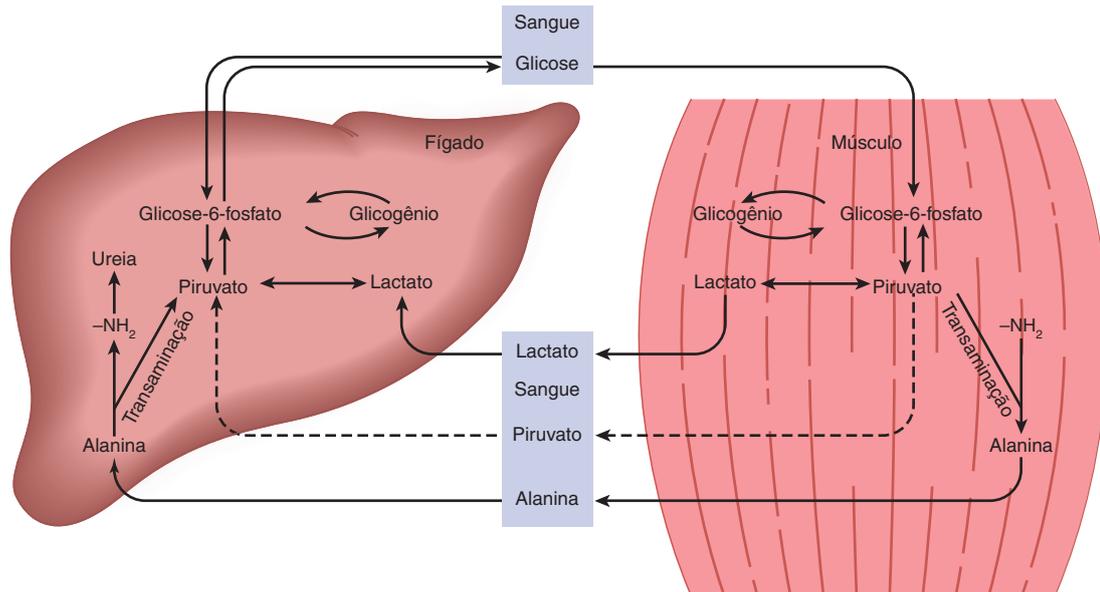


FIGURA 19-5 Os ciclos do ácido láctico (ciclo de Cori) e da glicose-alanina.

para o fígado, onde, após transaminação de volta ao piruvato, atua como substrato para a gliconeogênese. Esse **ciclo da glicose-alanina** (ver Figura 19-5) proporciona, assim, um meio indireto de utilizar o glicogênio muscular para a manutenção da glicemia em jejum. O ATP necessário para a síntese hepática de glicose a partir do piruvato provém da oxidação dos ácidos graxos.

A glicose também é formada a partir do glicogênio hepático pela glicogenólise (ver Capítulo 18).

A concentração de glicose no sangue é regulada por mecanismos metabólicos e hormonais

A manutenção da concentração da glicose sanguínea estável é um dos mecanismos homeostáticos regulados com mais precisão, envolvendo o fígado, os tecidos extra-hepáticos e diversos hormônios. As células hepáticas são livremente permeáveis à

glicose nas duas direções (por meio do transportador GLUT 2), ao passo que as células dos tecidos extra-hepáticos (exceto das células β pancreáticas) são relativamente impermeáveis, e seus transportadores unidirecionais de glicose são regulados por insulina. Em consequência, a captação a partir da corrente sanguínea constitui a etapa limitadora da velocidade na utilização da glicose nos tecidos extra-hepáticos. O papel de várias proteínas de transporte de glicose encontradas nas membranas celulares é apresentado na **Tabela 19-2**.

A glicocinase é importante na regulação da glicose sanguínea após uma refeição

A hexocinase tem um baixo valor de K_m para a glicose e, no fígado, é saturada e atua em velocidade constante em todas as condições normais. Assim, ela garante uma taxa de glicólise adequada para satisfazer as necessidades do fígado. A glicocinase tem um valor de K_m consideravelmente mais alto (menor

TABELA 19-2 Principais transportadores de glicose

Localização tecidual		Funções
Transportadores bidirecionais facilitadores		
GLUT 1	Encéfalo, rim, colo, placenta, hemácias	Captação de glicose
GLUT 2	Fígado, células β do pâncreas, intestino delgado, rim	Rápida captação ou liberação de glicose
GLUT 3	Encéfalo, rim, placenta	Captação de glicose
GLUT 4	Músculos cardíaco e esquelético, tecido adiposo	Captação de glicose estimulada pela insulina
GLUT 5	Intestino delgado	Absorção de frutose
Transportador unidirecional dependente de sódio		
SGLT 1	Intestino delgado e rim	Captação ativa de glicose contra um gradiente de concentração

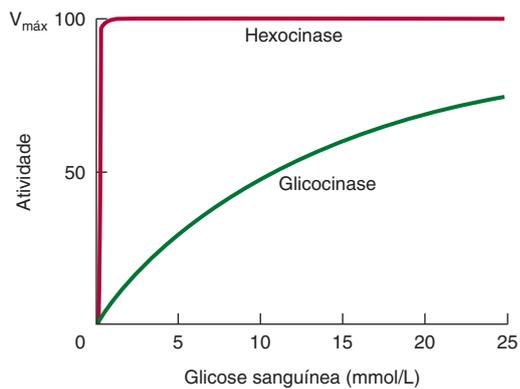


FIGURA 19-6 Variação da atividade da hexocinase e da glicocinase na fosforilação da glicose em concentrações crescentes de glicose no sangue. A K_m da hexocinase para a glicose é de 0,05 mmol/L, e a da glicocinase, de 10 mmol/L.

afinidade) para a glicose, de modo que a sua atividade aumenta com a elevação da concentração de glicose na veia porta do fígado (**Figura 19-6**). Isso permite a captação de grande quantidade de glicose pelo fígado após uma refeição rica em carboidratos, para a síntese de glicogênio e ácidos graxos, de forma que enquanto a concentração de glicose na veia porta do fígado pode alcançar 20 mmol/L após uma refeição, a concentração que deixa o fígado na circulação periférica normalmente não excede 8 a 9 mmol/L. A glicocinase está ausente no fígado dos ruminantes, nos quais apenas uma pequena quantidade de glicose proveniente do intestino penetra na circulação portal.

Em concentrações normais de glicose no sangue periférico (4,5-5,5 mmol/L), o fígado é um produtor de glicose. Entretanto, conforme o nível de glicose se eleva, a produção de glicose cessa, e ocorre captação efetiva.

A insulina e o glucagon exercem funções centrais na regulação da glicose sanguínea

Além dos efeitos diretos da hiperglicemia no aumento da captação de glicose pelo fígado, o hormônio **insulina** desempenha um papel central na regulação da glicose no sangue. Esse hormônio é produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em resposta à hiperglicemia. As células β das ilhotas são livremente permeáveis à glicose via transportador GLUT 2, e a glicose é fosforilada pela glicocinase. Por isso, o aumento da glicemia aumenta o fluxo metabólico

através da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da geração de ATP. A elevação de [ATP] inibe os canais de K^+ sensíveis ao ATP, causando despolarização da membrana celular, o que aumenta o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, estimulando a exocitose da insulina. Assim, a concentração sanguínea de insulina segue paralela à da glicose no sangue. Outras substâncias que causam a liberação de insulina pelo pâncreas incluem aminoácidos, ácidos graxos livres, corpos cetônicos, glucagon, secretina e as sulfonilureias – tolbutamida e gliburida. Esses fármacos são utilizados para estimular a secreção de insulina no diabetes melito tipo II através dos canais de K^+ sensíveis ao ATP. A epinefrina e a norepinefrina bloqueiam a liberação de insulina. A insulina diminui imediatamente a glicemia ao intensificar o transporte de glicose no tecido adiposo e no músculo por meio do recrutamento de transportadores de glicose (GLUT 4) do interior da célula para a membrana plasmática. Embora isso não afete diretamente a captação de glicose pelo fígado, a insulina potencializa a captação a longo prazo em consequência de suas ações sobre as enzimas que controlam a glicólise, a glicogênese e a gliconeogênese (ver Capítulo 18 e Tabela 19-1).

O **glucagon** é o hormônio produzido pelas células α das ilhotas pancreáticas em resposta à hipoglicemia. No fígado, ele estimula a glicogenólise por ativar a glicogênio-fosforilase. Ao contrário da epinefrina, o glucagon não tem efeito sobre a fosforilase muscular. O glucagon também aumenta a gliconeogênese a partir de aminoácidos e do lactato. Em todas essas ações, o glucagon atua por meio da geração de cAMP (ver Tabela 19-1). Tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese hepáticas contribuem para o **efeito hiperglicêmico** do glucagon, cujas ações se opõem às da insulina. A maior parte do glucagon endógeno (e da insulina) é depurada da circulação pelo fígado (**Tabela 19-3**).

Outros hormônios afetam a glicemia

A **adeno-hipófise** secreta hormônios que tendem a elevar a glicemia e, portanto, a antagonizar a ação da insulina. São eles o hormônio do crescimento, o ACTH (corticotrofina) e, possivelmente, outros hormônios “diabetogênicos”. A secreção de hormônio do crescimento é estimulada pela hipoglicemia; o hormônio diminui a captação de glicose pelo músculo. Parte desse efeito pode ser indireta, já que o hormônio estimula a mobilização dos ácidos graxos livres do tecido adiposo, os quais inibem a utilização da glicose. Os **glicocorticoides** (11-oxiesteroides) são secretados pelo córtex da glândula

TABELA 19-3 Respostas dos tecidos à insulina e ao glucagon

	Fígado	Tecido adiposo	Músculo
Aumentadas pela insulina	Síntese de ácidos graxos Síntese de glicogênio Síntese de proteínas	Captação de glicose Síntese de ácidos graxos	Captação de glicose Síntese de glicogênio Síntese de proteínas
Diminuídas pela insulina	Cetogênese Gliconeogênese	Lipólise	
Aumentadas pelo glucagon	Glicogenólise Gliconeogênese Cetogênese	Lipólise	

suprarrenal, e são também sintetizados de modo não regulado no tecido adiposo. Eles atuam aumentando a gliconeogênese em consequência do aumento do catabolismo hepático dos aminoácidos, devido à indução das aminotransferases (e de outras enzimas, como a triptofano-dioxigenase) e das enzimas essenciais da gliconeogênese. Além disso, os glicocorticoides inibem a utilização da glicose nos tecidos extra-hepáticos. Em todas essas ações, os glicocorticoides atuam de modo antagônico à insulina. Diversas **citocinas** secretadas por macrófagos que infiltram o tecido adiposo também exercem ações antagônicas às da insulina; junto com os glicocorticoides secretados pelo tecido adiposo, isso explica a resistência à insulina que frequentemente ocorre em indivíduos obesos.

A **epinefrina** é secretada pela medula da glândula suprarrenal em consequência de estímulos estressantes (medo, excitação, hemorragia, hipóxia, hipoglicemia, etc.) e leva à glicogenólise no fígado e no músculo, devido à estimulação da fosforilase pela geração de cAMP. No músculo, a glicogenólise resulta em aumento da glicólise, ao passo que, no fígado, determina a liberação de glicose na corrente sanguínea.

ASPECTOS CLÍNICOS ADICIONAIS

Ocorre glicosúria quando o limiar renal para a glicose é ultrapassado

Quando a concentração da glicose sanguínea aumenta para níveis superiores a 10 mmol/L, os rins também exercem um efeito (passivo) regulador. A glicose é filtrada continuamente pelos glomérulos; todavia, em condições normais, é totalmente reabsorvida nos túbulos renais por transporte ativo. A capacidade de o sistema tubular reabsorver a glicose é limitada a uma taxa

de cerca de 2 mmol/min, e na hiperglicemia (como ocorre no diabetes melito fracamente controlado), o filtrado glomerular pode conter mais glicose do que pode ser reabsorvido, resultando em **glicosúria**, quando o **limiar renal** para a glicose é excedido.

Pode ocorrer hipoglicemia durante a gestação e no recém-nascido

Durante a gestação, o consumo fetal de glicose aumenta, e existe risco de hipoglicemia materna e, possivelmente, fetal, sobretudo se houver longos intervalos entre as refeições ou à noite. Além disso, os lactentes prematuros ou com baixo peso ao nascer são mais suscetíveis à hipoglicemia, já que têm pouco tecido adiposo para fornecer ácidos graxos livres. As enzimas da gliconeogênese podem não estar completamente desenvolvidas nesse momento, e a gliconeogênese é dependente do suprimento de ácidos graxos não esterificados para energia. Pouco glicerol, que normalmente seria liberado pelo tecido adiposo, está disponível para a gliconeogênese.

A capacidade de utilizar glicose pode ser avaliada pela determinação da tolerância à glicose

A tolerância à glicose refere-se à capacidade de regular a concentração de glicose sanguínea após a administração de uma dose-teste de glicose (normalmente 1 g/kg de peso corporal) (**Figura 19-7**).

O **diabetes melito** (tipo I, ou diabetes melito dependente de insulina; DMID) caracteriza-se por redução da tolerância à glicose devido à secreção diminuída de insulina como resultado da destruição progressiva das células β das ilhotas

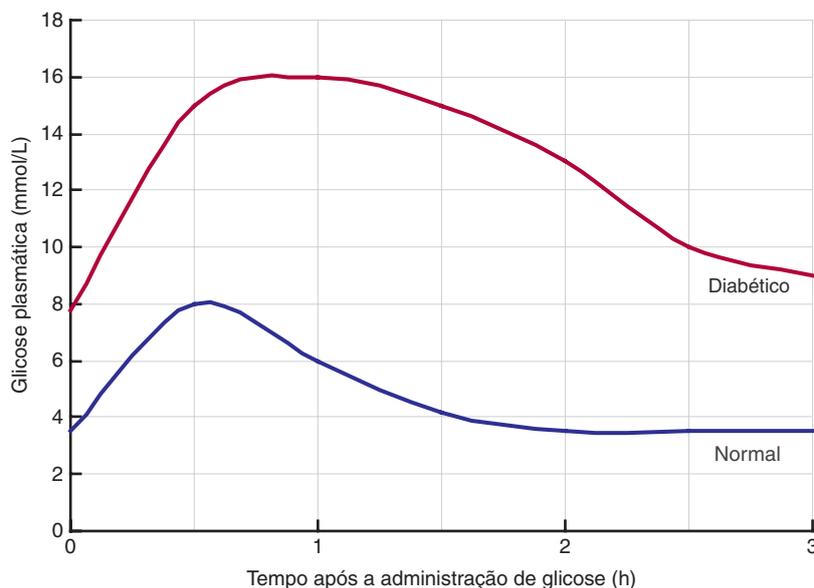


FIGURA 19-7 Teste de tolerância à glicose. Curvas de glicemia de um indivíduo normal e de um diabético após a administração oral de 1 g de glicose/kg de peso corporal. Observe a concentração inicial elevada no diabético em jejum. Um critério de normalidade é o retorno ao valor inicial dentro de 2 horas.

pancreáticas. A tolerância à glicose também é prejudicada no diabetes melito tipo II (diabetes melito não dependente de insulina, DMNID) como resultado da sensibilidade comprometida dos tecidos à ação da insulina. A resistência à insulina associada à obesidade (e, particularmente, à obesidade abdominal), que leva ao desenvolvimento de hiperlipidemia, seguida de aterosclerose e doença cardíaca coronariana, bem como diabetes manifesto, é conhecida como **síndrome metabólica**. A tolerância à glicose prejudicada ocorre em condições de insuficiência hepática, em algumas infecções, e em resposta a alguns fármacos, assim como em condições que levam à hiperatividade da hipófise ou do córtex da glândula suprarrenal devido ao fato de os hormônios secretados por essas glândulas antagonizarem as ações da insulina.

A administração de insulina (como no tratamento do diabetes melito) diminui a glicemia e aumenta a utilização e o armazenamento de glicose no fígado e no músculo na forma de glicogênio. A insulina em excesso pode causar **hipoglicemia**, resultando em convulsões e até mesmo em morte, a menos que a glicose seja imediatamente administrada. Observa-se aumento da tolerância à glicose na insuficiência hipofisária ou corticossuprarrenal, atribuível à diminuição do antagonismo à insulina pelos hormônios normalmente secretados por essas glândulas.

O custo energético da gliconeogênese explica por que as dietas com teor muito baixo de carboidratos promovem a perda de peso

As dietas com teor muito baixo de carboidratos, que fornecem apenas 20 g ou menos de carboidratos por dia (em comparação com uma ingestão desejável de 100-120 g/dia), mas que permitem consumo ilimitado de gorduras e proteínas, têm sido promovidas como um regime efetivo para a perda de peso, embora essas dietas sejam contrárias ao aconselhamento de uma dieta prudente visando à saúde. Como existe uma demanda contínua de glicose, haverá um grau considerável de gliconeogênese a partir dos aminoácidos; o elevado custo associado de ATP deve ser atendido pela oxidação dos ácidos graxos.

RESUMO

- A gliconeogênese é o processo de síntese de glicose ou de glicogênio a partir de precursores não carboidratos. Ela tem importância particular quando não há disponibilidade de carboidratos na alimentação. Os substratos importantes incluem aminoácidos, lactato, glicerol e propionato.
- A via gliconeogênese no fígado e no rim utiliza as reações da glicólise que são reversíveis, junto com quatro reações adicionais que contornam as reações irreversíveis, que não estão em equilíbrio.
- Como a glicólise e a gliconeogênese compartilham a mesma via, porém operam em direções opostas, as suas atividades precisam ser reguladas de modo recíproco.
- O fígado regula a concentração de glicose sanguínea após uma refeição, pois contém a glicocinase com alto valor de K_m , que promove aumento na utilização hepática de glicose.

- A insulina é secretada como resposta direta à hiperglicemia; ela estimula o fígado a armazenar glicose na forma de glicogênio e facilita a captação de glicose nos tecidos extra-hepáticos.
- O glucagon é secretado em resposta à hipoglicemia e ativa tanto a glicogenólise quanto a gliconeogênese no fígado, causando a liberação de glicose no sangue.

REFERÊNCIAS

- Barthel A, Schmoll D: Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E685.
- Bijland S, Mancini SJ: Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2013;124:491.
- Boden G: Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *J Investig Med* 2004;52:375.
- Brealey D, Singer M: Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol* 2009;3:1250.
- Brooks GA: Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol* 2009;587:5591.
- Dzugaj A: Localization and regulation of muscle fructose 1,6-bisphosphatase, the key enzyme of gluconeogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:51.
- Hers HG, Hue L: Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:617.
- Jiang G, Zhang BB: Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E671.
- Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC: Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:843.
- Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment, et al: Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 2008; 413:369.
- Klover PJ, Mooney RA: Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:753.
- Lim CT, Kola B: AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* 2010;44:87.
- Mather A, Pollock C: Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl* 2011;120:S1.
- McGuinness OP: Defective glucose homeostasis during infection. *Ann Rev Nutr* 2005;25:9.
- Mithieux G, Andreelli F, Magnan C: Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:419.
- Mlinar B, Marc J, Janez A, et al: Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta* 2007;375:20.
- Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ: Regulation of glucose production by the liver. *Ann Rev Nutr* 1999;19:379.
- Pilkis SJ, Claus TH: Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Ann Rev Nutr* 1991;11:465.
- Pilkis SJ, Granner DK: Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Physiol* 1992;54:885.
- Postic C, Shiota M, Magnuson MA: Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Rec Prog Horm Res* 2001;56:195.
- Previs SF, Brunengraber DZ, Brunengraber H: Is there glucose production outside of the liver and kidney? *Ann Rev Nutr* 2009;29:43.

- Quinn PG, Yeagley D: Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005;5:423.
- Ramnanan CJ, Edgerton DS: Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 2011;13 (suppl 1):118.
- Reaven GM: The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Ann Rev Nutr* 2005; 25:391.
- Roden M, Bernroider E: Hepatic glucose metabolism in humans —its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:365.
- Saggerson D: Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Ann Rev Nutr* 2008;28:253.
- Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG: Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 2001;50:1.
- Suh SH, Paik IY, Jacobs K: Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. *Mol Cells* 2007;23:272.
- Triplitt CL: Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation. *Am J Manag Care* 2012;18:S11.
- Wahren J, Ekberg K: Splanchnic regulation of glucose production. *Ann Rev Nutr* 2007;27:329.
- Yabaluri N, Bashyam MD: Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 2010;35:473.
- Young A: Inhibition of glucagon secretion. *Adv Pharmacol* 2005;52:151.

Via das pentoses-fosfato e outras vias do metabolismo das hexoses

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a via das pentoses-fosfato e suas funções como fonte de NADPH e na formação de ribose para a síntese de nucleotídeos.
- Descrever a via do ácido urônico e sua importância na síntese do ácido glicurônico para reações de conjugação e (em animais nos quais não é uma vitamina) vitamina C.
- Descrever e explicar as consequências de um grande consumo de frutose.
- Descrever a síntese e a importância fisiológica da galactose.
- Explicar as consequências dos defeitos genéticos da deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (favismo), da via do ácido urônico (pentosúria essencial) e do metabolismo da frutose e da galactose.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A via das pentoses-fosfato é uma via alternativa para o metabolismo da glicose. Essa via não leva à formação de ATP, porém desempenha duas funções importantes: (1) a formação de **NADPH** para a síntese de ácidos graxos (ver Capítulo 23) e esteroides (ver Capítulo 26), e manutenção de glutatona reduzida para atividade antioxidante, e (2) a síntese de **ribose** para a formação de nucleotídeos e ácidos nucleicos (ver Capítulo 32). A glicose, a frutose e a galactose são as principais hexoses absorvidas pelo trato gastrointestinal (TGI), provenientes do amido, da sacarose e da lactose da dieta, respectivamente. A frutose e a galactose podem ser convertidas em glicose, principalmente no fígado.

A deficiência genética de **glicose-6-fosfato-desidrogenase**, a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, leva à hemólise aguda das hemácias, resultando na **anemia hemolítica**. O ácido glicurônico é sintetizado a partir da glicose pela **via do ácido urônico**, de importância quantitativa inferior, porém de grande significado para a conjugação e a excreção de metabólitos e substâncias químicas estranhas (xenobióticos, Capítulo 47) na forma de **glicuronídeos**. A ocorrência de uma deficiência na via leva à condição de **pentosúria essencial**. A falta de

uma enzima da via (gulonolactona-oxidase) em primatas e em alguns outros animais explica a razão pela qual o **ácido ascórbico** (vitamina C, Capítulo 44) constitui uma necessidade nutricional para os seres humanos, mas não para a maioria dos outros mamíferos. Deficiências das enzimas do metabolismo da frutose e da galactose levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como a **frutosúria essencial**, a **intolerância hereditária à frutose** e a **galactosemia**.

A VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO FORMA NADPH E RIBOSE-FOSFATO

A via das pentoses-fosfato (desvio hexose-monofosfato, **Figura 20-1**) é uma via mais complexa do que a glicólise (ver Capítulo 17). Três moléculas de glicose-6-fosfato dão origem a três moléculas de CO_2 e a três açúcares de 5 carbonos. Estes são rearranjados para regenerar duas moléculas de glicose-6-fosfato e uma molécula do intermediário glicolítico, gliceraldeído-3-fosfato. Como duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato podem regenerar glicose-6-fosfato, a via pode responder pela oxidação completa da glicose.

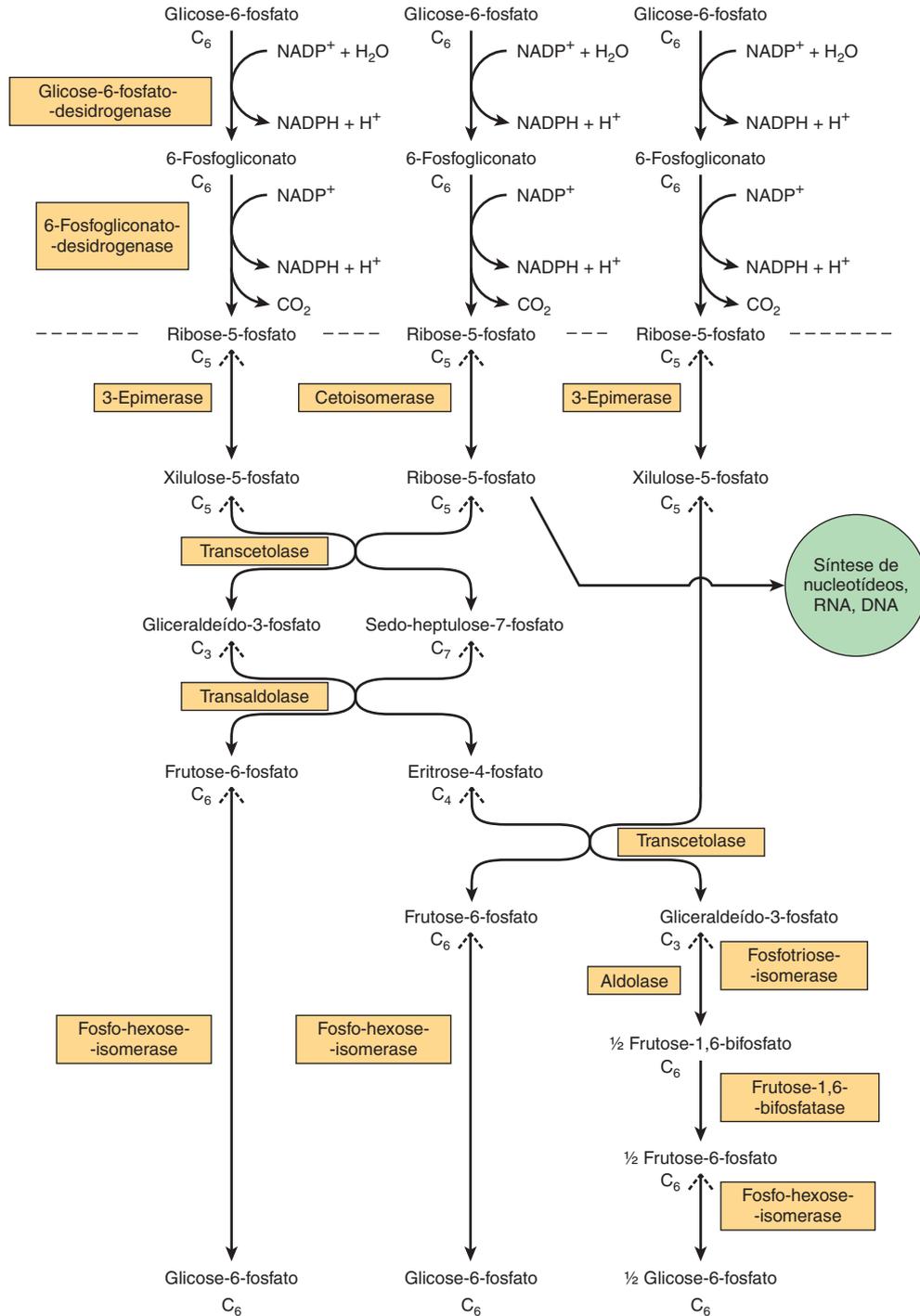


FIGURA 20-1 Fluxograma da via das pentoses-fosfato e suas conexões com a via glicolítica. A via completa, como indicada, consiste em três ciclos interconectados em que a glicose-6-fosfato é tanto substrato como produto final. As reações acima da linha tracejada são irreversíveis, ao passo que todas as reações abaixo da linha são livremente reversíveis, com exceção daquela catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase.

AS REAÇÕES DA VIA DAS PENTOSSES FOSFATO OCORREM NO CITOSOL

À semelhança da glicólise, as enzimas da via das pentoses-fosfato são citosólicas. Ao contrário da glicólise, a oxidação é atingida pela desidrogenação usando NADP^+ , e não NAD^+ , como aceptor de hidrogênio. A sequência de reações da via pode ser dividida em duas fases: uma **fase oxidativa irreversível** e uma **fase não oxidativa reversível**. Na primeira fase, a glicose-6-fosfato passa por desidrogenação e descarboxilação para formar uma pentose, a ribulose-5-fosfato. Na segunda fase, a ribulose-5-fosfato é convertida de volta a glicose-6-fosfato por uma série de reações envolvendo principalmente duas enzimas: a **transcetolase** e a **transaldolase** (ver Figura 20-1).

A fase oxidativa gera NADPH

A desidrogenação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato ocorre por meio da formação de 6-fosfogliconolactona, catalisada pela **glicose-6-fosfato-desidrogenase**, uma enzima dependente de NADP^+ (Figuras 20-1 e 20-2). A hidrólise da 6-fosfogliconolactona é efetuada pela enzima **gliconolactona-hidrolase**. Uma segunda etapa oxidativa é catalisada pela **6-fosfogliconato-desidrogenase**, que também requer NADP^+ como aceptor de hidrogênio. A descarboxilação segue com a formação da cetopentose-ribulose-5-fosfato.

No retículo endoplasmático, uma isoenzima da glicose-6-fosfato-desidrogenase, a hexose-6-fosfato-desidrogenase, fornece NADPH para as reações de hidroxilação (oxidase de função mista) e também para 11- β -hidroxiesteroide-desidrogenase-1. Essa enzima catalisa a redução da cortisona (inativa) a cortisol (ativo) no fígado, no sistema nervoso e no tecido adiposo. Trata-se da principal fonte de cortisol intracelular nesses tecidos, e pode ser importante na obesidade e na síndrome metabólica.

A fase não oxidativa gera precursores de ribose

A ribulose-5-fosfato é o substrato para duas enzimas. A **ribulose-5-fosfato-3-epimerase** altera a configuração sobre o carbono 3, formando o epímero xilulose-5-fosfato, também uma cetopentose. A **ribose-5-fosfato-cetoisomerase** converte ribulose-5-fosfato à aldopentose correspondente, ribose-5-fosfato, que é utilizada para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. A **transcetolase** transfere a unidade de dois carbonos, constituída pelos carbonos 1 e 2 de uma cetose, para o carbono aldeído de um açúcar aldose. Consequentemente, afeta a conversão de um açúcar cetose em uma aldose, com dois carbonos a menos, e de um açúcar aldose em uma cetose, com dois carbonos a mais. A reação requer a presença de Mg^{2+} e de **tiamina-difosfato** (vitamina B_1) como coenzima. A determinação da transcetolase eritrocitária e de sua ativação pela tiamina-difosfato fornece um índice do estado nutricional de vitamina B_1 (ver Capítulo 44). A porção de dois carbonos

transferida consiste provavelmente em glicolaldeído ligado à tiamina-difosfato. Portanto, a transcetolase catalisa a transferência da unidade de dois carbonos da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, produzindo a cetose de sete carbonos sedo-heptulose-7-fosfato e a aldose gliceraldeído-3-fosfato. Esses dois produtos sofrem, então, transaldolação. A **transaldolase** catalisa a transferência da porção de três carbonos, di-hidroxiacetona (carbonos 1-3) da cetose sedo-heptulose-7-fosfato para a aldose gliceraldeído-3-fosfato para formar a cetose frutose-6-fosfato e a aldose de quatro carbonos eritrose-4-fosfato. A transaldolase não tem nenhum cofator, e a reação prossegue por meio da formação de um intermediário base de Schiff da di-hidroxiacetona com o grupamento ϵ -amino de um resíduo de lisina na enzima. Em uma reação adicional catalisada pela **transcetolase**, a xilulose-5-fosfato atua como doador de glicolaldeído. Nesse caso, a eritrose-4-fosfato é o aceptor, e os produtos da reação são frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato.

Para oxidar completamente glicose a CO_2 através da via das pentoses-fosfato, devem haver enzimas presentes no tecido para converter gliceraldeído-3-fosfato a glicose-6-fosfato. Isso envolve a reversão da glicólise e a enzima gliconeogênica, **frutose-1,6-bifosfatase**. Nos tecidos que carecem dessa enzima, o gliceraldeído-3-fosfato segue a via normal da glicólise a piruvato.

As duas principais vias do catabolismo da glicose têm pouco em comum

Embora a glicose-6-fosfato seja comum a ambas as vias, a via das pentoses-fosfato é marcadamente diferente da glicólise. A oxidação utiliza o NADP^+ , em vez de NAD^+ , e o CO_2 , que não é produzido na glicólise, é um produto característico. Não há geração de ATP na via das pentoses-fosfato, já que esse composto é um importante produto da glicólise.

Entretanto, as duas vias são conectadas. A xilulose-5-fosfato ativa a proteína-fosfatase, que desfosforila a enzima bifuncional 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase (ver Capítulo 17). Isso ativa a cinase e inativa a fosfatase, levando à formação aumentada de frutose-2,6-bifosfato, ao aumento da atividade da fosfofrutocinase-1 e, portanto, ao aumento do fluxo glicolítico. A xilulose-5-fosfato também ativa a proteína-fosfatase que inicia o deslocamento nuclear e a ligação ao DNA da proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos, levando ao aumento da síntese de ácidos graxos (ver Capítulo 23) em resposta à dieta rica em carboidratos.

Os equivalentes redutores são gerados nos tecidos especializados em sínteses redutoras

A via das pentoses-fosfato é ativa no fígado, no tecido adiposo, no córtex da glândula suprarenal, na glândula tireoide, nas hemácias, nos testículos e na glândula mamária em lactação. A sua atividade se apresenta baixa tanto na glândula mamária na ausência de lactação quanto no músculo esquelético. Os tecidos nos quais a via é ativa utilizam o NADPH na síntese

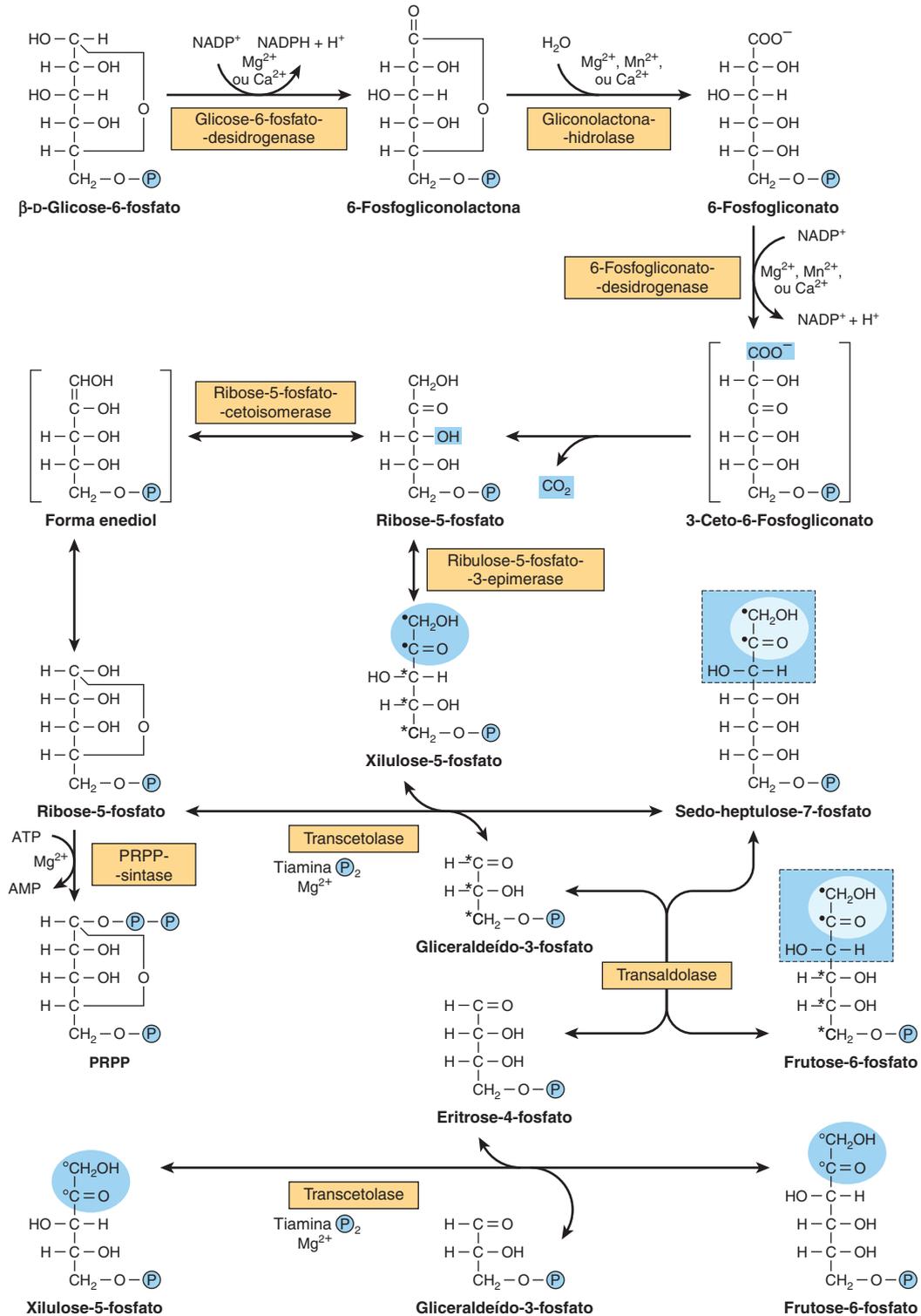


FIGURA 20-2 A via das pentoses-fosfato. (P, $-\text{PO}_3^{2-}$; PRPP, 5-fosforribosil-1-pirofosfato.)

reduzora, por exemplo, de ácidos graxos, esteroides, aminoácidos por meio da glutamato-desidrogenase e glutatona reduzida. A síntese de glicose-6-fosfato-desidrogenase e de 6-fosfogliconato-desidrogenase também pode ser induzida por insulina no estado alimentado, quando a lipogênese aumenta.

A ribose pode ser sintetizada em quase todos os tecidos

Pouca ou nenhuma ribose circula na corrente sanguínea, de modo que os tecidos precisam sintetizar a ribose necessária para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos usando a via das pentoses-fosfato (ver Figura 20-2). Não há necessidade de ter uma via das pentoses-fosfato totalmente funcional para que um tecido possa sintetizar ribose-5-fosfato. O músculo possui baixa atividade de glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase, mas, como a maioria dos outros tecidos, ele é capaz de sintetizar ribose-5-fosfato pela inversão da fase não oxidativa da via das pentoses-fosfato utilizando frutose-6-fosfato.

A VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO E A GLUTATIONA-PEROXIDASE PROTEGEM AS HEMÁCIAS DA HEMÓLISE

Nas hemácias, a via das pentoses-fosfato constitui a única fonte de NADPH para a redução da glutatona oxidada, catalisada pela **glutaciona-redutase**, uma flavoproteína que contém FAD. A glutatona reduzida remove H_2O_2 , em uma reação catalisada pela **glutaciona-peroxidase**, uma enzima que apresenta o análogo da cisteína contendo **selênio** (selenocisteína) no sítio ativo (Figura 20-3). A reação é importante, visto que o acúmulo de H_2O_2 pode diminuir o tempo de sobrevivência das hemácias, causando lesão oxidativa na membrana celular com consequente hemólise. Nos outros tecidos, o NADPH também pode ser produzido em uma reação catalisada pela enzima málica.

O GLICURONATO, UM PRECURSOR DE PROTEOGLICANOS E GLICURONÍDEOS CONJUGADOS, É UM PRODUTO DA VIA DO ÁCIDO URÔNICO

No fígado, a **via do ácido urônico** catalisa a conversão da glicose em ácido glicurônico, em ácido ascórbico (exceto nos seres humanos e em outras espécies para os quais o ascorbato é uma vitamina, a vitamina C) e em pentoses (Figura 20-4). Trata-se também de uma via oxidativa alternativa para a glicose que, à semelhança da via das pentoses-fosfato, não leva à formação de ATP. A glicose-6-fosfato é isomerizada a glicose-1-fosfato, que, então, reage com o trifosfato de uridina (UTP), formando uridina-difosfato-glicose (UDPGlc) em uma reação catalisada pela **UDPGlc-pirofosforilase**, como ocorre na síntese de glicogênio (Capítulo 18). A UDPGlc é oxidada no carbono 6 pela **UDPGlc-desidrogenase** dependente de NAD em uma reação de duas etapas para produzir UDP-glicuronato.

A UDP-glicuronato é a fonte de glicuronato para as reações que envolvem a sua incorporação em proteoglicanos (ver Capítulo 46) ou para a reação com substratos como hormônios esteroides, bilirrubina e vários medicamentos que são excretados na urina ou na bile como conjugados glicuronídeos (ver Figura 31-13 e Capítulo 47).

O glicuronato é reduzido a L-gulonato, o precursor direto de **ascorbato** nos animais com capacidade de sintetizar essa vitamina, em uma reação dependente de NADPH. Em seres humanos e outros primatas, assim como em porquinhos-da-índia, morcegos e alguns pássaros e peixes, o ácido ascórbico não pode ser sintetizado devido à ausência da enzima **L-gulonolactona-oxidase**. O L-gulonato é oxidado a 3-ceto-L-gulonato, que é, então, descarboxilado a L-xilulose. A L-xilulose é convertida ao isômero D-xilitol, em uma reação de redução dependente de NADPH, seguido por oxidação em uma reação dependente de NAD, formando D-xilulose. Após a conversão em D-xilulose-5-fosfato, é metabolizada pela via das pentoses-fosfato.

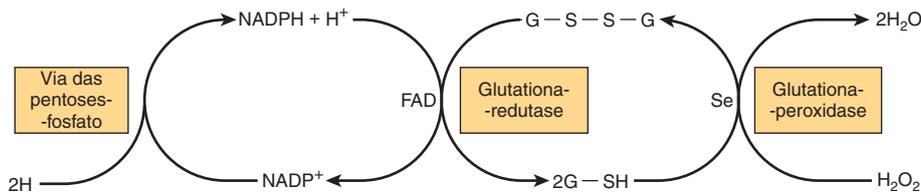


FIGURA 20-3 Papel da via das pentoses-fosfato na reação da glutaciona-peroxidase das hemácias. (G-SH, glutaciona reduzida; G-S-S-G, glutaciona oxidada; Se, enzima contendo selênio.)

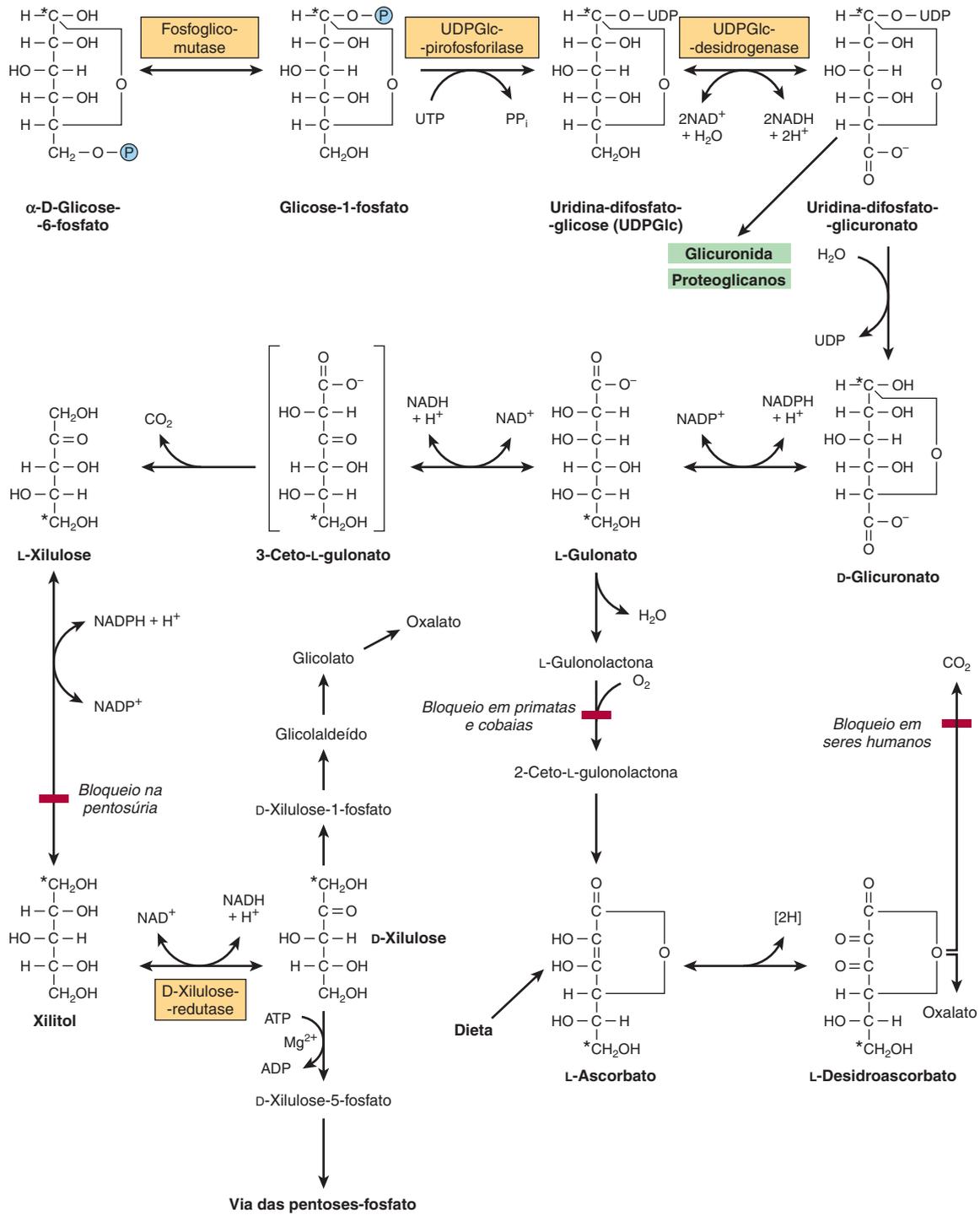


FIGURA 20-4 Via do ácido urônico. (*Indica o destino do carbono 1 da glicose; —PO₃²⁻.)

A INGESTÃO DE GRANDES QUANTIDADES DE FRUTOSE POSSUI CONSEQUÊNCIAS METABÓLICAS PROFUNDAS

As dietas ricas em sacarose ou em xaropes com alto teor de frutose (HFSs), utilizados em alimentos processados e bebidas, resultam em grandes quantidades de frutose (e glicose) que entram na veia porta do fígado.

No fígado, a frutose sofre glicólise de forma mais rápida do que a glicose, visto que escapa da etapa reguladora catalisada pela fosfofrutocinase (Figura 20-5). Isso possibilita a saturação das vias do fígado pela frutose, resultando em aumento da síntese de ácido graxos, esterificação dos ácidos graxos e secreção de VLDL, o que pode elevar as concentrações séricas de

triacilgliceróis e, por fim, de colesterol LDL. A **frutocinase** no fígado, nos rins e no intestino catalisa a fosforilação de frutose a frutose-1-fosfato. Essa enzima não atua sobre a glicose, e, diferentemente da glicocinase, a sua atividade não é afetada pelo jejum nem pela insulina, o que pode explicar por que a frutose é depurada do sangue de pacientes diabéticos em uma taxa normal. A frutose-1-fosfato é clivada a D-gliceraldeído e di-hidroxiacetona-fosfato pela **aldolase B**, uma enzima encontrada no fígado, que também atua na glicólise hepática clivando frutose-1,6-bifosfato. O D-gliceraldeído entra na glicólise por meio da fosforilação de gliceraldeído-3-fosfato catalisada pela **trioscinase**. As duas trioses-fosfato, di-hidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, podem ser degradadas pela glicólise ou podem atuar como substratos para a aldolase e, portanto, para a gliconeogênese, que é o destino de grande parte da frutose metabolizada no fígado.

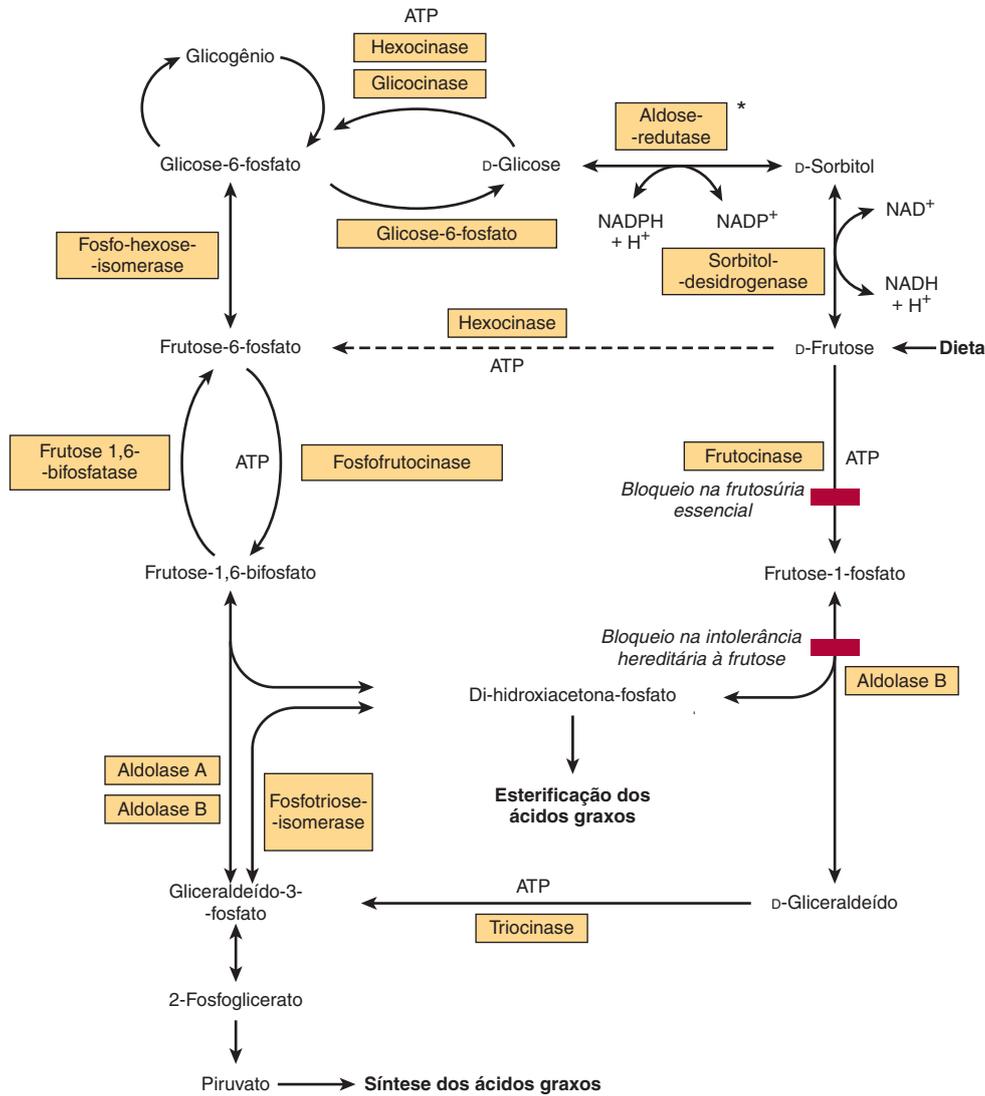


FIGURA 20-5 Metabolismo da frutose. A aldolase A é encontrada em todos os tecidos, a aldolase B constitui a forma predominante no fígado. (*Não encontrada no fígado.)

Nos tecidos extra-hepáticos, a hexocinase catalisa a fosforilação da maior parte dos açúcares hexoses, incluindo a frutose, porém, a glicose inibe a fosforilação da frutose, pois ela é um substrato melhor para a hexocinase. Todavia, alguma frutose pode ser metabolizada no tecido adiposo e no músculo. A frutose é encontrada no plasma seminal e na circulação fetal de ungulados e baleias. A aldose-redutase é encontrada na placenta das ovelhas e é responsável pela secreção de sorbitol no sangue fetal. A presença de sorbitol-desidrogenase no fígado, inclusive no fígado fetal, é responsável pela conversão do sorbitol em frutose. Essa via também é responsável pela ocorrência de frutose no líquido seminal.

A GALACTOSE É NECESSÁRIA PARA A SÍNTESE DA LACTOSE, DOS GLICOLIPÍDEOS, DOS PROTEOGLICANOS E DAS GLICOPROTEÍNAS

A galactose é derivada da hidrólise intestinal do dissacarídeo **lactose**, o açúcar encontrado no leite. É rapidamente convertida em glicose no fígado. A **galactocinase** catalisa a fosforilação da galactose, utilizando ATP como doador de fosfato (**Figura 20-6**). A galactose-1-fosfato reage com UDPGlc-formando uridina-difosfato-galactose (UDPGal) e glicose-1-fosfato, em uma reação

catalisada pela **galactose-1-fosfato-uridil-transferase**. A conversão da UDPGal a UDPGlc é catalisada pela **UDPGal-4-epimerase**. A reação envolve oxidação, seguida de redução, do carbono 4, com NAD^+ como coenzima. A UDPGlc é, então, incorporada no glicogênio (ver Capítulo 18).

A reação da epimerase é livremente reversível, de modo que a glicose pode ser convertida em galactose, e a galactose não é um elemento nutricional essencial. A galactose é necessária no corpo não apenas para a formação de lactose na lactação, mas também como constituinte dos glicolipídeos (cerebrosídeos), dos proteoglicanos e das glicoproteínas. Na síntese de lactose na glândula mamária, a UDPGal condensa-se com a glicose para produzir lactose, em uma reação catalisada pela **lactose-sintase** (ver Figura 20-6).

A glicose é o precursor de aminoaçúcares (hexosaminas)

Os aminoaçúcares são componentes importantes das **glicoproteínas** (ver Capítulo 46), de certos **glicosfingolipídeos** (p. ex., gangliosídeos; Capítulo 21) e dos glicosaminoglicanos (ver Capítulo 50). Os principais aminoaçúcares são as hexosaminas **glicosamina**, **galactosamina** e **manosamina**, bem como o composto de nove carbonos, o **ácido siálico**. O principal ácido siálico encontrado nos tecidos humanos é o ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc). A **Figura 20-7** fornece um resumo das inter-relações metabólicas entre os aminoaçúcares.

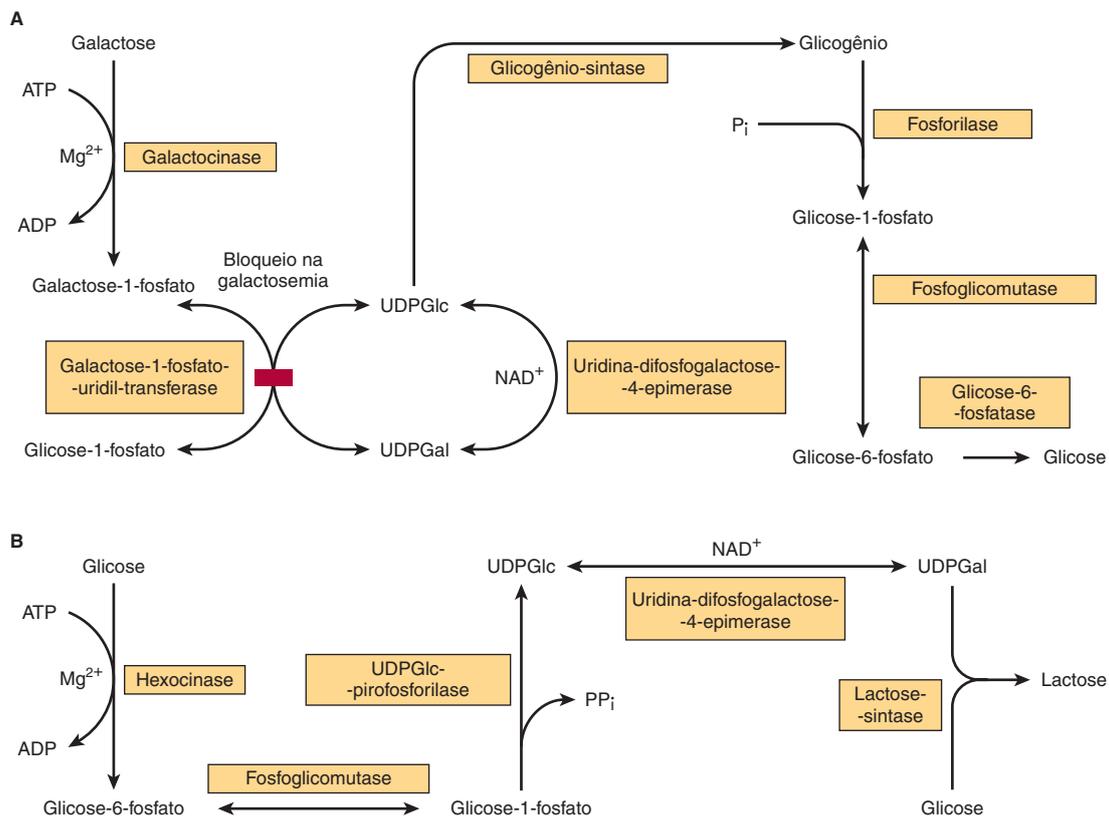


FIGURA 20-6 Via de conversão (A) da galactose em glicose no fígado e (B) da glicose em lactose na glândula mamária em lactação.

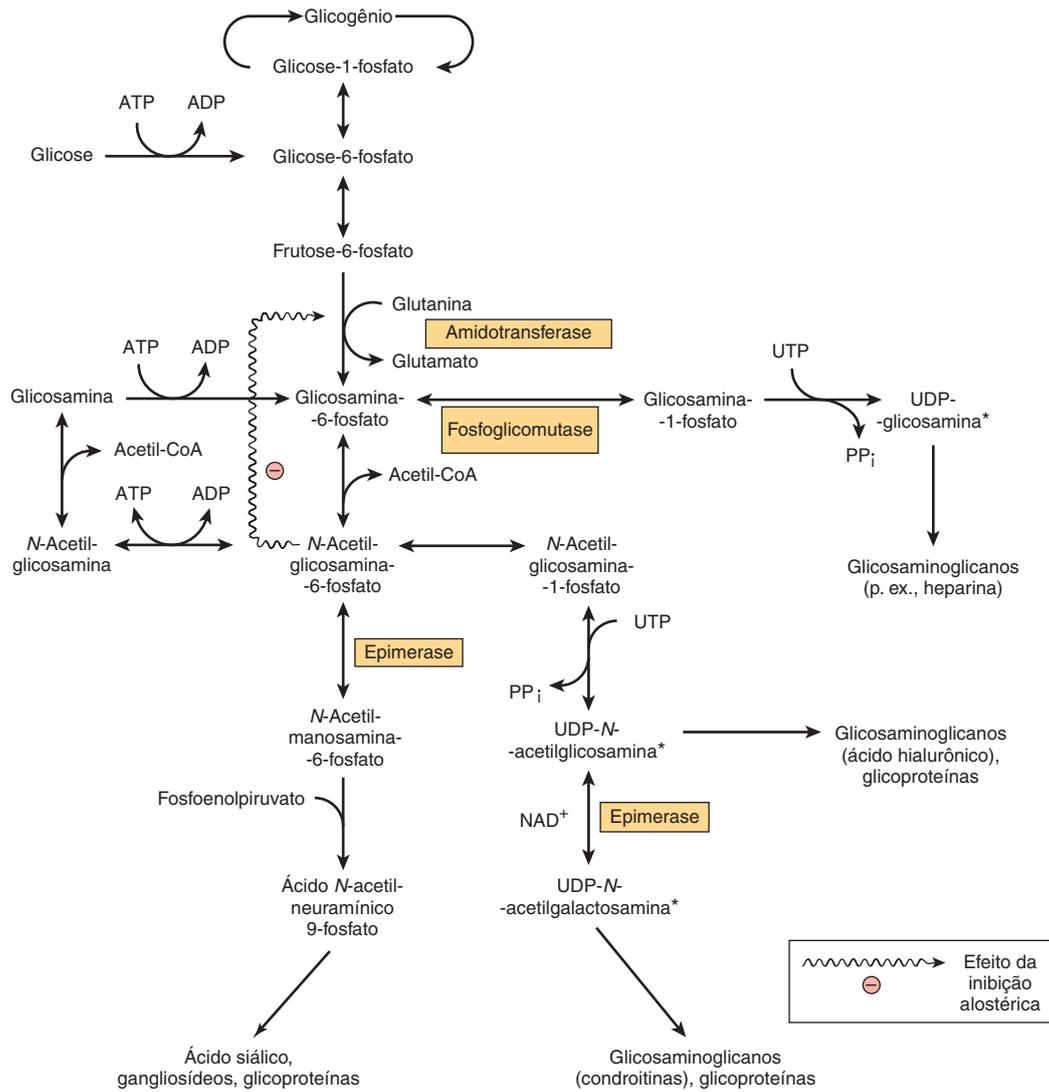


FIGURA 20-7 Resumo das inter-relações no metabolismo dos aminoaçúcares. (*Análogo à UDPGlc.) Outros nucleotídeos de purina ou de pirimidina podem se ligar de forma semelhante a açúcares ou a aminoaçúcares. São exemplos a difosfato de timidina (TDP)-glicosamina e a TDP-N-acetilglicosamina.

ASPECTOS CLÍNICOS

O comprometimento da via das pentoses-fosfato leva à hemólise das hemácias

Os defeitos genéticos de glicose-6-fosfato-desidrogenase, com conseqüente disfunção da geração de NADPH, são comuns na população do Mediterrâneo e de origem afro-caribenha. O gene localiza-se no cromossomo X, de modo que os indivíduos afetados são principalmente do sexo masculino. Em torno de 400 milhões de pessoas carregam um gene mutado para glicose-6-fosfato-desidrogenase, fazendo deste o defeito genético mais comum, mas a maior parte é assintomática. Em algumas populações, a deficiência de glicose-6-fosfatase é comum o suficiente para que possa ser considerada como um polimorfismo genético. A distribuição dos genes mutantes equivale à da malária, sugerindo que o estado de heterozigidade confere resistência contra a malária. O defeito manifesta-se

como hemólise das hemácias (**anemia hemolítica**) quando indivíduos suscetíveis são submetidos a estresse oxidativo (ver Capítulo 45) em decorrência de infecção, de fármacos anti-maláricos, como a primaquina, e das sulfonamidas, ou quando consomem favas (*Vicia faba* – daí a designação da doença como **favismo**).

Muitas mutações diferentes são conhecidas no gene da glicose-6-fosfato-desidrogenase, levando às duas principais variantes de favismo. Na variante afro-caribenha, a enzima é instável, de modo que, embora a atividade eritrocitária média seja baixa, somente as hemácias mais velhas são afetadas pelo estresse oxidativo, e as crises hemolíticas tendem a ser auto-limitadas. Em contrapartida, na variante do Mediterrâneo, a enzima é estável, porém apresenta baixa atividade em todas as hemácias. Nesses indivíduos, as crises hemolíticas são mais graves e podem ser fatais. A glutatona-peroxidase é dependente do suprimento de NADPH, que, nas hemácias, só pode ser formado por meio da via das pentoses-fosfato. Ela reduz

peróxidos orgânicos e H_2O_2 , como parte das defesas corporais contra a peroxidação de lipídeos. A dosagem de **glutathiona-reductase** em hemácias e sua ativação por FAD são utilizadas para avaliar o estado nutricional da **vitamina B₂** (ver Capítulo 44).

O rompimento da via do ácido urônico é causado por defeitos enzimáticos e por alguns fármacos

Na condição hereditária benigna **pentosúria essencial**, quantidades consideráveis de **xilulose** aparecem na urina, devido à falta de xilulose-redutase, a enzima necessária para reduzir xilulose em xilitol. Apesar de a pentosúria ser benigna, sem consequências clínicas, a xilulose é um açúcar redutor e pode dar resultados falsos-positivos quando a glicose urinária é medida usando reagente de cobre em meio alcalino (ver Capítulo 48). Vários fármacos aumentam a taxa de entrada da glicose na via do ácido urônico. Por exemplo, a administração de barbital ou de clorobutanol em ratos resulta em aumento significativo na conversão de glicose em glicuronato, L-gulonato e ascorbato. A aminopirina e a antipirina aumentam a excreção de xilulose em indivíduos com pentosúria. A pentosúria também ocorre após o consumo de quantidades relativamente grandes de frutas, como peras, que constituem fontes ricas de pentose (**pentosúria alimentar**).

A sobrecarga do fígado com frutose pode potencializar a hipertriacilglicerolemia, a hipercolesterolemia e a hiperuricemia

No fígado, a frutose aumenta a síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis, além da secreção de VLDL, levando à hipertriacilglicerolemia – e aumento de colesterol LDL –, que pode ser considerada como potencialmente aterogênica (ver Capítulo 26). A razão disso é que a frutose entra na glicólise pela frutocinase, e a frutose-1-fosfato assim formada escapa da etapa reguladora catalisada pela fosfofrutocinase (ver Capítulo 17). Além disso, uma sobrecarga aguda de frutose para o fígado, como a que pode ocorrer com infusão intravenosa ou após consumo muito alto de frutose, provoca sequestro de fosfato inorgânico na frutose-1-fosfato e diminuição da síntese de ATP. Como consequência, ocorre menor inibição da síntese *de novo* de purinas a partir de ATP, e observa-se aumento na formação de ácido úrico, causando hiperuricemia, que constitui a causa da **gota** (ver Capítulo 33). Como a frutose é absorvida pelo intestino delgado por difusão mediada por transportador (passiva), o uso de doses orais altas pode resultar em diarreia osmótica.

Os defeitos no metabolismo da frutose causam doença

A ausência de frutocinase hepática provoca **frutosúria essencial**, uma condição benigna e assintomática. A ausência de aldolase B, que cliva a frutose-1-fosfato, leva à **intolerância hereditária à frutose**, que é caracterizada por hipoglicemia profunda e vômitos após o consumo de frutose (ou sacarose, que gera frutose quando digerida). As dietas com baixo teor de frutose, sorbitol e sacarose são benéficas para ambas as condições. Uma consequência da intolerância hereditária

à frutose e de uma condição relacionada, resultante da **deficiência de frutose-1,6-bifosfatase**, é a **hipoglicemia** induzida por frutose, apesar da presença de grandes reservas de glicogênio, visto que a frutose-1-fosfato e o 1,6-bifosfato inibem alostericamente a glicogênio-fosforilase hepática. O sequestro de fosfato inorgânico também leva à depleção de ATP e ao desenvolvimento de hiperuricemia.

A frutose e o sorbitol na lente do olho estão associados à catarata diabética

No diabetes melito, tanto a frutose quanto o sorbitol são encontrados na lente do olho em concentrações aumentadas e podem estar envolvidos na patogênese da **catarata diabética**. A **via do sorbitol (poliol)** (ausente no fígado) é responsável pela formação de frutose a partir da glicose (ver Figura 20-5), e a sua atividade aumenta à medida que a concentração de glicose aumenta nos tecidos que não são sensíveis à insulina, isto é, a lente, os nervos periféricos e os glomérulos renais. A glicose é reduzida a sorbitol pela **aldose-reductase**, seguida da oxidação do sorbitol em frutose na presença de NAD^+ e de sorbitol-desidrogenase (poliol-desidrogenase). O sorbitol não sofre difusão através das membranas celulares, porém, acumula-se, causando lesão osmótica. Simultaneamente, os níveis de mioinositol diminuem. Em animais de laboratório, o acúmulo de sorbitol e a depleção de mioinositol, bem como a formação de cataratas diabéticas, podem ser evitados por inibidores da enzima aldose-reductase. Um desses inibidores foi aprovado no Japão para o tratamento da neuropatia diabética, embora haja pouca ou nenhuma evidência de que os inibidores possam ser efetivos na prevenção de cataratas ou na redução da progressão da neuropatia diabética nos seres humanos.

As deficiências enzimáticas na via da galactose causam galactosemia

Ocorre incapacidade de metabolizar a galactose nas **galactosemias**, que podem ser causadas por defeitos hereditários da galactocinase, da uridil-transferase ou da 4-epimerase (Figura 20-6A), embora a deficiência de **uridil-transferase** seja a mais conhecida. A galactose é um substrato da aldose-reductase, com formação de galactitol, que se acumula na lente do olho, causando catarata. A condição é mais grave se resultar de um defeito na uridil-transferase, uma vez que a galactose-1-fosfato se acumula e esgota o fígado de fosfato inorgânico. Por fim, ocorrem insuficiência hepática e deterioração mental. Na deficiência de uridil-transferase, a epimerase é encontrada em quantidades adequadas, de modo que o indivíduo com galactosemia ainda consegue formar UDPGal a partir da glicose. Isso explica como é possível que as crianças acometidas tenham crescimento e desenvolvimento normais, apesar da dieta desprovida de galactose utilizada para controlar os sintomas da doença.

RESUMO

- A via das pentoses-fosfato, presente no citosol, pode responder pela oxidação completa da glicose, produzindo $NADPH$ e CO_2 , mas não ATP.

- A via possui uma fase oxidativa, que é irreversível e que gera NADPH, e uma fase não oxidativa, que é reversível e fornece precursores de ribose para a síntese de nucleotídeos. A via completa é encontrada principalmente nos tecidos que requerem NADPH para processos de síntese redutora, como a lipogênese ou a esteroidogênese, ao passo que a fase não oxidativa ocorre em todas as células que necessitam de ribose.
- Nas hemácias, a via desempenha uma importante função na prevenção da hemólise, fornecendo NADPH para manter a glutatona no estado reduzido como o substrato da glutatona-peroxidase.
- A via do ácido urônico constitui a fonte de ácido glicurônico para a conjugação de muitas substâncias endógenas e exógenas antes de sua excreção, na forma de glicuronídeos, na urina e na bile.
- A frutose escapa da principal etapa reguladora na glicólise, catalisada pela fosfofrutocinase, e estimula a síntese de ácidos graxos e a secreção hepática de triacilgliceróis.
- A galactose é sintetizada a partir da glicose na glândula mamária em lactação e em outros tecidos nos quais é necessária para a síntese de glicolipídeos, proteoglicanos e glicoproteínas.

REFERÊNCIAS

- Ali M, Rellos P, Cox TM: Hereditary fructose intolerance. *J Med Gen* 1998;35:353.
- Cappellini MD, Fiorelli G: Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008;371:64.
- Dunlop M: Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000;77:S3.
- Grant CM: Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol* 2008;7:1.
- Ho HY, Cheng ML: Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep* 2007;12:109.
- Horecker BL: The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem* 2002;277:47965.
- Le KA, Tappy L: Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:469.
- Leslie ND: Insights into the pathogenesis of galactosemia. *Ann Rev Nutr* 2003;23:59.
- Manganelli G, Fico A, Martini G, et al: Discussion on pharmacogenetic interaction in G6PD deficiency and methods to identify potential hemolytic drugs. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010;10:143.
- Mayes PA: Intermediary metabolism of fructose. *Amer J Clin Nutr* 1993;58:754.
- Van den Berghe G: Inborn errors of fructose metabolism. *Ann Rev Nutr* 1994;14:41.
- Veech RL: A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates short- and long-term control of lipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5578.
- Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C: The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:703.
- Wong D: Hereditary fructose intolerance. *Mol Genet Metab* 2005;85:165.

Questões para estudo

Seção IV – Metabolismo dos carboidratos

- Qual das afirmativas a seguir é a definição de índice glicêmico?
 - A diminuição da concentração sanguínea de glucagon após o consumo de alimento em quantidade equivalente a um pão branco.
 - O aumento na concentração sanguínea de glicose após o consumo de alimentos.
 - O aumento na concentração sanguínea de glicose após o consumo de alimento em quantidade equivalente a um pão branco.
 - O aumento na concentração sanguínea de insulina após o consumo de alimentos.
 - O aumento na concentração sanguínea de insulina após o consumo de alimentos em quantidade equivalente a um pão branco.
- Qual dos seguintes terá o menor índice glicêmico?
 - Maçã assada.
 - Batata assada.
 - Maçã crua.
 - Batata crua.
 - Suco de maçã.
- Qual dos seguintes terá o maior índice glicêmico?
 - Maçã assada.
 - Batata assada.
 - Maçã crua.
 - Batata crua.
 - Suco de maçã.
- Uma amostra de sangue é coletada de uma mulher de 50 anos após jejum durante a noite. Qual dos seguintes está em concentração maior do que após ela ingerir uma refeição?
 - Glicose.
 - Insulina.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Triacilglicerol.
- Uma amostra de sangue é coletada de um homem de 25 anos após ele comer três fatias de torrada e um ovo cozido. Qual dos seguintes está em concentração maior do que se o sangue tivesse sido coletado depois de um jejum durante a noite?
 - Alanina.
 - Glucagon.
 - Glicose.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
- Uma amostra de sangue foi coletada de um homem de 40 anos que tem jejuado completamente durante uma semana, bebendo apenas água. Qual dos seguintes estará em uma concentração mais elevada do que após uma noite de jejum normal?
 - Glicose.
 - Insulina.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Triacilglicerol.
- Qual das seguintes afirmações sobre os estados metabólicos alimentado e de jejum está correta?
 - No jejum, o glucagon atua para aumentar a atividade da lipase lipoproteica no tecido adiposo.
 - No jejum, o glucagon atua aumentando a síntese de glicogênio a partir de glicose.
 - No estado alimentado, a insulina atua aumentando a quebra de glicogênio para manter a glicose sanguínea.
 - No estado alimentado, há um decréscimo na secreção de insulina em resposta ao aumento de glicose na circulação porta.
 - Os corpos cetônicos são sintetizados no fígado quando em jejum, e a quantidade sintetizada aumenta à medida que o jejum se estende à fome.
- Qual das seguintes afirmações sobre os estados metabólicos alimentado e de jejum está correta?
 - No estado alimentado, o músculo pode captar glicose para uso como combustível metabólico, uma vez que o transporte de glicose para o músculo é estimulado em resposta ao glucagon.
 - No estado alimentado, há um decréscimo na secreção de glucagon em resposta ao aumento de glicose na circulação porta.
 - No estado alimentado, o glucagon atua aumentando a síntese de glicogênio a partir de glicose.
 - A glicose plasmática é mantida durante a fome e o jejum prolongado pela gliconeogênese a partir dos corpos cetônicos.
 - Há um aumento na taxa metabólica durante o jejum.
- Qual das seguintes afirmações sobre os estados metabólicos alimentado e de jejum está correta?
 - Durante o jejum, o músculo sintetiza glicose a partir de aminoácidos.
 - No estado alimentado, o tecido adiposo pode captar glicose para a síntese de triacilglicerol, uma vez que o transporte de glicose para o tecido adiposo é estimulado em resposta ao glucagon.
 - Os corpos cetônicos são sintetizados no músculo durante o jejum, e a quantidade sintetizada aumenta à medida que o jejum se estende à fome.
 - Os corpos cetônicos são um combustível alternativo para as hemácias durante o jejum.
 - A glicose plasmática é mantida durante o jejum e a fome prolongada pela gliconeogênese a partir de ácidos graxos.
- Qual das seguintes afirmações sobre os estados metabólicos alimentado e de jejum está correta?
 - Durante o jejum, o tecido adiposo sintetiza glicose a partir do glicerol liberado pela degradação dos triacilgliceróis.
 - Durante o jejum, o tecido adiposo sintetiza corpos cetônicos.
 - Durante o jejum, o principal combustível para as hemácias são os ácidos graxos liberados do tecido adiposo.
 - Os corpos cetônicos são o principal combustível para o sistema nervoso central durante o jejum.
 - A glicose plasmática é mantida durante o jejum e a fome prolongada pela gliconeogênese hepática a partir dos aminoácidos liberados pela degradação de proteínas musculares.

11. Qual das seguintes afirmações sobre os estados metabólicos alimentado e de jejum está correta?
- Os ácidos graxos e o triacilglicerol são sintetizados no fígado durante o jejum.
 - Durante o jejum, o principal combustível para o sistema nervoso central são os ácidos graxos liberados do tecido adiposo.
 - Durante o jejum, o principal combustível metabólico para a maioria dos tecidos vem dos ácidos graxos liberados do tecido adiposo.
 - No estado alimentado, o músculo não pode captar glicose para uso como combustível metabólico uma vez que o transporte de glicose para o músculo é estimulado em resposta ao glucagon.
 - A glicose plasmática é mantida durante o jejum e a fome prolongada pela gliconeogênese no tecido adiposo a partir do glicerol liberado pelos triacilgliceróis.
12. Um homem de 25 anos visita seu médico e reclama de cólica abdominal e diarreia após tomar leite. Qual é a causa mais provável do problema dele?
- O crescimento excessivo de bactérias e leveduras no intestino grosso.
 - Infecção com o parasito intestinal *Giardia lamblia*.
 - Deficiência de amilase pancreática.
 - Deficiência de lactase no intestino delgado.
 - Deficiência de sucrase-isomaltase no intestino delgado.
13. Qual das seguintes afirmações sobre glicólise e gliconeogênese está correta?
- Todas as reações da glicólise são livremente reversíveis para a gliconeogênese.
 - A frutose não pode ser utilizada na gliconeogênese hepática porque ela não pode ser fosforilada à frutose-6-fosfato.
 - A glicólise pode seguir na ausência de oxigênio apenas se piruvato for formado a partir de lactato no músculo.
 - As hemácias metabolizam glicose apenas por glicólise anaeróbia (e pela via das pentoses-fosfato).
 - O inverso da glicólise é a via da gliconeogênese no músculo esquelético.
14. Qual das seguintes informações sobre a etapa na glicólise catalisada pela hexocinase e na gliconeogênese pela glicose-6-fosfatase está correta?
- Como a hexocinase tem baixo K_m , à sua atividade no fígado aumenta à medida que a concentração de glicose na circulação porta aumenta.
 - A glicose-6-fosfatase é ativa principalmente nos músculos durante o jejum.
 - Se a hexocinase e a glicose-6-fosfatase são igualmente ativas ao mesmo tempo, existe uma formação líquida de ATP a partir de ADP e fosfato.
 - O fígado contém uma isoenzima da hexocinase, a glicocinase, que é especialmente importante no estado alimentado.
 - O músculo pode liberar glicose na circulação, originária de sua reserva de glicogênio, durante o jejum.
15. Qual das seguintes afirmações sobre a etapa da glicólise catalisada pela fosfofrutocinase e da gliconeogênese pela frutose-1,6-bisfosfatase está correta?
- A frutose-1,6-bisfosfatase é ativa principalmente no fígado no estado alimentado.
 - A frutose-1,6-bisfosfatase é ativa principalmente no fígado no estado alimentado.
 - Se a fosfofrutocinase e a frutose-1,6-bisfosfatase são igualmente ativas ao mesmo tempo, existe uma formação líquida de ATP a partir de ADP e fosfato.
 - A fosfofrutocinase é inibida mais ou menos completamente por concentrações fisiológicas de ATP.
 - A fosfofrutocinase é ativa principalmente no fígado durante o jejum.
16. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo de glicose em esforço máximo está correta?
- A gliconeogênese a partir de lactato requer menos ATP do que é formado durante a glicólise anaeróbia.
 - Durante o esforço máximo, o piruvato é oxidado a lactato no músculo.
 - O débito de oxigênio é causado pela necessidade de exalar dióxido de carbono produzido em resposta à acidose.
 - O débito de oxigênio reflete a necessidade de substituir o oxigênio que foi utilizado pelo músculo durante o exercício vigoroso.
 - Ocorre acidose metabólica como resultado de exercício vigoroso.
17. Qual das afirmativas seguintes está correta?
- A glicose-1-fosfato pode ser hidrolisada, rendendo glicose livre no fígado.
 - A glicose-6-fosfato pode ser formada a partir de glicose, mas não a partir de glicogênio.
 - A glicose-6-fosfato não pode ser convertida à glicose-1-fosfato no fígado.
 - A glicose-6-fosfato é formada a partir de glicogênio pela ação da enzima glicogênio-fosforilase.
 - No fígado e nas hemácias, a glicose-6-fosfato pode entrar tanto na glicólise quanto na via das pentoses-fosfato.
18. Qual das afirmativas a seguir sobre o complexo multienzimático da piruvato-desidrogenase está correta?
- Na deficiência de tiamina (vitamina B1), o piruvato formado no músculo não pode ser transaminado à alanina.
 - Na deficiência de tiamina (vitamina B1), o piruvato formado no músculo não pode ser carboxilado a oxalacetato.
 - A reação da piruvato-desidrogenase envolve a descarboxilação e a oxidação de piruvato, e então a formação de acetil-CoA.
 - A reação da piruvato-desidrogenase é prontamente reversível, de forma que a acetil-CoA pode ser utilizada para a síntese de piruvato e, conseqüentemente, de glicose.
 - A reação da piruvato-desidrogenase leva à oxidação de NADH a NAD^+ , e, conseqüentemente, à formação de cerca de $2,5 \times \text{ATP}$ por mol de piruvato oxidado.
19. Qual das afirmativas a seguir sobre a via das pentoses-fosfato está correta?
- No favismo, as hemácias são mais suscetíveis ao estresse oxidativo devido à falta de NADPH para a síntese de ácidos graxos.
 - As pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase não podem sintetizar ácidos graxos devido à falta de NADPH no fígado e no tecido adiposo.
 - A via das pentoses-fosfato é especialmente importante em tecidos que sintetizam ácidos graxos.

- D. A via das pentoses-fosfato é a única fonte de NADPH para a síntese de ácidos graxos.
- E. A via das pentoses-fosfato é uma alternativa à glicólise apenas durante o jejum.
20. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo de glicogênio está correta?
- A. O glicogênio é sintetizado no fígado no estado alimentado e, então, exportado para outros tecidos em lipoproteínas de baixa densidade.
- B. As reservas de glicogênio no fígado e no músculo atenderão aos requisitos de energia para vários dias de jejum prolongado.
- C. O fígado sintetiza mais glicogênio quando a concentração de glicose na circulação hepática porta é alta devido à atividade de glicocinase no fígado.
- D. O músculo sintetiza glicogênio no estado alimentado, uma vez que a glicogênio-fosforilase está ativada em resposta à insulina.
- E. A concentração plasmática de glicogênio aumenta no estado alimentado.
21. Qual das afirmativas a seguir sobre a gliconeogênese está correta?
- A. Como eles formam acetil-CoA, os ácidos graxos podem ser substrato para a gliconeogênese.
- B. Se o oxalacetato é retirado do ciclo do ácido cítrico para a gliconeogênese, ele pode ser repostado pela ação da piruvato-desidrogenase.
- C. A reação da fosfoenolpiruvato-carboxicinas é importante para reabastecer o conjunto de intermediários do ciclo do ácido cítrico.
- D. O uso de GTP como doador de fosfato na reação da fosfoenolpiruvato-carboxicinas fornece uma ligação entre a atividade do ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese.
- E. Existe um maior rendimento de ATP na glicólise anaeróbia do que o custo para a síntese de glicose a partir de lactato.
22. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo dos carboidratos está correta?
- A. Uma etapa chave na biossíntese de glicogênio é a formação de UDP-glicose.
- B. O glicogênio pode ser degradado em glicose-6-fosfato no músculo, que a seguir libera glicose livre através da ação da enzima glicose-6-fosfatase.
- C. O glicogênio é estocado principalmente no fígado e no cérebro.
- D. A insulina inibe a biossíntese de glicogênio.
- E. A fosforilase cinase é uma enzima que fosforila a enzima glicogênio fosforilase e assim reduz a degradação de glicogênio.
23. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo de glicogênio está correta?
- A. A atividade da glicogênio-sintase é aumentada por glucagon.
- B. A glicogênio-fosforilase é uma enzima que pode ser ativada por fosforilação de resíduos de serina.
- C. A glicogênio-fosforilase não pode ser ativada por íons cálcio.
- D. O cAMP ativa a síntese de glicogênio.
- E. A glicogênio-fosforilase quebra as ligações glicosídicas α -1,4 por hidrólise.
24. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo da glicose está correta?
- A. O glucagon aumenta a taxa de glicólise.
- B. A glicólise requer NADP⁺.
- C. Na glicólise, a glicose é clivada em dois compostos de três carbonos.
- D. A fosforilação em nível de substrato ocorre na cadeia de transporte de elétrons.
- E. O principal produto da glicólise nas hemácias é o piruvato.
25. Qual das afirmativas a seguir sobre o metabolismo de açúcares está correta?
- A. A frutocinase fosforila frutose à frutose-6-fosfato.
- B. A frutose é um açúcar do tipo aldose, assim como a glicose.
- C. O transporte de frutose para as células é dependente de insulina.
- D. A galactose é fosforilada à galactose-1-fosfato pela galactocinase.
- E. A sacarose pode ser biossintetizada a partir de glicose e frutose no fígado.
26. Na glicólise, a conversão de 1 mol de frutose-1,6-bisfosfato a 2 moles de piruvato resulta na formação de:
- A. 1 mol de NAD⁺ e 2 moles de ATP.
- B. 1 mol de NADH e 1 mol de ATP.
- C. 2 moles de NAD⁺ e 4 moles de ATP.
- D. 2 moles de NADH e 2 moles de ATP.
- E. 2 moles de NADH e 4 moles de ATP.
27. Qual das afirmativas a seguir fornecerá o principal combustível para a contração muscular durante o esforço máximo de curta duração?
- A. Glicogênio muscular.
- B. Reserva muscular de triacilglicerol.
- C. Glicose plasmática.
- D. Ácidos graxos não esterificados plasmáticos.
- E. Triacilglicerol plasmático contido em lipoproteínas de densidade muito baixa.
28. O dissacarídeo lactulose não é digerido, porém é fermentado por bactérias intestinais, rendendo 4 moles de lactato, além de 4 prótons. O amônio (NH₄⁺) está em equilíbrio com a amônia (NH₃) na corrente sanguínea. Qual das alternativas melhor explica como a lactulose atua no tratamento de hiperamoniemia (concentração de amônio elevada no sangue)?
- A. A fermentação de lactulose aumenta a acidez da corrente sanguínea, de forma que há mais amônio e menos amônia disponível para atravessar a parede intestinal.
- B. A fermentação de lactulose resulta em acidificação do conteúdo intestinal, de forma que a amônia se difunde da corrente sanguínea para o intestino e é aprisionada como amônio, que não pode passar de volta.
- C. A fermentação de lactulose resulta em acidificação do conteúdo intestinal, de forma que a amônia se produzida pelas bactérias intestinais é aprisionada como amônio que não pode se difundir para a corrente sanguínea.
- D. A fermentação de lactulose resulta em um aumento de oito vezes da osmolalidade do conteúdo intestinal, de forma que há mais água para a amônia e o amônio se dissolverem, e, consequentemente, uma menor quantidade é absorvida para a corrente sanguínea.
- E. A fermentação da lactulose resulta em um aumento de oito vezes da osmolalidade do conteúdo intestinal, de forma que há mais água para a amônia e o amônio se dissolverem, e, consequentemente, uma maior quantidade se difundirá da corrente sanguínea para o intestino.

Lipídeos de importância fisiológica

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Definir lipídeos simples e complexos e identificar as classes de lipídeos em cada grupo.
- Indicar a estrutura dos ácidos graxos saturados e insaturados, explicar como o comprimento da cadeia e o grau de insaturação influenciam seu ponto de fusão, fornecer exemplos e explicar a nomenclatura.
- Compreender a diferença entre as ligações duplas *cis* e *trans* entre átomos de carbono.
- Descrever como os eicosanoides são formados pela modificação da estrutura dos ácidos graxos insaturados; identificar as diversas classes dos eicosanoides e indicar suas funções.
- Delinear a estrutura geral dos triacilgliceróis e indicar as suas funções.
- Esboçar a estrutura geral dos fosfolipídeos e dos glicoesfingolipídeos e indicar as funções das diferentes classes.
- Reconhecer a importância do colesterol como precursor de muitos esteroides biologicamente importantes, inclusive hormônios esteroides, ácidos biliares e vitaminas D.
- Reconhecer o núcleo cíclico comum a todos os esteroides, explicar a diferença entre as formas de “cadeira” e de “barco” dos anéis de seis carbonos e elucidar que os anéis podem ser *cis* ou *trans* um em relação ao outro, possibilitando muitos estereoisômeros.
- Explicar por que os radicais livres causam danos aos tecidos e identificar os três estágios da reação em cadeia da peroxidação lipídica que os produz continuamente.
- Compreender como os antioxidantes protegem os lipídeos contra a peroxidação, tanto por inibir a iniciação da cadeia quanto por quebrar a cadeia, e fornecer exemplos fisiológicos e não fisiológicos.
- Compreender que muitas moléculas lipídicas são anfipáticas, tendo grupamentos hidrofóbicos e hidrofílicos em suas estruturas, e explicar como isso influencia seu comportamento em um ambiente aquoso e possibilita que determinadas classes, incluindo fosfolipídeos, esfingolipídeos e colesterol, formem a estrutura básica das membranas biológicas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os lipídeos constituem um grupamento heterogêneo de compostos, incluindo gorduras, óleos, esteroides, ceras e compostos afins, que são relacionados mais por suas propriedades físicas do que pelas químicas. Eles têm a propriedade comum de ser (1) relativamente **insolúveis em água** e (2) **solúveis em solventes apolares**, como o éter e o clorofórmio. Eles são constituintes importantes da dieta, não apenas devido ao alto valor energético das gorduras, mas também porque os ácidos graxos essenciais e as **vitaminas lipossolúveis** e outros **micronutrientes** lipofílicos estão contidos na gordura de alimentos naturais. Acredita-se que a suplementação da dieta com **ácidos graxos ω3 de cadeia longa** possua efeitos benéficos no caso de várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, artrite reumatoide e demência. A gordura é armazenada no **tecido adiposo**, onde serve como isolante térmico nos tecidos subcutâneos e ao redor de determinados órgãos. Os lipídeos apolares agem como **isolantes elétricos**, permitindo a rápida propagação das ondas de despolarização ao longo dos **nervos mielinizados**. Os lipídeos são transportados no sangue combinados com proteínas em partículas **lipoproteicas** (ver Capítulos 25 e 26). Os lipídeos possuem papéis essenciais na nutrição e na saúde, e o conhecimento da bioquímica dos lipídeos é necessário para a compreensão de muitas patologias biomédicas importantes, incluindo **obesidade**, **diabetes melito** e **aterosclerose**.

OS LIPÍDEOS SÃO CLASSIFICADOS COMO SIMPLES OU COMPLEXOS

1. **Os lipídeos simples** incluem as gorduras e as ceras que são ésteres de ácidos graxos com diversos alcoóis:
 - a. **Gorduras:** ésteres de ácidos graxos com glicerol. Os **óleos** são gorduras em estado líquido.
 - b. **Ceras:** ésteres de ácidos graxos com alcoóis monoídricos com peso molecular mais elevado.
2. **Os lipídeos complexos** são ésteres de ácidos graxos contendo grupamentos além de um álcool e um ou mais ácidos graxos. Eles podem ser divididos em três grupos:
 - a. **Fosfolipídeos:** Os lipídeos que contêm, além dos ácidos graxos e um álcool, um resíduo de ácido fosfórico. Frequentemente, eles possuem bases contendo nitrogênio (p. ex., colina) e outros substituintes. Em muitos fosfolipídeos, o álcool é o glicerol (**glicerofosfolipídeos**), mas, nos **esfingofosfolipídeos**, é a esfingosina, a qual contém um grupamento amino.
 - b. **Glicolipídeos (glicosfingolipídeos):** lipídeos contendo um ácido graxo, esfingosina e carboidrato.
 - c. **Outros lipídeos complexos:** lipídeos como sulfolipídeos e aminolipídeos. As lipoproteínas também podem ser classificadas nesta categoria.
3. **Lipídeos precursores e derivados:** incluem ácidos graxos, glicerol, esteroides, outros alcoóis, aldeídos graxos, corpos cetônicos (ver Capítulo 22), hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e micronutrientes e hormônios.

Como não possuem carga elétrica, acilgliceróis (glicerídeos), colesterol e ésteres de colesterol são denominados **lipídeos neutros**.

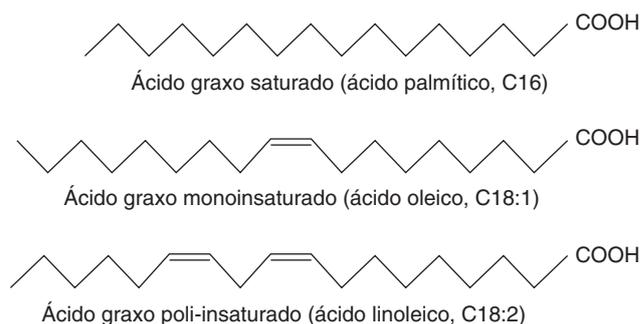


FIGURA 21-1 Ácidos graxos. São mostrados exemplos de ácidos graxos saturado (ácido palmítico), monoinsaturado (ácido oleico) e poli-insaturado (ácido linoleico).

OS ÁCIDOS GRAXOS SÃO ÁCIDOS CARBOXÍLICOS ALIFÁTICOS

Os ácidos graxos ocorrem no organismo principalmente como ésteres em óleos e gorduras naturais, porém são encontrados na forma não esterificada como **ácidos graxos livres**, uma forma de transporte no plasma. Em geral, os ácidos graxos presentes nas gorduras naturais contêm um número uniforme de átomos de carbono. A cadeia pode ser **saturada** (não contém ligações duplas) ou **insaturada** (contém uma ou mais ligações duplas) (Figura 21-1).

Os ácidos graxos são nomeados de acordo com os hidrocarbonetos correspondentes

A nomenclatura sistemática mais comumente empregada nomeia o ácido graxo a partir do hidrocarboneto com o mesmo número e arranjo de átomos de carbono, sendo **-oico** substituído pela terminação **-e** (sistema de Genebra). Portanto, os ácidos saturados terminam em **-anoico** – por exemplo, ácido octanoico (C8) –, e os ácidos insaturados com ligações duplas terminam em **-enoico** – por exemplo, ácido octadecenoico (ácido oleico, C18).

Os átomos de carbono são numerados a partir do carbono da carboxila (carbono nº 1). Os átomos de carbonos adjacentes ao carbono carboxílico (nº 2, 3 e 4) também são conhecidos como carbonos α , β e γ , respectivamente, e o carbono metílico terminal é conhecido como carbono ω ou n .

Diversas convenções utilizam Δ para indicar o número e a posição das ligações duplas (Figura 21-2); por exemplo, Δ^9 indica uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 do ácido graxo; $\omega 9$ indica uma ligação dupla no nono carbono a contar do carbono ω . Em animais, ligações duplas adicionais são introduzidas apenas entre uma ligação dupla existente nas posições $\omega 9$, $\omega 6$ ou $\omega 3$ e o carbono carboxílico, formando as três séries de ácidos graxos conhecidas como **famílias $\omega 9$, $\omega 6$ e $\omega 3$** , respectivamente.

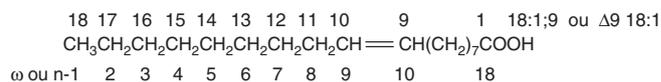


FIGURA 21-2 Nomenclatura para a quantidade e a posição das ligações duplas em ácidos graxos insaturados. Ilustrada utilizando ácido oleico como exemplo. $n - 9$ é equivalente a $\omega 9$.

Os ácidos graxos saturados não contêm ligações duplas

Os ácidos graxos saturados podem ser considerados em relação ao ácido acético ($\text{CH}_3\text{—COOH}$) como o primeiro membro da série em que o $\text{—CH}_2\text{—}$ é progressivamente adicionado entre o $\text{CH}_3\text{—}$ terminal e os grupamentos —COOH . Exemplos são mostrados na Tabela 21-1. Sabe-se que existem outros membros maiores das séries, principalmente nas ceras. Alguns ácidos graxos de cadeia ramificada também foram isolados a partir de fontes vegetais e animais.

Os ácidos graxos insaturados contêm uma ou mais ligações duplas

Os ácidos graxos insaturados (ver Figura 21-1 e Tabela 21-2 para exemplos) ainda podem ser subdivididos da seguinte forma:

1. **Ácidos monoinsaturados** (monoetenóide, monoenoico), contendo uma ligação dupla.
2. **Ácidos poli-insaturados** (polietenóides, polienoicos), contendo duas ou mais ligações duplas.
3. **Eicosanóides**: esses compostos, derivados do ácido graxo polienoico eicosa (20 carbonos) (ver Capítulo 23), compreendem os **prostanóides**, os **leucotrienos (LTs)** e as **lipoxinas (LXs)**. Os prostanóides incluem as **prostaglandinas (PGs)**, as **prostaciclinas (PGIs)** e os **tromboxanos (TXs)**.

Há **prostaglandinas** em quase todos os tecidos de mamíferos, atuando como hormônios locais; apresentam importantes atividades fisiológicas e farmacológicas. Elas são sintetizadas *in vivo* por meio da ciclização do centro da cadeia carbonada de ácidos graxos poli-insaturados de 20 carbonos (eicosanóicos) (p. ex., ácido araquidônico) para formar um anel ciclopentano (Figura 21-3). Uma série relacionada de compostos, os **tromboxanos**, possui o anel ciclopentano interrompido por um átomo de oxigênio (anel oxano) (Figura 21-4). Três ácidos graxos eicosanóicos diferentes dão origem a três grupos de eicosanóides caracterizados pelo número de ligações duplas nas cadeias laterais (ver Figura 23-12); por exemplo,

prostaglandina (PG)₁, PG₂ e PG₃. Diferentes grupos substituintes acoplados ao anel dão origem a uma série de prostaglandinas e tromboxanos marcados como A, B, etc. (ver Figura 23-13); por exemplo, a prostaglandina tipo “E” (PGE₂) possui um grupo ceto na posição 9, ao passo que a tipo “F” possui um grupamento hidroxil nessa posição. Os **leucotrienos** e as **lipoxinas** (Figura 21-5) constituem um terceiro grupo de derivados de eicosanóides formados pela **via da lipoxigenase** (ver Figura 23-14). Eles caracterizam-se pela presença de três ou quatro ligações duplas conjugadas, respectivamente. Os leucotrienos provocam broncoconstrição, assim como são potentes agentes pró-inflamatórios, desempenhando uma função na asma.

A maioria dos ácidos graxos insaturados de ocorrência natural possui ligações duplas *cis*

As cadeias de carbono dos ácidos graxos saturados formam um padrão em zigue-zague quando estendidas a baixas temperaturas (Figura 21-1). Em temperaturas mais elevadas, algumas ligações giram, provocando o encurtamento da cadeia, o que explica por que as biomembranas se tornam mais espessas com o aumento da temperatura. Um tipo de **isomerismo geométrico** ocorre em ácidos graxos insaturados, dependendo da orientação dos átomos ou dos grupamentos ao redor dos eixos das ligações duplas, o que não possibilita a rotação. Quando as cadeias de acil estão do mesmo lado da ligação, ela é ***cis***-, como no ácido oleico; quando em lados opostos, ela é ***trans***-, como no ácido eláidico, o isômero *trans* do ácido oleico (Figura 21-6). Quase todas as ligações duplas nos ácidos graxos insaturados de cadeia longa de ocorrência natural estão na configuração *cis*, e as moléculas estão “curvadas” 120° na ligação dupla. Portanto, o ácido oleico possui formato de V, ao passo que o ácido eláidico permanece “reto”. O aumento no número de ligações duplas *cis* em um ácido graxo leva a uma gama de possíveis configurações espaciais da molécula – por exemplo, o ácido araquidônico, com suas quatro ligações duplas *cis*, está curvado em formato de U (Figura 21-7). Isso tem profunda importância para o empacotamento das membranas celulares (ver Capítulo 40) e nas posições ocupadas pelos ácidos graxos em moléculas mais complexas, como fosfolipídeos. As ligações duplas *trans* alteram essas relações espaciais. Os **ácidos graxos *trans*** estão presentes em determinados alimentos, surgindo como subproduto da saturação dos ácidos graxos durante a hidrogenação ou “endurecimento” de óleos naturais na fabricação da margarina. Uma pequena contribuição adicional se origina da ingestão da gordura de ruminante que contém ácidos graxos *trans* que se originam da ação de microrganismos no rúmen. Atualmente, sabe-se que o consumo dos ácidos graxos *trans* é deletério para a saúde e está associado ao risco aumentado de doenças, inclusive de doença cardiovascular e diabetes melito. Isso levou à melhoria da tecnologia para produzir margarina cremosa pobre em ou sem ácidos graxos *trans*.

As propriedades físicas e fisiológicas dos ácidos graxos refletem o comprimento da cadeia e o grau de insaturação

Os pontos de fusão dos ácidos graxos com quantidades unificadas de carbono aumentam com o comprimento da cadeia

TABELA 21-1 Ácidos graxos saturados

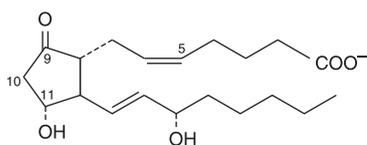
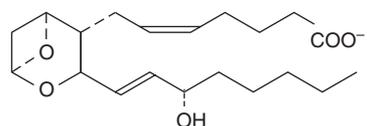
Nome comum	Número de átomos de C	Ocorrência
Acético	2	Principal produto final da fermentação de carboidratos por organismos ruminantes
Butírico	4	Em determinados lipídeos, está em pequenas quantidades (principalmente na manteiga); produto final da fermentação de carboidratos por organismos ruminantes ^a
Valérico	5	
Caproico	6	
Láurico	12	Espermacete, canela, óleos de coco, palma, louro, manteiga
Mirístico	14	Noz-moscada, palma, óleos de coco, murta, manteiga
Palmítico	16	Comum em todas as gorduras animais e vegetais
Esteárico	18	

^aTambém formado no ceco de herbívoros e, em menor extensão, no colo de seres humanos.

TABELA 21-2 Ácidos graxos insaturados de importância fisiológica e nutricional

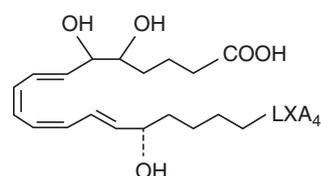
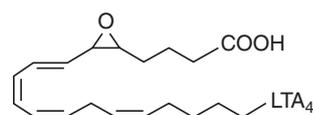
Número de átomos de C e número e posição das ligações duplas comuns	Família	Nome comum	Nome sistemático	Ocorrência
Ácidos monoenoicos (uma ligação dupla)				
16:1;9	ω 7	Palmitoleico	<i>cis</i> -9-Hexadecenoico	Em quase todas as gorduras
18:1;9	ω 9	Oleico	<i>cis</i> -9-Octadecenoico	Possivelmente o ácido graxo mais comum nos gorduras naturais; particularmente elevado no óleo de oliva
18:1;9	ω 9	Eláídico	<i>trans</i> -9-Octadecenoico	Gorduras hidrogenadas e de ruminantes
Ácidos dienoicos (duas ligações duplas)				
18:2;9,12	ω 6	Linoleico	todo- <i>cis</i> -9,12-Octadecadienoico	Milho, amendoim, semente de algodão, soja e muitos óleos vegetais
Ácidos trienoicos (três ligações duplas)				
18:3;6,9,12	ω 6	γ -Linolênico	todo- <i>cis</i> -6,9,12-Octadecatrienoico	Alguns vegetais (p. ex., óleo de primula, óleo de borragem); ácido graxo secundário em animais
18:3;9,12,15	ω 3	α -Linolênico	todo- <i>cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoico	Frequentemente encontrado com o ácido linoleico, mas principalmente no óleo de linhaça
Ácidos tetraenoicos (quatro ligações duplas)				
20:4;5,8,11,14	ω 6	Araquidônico	todo- <i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoico	Encontrado em gorduras animais; importante componente dos fosfolipídeos em animais
Ácidos pentaenoicos (cinco ligações duplas)				
20:5;5,8,11,14,17	ω 3	Timnodônico	todo- <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	Importante componente de óleos de peixe (p. ex., fígado de bacalhau, arenque, savelha, óleos de salmão)
Ácidos hexaenoicos (seis ligações duplas)				
22:6;4,7,10,13,16,19	ω 3	Cervônico	todo- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosa-hexaenoico	Óleos de peixes, óleos de algas, fosfolipídeos no encéfalo

e diminuem de acordo com a insaturação. Um triacilglicerol contendo três ácidos graxos saturados de 12 carbonos ou mais é sólido à temperatura corporal; caso os resíduos de ácido graxo forem poli-insaturados, ele será líquido abaixo de 0°C. Na prática, os acilgliceróis naturais contêm uma mistura de ácidos graxos modelados para se adequarem aos seus papéis funcionais. Por exemplo, os lipídeos de membrana, que devem ser fluidos em todas as temperaturas ambientais, são mais insaturados do que os lipídeos de armazenamento. Os lipídeos nos tecidos que estão sujeitos ao resfriamento, por exemplo, nos animais hibernantes ou nas extremidades de animais, são mais insaturados.

FIGURA 21-3 Prostaglandina E₂ (PGE₂).FIGURA 21-4 Tromboxano A₂ (TXA₂).

Os ácidos graxos ω 3 são anti-inflamatórios e causam benefícios à saúde

Os ácidos graxos ω 3 de cadeia longa, como α -linolênico (ALA) (encontrado em óleos vegetais), eicosapentaenoico (EPA) (encontrado em óleo de peixe) e docosa-hexaenoico (DHA) (encontrado em óleos de peixe e de alga) (Tabela 21-2), possuem efeitos anti-inflamatórios, provavelmente devido ao seu efeito em promover a síntese de menor quantidade de prostaglandinas e leucotrienos inflamatórios quando comparados aos ácidos graxos ω 6 (ver Figura 23-12). Diante disso, a sua potencial utilização como terapia em doenças crônicas graves,

FIGURA 21-5 Estrutura de um leucotrieno e de uma lipoxina. Os exemplos mostrados são leucotrieno A₄ (LTA₄) e lipoxina A₄ (LXA₄).

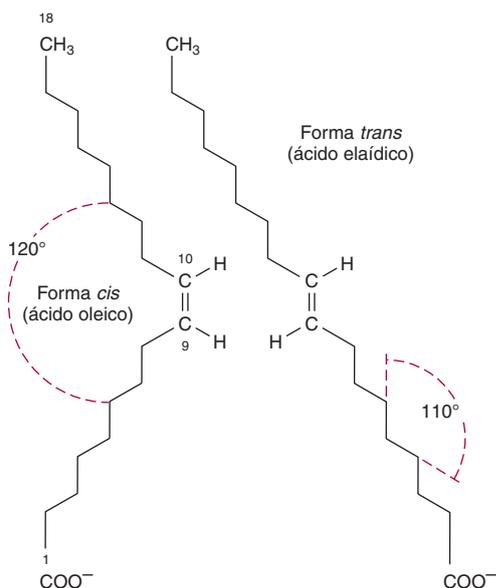


FIGURA 21-6 Isomerismo geométrico dos ácidos graxos Δ^9 , 18:1 (ácidos oleico e eláidico). Não há rotação ao redor das ligações duplas carbono-carbono. Na configuração *cis*, as cadeias acilas estão no mesmo lado da ligação, ao passo que, na forma *trans*, elas estão em lados opostos.

em que a inflamação é uma causa, está sob investigação intensiva. Evidências atuais sugerem que dietas ricas em ácidos graxos $\omega 3$ são benéficas, sobretudo em caso de **doenças cardiovasculares**, mas também em outras doenças degenerativas crônicas, como **câncer**, **artrite reumatoide** e **doença de Alzheimer**.

OS TRIACILGLICERÓIS (TRIGLICERÍDEOS)* SÃO AS PRINCIPAIS FORMAS DE ARMAZENAMENTO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os triacilgliceróis (**Figura 21-8**) são ésteres de glicerol álcool tri-hídrico e ácidos graxos. Mono e diacilgliceróis, em que um ou dois ácidos graxos estão esterificados com o glicerol, também são encontrados nos tecidos. Eles são de particular importância na síntese e na hidrólise de triacilgliceróis (ver Capítulos 24 e 25).

Os carbonos 1 e 3 do glicerol não são idênticos

Para numerar os átomos de carbono do glicerol de forma inequívoca, utiliza-se o sistema *-sn* (numeração estereoquímica). É importante reconhecer que os carbonos 1 e 3 do glicerol não são idênticos quando visualizados em três dimensões (demonstrado como uma fórmula de projeção na **Figura 21-9**).

*De acordo com a terminologia padronizada da International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada) e da International Union of Biochemistry (União Internacional de Bioquímica), os monoglicerídeos, os diglicerídeos e os triglicerídeos devem ser designados monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis respectivamente. No entanto, a terminologia mais antiga ainda é amplamente utilizada, sobretudo na medicina clínica.

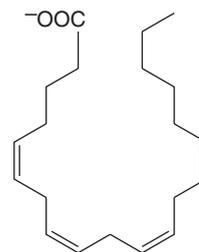


FIGURA 21-7 Ácido araquidônico. Quatro ligações duplas na configuração *cis* mantêm a molécula em formato de U.

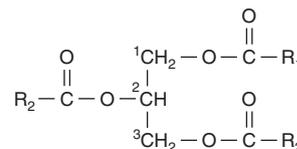


FIGURA 21-8 Triacilglicerol.

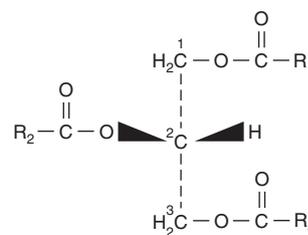


FIGURA 21-9 Fórmula em projeção mostrando um triacil-*sn*-glicerol.

As enzimas são facilmente distinguíveis entre elas e são quase sempre específicas para um ou outro carbono; por exemplo, glicerol é sempre fosforilado em *sn*-3 pela glicerol-cinase, formando glicerol-3-fosfato, e não glicerol-1-fosfato (ver Figura 24-2).

OS FOSFOLIPÍDEOS SÃO OS PRINCIPAIS CONSTITUINTES LIPÍDICOS DAS MEMBRANAS

Muitos fosfolipídeos são derivados do **ácido fosfatídico** (**Figura 21-10**), em que o fosfato é esterificado com um grupo OH do glicerol e os outros dois grupos OH do glicerol são esterificados com dois ácidos graxos de cadeia longa (glicerofosfolipídeos). O ácido fosfatídico é importante como intermediário na síntese de triacilgliceróis, assim como dos fosfogliceróis (ver Figura 24-2), mas não é encontrado em grande quantidade nos tecidos. Esfingolipídeos como a **esfingomielina**, em que o fosfato é esterificado com **esfingosina**, um aminoálcool complexo (**Figura 21-11**), também são componentes importantes das membranas. Glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos possuem duas caudas de hidrocarbonetos de cadeia longa importantes para sua função na formação da bicamada lipídica nas membranas celulares (ver Capítulo 40), porém, no primeiro lipídeo, ambos são cadeias de ácidos graxos, ao passo que, no último, um é ácido graxo e o segundo é parte da molécula de esfingosina (**Figura 21-12**).

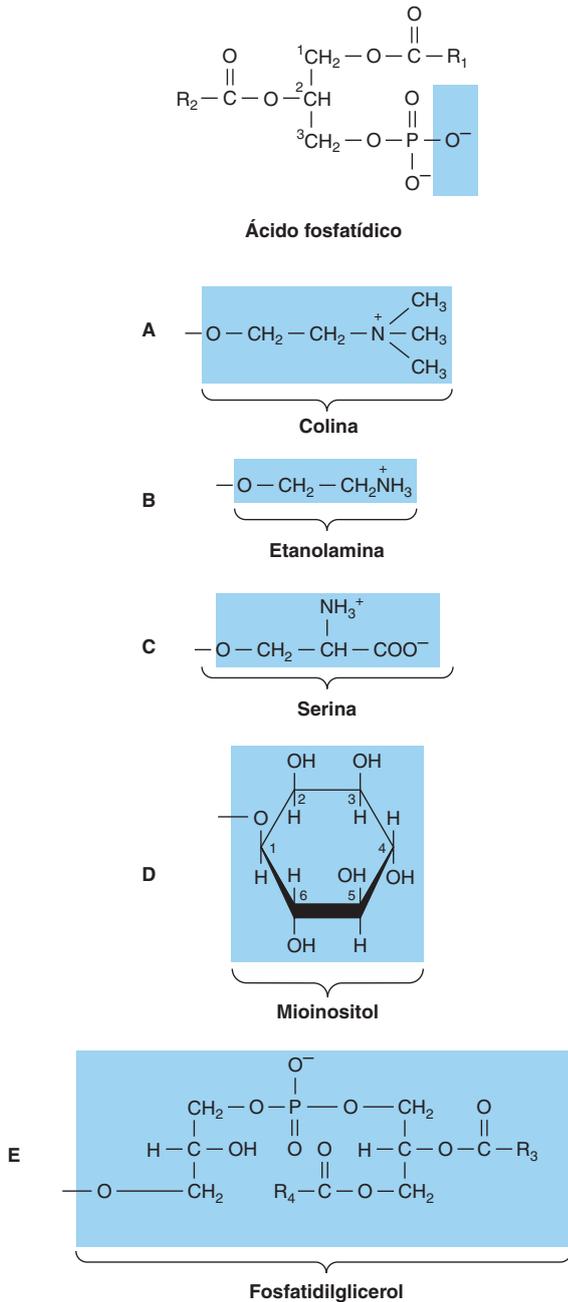


FIGURA 21-10 Fosfolípídeos. O O— mostrado sombreado no ácido fosfatídico é substituído pelos substituintes mostrados, formando os fosfolípídeos: (A) 3-fosfatidilcolina, (B) 3-fosfatidiletanolamina, (C) 3-fosfatidilserina, (D) 3-fosfatidilinositol e (E) cardiolipina (difosfatidilglicerol).

As fosfatidilcolinas (lecitinas) e as esfingomielinas são abundantes nas membranas celulares

Os glicerofosfolípídeos contendo **colina** (Figura 21-10) (fosfatidilcolinas, comumente chamadas de **lecitinas**) são os fosfolípídeos mais abundantes da membrana celular e representam uma grande proporção do estoque de colina corporal. A colina é importante na transmissão nervosa, assim como a acetilcolina, e também como reserva de grupamentos metil

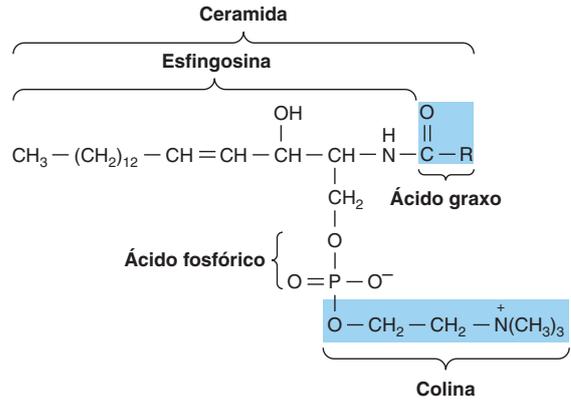


FIGURA 21-11 Esfingomielina.

lábeis. O **dipalmitoil-lecitina** é um agente tensoativo muito efetivo e o principal constituinte do **surfactante** que impede a aderência, devida à tensão de superfície, das paredes internas dos pulmões. A sua ausência nos pulmões de lactentes prematuros provoca a **síndrome da angústia respiratória**. A maior parte dos fosfolípídeos possui um radical acil saturado na posição *sn*-1, mas um radical insaturado na posição *sn*-2 do glicerol.

A **fosfatidiletanolamina (cefalina)** e a **fosfatidilserina** (encontrada na maioria dos tecidos) também são encontradas nas membranas celulares e diferem da fosfatidilcolina apenas pelo fato de que, nesta, a etanolamina ou a serina, respectivamente, substituem a colina (Figura 21-10). A fosfatidilserina também exerce função importante na **apoptose** (morte celular programada).

As esfingomielinas são encontradas na camada exterior da bicamada lipídica da membrana celular e são particularmente abundantes em áreas especializadas da membrana plasmática, conhecidas como **balsas lipídicas** (ver Capítulo 40). Elas também são encontradas em grandes quantidades na **bainha de mielina** que envolve as fibras nervosas. Acredita-se que desempenhem um papel na **sinalização celular** e na **apoptose**. As esfingomielinas não contêm glicerol e, quando hidrolisadas, formam um ácido graxo, ácido fosfórico, colina e esfingosina (Figura 21-11). A combinação de esfingosina mais ácido graxo é conhecida como **ceramida**, uma estrutura também encontrada nos glicosfingolípídeos (ver próxima seção).

O fosfatidilinositol é um precursor de segundos mensageiros

O inositol está presente no **fosfatidilinositol**, assim como no estereoisômero, mioinositol (Figura 21-10). Os fosfatidilinositóis fosforilados (**fosfoinositídeos**) são componentes minoritários das membranas celulares, mas desempenham funções importantes em processos de **sinalização celular** e **transporte através das membranas**. Os fosfoinositídeos podem ter 1, 2 ou 3 grupamentos fosfatos acoplados ao anel inositol. O **fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂)**, por exemplo, é clivado a **diacilglicerol** e **inositol-trifosfato** quando estimulado por um hormônio agonista adequado, e ambos atuam como sinais internos ou segundos mensageiros.

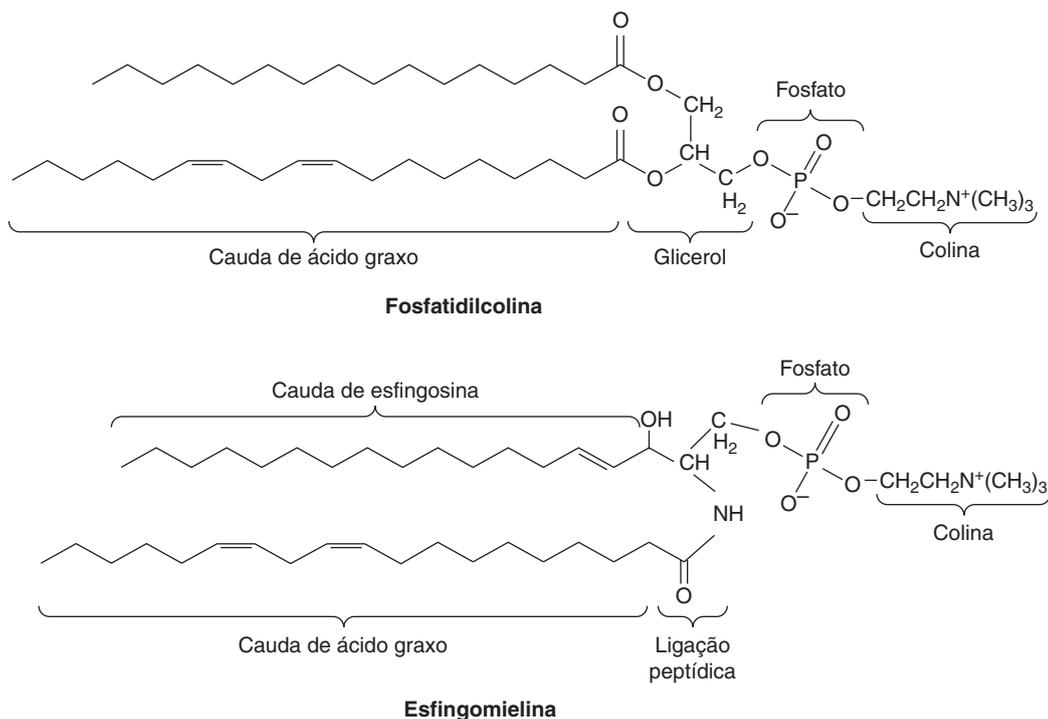


FIGURA 21-12 Comparação das estruturas de glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos. Os dois tipos de fosfolipídeos possuem duas caudas hidrocarbonadas; nos glicerofosfolipídeos, ambas são cadeias de ácidos graxos (está mostrada a fosfatidilcolina com um ácido graxo saturado e um insaturado) e, nos esfingolipídeos, uma é uma cadeia de ácido graxo e a outra é parte de uma porção da esfingosina (está mostrada uma esfingomielina). As duas caudas hidrofóbicas e o grupo cabeça polar são importantes para a função desses fosfolipídeos na bicamada lipídica das membranas celulares (ver Capítulo 40).

A cardiolipina é um lipídeo importante das membranas mitocondriais

O ácido fosfatídico é um precursor do **fosfatidilglicerol**, que, por sua vez, dá origem à **cardiolipina** (Figura 21-10). Esse fosfolipídeo é encontrado apenas na mitocôndria e é essencial para a função mitocondrial. Os níveis diminuídos de cardiolipina ou as alterações em sua estrutura ou no seu metabolismo provocam disfunção mitocondrial no envelhecimento e em condições patológicas, incluindo insuficiência cardíaca, hipotireoidismo e síndrome de Barth (miopatia cardiosquelética).

Os lisofosfolipídeos são intermediários no metabolismo dos fosfogliceróis

Estes fosfoacilgliceróis contêm apenas um radical acil, por exemplo, **lisofosfatidilcolina (lisolecitina)** (Figura 21-13), importante no metabolismo e na interconversão dos fosfo-

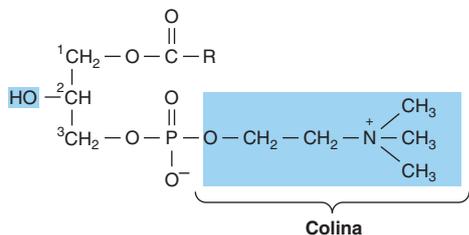


FIGURA 21-13 Lisofosfatidilcolina (lisolecitina).

lipídeos. Ela também é encontrada em lipoproteínas oxidadas e tem sido envolvida em alguns de seus efeitos na promoção da **aterosclerose**.

Os plasmalogênios ocorrem no encéfalo e no músculo

Esses compostos constituem 10 a 30% dos fosfolipídeos do encéfalo e do coração. Do ponto de vista estrutural, os plasmalogênios assemelham-se à fosfatidiletanolamina, porém apresentam uma ligação éter no carbono *sn-1*, em vez da ligação éster encontrada nos acilgliceróis. Em geral, o radical alquil é um álcool insaturado (Figura 21-14). Em alguns casos, a colina, a serina ou o inositol podem substituir a etanolamina. A função dos plasmalogênios permanece mal compreendida, mas tem sido sugerido que podem ter efeito protetor contra espécies reativas de oxigênio.

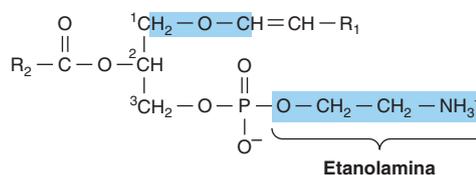


FIGURA 21-14 Plasmalogênio.

OS GLICOLIPÍDEOS (GLICOESFINGOLIPÍDEOS) SÃO IMPORTANTES EM TECIDOS NERVOSOS E NA MEMBRANA CELULAR

Os glicolipídeos são lipídeos com um carboidrato (ou uma cadeia de carboidratos) acoplado. Os glicolipídeos estão amplamente distribuídos em qualquer tecido do organismo, sobretudo em tecido nervoso, como o encéfalo. Eles ocorrem particularmente na camada externa da membrana plasmática, onde formam os **carboidratos de superfície celular** que constituem o **glicocálice** (ver Capítulo 15).

Os principais glicolipídeos encontrados nos tecidos animais são os glicosfingolipídeos. Eles contêm ceramida e um ou mais açúcares. A **galactosilceramida** (Figura 21-15) é um glicosfingolipídeo majoritário no encéfalo e em outros tecidos nervosos, encontrada em quantidades relativamente baixas em outras partes. Ela contém inúmeros ácidos graxos C24 característicos, como o ácido cerebrônico.

A galactosilceramida pode ser convertida em sulfogalactosilceramida (**sulfatídeo**), que possui um grupamento sulfato acoplado ao O na posição três da galactose e está presente em grandes quantidades na **mielina**. A **glicosilceramida** é semelhante à galactosilceramida, mas o grupo cabeça polar é a glicose, em vez da galactose. A glicosilceramida é o glicosfingolipídeo simples predominante nos tecidos extraneurais, e também ocorre no encéfalo em pequenas quantidades. Os **gangliosídeos** são glicosfingolipídeos complexos derivados da glicosilceramida, que também contêm uma ou mais moléculas de um **ácido siálico**. O **ácido neuramínico** (NeuAc; ver Capítulo 15) é o principal ácido siálico encontrado nos tecidos humanos. Os gangliosídeos também estão presentes nos tecidos nervosos em concentrações elevadas. Eles atuam no reconhecimento e comunicação célula célula e como receptores para hormônios e toxinas bacterianas, como a toxina colérica. O gangliosídeo mais simples encontrado nos tecidos é o **GM₃**, o qual contém ceramida, uma molécula de glicose, uma molécula de galactose e uma molécula de NeuAc. Na nomenclatura abreviada utilizada, G representa gangliosídeo; M é uma espécie contendo monossialo; e o subscrito 3 é um número designado com base na migração cromatográfica. O **GM1** (Figura 21-16), gangliosídeo mais complexo derivado do GM₃,

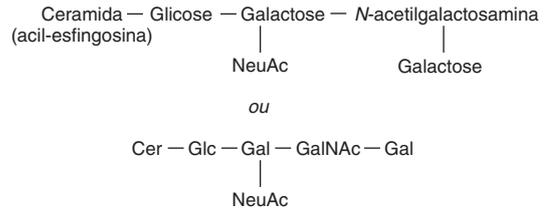


FIGURA 21-16 Gangliosídeo GM1, um monossialogangliosídeo, o receptor para a toxina colérica no intestino humano.

é de considerável interesse biológico, pois se sabe que ele é o receptor no intestino humano para a **toxina colérica**. Outros gangliosídeos podem conter de 1 a 5 moléculas de ácido siálico, originando di-, trissialogangliosídeos, etc.

OS ESTEROIDES DESEMPENHAM MUITAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAMENTE IMPORTANTES

Embora o **colesterol** seja, provavelmente, mais bem conhecido por sua associação com **aterosclerose** e doenças cardíacas, ele tem numerosas funções essenciais no corpo. Ele é o precursor de um grande número de **esteroides** igualmente importantes que incluem **ácidos biliares**, **hormônios corticossuprarrenais**, **hormônios sexuais**, **vitamina D** e **glicosídeos cardíacos**.

Todos os esteroides apresentam um núcleo cíclico similar, assemelhando-se ao fenantreno (anéis A, B e C), ao qual se liga um anel de ciclopentano (D). As posições dos carbonos no núcleo esteroide são numeradas conforme mostrado na Figura 21-17. É importante imaginar que, nas fórmulas estruturais dos esteroides, um anel hexagonal simples indica um anel de seis carbonos totalmente saturado com todas as valências satisfeitas pelas pontes de hidrogênio, salvo demonstração contrária; isto é, ele não é um anel benzênico. Todas as ligações duplas são mostradas dessa forma. As cadeias laterais de grupamentos metil são evidenciadas como ligações simples não acopladas na extremidade oposta (metil). Em geral, essas cadeias ocorrem nas posições 10 e 13 (constituindo os átomos de C 19 e 18). Uma cadeia lateral na posição 17 é comum (como no colesterol). Quando o composto possui um ou mais grupamentos hidroxil e nenhum grupamento carbonila ou carboxila, é um **esterol**, e seu nome termina em *-ol*.

Devido à assimetria na molécula de esteroide, muitos estereoisômeros são possíveis

Cada um dos anéis de seis carbonos do núcleo esteroide é capaz de existir na conformação tridimensional tanto de uma “cadeira” quanto de um “barco” (Figura 21-18). Nos esteroides de ocorrência natural, quase todos os anéis estão na forma de

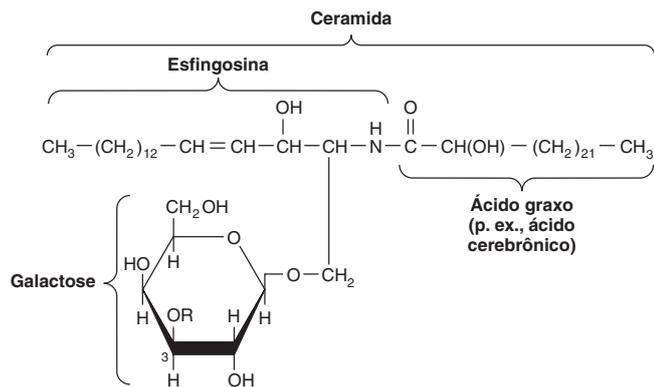


FIGURA 21-15 Estrutura da galactosilceramida.

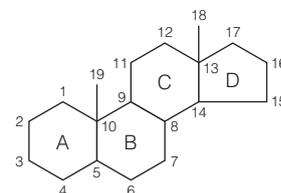


FIGURA 21-17 Núcleo esteroide.

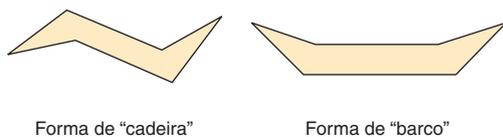


FIGURA 21-18 Conformações dos estereoisômeros do núcleo esteroide.

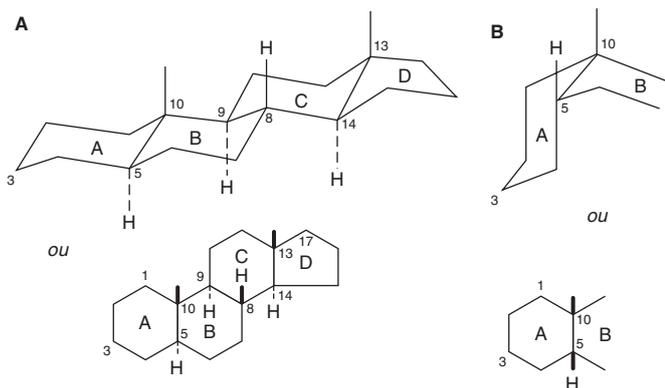


FIGURA 21-19 Núcleo esteroide geral, mostrando (A) uma configuração *todo-trans* entre anéis adjacentes e (B) uma configuração *cis* entre os anéis A e B.

“cadeira”, a qual constitui a conformação mais estável. Em relação um ao outro, os anéis podem ser *cis* ou *trans* (Figura 21-19). A junção entre os anéis A e B pode ser *cis* ou *trans* nos esteroides de ocorrência natural. A junção entre B e C é *trans*, assim como frequentemente acontece na junção C/D. As ligações que fixam os grupamentos substitutos acima do plano dos anéis (ligações β) são mostradas como linhas sólidas em negrito, ao passo que as ligações que prendem os grupamentos abaixo (ligações α) são indicadas por linhas tracejadas. O anel A de um esteroide 5α sempre é *trans* para o anel B, enquanto é *cis* em um esteroide 5β . Os grupamentos metil ligados a C10 e C13 estão invariavelmente na configuração β .

O colesterol é um componente significativo de muitos tecidos

O colesterol (Figura 21-20) está amplamente distribuído em todas as células do organismo, mas principalmente no tecido nervoso. Ele é um constituinte majoritário da membrana plasmática e das lipoproteínas plasmáticas (ver Capítulo 26). Com frequência, é encontrado como **éster de colesterol**, onde o grupamento hidroxil na posição 3 é esterificado por um ácido graxo de cadeia longa. Ele ocorre em animais, mas não em vegetais ou em bactérias.

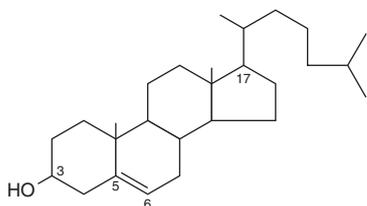


FIGURA 21-20 Colesterol.

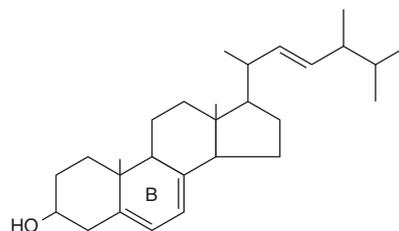


FIGURA 21-21 Ergosterol.

O ergosterol é um precursor da vitamina D

O ergosterol ocorre em plantas e leveduras e é importante como fonte dietética de vitamina D (Figura 21-21). Quando irradiado com luz ultravioleta na pele, o anel B é aberto para formar vitamina D_2 em um processo semelhante ao que forma a vitamina D_3 a partir de 7-desidrocolesterol na pele (ver Figura 44-3).

Os poliprenoides compartilham o mesmo composto original com o colesterol

Embora não sejam esteroides, os **poliprenoides** estão relacionados porque são sintetizados, como o colesterol (ver Figura 26-2), a partir de unidades de isopreno de cinco carbonos (Figura 21-22). Eles compreendem a **ubiquinona** (ver Capítulo 13), que participa da cadeia respiratória na mitocôndria, e o álcool de cadeia longa **dolicol** (Figura 21-23), que participa da síntese de glicoproteínas ao transferir resíduos de carboidratos para resíduos de asparagina no polipeptídeo (ver Capítulo 46). Poliprenoides derivados de vegetais incluem a borracha, a cânfora, as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K e o β -caroteno (provitamina A).

A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA É UMA FONTE DE RADICAIS LIVRES

A peroxidação (**auto-oxidação**) dos lipídeos expostos ao oxigênio é responsável não somente pela deterioração dos alimentos (**ranço**), mas também por danos aos tecidos *in vivo*, podendo constituir causa de câncer, doenças inflamatórias, aterosclerose e envelhecimento. Considera-se que os efeitos deletérios são causados pelos **radicais livres**, moléculas que possuem elétrons de valência não pareados, tornando-os altamente reativos. Os radicais livres contendo oxigênio (p. ex., ROO^{\bullet} , RO^{\bullet} , OH^{\bullet}) são chamados de **espécies reativas de oxigênio (EROs)**. Estas

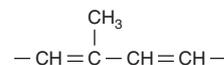


FIGURA 21-22 Unidade de isopreno.

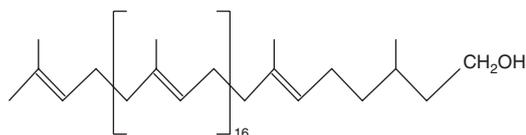


FIGURA 21-23 Dolicol – um álcool C95.

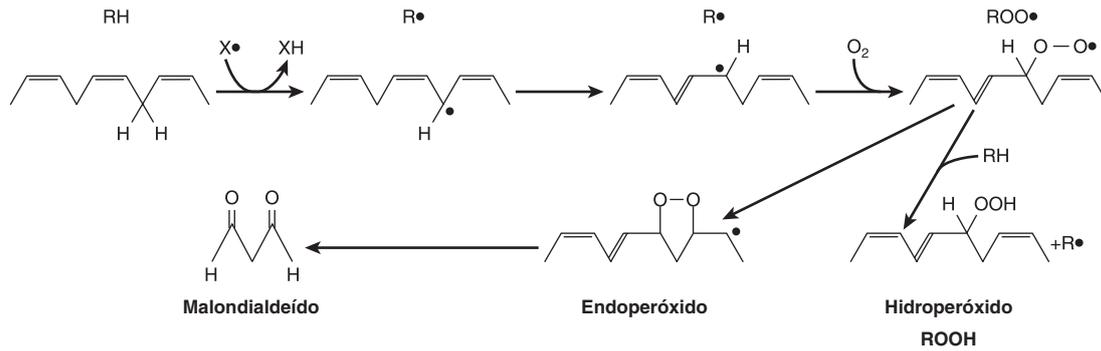
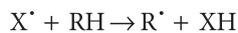


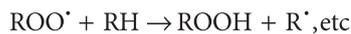
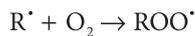
FIGURA 21-24 Peroxidação lipídica. A reação é iniciada por um radical livre existente (X), pela luz ou por íons metálicos. O malondialdeído é formado somente por ácidos graxos com três ou mais ligações duplas e é utilizado como medida da peroxidação lipídica, com o etano oriundo dos dois carbonos terminais de ácidos graxos $\omega 3$ e do pentano originário dos cinco carbonos terminais de ácidos graxos $\omega 6$.

são produzidas durante a formação de peróxidos a partir de ácidos graxos contendo ligações duplas interrompidas por metileno, ou seja, aqueles encontrados nos ácidos graxos poli-insaturados que ocorrem naturalmente (Figura 21-24). A **peroxidação lipídica** é uma reação em cadeia que proporciona fornecimento contínuo de ROS que dá início à peroxidação adicional e, portanto, possui efeitos potencialmente devastadores. O processo como um todo pode ser demonstrado da seguinte maneira:

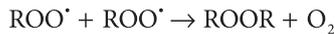
1. Iniciação:



2. Propagação:



3. Terminação:



Para controlar e reduzir a peroxidação lipídica, tanto os seres humanos em suas atividades quanto a natureza usam **antioxidantes**. O galato de propila, o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT,) são antioxidantes empregados como aditivos alimentares. Os antioxidantes de ocorrência natural incluem a vitamina E (tocoferol), que é lipossolúvel, bem como o urato e a vitamina C, que são hidrossolúveis. O betacaroteno é um antioxidante em PO_2 baixo. Os antioxidantes são classificados em dois tipos: (1) **antioxidantes preventivos**, que reduzem a velocidade de iniciação da cadeia, e (2) **antioxidantes que interrompem a cadeia**, que interferem na propagação da cadeia. Os antioxidantes preventivos incluem a catalase e outras peroxidases, como a glutatona-peroxidase (ver Figura 20-3), que reagem com o ROOH; o selênio, que é um componente essencial da glutatona-peroxidase e regula a sua atividade; e os quelantes de íons metálicos, como o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e o ácido dietileno-triaminopentacético (DTPA). *In vivo*, os principais antioxidantes que interrompem a cadeia são a superóxido

dismutase, que age na fase aquosa para dismutar os radicais superóxido livres ($\text{O}_2^{\bullet -}$) urato, e a vitamina E, que atua na fase lipídica para sequestrar os radicais ROO• (ver Figura 44-6).

A peroxidação também é catalisada *in vivo* por compostos contendo heme e pelas **lipoxigenases** (ver Figura 23-14) encontradas em plaquetas e leucócitos. Os outros produtos de auto-oxidação ou de oxidação enzimática com importância fisiológica incluem os **oxiesteróis** (formados a partir do colesterol) e os **isoprostanos** (formados a partir da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico).

AUTO-ORIENTAÇÃO DE LIPÍDEOS ANFIPÁTICOS EM INTERFACES ÓLEO: ÁGUA

Eles formam membranas, micelas, lipossomos e emulsões

Em geral, os lipídeos são insolúveis em água, pois contêm predominância de grupamentos apolares (hidrocarbonetos). No entanto, ácidos graxos, fosfolipídeos, esfingolipídeos, sais biliares e, em menor grau, o colesterol contêm grupamentos polares. Portanto, uma parte da molécula é **hidrofóbica**, ou insolúvel em água, e uma parte é **hidrofílica**, ou solúvel em água. Essas moléculas são descritas como **anfipáticas** (Figura 21-25). Elas orientam-se nas interfaces óleo-água, com o grupamento polar na fase aquosa e o grupamento apolar na fase oleosa. Uma camada dupla desses lipídeos anfipáticos constitui a estrutura básica das **membranas** biológicas (ver Capítulo 40). Quando uma concentração crítica desses lipídeos está presente em meio aquoso, eles formam **micelas**. Os **lipossomos** podem ser formados pela sonicação de um lipídeo anfipático em meio aquoso. Eles consistem em esferas de duplas camadas lipídicas que cercam parte do meio aquoso. As agregações de sais biliares nas micelas e nos lipossomos e a formação de **micelas mistas** com produtos da digestão lipídica são importantes na facilitação da absorção dos lipídeos a partir dos intestinos. Os lipossomos apresentam uso clínico potencial – principalmente quando combinados a anticorpos tecido-específicos – como transportadores de fármacos na circulação, direcionados para órgãos específicos; por exemplo, na

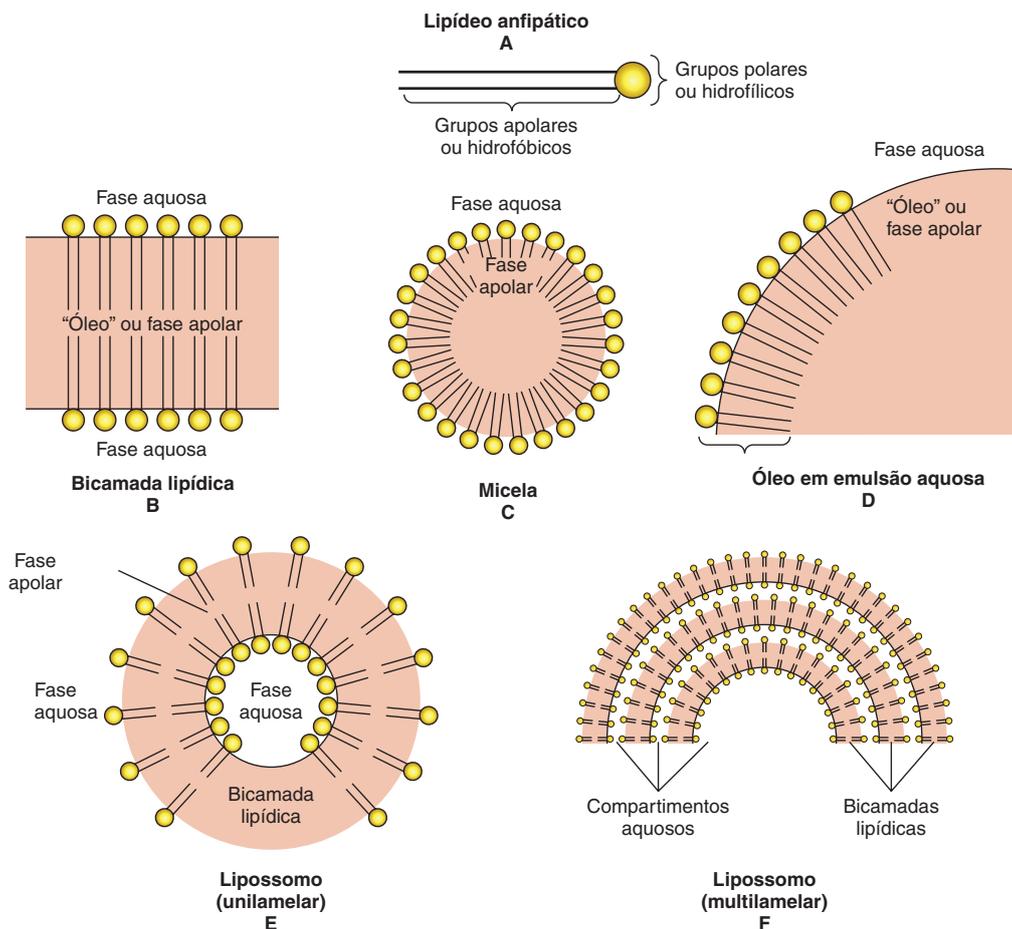


FIGURA 21-25 Formação de membranas lipídicas, micelas, emulsões e lipossomos a partir de lipídeos anfipáticos; por exemplo, os fosfolipídeos.

terapia do câncer. Além disso, eles são utilizados para a transferência de gene para dentro das células vasculares e como transportadores para o fornecimento tópico e transdérmico de fármacos e cosméticos. As **emulsões** são partículas muito maiores, formadas geralmente por lipídeos apolares em meio aquoso. Elas são estabilizadas por agentes emulsificantes como lipídeos anfipáticos (p. ex., fosfatidilcolina), que formam uma camada na superfície, separando grande quantidade do material apolar da fase aquosa (Figura 21-25).

RESUMO

- Os lipídeos possuem a propriedade comum de ser relativamente insolúveis em água (hidrofóbicos), mas solúveis em solventes não polares. Os lipídeos anfipáticos também contêm um ou mais grupos polares, tornando-os apropriados como constituintes de membranas nas interfaces lipídeo-água.
- Os lipídeos de maior importância fisiológica são os ácidos graxos e seus ésteres, junto com colesterol e outros esteróides.
- Os ácidos graxos de cadeia longa podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados, de acordo com o número de ligações duplas existentes. A sua fluidez diminui com o comprimento da cadeia e aumenta de acordo com o grau de insaturação.

- Os eicosanóides são formados a partir de ácidos graxos poli-insaturados com 20 átomos de carbono e constituem um grupo importante de compostos ativos do ponto de vista fisiológico e farmacológico, conhecidos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas.
- Os ésteres de glicerol são, do ponto de vista quantitativo, os lipídeos mais significativos, representados pelo triacilglicerol (“gordura”), importante componente de algumas classes de lipoproteína e forma de armazenamento de lipídeos no tecido adiposo. Os glicerofosfolipídeos e os esfingolipídeos são lipídeos anfipáticos e possuem funções importantes – como principais constituintes de membranas e da camada exterior de lipoproteínas, como surfactante nos pulmões, como precursores de segundos mensageiros e como constituintes do tecido nervoso.
- Os glicolipídeos também são componentes importantes do tecido nervoso, como o cérebro e a camada externa da membrana celular, onde contribuem com carboidratos na superfície celular.
- O colesterol, um lipídeo anfipático, é um importante componente de membranas. Ele é a molécula original a partir da qual são sintetizados todos os outros esteróides no organismo, incluindo hormônios importantes como os corticossuprarrenais e os sexuais, as vitaminas D e os ácidos biliares.
- A peroxidação dos lipídeos portadores de ácidos graxos poli-insaturados leva à produção de radicais livres que causam danos aos tecidos e provocam doenças.

REFERÊNCIAS

- Christie WW: *Lipid Analysis*, 3rd ed. The Oily Press, 2003.
- Dessi M, Noce A, Bertucci P, et al: Atherosclerosis, dyslipidemia and inflammation: the significant role of polyunsaturated fatty acids. *ISRN Inflamm*, 2013;191:823.
- Dowhan W, Bodanov H, Mileykovskaya E: Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:1–37.
- Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ: *The Lipid Handbook with CD-Rom*. CRC Press, 2007.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn K: *Lipid Biochemistry*. Blackwell Publishing, 2002.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, et al: Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005;338:668.
- Tur JA, Bibiloni MM, Sureda A, et al: Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *Brit J Nutr* 2012;107(suppl 2):S23.

Oxidação dos ácidos graxos: cetogênese

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os processos pelos quais os ácidos graxos são transportados no sangue, ativados e transportados para a matriz das mitocôndrias para a sua degradação e consequente obtenção de energia.
- Descrever a via da β -oxidação pela qual os ácidos graxos são metabolizados em acetil-CoA e explicar como esse processo leva à produção de grandes quantidades de trifosfato de adenosina (ATP) a partir dos equivalentes redutores produzidos durante a β -oxidação e o metabolismo subsequente da acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico.
- Identificar os três compostos denominados “corpos cetônicos” e descrever as reações pelas quais são formados nas mitocôndrias hepáticas.
- Reconhecer que os corpos cetônicos são combustíveis importantes para os tecidos extra-hepáticos e indicar as condições nas quais a sua síntese e utilização são favorecidas.
- Indicar os três estágios no metabolismo dos ácidos graxos em que a cetogênese é regulada.
- Compreender que a produção excessiva de corpos cetônicos leva ao desenvolvimento de cetose e, quando prolongada, de cetoacidose, e identificar as condições patológicas nas quais esse processo ocorre.
- Fornecer exemplos de doenças associadas ao comprometimento da oxidação dos ácidos graxos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Embora os ácidos graxos sofram degradação por oxidação à acetil-CoA e também sejam sintetizados a partir dela, a oxidação dos ácidos graxos não representa uma simples reversão de sua biossíntese, e sim um processo inteiramente diferente, que ocorre em outro compartimento da célula. A separação entre a oxidação dos ácidos graxos, que ocorre nas mitocôndrias, e a sua biossíntese, que ocorre no citosol, permite que cada um desses dois processos seja controlado e integrado de acordo com as suas necessidades teciduais. Cada etapa na oxidação dos ácidos graxos envolve derivados de acil-CoA, é catalisada por enzimas distintas, utiliza NAD^+ e FAD como coenzimas e gera ATP. Trata-se de um processo aeróbio, que exige a presença de oxigênio.

O aumento da oxidação dos ácidos graxos constitui uma característica do estado de inanição e do diabetes melito (DM), levando ao aumento da produção de **corpos cetônicos** pelo fígado (**cetose**). Os corpos cetônicos são ácidos, e quando produzidos em excesso por longos períodos de tempo, como

ocorre no diabetes, causam **cetoacidose**, que acaba sendo fatal. Como a gliconeogênese depende da oxidação dos ácidos graxos, qualquer comprometimento na oxidação dos ácidos graxos leva à **hipoglicemia**. Isso ocorre em vários estados de **deficiência de carnitina** ou de deficiência de enzimas essenciais para a oxidação dos ácidos graxos, como a **carnitina-palmitoil-transferase**, ou durante a inibição da oxidação dos ácidos graxos por substâncias tóxicas, como a **hipoglicina**.

A OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OCORRE NAS MITOCÔNDRIAS

Os ácidos graxos são transportados no sangue como ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres (AGLs) – também chamados de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) (Capítulo 21) – são ácidos graxos que estão no **estado não esterificado**. No plasma, os AGLs de cadeias mais longas estão associados à **albumina**, ao

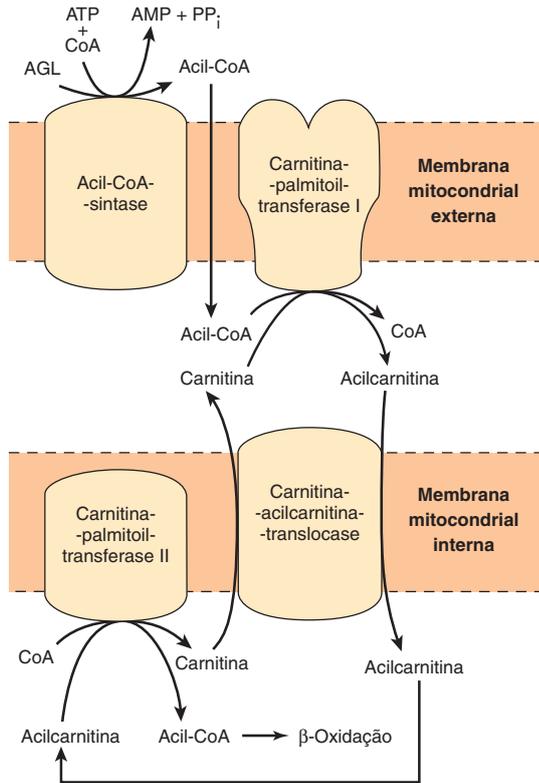


FIGURA 22-1 Papel da carnitina no transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna. A acil-CoA de cadeia longa entra no espaço intermembrana após a sua formação pela acil-CoA-sintase, mas não pode passar através da membrana mitocondrial interna. Para o transporte através da membrana, portanto, os grupos acil são transferidos da CoA para a carnitina pela carnitina-palmitoil-transferase I (inserida na membrana mitocondrial externa). A acilcarnitina formada pode, então, ser transportada para a matriz mitocondrial pela carnitina-acilcarnitina-translocase (inserida na membrana mitocondrial interna) em troca de uma carnitina livre. O grupo acil é, então, transferido de volta para a CoA pela carnitina-palmitoil-transferase II, formando novamente acil-CoA, e a carnitina liberada é transportada de volta para o espaço intermembrana através da enzima translocase.

passo que na célula, estão ligados a uma **proteína de ligação de ácidos graxos**, de modo que nunca estão realmente “livres”. Os ácidos graxos de cadeias mais curtas são mais hidrossolúveis e ocorrem como ácidos não ionizados ou como ânions de ácido graxo.

Os ácidos graxos são ativados antes de ser catabolizados

Os ácidos graxos devem ser inicialmente convertidos em um intermediário ativo antes que possam ser catabolizados. Trata-se da única etapa em todo o processo de degradação de um ácido graxo que requer a energia proveniente do ATP. Na presença de ATP e de coenzima A, a enzima **acil-CoA-sintase (tiocinase)** catalisa a conversão de um ácido graxo livre a um “ácido graxo ativado” ou **acil-CoA**, usando um fosfato de alta energia e formando AMP e PP_i (**Figura 22-1**). O PP_i é hidrolisado pela **pirofosfatase inorgânica**, com perda de mais um fosfato de alta energia, assegurando o progresso da reação

global até o seu término. As acil-CoA-sintases são encontradas no retículo endoplasmático, nos peroxissomos e tanto no interior quanto na membrana externa das mitocôndrias.

Os ácidos graxos de cadeia longa atravessam a membrana mitocondrial interna como derivados da carnitina

A **carnitina** (butirato de β-hidroxi-γ-trimetilamônio), (CH₃)₃N⁺—CH₂—CH(OH)—CH₂—COO⁻, possui ampla distribuição e é particularmente abundante no músculo. Acilas-CoA de cadeia longa (ou AGLs) não podem atravessar a membrana interna das mitocôndrias. Na presença de carnitina, no entanto, a **carnitina-palmitoil-transferase I**, localizada na membrana mitocondrial externa, transfere grupos acil de cadeia longa da CoA para a carnitina, formando **acilcarnitina** e liberando CoA. A acilcarnitina é capaz de penetrar na membrana interna e ter acesso ao sistema enzimático da β-oxidação por meio do transportador de troca na membrana interna, **carnitina-acilcarnitina-translocase**. O transportador liga acilcarnitina e a transporta através da membrana em troca de carnitina. O grupo acil é, então, transferido para a CoA, de forma que acil-CoA é formada novamente e a carnitina é liberada. Essa reação é catalisada pela **carnitina-palmitoil-transferase II**, que está localizada no lado de dentro da membrana interna (**Figura 22-1**).

A β-oxidação de ácidos graxos envolve clivagens sucessivas com a liberação de acetil-CoA

Na via da **β-oxidação** (**Figura 22-2**), são clivados dois carbonos por vez de moléculas acil-CoA, iniciando pela extremidade de carboxila. A cadeia é clivada entre os átomos de carbono α(2) e β(3) – por isso, o nome β-oxidação. As unidades de dois carbonos formadas são de acetil-CoA; por conseguinte, o palmitoil-CoA forma oito moléculas de acetil-CoA.

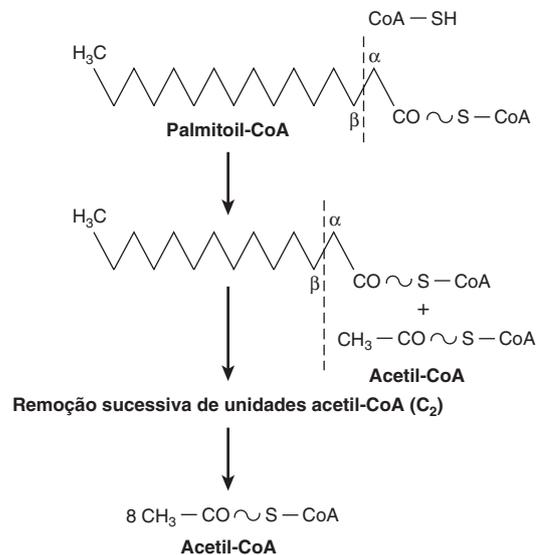


FIGURA 22-2 Visão geral da β-oxidação dos ácidos graxos.

O ciclo da β-oxidação gera FADH₂ e NADH

Várias enzimas, conhecidas como “oxidase de ácido graxo”, são encontradas na matriz mitocondrial ou na membrana interna, adjacentes à cadeia respiratória. Elas catalisam a oxidação de acil-CoA à acetil-CoA por meio da via da β-oxidação. O sistema prossegue de forma cíclica, o que resulta na degradação de ácidos graxos longos à acetil-CoA. Nesse processo, grandes quantidades de equivalentes redutores FADH₂ e NADH são geradas e utilizadas para formar ATP pela fosforilação oxidativa (ver Capítulo 13) (Figura 22-3).

A primeira etapa consiste na remoção de dois átomos de hidrogênio dos átomos de carbono α (2) e β(3), em uma reação catalisada pela **acil-CoA-desidrogenase**, que requer a presença de FAD. Isso resulta na formação de Δ²-trans-enoil-CoA e FADH₂. A reoxidação do FADH₂ pela cadeia respiratória requer a participação de outra flavoproteína, denominada **flavoproteína transferidora de elétrons** (ver Capítulo 12). Água é adicionada para saturar a dupla ligação e formar 3-hidroxiacil-CoA, catalisada pela Δ²-enoil-CoA-hidratase. O derivado 3-hidroxi sofre uma desidrogenação adicional no carbono 3, catalisada pela L(+)-3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase, com formação do composto 3-cetoacil-CoA correspondente. Nesse caso, o NAD⁺ é a coenzima envolvida. Por fim, a 3-cetoacil-CoA é clivada na posição 2,3 pela **tiolase** (3-cetoacil-CoA-tiolase), formando acetil-CoA e uma nova acil-CoA com dois carbonos a menos do que a molécula original de acil-CoA. A acil-CoA formada na reação de clivagem entra novamente na via oxidativa, na reação 2 (Figura 22-3). Dessa forma, um ácido graxo de cadeia longa com número par de átomos de carbono pode ser completamente degradado à acetil-CoA (unidades de C₂). Por exemplo, após sete ciclos, o ácido graxo C16, palmitato, seria convertido a oito moléculas de acetil-CoA. Como a acetil-CoA pode ser oxidada a CO₂ e água por meio do ciclo do ácido cítrico (que também é encontrado no interior das mitocôndrias), obtém-se, então, a oxidação completa dos ácidos graxos.

A oxidação de um ácido graxo com número ímpar de átomos de carbono dá origem à acetil-CoA e a uma molécula de propionil-CoA

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbonos são oxidados pela via da β-oxidação descrita, produzindo acetil-CoA até formar um resíduo de três carbonos (propionil-CoA). Esse composto é convertido em succinil-CoA, um constituinte do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-2). Portanto, o **resíduo propionil de um ácido graxo de cadeia ímpar constitui a única parte de um ácido graxo que é glicogênica**.

A oxidação dos ácidos graxos produz uma grande quantidade de ATP

O transporte de elétrons provenientes do FADH₂ e do NADH pela cadeia respiratória leva à síntese de quatro fosfatos de alta energia (ver Capítulo 13) para cada um dos sete ciclos necessários para a degradação do ácido graxo C16, o palmitato, em acetil-CoA (7 × 4 = 28). Formam-se, no total, 8 moles

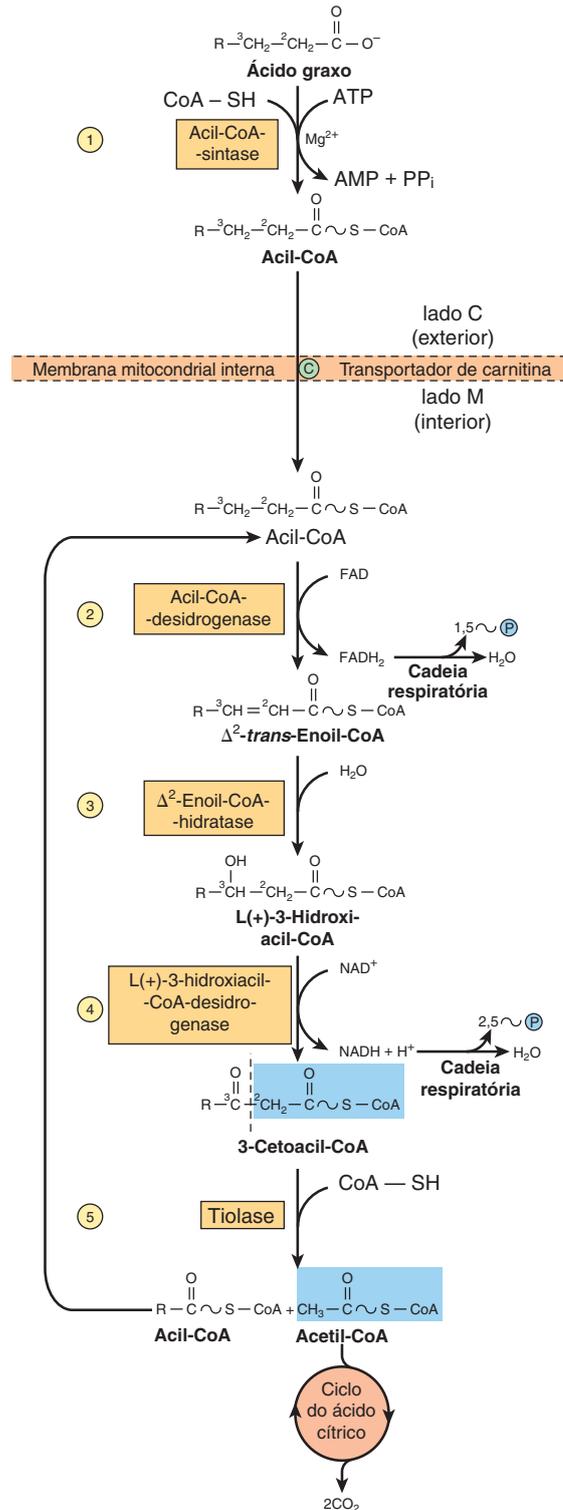


FIGURA 22-3 β-Oxidação dos ácidos graxos. A acil-CoA de cadeia longa é processada pelas reações 2 a 5, com remoção de acetil-CoA, em cada ciclo, pela tiolase (reação 5). Quando o comprimento do radical acil é de apenas quatro átomos de carbono, são formadas duas moléculas de acetil-CoA na reação 5.

de acetil-CoA, e cada um dá origem a 10 moles de ATP no processo de oxidação no ciclo do ácido cítrico, resultando em 8 × 10 = 80 moles. Deve-se subtrair 2 para a ativação inicial do

TABELA 22-1 Geração de ATP a partir da oxidação completa de um ácido graxo C16

Etapa	Produto	Quantidade de produto formado (mol)/mol palmitato	ATP formado (mol)/mol produto	ATP total formado (mol)/mol palmitato	ATP utilizado (mol)/mol palmitato
Ativação		–			2
β -Oxidação	FADH ₂	7	1,5	10,5	–
β -Oxidação	NADH	7	2,5	17,5	–
Ciclo do ácido cítrico	Acetil-CoA	8	10	80	–
Total de ATP formado (mol)/mol palmitato				108	
Total de ATP utilizado (mol)/mol palmitato					2

A tabela mostra como a oxidação de 1 mol do ácido graxo C16, palmitato, gera 106 moles de ATP (108 formados no total – 2 utilizados na etapa de ativação).

ácido graxo, gerando um ganho líquido de 106 moles de ATP por mol de palmitato (Tabela 22-1), ou $106 \times 30,5^* = 3.233$ kJ. Isso representa 33% da energia livre obtida da combustão do ácido palmítico.

Os peroxissomos oxidam os ácidos graxos de cadeia muito longa

Nos **peroxissomos**, existe uma forma modificada de β -oxidação que leva à formação de acetil-CoA e H₂O₂ (a partir da etapa da desidrogenase ligada à flavoproteína), que é degradado pela catalase (ver Capítulo 12). Portanto, essa desidrogenação nos peroxissomos não está diretamente ligada à fosforilação e à geração de ATP. O sistema facilita a oxidação dos **ácidos graxos de cadeia muito longa** (p. ex., C₂₀, C₂₂). As enzimas responsáveis são induzidas por dietas ricas em gordura e, em algumas espécies, por medicamentos hipolipidêmicos, como o clofibrato.

As enzimas presentes nos peroxissomos não atacam os ácidos graxos de cadeias mais curtas; a sequência da β -oxidação termina na octanoil-CoA. Os grupos octanoil e acetil são subsequentemente oxidados nas mitocôndrias. Outro papel da β -oxidação nos peroxissomos consiste em encurtar a cadeia lateral do colesterol durante a formação dos ácidos biliares (ver Capítulo 26). Os peroxissomos também participam da síntese de glicerolipídeos éteres (ver Capítulo 24), colesterol e dolicol (ver Figura 26-2).

A oxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre por uma via modificada de β -oxidação

Os ésteres de CoA de ácidos graxos insaturados são degradados pelas enzimas normalmente responsáveis pela β -oxidação até a formação de um composto Δ^3 -*cis*-acil-CoA ou de um composto Δ^4 -*cis*-acil-CoA, dependendo da posição das duplas ligações (Figura 22-4). O primeiro composto é isomerizado (Δ^3 -*cis* \rightarrow Δ^2 -*trans*-enoil-CoA-isomerase) ao Δ^2 -*trans*-CoA correspondente, para subsequente hidratação e oxidação. Qualquer Δ^4 -*cis*-acil-CoA remanescente, como no caso do ácido linoleico, ou que esteja entrando na via nesse ponto após conversão pela acil-CoA-desidrogenase em Δ^2 -*trans*- Δ^4 -*cis*-dienoil-CoA, é então metabolizado, conforme indicado na Figura 22-4.

* ΔG para a reação do ATP, como explicado no Capítulo 11.

A CETOGÊNESE OCORRE QUANDO HÁ UMA ELEVADA TAXA DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO FÍGADO

Em condições metabólicas associadas a uma elevada taxa de oxidação dos ácidos graxos, o fígado produz quantidades consideráveis de **acetacetato** e **D(-)-3-hidroxi-butilirato** (β -hidroxibutilirato). O acetacetato sofre descarboxilação contínua e espontânea, produzindo **acetona**. Essas três substâncias são coletivamente conhecidas como **corpos cetônicos** (também denominados corpos de acetona ou “cetonas” [incorretamente**]) (Figura 22-5). O acetacetato e o 3-hidroxi-butilirato sofrem interconversão pela enzima mitocondrial, a **D(-)-3-hidroxi-butilirato-desidrogenase**; o equilíbrio é controlado pela razão [NAD⁺]/[NADH] mitocondrial, isto é, pelo **estado redox**. A concentração total de corpos cetônicos no sangue de mamíferos bem-alimentados normalmente não ultrapassa 0,2 mmol/L, exceto nos ruminantes, nos quais ocorre formação contínua de 3-hidroxi-butilirato a partir do ácido butírico (um produto da fermentação do rúmen) na parede do rúmen. Em animais não ruminantes, o fígado parece constituir o único órgão a adicionar quantidades significativas de corpos cetônicos ao sangue *in vivo*. Os tecidos extra-hepáticos utilizam acetacetato e β -hidroxibutilirato como substratos respiratórios. A acetona é um produto residual que, sendo volátil, pode ser excretado pelos pulmões. Como há síntese ativa, mas pouca utilização dos corpos cetônicos no fígado, enquanto eles são utilizados, mas não produzidos em tecidos extra-hepáticos, existe um fluxo líquido dos compostos para os tecidos extra-hepáticos (Figura 22-6).

O 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é um intermediário na via da cetogênese

As enzimas responsáveis pela formação dos corpos cetônicos estão associadas, principalmente, às mitocôndrias. Duas moléculas de acetil-CoA formadas durante a β -oxidação se condensam para formar o acetoacetil-CoA mediante reversão da reação da **tiolase**. O acetoacetil-CoA, que constitui o material inicial para a cetogênese, também se origina diretamente dos quatro carbonos terminais de um ácido graxo durante a β -oxidação (Figura 22-7). A condensação do acetoacetil-CoA com outra

**O termo “cetonas” não deve ser utilizado, já que existem cetonas no sangue que não são corpos cetônicos; por exemplo, o piruvato e a frutose.

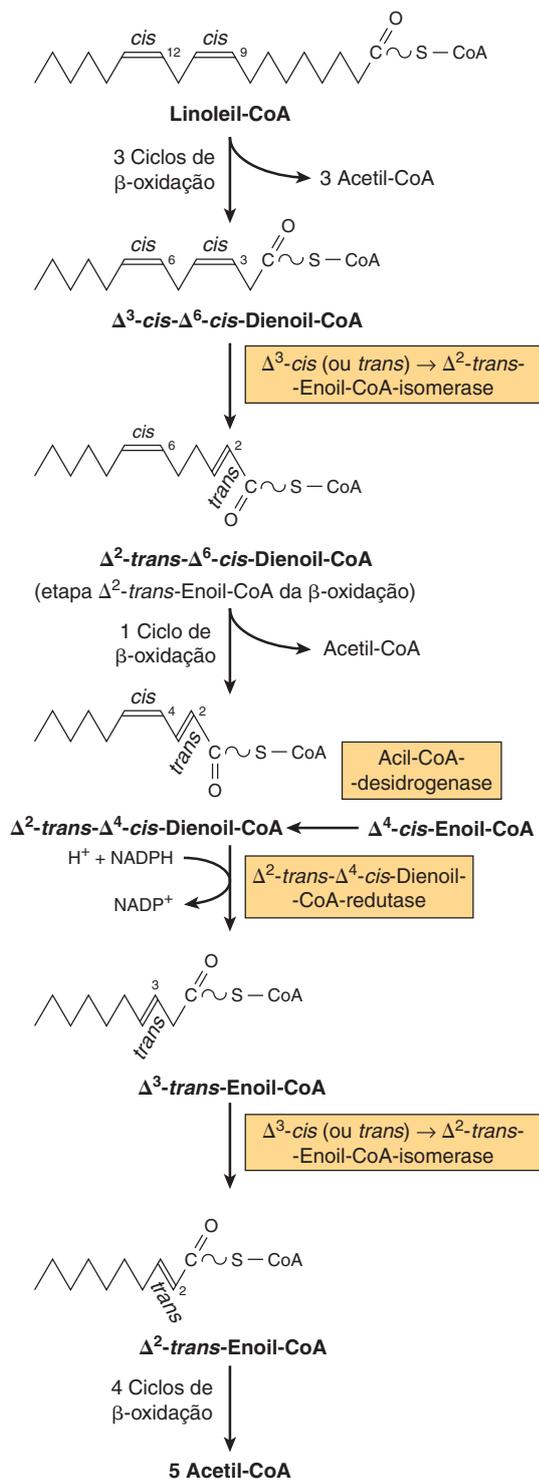


FIGURA 22-4 A sequência de reações na oxidação dos ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico. Os ácidos graxos Δ⁴-cis ou ácidos graxos que formam Δ⁴-cis-enoil-CoA entram na via na posição indicada na figura. O NADPH para a etapa da dienoil-CoA-redutase é fornecido por fontes intramitocondriais, como a glutamato-desidrogenase, a isocitrato-desidrogenase e a NAD(P)H trans-hidrogenase.

molécula de acetil-CoA pela **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintase** forma o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (**HMG-CoA**). Em seguida, a **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-liase** atua na

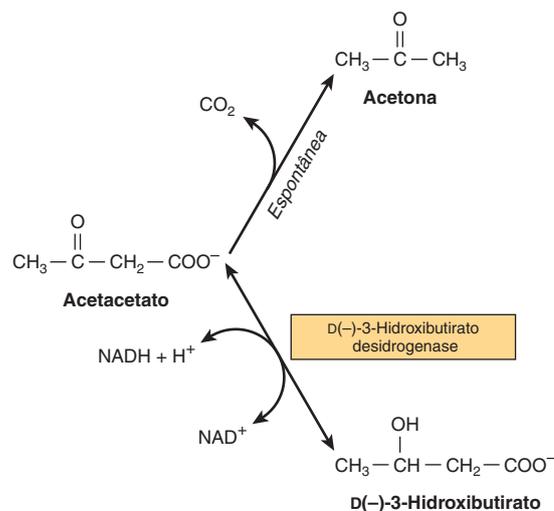


FIGURA 22-5 Inter-relações dos corpos cetônicos. A D(-)-3-hidroxiubutirato-desidrogenase é uma enzima mitocondrial.

clivagem da acetil-CoA do HMG-CoA, deixando o acetacetato livre. Os átomos de carbono retirados da molécula de acetil-CoA provêm da molécula original de acetoacetil-CoA. **Ambas as enzimas precisam estar presentes nas mitocôndrias para que ocorra a cetogênese.** Esse processo só ocorre no fígado e no epitélio do rúmen. O D(-)-3-hidroxiubutirato é o corpo cetônico que predomina quantitativamente no sangue e na urina na presença de cetose.

Os corpos cetônicos servem como combustível para os tecidos extra-hepáticos

Embora o acetacetato seja produzido por um mecanismo enzimático ativo a partir de acetoacetil-CoA no fígado, o acetacetato, uma vez formado, não pode ser diretamente reativado, exceto no citosol, onde é utilizado em uma via muito menos ativa como precursor na síntese de colesterol (Capítulo 26). Isso explica a produção líquida de corpos cetônicos pelo fígado.

Nos tecidos extra-hepáticos, o acetacetato é ativado a acetoacetil-CoA pela **succinil-CoA-acetacetato-CoA-transferase**. A CoA é transferida do succinil-CoA para formar o acetoacetil-CoA (**Figura 22-8**). Com o acréscimo de uma CoA, o acetoacetil-CoA é clivado em duas acetil-CoA pela tiolase e oxidado no ciclo do ácido cítrico. Se o nível sanguíneo subir, a oxidação dos corpos cetônicos aumenta até que, em uma concentração de cerca de 12 mmol/L, o mecanismo oxidativo esteja saturado. Quando isso ocorre, grande parte do consumo de oxigênio pode ser atribuída à oxidação dos corpos cetônicos.

Na maioria dos casos, **a cetonemia é causada pela produção aumentada de corpos cetônicos** pelo fígado, e não por uma deficiência de sua utilização pelos tecidos extra-hepáticos. Embora o acetacetato e o D(-)-3-hidroxiubutirato sejam prontamente oxidados pelos tecidos extra-hepáticos, a acetona é difícil de ser oxidada *in vivo* e é volatilizada, em grande parte, nos pulmões.

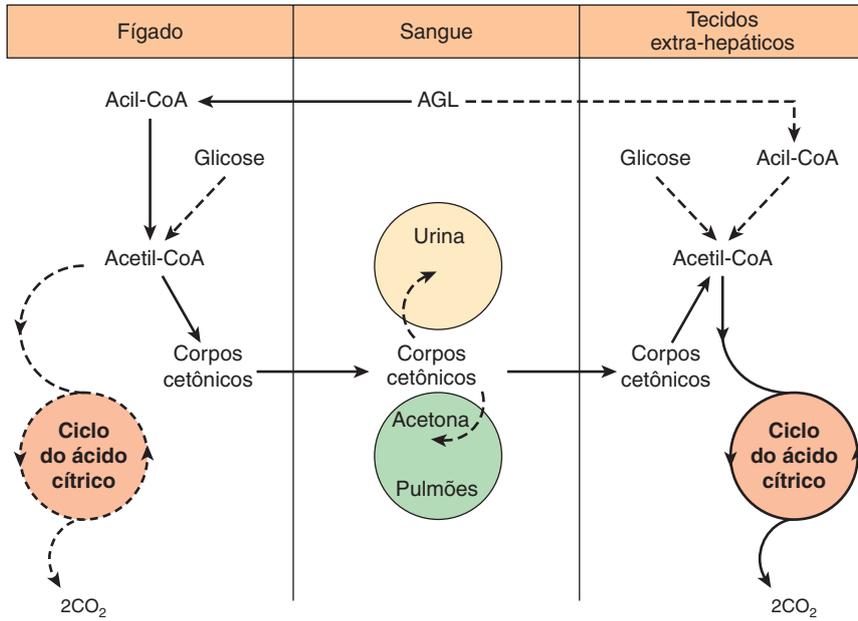


FIGURA 22-6 Formação, utilização e excreção dos corpos cetônicos. (A via principal está indicada por setas contínuas.)

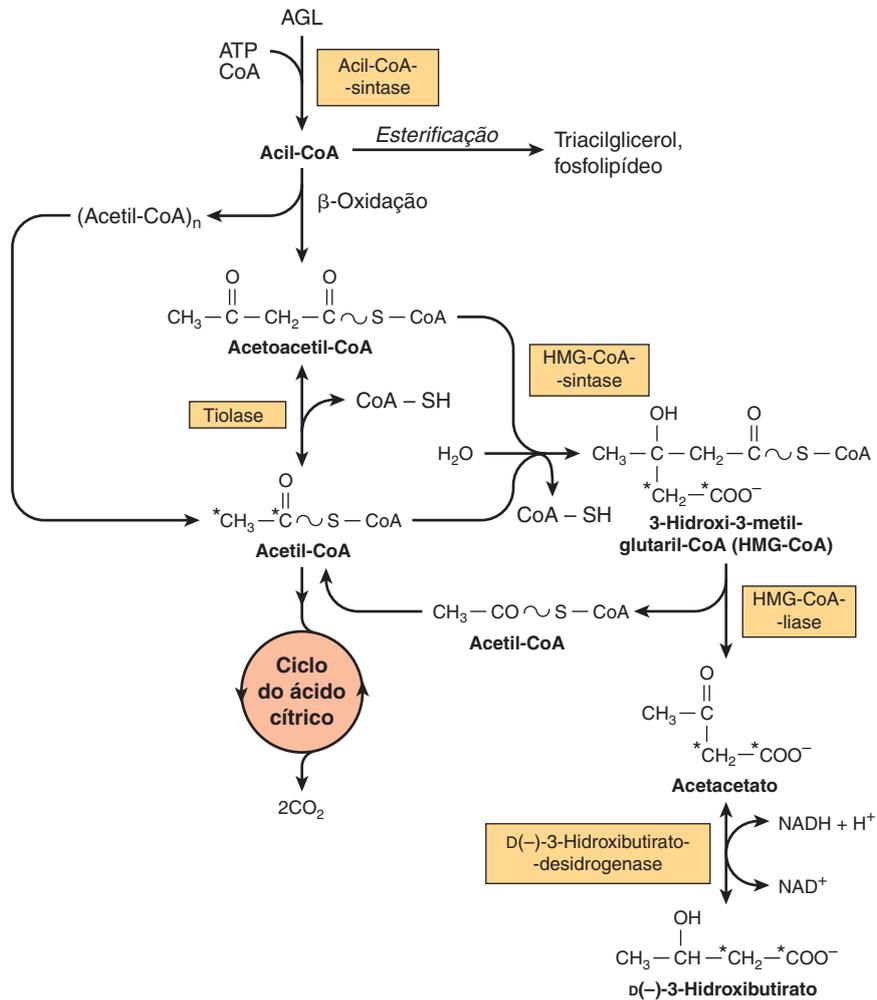


FIGURA 22-7 Vias da cetogênese no fígado. (AGL, ácidos graxos livres.)

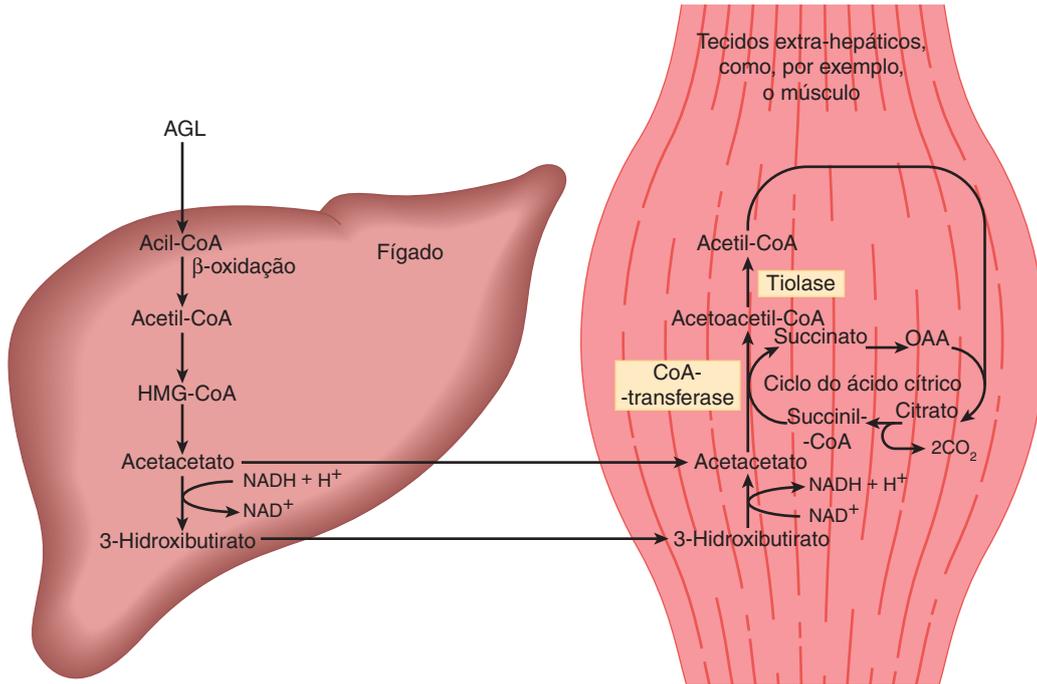


FIGURA 22-8 Transporte dos corpos cetônicos a partir do fígado e vias de utilização e oxidação nos tecidos extra-hepáticos.

Na cetonemia moderada, a perda de corpos cetônicos pela urina corresponde apenas a um pequeno percentual da produção e da utilização total dos corpos cetônicos. Como existem efeitos semelhantes ao limiar renal (não há um verdadeiro limiar), que variam de acordo com as espécies e os indivíduos, a determinação da cetonemia, e não da cetonúria, constitui o método preferido para avaliar a gravidade da cetose.

A CETOGÊNESE É REGULADA EM TRÊS ETAPAS CRUCIAIS

1. A cetose não ocorre *in vivo*, a não ser que haja aumento nos níveis de AGL circulantes provenientes da lipólise do triacilglicerol no tecido adiposo. **Os AGL são os precursores dos corpos cetônicos no fígado.** O fígado, tanto no estado alimentado como em jejum, extrai cerca de 30% dos AGL que passam por ele, de forma que em altas concentrações o fluxo que passa para o fígado é substancial. **Portanto, os fatores que regulam a mobilização dos AGL do tecido adiposo são importantes no controle da cetogênese (Figuras 22-9 e 25-8).**
2. Após a sua captação pelo fígado, os AGL são **β-oxidados** em CO₂ ou corpos cetônicos, ou **esterificados** em triacilglicerol e fosfolípidos. A entrada dos ácidos graxos na via oxidativa é regulada pela **carnitina-palmitoil-transferase-I (CPT-I)** (Figura 22-1), e o restante dos ácidos graxos captados é esterificado. A atividade da CPT-I é baixa no estado alimentado, levando à diminuição da oxidação dos ácidos graxos, ao passo que se apresenta alta no jejum prolongado, permitindo aumento na oxidação dos ácidos graxos. A **malonil-CoA**, intermediário inicial na biossíntese dos

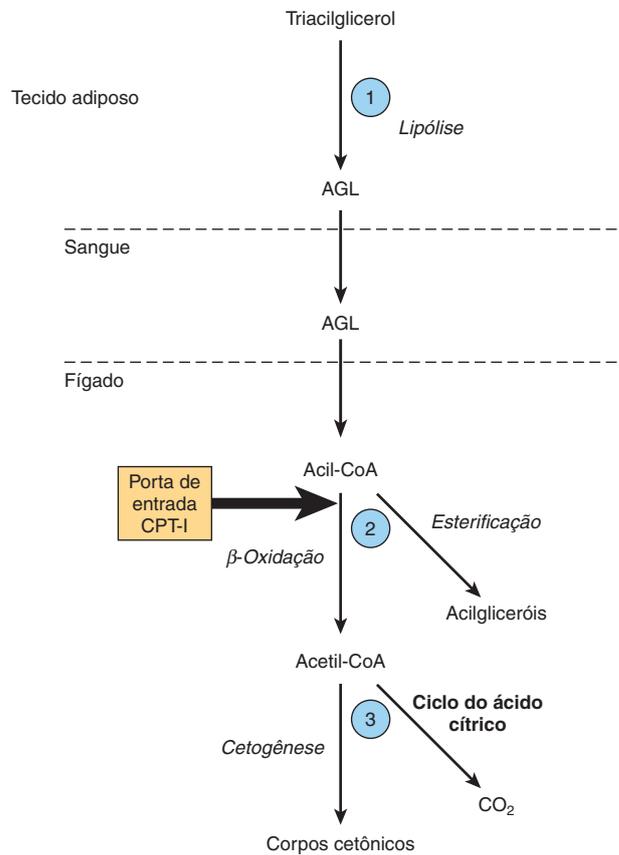


FIGURA 22-9 Regulação da cetogênese. ① a ③ mostram as três etapas cruciais na via do metabolismo de ácidos graxos livres (AGL) que determinam a magnitude da cetogênese. (CPT-I, carnitina-palmitoil-transferase-I.)

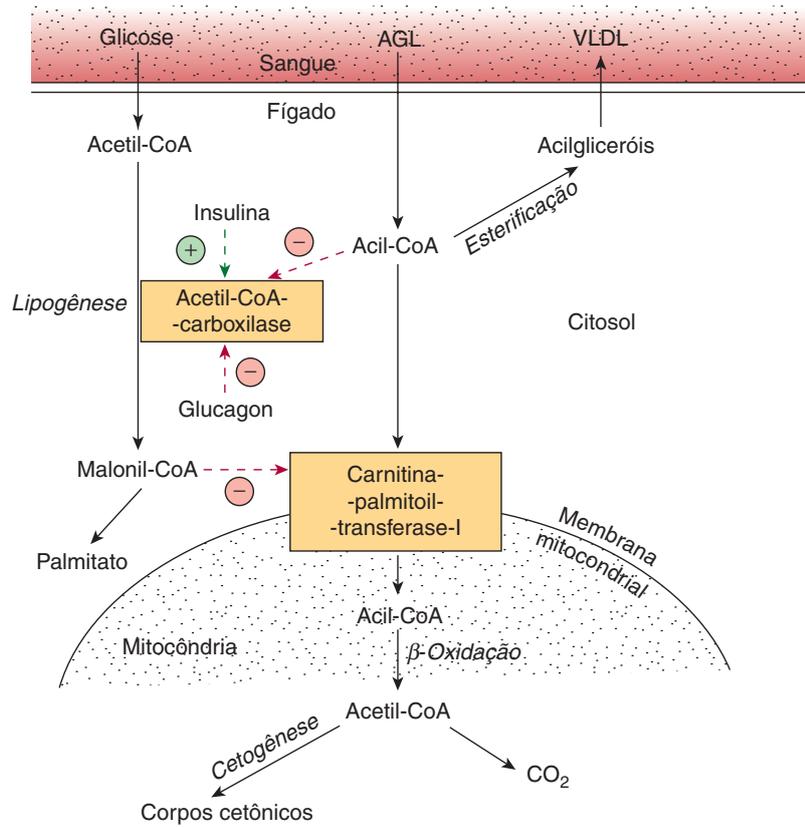


FIGURA 22-10 Regulação da oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa no fígado. (AGL, ácidos graxos livres; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.) Os efeitos reguladores positivos (⊕) e negativos (⊖) estão representados por setas tracejadas, e o fluxo de substratos, por setas contínuas.

ácidos graxos (Figura 23-1) formado pela acetil-CoA carboxilase no estado alimentado, é um potente inibidor da CPT-I (Figura 22-10). Nessas condições, os AGL entram no hepatócito em baixas concentrações e são quase todos esterificados a acilgliceróis e transportados para fora do fígado nas **lipoproteínas de densidade muito baixa** (VLDL). Entretanto, à medida que a concentração de AGL aumenta no jejum prolongado, a acetil-CoA-carboxilase é inibida diretamente pela acil-CoA, e a malonil-CoA diminui, interrompendo a inibição da CPT-I e possibilitando a β -oxidação de mais acil-CoA. Esses eventos são intensificados no jejum prolongado por uma redução da **razão (insulina)/(glucagon)**. Por isso, a β -oxidação dos AGL é controlada pela CPT-I, a porta de entrada para o interior das mitocôndrias, e o saldo de AGL não oxidados é esterificado.

- Por sua vez, a acetil-CoA formada durante a β -oxidação é oxidada no ciclo do ácido cítrico ou entra na via da cetogênese para formar corpos cetônicos. À medida que o nível sérico de AGL aumenta, uma quantidade proporcionalmente maior de AGL é convertida em corpos cetônicos, e uma menor quantidade é oxidada pelo ciclo do ácido cítrico em CO_2 . A distribuição de acetil-CoA entre a via da cetogênese e a via da oxidação a CO_2 é regulada de modo que a energia livre total captada em ATP, que resulta da oxidação dos AGL, permanece constante à medida que a sua concentração sérica é alterada. Essa situação pode ser

reconhecida quando se pensa que a oxidação completa de 1 mol de palmitato envolve uma produção líquida de 106 moles de ATP por meio da β -oxidação e da produção de CO_2 no ciclo do ácido cítrico (ver anteriormente), ao passo que são produzidos apenas 26 moles de ATP quando o produto final é o acetacetato, e apenas 21 moles quando o produto final é o 3-hidroxiacetato. Dessa forma, a cetogênese pode ser considerada como um mecanismo que permite ao fígado oxidar quantidades crescentes de ácidos graxos dentro das limitações de um sistema rigidamente acoplado da fosforilação oxidativa.

Uma queda na concentração de oxalacetato, particularmente no interior das mitocôndrias, pode comprometer a capacidade de o ciclo do ácido cítrico metabolizar acetil-CoA, desviando a oxidação dos ácidos graxos para a cetogênese. Essa queda pode ocorrer devido a uma elevação da razão $(\text{NADH})/(\text{NAD}^+)$, causada pelo aumento da β -oxidação dos ácidos graxos, o que afeta o equilíbrio entre o oxalacetato e o malato, levando a uma redução na concentração de oxalacetato, bem como quando a gliconeogênese está elevada, o que ocorre quando os níveis de glicose estão baixos. A ativação da piruvato carboxilase, que catalisa a conversão do piruvato em oxalacetato, pela acetil-CoA, alivia parcialmente esse problema; todavia, em condições como a inanição e o DM não tratado, ocorre produção excessiva de corpos cetônicos, causando cetose.

ASPECTOS CLÍNICOS

O comprometimento da oxidação dos ácidos graxos dá origem a doenças que estão frequentemente associadas à hipoglicemia

Pode ocorrer **deficiência de carnitina**, particularmente no recém-nascido – e, em particular, em lactentes prematuros –, devido à biossíntese inadequada ou à perda renal. Além disso, podem ocorrer perdas durante a hemodiálise. Isso sugere uma necessidade dietética de carnitina em alguns indivíduos, semelhante à necessidade de vitamina. Os sintomas de deficiência incluem hipoglicemia, que constitui uma consequência do comprometimento da oxidação dos ácidos graxos, e acúmulo de lipídeos com fraqueza muscular. O tratamento consiste em suplementação oral de carnitina.

A **deficiência hereditária de CPT-I** afeta apenas o fígado, resultando em diminuição da oxidação dos ácidos graxos e cetogênese, com hipoglicemia. A **deficiência de CPT-II** afeta principalmente o músculo esquelético e, quando grave, o fígado. As sulfonilureias (**gliburida [glibenclamida]** e **tolbutamida**), utilizadas no tratamento do DM tipo 2 (DM2), reduzem a oxidação dos ácidos graxos e, portanto, a hiperglicemia ao inibirem a CPT-I.

Os defeitos hereditários das enzimas da β -oxidação e da cetogênese também levam à hipoglicemia não cetótica, ao coma e à esteatose hepática. Sabe-se da existência de defeitos na 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase de cadeias longas e curtas (a deficiência da enzima para cadeias longas pode constituir uma causa da **esteatose hepática aguda da gravidez**). As **deficiências de 3-cetoacil-CoA-tiolase** e de **HMG-CoA-liase** também afetam a degradação da leucina, um aminoácido cetogênico (Capítulo 29).

A **doença do vômito da Jamaica** é causada pelo consumo de frutos imaturos da árvore *akee* (castanha-da-jamaica), que contém a toxina **hipoglicina**. Essa toxina inativa a acil-CoA-desidrogenase de cadeias médias e curtas, inibindo a β -oxidação e causando hipoglicemia. A **acidúria dicarboxílica** caracteriza-se pela excreção de ácidos ω -dicarboxílicos C_6 – C_{10} e por hipoglicemia não cetótica, sendo causada pela ausência de **acil-CoA-desidrogenase de cadeia média** nas mitocôndrias. A **doença de Refsum** é um distúrbio neurológico raro, devido a um defeito metabólico que leva ao acúmulo de ácido fitânico, encontrado em laticínios, bem como na gordura e na carne dos ruminantes. Acredita-se que o ácido fitânico tenha efeitos patológicos sobre a função das membranas, a prenilação das proteínas e a expressão gênica. A **síndrome de Zellweger (cérebro-hepatorrenal)** ocorre em indivíduos com ausência hereditária rara de peroxissomos em todos os tecidos. Esses indivíduos acumulam ácidos polienoicos C_{26} – C_{38} no tecido cerebral e também exibem perda generalizada das funções peroxissomais. A doença causa graves sintomas neurológicos, e a maioria dos pacientes morre no primeiro ano de vida.

A cetose prolongada resulta em cetoacidose

Quantidades de corpos cetônicos acima do normal no sangue ou na urina constituem a **cetonemia** (hipercetonemia) e a **cetonúria**, respectivamente. A condição global é denominada **cetose**.

A forma básica da cetose ocorre na **inanição** e envolve a depleção dos carboidratos disponíveis, junto com a mobilização dos AGL. Esse padrão geral de metabolismo é exagerado, produzindo os estados patológicos observados no **diabetes melito tipo 2, que é cada vez mais comum nos países ocidentais**; na **doença dos cordeiros gêmeos**; e na **cetose do gado leiteiro**. Formas não patológicas de cetose são encontradas na alimentação com alto teor de gorduras e após exercício físico intenso no estado pós-absortivo.

O ácido acetoacético e o ácido 3-hidroxi-butírico são moderadamente fortes e tamponados quando presentes no sangue ou em outros tecidos. Todavia, a sua excreção contínua em grandes quantidades provoca depleção progressiva da reserva alcalina, causando **cetoacidose**. Isso pode ser fatal no **diabetes melito** não controlado.

RESUMO

- A oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias leva à produção de grandes quantidades de ATP por um processo denominado β -oxidação, que cliva sequencialmente unidades de acetil-CoA a partir das cadeias de ácidos graxos. A acetil-CoA é oxidada no ciclo do ácido cítrico, gerando maior quantidade de ATP.
- Os corpos cetônicos (acetato, 3-hidroxi-butirato e acetona) são formados nas mitocôndrias hepáticas quando existe alta taxa de oxidação dos ácidos graxos. A via da cetogênese envolve a síntese e a degradação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por duas enzimas essenciais: a HMG-CoA-sintase e a HMG-CoA-liase.
- Os corpos cetônicos são combustíveis importantes nos tecidos extra-hepáticos.
- A cetogênese é regulada em três etapas cruciais: (1) o controle da mobilização de AGL a partir do tecido adiposo; (2) a atividade da carnitina-palmitoil-transferase-I no fígado, que determina a proporção do fluxo de ácidos graxos que é oxidada, em vez de esterificada; e (3) a distribuição de acetil-CoA entre a via da cetogênese e o ciclo do ácido cítrico.
- As doenças associadas ao comprometimento da oxidação dos ácidos graxos resultam em hipoglicemia, infiltração de gordura nos órgãos e hipocetonemia.
- A cetose é leve no jejum prolongado, porém é grave no diabetes melito e na cetose dos ruminantes.

REFERÊNCIAS

- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M: Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J* 1996;320:345.
- Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA: Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:243.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn K: *Lipid Biochemistry*. Blackwell Publishing, 2002.
- Houten SM, Wanders RJA: A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis* 2010;33:469.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Van Veldhoven PP: Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J Lipid Res* 2010;51:2863.
- Wood PA: Defects in mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:107.

Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a reação catalisada pela acetil-CoA-carboxilase e compreender os mecanismos pelos quais a sua atividade é regulada para controlar a taxa de síntese de ácidos graxos.
- Esboçar a estrutura do complexo multienzimático do ácido graxo-sintase, indicando a sequência das enzimas nas duas cadeias peptídicas do homodímero.
- Explicar como os ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados pela condensação sequencial de unidades de dois carbonos, com formação preferencial do palmitato de 16 carbonos na maioria dos tecidos, e identificar os cofatores necessários.
- Indicar as fontes de equivalentes redutores (NADPH) para a síntese de ácidos graxos.
- Compreender como a síntese de ácidos graxos é regulada pelo estado nutricional e identificar outros mecanismos de controle que operam além da modulação da atividade da acetil-CoA-carboxilase.
- Identificar os ácidos graxos nutricionalmente essenciais e explicar por que eles não podem ser sintetizados no organismo.
- Explicar como os ácidos graxos poli-insaturados são sintetizados pelas enzimas dessaturase e de alongamento.
- Delinear as vias da cicloxigenase e lipoxigenase responsáveis pela formação das várias classes de eicosanoides.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os ácidos graxos são sintetizados por um **sistema extramitocôndrial**, que é responsável pela síntese completa do palmitato a partir de acetil-CoA no **citosol**. Na maioria dos mamíferos, a glicose é o principal substrato para a lipogênese, ao passo que, em ruminantes, é o acetato a principal molécula combustível que eles obtêm da dieta. Não foram relatadas doenças críticas dessa via nos seres humanos. Entretanto, ocorre inibição da lipogênese no **diabetes melito** tipo 1 (DM1) (dependente de insulina), e a ocorrência de variações na atividade do processo afeta a natureza e a extensão da **obesidade**.

Os ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos das membranas celulares são importantes na manutenção da fluidez (ver Capítulo 40). Uma dieta com elevada proporção entre ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos saturados (razão de P:S) é considerada benéfica na prevenção de doença coronariana. Os tecidos animais têm capacidade limitada para dessaturar os ácidos graxos e necessitam de certos ácidos graxos poli-insaturados de origem vegetal na dieta. Esses **ácidos**

graxos essenciais são usados para formar os ácidos graxos eicosanoicos (C_{20}), que dão origem aos seguintes **eicosanoides**: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. As prostaglandinas medeiam a **inflamação** e a **dor**, induzem o **sono** e também regulam a **coagulação sanguínea** e a **reprodução**. Os **anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)**, como o **ácido acetilsalicílico** e o **ibuprofeno**, atuam ao inibir a síntese de prostaglandinas. Os leucotrienos apresentam propriedades quimiotáticas e relacionadas à contração muscular e são importantes nas reações alérgicas e na inflamação.

A PRINCIPAL VIA PARA A SÍNTESE DE NOVO DE ÁCIDOS GRAXOS (LIPOGÊNESE) OCORRE NO CITOSOL

Esse sistema é encontrado em muitos tecidos, incluindo fígado, rins, cérebro, pulmões, glândulas mamárias e tecido adiposo. Os cofatores necessários incluem NADPH, ATP, Mn^{2+} ,

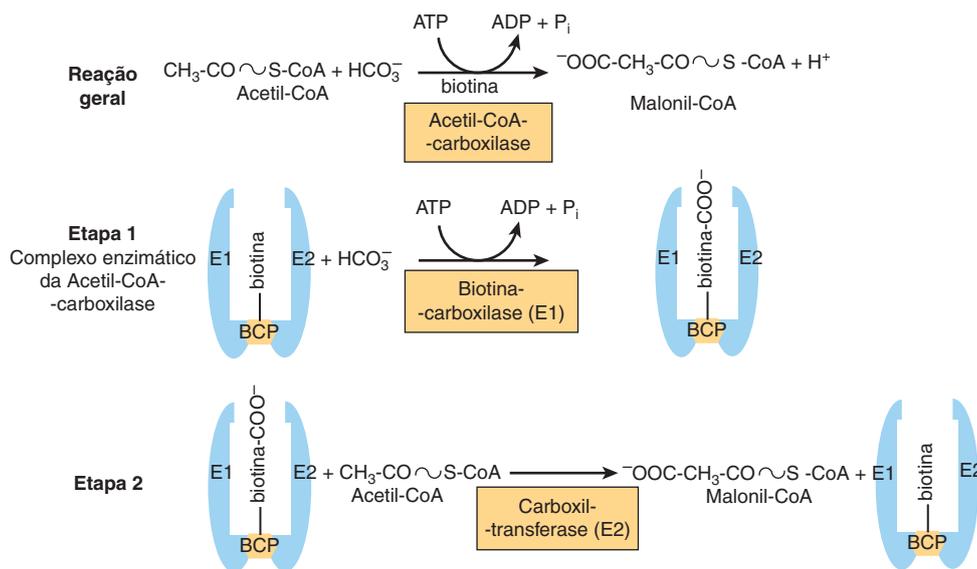


FIGURA 23-1 Biossíntese de malonil-CoA pela acetil-carboxilase. A acetil-carboxilase é um complexo multienzimático contendo duas enzimas, a biotina-carboxilase (E1) e a carboxil transferase (E2), além da proteína carreadora de biotina (BCP). A biotina é covalentemente ligada à BCP. A reação prossegue em duas etapas. Na etapa 1, catalisada pela E1, a biotina é carboxilada à medida que aceita um grupo COO^- do HCO_3^- , com gasto de ATP. Na etapa 2, catalisada pela E2, o COO^- é transferido para acetil-CoA, formando malonil-CoA.

biotina e HCO_3^- (como fonte de CO_2). A **acetil-CoA** é o substrato imediato, e o **palmitato livre** é o produto final.

A produção de malonil-CoA constitui a etapa inicial e de controle na síntese de ácidos graxos

O bicarbonato, como fonte de CO_2 , é necessário na reação inicial de carboxilação de acetil-CoA em **malonil-CoA**, na presença de ATP e **acetil-CoA-carboxilase**. Essa enzima possui um papel fundamental na regulação da síntese de ácidos graxos (ver a seguir). A acetil-CoA-carboxilase necessita da vitamina B **biotina** e é uma **proteína multienzimática** contendo a biotina, a enzima biotina-carboxilase, a proteína carreadora de carboxil-biotina e uma carboxil-transferase, assim como um sítio regulador alostérico. Uma subunidade do complexo contém todos os componentes, e um número variável de subunidades forma polímeros na enzima ativa (ver Figura 23-6). A reação ocorre em duas etapas: (1) carboxilação da biotina envolvendo ATP e (2) transferência de grupo carboxila para acetil-CoA para formar malonil-CoA (Figura 23-1).

O complexo de ácido graxo-sintase é um homodímero de duas cadeias polipeptídicas contendo seis atividades enzimáticas

Após a formação de malonil-CoA, os ácidos graxos são formados pelo **complexo enzimático de ácido graxo-sintase**. As enzimas individuais necessárias para a síntese de ácidos graxos estão ligadas a esse complexo polipeptídico multienzimático que incorpora a **proteína carreadora de grupos acil (ACP)**, que possui função similar à da CoA na via de β -oxidação (ver Capítulo 22). Esse complexo contém o **ácido pantotênico** na forma de 4'-fosfopanteteína (ver Figura 44-18). Na estrutura

primária da proteína, os domínios enzimáticos estão ligados na sequência ilustrada na **Figura 23-2**. Entretanto, a cristalografia de raios X da estrutura tridimensional demonstrou que o complexo é um homodímero com duas subunidades idênticas, contendo, cada uma delas, seis enzimas e uma ACP, dispostas em formato de X (Figura 23-2). A posição da ACP e dos domínios tioesterase ainda não pôde ser resolvida pela cristalografia de raios X, possivelmente por serem muito flexíveis; todavia, acredita-se que esses domínios estejam localizados próximos à enzima 3-cetoacil-redutase. O uso de uma unidade funcional multienzimática tem as vantagens de obter o efeito de compartimentalização do processo dentro da célula, sem a criação de barreiras de permeabilidade, e a síntese de todas as enzimas do complexo é coordenada, visto que é codificada por um único gene.

Inicialmente, uma molécula iniciadora de acetil-CoA combina-se com um grupo -SH de uma cisteína (**Figura 23-3**, reação 1a), ao passo que a malonil-CoA se combina com o grupo -SH adjacente presente na 4'-fosfopanteteína da ACP do outro monômero (reação 1b). Essas reações são catalisadas pela **malonil-acetil-transacilase**, para formar a **enzima acetil-(acil)-malonil**. O grupo acetil ataca o grupo metileno do resíduo de malonil, em uma reação catalisada pela **3-cetoacil-sintase**, e libera CO_2 , formando a enzima 3-cetoacil (enzima acetoacil) (reação 2), liberando o grupo -SH da cisteína. A descarboxilação permite que a reação prossiga até o seu término, levando toda a sequência das reações na direção direta. O grupo 3-cetoacil é reduzido, desidratado e novamente reduzido (reações 3-5) para formar a acil-S-enzima saturada correspondente. Uma nova molécula de malonil-CoA combina-se com o -SH da 4'-fosfopanteteína, deslocando o resíduo acil saturado para o grupo -SH da cisteína livre. A sequência de reações é repetida por mais seis vezes até a montagem de um radical acil saturado de

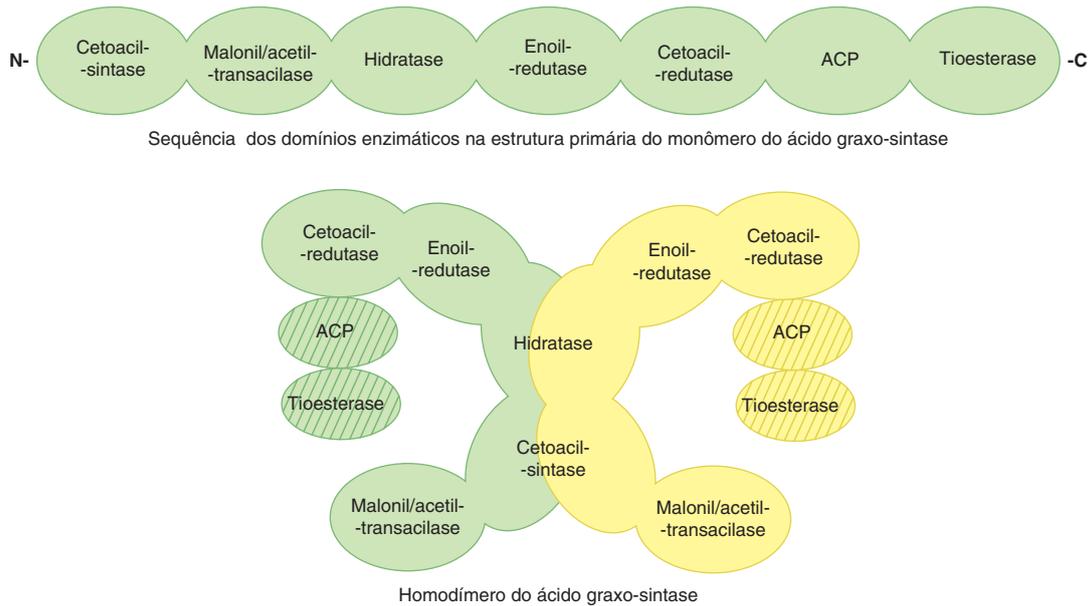
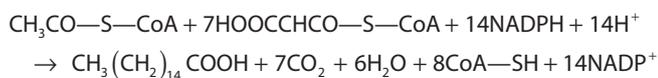


FIGURA 23-2 Complexo multienzimático de ácido graxo-sintase. O complexo é um dímero constituído de dois monômeros polipeptídicos idênticos, em que seis enzimas e a proteína carreadora de grupos acil (ACP) estão ligadas na estrutura primária da sequência ilustrada. A cristalografia de raios X da estrutura tridimensional demonstrou que os dois monômeros no complexo estão arranjados em formato de X. A posição da ACP e da tioesterase ainda não está estabelecida, mas se acredita que elas estejam próximas ao domínio enzimático 3-cetoacil-redutase.

16 carbonos (palmitoil). Ele é liberado do complexo enzimático pela atividade da sexta enzima do complexo, a **tioesterase** (desacilase). O palmitato livre deve ser ativado a acil-CoA antes de prosseguir por qualquer outra via metabólica. Os seus destinos possíveis são esterificação em acilgliceróis, alongamento ou dessaturação da cadeia ou esterificação em ésteres de colesterol. Na glândula mamária, existe uma tioesterase distinta específica para os resíduos acil de C₈, C₁₀ ou C₁₂, os quais são encontrados subsequentemente nos lipídeos do leite.

A equação geral para a síntese do palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA é:



A acetil-CoA usada como iniciador forma os átomos de carbono 15 e 16 do palmitato. A adição de todas as unidades subsequentes de C₂ ocorre por meio da malonil-CoA. A propionil-CoA atua como iniciador para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa que apresentam número ímpar de átomos de carbono, encontrados particularmente na gordura e no leite dos ruminantes.

A principal fonte de NADPH para a lipogênese é a via das pentoses-fosfato

O NADPH está envolvido como doador de equivalentes redutores na redução dos derivados, tanto do 3-cetoacil quanto do acil 2,3-insaturado (Figura 23-3, reações 3 e 5). As reações oxidativas da via das pentoses fosfato (ver Capítulo 20) constituem a principal fonte de hidrogênio necessário para a síntese redutora dos ácidos graxos. De modo significativo, os tecidos especializados na lipogênese ativa – isto é, o fígado, o tecido adiposo e a glândula mamária em lactação – possuem uma via

ativa das pentoses-fosfato. Além disso, ambas as vias metabólicas são encontradas no citosol da célula; dessa maneira, não existem membranas nem barreiras de permeabilidade contra a transferência do NADPH. Outras fontes de NADPH incluem a reação que converte o malato em piruvato, catalisada pela “**enzima málica**” (NADP malato-desidrogenase) (Figura 23-4) e pela reação extramitocondrial da **isocitrato-desidrogenase** (que provavelmente não se qualifica como uma fonte substancial, exceto nos ruminantes).

A acetil-CoA é o principal bloco de construção dos ácidos graxos

A acetil-CoA é formada a partir da glicose por meio da oxidação de piruvato na matriz mitocondrial. No entanto, como não se difunde prontamente através das membranas mitocondriais, o seu transporte para o citosol – o principal local de síntese dos ácidos graxos – requer um mecanismo especial envolvendo **citrato**. Após a condensação de acetil-CoA com oxalacetato no ciclo do ácido cítrico dentro da mitocôndria, o citrato produzido pode ser translocado para o compartimento extramitocondrial pelo transportador de tricarboxilatos, onde, na presença de CoA e ATP, ele sofre clivagem a acetil-CoA e oxalacetato catalisada pela **ATP-citrato-liase**, que aumenta sua atividade no estado bem-alimentado. A acetil-CoA está então disponível para a formação de malonil-CoA e síntese de ácidos graxos (Figura 23-4). O oxalacetato resultante pode formar malato por meio da malato-desidrogenase ligada ao NADH, seguido de geração de NADPH pela enzima málica. O NADPH torna-se disponível para lipogênese, e o piruvato pode ser utilizado para regenerar a acetil-CoA depois de transportada para a mitocôndria. Essa via representa um meio de transferir equivalentes redutores do NADH extramitocondrial para o NADP. De modo alternativo, o próprio malato pode ser transportado para a mitocôndria,

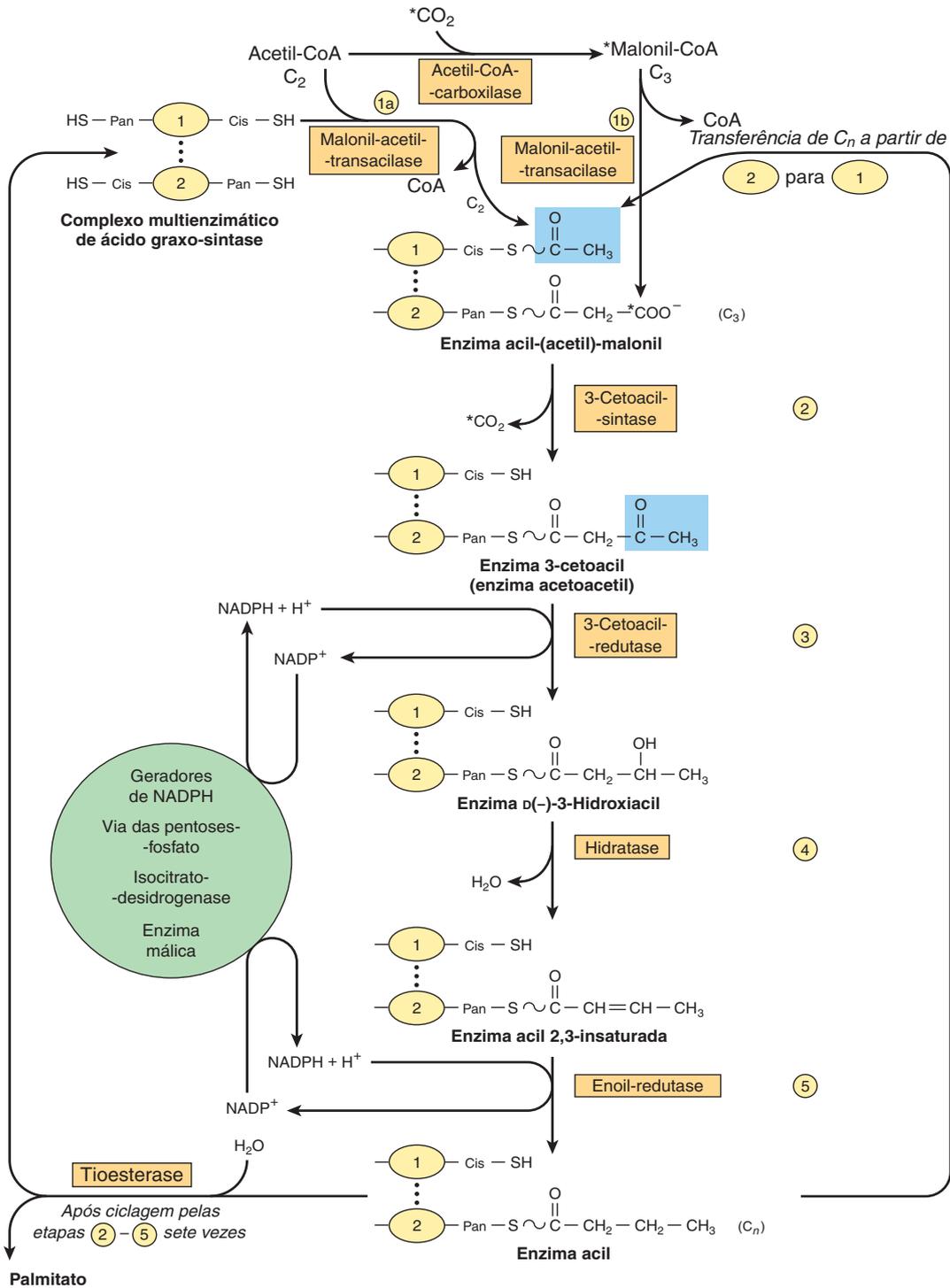


FIGURA 23-3 Biossíntese dos ácidos graxos de cadeia longa. Detalhes de como a adição de um resíduo de malonil produz o crescimento da cadeia acil em dois átomos de carbono. (Cis, resíduo de cisteína; Pan, 4'-fosfopanteteína.) Os blocos destacados em azul contêm inicialmente uma unidade C_2 derivada da acetil-CoA (conforme ilustrado) e, subsequentemente, a unidade C_n formada na reação 5.

onde tem a capacidade de formar oxalacetato novamente. O transportador de citrato (tricarboxilato) na membrana mitocondrial requer a presença de malato para troca com o citrato (ver Figura 13-10). Há pouca ATP-citrato-liase, ou enzima

málica, nos ruminantes, provavelmente pelo fato de, nessas espécies, o acetato (derivado da digestão dos carboidratos no rúmen e ativado em acetil-CoA no meio extramitocondrial) constituir a principal fonte de acetil-CoA.

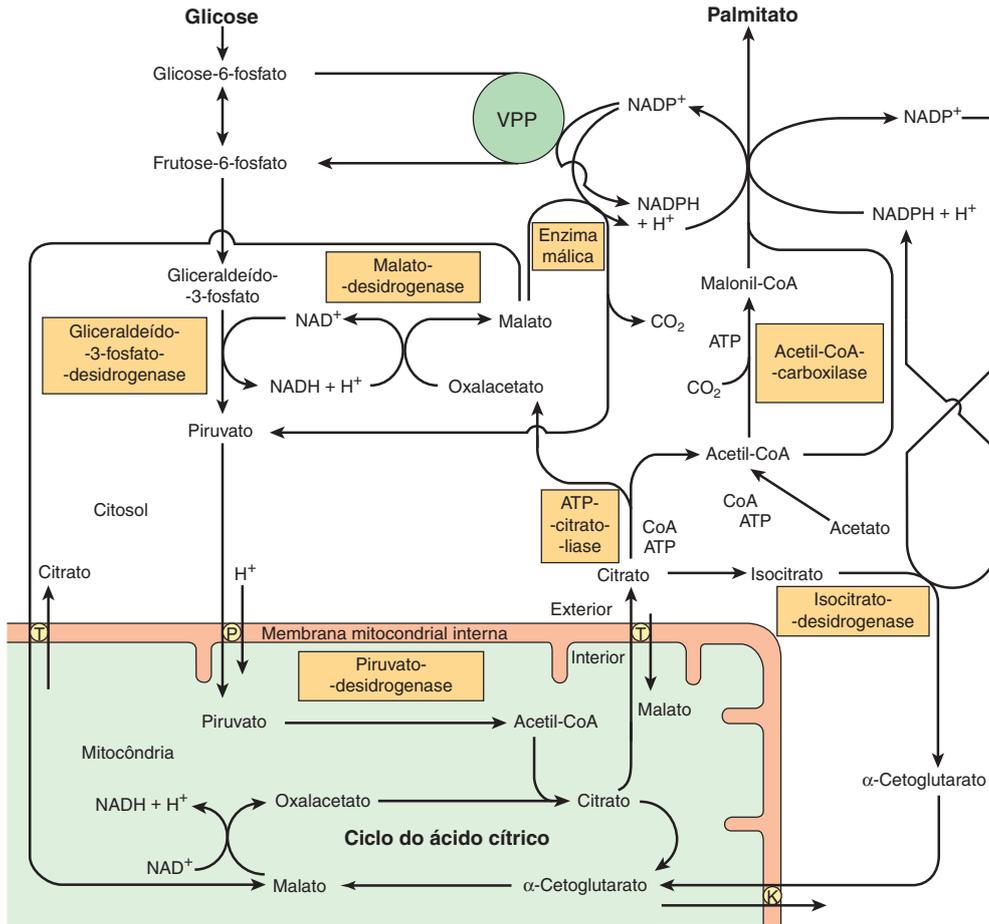


FIGURA 23-4 O suprimento de acetil-CoA e NADPH para a lipogênese. (K, transportador de α-cetoglutarato; P, transportador de piruvato; VPP, via das pentoses-fosfato; T, transportador de tricarboxilato.)

O alongamento das cadeias de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático

Essa via (o “sistema microsomal”) alonga as acil-CoA de ácidos graxos saturados e insaturados (a partir de C₁₀) em dois carbonos, utilizando a malonil-CoA, como doadora de acetil, e o NADPH, como agente redutor, em uma reação catalisada pelo sistema enzimático microsomal **ácido graxo alongase** (Figura 23-5). O alongamento da estearil-CoA no encéfalo aumenta rapidamente durante a mielinização, a fim de fornecer ácidos graxos C₂₂ e C₂₄ para os esfingolipídeos.

O ESTADO NUTRICIONAL REGULA A LIPOGÊNESE

O excesso de carboidratos é armazenado na forma de gordura em muitos animais para prevenção em períodos de deficiência calórica, como jejum prolongado, hibernação, etc., bem como para fornecer a energia necessária entre as refeições, incluindo os seres humanos, que se alimentam em intervalos espaçados. A lipogênese converte a glicose e os intermediários excedentes, como piruvato, lactato e acetil-CoA, em gordura, auxiliando na fase anabólica desse ciclo alimentar. O estado nutricional do

organismo constitui o principal fator que regula a taxa de lipogênese. Por isso, a taxa apresenta-se elevada no animal bem-alimentado cuja dieta contém alta proporção de carboidratos. A taxa é reduzida nos estados de restrição de aporte calórico, em dietas ricas em gordura, ou em caso de deficiência de insulina, como ocorre no diabetes melito. As últimas condições estão associadas a concentrações elevadas de ácidos graxos livres no plasma, e foi demonstrada uma relação inversa entre a lipogênese hepática e a concentração sérica de ácidos graxos livres. Ocorre aumento da lipogênese quando há ingestão de sacarose, em vez de glicose, pois a frutose escapa do ponto de controle da fosfofrutocinase na glicólise e segue para a via lipogênica (ver Figura 20-5).

A LIPOGÊNESE É REGULADA POR MECANISMOS DE CURTO E DE LONGO PRAZO

A síntese de ácidos graxos de cadeia longa é controlada, em curto prazo, pela modificação alostérica e covalente de enzimas e, em longo prazo, por alterações na expressão dos genes que controlam a taxa de síntese das enzimas.

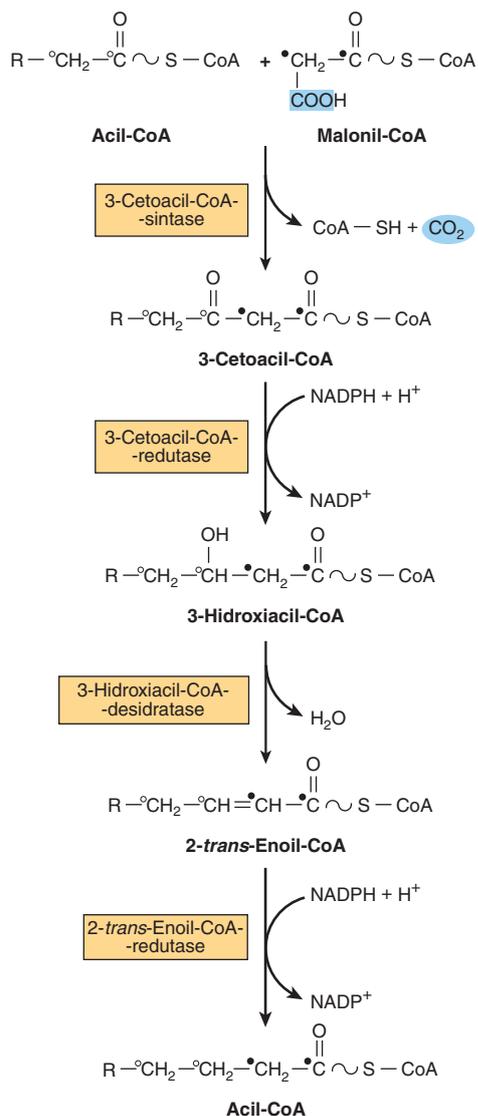


FIGURA 23-5 Sistema microsossomal de alongamento para o alongamento das cadeias de ácidos graxos. O NADH também é utilizado pelas redutases, porém o NADPH é preferido.

A acetil-CoA-carboxilase é a enzima mais importante na regulação da lipogênese

A acetil-CoA-carboxilase é uma enzima alostérica ativada pelo **citrato**, cuja concentração aumenta no estado bem-alimentado e constitui um indicador de suprimento abundante de acetil-CoA. O citrato promove a conversão da enzima de um dímero inativo (duas subunidades do complexo enzimático) para uma forma polimérica ativa, com massa molecular de alguns milhões. A inativação é promovida pela fosforilação da enzima e por moléculas de acil-CoA de cadeia longa, fornecendo um exemplo de inibição por retroalimentação negativa por um produto da reação (**Figura 23-6**). Então, se houver acúmulo de acil-CoA, por não ser esterificada rápido o suficiente, em consequência de um aumento da lipólise, ou ainda devido a um influxo de ácidos graxos livres no tecido, ela automaticamente reduzirá a síntese de novos ácidos graxos. A acil-CoA também inibe o **transportador de tricarboxilatos**

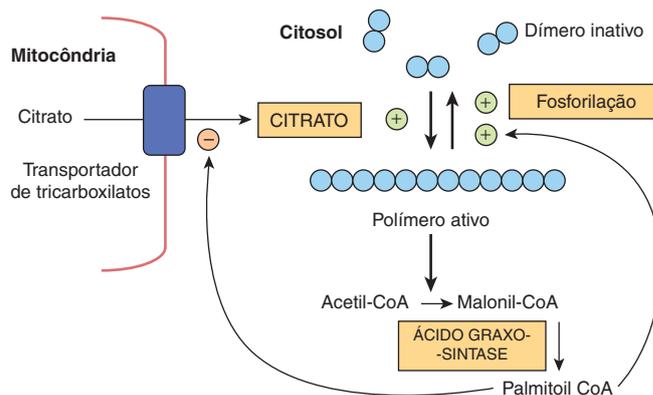


FIGURA 23-6 Regulação da acetil-CoA-carboxilase. A acetil-CoA-carboxilase é ativada pelo citrato, que promove a conversão da enzima de um dímero inativo em uma forma polimérica ativa. A inativação é promovida pela fosforilação da enzima e por moléculas de acil-CoA de cadeia longa, como o palmitoil-CoA. Além disso, a acil-CoA inibe o transportador de tricarboxilato, que transporta o citrato das mitocôndrias para o citosol, diminuindo, conseqüentemente, a concentração de citrato no citosol e favorecendo a inativação da enzima.

mitocondrial, impedindo, assim, a ativação da enzima pelo efluxo de citrato das mitocôndrias para o citosol (**Figura 23-6**).

A acetil-CoA-carboxilase também é regulada por hormônios, como o **glucacon**, a **epinefrina** e a **insulina**, por meio de alterações em seu estado de fosforilação (detalhes na **Figura 23-7**).

A piruvato-desidrogenase também é regulada pela acil-CoA

A acil-CoA provoca inibição da piruvato-desidrogenase ao inibir o transportador de troca de ATP-ADP da membrana mitocondrial interna, levando ao aumento da razão (ATP)/(ADP) mitocondrial e, em consequência, à conversão da piruvato-desidrogenase ativa em sua forma inativa (ver **Figura 17-6**), regulando, dessa maneira, a disponibilidade de acetil-CoA para a lipogênese. Além disso, a oxidação da acil-CoA, devido a níveis aumentados de ácidos graxos livres, pode aumentar as razões de (acetil-CoA)/(CoA) e (NADH)/(NAD⁺) na mitocôndria, inibindo a piruvato-desidrogenase.

A insulina também regula a lipogênese por outros mecanismos

A **insulina** estimula a lipogênese por vários outros mecanismos, bem como pelo aumento da atividade da acetil-CoA-carboxilase. Ela aumenta o transporte de glicose para dentro da célula (p. ex., no tecido adiposo), aumentando a disponibilidade tanto de piruvato, para a síntese de ácidos graxos, como de glicerol-3-fosfato, para a síntese de triacilglicerol por meio da esterificação do ácido graxo recém-formado (ver **Figura 24-2**). Ela também converte a forma inativa da piruvato-desidrogenase para a forma ativa no tecido adiposo, mas não no fígado. A insulina – em virtude de sua capacidade de reduzir os níveis intracelulares de cAMP – também **inibe a lipólise** no tecido adiposo, reduzindo, assim, a concentração plasmática de ácidos graxos livres e, portanto, de acil-CoA de cadeia longa, os quais são inibidores da lipogênese.

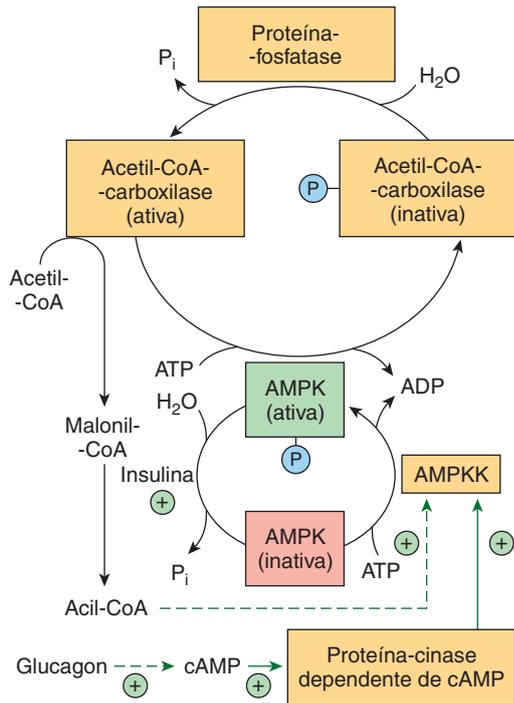


FIGURA 23-7 Regulação da acetil-CoA-carboxilase por fosforilação/desfosforilação. A enzima é inativada por fosforilação pela proteína-quinase ativada por AMP (AMPK), que, por sua vez, é fosforilada e ativada pela cinase ativada por proteína-quinase ativada por AMP (AMPKK). O glucagon (e a epinefrina) aumenta o cAMP e, portanto, ativa esta última enzima por meio da proteína-quinase dependente de cAMP. Acredita-se também que a enzima cinase seja ativada pela acil-CoA. A insulina ativa a acetil-CoA-carboxilase pela desfosforilação da AMPK.

O complexo de ácido graxo-sintase e a acetil-CoA-carboxilase são enzimas adaptativas

Essas enzimas se adaptam às necessidades fisiológicas do corpo, por meio da variação da expressão gênica, que leva ao aumento na quantidade total de moléculas de enzimas presente no estado alimentado e diminui durante a ingestão de uma dieta rica em gordura e em condições de inanição e no diabetes melito. A **insulina** exerce uma função importante, causando a expressão gênica e a indução de enzimas da biossíntese, e o **glucagon** (via cAMP) antagoniza esse efeito. A ingestão de gorduras contendo ácidos graxos poli-insaturados regula, de modo coordenado, a inibição da expressão de enzimas essenciais da glicólise e da lipogênese. Esses mecanismos para regulação a longo prazo da lipogênese levam vários dias para se manifestar por completo e aumentam o efeito direto e imediato dos ácidos graxos livres e de hormônios, como a insulina e o glucagon.

ALGUNS ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NÃO PODEM SER SINTETIZADOS POR MAMÍFEROS E SÃO NUTRICIONALMENTE ESSENCIAIS

A **Figura 23-8** mostra alguns ácidos graxos insaturados de cadeia longa de importância metabólica nos mamíferos. Outros

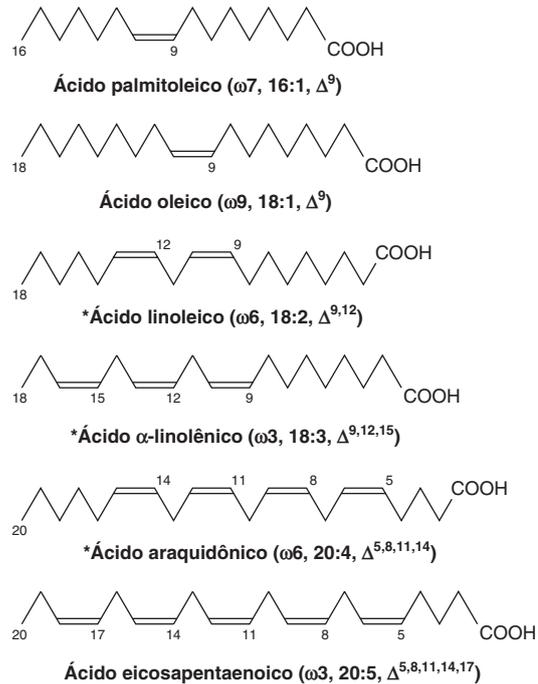


FIGURA 23-8 Estrutura de alguns ácidos graxos insaturados. Embora os átomos de carbono nas moléculas sejam numerados de modo convencional – isto é, a partir da extremidade carboxiterminal –, os números ω (p. ex., ω7 no ácido palmítoleico) são calculados a partir da extremidade oposta (metilterminal) das moléculas. A informação entre parênteses mostra, por exemplo, que o ácido α-linolênico contém ligações duplas que começam no terceiro carbono, a partir da extremidade metil, e tem 18 carbonos e 3 ligações duplas, estando essas três ligações duplas nos carbonos 9, 12 e 15 a partir da extremidade carboxiterminal. (*Classificados como “ácidos graxos essenciais”).

ácidos graxos polienuicos, C₂₀, C₂₂ e C₂₄, podem ser derivados dos ácidos oleico, linoleico e α-linolênico por alongamento da cadeia. Os ácidos palmítoleico e oleico não são essenciais na dieta, visto que os tecidos podem introduzir uma ligação dupla na posição Δ⁹ de um ácido graxo saturado. Os **ácidos linoleico** e **α-linolênico** são os únicos ácidos graxos conhecidos como essenciais para a nutrição completa de muitas espécies de animais, inclusive os seres humanos, e são denominados **ácidos graxos nutricionalmente essenciais**. Na maioria dos mamíferos, o **ácido araquidônico** pode ser formado a partir do ácido linoleico. Ligações duplas podem ser introduzidas nas posições Δ⁴, Δ⁵, Δ⁶ e Δ⁹ (ver Capítulo 21) na maioria dos animais, porém nunca além da posição Δ⁹. Em contrapartida, as plantas são capazes de sintetizar os ácidos graxos nutricionalmente essenciais pela introdução de ligações duplas nas posições Δ¹² e Δ¹⁵.

OS ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS SÃO SINTETIZADOS POR UM SISTEMA Δ⁹-DESSATURASE

Vários tecidos, incluindo o fígado, são considerados responsáveis pela formação de ácidos graxos monoinsaturados não essenciais a partir de ácidos graxos saturados. A primeira

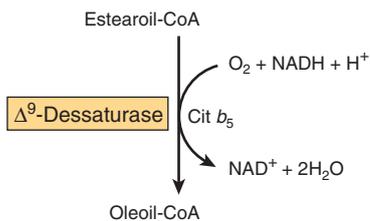


FIGURA 23-9 Δ^9 -Dessaturase microssomal.

ligação dupla introduzida em um ácido graxo saturado está quase sempre na posição Δ^9 . Um sistema enzimático – a Δ^9 -**dessaturase** (Figura 23-9) – presente no retículo endoplasmático catalisa a conversão de palmitoil-CoA ou estearoil-CoA em palmitoleoil-CoA ou oleoil-CoA, respectivamente. É necessária a presença de oxigênio e de NADH ou NADPH para a reação. As enzimas parecem ser similares ao sistema da monoxigenase envolvendo citocromo b_5 (ver Capítulo 12).

A SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ENVOLVE SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE DESSATURASES E ALONGASES

As ligações duplas adicionais introduzidas nos ácidos graxos monoinsaturados existentes estão sempre separadas umas das outras por um grupo metileno (metileno interrompido), exceto nas bactérias. Como os animais possuem uma Δ^9 -dessaturase, eles são capazes de sintetizar a família $\omega 9$ (ácido oleico) de ácidos graxos insaturados completamente por uma combinação de alongamento e dessaturação da cadeia (Figuras 23-9 e 23-10) após a formação de ácidos graxos saturados pelas vias descritas neste capítulo. No entanto, como indicado, os ácidos linoleico ($\omega 6$) ou α -linolênico ($\omega 3$) são necessários para a síntese de outros membros das famílias $\omega 6$ ou $\omega 3$ (vias mostradas na Figura 23-10) e devem ser fornecidos na dieta. O ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico (20:4 $\omega 6$) via ácido γ -linolênico (18:3 $\omega 6$). A necessidade nutricional de araquidonato pode, portanto, ser dispensada se houver quantidade adequada de linoleato na dieta. Os gatos são incapazes de efetuar essa conversão, devido à ausência da Δ^6 -dessaturase, e devem obter o araquidonato na dieta. O sistema de dessaturação e de alongamento da cadeia diminui acentuadamente no estado de jejum, em resposta à administração de glucagon e epinefrina e na ausência de insulina, como ocorre no diabetes melito tipo 1.

OS SINTOMAS DE DEFICIÊNCIA OCORREM QUANDO OS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (AGE) ESTÃO AUSENTES DA DIETA

Ratos alimentados com uma dieta não lipídica purificada contendo vitaminas A e D exibem redução da velocidade de crescimento e deficiência de reprodução, que podem ser

curadas pela adição dos **ácidos linoleico**, **α -linolênico** e **araquidônico** à dieta. Esses ácidos graxos são encontrados em altas concentrações nos óleos vegetais (ver Tabela 21-2) e em pequenas quantidades em carcaças de animais. Os ácidos graxos essenciais (AGE) são necessários para a formação de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (ver adiante), e também desempenham várias outras funções que não estão tão bem definidas. Eles são encontrados nos lipídeos estruturais das células, frequentemente na posição 2 dos fosfolipídeos, e participam da integridade estrutural da membrana mitocondrial.

O ácido araquidônico está presente em membranas e representa 5 a 15% dos ácidos graxos em fosfolipídeos. O ácido docosa-hexaenoico (DHA; $\omega 3$, 22:6), sintetizado em grau limitado a partir do ácido α -linolênico e obtido diretamente dos óleos de peixe, é encontrado em altas concentrações na retina, no córtex cerebral, nos testículos e no esperma. O DHA é particularmente necessário para o desenvolvimento do cérebro e da retina e é fornecido pela placenta e pelo leite. Pacientes com **retinite pigmentar** apresentam baixos níveis sanguíneos de DHA. Na **deficiência de ácidos graxos essenciais**, os ácidos poliênicos não essenciais da família $\omega 9$, particularmente o ácido $\Delta^{5,8,11}$ -eicosatrienoico ($\omega 9$, 20:3) (Figura 23-10), substituem os ácidos graxos essenciais nos fosfolipídeos, em outros lipídeos complexos e nas membranas. A razão trieno:tetraeno nos lipídeos plasmáticos pode ser utilizada para diagnosticar o grau de deficiência de ácidos graxos essenciais.

OS EICOSANÓIDES SÃO FORMADOS A PARTIR DOS ÁCIDOS GRAXOS C₂₀ POLI-INSATURADOS

O araquidonato e alguns outros ácidos graxos C₂₀ poli-insaturados dão origem aos **eicosanóides**, compostos fisiológica e farmacologicamente ativos, conhecidos como **prostaglandinas (PG)**, **tromboxanos (TX)**, **leucotrienos (LT)** e **lipoxinas (LX)** (ver Capítulo 21). Fisiologicamente, são considerados hormônios locais em sua ação, atuando por meio de receptores ligados à proteína G para produzir seus efeitos bioquímicos.

Existem três grupos de eicosanóides que são sintetizados a partir de ácidos eicosanoicos C₂₀ derivados dos AGE **linoleato** e **α -linolenato**, ou diretamente a partir do araquidonato e do eicosapentaenoato encontrados na dieta (Figura 23-11). O araquidonato pode ser obtido a partir da dieta, mas, em geral, deriva da posição 2 dos fosfolipídeos na membrana plasmática pela ação da fosfolipase A₂ (Figura 24-6), e é o substrato para a síntese das séries PG₂, TX₂ (**prostanóides**) pela **via da cicloxigenase**, ou das séries LT₄ e LX₄ pela **via da lipoxigenase**, com as duas vias competindo pelo substrato araquidonato (Figura 23-11).

A VIA DA CICLOXIGENASE É RESPONSÁVEL PELA SÍNTESE DE PROSTANÓIDES

A síntese de prostanóides (Figura 23-12) envolve o consumo de duas moléculas de O₂, catalisadas pela **cicloxigenase (COX)**

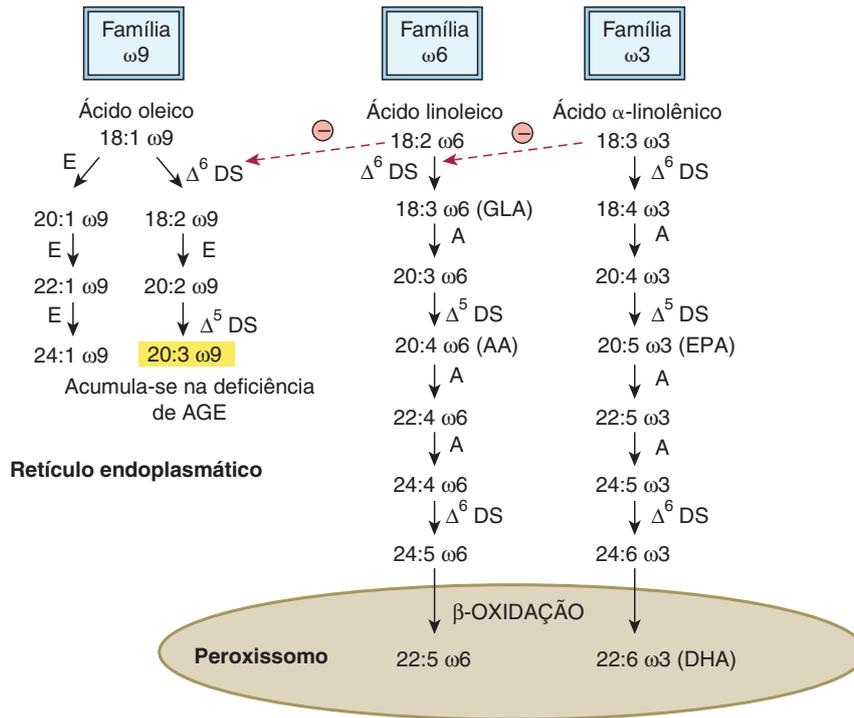


FIGURA 23-10 Biossíntese das famílias ω9, ω6 e ω3 de ácidos graxos poli-insaturados. Nos animais, as famílias ω9, ω6 e ω3 de ácidos graxos poli-insaturados são sintetizadas no retículo endoplasmático a partir dos ácidos oleico, linoleico e β-linolênico, respectivamente, por uma série de reações de alongamento e dessaturação. A produção de 22:5 ω6 (ácido osbond) ou 22:6 ω3 (ácido docosa-hexaenoico [DHA]), no entanto, requer um ciclo de β-oxidação que ocorre dentro dos peroxissomos após a formação de 24:5 ω6 ou 24:6 ω3. AA, ácido araquidônico; A, alongase; AGE, ácidos graxos essenciais; EPA, ácido eicosapentaenoico; GLA, ácido γ-linolênico; DS, dessaturase; ⊖, inibição.

(também denominada **prostaglandina H-sintase**), enzima que possui duas atividades, uma **cicloxigenase** e uma **peroxidase**. A COX ocorre na forma de duas isoenzimas, a **COX-1** e a **COX-2**. O produto, um endoperóxido (PGH), é convertido em prostaglandinas D e E, bem como em tromboxano (TXA₂) e prostaciclina (PGI₂). Cada tipo celular produz apenas um tipo de prostanoide. O **ácido acetilsalicílico**, um AINE, inibe a COX-1 e a COX-2. Outros AINEs incluem a **indometacina** e o **ibuprofeno** e geralmente inibem a cicloxigenase pela sua competição com o araquidonato. Como a inibição da COX-1 causa irritação gástrica, com frequência associada ao uso de AINEs, foram feitas tentativas para desenvolver fármacos que inibem seletivamente a COX-2 (**coxibes**). Infelizmente, entretanto, o sucesso dessa abordagem foi limitado, e alguns coxibes foram retirados ou suspensos do mercado, devido a efeitos colaterais indesejáveis e problemas de segurança. A transcrição da COX-2 – mas não da COX-1 – é totalmente inibida pelos **corticosteroides anti-inflamatórios**.

Os ácidos graxos essenciais não exercem todos os seus efeitos fisiológicos por meio da síntese de prostaglandinas

O papel dos ácidos graxos essenciais na formação da membrana não está relacionado à síntese de prostaglandinas. As prostaglandinas não aliviam os sintomas da deficiência de ácidos graxos essenciais, e a inibição da síntese de prostaglandinas não provoca deficiência de ácidos graxos essenciais.

A cicloxigenase é uma “enzima suicida”

O bloqueio da atividade das prostaglandinas é obtido, em parte, por uma notável propriedade da cicloxigenase – a sua destruição autocatalisada, isto é, trata-se de uma **“enzima suicida”**. Além disso, a inativação das prostaglandinas pela **15-hidroxi prostaglandina-desidrogenase** é rápida. O bloqueio da ação dessa enzima com sulfassalazina ou indometacina pode prolongar a meia-vida das prostaglandinas no corpo.

OS LEUCOTRIENOS E AS LIPOXINAS SÃO FORMADOS PELA VIA DA LIPOXIGENASE

Os **leucotrienos** compreendem uma família de trienos conjugados formados a partir de ácidos eicosanoicos pela **via da lipoxigenase** nos leucócitos, em células de mastocitoma, nas plaquetas e nos macrófagos, em resposta a estímulos imunológicos e não imunológicos. Três lipoxigenases diferentes (dioxigenases) introduzem o oxigênio nas posições 5, 12 e 15 do ácido araquidônico, dando origem aos hidroperóxidos (HPETE). Apenas a **5-lipoxigenase** forma leucotrienos (detalhes na **Figura 23-13**). As **lipoxinas** formam uma família de tetraenos conjugados, que também se originam nos leucócitos. Elas são formadas pela ação combinada de mais de uma lipoxigenase (**Figura 23-13**).

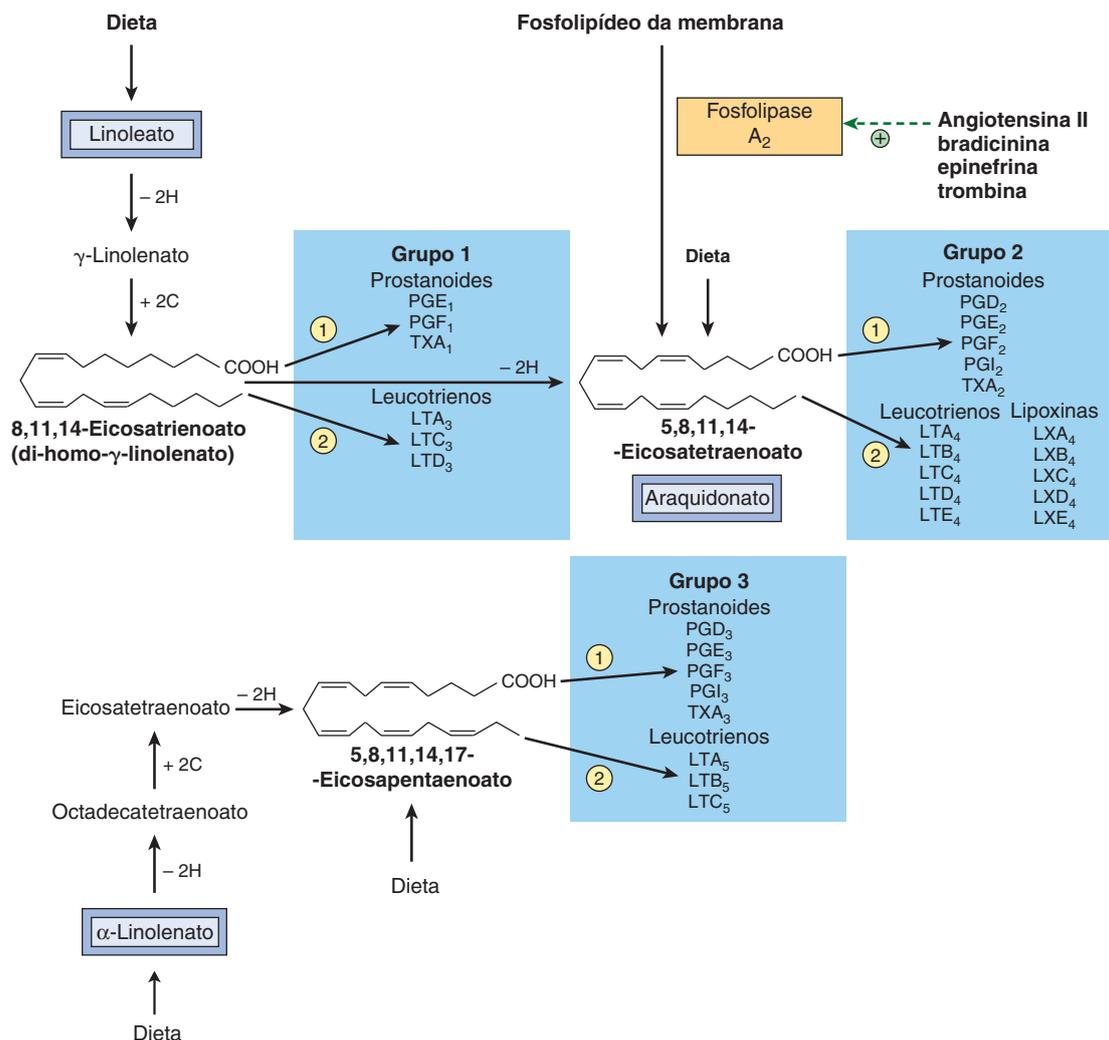


FIGURA 23-11 Os três grupos de eicosanoides e suas origens biossintéticas. (1) via da cicloxigenase; (2) via da lipoxigenase; LT, leucotrieno; LX, lipoxina; PG, prostaglandina; PGI, prostaciclina; TX, tromboxano.) O subscrito denota o número total de ligações duplas na molécula e a série à qual pertence o composto.

ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas de deficiência de ácidos graxos essenciais nos seres humanos incluem lesões cutâneas e comprometimento do transporte de lipídeos

Em adultos que subsistem com dietas comuns, não é relatado nenhum sinal de deficiência de ácidos graxos essenciais. Entretanto, lactentes alimentados com dietas artificiais contendo baixos teores de gordura e pacientes mantidos por longos períodos de tempo exclusivamente com nutrição intravenosa pobre em ácidos graxos essenciais apresentam sintomas de deficiência, que podem ser evitados por um aporte de ácidos graxos essenciais correspondendo a 1 a 2% das necessidades calóricas totais.

O metabolismo anormal dos ácidos graxos essenciais ocorre em várias doenças

O metabolismo anormal dos ácidos graxos essenciais, que pode estar relacionado a uma insuficiência dietética, foi observado

na fibrose cística, na acrodermatite enteropática, na síndrome hepatorenal, na síndrome de Sjögren-Larsson, na degeneração neuronal multissistêmica, na doença de Crohn, na cirrose, no alcoolismo e na síndrome de Reye. Foram encontrados níveis elevados de ácidos poliênicos de cadeia muito longa no encéfalo de pacientes com síndrome de Zellweger (ver Capítulo 22). As dietas com alta razão P:S (ácidos graxos poli-insaturados:saturados) reduzem os níveis séricos de colesterol e são consideradas benéficas em relação ao risco de desenvolvimento de doença coronariana.

Os ácidos graxos *trans* estão implicados em vários distúrbios

Pequenas quantidades de ácidos graxos *trans*-insaturados são encontradas na gordura de ruminantes (p. ex., a gordura da manteiga tem 2-7%), onde eles surgem da ação de microrganismos no rúmen, mas a principal fonte na dieta humana é de óleos vegetais parcialmente hidrogenados (p. ex., margarina) (ver Capítulo 21). Os ácidos graxos *trans* competem

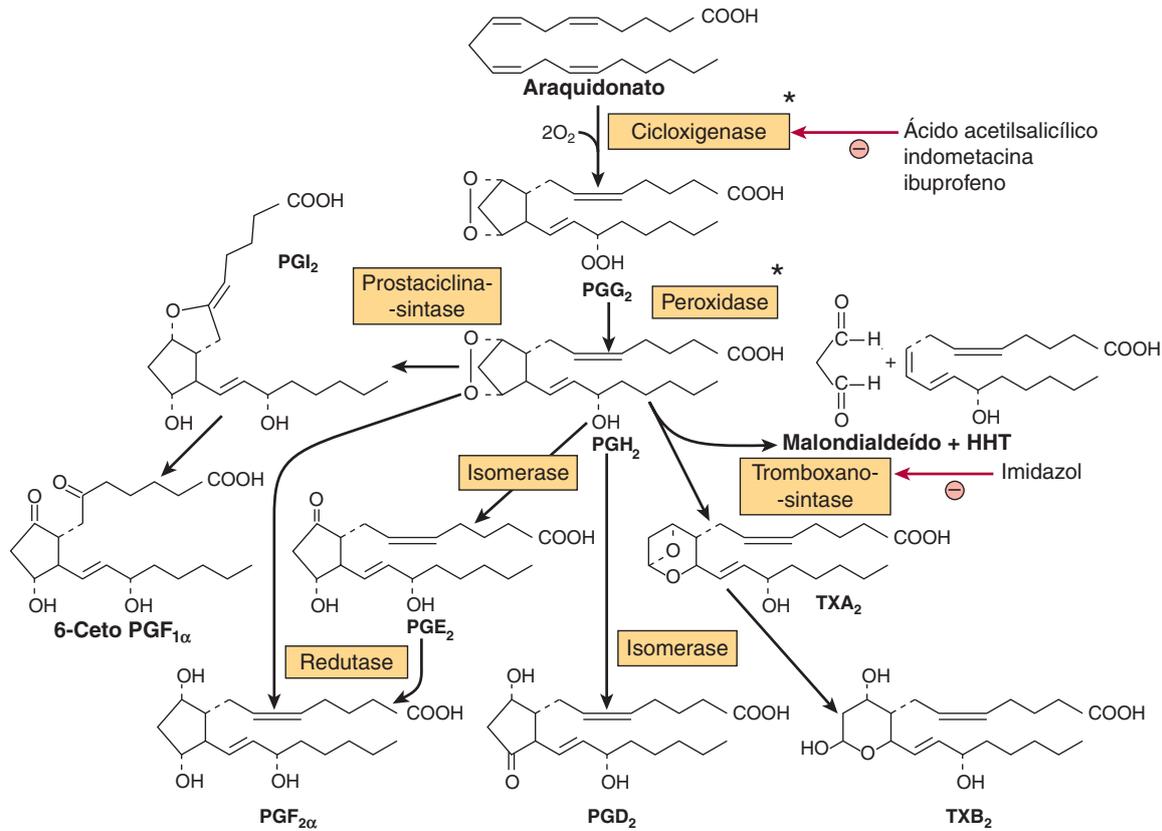


FIGURA 23-12 Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos da série 2. (HHT, hidroxi-heptadecatrienoato; PG, prostaglandina; PGI, prostaciclina; TX, tromboxano.) (*Ambas as atividades indicadas com asterisco são atribuídas à enzima cicloxigenase [prostaglandina H-sintase]. Ocorrem conversões semelhantes em prostaglandinas e tromboxanos das séries 1 e 3.)

com os ácidos graxos essenciais e podem exacerbar a deficiência destes. Além disso, assemelham-se, na sua estrutura, aos ácidos graxos saturados (ver Capítulo 21) e exercem efeitos comparáveis na promoção da hipercolesterolemia e da aterosclerose (ver Capítulo 26).

Os prostanoides são substâncias potentes e biologicamente ativas

Os **tromboxanos** são sintetizados nas plaquetas e, com a sua liberação, causam vasoconstrição e agregação plaquetária. A sua síntese é especificamente inibida pelo ácido acetil-salicílico administrado em baixas doses. As **prostaciclina**s (**PGI₂**) são produzidas pelas paredes dos vasos sanguíneos e atuam como potentes inibidores da agregação plaquetária. Portanto, os tromboxanos e as prostaciclina são antagonistas. A **PG₃** e o **TX₃**, formados a partir do ácido eicosapentaenoico (EPA), inibem a liberação do araquidonato dos fosfolídeos, bem como a formação de **PG₂** e **TX₂**. A **PGI₃** é tão potente quanto a **PGI₂** como antiagregador plaquetário, e o **TXA₃** é um agregador mais fraco do que o **TXA₂**, modificando o equilíbrio da atividade e favorecendo tempos de coagulação mais longos. Apenas 1 ng/mL de prostaglandina plasmática provoca contração do músculo liso nos animais. Os usos terapêuticos potenciais incluem a prevenção da concepção, a indução do trabalho de parto a termo, a interrupção da gravidez, a prevenção

ou o alívio de úlceras gástricas, o controle da inflamação e da pressão arterial e o alívio da asma e da congestão nasal. Além disso, a **PGD₂** é uma potente substância que promove o sono. As prostaglandinas aumentam o cAMP nas plaquetas, na tireoide, no corpo lúteo, nos ossos fetais, na adeno-hipófise e nos pulmões, porém, reduzem-no nas células tubulares renais e no tecido adiposo (ver Capítulo 25).

Os leucotrienos e as lipoxinas são potentes reguladores de muitos processos patológicos

A substância de reação lenta da anafilaxia (**SRS-A**) é uma mistura dos leucotrienos **C₄**, **D₄** e **E₄**. Essa mistura de leucotrienos atua como potente constritor da musculatura das vias respiratórias brônquicas. Esses leucotrienos, junto com o **leucotrieno B₄**, também provocam permeabilidade vascular, bem como atração e ativação dos leucócitos, e são importantes reguladores em muitas doenças, envolvendo reações inflamatórias ou de hipersensibilidade imediata, como a asma. Os leucotrienos são vasoativos, e a 5-lipoxigenase foi encontrada nas paredes das artérias. As evidências disponíveis sustentam um papel anti-inflamatório para as lipoxinas na função vasoativa e imunorreguladora, atuando, por exemplo, como compostos contrarreguladores (**calônios**) da resposta imune.

REFERÊNCIAS

- Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* 2004;10:577.
- Lands B: Consequences of essential fatty acids. *Nutrients* 2012;4:1338.
- McMahon B, Mitchell S, Brady HR, et al: Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:391.
- Miyazaki M, Ntambi JM: Fatty acid desaturation and chain elongation in mammals. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;191–212.
- Smith WL, Murphy RC: The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;331–362.
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK: Structural and functional organisation of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 2003;42:289.
- Sul HS, Smith S: Fatty acid synthesis in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;155–190.
- Tong L: Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and an attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1784.
- Wijendran V, Hayes KC: Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 2004;24:597.

Metabolismo de acilgliceróis e esfingolipídeos

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer que o catabolismo dos triacilgliceróis envolve a hidrólise por uma lipase, com liberação de ácidos graxos e glicerol, e indicar o destino desses metabólitos.
- Compreender que o glicerol-3-fosfato é o substrato para a formação de triacilgliceróis e fosfogliceróis, e que um ponto de bifurcação no fosfatidato leva à síntese de inositolfosfolipídeos e de cardiolipina por meio de uma das vias e de triacilgliceróis e outros fosfolipídeos por meio de outra.
- Explicar a formação dos plasmalogênios e do fator de ativação de plaquetas (PAF) por uma via complexa que começa com a di-hidroxiacetona-fosfato.
- Ilustrar o papel das várias fosfolipases na degradação e no remodelamento dos fosfolipídeos.
- Reconhecer que a ceramida é produzida a partir do aminoácido serina e é a precursora para a formação de todos os esfingolipídeos.
- Indicar como a esfingomielina e os glicosfingolipídeos são produzidos pela reação da ceramida com fosfatidilcolina (com liberação de diacilglicerol) ou resíduo(s) de açúcar, respectivamente.
- Fornecer exemplos de doenças causadas por defeitos na síntese ou na degradação de fosfolipídeos ou esfingolipídeos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os acilgliceróis constituem a maior parte dos lipídeos do organismo. Os triacilgliceróis representam os principais lipídeos nos depósitos de gordura do corpo e nos alimentos. O papel que desempenham no transporte e no armazenamento dos lipídeos, bem como em várias doenças, como a obesidade, o diabetes e a hiperproteinemia, será descrito nos capítulos subsequentes. Em virtude de sua natureza anfipática, os fosfolipídeos e os esfingolipídeos são apropriadamente os principais componentes lipídicos das membranas celulares.

Os fosfolipídeos também atuam no metabolismo de muitos outros lipídeos. Alguns fosfolipídeos desempenham funções especializadas; por exemplo, a dipalmitoil-lectina constitui um importante componente do **surfactante pulmonar**, o qual está ausente na **síndrome de angústia respiratória** do

recém-nascido. Os inositolfosfolipídeos da membrana celular atuam como precursores de **segundos mensageiros de hormônios**, e o **fator de ativação de plaquetas** é um alquilfosfolipídeo. Os glicosfingolipídeos, que contêm esfingosina e resíduos de açúcar, bem como ácidos graxos, são encontrados na camada externa da membrana plasmática, com suas cadeias de oligossacarídeos voltadas para o exterior. Eles constituem parte do **glicocálice** da superfície celular e são importantes (1) na adesão e reconhecimento celulares, (2) como receptores para toxinas bacterianas (p. ex., a toxina colérica) e (3) como substâncias dos grupos sanguíneos ABO. Foram descritas várias **doenças de armazenamento de glicolipídeos** (p. ex., doença de Gaucher e doença de Tay-Sachs), cada uma delas decorrente de um defeito genético na via de degradação dos glicolipídeos nos lisossomos.

A HIDRÓLISE INICIA O CATABOLISMO DOS TRIACILGLICERÓIS

Os triacilgliceróis devem ser hidrolisados por uma **lipase** em seus constituintes, ácidos graxos e glicerol, antes que possa ocorrer catabolismo adicional. Grande parte dessa hidrólise (lipólise) ocorre no tecido adiposo, com liberação de ácidos graxos livres no plasma, onde são encontrados em combinação com albumina sérica (ver Figura 25-7). Isso é seguido pela captura de ácidos graxos livres pelos tecidos (incluindo fígado, coração, rins, músculo, pulmões, testículos e tecido adiposo, mas não facilmente pelo encéfalo), onde eles são oxidados para obter energia ou são reesterificados. A utilização do glicerol depende da presença, nesses tecidos, da enzima **glicerol-cinase**, que é encontrada em quantidades significativas no fígado, no rim, no intestino, no tecido adiposo marrom e na glândula mamária em lactação.

OS TRIACILGLICERÓIS E OS FOSFOGLICERÓIS SÃO FORMADOS PELA ACILAÇÃO DE TRIOSES-FOSFATO

As principais vias de biossíntese dos triacilgliceróis e fosfogliceróis estão esquematizadas na **Figura 24-1**. Substâncias importantes, como os triacilgliceróis, a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, o fosfatidilinositol e a cardiolípinina, um constituinte das membranas mitocondriais, são formadas a partir do **glicerol-3-fosfato**. São observados pontos de bifurcação importantes na via nas etapas do **fosfatidato** e do **diacilglicerol**. Os fosfogliceróis que contêm uma ligação éter ($-C-O-C-$), dos quais os mais conhecidos são os plasmalogênios e o PAF, derivam da **di-hidroxiacetona-fosfato**. O glicerol-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato são intermediários da glicólise, estabelecendo uma conexão muito importante entre o metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos (ver Capítulo 14).

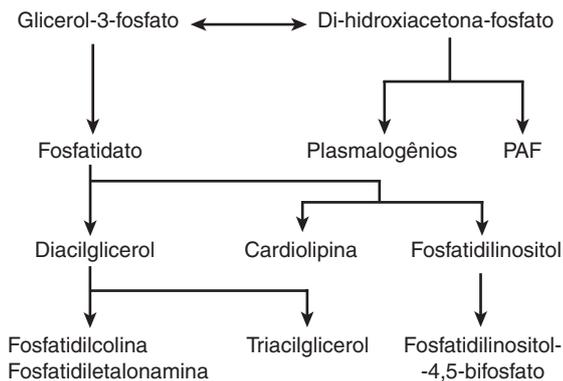


FIGURA 24-1 Visão geral da biossíntese de acilgliceróis. (PAF, fator de ativação de plaquetas.)

O fosfatidato é o precursor comum na biossíntese dos triacilgliceróis, de muitos fosfogliceróis e da cardiolípinina

Tanto o glicerol quanto os ácidos graxos devem ser ativados pelo ATP antes que possam ser incorporados em acilgliceróis. A **glicerol-cinase** catalisa a ativação do glicerol em *sn*-glicerol-3-fosfato. Se a atividade dessa enzima estiver ausente ou baixa, como no músculo ou no tecido adiposo, a maior parte do glicerol-3-fosfato é formada a partir da di-hidroxiacetona-fosfato pela **glicerol-3-fosfato-desidrogenase** (**Figura 24-2**).

Biossíntese dos triacilgliceróis

Duas moléculas de acil-CoA, formadas pela ativação dos ácidos graxos pela **acil-CoA-sintase** (ver Capítulo 22), combinam-se com glicerol-3-fosfato para formar **fosfatidato** (1,2-diacilglicerol-fosfato). Essa reação ocorre em dois estágios, catalisados pela **glicerol-3-fosfato-aciltransferase** e pela **1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase**. O fosfatidato é convertido pela **fosfatidato-fosfo-hidrolase** (também chamada de **fosfatidato-fosfatase** [PAP]) e pela **diacilglicerol-aciltransferase** (DGAT) em 1,2-diacilglicerol e, então, em triacilglicerol. As **lipinas**, uma família de três proteínas, possuem atividade de PAP e também atuam como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos. A DGAT catalisa a única etapa específica para a síntese de triacilglicerol, e acredita-se que seja a enzima limitante da velocidade na maioria das circunstâncias. Na mucosa intestinal, a **monoacilglicerol-aciltransferase** converte o **monoacilglicerol** em 1,2-diacilglicerol na **via do monoacilglicerol**. A atividade dessas enzimas reside, em sua maior parte, no retículo endoplasmático, no entanto se observa também alguma atividade nas mitocôndrias. Embora a fosfatidato-fosfo-hidrolase seja encontrada principalmente no citosol, a forma ativa da enzima está ligada à membrana.

Biossíntese dos fosfolipídeos

Na biossíntese de **fosfatidilcolina** e **fosfatidiletanolamina** (**Figura 24-2**), a colina ou a etanolamina deve ser inicialmente ativada por fosforilação pelo ATP, seguida de ligação à CDP. A CDP-colina ou a CDP-etanolamina resultante reage com o 1,2-diacilglicerol, formando fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, respectivamente. A **fosfatidilserina** é formada diretamente a partir da fosfatidiletanolamina pela sua reação com serina (**Figura 24-2**). A fosfatidilserina pode novamente formar fosfatidiletanolamina por descarboxilação. No fígado, uma via alternativa permite que a fosfatidiletanolamina dê origem diretamente à fosfatidilcolina por metilação progressiva do resíduo de etanolamina. Apesar dessas fontes de colina, ela é considerada um nutriente essencial em muitas espécies de mamíferos, embora isso não tenha sido estabelecido nos seres humanos.

A regulação da biossíntese de triacilglicerol, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina depende da disponibilidade de ácidos graxos livres. Os que escapam da oxidação são preferencialmente convertidos em fosfolipídeos; quando essa necessidade está satisfeita, os ácidos graxos livres são utilizados na síntese de triacilgliceróis.

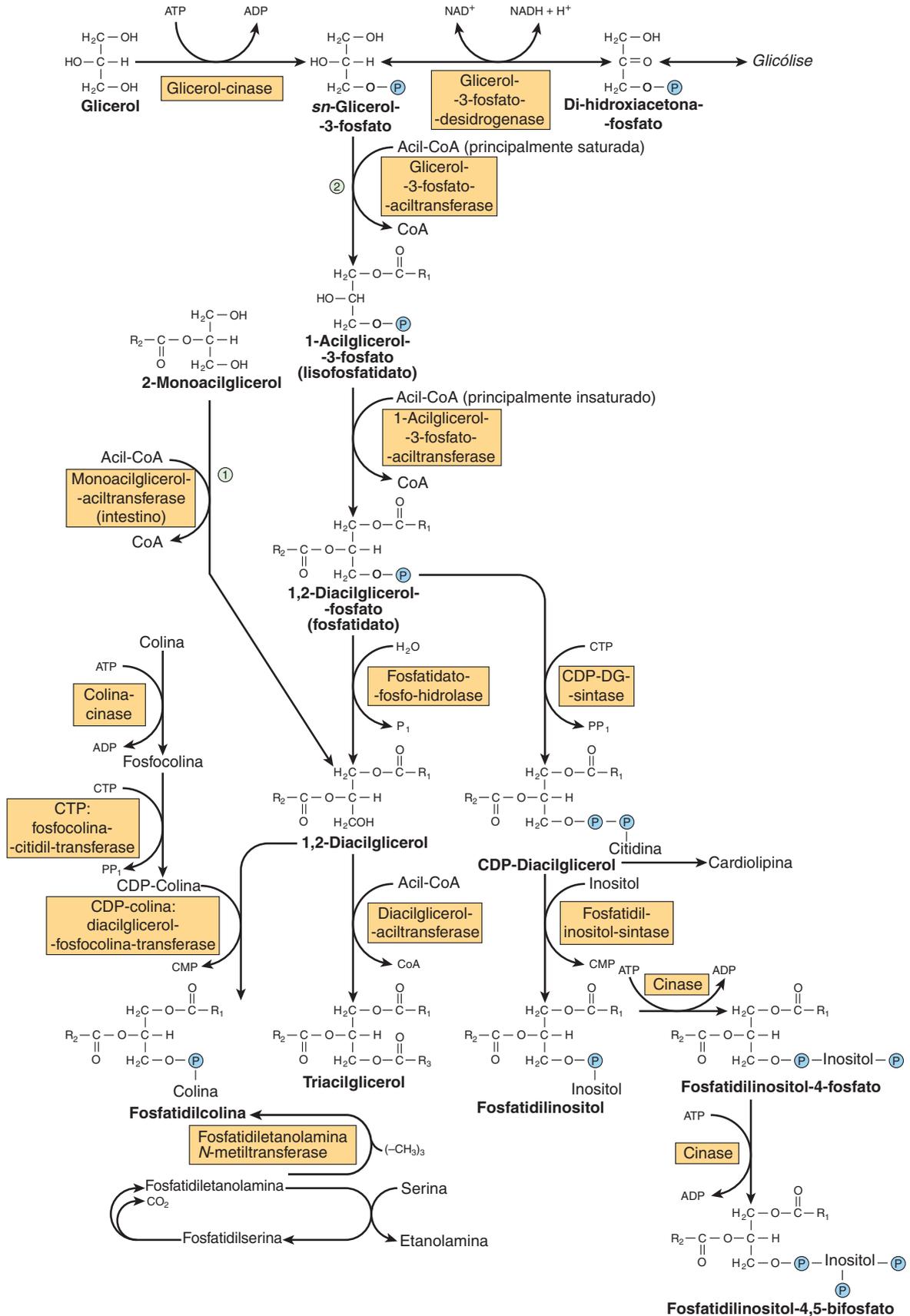


FIGURA 24-2 Biossíntese do triacilglicéris e de fosfolípideos. ①, Via do monoacilglicéris; ②, via do glicéris-fosfato. A fosfatidiletanolamina pode ser formada a partir da etanolamina por uma via semelhante à mostrada para a formação de fosfatidilcolina a partir da colina.

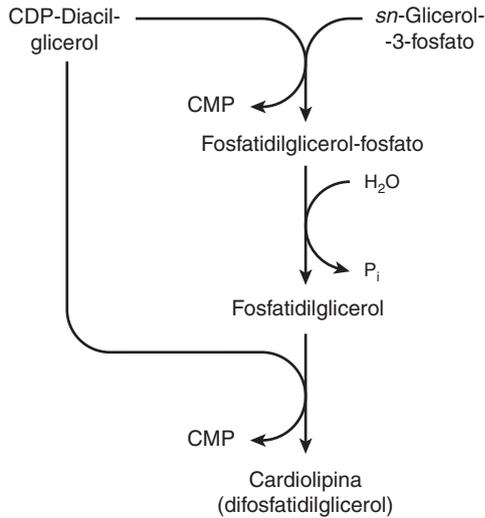


FIGURA 24-3 Biossíntese da cardiolipina.

A **cardiolipina** (difosfatidilglicerol; Figura 21-10) é um fosfolípido presente nas mitocôndrias. A cardiolipina é formada a partir do fosfatidilglicerol, que, por sua vez, é sintetizado a partir do CDP-diacilglicerol (Figura 24-2) e do glicerol-3-fosfato, de acordo com o esquema ilustrado na **Figura 24-3**. A cardiolipina, encontrada na membrana interna das mitocôndrias, desempenha um papel essencial na estrutura e na função dessas organelas, e acredita-se, também, que esteja envolvida na morte celular programada (**apoptose**).

Biossíntese dos éteres glicerofosfolipídeos

Nos **éteres glicerofosfolipídeos**, um ou mais dos carbonos do glicerol estão acoplados a uma cadeia hidrocarbonada por uma ligação éter, em vez de por uma ligação éster. Os **plasmalogênios** e o **PAF** são exemplos importantes desse tipo de lipídeo. A via biossintética está localizada nos peroxissomos. A di-hidroxiacetona fosfato é o precursor da porção glicerol (**Figura 24-4**). Ela combina-se com acil-CoA para formar 1-acildi-hidroxiacetona-fosfato, e a ligação éter é formada na reação seguinte, produzindo 1-alkildi-hidroxiacetona-fosfato,

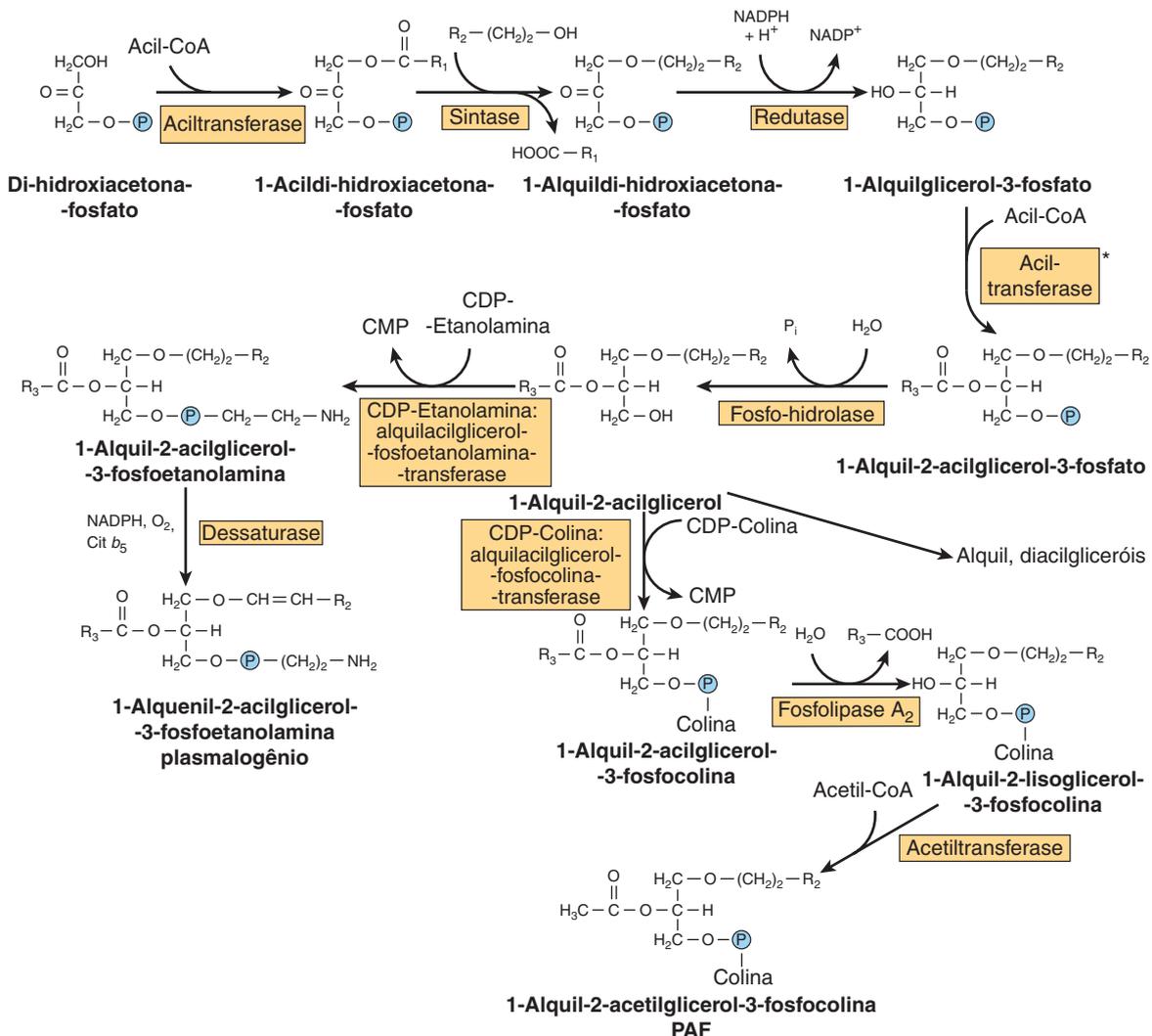


FIGURA 24-4 Biossíntese dos éteres lipídeos, incluindo os plasmalogênios e o fator de ativação de plaquetas (PAF). Na via *de novo* para a síntese de PAF, a acetil-CoA é incorporada no estágio*, evitando as duas últimas etapas da via aqui apresentada.

que é, então, convertida a 1-alkilglicérol-3-fosfato. Após mais uma acilação na posição 2, o 1-alkil-2-acilglicérol-3-fosfato resultante (análogo ao fosfatidato na Figura 24-2) é hidrolisado, dando origem ao derivado glicérol livre. Os plasmalogenos, que compreendem grande parte dos fosfolípídeos nas mitocôndrias, são formados pela dessaturação dos derivados análogos da 3-fosfoetanolamina (Figura 24-4). O fator de ativação das plaquetas (PAF) (1-alkil-2-acetil-*sn*-glicérol-3-fosfocolina) é sintetizado a partir do derivado correspondente da 3-fosfocolina. O PAF é formado por muitas células sanguíneas e por outros tecidos e agrega as plaquetas em concentrações baixas de apenas 10^{-11} mol/L. Além disso, apresenta propriedades hipotensoras e ulcerogênicas e está envolvido em uma variedade de respostas biológicas, incluindo inflamação, quimiotaxia e fosforilação de proteínas.

As fosfolípases possibilitam a degradação e o remodelamento dos fosfoglicéris

Embora os fosfolípídeos sejam degradados ativamente, cada parte da molécula apresenta uma renovação em velocidade diferente – por exemplo, o tempo de renovação do grupamento fosfato é diferente do tempo do grupo 1-acil. Isso se deve à presença de enzimas que permitem a degradação parcial da molécula, seguida de nova síntese (Figura 24-5). A **fosfolípase A₂** catalisa a hidrólise dos glicérolfosfolípídeos, originando um ácido graxo livre e a um lisofosfolípídeo, que, por sua vez, pode ser novamente acilado com acil-CoA na presença de uma aciltransferase. Alternativamente, o lisofosfolípídeo (p. ex., lisolecitina) é atacado pela **lisofosfolípase**, formando a base glicérol-fosforil correspondente, que, por sua vez, pode ser clivada por uma hidrolase, com liberação de glicérol-3-fosfato e da base. **Fosfolípases A₁, A₂, B, C e D** clivam as ligações indicadas na Figura 24-6. A **fosfolípase A₂** é encontrada no suco pancreático e no veneno das serpentes, bem como em muitos tipos de células; a **fosfolípase C** é uma das principais toxinas secretadas por bactérias; e a **fosfolípase D** é conhecida pela sua participação na transdução de sinais em mamíferos.

A **lisolecitina (lisofosfatidilcolina)** pode ser formada por uma via alternativa que envolve **lecitina: colesterol-aciltransferase (LCAT)**. Essa enzima, encontrada no plasma, catalisa a transferência de um resíduo do ácido graxo da posição 2 da lecitina para o colesterol, originando um éster de colesterol e uma lisolecitina; é considerada responsável pela maior parte do éster de colesterol presente nas lipoproteínas plasmáticas (ver Capítulo 25).

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são encontrados predominantemente na posição 1 dos fosfolípídeos, ao passo que os ácidos graxos poli-insaturados (p. ex., os precursores das prostaglandinas) são incorporados mais frequentemente na posição 2. A incorporação de ácidos graxos na lecitina ocorre de três maneiras: pela síntese completa do fosfolípídeo; por transacilação entre o éster de colesterol e a lisolecitina; e por acilação direta da lisolecitina pela acil-CoA. Portanto, é possível haver troca contínua de ácidos graxos, particularmente no que diz respeito à introdução de ácidos graxos essenciais nas moléculas de fosfolípídeos.

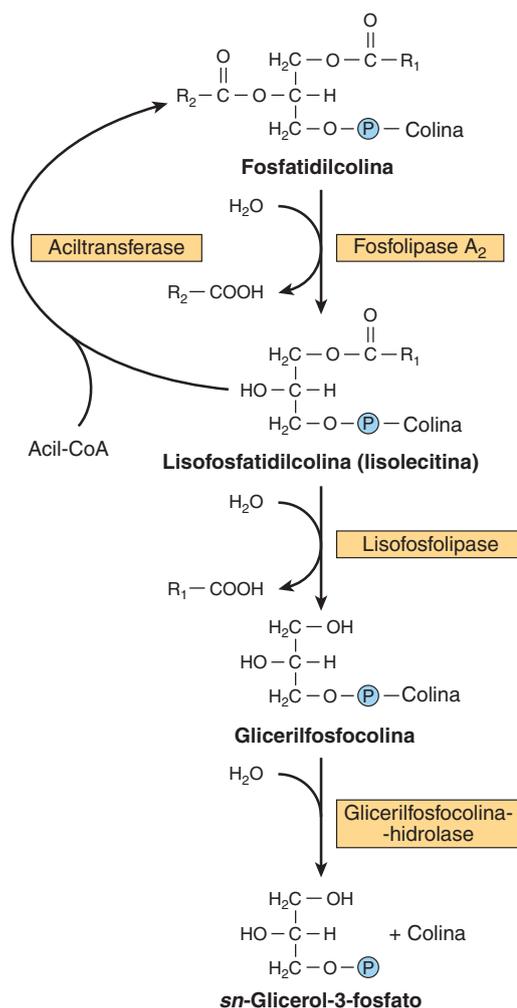


FIGURA 24-5 Metabolismo da fosfatidilcolina (lecitina).

TODOS OS ESFINGOLÍPÍDEOS SÃO FORMADOS A PARTIR DA CERAMIDA

A **ceramida** (ver Capítulo 21) é sintetizada no retículo endoplasmático a partir do aminoácido serina, como mostrado na Figura 24-7. A ceramida é uma molécula de sinalização (segundo mensageiro) importante, que regula diversas vias, incluindo a morte celular programada (**apoptose**), o **ciclo celular** e a **diferenciação** e a **senescência das células**.

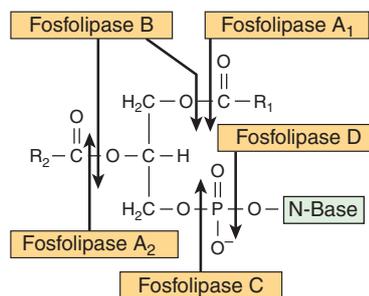


FIGURA 24-6 Locais de atividade hidrolítica das fosfolípases em um substrato fosfolípídico.

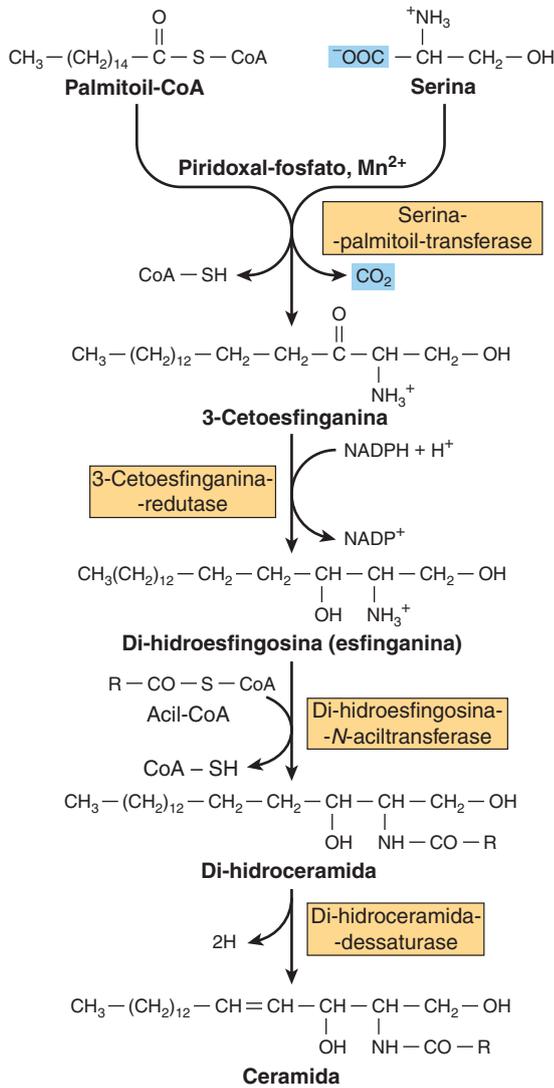


FIGURA 24-7 Biossíntese da ceramida.

As **esfingomielinas** (ver Figura 21-11) são fosfolipídeos formados quando uma ceramida reage com fosfatidilcolina, formando esfingomielina e diacilglicerol (Figura 24-8A). Isso ocorre principalmente no aparelho de Golgi e, em menor grau, na membrana plasmática.

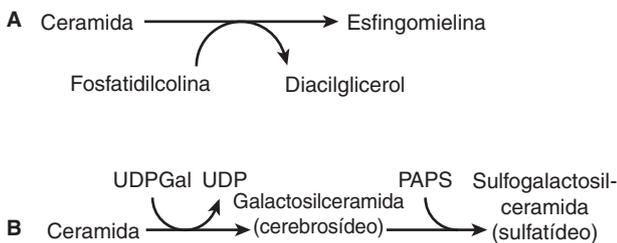


FIGURA 24-8 Biossíntese (A) da esfingomielina e (B) da galactosilceramida e do seu derivado sulfurado. (PAPS, “sulfato ativo”, 3’-fosfoadenosina-5’-fosfossulfato).

Os glicosfingolipídeos são uma combinação de ceramida com um ou mais resíduos de açúcar

Os glicosfingolipídeos mais simples (**cerebrosídeos**) são a **galactosilceramida (GalCer)** (ver Figura 21-15) e a **glicosilceramida (GlcCer)**. A GalCer é um importante lipídeo da **mielina**, ao passo que a GlcCer é o principal glicosfingolipídeo dos **tecidos extraneurais** e um precursor da maior parte dos glicosfingolipídeos mais complexos. A GalCer (Figura 24-8B) é formada em uma reação entre a ceramida e a UDPGal (formada por epimerização a partir da UDPGlc; Figura 20-6).

A **sulfogalactosilceramida** e outros sulfolipídeos, como os **sulfo (galacto)-glicerolipídeos** e os **sulfatos esteroides**, são formados após reações adicionais envolvendo a 3’-fosfoadenosina-5’-fosfossulfato (PAPS; “sulfato ativo”). Os **gangliosídeos** são sintetizados a partir da ceramida pela adição sequencial de açúcares ativados (p. ex., UDPGlc e UDPGal) e **ácido siálico**, geralmente o ácido *N*-acetilneuramínico (Figura 24-9). Pode haver formação de um grande número de gangliosídeos com pesos moleculares crescentes. As enzimas que transferem açúcares dos nucleotídeos (glicosiltransferases) são encontradas, em sua maioria, no aparelho de Golgi.

Os **glicosfingolipídeos** são constituintes da camada externa das membranas plasmáticas e são importantes na **adesão** e no **reconhecimento celular**. Alguns são antígenos, como, por exemplo, o grupo de substâncias ABO do sangue. Certos gangliosídeos atuam como receptores de toxinas bacterianas (p. ex., para a **toxina colérica**, que, subsequentemente, ativa a adenilato, ciclase).

ASPECTOS CLÍNICOS

A deficiência de surfactante pulmonar causa a síndrome da angústia respiratória

O **surfactante pulmonar**, constituído principalmente por lipídeo com algumas proteínas e carboidratos, impede o colapso dos alvéolos. O fosfolipídeo **dipalmitoil-fosfatidilcolina** diminui a tensão superficial na interface entre ar e líquido e, assim, reduz acentuadamente o trabalho da respiração; no entanto outros componentes lipídicos e proteicos do surfactante também são importantes na sua função. A deficiência de surfactante pulmonar nos pulmões de muitos recém-nascidos prematuros dá origem à **síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SARRN)**. A administração de surfactante natural ou artificial tem benefício terapêutico.

Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos estão envolvidos na esclerose múltipla e nas lipidoses

Certas doenças caracterizam-se por quantidades anormais desses lipídeos nos tecidos, frequentemente no tecido nervoso. Elas podem ser classificadas em dois grupos: (1) doenças desmielinizantes verdadeiras e (2) esfingolipidoses.

Na **esclerose múltipla**, uma doença desmielinizante, ocorre perda de fosfolipídeos (particularmente do plasmalogeno

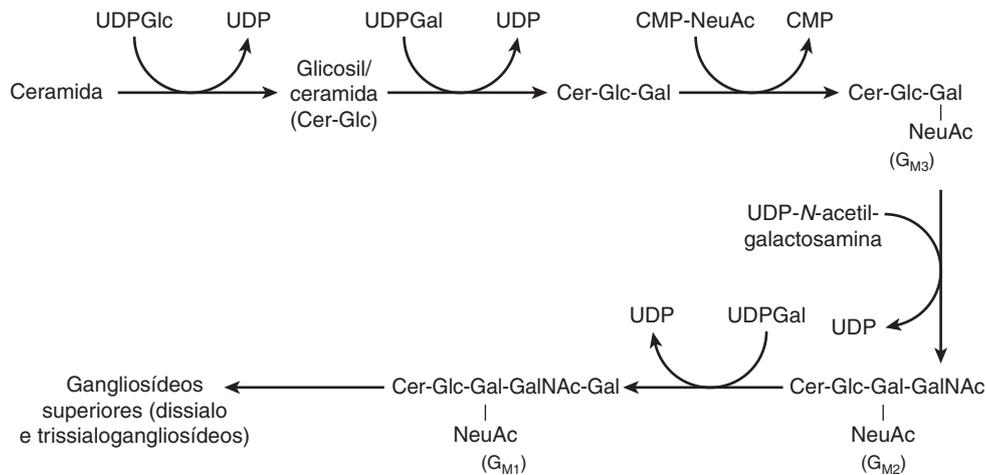


FIGURA 24-9 Biossíntese dos gangliosídeos. (NeuAc, ácido *N*-acetilneuramínico.)

etanolamina) e de esfingolípídeos da substância branca. Por conseguinte, a composição lipídica da substância branca assemelha-se à da substância cinzenta. O líquido cerebrospinal apresenta níveis elevados de fosfolípídeos.

As **esfingolipídeos (doenças de depósito de lipídeos)** compreendem um grupo de doenças hereditárias causadas por defeito genético no catabolismo dos lipídeos contendo esfingosina. As esfingolipídeos fazem parte de um grupo maior de distúrbios dos lisossomos e exibem várias características constantes: (1) ocorre acúmulo de lipídeos complexos contendo ceramida nas células, particularmente nos neurônios, causando neurodegeneração e redução do tempo de sobrevivência; (2) a velocidade de **síntese** do lipídeo armazenado é normal; (3) o defeito enzimático está localizado na **via de degradação lisossomal** dos esfingolípídeos; (4) o grau de redução da atividade

da enzima afetada é semelhante em todos os tecidos. Não existe nenhum tratamento efetivo para muitas das doenças, embora se tenha obtido algum sucesso com **terapia de reposição enzimática** e **transplante de medula óssea** no tratamento da doença de Gaucher e da doença de Fabry. Outras abordagens promissoras são a terapia de **privação de substrato**, para inibir a síntese de esfingolípídeos, e a **terapia química com chaperona**. Atualmente, a **terapia gênica** para os distúrbios lisossomais também está em fase de pesquisa. A **Tabela 24-1** fornece alguns exemplos das mais importantes doenças de depósito de lipídeos.

A **deficiência múltipla de sulfatase** resulta em acúmulo de sulfogalactosilceramida, sulfatos esteroides e proteoglicanos, devido à deficiência combinada das arilsulfatases A, B e C e da esteroide sulfatase.

TABELA 24-1 Exemplos de esfingolipídeos

Doença	Deficiência enzimática	Lípídeo que se acumula	Sintomas clínicos
Doença de Tay-Sachs	Hexosaminidase A	Cer—Glc—Gal(NeuAc)— \ddagger GalNAc G_{M2} Gangliosídeo	Deficiência intelectual, cegueira, fraqueza muscular
Doença de Fabry	α -Galactosidase	Cer—Glc—Gal— \ddagger Gal Globotriaosilceramida	Erupção cutânea, insuficiência renal (os sintomas integrais são observados apenas em indivíduos do sexo masculino; herança recessiva ligada ao X)
Leucodistrofia metacromática	Arilssulfatase A	Cer—Gal— \ddagger OSO ₃ 3-Sulfogalactosilceramida	Deficiência intelectual e transtornos psicológicos em adultos; desmielinização
Doença de Krabbe	β -Galactosidase	Cer— \ddagger Gal Galactosilceramida	Deficiência intelectual; mielina quase ausente
Doença de Gaucher	β -Glicosidase	Cer— \ddagger Glc Glicosilceramida	Aumento do fígado e do baço, erosão de ossos longos, deficiência intelectual em lactentes
Doença de Niemann-Pick	Esfingomielinase	Cer— \ddagger P—colina Esfingomielina	Aumento do fígado e do baço, deficiência intelectual; fatal no início da vida
Doença de Farber	Ceramidase	Acil— \ddagger Esfingosina Ceramida	Rouquidão, dermatite, deformação do esqueleto, deficiência intelectual; fatal no início da vida

Abreviaturas: Cer, ceramida; Gal, galactose; Glc, glicose; NeuAc, ácido *N*-acetilneuramínico; \ddagger , local da reação enzimática deficiente.

RESUMO

- Os triacilgliceróis constituem os principais lipídeos de armazenamento de energia, ao passo que os fosfogliceróis, a esfingomielina e os glicosfingolipídeos são anfipáticos e desempenham funções estruturais nas membranas celulares, além de outros papéis especializados.
- Os triacilgliceróis e alguns fosfogliceróis são sintetizados pela acilação progressiva de glicerol-3-fosfato. A via bifurca no fosfatidato, formando fosfolipídeos inositóis e cardiolipina por um lado, e triacilglicerol e fosfolipídeos de colina e etanolamina por outro.
- Os plasmalogenos e o PAF são éteres fosfolipídeos formados a partir da di-hidroxiacetona-fosfato.
- Os esfingolipídeos são formados a partir da ceramida (*N*-acil-esfingosina). A esfingomielina está presente nas membranas das organelas envolvidas em processos secretórios (p. ex., aparelho de Golgi). Os glicosfingolipídeos mais simples são uma combinação de ceramida mais um resíduo de açúcar (p. ex., GalCer na mielina). Os gangliosídeos são glicosfingolipídeos mais complexos, que contêm mais resíduos de açúcar e ácido siálico. Eles são encontrados na camada externa da membrana plasmática, onde contribuem para o glicocálice, e são importantes como antígenos e receptores celulares.
- Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos estão envolvidos em vários processos patológicos, incluindo a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (ausência de surfactante pulmonar), a esclerose múltipla (desmielinização) e as esfingolipidoses (incapacidade de degradar os esfingolipídeos nos lisossomos devido a defeitos hereditários das enzimas hidrolases).

REFERÊNCIAS

- Goss V, Hunt AN, Postle AD: Regulation of lung surfactant phospholipid synthesis and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:448.
- McPhail LC: Glycerolipid in signal transduction. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2002:315–340.
- Merrill AH: Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:363–398.
- Reue K, Brindley DN: Thematic review series: glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J Lipid Res* 2008;49:2493
- Ruvolo PP: Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 2003;47:383.
- Shimizu T: Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:123.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Vance DE, Vance JE (editors): Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Elsevier, 2008:213–244.
- Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, et al: Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 2008;49:2283.
- Yu RK, Tsai YT, Ariga T, et al: Structures, biosynthesis and functions of gangliosides – an overview. *J Oleo Sci* 2011;60:537.

Transporte e armazenamento de lipídeos

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Identificar os quatro principais grupos de lipoproteínas plasmáticas e as quatro principais classes de lipídeos que eles transportam.
- Ilustrar a estrutura de uma partícula de lipoproteína.
- Indicar os principais tipos de apolipoproteínas encontradas nas diferentes classes de lipoproteínas.
- Explicar que o triacilglicerol é transportado do intestino (após a sua ingestão na dieta) para o fígado nos quilomícrons e do fígado para os tecidos extra-hepáticos nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), e que essas partículas são sintetizadas por processos semelhantes nas células intestinais e hepáticas, respectivamente.
- Ilustrar os processos pelos quais os quilomícrons são metabolizados por lipases para formar remanescentes de quilomícrons, que são removidos da circulação pelo fígado.
- Explicar como a VLDL é metabolizada por lipases a remanescentes de VLDL (também denominadas lipoproteínas de densidade intermediária [IDL], que podem ser depuradas pelo fígado ou convertidas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que atuam no transporte do colesterol do fígado para os tecidos extra-hepáticos e são captadas pelo receptor de LDL (apo B-100, E).
- Explicar como é sintetizada a lipoproteína de alta densidade (HDL), que transporta o colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta ao fígado pelo transporte reverso do colesterol, indicar os mecanismos pelos quais a HDL aceita o colesterol dos tecidos e mostrar como ela é metabolizada no ciclo da HDL.
- Compreender como o fígado desempenha um papel central no transporte e no metabolismo dos lipídeos e como a secreção de VLDL hepática é regulada pela dieta e por hormônios.
- Reconhecer os papéis da LDL e da HDL na promoção e no retardo, respectivamente, do desenvolvimento da aterosclerose.
- Indicar as causas das doenças hepáticas gordurosas alcoólica e não alcoólica.
- Reconhecer o tecido adiposo como o principal local de armazenamento de triacilglicerol no corpo e explicar os processos pelos quais os ácidos graxos são liberados e como são regulados.
- Compreender o papel do tecido adiposo marrom na produção de calor corporal.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A gordura absorvida a partir da dieta e os lipídeos sintetizados pelo fígado e pelo tecido adiposo devem ser transportados entre os vários tecidos e órgãos para a sua utilização e armazenamento. Como os lipídeos são insolúveis em água, o problema de seu transporte no plasma sanguíneo aquoso é resolvido pela associação dos lipídeos apolares (triacilglicerol e ésteres de

colesteril) aos lipídeos anfipáticos (fosfolipídeos e colesterol) e às proteínas para formar **lipoproteínas miscíveis em água**.

Em um onívoro, como o ser humano, as calorias em excesso são ingeridas na fase anabólica do ciclo alimentar, seguida de um período de balanço calórico negativo, quando o organismo recorre às suas reservas de carboidratos e gordura. Esse ciclo é mediado pelas lipoproteínas, que transportam lipídeos a partir do intestino sob a forma de **quilomícrons** – e a partir do

TABELA 25-1 Composição das lipoproteínas no plasma humano

Lipoproteína	Fonte	Diâmetro (nm)	Densidade (g/mL)	Composição		Principais componentes lipídicos	Apolipoproteínas
				Proteína (%)	Lípido (%)		
Quilomícrons	Intestino	90-1.000	< 0,95	1-2	98-99	Triacilglicerol	A-I, A-II, A-IV; ^a B-48, C-I, C-II, C-III, E
Remanescentes de quilomícrons	Quilomícrons	45-150	< 1,006	6-8	92-94	Triacilglicerol, fosfolipídeos, colesterol	B-48, E
VLDL	Fígado (intestino)	30-90	0,95-1,006	7-10	90-93	Triacilglicerol	B-100, C-I, C-II, C-III
IDL	VLDL	25-35	1,006-1,019	11	89	Triacilglicerol, colesterol	B-100, E
LDL	VLDL	20-25	1,019-1,063	21	79	Colesterol	B-100
HDL	Fígado, intestino, VLDL, quilomícrons					Fosfolipídeos, colesterol	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, ^b E
HDL ₁		20-25	1,019-1,063	32	68		
HDL ₂		10-20	1,063-1,125	33	67		
HDL ₃		5-10	1,125-1,210	57	43		
Pré-β-HDL ^c		< 5	> 1,210				A-I
Albumina/ácidos graxos livres	Tecido adiposo		> 1,281	99	1	Ácidos graxos livres	

^aSecretada com quilomícrons, mas transferida para HDL.

^bAssociada às subfrações HDL₂ e HDL₃.

^cParte de uma fração menor, conhecida como lipoproteína de densidade muito alta (VHDL).

Abreviações: HDL, lipoproteína de alta densidade; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

fígado, sob a forma de **lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL)** – para a maioria dos tecidos para oxidação e até o tecido adiposo para armazenamento. Os lipídeos são mobilizados do tecido adiposo na forma de ácidos graxos livres (AGL) ligados à albumina sérica. As anormalidades no metabolismo das lipoproteínas causam diversas **hipo** ou **hiperlipoproteinemias**. A mais comum delas é o **diabetes melito**, em que a deficiência de insulina causa mobilização excessiva de AGL e utilização deficiente de quilomícrons e VLDL, com consequente desenvolvimento de **hipertriacilglicerolemia**. As outras condições patológicas que afetam o transporte dos lipídeos são, em sua maioria, causadas principalmente por defeitos hereditários, alguns dos quais provocam **hipercolesterolemia** e **aterosclerose** prematura (ver Tabela 26-1). A **obesidade** – particularmente a obesidade abdominal – constitui fator de risco para aumento da mortalidade, da hipertensão arterial, do diabetes melito tipo 2, da hiperlipidemia, da hiperglicemia e de várias disfunções endócrinas.

OS LIPÍDEOS SÃO TRANSPORTADOS NO PLASMA COMO LIPOPROTEÍNAS

As quatro principais classes de lipídeos estão presentes nas lipoproteínas

Os lipídeos plasmáticos consistem em **triacilgliceróis** (16%), **fosfolipídeos** (30%), **colesterol** (14%) e **ésteres de colesterol** (36%) e, em uma fração muito menor, de ácidos graxos de cadeia longa não esterificados (ácidos graxos livres, ou AGL) (4%). Essa última fração, os **AGL**, é metabolicamente a mais ativa dos lipídeos plasmáticos.

Foram identificados quatro grandes grupos de lipoproteínas plasmáticas

Como a gordura é menos densa do que a água, a densidade de uma lipoproteína diminui à medida que aumenta a proporção de lipídeo para proteína (Tabela 25-1). Foram identificados quatro grupos principais de lipoproteínas, importantes tanto fisiologicamente quanto no diagnóstico clínico. Os quatro grupos consistem em (1) **quilomícrons**, provenientes da absorção intestinal de triacilglicerol e de outros lipídeos; (2) **lipoproteínas de densidade muito baixa** (VLDL), derivadas do fígado para a exportação de triacilglicerol; (3) **lipoproteínas de baixa densidade** (LDL), que representam um estágio final no catabolismo das VLDL; e (4) **lipoproteínas de alta densidade** (HDL), envolvidas no transporte do colesterol, bem como no metabolismo das VLDL e dos quilomícrons. O triacilglicerol constitui o lipídeo predominante presente nos quilomícrons e nas VLDL, ao passo que o colesterol e os fosfolipídeos são os lipídeos predominantes encontrados nas LDL e HDL, respectivamente (Tabela 25-1). As lipoproteínas também podem ser classificadas de acordo com as suas propriedades eletroforéticas em **lipoproteínas α** (HDL), **β** (LDL) e **pré-β** (VLDL).

As lipoproteínas consistem em um núcleo apolar e em uma única camada superficial de lipídeos anfipáticos

O **núcleo de lipídeos apolares** consiste principalmente em **triacilglicerol** e **éster de colesterol** e é circundado por uma **única camada superficial** de moléculas de **fosfolipídeos anfipáticos** e moléculas de **colesterol** (Figura 25-1). Essas

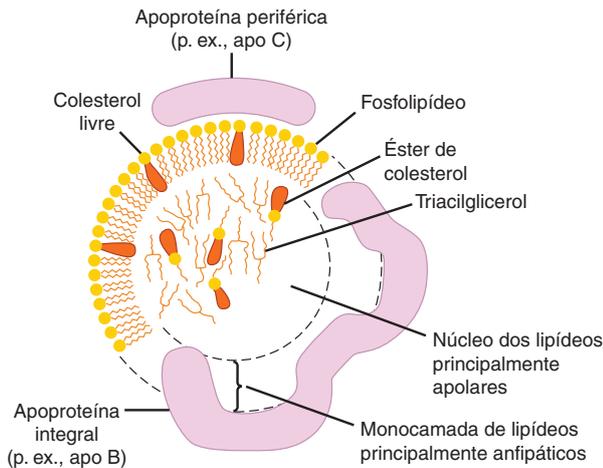


FIGURA 25-1 Estrutura geral de uma lipoproteína plasmática. Convém observar as semelhanças com a estrutura da membrana plasmática. São encontradas pequenas quantidades de éster de colesterol e de triacilglicerol na camada superficial, bem como uma pequena quantidade de colesterol livre no núcleo.

moléculas são orientados de forma que seus grupos polares estão virados para fora, para o meio aquoso, assim como nas membranas celulares (ver Capítulos 21 e 40). A fração proteica de uma lipoproteína é conhecida como **apolipoproteína** ou **apoproteína** e representa quase 70% de algumas HDL e apenas 1% dos quilomícrons.

A lipoproteína é caracterizada pela distribuição das apolipoproteínas

Verifica-se a presença de uma ou mais apolipoproteínas (proteínas ou polipeptídeos) em cada lipoproteína. Em geral, elas são abreviadas como apo, seguidas das letras A, B, C, etc. (Tabela 25-1). Algumas apolipoproteínas são integrais e não podem ser removidas (p. ex., apo B), ao passo que outras são ligadas à superfície e são livres para serem transferidas a outras lipoproteínas (p. ex., apo C e apo E). As principais apolipoproteínas de HDL (α -lipoproteínas) são as apos A (Tabela 25-1). A principal apolipoproteína de LDL (β -lipoproteína) é a apo B (B-100), que também é encontrada em VLDL. Os quilomícrons contêm uma forma truncada de apo B (B-48), que é sintetizada no intestino, ao passo que a B-100 é sintetizada no fígado. A apo B-100 é uma das cadeias polipeptídicas simples mais longas conhecidas, com 4.536 aminoácidos e massa molecular de 550.000 Da. A apo B-48 (48% da B-100) é formada pela transcrição do gene da apo B-100 com a introdução de um sinal de interrupção na transcrição do mRNA por uma enzima de edição do RNA. As apos C-I, C-II e C-III são polipeptídeos menores (com massa molecular de 7.000 a 9.000 Da), que podem ser livremente transferidas entre várias lipoproteínas diferentes. A apo E, encontrada nas VLDL, nas HDL, nos quilomícrons e nos remanescentes de quilomícrons, também é livremente transferível; nos indivíduos normais, responde por 5 a 10% das apolipoproteínas totais das VLDL.

As apolipoproteínas desempenham vários papéis: (1) podem fazer parte da estrutura das lipoproteínas, por exemplo, apo B; (2) são cofatores enzimáticos, por exemplo, C-II para lipase lipoproteica, A-I para lecitina:colesterol-aciltransferase, ou

inibidores enzimáticos, por exemplo, apo A-II e apo C-III para lipase lipoproteica, apo C-I para proteína de transferência de ésteres de colesterol; e (3) atuam como ligantes na interação com receptores de lipoproteínas em tecidos, por exemplo, apo B-100 e apo E com o receptor de LDL, apo E com a proteína-1 relacionada ao receptor de LDL (LRP-1), que foi identificada como o receptor remanescente, e apo A-I com o receptor de HDL. Todavia, as funções da apo A-IV e da apo D ainda não estão claramente definidas; no entanto, acredita-se que a apo D seja um importante fator nos distúrbios neurodegenerativos humanos.

OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES SÃO RAPIDAMENTE METABOLIZADOS

Os AGL (também denominados ácidos graxos não esterificados [AGNE]) surgem no plasma a partir da degradação do triacilglicerol do tecido adiposo ou como resultado da ação da lipase lipoproteica sobre os triacilgliceróis plasmáticos. São encontrados **em combinação com a albumina**, um solubilizador muito efetivo, em concentrações plasmáticas que variam entre 0,1 e 2,0 meq/mL. Os níveis são baixos no estado alimentado e aumentam para 0,7 a 0,8 meq/mL no jejum prolongado. No **diabetes melito** não controlado, os níveis podem alcançar até 2 meq/mL.

Os AGL são removidos do sangue de forma extremamente rápida e são oxidados (cumprindo 25 a 50% das necessidades energéticas quando em inanição) ou esterificados, formando triacilglicerol nos tecidos. Na inanição, os lipídeos esterificados da circulação ou dos tecidos também são oxidados, particularmente nas células cardíacas e do músculo esquelético, onde são encontradas consideráveis reservas de lipídeos.

A captação de AGL pelos tecidos está diretamente relacionada à concentração plasmática desses ácidos que, por sua vez, é determinada pela taxa de lipólise no tecido adiposo. Após dissociação do complexo ácido graxo albumina na membrana plasmática, os ácidos graxos ligam-se a uma **proteína de transporte de ácidos graxos da membrana**, a qual atua como co-transportador transmembrana com o Na^+ . Ao entrar no citosol, os AGL são ligados por **proteínas intracelulares de ligação aos ácidos graxos**. Acredita-se que o papel dessas proteínas no transporte intracelular seja semelhante ao da albumina sérica no transporte extracelular de ácidos graxos de cadeia longa.

O TRIACILGLICEROL É TRANSPORTADO DOS INTESTINOS EM QUILOMÍCRONS E A PARTIR DO FÍGADO EM LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDADE MUITO BAIXA

Por definição, os **quilomícrons** são encontrados no **quilo**, que é formado apenas pelo sistema linfático que **drena o intestino**. Eles são responsáveis pelo transporte de todos os lipídeos da dieta para a circulação. Pequenas quantidades de VLDL também são encontradas no quilo; entretanto, a maior parte das **VLDL no plasma** é de origem hepática. **Elas constituem os veículos de transporte de triacilglicerol do fígado para os tecidos extra-hepáticos.**

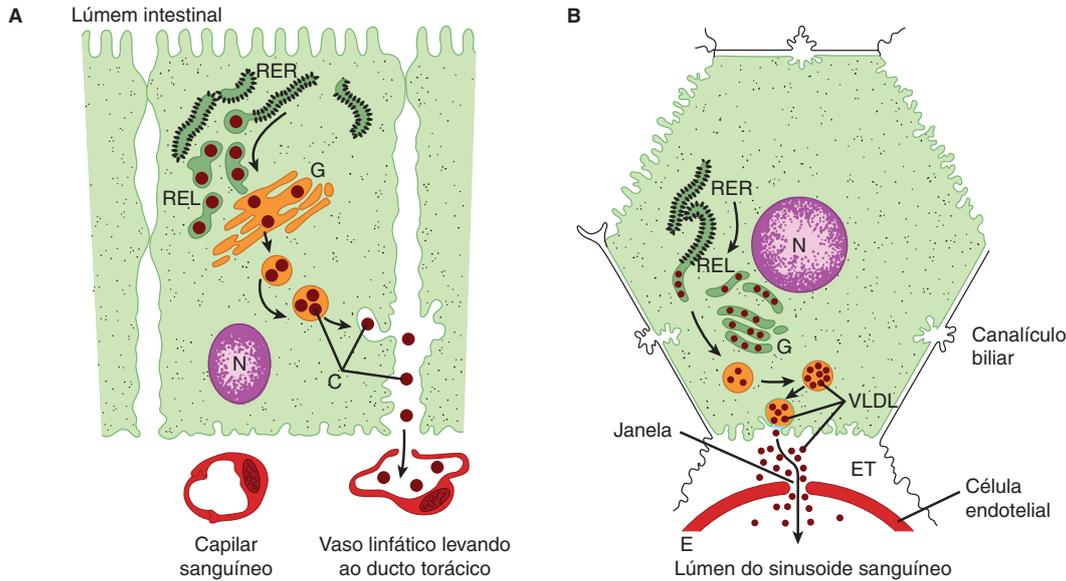


FIGURA 25-2 Formação e secreção de (A) quilomírons por uma célula intestinal e (B) lipoproteínas de densidade muito baixa por uma célula hepática. (C, quilomírons; E, endotélio; G, aparelho de Golgi; N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso; ED, espaço de Disse, que contém plasma sanguíneo; REL, retículo endoplasmático liso; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.) A apolipoproteína B, sintetizada no RER, é incorporada em partículas com triacilglicerol, colesterol e fosfolípidos no REL. Após a adição de resíduos de carboidratos no G, são liberadas da célula por pinocitose reversa. Os quilomírons passam para o sistema linfático. As VLDL são secretadas no espaço de Disse e, em seguida, nos sinusóides hepáticos através das janelas do revestimento endotelial.

Existem semelhanças notáveis nos mecanismos de formação dos quilomírons pelas células intestinais e das VLDL pelas células parenquimatosas hepáticas (Figura 25-2), talvez pelo fato – com exceção da glândula mamária – de o intestino e o fígado serem os únicos tecidos a partir dos quais ocorre secreção de lipídeos na forma de partículas. Os quilomírons e as VLDL recém-secretadas ou “nascentes” contêm apenas uma pequena quantidade de apolipoproteínas C e E, visto que o complemento total é adquirido a partir das HDL na

circulação (Figuras 25-3 e 25-4). A apo B, no entanto, é uma parte integral das partículas lipoproteicas, ela é incorporada nas partículas durante a sua montagem no interior das células e é essencial para a formação dos quilomírons e da VLDL. Na **abetalipoproteinemia** (uma doença rara), as lipoproteínas que contêm apo B não são formadas e ocorre acúmulo de gotículas de lipídeos no intestino e no fígado.

Uma discussão mais detalhada dos fatores que controlam a secreção hepática das VLDL é apresentada a seguir.

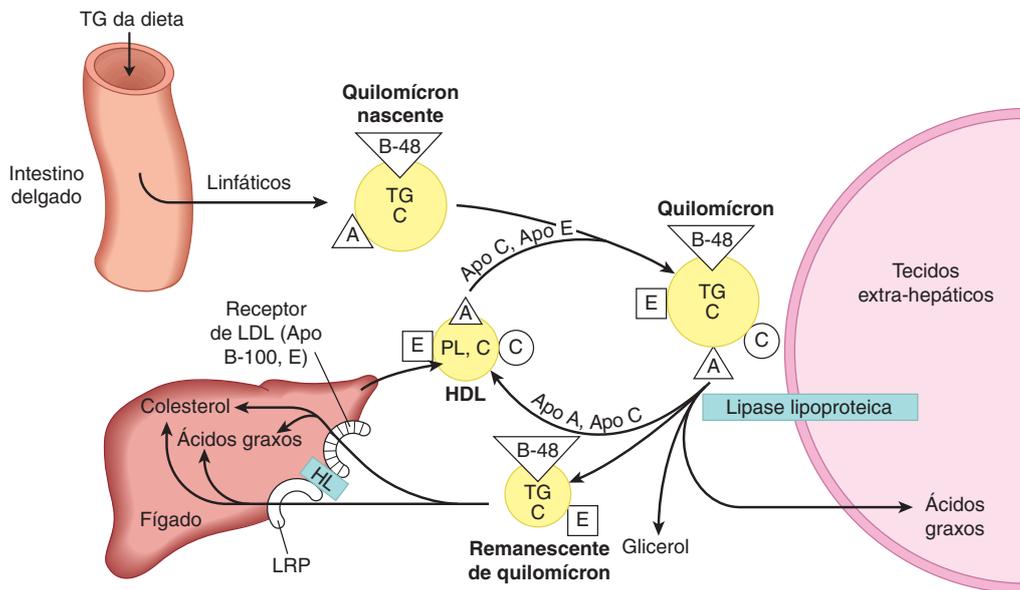


FIGURA 25-3 Destino metabólico dos quilomírons. (A, apolipoproteína A; B-48, apolipoproteína B-48; C, apolipoproteína C; C, colesterol e éster de colesterol; E, apolipoproteína E; HDL, lipoproteína de alta densidade; LH, lipase hepática; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL; PL, fosfolípido; TG, triacilglicerol.) São mostrados apenas os lipídeos predominantes.

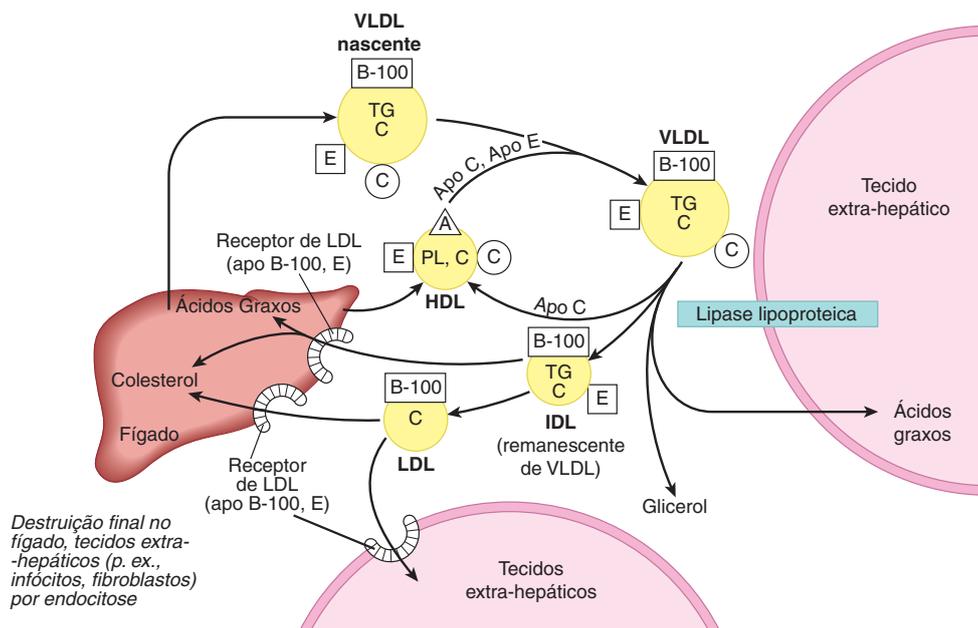


FIGURA 25-4 Destino metabólico das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e produção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). (A, apolipoproteína A; B-100, apolipoproteína B-100; C, apolipoproteína C; C, colesterol e éster de colesterol; E, apolipoproteína E; HDL, lipoproteína de alta densidade; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; PL, fosfolípido; TG, triacilglicerol.) São mostrados apenas os lipídeos predominantes. É possível que alguma IDL também seja metabolizada via proteína-1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP-1).

OS QUILOMÍCRONS E AS LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDADE MUITO BAIXA SÃO RAPIDAMENTE CATABOLIZADOS

A depuração dos quilomícrons do sangue é rápida, sendo a meia-vida de desaparecimento de menos de 1 hora nos seres humanos. As partículas maiores são catabolizadas mais rapidamente do que as menores. Os ácidos graxos que se originam dos triacilgliceróis dos quilomícrons são transportados principalmente até o tecido adiposo, o coração e o músculo (80%), ao passo que cerca de 20% vão para o fígado. Entretanto, **o fígado não metaboliza significativamente os quilomícrons e as VLDL**; por conseguinte, os ácidos graxos no fígado devem ser secundários ao seu metabolismo nos tecidos extra-hepáticos.

Os Triacilgliceróis dos quilomícrons e as VLDL são hidrolisados pela lipase lipoproteica, formando remanescentes de lipoproteínas

A **lipase lipoproteica** está localizada nas paredes dos capilares sanguíneos, ancorada no endotélio por cadeias de proteoglicanos de carga negativa de heparano sulfato. A lipase lipoproteica tem sido encontrada no coração, no tecido adiposo, no baço, no pulmão, na medula renal, na aorta, no diafragma e na glândula mamária em lactação, embora não seja ativa no fígado do adulto. Não é normalmente encontrada no sangue; entretanto, após a injeção de **heparina**, a lipase lipoproteica é liberada na circulação a partir de seus sítios de ligação ao heparano sulfato. A **lipase hepática** está ligada à superfície

sinusoidal das células hepáticas e também é liberada pela heparina. Entretanto, essa enzima não reage prontamente com quilomícrons ou VLDL, mas está envolvida no metabolismo dos remanescentes de quilomícrons e HDL.

Tanto os **fosfolípídeos** quanto a **apo C-II** são necessários como cofatores para a atividade da lipase lipoproteica, ao passo que a **apo A-II** e a **apo C-III** atuam como inibidores. Ocorre hidrólise enquanto as lipoproteínas estão ligadas à enzima sobre o endotélio. O triacilglicerol é hidrolisado progressivamente de um diacilglicerol, formando um monoacilglicerol e, por fim, AGL mais glicerol. Alguns dos AGL liberados retornam à circulação ligados à albumina, porém a maior parte é transportada para o tecido (Figuras 25-3 e 25-4). A lipase lipoproteica cardíaca apresenta baixo valor de K_m para o triacilglicerol, que corresponde a cerca de um décimo do valor para a enzima presente no tecido adiposo. Isso permite que os ácidos graxos derivados do triacilglicerol sejam **redirecionados do tecido adiposo para o coração no estado de jejum prolongado** quando os níveis plasmáticos de triacilglicerol diminuem. Ocorre um redirecionamento semelhante para a glândula mamária durante a lactação, possibilitando a captação de ácidos graxos dos triacilgliceróis das lipoproteínas para a síntese de **gordura do leite**. O **receptor de VLDL** desempenha um importante papel na transferência de ácidos graxos do triacilglicerol das VLDL para os adipócitos, uma vez que liga as VLDL e as mantém em estreito contato com a lipase lipoproteica. No tecido adiposo, a **insulina** aumenta a síntese de lipase lipoproteica nos adipócitos e o seu deslocamento para a superfície luminal do endotélio capilar.

A reação com a lipase lipoproteica resulta em perda de 70 a 90% dos triacilgliceróis dos quilomícrons e perda da apo C (que retorna às HDL), mas não da apo E, que é mantida.

Os **remanescentes de quilomícrons** resultantes têm aproximadamente metade do diâmetro dos quilomícrons originais e são relativamente enriquecidos com colesterol e ésteres de colesterol, devido à perda dos triacilgliceróis (Figura 25-3). Ocorrem alterações semelhantes nas VLDL, com formação de **remanescentes de VLDL** (também denominadas **lipoproteínas de densidade intermediária [IDL]**) (Figura 25-4).

O fígado é responsável pela captação de remanescentes de lipoproteínas

Os remanescentes de quilomícrons são captados pelo fígado por endocitose mediada por receptores, e os ésteres de colesterol e triacilgliceróis são hidrolisados e metabolizados. A captação é mediada pela **apo E** (Figura 25-3), por meio de dois receptores dependentes de apo E, o **receptor de LDL (apo B-100, E)** e a **LRP-1 (proteína-1 relacionada ao receptor de LDL)**. A lipase hepática desempenha um duplo papel: (1) atua como ligante para facilitar a captação de remanescentes e (2) hidrolisa os remanescentes de triacilgliceróis e fosfolipídeos.

Após o seu metabolismo à IDL, a VLDL pode ser captada pelo fígado diretamente por meio do receptor de LDL (apo B-100, E) ou pode ser convertida em LDL. Apenas uma molécula de apo B-100 está presente em cada uma dessas partículas de lipoproteína, sendo essa característica conservada durante as transformações. Por conseguinte, cada partícula de LDL origina-se de uma única partícula de VLDL precursora (Figura 25-4). Nos seres humanos, uma proporção relativamente grande de IDL forma LDL, respondendo pelas

concentrações aumentadas de LDL nos seres humanos, em comparação com muitos outros mamíferos.

A LDL É METABOLIZADA VIA RECEPTOR DE LDL

O fígado e muitos tecidos extra-hepáticos expressam o **receptor de LDL (apo B-100, E)**. Esse receptor é assim designado por ser específico da apo B-100, mas não da B-48, que carece do domínio carboxiterminal da B-100 que contém o domínio de ligação ao receptor de LDL e também capta lipoproteínas ricas em apo E. Cerca de 30% das LDL sofrem degradação nos tecidos extra-hepáticos, e 70%, no fígado. Existe correlação positiva entre a incidência de **aterosclerose** e a concentração plasmática de colesterol LDL. O receptor de LDL (apo B-100, E) está deficiente na **hipercolesterolemia familiar**, distúrbio genético caracterizado por níveis sanguíneos elevados de colesterol LDL, causando aterosclerose prematura (Tabela 26-1). Para uma discussão mais detalhada da regulação do receptor de LDL, ver Capítulo 26.

A HDL PARTICIPA DO METABOLISMO DO TRIACILGLICEROL DAS LIPOPROTEÍNAS E DO COLESTEROL

A **HDL** é sintetizada e secretada tanto pelo fígado quanto pelo intestino (Figura 25-5). Entretanto, a apo C e a apo E são sintetizadas no fígado e transferidas da HDL hepática para

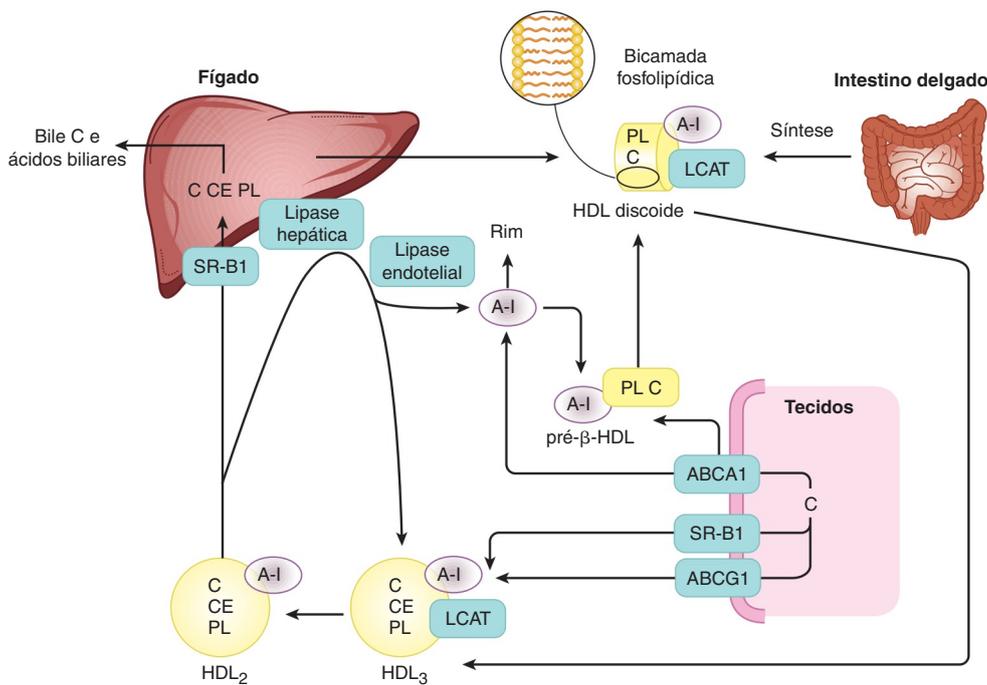


FIGURA 25-5 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) no transporte reverso do colesterol. (A-I, apolipoproteína A-I; ABCA1, transportador A1 contendo cassete de ligação a ATP; ABCG1, transportador G1 contendo cassete de ligação a ATP; C, colesterol; CE, éster de colesterol; LCAT, lecitina:colesterol-aciltransferase; PL, fosfolipídeo; SR-B1, receptor *scavenger* B1.) Pré-β-HDL, HDL₂, HDL₃ – ver Tabela 25-1. Os constituintes superficiais em excesso, em decorrência da ação da lipase lipoproteica sobre os quilomícrons e as VLDL, constituem outra fonte de pré-β-HDL. A atividade da lipase hepática é aumentada pelos androgênios e diminuída pelos estrogênios, o que pode explicar as concentrações plasmáticas mais elevadas de HDL₂ em mulheres.

a HDL intestinal quando essa última entra no plasma. Uma importante função das HDL consiste em atuar como depósito para apo C e apo E necessárias no metabolismo dos quilomícrons e das VLDL. A HDL nascente consiste em bicamada fosfolipídica discóides contendo apo A e colesterol livre. Essas lipoproteínas se assemelham às partículas encontradas no plasma de pacientes com deficiência da enzima plasmática **lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT)**, bem como no plasma de pacientes com **icterícia obstrutiva**. A LCAT – e o ativador da LCAT, a apo A-I – liga-se às partículas discóides, e o fosfolípido de superfície e o colesterol livre são convertidos em ésteres de colesteril e lisolecitina (ver Capítulo 24). Os ésteres de colesteril apolares deslocam-se para o interior hidrofóbico da bicamada, ao passo que a lisolecitina é transferida para a albumina plasmática. Dessa maneira, há geração de um núcleo apolar, formando uma HDL pseudo-micelar esférica, coberta por um filme superficial de lipídeos polares e apolipoproteínas. Isso ajuda a remover o excesso de colesterol não esterificado das lipoproteínas e dos tecidos, conforme descrito adiante. O **receptor scavenger B1 (SR-B1) da classe B** foi identificado como **receptor de HDL com duplo papel no metabolismo das HDL**. No fígado e nos tecidos esteroideogênicos, esse receptor se liga à HDL pela apo A-I, e o éster de colesteril é seletivamente liberado para as células, embora a partícula em si, incluindo a apo A-I, não seja captada. Por outro lado, nos tecidos, o SR-B1 medeia a recepção pela HDL do colesterol proveniente das células e, em seguida, o transporta até o fígado para excreção pela bile (sob a forma de colesterol ou após conversão em ácidos biliares), em um processo conhecido como **transporte reverso do colesterol** (Figura 25-5). A HDL₃, gerada a partir da HDL discoide pela ação da LCAT, aceita o colesterol dos tecidos por meio do **SR-B1**, e o colesterol é esterificado pela LCAT, aumentando o tamanho das partículas para formar HDL₂ menos densa. Em seguida, ocorre nova formação de HDL₃ após liberação seletiva de éster de colesteril no fígado por meio do SR-B1 ou por hidrólise do fosfolípido e do triacilglicerol da HDL₂ pelas lipases hepática e endotelial. Esse intercâmbio entre HDL₂ e HDL₃ é denominado **ciclo das HDL** (Figura 25-5). A apo A-I livre é liberada por esses processos e forma a **pré-β-HDL** após a sua associação a uma quantidade mínima de fosfolípido e colesterol. O excesso de apo A-I é destruído no rim. Um segundo mecanismo importante para o transporte reverso do colesterol envolve os **transportadores com cassete de ligação ao ATP A1 (ABCA1) e G1 (ABCG1)**. Esses transportadores são membros de uma família de proteínas transportadoras que acoplam a hidrólise do ATP à ligação de um substrato, possibilitando o seu transporte através da membrana. O ABCG1 medeia o transporte do colesterol das células para as HDL, ao passo que o ABCA1 promove preferencialmente o efluxo de partículas contendo poucos lipídeos, como pré-β-HDL ou apo A-I, que são convertidas em HDL₃ pela HDL discoide (Figura 25-5). A pré-β-HDL constitui a forma mais potente de HDL que induz o efluxo de colesterol dos tecidos.

As concentrações de HDL variam de modo recíproco com as concentrações plasmáticas de triacilglicerol e diretamente com a atividade da lipase lipoproteica. Isso pode ser devido à liberação do excesso de constituintes superficiais, como fosfolípido e apo A-I, durante a hidrólise dos quilomícrons e

das VLDL, contribuindo para a formação de pré-β-HDL e HDL discoide. As concentrações de HDL₂ estão **inversamente relacionadas à incidência de aterosclerose**, possivelmente por refletirem a eficiência do transporte reverso do colesterol. A HDL_c (HDL₁) é encontrada no sangue de animais com hipercolesterolemia induzida pela dieta. É rica em colesterol, e sua única apolipoproteína é a apo E. Aparentemente, todas as lipoproteínas plasmáticas são componentes inter-relacionados de um ou mais ciclos metabólicos que, juntos, são responsáveis pelo processo complexo de transporte dos lipídeos plasmáticos.

O FÍGADO DESEMPENHA UM PAPEL CENTRAL NO TRANSPORTE E NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS

O fígado desempenha as seguintes funções importantes no metabolismo dos lipídeos:

1. Facilita a digestão e a absorção dos lipídeos pela produção de **bile**, que contém colesterol e sais biliares sintetizados no fígado *de novo* ou após a captação do colesterol das lipoproteínas (ver Capítulo 26).
2. **Sintetiza e oxida ácidos graxos** ativamente (ver Capítulos 22 e 23) e também sintetiza triacilgliceróis e fosfolípidoes (ver Capítulo 24).
3. **Converte ácidos graxos em corpos cetônicos (cetogênese)** (ver Capítulo 22).
4. Desempenha função integral na **síntese** e no **metabolismo das lipoproteínas plasmáticas** (neste capítulo).

A secreção hepática de VLDL está relacionada aos estados nutricional e hormonal

Os eventos celulares envolvidos na formação e na secreção de VLDL já foram descritos (Figura 25-2) e estão ilustrados na **Figura 25-6**. A montagem de VLDL hepática requer a síntese de apo B-100 e uma fonte de triacilglicerol. A apo B-100 é sintetizada nos polirribossomos e transferida para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) à medida que é formada. À medida que a proteína entra no lúmen, são adicionados fosfolípidoes com o auxílio da **proteína transportadora de triglicerídeo microsomal (MTP)**, que também facilita a transferência de triacilgliceróis através da membrana do RE, e, assim, partículas de **VLDL2** (ou precursor de VLDL) contendo apo B são formadas. O triacilglicerol (TG) é derivado da lipólise de gotículas lipídicas contendo TG no citosol e da reesterificação em uma via que requer derivados de fosfolípidoes e diacilglicerol-aciltransferases. O TG não utilizado para formação de VLDL1 é reciclado para as gotículas citosólicas. Após a montagem no RE, VLDL2 são transportadas em vesículas COPII (ver Capítulo 49) para o aparelho de Golgi, onde se fundem com gotículas lipídicas ricas em TG, produzindo **VLDL1**. O ácido fosfatídico produzido pela atividade da fosfolipase D quando ativada pela pequena proteína de ligação ao GTP, chamada de **fator-1 de ribosilação de ADP (ARF-1)**, é necessário para a formação das partículas ricas em TG e/ou VLDL2. Embora algumas partículas de VLDL2

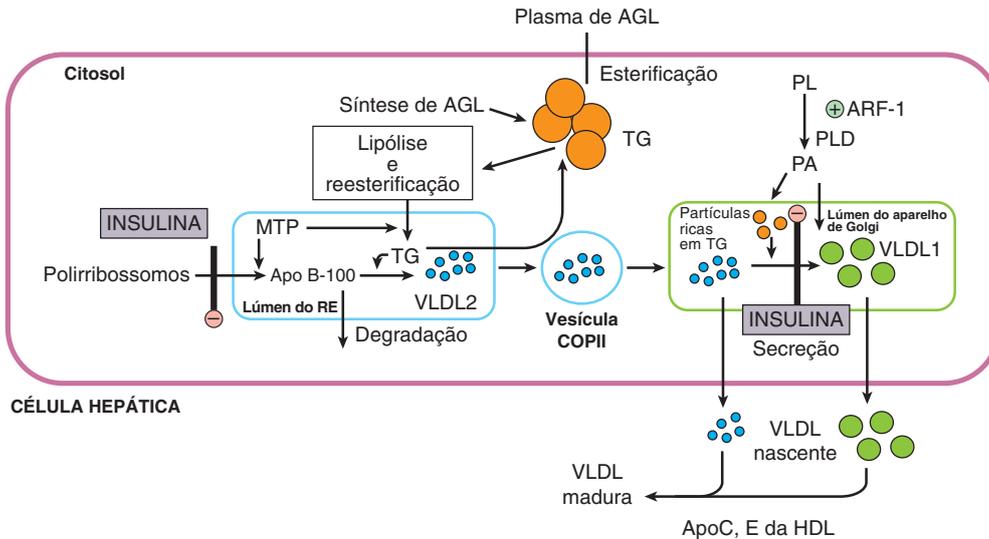


FIGURA 25-6 Montagem da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) no fígado. (Apo, apolipoproteína; ARF-1, fator-1 de ribossilação de ADP; AGL, ácidos graxos livres; HDL, lipoproteínas de alta densidade; MTP, proteína transportadora de triglicerídeo microsomal; PA, ácido fosfatídico; PL, fosfolípideo; PLD, fosfolipase D; TG, triacilglicerol.) As vias indicadas formam a base para os eventos apresentados na Figura 25-2. Apo B-100 é sintetizada nos polirribossomos e os fosfolípideos são adicionados pela MTP à medida que entra no lúmen do RE. Qualquer excesso é degradado nos proteossomos. O TG derivado da lipólise das gotículas lipídicas citosólicas seguida de ressíntese é transferido para o lúmen do RE com o auxílio da MTP e interage com a apo B-100, formando VLDL2. O excesso de TG é reciclado nas gotículas lipídicas citosólicas. As VLDL2 são transportadas para o aparelho de Golgi em vesículas COPII, onde se fundem com partículas ricas em TG, formando VLDL1. O PA é produzido pela ativação de PLD pela ARF-1 e é incorporado em VLDL1 e/ou VLDL2 rica em TG. Tanto VLDL1 quanto VLDL2 podem ser secretadas no sangue. A insulina inibe a secreção de VLDL por inibir a síntese de apo B-100 e a formação de VLDL1 a partir de VLDL2.

possam ser secretadas sem a fusão, a maioria das partículas que deixam a célula ocorre na forma de VLDL1. Então, as VLDL nascentes adquirem apolipoproteínas C e E a partir do HDL da circulação, tornando-se VLDL maduras.

O triacilglicerol para a formação de VLDL é sintetizado a partir de AGL. Os ácidos graxos utilizados provêm de duas fontes possíveis: (1) a síntese *de novo* no fígado a partir da **acetil-CoA**, derivada principalmente dos carboidratos (o que talvez não seja tão importante nos seres humanos) e (2) a captação de **AGL** da circulação. A primeira fonte predomina no estado alimentado, quando a síntese de ácidos graxos está elevada e o nível de AGL circulantes está baixo. Como o triacilglicerol normalmente não se acumula no fígado nessas condições, deve-se deduzir que ele é transportado a partir do fígado nas VLDL tão rapidamente quanto é sintetizado. Os AGL da circulação constituem a principal fonte de energia durante jejum prolongado, na ingestão de dietas ricas em gordura ou no diabetes melito, quando ocorre inibição da lipogênese hepática. Os fatores que aumentam tanto a síntese de triacilglicerol quanto a secreção de VLDL pelo fígado incluem (1) o estado alimentado, e não o de jejum prolongado; (2) a ingestão de dietas ricas em carboidratos (particularmente quando contêm sacarose ou frutose), resultando em altas taxas de lipogênese e esterificação dos ácidos graxos; (3) os níveis elevados de AGL circulantes; (4) a ingestão de etanol; e (5) a presença de altas concentrações de insulina e baixas concentrações de glucagon, que aumentam a síntese e a esterificação de ácidos graxos e inibem a sua oxidação.

A insulina reprime a secreção de VLDL hepática tanto por inibir a síntese de apo B-100 quanto por inibir a conversão de VLDL2 em VLDL1 pela fusão com a massa de TG. Outros fatores conhecidos por inibir ou prevenir a montagem de VLDL

no fígado incluem o antibiótico brefeldina A, que inibe a atividade da ARF-1; um fármaco hipoglicêmico sulfonilureia, a tolbutamida, os ácidos graxos $\omega 3$ da dieta (ver Capítulo 21) e o ácido orótico, um intermediário na síntese de pirimidinas (ver Capítulo 33) diminuem a taxa de lipólise de TG; e um defeito no gene da MTP. A glicose, por outro lado, aumenta a produção de VLDL por promover a lipólise de TG. A regulação da formação de VLDL no fígado é complexa e envolve interações entre fatores hormonais e dietéticos que ainda não estão completamente entendidos.

ASPECTOS CLÍNICOS

O desequilíbrio nas taxas de formação e exportação de triacilgliceróis provoca esteatose hepática

Por várias razões, os lipídeos – principalmente na forma de triacilgliceróis – podem acumular-se no fígado (Figura 25-6). O acúmulo extenso é considerado uma condição patológica. A **doença hepática gordurosa não alcoólica (EHNA)** constitui o distúrbio hepático mais comum no mundo inteiro. Quando o acúmulo de lipídeos no fígado se torna crônico, pode-se verificar o desenvolvimento de alterações inflamatórias e fibróticas, resultando em **esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)**, que pode evoluir para doenças hepáticas, incluindo **cirrose, hepatocarcinoma e insuficiência hepática**.

O fígado gorduroso é classificado em duas categorias principais. O primeiro tipo está associado a **níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos livres**, devido à mobilização de gordura do tecido adiposo ou da hidrólise do triacilglicerol

das lipoproteínas pela lipase lipoproteica nos tecidos extra-hepáticos. A produção de VLDL não acompanha o influxo e a esterificação crescentes de ácidos graxos livres, permitindo o acúmulo de triacilglicerol, o que, por sua vez, resulta em fígado gorduroso. Isso ocorre durante o **jejum prolongado** e o consumo de **dietas ricas em gordura**. A capacidade de secretar VLDL também pode estar comprometida (p. ex., no jejum prolongado). No **diabetes melito** não controlado, na **doença de gestação múltipla em ovinos** e na **cetose bovina**, a infiltração gordurosa é grave o suficiente para causar aumento e palidez visível (aparência gordurosa) do fígado, com possível disfunção hepática.

O segundo tipo de fígado gorduroso é geralmente devido a um **bloqueio metabólico na produção de lipoproteínas plasmáticas**, possibilitando o acúmulo de triacilgliceróis. Teoricamente, a lesão pode ser devida a (1) um bloqueio na síntese de apolipoproteínas (ou a um aumento de sua degradação antes que possa ser incorporado nas VLDL); (2) um bloqueio na síntese da lipoproteína a partir de lipídeos e apolipoproteínas; (3) uma falha no suprimento de fosfolipídeos encontrados nas lipoproteínas; ou (4) uma falha no próprio mecanismo secretor.

Um tipo de esteatose hepática que foi extensamente estudado em ratos é causado por deficiência de **colina**, motivo pelo qual foi designada como **fator lipotrópico**. O antibiótico puromicina, a etionina (ácido α -amino- γ -mercaptobutírico), o tetracloreto de carbono, o clorofórmio, o fósforo, o chumbo e o arsênico provocam esteatose hepática e acentuada redução da concentração sanguínea de VLDL em ratos. A colina não protege o organismo contra esses agentes, mas parece auxiliar na recuperação. A ação do tetracloreto de carbono provavelmente envolve a formação de radicais livres, causando peroxidação dos lipídeos. Alguma proteção contra isso é proporcionada pela ação antioxidante de dietas suplementadas com **vitamina E**. Acredita-se que a ação da etionina seja causada por redução na disponibilidade de ATP, devido à substituição da metionina em S-adenosilmetionina, sequestrando a adenina disponível e impedindo a síntese de ATP. O **ácido orótico** também provoca esteatose hepática; acredita-se que ele interfira na glicosilação das lipoproteínas, inibindo a sua liberação; além disso, pode comprometer o recrutamento de triacilglicerol para as partículas. A deficiência de vitamina E aumenta a necrose hepática que ocorre na esteatose hepática por deficiência de colina. A adição de vitamina E ou de uma fonte de **selênio** tem efeito protetor ao combater a peroxidação dos lipídeos. Além da deficiência de proteínas, as deficiências de ácidos graxos essenciais e de vitaminas (p. ex., ácido linoleico, piridoxina e ácido pantotênico) podem causar infiltração gordurosa do fígado.

O etanol também provoca esteatose hepática

O **fígado gorduroso alcoólico** constitui o primeiro estágio da **doença hepática alcoólica (DHA)**, que é causada pelo **alcooolismo** e leva, por fim, à **cirrose**. O acúmulo de gordura no fígado é causado por combinação de comprometimento da oxidação dos ácidos graxos e aumento da lipogênese, o que se acredita ser devido a alterações do potencial redox de $[NADH]/[NAD^+]$ no fígado, bem como à interferência na ação de fatores de transcrição que regulam a expressão das

enzimas envolvidas nas vias. A oxidação de etanol pela **álcool-desidrogenase** resulta em produção excessiva de NADH, que compete com equivalentes redutores de outros substratos, incluindo ácidos graxos, pela cadeia respiratória. Isso inibe a sua oxidação e provoca aumento da esterificação dos ácidos graxos para formar triacilglicerol, resultando em fígado gorduroso. A oxidação do etanol leva à formação de acetaldeído, que é oxidado pela **aldeído-desidrogenase**, produzindo acetato. O aumento da razão $(NADH)/(NAD^+)$ também provoca aumento da razão $(lactato)/(piruvato)$, com consequente desenvolvimento de **hiperacidemia láctica**, que diminui a excreção de ácido úrico, agravando a **gota**.

Ocorre metabolismo do etanol por meio do sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) dependente do citocromo P450, envolvendo NADPH e O_2 . A atividade desse sistema aumenta no **alcooolismo crônico**, podendo responder pelo aumento da depuração metabólica nessa condição. O etanol também inibe o metabolismo de alguns fármacos, como os barbitúricos, ao competir pelas enzimas dependentes do citocromo P450.

Em algumas populações asiáticas e em norte-americanos nativos, o consumo de álcool resulta em reações adversas mais intensas ao acetaldeído, devido a um defeito genético da aldeído-desidrogenase mitocondrial.

O TECIDO ADIPOSEO É O PRINCIPAL LOCAL DE ARMAZENAMENTO DE TRIACILGLICEROL NO CORPO

Os triacilgliceróis são armazenados no tecido adiposo em grandes gotas lipídicas e estão continuamente passando por lipólise (hidrólise) e reesterificação. Esses dois processos consistem em vias totalmente diferentes, envolvendo substratos e enzimas diferentes. Isso possibilita a regulação separada dos processos de esterificação ou de lipólise por muitos fatores nutricionais, metabólicos e hormonais. O equilíbrio entre esses dois processos determina a magnitude do reservatório de AGL no tecido adiposo, o que, por sua vez, determina o nível de AGL circulantes no plasma. Como esse último exerce efeitos mais profundos sobre o metabolismo de outros tecidos, particularmente fígado e músculo, os fatores que operam no tecido adiposo para regular o efluxo de AGL exercem influência muito além do próprio tecido. Além disso, o papel do tecido adiposo como órgão endócrino tem sido reconhecido desde a descoberta, nos últimos 20 anos, de que ele secreta hormônios, como leptina e adiponectina, conhecidos como adipocinas. A leptina regula a homeostasia energética, estimulando o consumo de energia e limitando a ingestão de alimento. Se a leptina estiver ausente, a ingestão de alimento pode ser descontrolada, causando obesidade. A adiponectina modula o metabolismo de glicose e lipídeos no músculo e no fígado e aumenta a sensibilidade dos tecidos à insulina.

O suprimento de glicerol-3-fosfato regula a esterificação: a lipólise é controlada pela lipase sensível a hormônio

O triacilglicerol é sintetizado a partir de acil-CoA e glicerol-3-fosfato (ver Figura 24-2). Como a enzima **glicerol-cinase** não

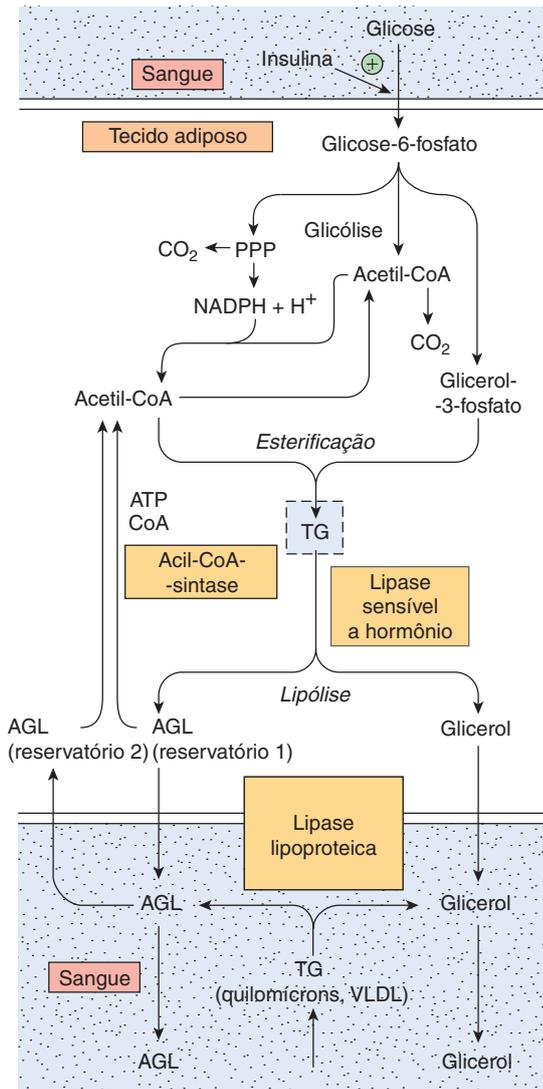


FIGURA 25-7 Metabolismo do triacilglicerol no tecido adiposo. A lipase sensível a hormônio é ativada por ACTH, TSH, glucagon, epinefrina, norepinefrina e vasopressina; e inibida por insulina, prostaglandina E₁ e ácido nicotínico. Os detalhes da formação do glicerol-3-fosfato a partir de intermediários da glicólise são apresentados na Figura 24-2. (AGL, ácidos graxos livres; PPP, via das pentoses-fosfato; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.)

é expressa no tecido adiposo, o glicerol não pode ser utilizado para suprimento de glicerol-3-fosfato, que deve ser obtido da glicose a partir da glicólise (Figura 25-7).

O triacilglicerol é hidrolisado pela **lipase sensível a hormônio**, com formação de AGL e glicerol. Essa lipase é distinta da lipase lipoproteica, que catalisa a hidrólise do triacilglicerol das lipoproteínas antes de sua captação pelos tecidos extra-hepáticos (ver anteriormente). Como não pode ser utilizado, o glicerol entra no sangue circulante e é captado e transportado para tecidos como o fígado e o rim, que possuem glicerol-cinase ativa. Os AGL formados pela lipólise podem ser reconvertidos, no tecido adiposo, à acil-CoA pela **acil-CoA sintase** e reesterificados com glicerol-3-fosfato, formando triacilglicerol. Portanto, **existe um ciclo contínuo de lipólise**

e reesterificação dentro do tecido (Figura 25-7). Entretanto, quando a taxa de reesterificação não é suficiente para acompanhar a taxa de lipólise, os AGL acumulam-se e difundem-se no plasma, onde se ligam à albumina e aumentam a concentração plasmática de ácidos graxos livres.

O aumento do metabolismo da glicose reduz o efluxo de AGL

Quando a utilização de glicose pelo tecido adiposo aumenta, o efluxo de AGL diminui. Entretanto, a liberação de glicerol continua, demonstrando que o efeito da glicose não é mediado pela redução da taxa de lipólise. O efeito é devido ao fornecimento de glicerol-3-fosfato, que aumenta a esterificação de AGL. A glicose pode seguir diversas vias no tecido adiposo, incluindo a oxidação a CO₂ pelo ciclo do ácido cítrico, a oxidação na via das pentoses-fosfato, a conversão em ácidos graxos de cadeia longa e a formação de acilglicerol pelo glicerol-3-fosfato (Figura 25-7). Quando a utilização da glicose está elevada, maior proporção da captação de glicose é oxidada a CO₂ e convertida em ácidos graxos. Todavia, à medida que a utilização de glicose total diminui, a maior proporção da glicose é direcionada para a formação de glicerol-3-fosfato para a esterificação da acil-CoA, o que ajuda a minimizar o efluxo de AGL.

OS HORMÔNIOS REGULAM A MOBILIZAÇÃO DE GORDURA

A lipólise no tecido adiposo é inibida pela insulina

A taxa de liberação de AGL do tecido adiposo é afetada por muitos hormônios que influenciam a taxa de esterificação ou a taxa de lipólise. A **insulina** inibe a liberação de AGL do tecido adiposo, resultando em queda dos níveis plasmáticos circulantes de ácidos graxos livres. A insulina também aumenta a lipogênese e a síntese de acilglicerol, bem como a oxidação da glicose gerando CO₂ pela via das pentoses-fosfato. Todos esses efeitos dependem da presença de glicose e podem ser explicados, em grande parte, com base na capacidade da insulina de aumentar a captação de glicose nas células adiposas por meio do **transportador GLUT 4**. Além disso, a insulina aumenta a atividade das enzimas piruvato-desidrogenase, acetil-CoA-carboxilase e glicerol-fosfato-aciltransferase, reforçando os efeitos da captação aumentada de glicose sobre o aumento da síntese de ácidos graxos e acilglicerol. Essas três enzimas (ver Capítulos 17, 23 e 24) são reguladas de maneira coordenada por mecanismos de fosforilação-desfosforilação.

Outra ação importante da insulina no tecido adiposo consiste na inibição da atividade da **lipase sensível a hormônio**, reduzindo a liberação não apenas dos AGL, mas também do glicerol. O tecido adiposo é muito mais sensível à insulina do que muitos outros tecidos, sendo apontado como importante local de ação da insulina *in vivo*.

Vários hormônios promovem a lipólise

Outros hormônios aceleram a liberação de AGL do tecido adiposo e causam elevação da concentração plasmática de ácidos

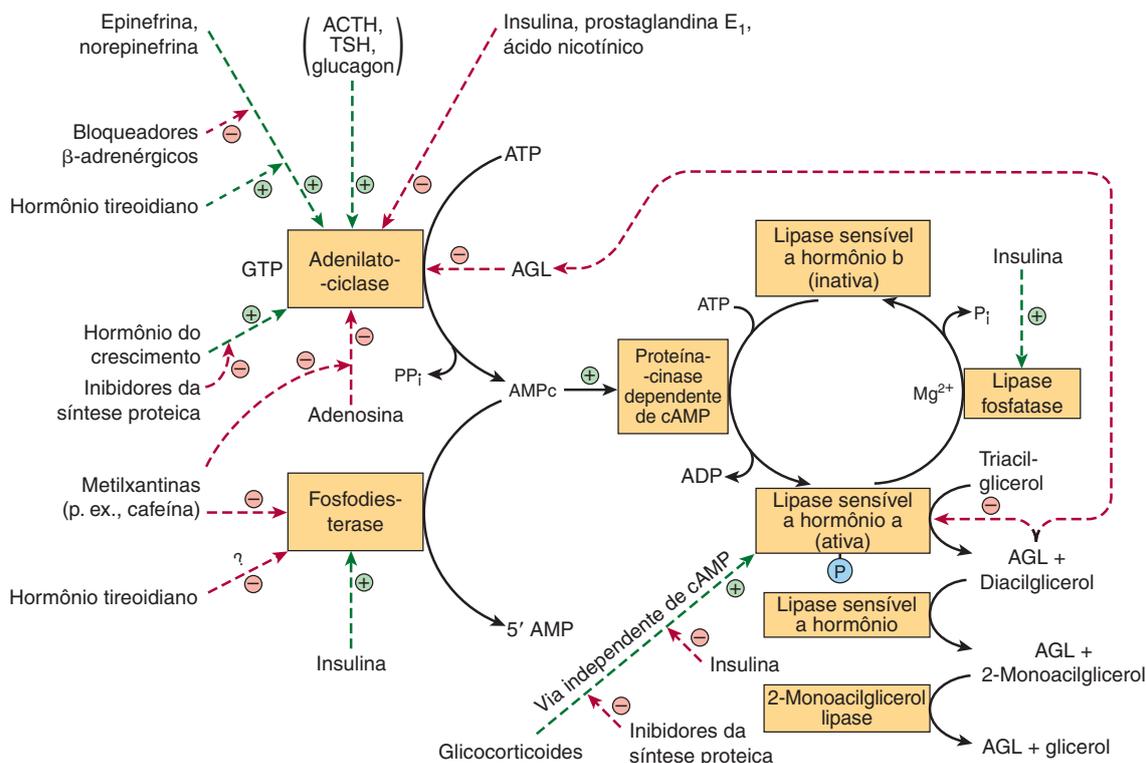


FIGURA 25-8 Controle da lipólise do tecido adiposo. (AGL, ácidos graxos livres; TSH, hormônio estimulante da tireoide.) Observe uma sequência de reações em cascata, produzindo amplificação em cada etapa. O estímulo lipolítico é “desligado” pela remoção do hormônio estimulante; pela ação da lipase-fosfatase; pela inibição da lipase e da adenilato-ciclase, por altas concentrações de AGL; pela inibição da adenilato-ciclase pela adenosina; e pela remoção do cAMP em decorrência da ação da fosfodiesterase. ACTH, TSH e glucagon podem não ativar a adenilato-ciclase *in vivo*, visto que a concentração necessária *in vitro* de cada hormônio é muito maior do que a encontrada na circulação. Os efeitos reguladores positivo (⊕) e negativo (⊖) são representados pelas linhas tracejadas, e o fluxo de substrato, pelas linhas sólidas.

graxos livres ao aumentar a taxa de lipólise das reservas de triacilglicerol (Figura 25-8). Esses hormônios incluem a **epinefrina**, a **norepinefrina**, o **glucagon**, o **hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)**, os **hormônios estimulantes de melanócitos (MSHs) α e β** , o **hormônio estimulante da tireoide (TSH)**, o **hormônio do crescimento (GH)** e a **vasopressina**. Muitos desses hormônios ativam a lipase sensível a hormônio. Para produzir o melhor efeito, a maioria desses processos lipolíticos requer a presença de **glicocorticoides** e **hormônios tireoidianos**. Esses hormônios atuam com capacidade **facilitadora** ou **permissiva** em relação a outros fatores endócrinos lipolíticos.

Os hormônios que atuam rapidamente na ativação da lipólise, isto é, as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), estimulam, para isso, a atividade da **adenilato-ciclase**, a enzima que converte ATP em cAMP. O mecanismo é análogo ao responsável pela estimulação hormonal da glicogenólise (ver Capítulo 18). O cAMP, ao estimular a **proteína-cinase dependente de cAMP**, ativa a lipase sensível a hormônio. Portanto, os processos que destroem ou preservam o cAMP influenciam a lipólise. O cAMP é degradado a 5'-AMP pela enzima **3',5'-nucleotídeo cíclico fosfodiesterase**. Essa enzima é inibida pelas metilxantinas, como a **caféina** e a **teofilina**. A **insulina** antagoniza os efeitos dos hormônios lipolíticos. A lipólise parece ser mais sensível a alterações na concentração de insulina do que a utilização da glicose e a

esterificação. Os efeitos antilipolíticos da insulina, do ácido nicotínico e da prostaglandina E_1 são explicados pela inibição da síntese de cAMP no sítio da adenilato-ciclase, atuando por meio de uma proteína G_i . A insulina também estimula a fosfodiesterase e a lipase-fosfatase que inativa a lipase sensível a hormônio. O efeito do hormônio do crescimento na promoção da lipólise depende da síntese de proteínas envolvidas na formação de cAMP. Os glicocorticoides promovem a lipólise pela síntese de nova proteína lipase por via independente de cAMP, que pode ser inibida pela insulina, bem como pela promoção da transcrição de genes envolvidos na cascata de sinalização do cAMP. Esses achados ajudam a explicar o papel da hipófise e do córtex da glândula suprarrenal no aumento da mobilização da gordura. O sistema nervoso simpático, por meio da liberação de norepinefrina no tecido adiposo, desempenha papel central na mobilização de AGL. Por conseguinte, o aumento da lipólise causado por muitos dos fatores anteriormente descritos pode ser reduzido ou abolido por desnervação do tecido adiposo ou por bloqueio ganglionar.

A perilipina regula o equilíbrio entre o armazenamento de triacilglicerol e a lipólise nos adipócitos

A **perilipina**, proteína envolvida na formação de gotículas de lipídeos nos adipócitos, inibe a lipólise em condições basais,

impedindo o acesso das enzimas lipases aos triacilgliceróis armazenados. No entanto, à estimulação com hormônios que promovem a degradação de triacilglicerol, a proteína torna-se fosforilada e altera sua conformação, expondo a superfície da gota lipídica à lipase sensível a hormônio, promovendo, assim, a lipólise. Por isso, a perilipina permite que o armazenamento e a degradação dos triacilgliceróis sejam coordenados de acordo com as necessidades metabólicas do corpo.

O tecido adiposo humano pode não ser um local importante de lipogênese

No tecido adiposo, não ocorre incorporação significativa da glicose ou do piruvato em ácidos graxos de cadeia longa; a ATP-citrato liase, uma enzima-chave na lipogênese, não parece estar presente, e outras enzimas lipogênicas – por exemplo, a glicose-6-fosfato-desidrogenase e a enzima málica – não sofrem alterações adaptativas. De fato, foi sugerido que, nos seres humanos, existe uma “**síndrome de excesso de carboidrato**”, devida à limitação singular na capacidade de processar o excesso de carboidratos pela lipogênese. Nas aves, a lipogênese é restrita ao fígado, onde é particularmente importante no fornecimento de lipídeos para a formação dos ovos, estimulada pelos estrogênios.

O TECIDO ADIPOSEO MARRON PROMOVE TERMOGÊNESE

O tecido adiposo marrom está envolvido no metabolismo, particularmente nas ocasiões em que há necessidade de geração de calor. Assim, esse tecido é extremamente ativo em algumas espécies; por exemplo, no término da hibernação em animais expostos ao frio (termogênese sem calafrios) e na produção de calor no recém-nascido. Embora não seja um tecido proeminente nos seres humanos, o tecido adiposo marrom está presente em indivíduos normais, onde pode ser responsável pela “**termogênese induzida pela dieta**”. É notável observar que o tecido adiposo marrom está reduzido ou ausente nos indivíduos obesos. O tecido caracteriza-se por suprimento sanguíneo bem desenvolvido e alto conteúdo de mitocôndrias e citocromos, mas baixa atividade de ATP-sintase. A ênfase metabólica está na oxidação da glicose e dos ácidos graxos. A **norepinefrina** liberada a partir das terminações nervosas simpáticas é importante para aumentar a lipólise nesse tecido e para aumentar a síntese da lipase lipoproteica, de modo a intensificar a utilização das lipoproteínas ricas em triacilglicerol presentes na circulação. A oxidação e a fosforilação não estão acopladas nas mitocôndrias desse tecido, e a fosforilação que ocorre é observada no nível do substrato, por exemplo, na etapa da succinato-tiocinase e na glicólise. Desse modo, **a oxidação produz muito calor, e pouca energia livre é retida no ATP**. Uma proteína desacopladora termogênica, a **termogenina**, atua como via de condutância de prótons, dissipando o potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial (Figura 25-9).

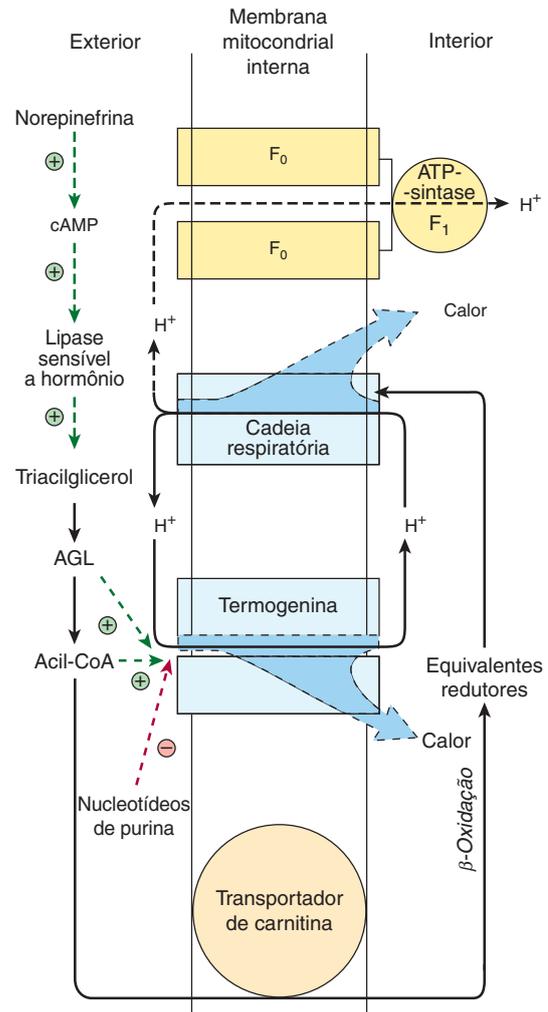


FIGURA 25-9 Termogênese no tecido adiposo marrom. Além do transporte de prótons, a atividade da cadeia respiratória também produz calor (Capítulo 13). Esses prótons dissipam mais calor quando retornam ao compartimento mitocondrial interno via termogenina, em vez de passar pela ATP-sintase F_1 , a via que gera ATP (ver Figura 13-7). A passagem de H^+ via termogenina é inibida por nucleotídeos de purina quando o tecido adiposo marrom não é estimulado. Sob influência da norepinefrina, a inibição é removida pela produção de ácidos graxos livres (AGL) e acil-CoA. Observe a função dupla do acil-CoA, facilitando a atividade da termogenina e fornecendo equivalentes redutores para a cadeia respiratória. \oplus e \ominus significam efeitos reguladores positivos e negativos.

RESUMO

- Por serem insolúveis em água, os lipídeos apolares combinam-se, para o seu transporte entre os tecidos no plasma aquoso do sangue, com lipídeos anfipáticos e com proteínas, formando lipoproteínas miscíveis em água.
- São reconhecidos quatro grupos principais de lipoproteínas. Os quilomírons transportam lipídeos resultantes da digestão e da absorção. As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) transportam triacilgliceróis provenientes do fígado. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) liberam colesterol nos tecidos, e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) removem o colesterol dos tecidos, devolvendo-o ao fígado para a sua excreção, no processo conhecido como transporte reverso do colesterol.

- Quilomícrons e VLDL são metabolizados pela hidrólise de seus triacilglicéris, e remanescentes das lipoproteínas são deixados na circulação. Esses remanescentes são captados pelo fígado, no entanto alguns desses remanescentes (IDL), resultantes das VLDL, formam LDL, que são captadas pelo fígado e por outros tecidos via receptor de LDL.
- As apolipoproteínas constituem a fração proteica das lipoproteínas. Atuam como ativadores enzimáticos (p. ex., apo C-II e apo A-I) ou como ligantes de receptores celulares (p. ex., apo A-I, apo E e apo B-100).
- O triacilglicerol é o principal lipídeo de armazenamento no tecido adiposo. Com a sua mobilização, ocorre liberação de AGL e glicerol. Os AGL são fontes importantes de combustível.
- O tecido adiposo marrom constitui o local da “termogênese sem calafrios”. Esse tecido é encontrado em animais que hibernam e em animais recém-nascidos; nos seres humanos, está presente em pequenas quantidades. A termogênese resulta da presença de uma proteína desacopladora, a termogenina, na membrana mitocondrial interna.

REFERÊNCIAS

- Arner P: Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:471.
- Brasaemle DL: Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 2007;48:2547.
- Fielding CJ, Fielding PE: Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;533–554.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR: Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:129.
- Goldberg IJ, Merkel M: Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry and molecular biology. *Front Biosci* 2001;6:D388.
- Lass A, Zimmermann R, Oberer M, et al: Lipolysis—a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* 2011;50:14.
- Lenz A, Diamond FB: Obesity: the hormonal milieu. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:9.
- Redgrave TG: Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* 2004;32:79.
- Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM, et al: Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2008;14:2474.
- Schulz TJ, Tseng YH: Brown adipose tissue, development, metabolism and beyond. *Biochem J* 2013;453:167.
- Vance JE, Adeli K: Assembly and secretion of triacylglycerol-rich lipoproteins. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008;507–532.

Síntese, transporte e excreção do colesterol

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a importância do colesterol como componente estrutural essencial das membranas celulares e como precursor de todos os outros esteroides no organismo, e explicar o seu papel patológico na doença dos cálculos biliares de colesterol e no desenvolvimento da aterosclerose.
- Identificar as cinco etapas na biossíntese do colesterol a partir da acetil-CoA.
- Compreender o papel da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase (HMG-CoA-redutase) no controle da taxa de síntese do colesterol e explicar os mecanismos pelos quais a sua atividade é regulada.
- Reconhecer que o equilíbrio do colesterol nas células é rigorosamente regulado e indicar os fatores envolvidos na manutenção do equilíbrio correto.
- Explicar o papel das lipoproteínas plasmáticas, incluindo os quilomícrons, a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL), no transporte do colesterol entre os tecidos e o plasma.
- Citar os dois principais ácidos biliares primários encontrados nos mamíferos, descrever de modo sucinto as vias pelas quais são sintetizados a partir do colesterol no fígado e compreender o papel da colesterol 7 α -hidroxilase na regulação do processo.
- Reconhecer a importância da síntese de ácidos biliares não apenas na digestão e na absorção das gorduras, mas também como importante via de excreção do colesterol.
- Indicar como os ácidos biliares secundários são produzidos a partir dos ácidos biliares primários pelas bactérias intestinais.
- Explicar o que se entende por “circulação êntero-hepática” e por que ela é importante.
- Identificar os fatores de estilo de vida que influenciam as concentrações plasmáticas de colesterol e que afetam, portanto, o risco de doença coronariana.
- Compreender que a classe de lipoproteínas na qual o colesterol é transportado é importante para a determinação dos efeitos do colesterol plasmático sobre o desenvolvimento da aterosclerose, sendo os níveis elevados de VLDL ou LDL deletérios, ao passo que os níveis elevados de HDL são benéficos.
- Citar exemplos de distúrbios hereditários e não hereditários que afetam o metabolismo das lipoproteínas, causando hipo ou hiperlipoproteinemia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O **colesterol** está presente nos tecidos e no plasma na forma de colesterol livre ou em combinação com um ácido graxo de cadeia longa, na forma de éster de colesteril, sua forma de armazenamento. No plasma, ambas as formas são transportadas em lipoproteínas (ver Capítulo 25). O colesterol é um lipídeo anfipático e, desse modo, um componente estrutural essencial das membranas, onde é importante na manutenção da permeabilidade e da fluidez apropriadas, bem como da camada externa das lipoproteínas plasmáticas. É sintetizado em muitos tecidos a partir de acetil-CoA e constitui o precursor de todos os outros esteroides no organismo, incluindo os **corticosteroides**, os **hormônios sexuais**, os **ácidos biliares** e a **vitamina D**. Como produto típico do metabolismo animal, o colesterol é encontrado nos alimentos de origem animal, como a gema do ovo, a carne, o fígado e o cérebro. A **lipoproteína de baixa densidade (LDL)** do plasma é o veículo que fornece o colesterol e o éster de colesteril em muitos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela **lipoproteína de alta densidade (HDL)** plasmática e transportado até o fígado, onde é eliminado do organismo em sua forma inalterada ou após conversão em ácidos biliares por um processo conhecido como **transporte reverso do colesterol** (ver Capítulo 25). O colesterol é um importante constituinte dos **cálculos biliares**. Entretanto, seu principal papel em processos patológicos consiste em atuar como fator na gênese da **aterosclerose** de artérias vitais, causando doença vascular cerebral, coronariana e periférica.

O COLESTEROL É BIOSINTETIZADO A PARTIR DE ACETIL-COA

Pouco mais da metade do colesterol do organismo se origina por síntese (cerca de 700 mg/dia), ao passo que o restante provém da dieta normal. Nos seres humanos, o fígado e o intestino são responsáveis, cada um, por cerca de 10% da síntese total. Praticamente todos os tecidos que contêm células nucleadas são capazes de efetuar a síntese de colesterol, que ocorre no retículo endoplasmático e nos compartimentos citosólicos.

A acetil-CoA constitui a fonte de todos os átomos de carbono do colesterol

O colesterol é um composto de 27 carbonos, consistindo em quatro anéis e uma cadeia lateral (ver Figura 21-20). Ele é sintetizado a partir de acetil-CoA por uma longa via que pode ser dividida em cinco etapas: (1) síntese do **mevalonato** a partir da acetil-CoA (**Figura 26-1**); (2) formação de **unidades isoprenoídes** a partir do mevalonato com a perda de CO₂ (**Figura 26-2**); (3) condensação de seis unidades isoprenoídes para formar o **esqualeno** (**Figura 26-2**); (4) ciclização do esqualeno, dando origem ao esteroide parental, o **lanosterol**; (5) formação do colesterol a partir do lanosterol (**Figura 26-3**).

Etapa 1 – Biossíntese do mevalonato: o HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA) é formado pelas reações utilizadas na mitocôndria para sintetizar os corpos cetônicos (ver Figura 22-7). Entretanto, como a síntese do colesterol é extramitocondrial, as duas vias são distintas. Inicialmente,

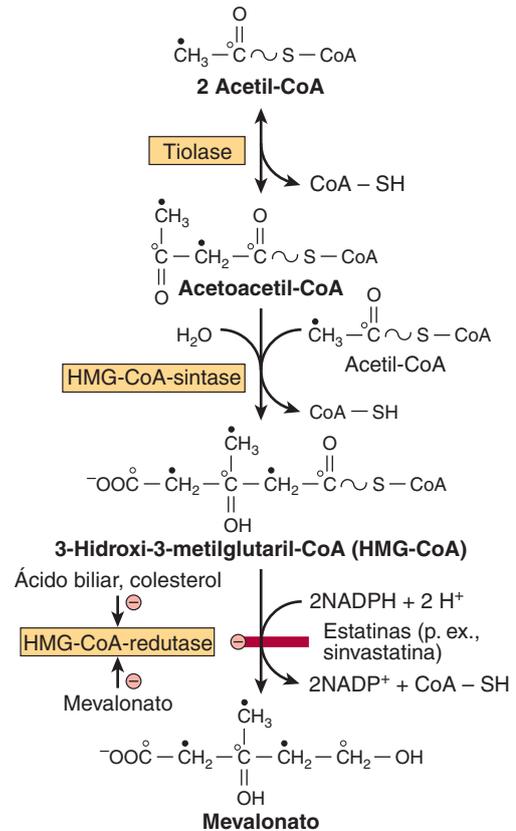


FIGURA 26-1 Biossíntese do mevalonato. A HMG-CoA-redutase é inibida pelas estatinas. Os pequenos círculos abertos e fechados indicam o destino de cada um dos carbonos na porção acetil da acetil-CoA.

ocorre condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, em uma reação catalisada pela **tiolase** citosólica. O acetoacetil-CoA condensa-se com outra molécula de acetil-CoA em outra reação catalisada pela **HMG-CoA-sintase**, com formação de HMG-CoA, que é reduzida a **mevalonato** pelo NADPH, em uma reação catalisada pela **HMG-CoA-redutase**. Esta última etapa constitui a principal etapa reguladora na via de síntese do colesterol e o local de ação da classe mais efetiva de fármacos redutores do colesterol, as estatinas, que são inibidores da HMG-CoA-redutase (**Figura 26-1**).

Etapa 2 – Formação das unidades isoprenoídes: o mevalonato é fosforilado sequencialmente por três cinases utilizando o ATP e, após descarboxilação (**Figura 26-2**), ocorre a formação da unidade isoprenoíde ativa, o **isopentenil-difosfato**.

Etapa 3 – Formação do esqualeno a partir de seis unidades isoprenoídes: o isopentenil-difosfato é isomerizado por um deslocamento da dupla ligação para formar **dimetilalil-difosfato** e, em seguida, condensado com outra molécula de isopentenil-difosfato, com formação do intermediário de 10 carbonos, o **geranyl-difosfato** (**Figura 26-2**). Uma condensação adicional com isopentenil-difosfato forma o **farnesil-difosfato**. Duas moléculas de farnesil-difosfato condensam-se na extremidade difosfato, formando o **esqualeno**. Inicialmente, o pirofosfato inorgânico é eliminado, resultando no

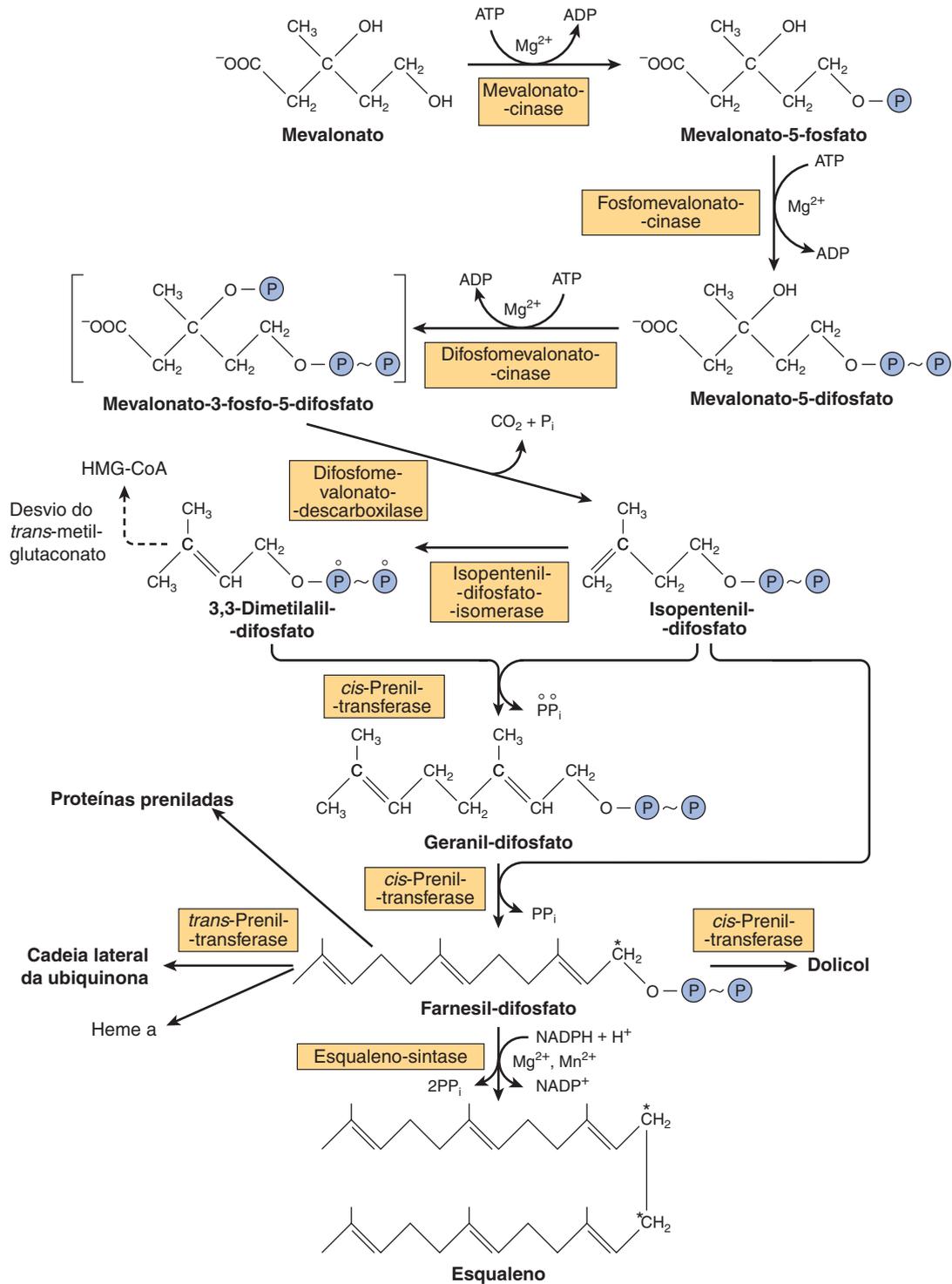


FIGURA 26-2 Biossíntese do esqualeno, da ubiquinona, do dolicol e de outros derivados poli-isoprênicos. Um resíduo farnesil está presente no heme a da citocromo-oxidase. O carbono marcado com asterisco torna-se o C₁₁ ou o C₁₂ no esqualeno. A esqualeno-sintase é uma enzima microssomal; todas as outras enzimas indicadas são proteínas citosólicas solúveis, e algumas são encontradas nos peroxissomos. (HMG, 3-hidroxi-3-metilglutaril.)

pré-esqualeno-difosfato, que é então reduzido pelo NADPH, com eliminação de mais uma molécula de pirofosfato inorgânico.

Etapa 4 – Formação do lanosterol: o esqualeno pode dobrar-se em uma estrutura muito semelhante ao núcleo esteroide (Figura 26-3). Antes do fechamento do anel, o esqualeno

é convertido em esqualeno-2,3-epóxido por uma oxidase de função mista presente no retículo endoplasmático, a **esqualeno-epoxidase**. O grupo metil em C₁₄ é transferido para o C₁₃ e o do C₈ para o C₁₄ à medida que ocorre a ciclização, catalisada pela **oxidoesqualeno-lanosterol-ciclase**.

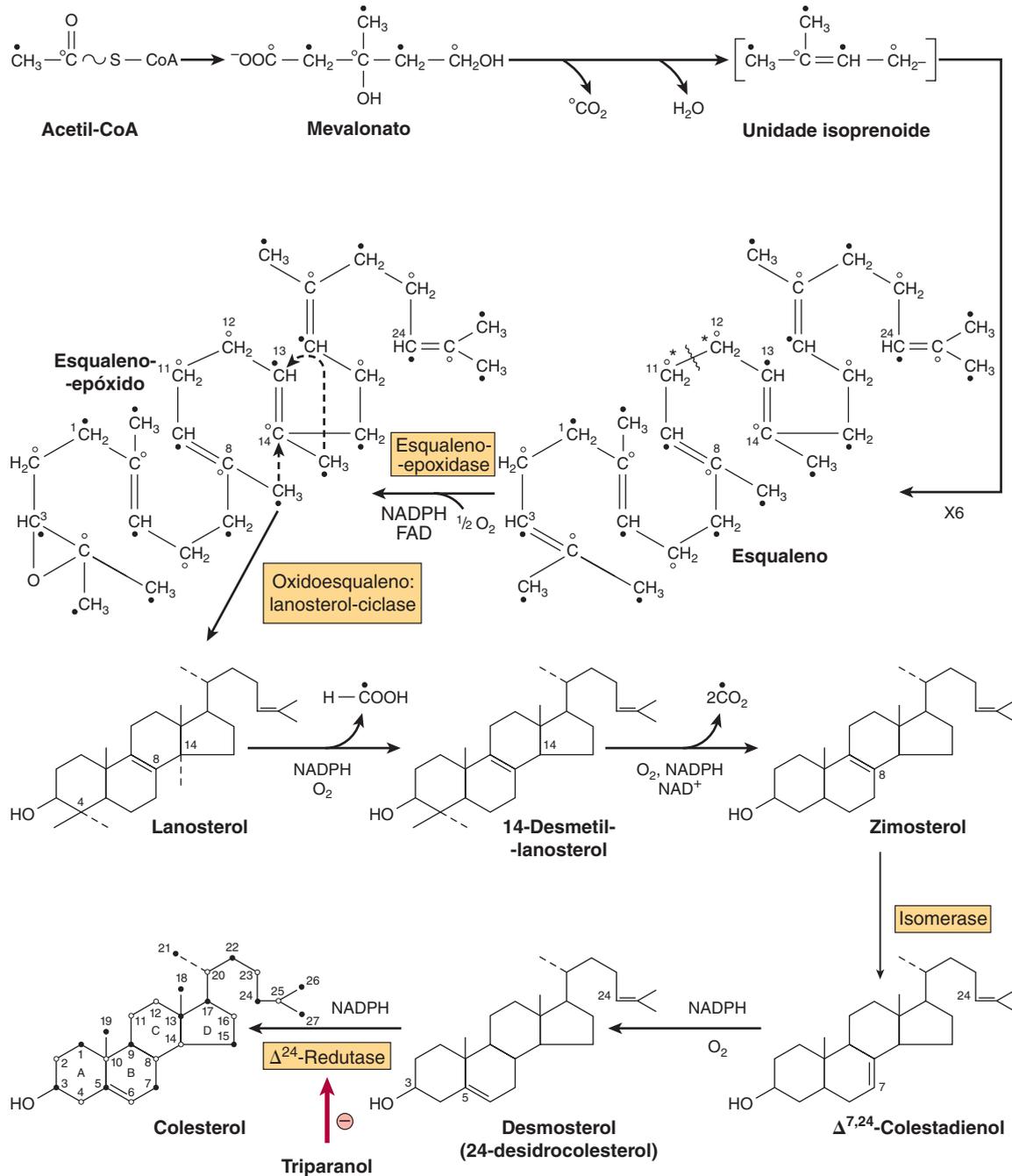


FIGURA 26-3 Biossíntese do colesterol. As posições numeradas correspondem ao núcleo esteróide, e os pequenos círculos abertos e fechados indicam o destino de cada um dos carbonos da fração acetil da acetil-CoA. (*Referem-se à numeração do esqualeno na Figura 26-2.)

Etapa 5 – Formação do colesterol: a formação do colesterol a partir do **lanosterol** ocorre nas membranas do retículo endoplasmático e envolve alterações no núcleo e na cadeia lateral do esteróide (Figura 26-3). Os grupos metilas em C_{14} e C_4 são removidos para formar 14-desmetil-lanosterol e, em seguida, zimosterol. Posteriormente, a dupla ligação em C_8-C_9 é transferida para C_5-C_6 em duas etapas, com formação do **desmosterol**. Por fim, a dupla ligação da cadeia lateral é reduzida, produzindo colesterol.

O farnesil-difosfato dá origem ao dolicol e à ubiquinona

Os poli-isoprenoídeos **dolicol** (ver Figura 21-23 e Capítulo 46) e **ubiquinona** (ver Figura 13-6) são formados a partir do farnesil-difosfato pelo acréscimo adicional de até 16 (dolicol) ou 3 a 7 (ubiquinona) resíduos isopentenil-difosfato (Figura 26-2). Algumas **proteínas de ligação ao GTP** na membrana celular são preniladas com resíduos de farnesil ou geranylgeranil

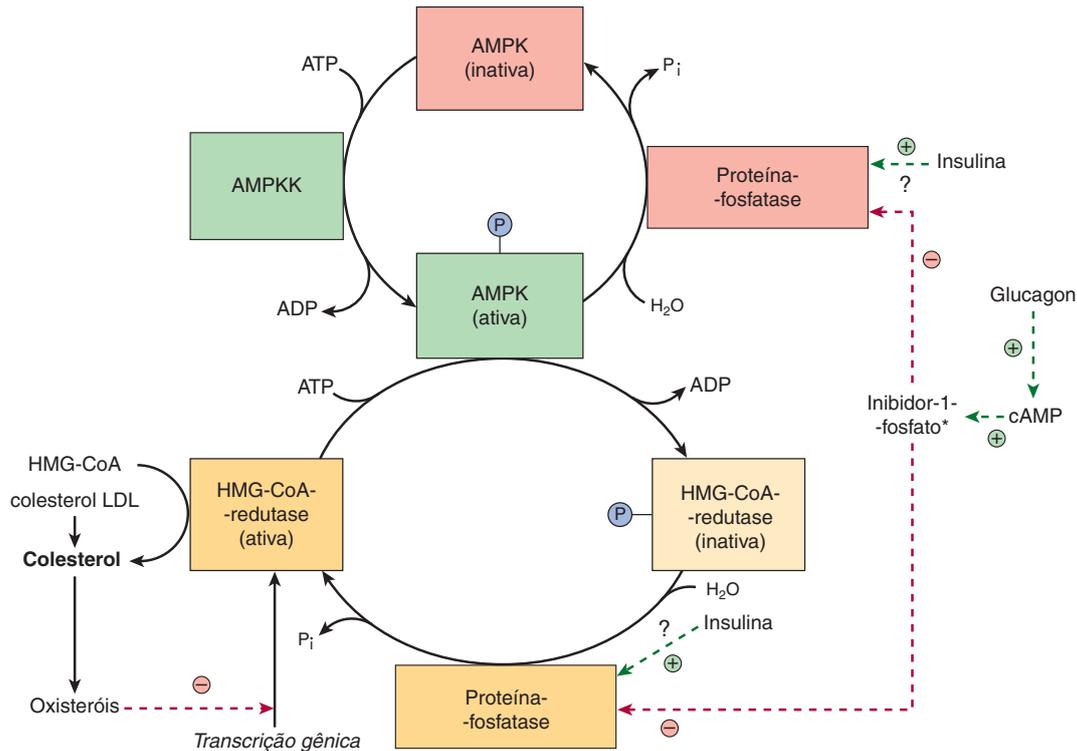


FIGURA 26-4 Possíveis mecanismos envolvidos na regulação da síntese de colesterol pela HMG-CoA-redutase. A insulina desempenha um papel dominante em comparação com o glucagon. (AMPK, proteína-cinase ativada por AMP; AMPKK, proteína-cinase ativada por AMP-cinase) *Ver Figura 18-6.

(20 carbonos). Acredita-se que a **prenilação proteica** facilite a ancoragem das proteínas em membranas lipídicas e também possa estar envolvida nas interações entre proteínas e no transporte de proteínas associadas à membrana.

A SÍNTESE DE COLESTEROL É CONTROLADA PELA REGULAÇÃO DA HMG-COA-REDUTASE

A regulação da síntese do colesterol é efetuada próximo ao início da via, na etapa da HMG-CoA-redutase. Nos animais em jejum prolongado, a síntese diminuída de colesterol é acompanhada de redução da atividade enzimática. Entretanto, o colesterol da dieta inibe apenas a síntese hepática. A HMG-CoA-redutase no fígado é inibida pelo mevalonato, o produto imediato da reação, e pelo colesterol, o principal produto da via. O colesterol e seus metabólitos reprimem a transcrição da HMG-CoA-redutase pela ativação de um fator de transcrição, a **proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP)**. As SREBPs constituem uma família de proteínas que regulam a transcrição de uma gama de genes envolvidos na captação e no metabolismo celular do colesterol e de outros lipídeos. A ativação da SREBP é inibida pela **Insig** (gene induzido por insulina), uma proteína cuja expressão, como o nome indica, é induzida por insulina e está presente no retículo endoplasmático. A Insig também promove a degradação da HMG-CoA-redutase. Tanto a síntese de colesterol quanto a atividade da redutase exibem **variação diurna**. Além desses

mecanismos envolvidos na regulação da taxa de síntese/degradação proteica, a atividade enzimática também é modulada mais rapidamente por modificação pós-traducional (**Figura 26-4**). A **insulina** ou o **hormônio tireoideano** aumentam a atividade da HMG-CoA-redutase, ao passo que o **glucagon** ou os **glicocorticoides** a diminuem. A atividade enzimática é reversivelmente modificada pelos mecanismos de fosforilação-desfosforilação, alguns dos quais podem ser dependentes de cAMP e, portanto, imediatamente responsivos ao glucagon. A **proteína-cinase ativada por AMP (AMPK)** (antes chamada de HMG-CoA-redutase-cinase) fosforila e inativa a HMG-CoA-redutase. A AMPK é ativada por fosforilação pela **AMPK-cinase (AMPKK)** e por modificação alostérica pelo AMP. As tentativas de reduzir o colesterol plasmático nos seres humanos ao diminuir a quantidade de colesterol na dieta produzem resultados variáveis. Em geral, uma redução de 100 mg do colesterol dietético produz uma redução de aproximadamente 0,13 mmol/L na concentração sérica.

MUITOS FATORES INFLUENCIAM O EQUILÍBRIO DO COLESTEROL NOS TECIDOS

Nos tecidos, o equilíbrio do colesterol é regulado como descrito a seguir (**Figura 26-5**). O aumento do colesterol celular é causado pela captação de lipoproteínas contendo colesterol pelos receptores, como o receptor de LDL ou o receptor *scavenger*; pela captação do colesterol livre das lipoproteínas ricas

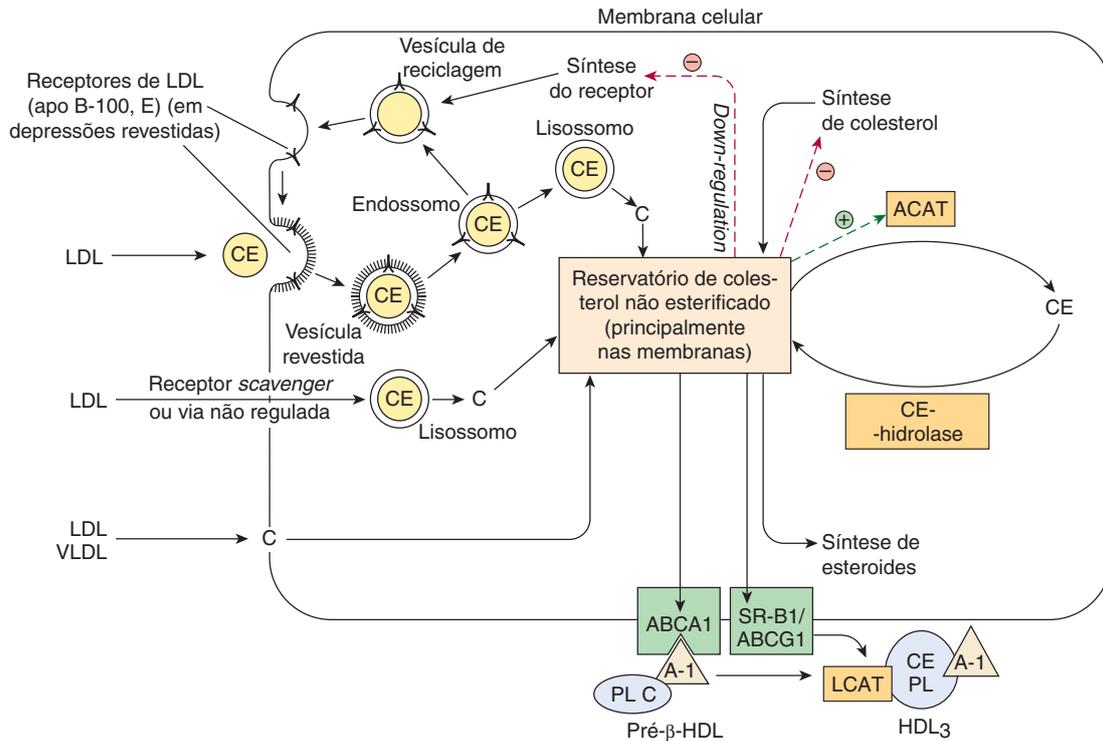


FIGURA 26-5 Fatores que afetam o equilíbrio do colesterol a nível celular. O transporte reverso do colesterol pode ser mediado pela proteína transportadora ABCA-1 (com a pré-β-HDL atuando comoceptor exógeno) ou SR-B1 ou ABCG-1 (com HDL₃ atuando comoceptor exógeno). (C, colesterol; CE, éster de colesterol; PL, fosfolípido; ACAT, acil-CoA:colesterol-aciltransferase; LCAT, lecitina:colesterol-aciltransferase; A-I, apolipoproteína A-I; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.) A LDL e a HDL não estão representadas em escala.

em colesterol pela membrana celular; pela síntese de colesterol; e pela hidrólise dos ésteres de colesterol pela enzima **éster de colesterol-hidrolase**. A redução é produzida pelo efluxo do colesterol da membrana para as HDLs por meio de ABCA1, ABCG1 ou SR-B1 (ver Figuar 25-5); por esterificação do colesterol pela **ACAT** (acil-CoA:colesterol-aciltransferase); e pela utilização do colesterol para a síntese de outros esteróides, como hormônios, ou de ácidos biliares no fígado.

O receptor de LDL é altamente regulado

Os receptores de LDL (apo B-100, E) ocorrem na superfície celular, em cavidades revestidas no lado citosólico da membrana celular por uma proteína denominada **clatrina**. O receptor de glicoproteína estende-se por toda a membrana, com a região de ligação a B-100 localizada na extremidade aminoterminal exposta. Após a ligação, a LDL é captada de modo inalterado por **endocitose**. A seguir, a apoproteína e o éster de colesterol são hidrolisados nos lisossomos, e o colesterol é transferido para dentro da célula. Os receptores são reciclados e retornam à superfície celular. Esse influxo de colesterol inibe a transcrição dos genes que codificam a HMG-CoA-sintase, a HMG-CoA-redutase e outras enzimas envolvidas na síntese do colesterol, bem como o próprio receptor de LDL por meio da via da SREBP e, dessa forma, suprime de modo coordenado a síntese e a captação do colesterol. Além disso, a atividade da ACAT é estimulada, promovendo a esterificação do colesterol. Pesquisas recentes mostraram que a proteína **pró-proteína-convertase-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9)**

regula a reciclagem do receptor para a superfície celular, direcionando-o para degradação. Por esses mecanismos, a atividade do receptor de LDL na superfície da célula é regulada pela necessidade de colesterol para as membranas, para a síntese dos hormônios esteróides ou de ácido biliar, e o conteúdo de colesterol livre da célula é mantido em limites relativamente estreitos (Figura 26-5).

O COLESTEROL É TRANSPORTADO ENTRE OS TECIDOS EM LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

O colesterol é transportado no plasma em lipoproteínas, a maior parte na forma de éster de colesterol (**Figura 26-6**) e, em seres humanos, a maior proporção é encontrada nas LDLs. O colesterol da dieta entra em equilíbrio com o colesterol plasmático dentro de alguns dias e com o colesterol tecidual em algumas semanas. O éster de colesterol presente na dieta é hidrolisado em colesterol, que é, então, absorvido pelo intestino, junto com o colesterol não esterificado e outros lipídeos da dieta. Com o colesterol sintetizado no intestino, ele é incorporado, a seguir, nos quilomícrons (ver Capítulo 25). Do colesterol absorvido, 80 a 90% são esterificados com ácidos graxos de cadeia longa na mucosa intestinal. Noventa e cinco por cento do colesterol dos quilomícrons é liberado para o fígado em quilomícrons remanescentes, e a maior parte do colesterol secretado pelo fígado nas VLDLs é retido durante a formação das lipoproteínas

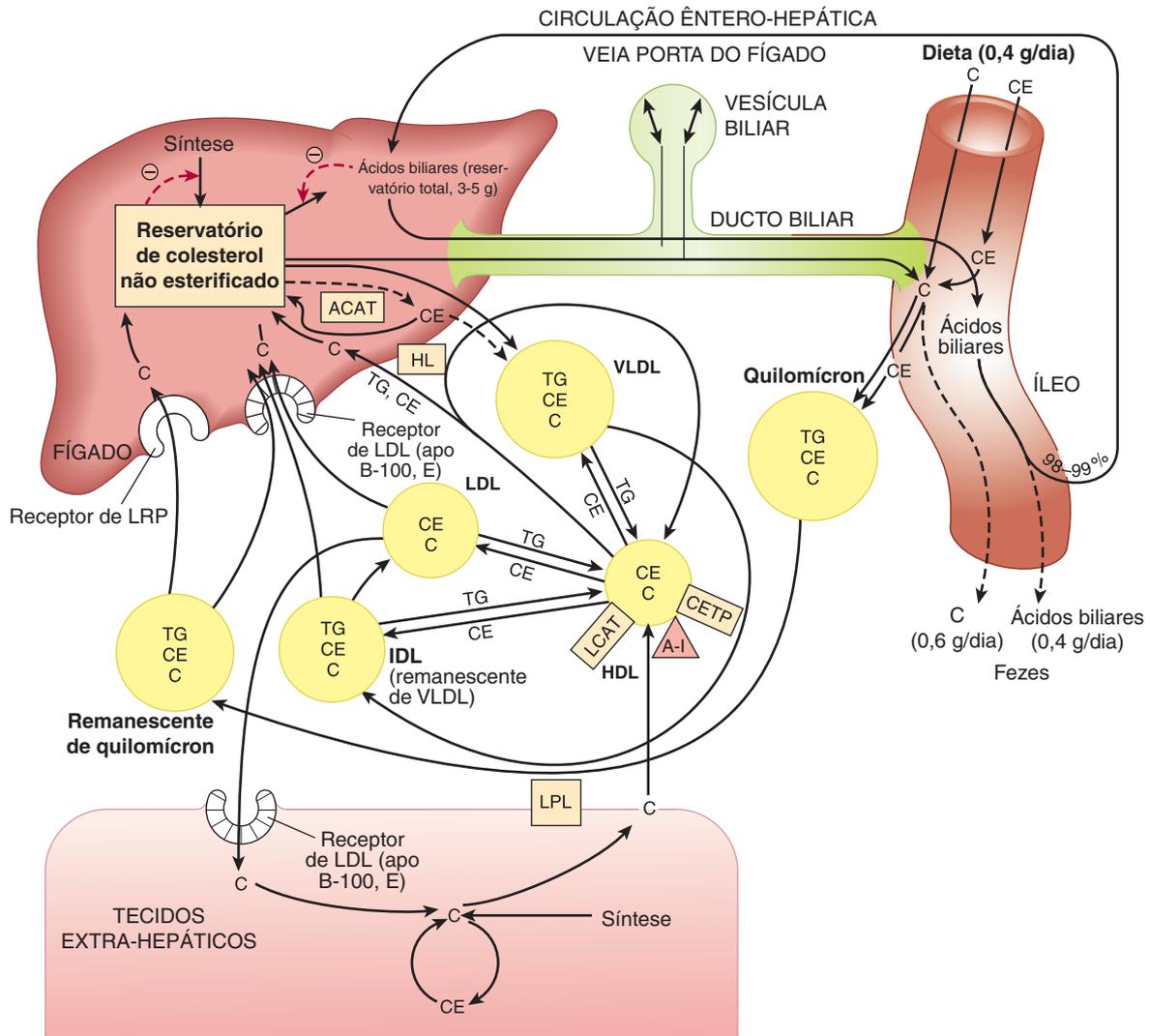


FIGURA 26-6 Transporte do colesterol entre os tecidos nos seres humanos. (ACAT, acil-CoA:colesterol-aciltransferase; C, colesterol não esterificado; CE, éster de colesterol; TG, triacilglicerol; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; LCAT, lecitina:colesterol-aciltransferase; A-I, apolipoproteína A-I; CETP, proteína de transferência de ésteres de colesterol; LPL, lipase lipoproteica; HL, lipase hepática; LRP, proteína relacionada ao receptor de LDL 1.)

de densidade intermediária (IDLs) e finalmente LDL, que é captada pelo receptor de LDL no fígado e nos tecidos extra-hepáticos (ver Capítulo 25).

A lecitina:colesterol-aciltransferase plasmática é responsável pela formação de quase todo o éster de colesterol plasmático nos seres humanos

A atividade da **lecitina:colesterol-aciltransferase (LCAT)** está associada à HDL, que contém apo A-I. À medida que o colesterol da HDL se torna esterificado, ele gera um gradiente de concentração que atrai o colesterol presente nos tecidos e em outras lipoproteínas (Figuras 26-5 e 26-6), permitindo, assim, que a HDL funcione no **transporte reverso do colesterol** (ver Figura 25-5).

A proteína de transferência de éster de colesterol facilita a transferência do éster de colesterol das HDLs para outras lipoproteínas

A **proteína de transferência de éster de colesterol**, que está associada à HDL, é encontrada no plasma em seres humanos e muitas outras espécies. Essa proteína facilita a transferência do éster de colesterol da HDL para a VLDL, a IDL e a LDL em troca de triacilglicerol, aliviando a inibição pelo produto da atividade da LCAT na HDL. Por isso, nos seres humanos, grande parte do éster de colesterol formado pela LCAT alcança o fígado por meio dos remanescentes de VLDL (IDL) ou LDL (Figura 26-6). A HDL₂ enriquecida com triacilglicerol libera o seu colesterol no fígado no ciclo da HDL (ver Figura 25-5).

O COLESTEROL É EXCRETADO DO ORGANISMO NA BILE COMO COLESTEROL OU ÁCIDOS BILIARES (SAIS)

O colesterol é excretado pelo organismo através da bile, na forma não esterificada ou após conversão em ácidos biliares no fígado. O **coprostanol** é o principal esteroide encontrado nas fezes e é formado a partir do colesterol pelas bactérias presentes na parte distal do intestino.

Os ácidos biliares são formados a partir do colesterol

Os **ácidos biliares primários** são sintetizados no fígado a partir do colesterol. São eles: ácido cólico (encontrado em maior quantidade na maioria dos mamíferos) e **ácido quenodesoxicólico** (Figura 26-7). A 7α -hidroxilação do colesterol é a primeira

e a principal etapa reguladora na biossíntese de ácidos biliares e é catalisada pela **colesterol 7α -hidroxilase**, uma enzima microsomal do citocromo P450 (ver Capítulo 12) designada **CYP7A1**. Essa enzima, que é uma monoxigenase típica, requer oxigênio, NADPH e citocromo P450. As etapas subsequentes de hidroxilação também são catalisadas por monoxigenases. A via de biossíntese dos ácidos biliares é dividida inicialmente em uma via que leva à formação de **colil-CoA**, caracterizada por um grupo α -OH adicional na posição 12, e em outra via que leva à produção de **quenodesoxicolil-CoA** (Figura 26-7). Uma segunda via mitocondrial envolvendo a 27 -hidroxilação do colesterol pela citocromo P450 **esterol- 27 -hidroxilase** (CYP27A1), como primeira etapa, é responsável por uma significativa proporção dos principais ácidos biliares sintetizados. Os ácidos biliares primários (Figura 26-7) entram na bile sob a forma de conjugados de glicina ou taurina. A conjugação ocorre nos peroxissomos hepáticos. Nos seres humanos, a razão entre os conjugados de glicina e taurina é normalmente de 3:1. Na bile alcalina

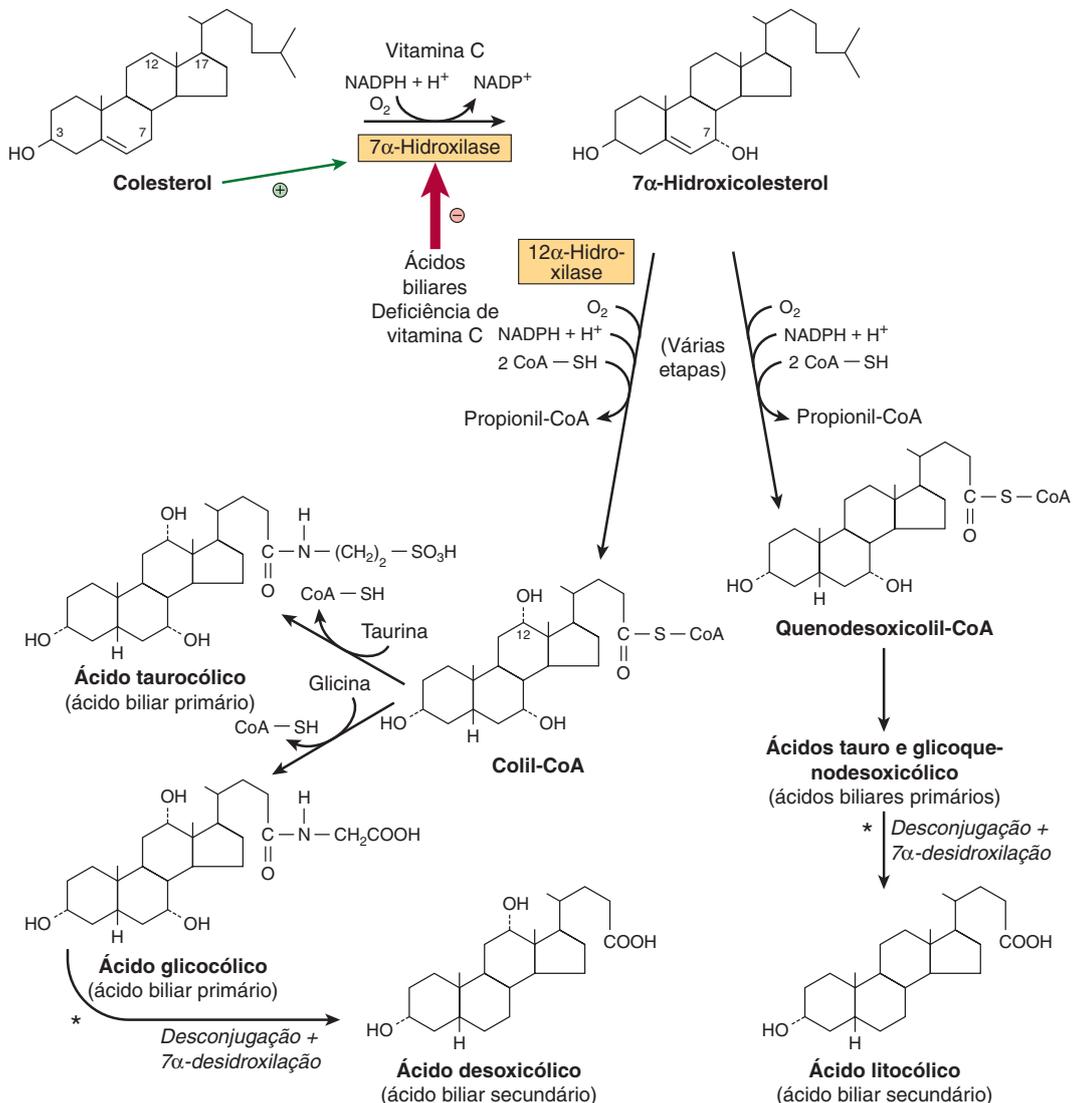


FIGURA 26-7 Biossíntese e degradação dos ácidos biliares. Uma segunda via presente nas mitocôndrias envolve a hidroxilação do colesterol pela esterol- 27 -hidroxilase. *Catalisada por enzimas microbianas.

(pH de 7,6 a 8,4), presume-se que os ácidos biliares e seus conjugados estejam na forma de sais – daí o termo “sais biliares”.

Os ácidos biliares primários são ainda metabolizados no intestino pela atividade das bactérias intestinais. Portanto, ocorrem desconjugação e 7 α -desidroxilação, produzindo os **ácidos biliares secundários**, o **ácido desoxicólico** e o **ácido litocólico**.

A maior parte dos ácidos biliares retorna ao fígado pela circulação êntero-hepática

Embora os produtos da digestão das gorduras, incluindo o colesterol, sejam absorvidos nos primeiros 100 cm do intestino delgado, os ácidos biliares primários e secundários são absorvidos quase exclusivamente no íleo, e 98 a 99% retornam ao fígado pela circulação portal. Esse processo é conhecido como **circulação êntero-hepática** (Figura 26-6). Entretanto, em virtude de sua insolubilidade, o ácido litocólico não é reabsorvido em quantidades significativas. Apenas uma fração pequena dos sais biliares escapa da absorção e, portanto, é eliminada nas fezes. Todavia, isso representa uma importante via de eliminação do colesterol. Diariamente, a mistura de ácidos biliares (cerca de 3-5 g) circula 6 a 10 vezes pelo intestino, e uma quantidade de ácidos biliares equivalente àquela perdida nas fezes é sintetizada a partir do colesterol, com conseqüente manutenção do reservatório de ácidos biliares de tamanho constante. Esse processo é obtido por um sistema de controle por retroalimentação.

A síntese de ácidos biliares é regulada na etapa da CYP7A1

A principal etapa limitadora da taxa de biossíntese de ácidos biliares é a **reação da CYP7A1** (Figura 26-7). A atividade dessa enzima é regulada por retroalimentação pelo receptor nuclear de ligação a ácidos biliares, o **receptor farnesoide X (FXR)**. Quando o tamanho do reservatório de ácidos biliares na circulação êntero-hepática aumenta, o FXR é ativado, e a transcrição do gene da CYP7A1 é suprimida. O ácido quenodesoxicólico é particularmente importante na ativação do FXR. A atividade de CYP7A1 também é aumentada pelo colesterol da dieta e de origem endógena e regulada pelos hormônios insulina, glucagon, glucocorticoides e tireoideanos.

ASPECTOS CLÍNICOS

O colesterol sérico está correlacionado à incidência de aterosclerose e doença à coronariana

A aterosclerose é uma doença inflamatória caracterizada pela deposição de colesterol e ésteres de colesterol das lipoproteínas plasmáticas nas paredes das artérias e é a principal causa de doenças cardíacas. Os níveis elevados de colesterol plasmático (> 5,2 mmol/L) são um dos fatores mais importantes na promoção da aterosclerose, mas atualmente se sabe que os níveis elevados de triacilgliceróis no sangue também constituem um fator de risco independente. As doenças nas quais existe elevação prolongada dos níveis de VLDL, IDL, remanescentes de quilomícrons ou LDL no sangue (p. ex., **diabetes melito [DM]**, **nefrose lipídica**, **hipotireoidismo** e **outras condições de hiperlipidemia**) são frequentemente acompanhadas de aterosclerose prematura ou mais grave. Existe também uma

relação inversa entre as concentrações de HDL (HDL₂) e doença coronariana, tornando a **razão colesterol LDL:HDL um parâmetro preditivo confiável**. Isso é compatível com a função das HDLs no transporte reverso do colesterol. A suscetibilidade à aterosclerose varia amplamente entre as espécies, e os seres humanos constituem uma das poucas espécies nas quais a doença pode ser induzida por dietas ricas em colesterol.

A dieta pode desempenhar um importante papel na redução do colesterol sérico

Os fatores hereditários desempenham o papel mais importante na determinação das concentrações séricas de colesterol no indivíduo; entretanto, os fatores nutricionais e ambientais também contribuem, e, dentre esses fatores, o mais benéfico consiste em substituir, na dieta, os ácidos graxos saturados por **ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados**. Os óleos vegetais, como óleo de milho e óleo de sementes de girassol, contêm alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados ω_6 , ao passo que o óleo de oliva contém alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados. Os ácidos graxos ω_3 encontrados nos óleos de peixe também são benéficos (ver Capítulo 21). Por outro lado, as gorduras da manteiga e da carne e o óleo de palma contêm elevada proporção de ácidos graxos saturados. A sacarose e a frutose exercem um maior efeito na elevação dos lipídeos sanguíneos, particularmente dos triacilgliceróis, em comparação com outros carboidratos.

Um dos mecanismos pelo qual os ácidos graxos insaturados reduzem os níveis do colesterol sanguíneo é pela **upregulation** de receptores de LDL na superfície celular por poli-insaturados e monoinsaturados quando comparados com ácidos graxos saturados, causando aumento da taxa catabólica do LDL, a principal lipoproteína aterogênica. Acredita-se que os ácidos graxos ω_3 sejam protetores devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e redutores de triacilgliceróis. Além disso, os ácidos graxos saturados levam à formação de partículas menores de VLDL, que contêm quantidades relativamente maiores de colesterol e são utilizadas pelos tecidos extra-hepáticos em uma taxa mais lenta do que as partículas maiores – tendência que pode ser considerada aterogênica.

O estilo de vida afeta os níveis séricos de colesterol

Outros fatores que parecem desempenhar um papel na doença coronariana incluem a **hipertensão arterial**, o **tabagismo**, o **sexo masculino**, a **obesidade** (sobretudo a **obesidade abdominal**), a **falta de exercícios físicos** e a **ingestão de água mole, em vez de água dura**. Os fatores associados com a elevação dos AGL plasmáticos, seguida de aumento da liberação de triacilglicerol e colesterol na circulação, na forma de VLDL, incluem **estresse emocional** e **consumo de café**. As mulheres na pré-menopausa parecem estar protegidas de muitos desses fatores deletérios, e acredita-se que essa proteção esteja relacionada com os efeitos benéficos do **estrogênio**. Existe uma associação entre o **consumo moderado de álcool** e a menor incidência de doença coronariana. Isso pode ser atribuído à elevação das concentrações de HDL em decorrência da síntese aumentada de apo A-I e de alterações na atividade da proteína de transferência de éster de colesterol. Acredita-se que o vinho tinto seja particularmente benéfico, talvez em virtude de seu teor

de antioxidantes. A prática regular de exercícios físicos reduz os níveis plasmáticos de LDL e aumenta os níveis de HDL. As concentrações de triacilgliceróis também são reduzidas, provavelmente devido ao aumento da sensibilidade à insulina, que intensifica a expressão da lipase lipoproteica.

Quando as mudanças nos hábitos alimentares falham, os fármacos hipolipidêmicos podem reduzir os níveis séricos de colesterol e triacilglicerol

Uma família de fármacos conhecidos como **estatinas** demonstrou ser altamente eficaz na redução do colesterol plasmático e na prevenção da doença cardíaca. As estatinas atuam pela inibição da HMG-CoA-redutase e por *upregulation* da atividade dos receptores de LDL. **Atorvastatina**, **sinvastatina**, **fluvastatina** e **pravastatina** são exemplos de fármacos dessa família atualmente em uso. A **ezetimiba** reduz os níveis sanguíneos de colesterol ao inibir a sua absorção pelo intestino por meio do bloqueio da

captação pela **proteína semelhante a Niemann-Pick C1**. Outros fármacos utilizados incluem os fibratos, como o **clofibrato**, a **genfibrozila** e o **ácido nicotínico**, que atuam principalmente na redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis ao diminuir a secreção hepática de VLDL contendo triacilglicerol e colesterol. Como PCSK9 reduz o número de receptores de LDL expostos na membrana celular, ele tem o efeito de elevar os níveis de colesterol no sangue; assim, os medicamentos que inibem sua atividade são potencialmente antiaterogênicos, e vários desses compostos estão atualmente em estudos clínicos.

Os distúrbios primários das lipoproteínas plasmáticas (dislipoproteinemias) são hereditários

Os defeitos hereditários no metabolismo das lipoproteínas levam à condição primária de **hipolipoproteinemia** ou **hiperlipoproteinemia** (Tabela 26-1). Por exemplo, a **hipercolesterolemia familiar (HF)** causa hipercolesterolemia grave e também

TABELA 26-1 Distúrbios primários das lipoproteínas plasmáticas (dislipoproteinemias)

Nome	Defeito	Comentários
Hipolipoproteinemias Abetalipoproteinemia	Não há formação de quilomícrons, VLDL ou LDL, devido a um defeito na ligação da apo B aos lipídeos.	Rara; os níveis sanguíneos de acilgliceróis são baixos; o intestino e o fígado acumulam acilgliceróis. Má absorção intestinal. A morte precoce pode ser evitada pela administração de grandes doses de vitaminas lipossolúveis, sobretudo vitamina E.
Deficiência familiar de alfa-lipoproteína Doença de Tangier Doença do olho de peixe Deficiências de apo A-I	Todas apresentam níveis baixos ou quase ausentes de HDL.	Tendência à hipertriacilglicerolemia devida à ausência de apo C-II, causando inativação da LPL. Baixos níveis de LDL. Aterosclerose nos idosos.
Hiperlipoproteinemias Deficiência familiar de lipase lipoproteica (tipo I)	Hipertriacilglicerolemia devida à deficiência de LPL, LPL anormal ou deficiência de apo C-II resultando em inativação da LPL.	Depuração lenta dos quilomícrons e da VLDL. Baixos níveis de LDL e HDL. Nenhum risco aumentado de doença coronariana.
Hipercolesterolemia familiar (tipo IIa)	Receptores de LDL defeituosos ou mutação na região do ligante da apo B-100.	Níveis elevados de LDL e hipercolesterolemia, resultando em aterosclerose e doença coronariana.
Hiperlipoproteinemia familiar tipo III (doença beta ampla, doença de remoção dos remanescentes, disbetalipoproteinemia familiar)	Deficiência na depuração dos remanescentes pelo fígado, causada por uma anormalidade da apo E. Os pacientes carecem das isoformas E3 e E4 e apresentam apenas E2, a qual não reage com o receptor E. ^a	Aumento dos remanescentes de quilomícrons e da VLDL com densidade < 1,019 (β-VLDL). Causa hipercolesterolemia, xantomas e aterosclerose.
Hipertriacilglicerolemia familiar (tipo IV)	A produção excessiva de VLDL está frequentemente associada à intolerância à glicose e à hiperinsulinemia.	Os níveis de colesterol aumentam com a concentração de VLDL. A LDL e a HDL tendem a estar abaixo do normal. Esse padrão está comumente associado à doença coronariana, ao DM2, à obesidade, ao alcoolismo e à administração de hormônios progestacionais.
Hiperalfalipoproteinemia familiar	Concentrações aumentadas de HDL.	Distúrbio raro, aparentemente benéfico à saúde e à longevidade.
Deficiência de lipase hepática	A deficiência dessa enzima leva ao acúmulo de HDL rica em triacilglicerol e de remanescentes de VLDL grandes.	Os pacientes apresentam xantomas e doença coronariana.
LCAT	A ausência da LCAT leva ao bloqueio do transporte reverso do colesterol. A HDL permanece na forma de discos nascentes, incapazes de captar e esterificar o colesterol.	As concentrações plasmáticas de ésteres de colesterol e de lisolecitina são baixas. Está presente uma fração LDL anormal, a lipoproteína X, também encontrada em pacientes com coléstase. A VLDL está anormal (β-VLDL).
Excesso de lipoproteína(a) familiar	A Lp(a) consiste em 1 mol de LDL ligado a 1 mol de apo(a). A apo(a) exibe homologias estruturais com o plasminogênio.	Doença coronariana prematura devida à aterosclerose, e trombose em consequência da inibição da fibrinólise.

^aExiste uma associação entre pacientes que apresentam o alelo apo E4 e a incidência da doença de Alzheimer. Aparentemente, a apo E4 liga-se com maior afinidade ao β-amiloide encontrado nas placas neuríticas.

LCAT, deficiência familiar de lecitina:colesterol-aciltransferase; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; LDL, lipoproteína de baixa densidade; DM2, diabetes melito tipo 2; HDL, lipoproteína de alta densidade; LPL, lipase lipoproteica.

está associada com aterosclerose precoce. O defeito é mais frequente no gene do receptor de LDL, de forma que a LDL não é retirada do sangue. Além disso, doenças como diabetes melito, hipotireoidismo, doença renal (síndrome nefrótica) e aterosclerose estão associadas a padrões anormais secundários de lipoproteínas, que são muito semelhantes a alguns distúrbios hereditários primários. Quase todos os distúrbios primários são causados por um defeito em um estágio na formação, no transporte ou na degradação das lipoproteínas (ver Figuras 25-4, 26-5 e 26-6). Nem todas essas anormalidades são prejudiciais.

RESUMO

- O colesterol é o precursor de todos os esteroides do organismo, por exemplo, os corticosteroides, os hormônios sexuais, os ácidos biliares e a vitamina D. Além disso, desempenha um importante papel estrutural nas membranas e na camada externa das lipoproteínas.
- O colesterol é inteiramente sintetizado no organismo a partir de acetil-CoA. Três moléculas de acetil-CoA formam o mevalonato pela reação reguladora importante da via, catalisada pela HMG-CoA-redutase. Em seguida, uma unidade isoprenoide de cinco carbonos é sintetizada, e seis dessas unidades se condensam para formar o esqualeno. O esqualeno sofre ciclização para formar o esteroide parental, o lanosterol, o qual, após a remoção de três grupos metil e outras alterações, forma o colesterol.
- A síntese do colesterol no fígado é regulada, em parte, pelo colesterol da dieta. Nos tecidos, o equilíbrio do colesterol é mantido entre os fatores que produzem ganho de colesterol (p. ex., síntese, captação por meio dos receptores de LDL ou receptores *scavenger*) e os fatores que causam perda do colesterol (p. ex., síntese de esteroides, formação de ésteres de colesterol, excreção). Para alcançar esse equilíbrio, a atividade do receptor de LDL é modulada pelos níveis celulares de colesterol. No transporte reverso do colesterol, a HDL capta-o dos tecidos, e a LCAT esterifica-o e deposita-o no núcleo das partículas. O éster de colesterol da HDL é captado pelo fígado, diretamente ou após transferência para a VLDL, a IDL ou a LDL por meio da proteína de transferência de éster de colesterol.

- O colesterol em excesso é excretado pelo fígado na bile, sob a forma de colesterol ou sais biliares. Uma grande proporção de sais biliares é absorvida na circulação portal e retorna ao fígado como parte da circulação êntero-hepática.
- Os níveis elevados de colesterol presentes em VLDL, IDL ou LDL estão associados à aterosclerose, e os níveis elevados de HDL exercem um efeito protetor.
- Os defeitos hereditários do metabolismo das lipoproteínas levam a uma condição primária de hipo ou hiperlipoproteinemia. Certas doenças, como diabetes melito, hipotireoidismo, doença renal e aterosclerose, exibem padrões anormais secundários de lipoproteína, que se assemelham a alguns dos distúrbios primários.

REFERÊNCIAS

- Agellon LB: Metabolism and function of bile acids. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:423–440.
- Banach M, Rizzo M, Obradovic M, et al: PCSK9 inhibition – a novel mechanism to treat lipid disorders? *Curr Pharm Des* 2013;19:3869.
- Burg JS, Espenshade PJ: Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* 2011;50:403.
- Chiang JY: Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009;50:1955.
- Denke MA: Dietary fats, fatty acids and their effects on lipoproteins. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:466.
- Djoussé L, Gaziano JM: Dietary cholesterol and coronary disease risk: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11:418.
- Fernandez ML, West KL: Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr* 2005;135:2075.
- Jiang XC, Zhou HW: Plasma lipid transfer proteins. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:302.
- Liscum L: Cholesterol biosynthesis. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Vance DE, Vance JE (editors). Elsevier, 2008:399–422.
- Perez-Sala D: Protein isoprenylation in biology and disease: general overview and perspectives from studies with genetically engineered animals. *Front Biosci* 2007;12:4456.

Questões para estudo

Seção V – Metabolismo dos lipídeos

- Qual das afirmativas a seguir relacionadas às moléculas de ácidos graxos está CORRETA?
 - Elas consistem em um grupo cabeça de ácido carboxílico ligado a uma cadeia de carboidratos.
 - Elas são chamadas de poliinsaturadas quando contêm uma ou mais duplas ligações carbono-carbono.
 - Os seus pontos de fusão aumentam com o aumento do número de insaturações.
 - Elas quase sempre têm suas duplas ligações na configuração *cis* quando ocorrem naturalmente.
 - Elas ocorrem no organismo, principalmente, na forma de ácidos graxos livres (não esterificados).
- Qual dos seguintes NÃO é um fosfolípido?
 - Esfingomielina.
 - Plasmalogênio.
 - Cardiolipina.
 - Galactosilceramida.
 - Lisolecitina.
- Qual das afirmativas a seguir sobre gangliosídeos está INCORRETA?
 - Eles são derivados da galactosilceramida.
 - Eles contêm uma molécula ou mais de ácido siálico.
 - Eles estão presentes no tecido nervoso em altas concentrações.
 - O gangliosídeo GM1 é o receptor da toxina colérica no intestino humano.
 - Eles atuam no reconhecimento célula a célula.
- Qual dos seguintes é um antioxidante que quebra a cadeia?
 - Glutathione-peroxidase.
 - Selênio.
 - Superóxido-dismutase.
 - EDTA.
 - Catalase.
- Depois de produzidos a partir de acetil-CoA no fígado, os corpos cetônicos são utilizados principalmente em qual dos processos a seguir?
 - Excreção como resíduo.
 - Geração de energia no fígado.
 - Conversão de ácidos graxos para estoque de energia.
 - Geração de energia nos tecidos.
 - Geração de energia nas hemácias.
- O local subcelular da quebra dos ácidos graxos de cadeia longa à acetil-CoA através da β -oxidação é:
 - O citosol.
 - A matriz mitocondrial.
 - O retículo endoplasmático.
 - O espaço intermembrana da mitocôndria.
 - O aparelho de Golgi.
- A carnitina é necessária para a oxidação de ácidos graxos PORQUE:
 - Ela é um cofator para a acil-CoA-sintase, que ativa os ácidos graxos para a degradação.
 - Acil-CoA de cadeia longa (“ácidos graxos ativados”) precisam entrar na matriz mitocondrial para serem oxidados, porém não podem atravessar a membrana mitocondrial externa. A transferência do grupo acil-CoA para a carnitina possibilita que o deslocamento ocorra.
 - Acil-CoA de cadeia longa (“ácidos graxos ativados”) precisam entrar no espaço intermembrana da mitocôndria para serem oxidados, porém não podem atravessar a membrana mitocondrial interna. A transferência do grupo acil-CoA para a carnitina possibilita que o deslocamento ocorra.
 - Previne a quebra de ácido graxo acil-CoA de cadeia longa no espaço intermembrana da mitocôndria.
- A degradação de uma molécula de um ácido graxo C16 completamente saturado (ácido palmítico) por β -oxidação leva à formação de:
 - 8 FADH₂, 8 NADH e 8 moléculas de acetil-CoA
 - 7 FADH₂, 7 NADH e 7 moléculas de acetil-CoA
 - 8 FADH₂, 8 NADH e 7 moléculas de acetil-CoA
 - 7 FADH₂, 8 NADH e 8 moléculas de acetil-CoA
 - 7 FADH₂, 7 NADH e 8 moléculas de acetil-CoA
- Malonil-CoA, o primeiro intermediário na síntese de ácidos graxos, é um importante regulador do metabolismo de ácidos graxos PORQUE:
 - A sua formação a partir de acetil-CoA e bicarbonato pela enzima acetil-CoA-carboxilase é a principal etapa limitante da velocidade de síntese dos ácidos graxos.
 - Previne a entrada de grupos de ácidos graxos acil na matriz mitocondrial porque é um potente inibidor da carnitina-palmitoil-transferase-I.
 - Previne a entrada de grupos de ácidos graxos acil na matriz mitocondrial porque é um potente inibidor da carnitina-palmitoil-transferase-II.
 - Previne a entrada de grupos de ácidos graxos acil na matriz mitocondrial porque é um potente inibidor da carnitina-acilcarnitina-translocase.
 - Inibe a síntese do ácido graxo acil-CoA.
- O ácido α -linolênico é considerado nutricionalmente essencial para os seres humanos PORQUE:
 - Ele é um ácido graxo ω 3.
 - Ele contém três duplas ligações.
 - Em seres humanos, a dupla ligação não pode ser introduzida em ácidos graxos acima da posição Δ 9.
 - Em seres humanos, a dupla ligação não pode ser introduzida em ácidos graxos acima da posição Δ 12.
 - Tecidos humanos não são capazes de introduzir uma dupla ligação na posição Δ 9 dos ácidos graxos.
- A inativação da acetil-CoA-carboxilase é favorecida QUANDO:
 - Os níveis de citrato citosólico estão altos.
 - Ela estiver na forma polimérica.
 - Os níveis de palmitoil-CoA forem baixos.
 - O transportador de tricarboxilatos estiver inibido.
 - Ela estiver desfosforilada.

12. Qual dos eicosanóides a seguir é sintetizado a partir do ácido linoleico através da via da cicloxigenase?
- Prostaglandina E₁ (PGE₁).
 - Leucotrieno A₃ (LTA₃).
 - Prostaglandina E₃ (PGE₃).
 - Lipoxina A₄ (LXA₄).
 - Tromboxano A₃ (TXA₃).
13. Qual das enzimas a seguir é inibida pelo ácido acetilsalicílico, um anti-inflamatório não esteroide (AINE)?
- Lipoxigenase.
 - Prostaciclina-sintase.
 - Cicloxigenase.
 - Tromboxano-sintase.
 - Δ⁶-dessaturase.
14. Qual das opções a seguir é o principal produto do ácido graxo-sintase?
- Acetil-CoA.
 - Oleato.
 - Palmitoil-CoA.
 - Acetacetato.
 - Palmitato.
15. Os ácidos graxos são degradados pela remoção repetida de fragmentos de dois carbonos na forma de acetil-CoA no ciclo de β-oxidação e sintetizados pela condensação repetida de acetil-CoA até que é formada uma longa cadeia saturada de ácido graxo com um número par de átomos de carbono. Uma vez que os ácidos graxos precisam ser degradados quando a energia está escassa e sintetizados quando ela está abundante, existem importantes diferenças entre os dois processos que ajudam as células a os regular de forma eficiente. Qual das afirmativas a seguir relacionada a essas diferenças está INCORRETA?
- A degradação dos ácidos graxos ocorre dentro da mitocôndria, ao passo que a síntese ocorre no citosol.
 - A degradação dos ácidos graxos utiliza NAD⁺ e produz NADH, ao passo que a síntese utiliza NADPH e produz NADP.
 - Os grupos de ácidos graxos acil são ativados para separação utilizando CoA e para síntese utilizando a proteína carreadora de grupos acila.
 - O transporte através da membrana mitocondrial de grupos de ácidos graxos acil e acetil-CoA é necessário para a degradação e síntese de ácidos graxos, respectivamente.
 - O glucagon promove a síntese de ácidos graxos e inibe a degradação dos ácidos graxos.
16. A lipase sensível a hormônio, a enzima que mobiliza ácidos graxos a partir dos estoques de triacilgliceróis no tecido adiposo, é inibida por:
- Glucagon.
 - ACTH.
 - Epinefrina.
 - Vasopressina.
 - Prostaglandina E.
17. Qual das alternativas a seguir melhor descreve a ação da fosfolipase C?
- Ela libera a cadeia de acil da posição *sn*-2 de um fosfolípido.
 - Ela cliva um fosfolípido em seu grupo principal contendo fosfato e um diacilglicerol.
 - Ela libera o grupo principal de um fosfolípido, gerando ácido fosfatídico.
 - Ela libera a cadeia de acil da posição *sn*-1 de um fosfolípido.
 - Ela libera as cadeias de acil das posições *sn*-1 e *sn*-2 de um fosfolípido.
18. O distúrbio de Tay Sachs é uma doença de armazenamento de lipídeo causada por um defeito genético que causa a deficiência de qual das enzimas a seguir:
- β-Galactosidase.
 - Esfingomielinase.
 - Ceramidase.
 - Hexosaminidase A.
 - β-Glicosidase.
19. Qual das lipoproteínas plasmáticas é melhor descrita como se segue: sintetizada na mucosa intestinal, contendo alta concentração de triacilglicerol e responsável pelo transporte de lipídeos da dieta pela circulação?
- Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Lipoproteína de densidade intermediária.
 - Lipoproteína de baixa densidade.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.
20. Qual das lipoproteínas plasmáticas é melhor descrita como se segue: sintetizada no fígado, contendo alta concentração de triacilglicerol e eliminada da circulação principalmente pelos tecidos adiposo e muscular?
- Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Lipoproteína de densidade intermediária.
 - Lipoproteína de baixa densidade.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.
21. Qual das lipoproteínas plasmáticas é melhor descrita como se segue: formada na circulação pela remoção de triacilglicerol das lipoproteínas de densidade muito baixa, contém colesterol captado da lipoproteína de alta densidade e entrega o colesterol para os tecidos extra-hepáticos?
- Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Lipoproteína de densidade intermediária.
 - Lipoproteína de baixa densidade.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.
22. Qual das seguintes estará elevada na corrente sanguínea cerca de 2 horas após a ingestão de uma refeição rica em gordura?
- Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Lipoproteína de muito baixa densidade.
23. Qual das seguintes estará elevada na corrente sanguínea cerca de 4 horas após a ingestão de uma refeição rica em gordura?
- Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.

24. Qual dos processos a seguir NÃO está envolvido no efluxo de colesterol dos tecidos extra-hepáticos e na entrega do colesterol para o fígado para excreção através da HDL?
- Efluxo de colesterol dos tecidos para pré- β HDL através de ABCA1.
 - Esterificação do colesterol a éster de colesterol pela LCAT, formando HDL₃.
 - Transferência de éster de colesterol do HDL para VLDL, IDL e LDL pela ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP).
 - Efluxo de colesterol dos tecidos para HDL₃ através de SR-B1 e ABCG1.
 - Captação seletiva de éster de colesterol a partir de HDL₂ pelo fígado através de SR-B1.
25. Qual das seguintes afirmações sobre os quilomícrons está CORRETA?
- Os quilomícrons são produzidos dentro das células intestinais e secretados na linfa, onde eles adquirem as apolipoproteínas B e C.
 - O núcleo dos quilomícrons contém triacilglicerol e fosfolípidos.
 - A enzima lipase sensível a hormônio atua sobre os quilomícrons liberando ácidos graxos dos triacilgliceróis quando eles estão ligados à superfície das células endoteliais nos capilares sanguíneos.
 - Os remanescentes de quilomícrons diferem dos quilomícrons por serem menores e por conter uma proporção menor de triacilglicerol e uma maior proporção de colesterol.
 - Os quilomícrons são captados pelo fígado.
26. Qual das seguintes afirmações sobre a biossíntese do colesterol é a CORRETA?
- A etapa limitante da velocidade é a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA-sintase.
 - A síntese ocorre no citosol das células.
 - Todos os átomos de carbono do colesterol sintetizado são originários de acetil-CoA.
 - O esqualeno é o primeiro intermediário cíclico da via.
 - O substrato inicial é o mevalonato.
27. A classe de fármacos chamada de estatinas tem-se revelado muito eficaz contra a hipercolesterolemia, a principal causa de aterosclerose, e doenças cardiovasculares associadas. Esses medicamentos reduzem os níveis de colesterol plasmático por:
- Prevenir a absorção de colesterol do intestino.
 - Aumentar a excreção de colesterol do organismo através da conversão a ácidos biliares.
 - Inibir a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato na via de biossíntese de colesterol.
 - Aumentar a velocidade de degradação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reductase.
 - Estimular a atividade do receptor de LDL no fígado.
28. Qual das seguintes afirmações sobre os ácidos biliares (ou sais biliares) está INCORRETA:
- Os ácidos biliares primários são sintetizados no fígado a partir de colesterol.
 - Os ácidos biliares são necessários para a digestão das gorduras pela lipase pancreática.
 - Os ácidos biliares secundários são produzidos por modificação dos ácidos biliares primários no fígado.
 - Os ácidos biliares facilitam a absorção dos produtos da digestão lipídica no jejum.
 - Os ácidos biliares são reciclados entre o fígado e o intestino delgado na circulação entero-hepática.
29. Um homem de 35 anos com hipercolesterolemia grave tem história familiar de morte de jovens com doença cardíaca e acidente vascular cerebral. Qual dos seguintes genes, provavelmente, é o comprometido?
- Apolipoproteína E.
 - Receptor de LDL.
 - Lipase lipoproteica.
 - PCSK9.
 - LCAT.
30. A proteína recentemente descoberta, proproteína-convertase-subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), foi identificada como um alvo em potencial para fármacos antiaterogênicos PORQUE:
- Diminui o número de receptores LDL expostos na superfície celular, de forma que a captação de LDL é reduzida, e os níveis de colesterol sanguíneo aumentam.
 - Inibe a ligação de apoB ao receptor de LDL, bloqueando, assim, a captação da lipoproteína e aumentando os níveis de colesterol sanguíneo.
 - Aumenta a absorção de colesterol intestinal.
 - Previne a degradação de colesterol a ácidos biliares no fígado.
 - Aumenta a síntese e a secreção de VLDL no fígado, levando ao aumento da formação de LDL no sangue.

Biossíntese dos aminoácidos nutricionalmente não essenciais

C A P Í T U L O

27

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

*Após o estudo deste capítulo,
você deve ser capaz de:*

- Explicar por que a ausência de certos aminoácidos na dieta, que estão presentes na maioria das proteínas, não é prejudicial para a saúde humana.
- Avaliar a distinção entre os termos aminoácido “essencial” e aminoácido “nutricionalmente essencial” e identificar os aminoácidos que são nutricionalmente não essenciais.
- Nomear os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da glicólise que são precursores de aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, glicina e serina.
- Ilustrar a função essencial das transaminases no metabolismo dos aminoácidos.
- Explicar o processo pelo qual são formadas a 4-hidroxiprolina e a 5-hidroxilisina em proteínas como o colágeno.
- Descrever a apresentação clínica do escorbuto e fornecer uma explicação bioquímica do motivo por que a privação grave de vitamina C (ácido ascórbico) resulta nessa disfunção nutricional.
- Reconhecer que, apesar da toxicidade do selênio, a selenocisteína é um componente essencial de várias proteínas de mamíferos.
- Definir e delinear a reação catalisada pela oxidase de função mista.
- Identificar o papel da tetra-hidrobiopterina na biossíntese de tirosina.
- Indicar o papel de um tRNA modificado na inserção cotraducional da selenocisteína em proteínas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os estados de deficiência de aminoácidos podem ocorrer se aminoácidos nutricionalmente essenciais estiverem ausentes da dieta ou estiverem presentes em quantidades inadequadas. Exemplos, em certas regiões da África Ocidental, incluem o **kwashiorkor**, que ocorre quando uma criança é desmamada para uma dieta baseada em amido e pobre em proteínas, e o **marasmo**, em que tanto a ingestão calórica quanto a de aminoácidos específicos estão deficientes. Os pacientes com síndrome do intestino curto, que são incapazes de absorver quantidades suficientes de calorias e nutrientes, apresentam anormalidades nutricionais e metabólicas significativas. Tanto

o distúrbio nutricional conhecido como **escorbuto**, uma deficiência dietética de vitamina C, quanto distúrbios genéticos específicos estão associados a uma redução da capacidade de o tecido conectivo formar hidroxiprolina e hidroxilisina. A consequente instabilidade na conformação do colágeno resulta em sangramento das gengivas, edema das articulações, cicatrização deficiente de feridas e, por fim, morte. A **síndrome de Menkes**, caracterizada por pelos crespos e retardo no crescimento, resulta da deficiência de cobre na dieta, um cofator essencial para a enzima lisil-oxidase que atua na formação das ligações covalentes cruzadas que dão força às fibras de colágeno. Os distúrbios genéticos da biossíntese de colágeno incluem várias formas de **osteogênese imperfeita**, caracterizada por

fragilidade óssea, e **síndrome de Ehlers-Danlos**, um grupo de distúrbios do tecido conectivo que resultam em mobilidade das articulações e anormalidades da pele, devido a defeitos nos genes que codificam enzimas, incluindo a lisil-hidroxilase.

AMINOÁCIDOS NUTRICIONALMENTE ESSENCIAIS E NUTRICIONALMENTE NÃO ESSENCIAIS

Embora muitas vezes empregados em referência aos aminoácidos, os termos “essenciais” e “não essenciais” são equivocados, já que todos os 20 aminoácidos comuns são essenciais para assegurar a saúde. Desses 20 aminoácidos, 8 *precisam* estar presentes na dieta humana e, portanto, são mais bem designados como “*nutricionalmente essenciais*”. Os outros 12 aminoácidos são “*nutricionalmente não essenciais*”, visto que não precisam estar presentes na dieta (**Tabela 27-1**). A distinção entre essas duas classes de aminoácidos foi estabelecida na década de 1930, quando indivíduos foram alimentados com aminoácidos purificados, em vez de proteína. As pesquisas bioquímicas subsequentes revelaram as reações e os intermediários envolvidos na biossíntese de todos os 20 aminoácidos. Os distúrbios de deficiência de aminoácidos são endêmicos em certas regiões da África Ocidental, onde a nutrição se baseia, em grande parte, em cereais que são pobres em triptofano e lisina. Esses distúrbios nutricionais incluem o kwashiorkor, que ocorre quando uma criança é desmamada e passa a ser alimentada com uma dieta com base em amido e pobre em proteínas, e o marasmo, em que há deficiência tanto de aporte calórico quanto de aminoácidos específicos.

Os aminoácidos nutricionalmente essenciais são formados por vias metabólicas longas

A existência de necessidades nutricionais sugere que a dependência de uma fonte externa de determinado nutriente pode

TABELA 27-1 Necessidades de aminoácidos nos seres humanos

Nutricionalmente essenciais	Nutricionalmente não essenciais
Arginina ^a	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Aspartato
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Hidroxiprolina ^b
Triptofano	Hidroxilisina ^b
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina

^aNutricionalmente “semiessencial”. Sintetizada em taxas inadequadas para sustentar o crescimento de crianças.

^bNão são necessárias para a síntese de proteínas, porém são formadas durante o processamento pós-traducional do colágeno.

TABELA 27-2 Enzimas necessárias para a síntese de aminoácidos a partir de intermediários anfibólicos

Quantidade de enzimas necessárias para a síntese			
Nutricionalmente essenciais		Nutricionalmente não essenciais	
Arg ^a	7	Ala	1
His	6	Asp	1
Thr	6	Asn ^b	1
Met	5 (4 compartilhadas)	Glu	1
Lis	8	Gln ^a	1
Ile	8 (6 compartilhadas)	Hil ^c	1
Val	6 (todas compartilhadas)	Hip ^d	1
Leu	7 (5 compartilhadas)	Pro ^a	3
Phe	10	Ser	3
Trp	5 (8 compartilhadas)	Gli ^e	1
	59	Cis ^f	2
		Tir ^g	1
			17

^aA partir de Glu, ^ba partir de Asp, ^ca partir de Lis, ^da partir de Pro, ^ea partir de Ser, ^fa partir de Ser mais S²⁻, ^ga partir de Phe.

ser mais importante para a sobrevivência do que a capacidade de biossintetizá-lo. Por quê? Se um nutriente específico estiver presente no alimento, um organismo capaz de sintetizá-lo transferirá à sua progênie uma informação genética de valor de sobrevivência *negativo*. O valor de sobrevivência é negativo, e não nulo, visto que é necessária a presença de ATP e nutrientes para sintetizar DNA “desnecessário” – mesmo se os genes codificados específicos não forem mais expressos. A quantidade de enzimas necessárias nas células procarióticas para sintetizar os aminoácidos nutricionalmente essenciais é grande em relação à quantidade de enzimas necessárias para a síntese dos aminoácidos nutricionalmente não essenciais (**Tabela 27-2**). Isso sugere uma vantagem de sobrevivência na retenção da capacidade de produzir aminoácidos “fáceis”, porém, com perda da capacidade de produzir aminoácidos “difíceis”. As vias metabólicas que formam os aminoácidos nutricionalmente essenciais ocorrem nas plantas e nas bactérias, mas não nos seres humanos, razão pela qual não serão discutidas aqui. Este capítulo trata das reações e dos intermediários envolvidos na biossíntese dos 12 aminoácidos nutricionalmente *não essenciais* pelos tecidos humanos, bem como de distúrbios nutricionais e metabólicos selecionados associados ao seu metabolismo.

BIOSSÍNTESE DOS AMINOÁCIDOS NUTRICIONALMENTE NÃO ESSENCIAIS

Glutamato

O glutamato, precursor dos chamados aminoácidos da “família do glutamato”, é formado pela amidação reductiva do α -cetoglutarato do ciclo do ácido cítrico, uma reação catalisada pela glutamato-desidrogenase mitocondrial (**Figura 27-1**).

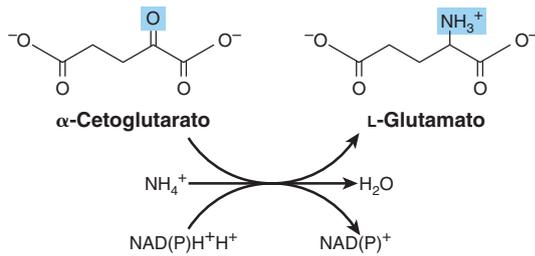


FIGURA 27-1 A reação catalisada pela glutamato-desidrogenase (EC 1.4.1.3).

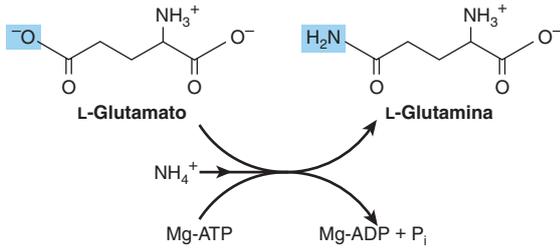


FIGURA 27-2 A reação catalisada pela glutamina-sintase (EC 6.3.1.2).

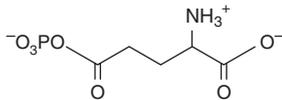


FIGURA 27-3 γ -Glutamil-fosfato.

A reação favorece significativamente a síntese de glutamato, o que reduz a concentração de íon amônio citotóxico.

Glutamina

A amidação do glutamato à glutamina, catalisada pela glutamina-sintase (**Figura 27-2**), envolve a formação do intermediário γ -glutamil-fosfato (**Figura 27-3**). Após a ligação ordenada do glutamato e do ATP, o glutamato ataca o fósforo γ do ATP, formando γ -glutamil-fosfato e ADP. Então, o NH_4^+ liga-se, e o NH_3 não carregado ataca o γ -glutamil-fosfato. A liberação de P_i e de um próton do grupo γ -amino do intermediário tetraédrico permite a liberação do produto, a glutamina.

Alanina e aspartato

A transaminação do piruvato forma a alanina (**Figura 27-4**). De modo siliar, a transaminação do oxalacetato forma o aspartato.

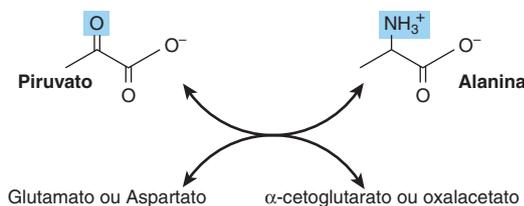


FIGURA 27-4 Formação de alanina por transaminação do piruvato. O doador de amino pode ser o glutamato ou o aspartato. Por isso, o outro produto é α -cetoglutarato ou oxalacetato.

A glutamato-desidrogenase, a glutamina-sintase e as aminotransferases desempenham papéis centrais na biossíntese dos aminoácidos

A ação combinada das enzimas glutamato-desidrogenase, glutamina-sintase e aminotransferases (**Figuras 27-1**, **27-2** e **27-4**) converte o íon amônio inorgânico no nitrogênio α -amino dos aminoácidos.

Asparagina

A conversão do aspartato em asparagina, catalisada pela asparagina-sintase (**Figura 27-5**), assemelha-se à reação da glutamina-sintase (**Figura 27-2**), porém, a glutamina, e não o íon amônio, fornece o nitrogênio. Entretanto, as asparaginas-sintases bacterianas também podem utilizar o íon amônio. A reação envolve a formação do intermediário aspartil-fosfato (**Figura 27-6**). O acoplamento da hidrólise de PP_i a P_i pela pirofosfatase, EC 3.6.1.1, assegura que a reação seja fortemente favorecida.

Serina

A oxidação do grupo α -hidroxila do intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato, catalisada pela 3-fosfoglicerato-desidrogenase, converte-o em 3-fosfo-hidroxipiruvato. A transaminação e a desfosforilação subsequentes formam a serina (**Figura 27-7**).

Glicina

As glicinas aminotransferases podem catalisar a síntese de glicina a partir do glioxilato e do glutamato ou da alanina. Diferentemente da maioria das reações das aminotransferases, essas reações favorecem fortemente a síntese de glicina. Outras vias importantes para a formação de glicina nos mamíferos são a partir da colina (**Figura 27-8**) e da serina (**Figura 27-9**).

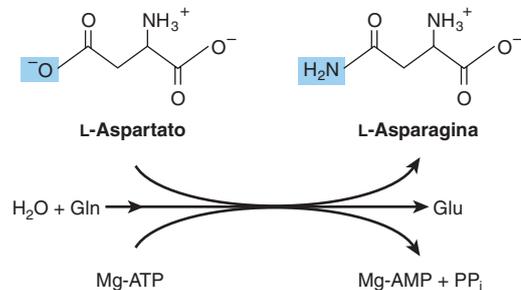


FIGURA 27-5 A reação catalisada pela asparagina-sintase (EC 6.3.5.4). Observe as semelhanças e as diferenças em relação à reação da glutamina-sintase (**Figura 27-2**).

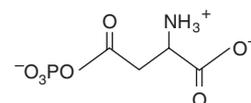


FIGURA 27-6 Aspartil-fosfato.

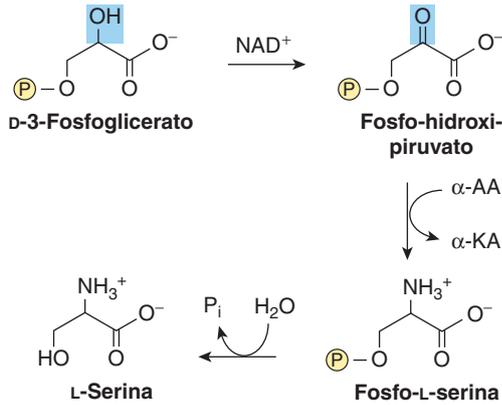


FIGURA 27-7 Biossíntese da serina. A oxidação de 3-fosfoglicerato é catalisada pela 3-fosfoglicerato-desidrogenase (EC 1.1.1.95). A transaminação converte fosfo-hidroxi-piruvato à fosfoserina. A remoção hidrolítica do grupo fosforil catalisada pela fosfoserina-hidrolase (EC 3.1.3.3) forma L-serina.

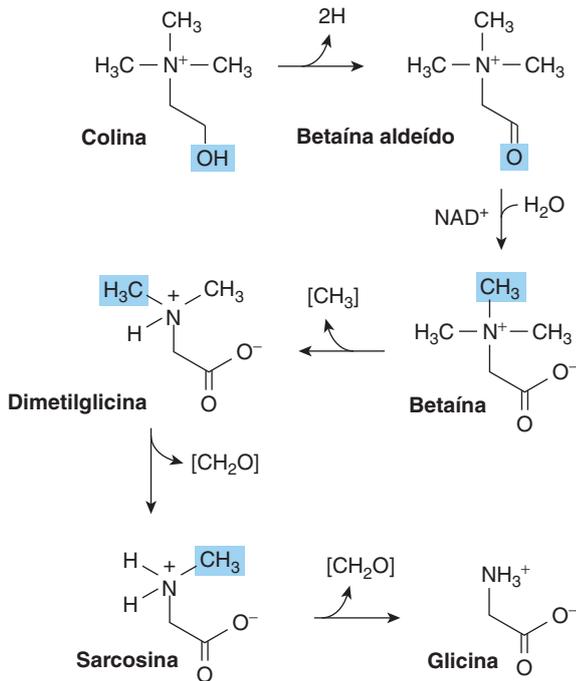


FIGURA 27-8 Formação da glicina a partir da colina. Os catalisadores incluem colina-desidrogenase (EC 1.1.91.1), betaína-desidrogenase (EC 1.2.1.8), betaína-homocisteína N-metiltransferase, sarcosina-desidrogenase (EC 1.5.8.3) e dimetilglicina-desidrogenase (EC 1.5.99.2).

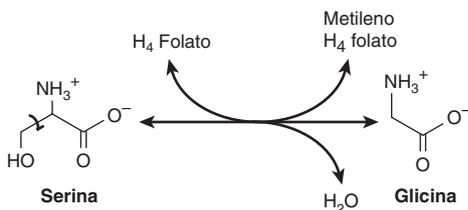


FIGURA 27-9 Interconversão de serina e glicina, catalisada pela serina-hidroxi-metiltransferase (EC 2.1.2.1). A reação é livremente reversível. (H₄ folato, tetra-hidrofolato.)

Prolina

A reação inicial da biossíntese de prolina converte o grupo γ -carboxila do glutamato no anidrido ácido misto de glutamato γ -fosfato (Figura 27-3). A redução subsequente forma glutamato γ -semialdeído que, após a ciclização espontânea, é reduzido à L-prolina (Figura 27-10).

Cisteína

Apesar de não ser nutricionalmente essencial, a cisteína é formada a partir da metionina, que é nutricionalmente essencial.

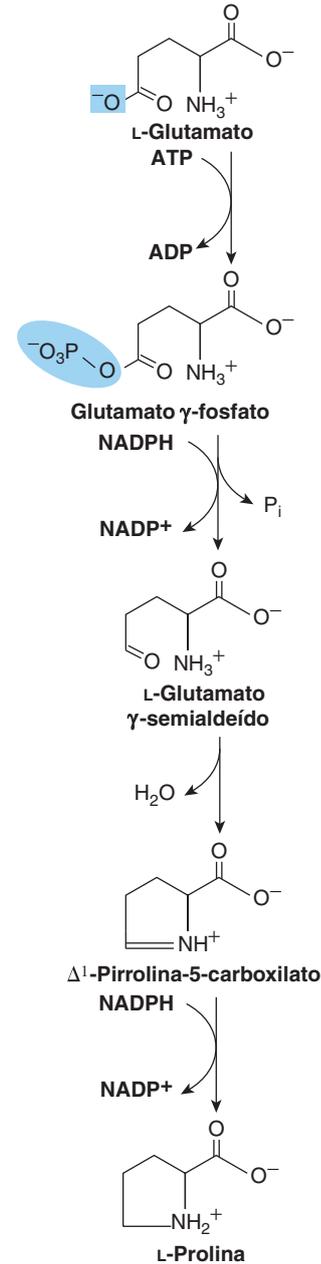


FIGURA 27-10 Biossíntese da prolina a partir do glutamato. Os catalisadores dessas reações são glutamato-5-cinase (EC 2.7.2.11), glutamato-semialdeído-desidrogenase (EC 1.2.1.41) e pirrolina-5-carboxilato-reduzase (EC 1.5.1.2). O fechamento do anel do glutamato-semialdeído é espontâneo.

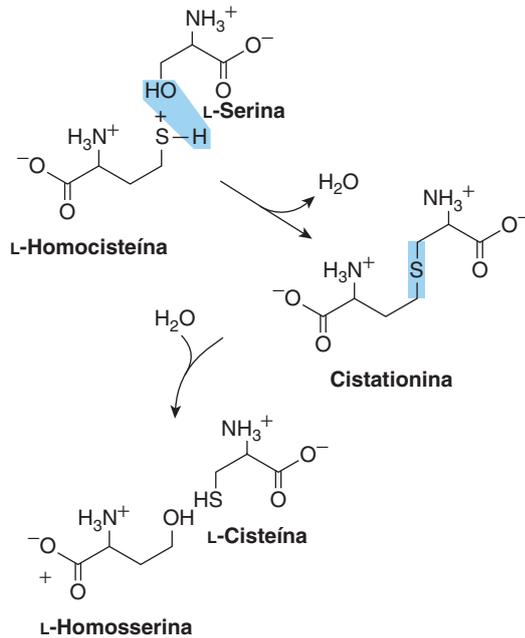


FIGURA 27-11 Conversão da homocisteína e da serina em homosserina e cisteína. O enxofre da cisteína provém da metionina, e o esqueleto de carbono, da serina. Os catalisadores são cistationina β -sintase (EC 4.2.1.22) e cistationina-liase (EC 4.4.1.1).

Após a conversão da metionina em homocisteína (ver Figura 29-19), a homocisteína e a serina formam a cistationina, cuja hidrólise produz cisteína e homosserina (Figura 27-11).

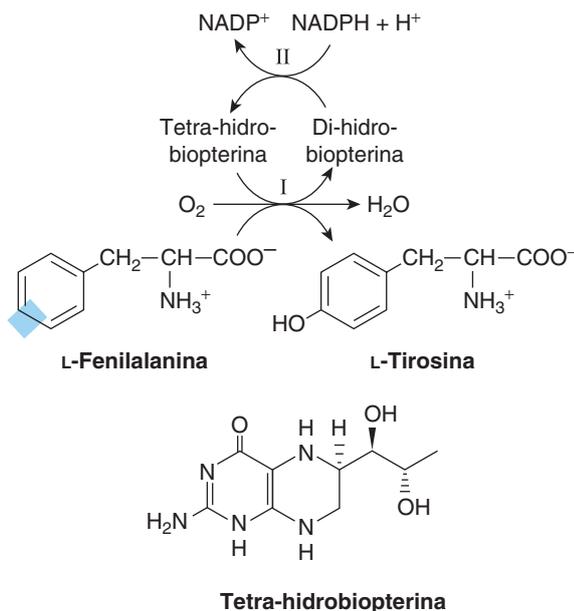


FIGURA 27-12 Conversão de fenilalanina à tirosina pela fenilalanina-hidroxilase (EC 1.14.16.1). Duas atividades enzimáticas estão envolvidas. A atividade II catalisa a redução da di-hidro-biopterina pelo NADPH, e a atividade I, a redução de O_2 a H_2O e de fenilalanina à tirosina. Esta reação está associada a vários defeitos do metabolismo da fenilalanina, discutidos no Capítulo 29.

Tirosina

A fenilalanina-hidroxilase (EC 1.14.16.1) converte fenilalanina à tirosina (Figura 27-12). Quando a dieta contém quantidades adequadas do aminoácido nutricionalmente essencial fenilalanina, a tirosina é nutricionalmente não essencial. Entretanto, como a reação da fenilalanina-hidroxilase é irreversível, a tirosina de origem nutricional não pode substituir a fenilalanina. A catálise por essa oxigenase de função mista incorpora um átomo de O_2 para a posição *para* da fenilalanina e reduz o outro átomo à água. O poder redutor, fornecido como tetra-hidrobiopterina, deriva, em última análise, do NADPH (Figura 27-12).

Hidroxi prolina e hidroxilisina

A hidroxiprolina e a hidroxilisina ocorrem principalmente no colágeno. Como não existe nenhum tRNA para ambos os aminoácidos hidroxilados, nem a hidroxiprolina nem a hidroxilisina da dieta são incorporadas durante a síntese de proteína. A peptidil-hidroxiprolina e a peptidil-hidroxilisina originam-se da prolina e da lisina, porém, somente após a incorporação desses aminoácidos em peptídeos. A hidroxilação dos resíduos de peptidil-prolil e peptidil-lisil catalisada pela **prolil-hidroxilase** e pela **lisil-hidroxilase** da pele, do músculo esquelético e das feridas em processo de granulação exige, além do substrato, O_2 molecular, ascorbato, Fe^{2+} e α -cetogluturato (Figura 27-13). Para cada mol de prolina ou lisina hidroxilado, um mol de α -cetogluturato é descarboxilado em succinato. As hidroxilases são oxidases de função mista. Um átomo de O_2 é incorporado na colina ou na lisina, e o outro, no succinato (Figura 27-13). A deficiência de vitamina C, cuja presença é necessária para essas duas hidroxilases, resulta em **escorbuto**, caracterizado por sangramento das gengivas, edema das articulações e cicatrização deficiente de feridas, devido ao comprometimento da estabilidade do colágeno (ver Capítulos 5 e 50).

Valina, leucina e isoleucina

Embora a leucina, a valina e a isoleucina sejam aminoácidos nutricionalmente essenciais, as aminotransferases teciduais efetuam a interconversão reversível de todos os três aminoácidos e seus α -cetoácidos correspondentes. Por isso, esses α -cetoácidos podem substituir seus aminoácidos na dieta.

Selenocisteína, o 21º aminoácido

Apesar de a ocorrência da selenocisteína (Figura 27-14) ser incomum nas proteínas, são conhecidas pelo menos 25 selenoproteínas humanas. A selenocisteína é encontrada no sítio

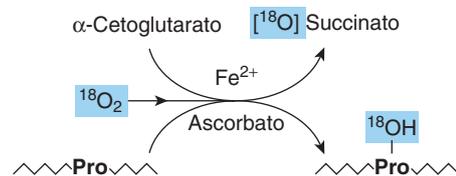


FIGURA 27-13 Hidroxilação de um peptídeo rico em prolina. O oxigênio é incorporado tanto no succinato quanto na prolina. A peptidil-prolil-4-hidroxilase (EC 1.14.11.2) é uma oxidase de função mista. A lisil-5-hidroxilase (EC 1.14.11.4) catalisa uma reação análoga.

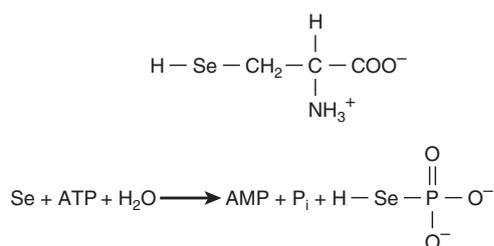


FIGURA 27-14 Selenocisteína (parte superior) e a reação catalisada pela selenofosfato-sintase (EC 2.7.9.3) (parte inferior).

ativo de várias enzimas humanas que catalisam reações de oxidorredução. Exemplos incluem a tioredoxina-redutase, a glutatona-peroxidase e a deiodinase, a qual converte a tiroxina em tri-iodotironina. Quando presente, a selenocisteína participa no mecanismo catalítico dessas enzimas. De modo significativo, a substituição da selenocisteína pela cisteína pode comprometer a atividade catalítica. A ocorrência de deficiência de selenoproteínas humanas tem sido envolvida na tumorigênese e na aterosclerose e está associada à miocardiopatia por deficiência de selênio (doença de Keshan).

A biossíntese de selenocisteína exige a presença de cisteína, selenato (SeO_4^{2-}), ATP, um tRNA específico e várias enzimas. A serina fornece o esqueleto de carbono para a selenocisteína. O selenofosfato, formado a partir de ATP e selenato (Figura 27-14), atua como doador de selênio. Ao contrário da hidroxiprolina ou da hidroxilisina, a selenocisteína surge cotraducionalmente durante sua incorporação nos peptídeos. O anticódon UGA do tRNA incomum, denominado tRNA^{Sec}, normalmente sinaliza TÉRMINO. A capacidade de o mecanismo de síntese proteica identificar um códon UGA específico de selenocisteína envolve o elemento de inserção da selenocisteína, uma estrutura em haste-alça situada na região não traduzida do mRNA. O tRNA^{Sec} é inicialmente carregado com serina pela ligase que carrega o tRNA^{Ser}. A substituição subsequente do oxigênio da serina por selênio envolve o selenofosfato formado pela selenofosfato-sintase (Figura 27-14). Reações sucessivas catalisadas por enzimas convertem o cisteil-tRNA^{Sec} em aminoacrilil-tRNA^{Sec} e, a seguir, em selenocisteil-tRNA^{Sec}. Na presença de um fator de alongamento específico, que reconhece o selenocisteil-tRNA^{Sec}, a selenocisteína pode ser então incorporada em proteínas.

RESUMO

- Todos os vertebrados podem sintetizar certos aminoácidos a partir de intermediários anfílicos ou a partir de outros aminoácidos obtidos da dieta. Os intermediários e os aminoácidos a partir dos quais se originam são o α -cetogluturato (Glu, Gln, Pro, Hip), o oxalacetato (Asp, Asn) e o 3-fosfoglicerato (Ser, Gli).
- A cisteína, a tirosina e a hidroxilisina são formadas a partir de aminoácidos nutricionalmente essenciais. A serina fornece o esqueleto de carbonos, e a homocisteína fornece o enxofre para a biossíntese de cisteína.
- No escorbuto, doença nutricional que resulta da deficiência de vitamina C, o comprometimento na hidroxilação da peptidil-prolina e da peptidil-lisina resulta na incapacidade de fornecer os substratos necessários para a ligação cruzada nos colágenos em maturação.
- A fenilalanina-hidroxilase converte a fenilalanina em tirosina. Como a reação catalisada pela oxidase de função mista é irreversível, a tirosina não pode dar origem à fenilalanina.
- A hidroxiprolina e a hidroxilisina provenientes da dieta não são incorporadas em proteínas, visto que não há nenhum códon ou tRNA para determinar a sua inserção em peptídeos.
- O peptidil-hidroxiprolina e o peptidil-hidroxilisina são formados por hidroxilação da peptidil-prolina ou da lisina, em reações catalisadas por oxidases de função mista que exigem a presença de vitamina C como cofator.
- A selenocisteína, um resíduo de sítio ativo essencial presente em várias enzimas dos mamíferos, surge por inserção cotraducional a partir de um tRNA previamente modificado.

REFERÊNCIAS

- Beckett GJ, Arthur JR: Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol* 2005;184:455.
- Bender, DA: *Amino Acid Metabolism*, 3rd ed. Wiley, 2012.
- Donovan J, Copeland PR: The efficiency of selenocysteine incorporation is regulated by translation initiation factors. *J Mol Biol* 2010;400:659.
- Kilberg MS: Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem* 2006;75:629.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Stickel F, Inderbitzin D, Candinas D: Role of nutrition in liver transplantation for end-stage chronic liver disease. *Nutr Rev* 2008;66:47.
- Turanov AA, Shchedrina VA, Everley RA et al: Selenoprotein S is involved in maintenance and transport of multiprotein complexes. *Biochem J*. 2014;462:555.

Catabolismo das proteínas e do nitrogênio dos aminoácidos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a renovação das proteínas, indicar a taxa média de *turnover* proteico nos indivíduos saudáveis e fornecer exemplos de proteínas humanas que são degradadas em taxas maiores do que a média.
- Delinear os eventos no processo de *turnover* proteico pelas vias dependente de ATP e independente de ATP e indicar as funções na degradação proteica exercidas pelo proteossomo, pela ubiquitina, pelos receptores de superfície celular, pelas assialoglicoproteínas circulantes e pelos lisossomos.
- Indicar como os produtos finais do catabolismo do nitrogênio nos mamíferos diferem daqueles das aves e dos peixes.
- Ilustrar os papéis centrais das transaminases (aminotransferases), da glutamato-desidrogenase e da glutaminase no metabolismo do nitrogênio nos seres humanos.
- Utilizar fórmulas estruturais para representar as reações que convertem NH_3 , CO_2 e o nitrogênio da amida do aspartato em ureia, e identificar as localizações subcelulares das enzimas que catalisam a biossíntese de ureia.
- Indicar as funções da regulação alostérica e do acetilglutamato na regulação das etapas iniciais da biossíntese de ureia.
- Explicar por que os defeitos metabólicos em diferentes enzimas da biossíntese da ureia, apesar de distintos a nível molecular, apresentam sinais e sintomas clínicos semelhantes.
- Descrever as abordagens clássicas e o papel da espectrometria de massa em *tandem* no rastreamento de recém-nascidos para doenças metabólicas hereditárias.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Nos adultos saudáveis, o aporte de nitrogênio corresponde ao nitrogênio excretado. O crescimento e a gestação são acompanhados de um balanço nitrogenado positivo, isto é, um excesso de nitrogênio ingerido em relação à sua quantidade excretada. O balanço nitrogenado negativo, em que a excreção é maior do que o aporte, pode ocorrer após cirurgia, na presença de câncer avançado e nos distúrbios nutricionais conhecidos como kwashiorkor e marasmo. Os distúrbios genéticos resultantes dos defeitos nos genes que codificam ubiquitina, ubiquitina-ligases ou as enzimas desubiquitinadoras que participam na degradação de certas proteínas incluem a síndrome de Angelman, a doença de Parkinson juvenil, a síndrome de von Hippel-Lindau e a policitemia congênita. Este capítulo descreve como o nitrogênio dos aminoácidos é convertido em ureia e os distúrbios metabólicos que acompanham os defeitos nesse processo. A amônia, que é altamente tóxica, origina-se nos

seres humanos principalmente do nitrogênio α -amino dos aminoácidos. Dessa forma, os tecidos convertem a amônia no nitrogênio amida não tóxico do aminoácido glutamina. A desaminação subsequente da glutamina no fígado libera amônia, que é convertida em ureia, uma substância atóxica. Se houver comprometimento da função hepática, como o que ocorre na cirrose e na hepatite, a presença de níveis sanguíneos elevados de amônia produz sinais e sintomas clínicos. Cada enzima do ciclo da ureia fornece exemplos de defeitos metabólicos e suas consequências fisiológicas. Além disso, o ciclo da ureia fornece um modelo molecular útil para o estudo de outros distúrbios metabólicos humanos.

TURNOVER PROTEICO

O contínuo processo de degradação e síntese (*turnover*) das proteínas celulares ocorre em todas as formas de vida. Todos

os dias, os seres humanos reciclam 1 a 2% de suas proteínas corporais totais, principalmente proteínas musculares. Ocorrem altas taxas de degradação proteica nos tecidos que sofrem rearranjo estrutural, como o tecido uterino durante a gestação, o músculo esquelético em situações de jejum prolongado e o tecido da cauda do girino durante a metamorfose. Em torno de 75% dos aminoácidos liberados pela degradação proteica são reutilizados, ao passo que o excesso remanescente de aminoácidos livres não é estocado para uso futuro. Os aminoácidos que não são incorporados de imediato em proteínas novas são rapidamente degradados. A principal porção dos esqueletos de carbono dos aminoácidos é convertida em intermediários anfíóxicos, ao passo que, nos seres humanos, o nitrogênio amino é convertido em ureia e excretado na urina.

AS PROTEASES E AS PEPTIDASES DEGRADAM PROTEÍNAS A AMINOÁCIDOS

A suscetibilidade relativa de uma proteína à degradação é expressa como o seu **tempo de meia-vida** ($t_{1/2}$), o tempo necessário para reduzir sua concentração à metade do seu valor inicial. O tempo de meia-vida das proteínas hepáticas varia de menos de 30 minutos até mais de 150 horas. As enzimas constitutivas, como as da glicólise, possuem valores de $t_{1/2}$ de mais de 100 horas. Em contrapartida, as enzimas reguladoras essenciais podem ter valores de $t_{1/2}$ de apenas 0,5 a 2 horas. As sequências PEST, regiões ricas em prolina (P), glutamato (E), serina (S) e treonina (T), direcionam algumas proteínas para rápida degradação. As proteases intracelulares hidrolisam as ligações peptídicas internas. Os peptídeos resultantes são, então, degradados em aminoácidos por endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas, e por aminopeptidases e carboxipeptidases, que removem sequencialmente os aminoácidos a partir das extremidades aminoterminal e carboxiterminal, respectivamente.

Degradação independente de ATP

A degradação das glicoproteínas do sangue (ver Capítulo 46) é acompanhada pela perda de uma porção de ácido siálico das extremidades não redutoras de suas cadeias oligossacarídicas. A seguir, as assialoglicoproteínas são internalizadas por receptores de assialoglicoproteínas na célula hepática e degradadas por proteases lisossômicas. As proteínas extracelulares associadas à membrana e as proteínas intracelulares de vida longa são degradadas nos lisossomos por processos independentes de ATP.

Degradação dependente de ATP e de ubiquitina

A degradação das proteínas reguladoras com meias-vidas curtas e das proteínas anormais ou com dobramento incorreto ocorre no citosol e exige a presença de ATP e de **ubiquitina**. Nomeada com base em sua presença em todas as células eucarióticas, a ubiquitina é um pequeno polipeptídeo (8,5 kDa, 76 resíduos) que direciona muitas proteínas intracelulares para a degradação. A estrutura primária da ubiquitina é altamente conservada. Apenas três dos 76 resíduos diferem entre a ubiquitina de levedura e a ubiquitina humana. A **Figura 28-1** ilustra

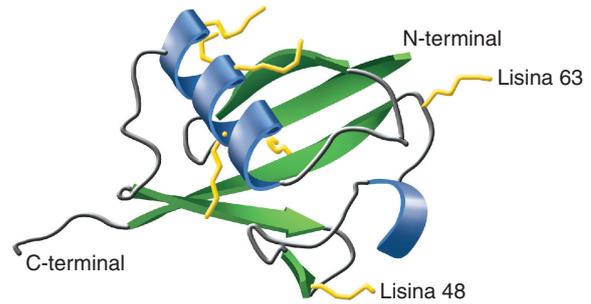


FIGURA 28-1 Estrutura tridimensional da ubiquitina. Estão representadas as hélices α (em azul), as folhas β (em verde) e os grupos R dos resíduos lisil (em cor de laranja). A Lis48 e a Lis63 são sítios de ligação de moléculas adicionais de ubiquitina durante a poliubiquitinação. Criada por Rogerdodd na Wikipédia utilizando PyMOL, PDB id 1ubi, com créditos do European Bioinformatics Institute.

a estrutura tridimensional da ubiquitina. As moléculas de ubiquitina estão unidas por **ligações peptídicas não α** , formadas entre a extremidade carboxiterminal da ubiquitina e os grupos ϵ -amino de resíduos de lisil na proteína-alvo (**Figura 28-2**). O resíduo presente na extremidade aminoterminal afeta o modo pelo qual uma proteína é ubiquitinada. Resíduos de Met ou de Ser aminoterminais retardam a ubiquitinação, ao passo que Asp ou Arg a aceleram. A ligação de uma única molécula de ubiquitina a proteínas transmembranas altera a

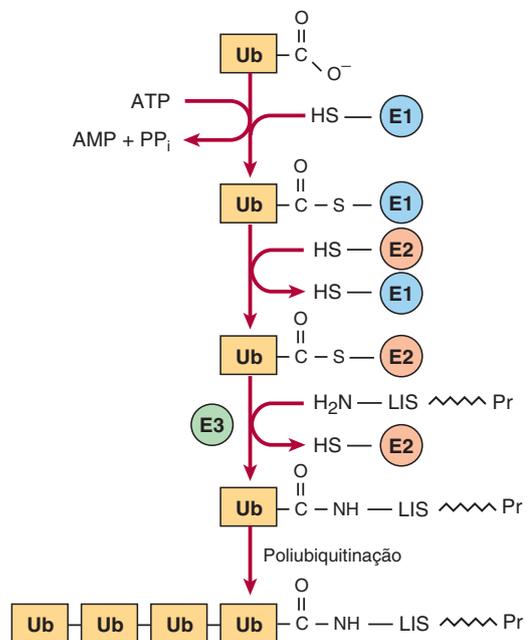


FIGURA 28-2 Reações envolvidas no acoplamento de ubiquitina (Ub) às proteínas. Existem três enzimas envolvidas. A E1 é uma enzima ativadora, a E2, uma ligase, e a E3, uma transferase. Embora sejam indicadas como entidades únicas, existem vários tipos de E1 e mais de 500 tipos de E2. O COOH terminal da ubiquitina forma inicialmente um tioéster. O acoplamento da hidrólise de PP_i pela pirofosfatase assegura que a reação ocorra rapidamente. Uma reação de troca de tioéster transfere a ubiquitina ativada para a E2. Em seguida, a E3 catalisa a transferência da ubiquitina para o grupo ϵ -amino de um resíduo lisil da proteína-alvo. Ciclos adicionais de ubiquitinação resultam em poliubiquitinação subsequente.

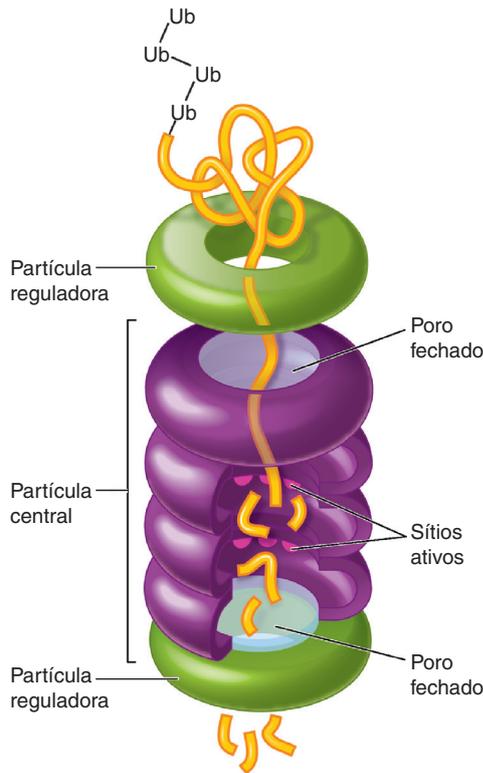


FIGURA 28-3 Representação da estrutura do proteossomo.

O anel superior é fechado para permitir que apenas proteínas poliubiquitinadas entrem no proteossomo, onde proteases internas imobilizadas as degradam em peptídeos.

sua localização subcelular e as tornam alvos de degradação. As proteínas solúveis sofrem **poliubiquitinação**, que é a ligação de quatro ou mais moléculas de ubiquitina nos resíduos lisil 63 e 68, catalisadas pela ligase (Figura 28-1). A degradação subsequente das proteínas marcadas com ubiquitina ocorre no **proteossomo**, uma macromolécula que também é ubíqua em células eucarióticas. O proteossomo consiste em um complexo macromolecular cilíndrico de proteínas, cujos anéis empilhados formam um poro central que abriga os sítios ativos de

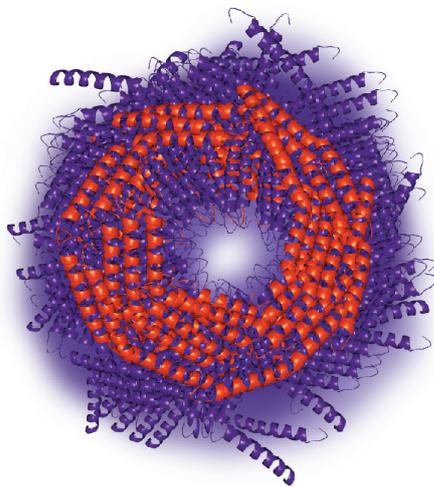


FIGURA 28-4 Visão superior de um proteossomo. Criada por Rogerdodd na Wikipédia, com créditos do European Bioinformatics Institute.

enzimas proteolíticas. Para a degradação, a proteína deve entrar primeiramente no poro central. A entrada é regulada pelos dois anéis mais externos que reconhecem proteínas poliubiquitinadas (Figuras 28-3 e 28-4).

Aaron Ciechanover e Avram Hershko, de Israel, e Irwin Rose, dos Estados Unidos, receberam o Prêmio Nobel de Química, em 2004, pela descoberta do processo de degradação das proteínas mediada pela ubiquitina. Os distúrbios genéticos que resultam dos defeitos nos genes que codificam ubiquitina, ubiquitinas-ligase ou enzimas desubiquitinadoras incluem a síndrome de Angelman, a doença de Parkinson juvenil autossômica recessiva, a síndrome de von Hippel-Lindau e a policitemia congênita. Para aspectos adicionais da degradação proteica e da ubiquitinação, incluindo o seu papel no ciclo celular, ver Capítulos 4 e 35.

O INTERCÂMBIO INTERÓRGÃOS MANTÉM OS NÍVEIS CIRCULANTES DE AMINOÁCIDOS

A manutenção das concentrações de aminoácidos no plasma circulante, no estado de equilíbrio dinâmico entre as refeições, depende do equilíbrio efetivo entre a liberação das reservas endógenas de proteínas e a sua utilização por vários tecidos. O músculo gera mais da metade do reservatório corporal total de aminoácidos livres, e o fígado constitui o local das enzimas do ciclo da ureia necessárias para o processamento do excesso de nitrogênio. Portanto, o músculo e o fígado desempenham importantes papéis na manutenção dos níveis circulantes de aminoácidos.

A Figura 28-5 fornece um resumo do estado pós-absorptivo. Os aminoácidos livres, sobretudo a alanina e a glutamina, são liberados do músculo para a circulação. A alanina é extraída principalmente pelo fígado, e a glutamina é extraída pelo intestino e pelos rins, ambos convertem uma porção significativa, a alanina. A glutamina também atua como fonte de amônia para a excreção renal. Os rins fornecem uma importante fonte de serina para captação pelos tecidos periféricos, incluindo o fígado e o músculo. Os aminoácidos de cadeia ramificada, em particular a valina, são liberados pelo músculo e captados predominantemente pelo encéfalo.

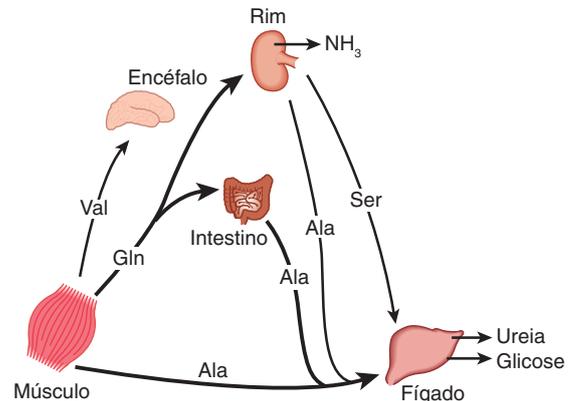


FIGURA 28-5 Troca de aminoácidos entre órgãos em seres humanos saudáveis no estado pós-absorptivo. A figura mostra o papel essencial da alanina no débito de aminoácidos do músculo e do intestino e sua captação pelo fígado.

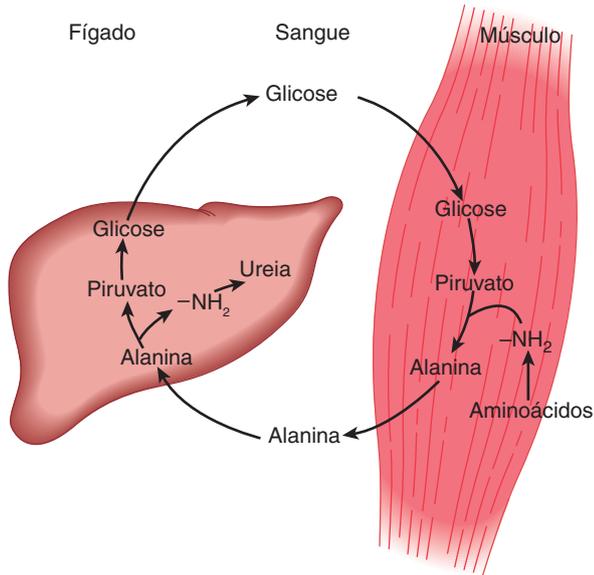


FIGURA 28-6 O ciclo de glicose-alanina. A alanina é sintetizada no músculo por transaminação do piruvato, derivado da glicose, liberada na corrente sanguínea e captada pelo fígado. No fígado, o esqueleto de carbono da alanina é novamente convertido em glicose, que é liberada na corrente sanguínea, onde fica disponível para captação pelo músculo e para nova síntese de alanina.

A alanina é um **aminoácido gliconeogênico** essencial (Figura 28-6). A taxa de gliconeogênese hepática a partir da alanina é muito maior do que a de todos os outros aminoácidos. A capacidade de gliconeogênese do fígado a partir da alanina só atinge a saturação quando a concentração de alanina alcança 20 a 30 vezes o seu nível fisiológico normal. Após uma refeição rica em proteína, os tecidos esplâncnicos liberam aminoácidos (Figura 28-7), e os músculos periféricos extraem aminoácidos; em ambos os casos, predominantemente, os aminoácidos de cadeia ramificada. Os aminoácidos de cadeia ramificada, portanto, possuem uma função especial no metabolismo do nitrogênio. No estado de jejum, eles fornecem ao cérebro uma fonte de energia, e no estado pós-prandial, eles são extraídos predominantemente pelos músculos, sendo poupados pelo fígado.

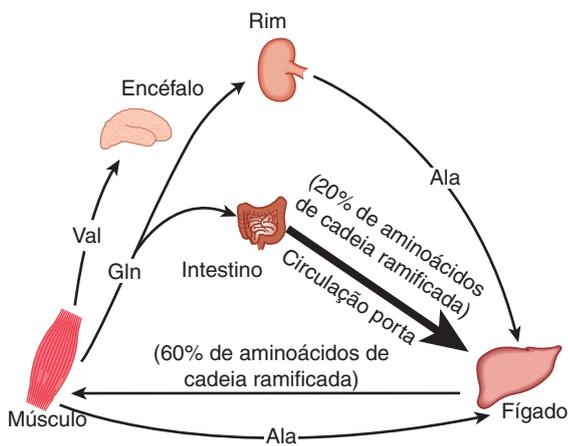


FIGURA 28-7 Resumo da troca de aminoácidos entre os órgãos imediatamente após a ingestão de alimentos.

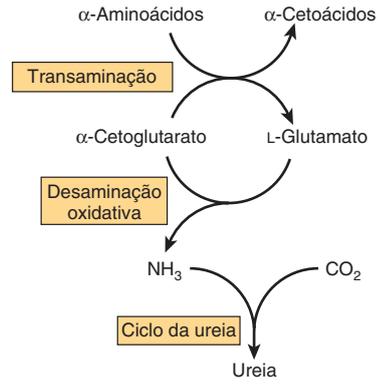


FIGURA 28-8 Fluxo global de nitrogênio no catabolismo dos aminoácidos.

OS ANIMAIS CONVERTEM O NITROGÊNIO α-AMINO A PRODUTOS FINAIS VARIADOS

Dependendo de seu nicho ecológico e de sua fisiologia, os diferentes tipos de animais excretam o excesso de nitrogênio na forma de amônia, de ácido úrico ou de ureia. O ambiente aquoso dos peixes teleosteos, os quais são **amoniotélicos** (que excretam amônia), permite que eles excretem água continuamente para facilitar a excreção de amônia, que é muito tóxica. Esse mecanismo é apropriado para animais aquáticos, ao passo que as aves precisam conservar a água e manter o seu baixo peso. As aves, que são **uricotélicas**, resolvem ambos os problemas com a excreção de ácido úrico rico em nitrogênio (ver Figura 33-11) na forma de guano semissólido. Muitos animais terrestres, incluindo os seres humanos, são **ureotélicos** e excretam ureia altamente hidrossolúvel e atóxica. Como a ureia não é tóxica para os seres humanos, a presença de níveis sanguíneos elevados na doença renal constitui uma consequência, e não uma causa, de comprometimento da função renal.

BIOSSÍNTESE DA UREIA

A biossíntese da ureia ocorre em quatro estágios: (1) transaminação, (2) desaminação oxidativa do glutamato, (3) transporte de amônia e (4) reações do ciclo da ureia (Figura 28-8). A expressão no fígado dos RNAs de todas as enzimas do ciclo da ureia aumenta várias vezes no estado de jejum, provavelmente secundário ao aumento da degradação proteica para prover energia.

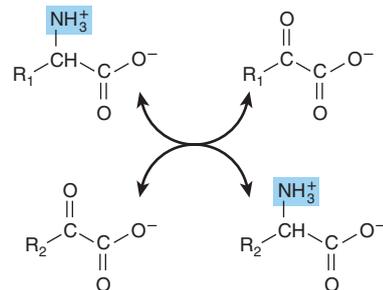


FIGURA 28-9 Transaminação. A reação é livremente reversível, com uma constante de equilíbrio próxima a 1.

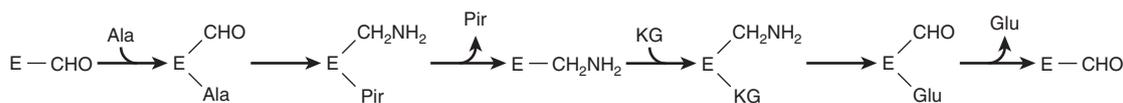


FIGURA 28-10 Mecanismo em pingue-pongue para a transaminação. E—CHO e E—CH₂NH₂ representam o piridoxal-fosfato e a piridoxamina-fosfato ligados à enzima, respectivamente. (Ala, alanina; Glu, glutamato; KG, α-cetoglutarato; Pir, piruvato.)

A transaminação transfere o nitrogênio α-amino para o α-cetoglutarato, formando glutamato

As reações de transaminação efetuam a interconversão de pares de α-aminoácidos e α-cetoácidos (Figura 28-9). As reações de transaminação, livremente reversíveis, também atuam na biossíntese de aminoácidos (ver Figura 27-4). Todos os aminoácidos comuns, exceto lisina, treonina, prolina e hidroxiprolina, participam de transaminações. As transaminações não são restritas aos grupos α-amino. O grupo δ-amino da ornitina (mas não o grupo ε-amino da lisina) sofre transaminação prontamente.

A alanina-piruvato aminotransferase (alanina aminotransferase, EC 2.6.1.2) e a glutamato-α-cetoglutarato aminotransferase (glutamato aminotransferase, EC 2.6.1.1) catalisam a transferência de grupos amino para o piruvato (formando alanina) ou para o α-cetoglutarato (formando glutamato).

Cada aminotransferase é específica para um par de substratos, porém inespecífica para o outro par. Como a alanina também é um substrato da glutamato aminotransferase, o nitrogênio α-amino de todos os aminoácidos que sofrem transaminação pode ser concentrado em glutamato. Esse aspecto é importante, visto que o L-glutamato é o único aminoácido que sofre desaminação oxidativa em uma taxa apreciável nos tecidos dos mamíferos. Por isso, a formação de amônia a partir de grupos α-amino ocorre principalmente pelo nitrogênio α-amino do L-glutamato.

A transaminação ocorre por um mecanismo em “pingue-pongue”, caracterizado pela adição alternada de um substrato e pela liberação de um produto (Figura 28-10). Após a remoção de seu nitrogênio α-amino por transaminação, o “esqueleto” de carbono remanescente de um aminoácido é degradado pelas vias discutidas no Capítulo 29.

O piridoxal-fosfato (PLP), um derivado da vitamina B₆, está presente no sítio catalítico de todas as aminotransferases e exerce uma função essencial na catálise. Durante a transaminação, o PLP atua como “carreador” de grupos amino. Ocorre formação de uma base de Schiff ligada à enzima (Figura 28-11) entre o grupo oxo do PLP ligado à enzima e o grupo α-amino de um α-aminoácido. A base de Schiff pode sofrer

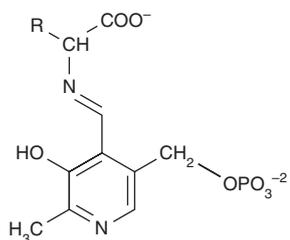


FIGURA 28-11 Estrutura de uma base de Schiff formada entre o piridoxal-fosfato e um aminoácido.

rearranjo de várias maneiras. Na transaminação, o rearranjo forma um α-cetoácido e uma piridoxamina-fosfato ligada à enzima. Conforme assinalado, certas doenças estão associadas a níveis séricos elevados de aminotransferases (ver Tabela 7-2).

A L-GLUTAMATO-DESIDROGENASE OCUPA UMA POSIÇÃO CENTRAL NO METABOLISMO DO NITROGÊNIO

A transferência do nitrogênio amino ao α-cetoglutarato forma L-glutamato. A **L-glutamato-desidrogenase** (GDH) hepática, que pode usar NAD⁺ ou NADP⁺, libera esse nitrogênio como amônia (Figura 28-12). A conversão do nitrogênio α-amino em amônia pela ação combinada da glutamato aminotransferase e da GDH é frequentemente denominada “transdesaminação”. A atividade da GDH hepática é alostericamente inibida por ATP, GTP e NADH, e ativada pelo ADP. A reação catalisada pela GDH é livremente reversível e também funciona na biossíntese de aminoácidos (ver Figura 27-1).

AS AMINOÁCIDOS-OXIDASE REMOVEM O NITROGÊNIO NA FORMA DE AMÔNIA

A L-aminoácido-oxidase do fígado e dos rins converte um aminoácido a um α-iminoácido que se decompõe a um α-cetoácido com a liberação de íon amônio (Figura 28-13). A flavina reduzida é reoxidada pelo oxigênio molecular, formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, em seguida, é clivado em O₂ e H₂O pela **catalase**, EC 1.11.1.6.

A intoxicação por amônia é potencialmente fatal

A amônia produzida pelas bactérias entéricas e absorvida no sangue venoso portal e a amônia produzida pelos tecidos são rapidamente removidas da circulação pelo fígado e convertidas

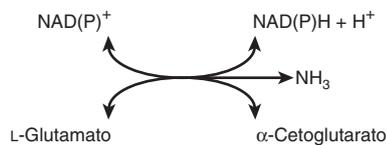


FIGURA 28-12 A reação catalisada pela glutamato-desidrogenase, EC 1.4.1.2. O NAD(P)⁺ significa que o NAD⁺ ou o NADP⁺ podem atuar como oxidorreductores. A reação é reversível, mas favorece significativamente a formação de glutamato.

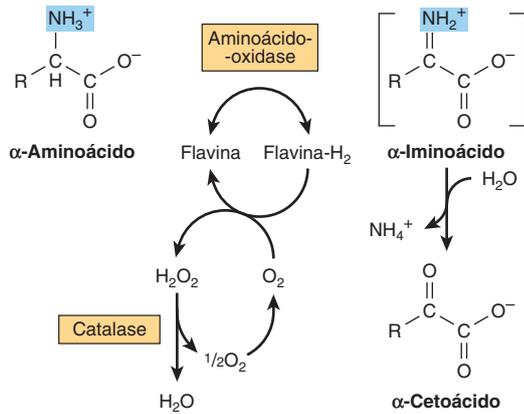


FIGURA 28-13 A desaminação oxidativa catalisada pela L-aminoácido-oxidase (L-α-aminoácido:O₂ oxidorreductase, EC 1.4.3.2). O α-iminoácido, mostrado entre colchetes, não é um intermediário estável.

em ureia. Desse modo, normalmente, existem apenas traços de amônia (10-20 µg/dL) no sangue periférico. Esse processo de remoção é essencial, visto que a amônia é tóxica para o sistema nervoso central. Se o sangue portal deixa de passar pelo fígado, os níveis sanguíneos sistêmicos de amônia podem alcançar níveis tóxicos. Essa situação é observada em caso de grave comprometimento da função hepática ou de desenvolvimento de ligações colaterais entre as veias porta e sistêmicas na cirrose. Os sintomas de **intoxicação por amônia** consistem em tremor, fala arrastada, visão embaçada, coma e, por fim, morte. A amônia pode ser tóxica para o encéfalo, em parte devido à sua reação com o α-cetoglutarato, formando glutamato. A consequente depleção dos níveis de α-cetoglutarato compromete, então, a função do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ATCs) nos neurônios.

A glutamina-sintase fixa a amônia na forma de glutamina

A formação de glutamina é catalisada pela **glutamina-sintase** mitocondrial (Figura 28-14). Como a síntese de ligações amida está acoplada à hidrólise de ATP em ADP e P_i, a reação favorece fortemente a síntese de glutamina. Durante a catálise, o glutamato ataca o grupo γ-fosforil do ATP, formando

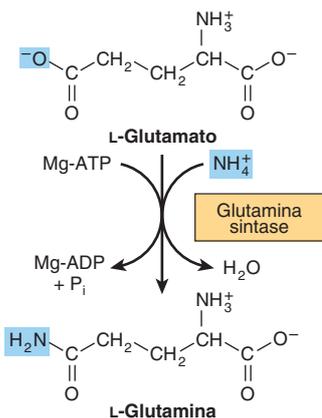


FIGURA 28-14 Formação de glutamina, catalisada pela glutamina-sintase, EC 6.3.1.2.

γ-glutamil-fosfato e ADP. Após a desprotonação do NH₄⁺, a NH₃ ataca o γ-glutamil-fosfato e ocorre liberação de glutamina e P_i. Além de fornecer glutamina para atuar como carreador de nitrogênio, de carbono e de energia entre os órgãos (Figura 28-5), a glutamina-sintase desempenha um importante papel na desintoxicação da amônia e na homeostase acidobásica. Uma rara deficiência de glutamina-sintase no recém-nascido resulta em grave lesão cerebral, falência múltipla de órgãos e morte.

A glutaminase e a asparaginase desamidam a glutamina e a asparagina

Existem duas isoformas humanas da **glutaminase** mitocondrial, chamadas de glutaminases hepática e renal. As glutaminases, que são produtos de diferentes genes, diferem em relação à sua estrutura, à sua cinética e à sua regulação. Os níveis de glutaminase hepática aumentam em resposta a um elevado aporte de proteína, e a glutaminase tipo renal aumenta na acidose metabólica. A liberação hidrolítica do nitrogênio amídico da glutamina na forma de amônia, em uma reação catalisada pela glutaminase (Figura 28-15), favorece fortemente a formação de glutamato. Uma reação análoga é catalisada pela L-asparaginase (EC 3.5.1.1). Nessas condições, a ação combinada da glutamina-sintase e da glutaminase catalisa a interconversão do íon amônio livre e da glutamina.

A formação e a secreção de amônia mantêm o equilíbrio acidobásico

A excreção da amônia produzida pelas células tubulares renais na urina facilita a conservação de cátions e a regulação do equilíbrio acidobásico. A produção de amônia a partir dos aminoácidos renais intracelulares, particularmente a glutamina, aumenta na **acidose metabólica** e diminui na **alcalose metabólica**.

A ureia é o principal produto final do catabolismo do nitrogênio nos seres humanos

A síntese de 1 mol de ureia requer 3 moles de ATP, 1 mol de íon amônio e 1 mol de aspartato e utiliza 5 enzimas (Figura 28-16). Dos seis aminoácidos que participam do processo, o N-acetilglutamato atua exclusivamente como ativador enzimático.

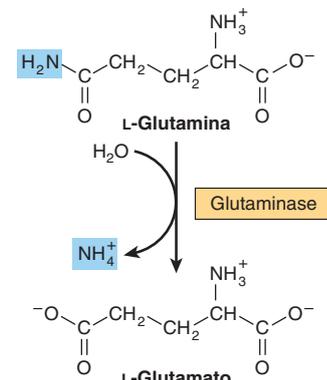


FIGURA 28-15 A reação catalisada pela glutaminase, EC 3.5.1.2. A reação prossegue essencialmente de forma irreversível na direção da formação de glutamato e NH₄⁺. Observe que o nitrogênio imida, e não o nitrogênio α-amino, é removido.

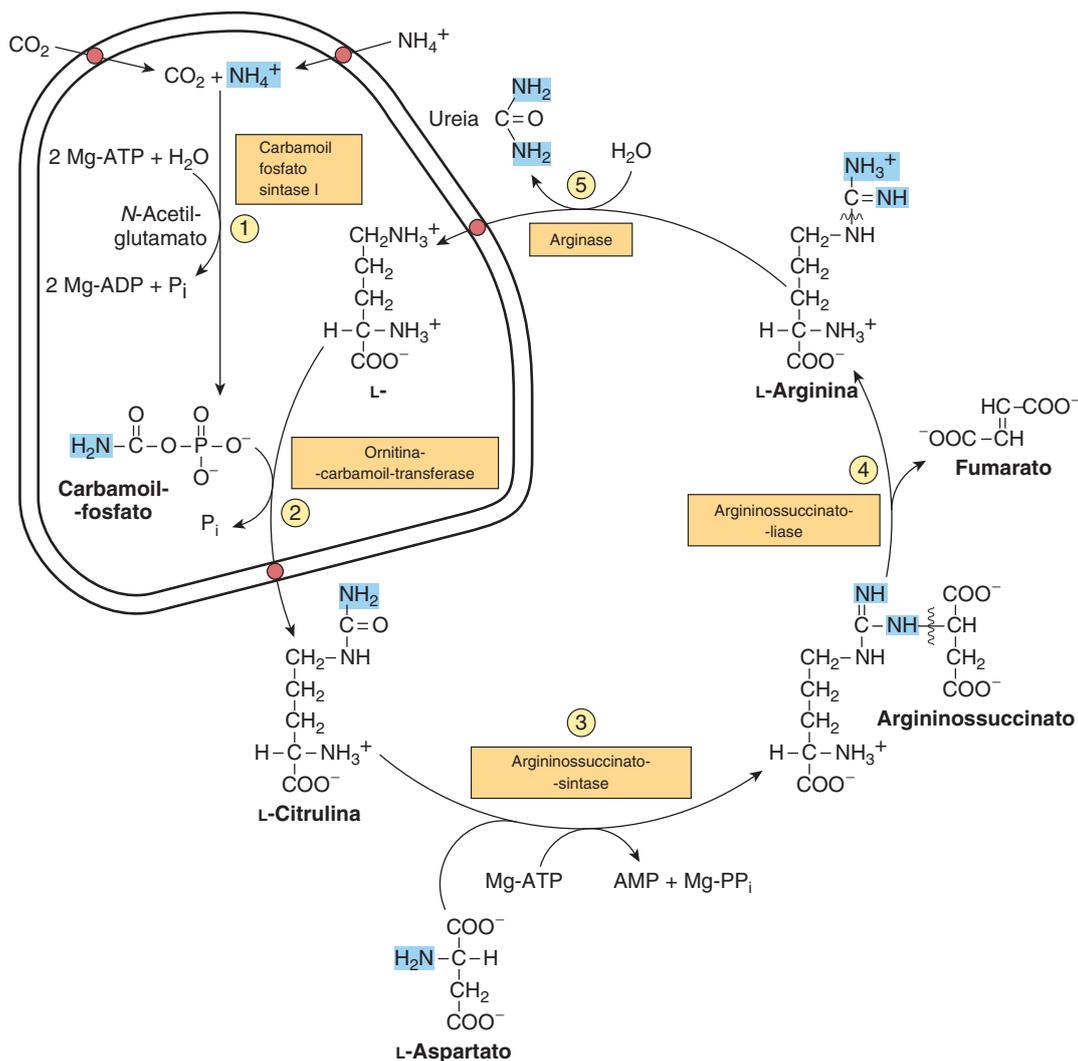


FIGURA 28-16 Reações e intermediários da biossíntese da ureia. Os grupos contendo nitrogênio que contribuem para a formação da ureia estão sombreados. As reações ① e ② ocorrem na matriz das mitocôndrias hepáticas, e as reações ③, ④ e ⑤ ocorrem no citosol dos hepatócitos. O CO₂ (na forma de bicarbonato), o íon amônio, a ornitina e a citrulina entram na matriz mitocondrial por meio de carreadores específicos (ver pontos vermelhos) presentes na membrana interna das mitocôndrias hepáticas.

Os outros servem como carreadores dos átomos que, por fim, formarão a ureia. A função metabólica principal da **ornitina**, da **citrulina** e do **argininosuccinato** em mamíferos é a síntese de ureia. A síntese de ureia é um processo cíclico. O íon amônio, o CO₂, o ATP e o aspartato são consumidos, ao passo que a ornitina consumida na reação 2 é regenerada na reação 5. Então, não há perda nem ganho efetivo de ornitina, citrulina, argininosuccinato ou arginina. Como indicado na Figura 28-16, algumas reações da síntese de ureia ocorrem na matriz mitocondrial, e outras reações, no citosol.

A carbamoil fosfato sintase I inicia a biossíntese da ureia

A condensação de CO₂, amônia e ATP para formar **carbamoil-fosfato** é catalisada pela **carbamoil-fosfato-sintase I** mitocondrial (EC 6.3.4.16). A forma citosólica dessa enzima, a carbamoil-fosfato-sintase II, utiliza glutamina, em vez de amônia, como doador de nitrogênio e atua na biossíntese

de pirimidinas (ver Figura 33-9). Por isso, a ação combinada da glutamato-desidrogenase e da carbamoil-fosfato-sintase I transporta em ambas as direções o nitrogênio amino para o carbamoil-fosfato, um composto com alto potencial de transferência de grupo.

A carbamoil-fosfato-sintase I, enzima limitante da velocidade do ciclo da ureia, é ativa apenas na presença de **N-acetilglutamato**, um ativador alostérico que aumenta a afinidade da sintase pelo ATP. A síntese de 1 mol de carbamoil-fosfato requer 2 moles de ATP. Um ATP serve como doador de grupo fosforil para a formação da ligação anidrido ácido misto de carbamoil-fosfato. O segundo ATP fornece a força motriz para a síntese da ligação amida do carbamoil-fosfato. Os outros produtos consistem em 2 moles de ADP e 1 mol de P_i (reação 1, Figura 28-16). A reação prossegue de modo sequencial. A reação do bicarbonato com o ATP forma carbonil-fosfato e ADP. Em seguida, a amônia desloca o ADP, formando carbamato e ortofosfato. A fosforilação do carbamato pelo segundo ATP forma carbamoil-fosfato.

A combinação do carbamoil-fosfato com a ornitina forma a citrulina

A **L-ornitina-transcarbamoilase** (EC 2.1.3.3) catalisa a transferência do grupo carbamoil do carbamoil-fosfato para a ornitina, formando citrulina e ortofosfato (reação 2, Figura 28-16). Embora a reação ocorra na matriz mitocondrial, tanto a formação de ornitina quanto o metabolismo subsequente da citrulina ocorrem no citosol. Dessa forma, a entrada de ornitina nas mitocôndrias e a saída da citrulina das mitocôndrias envolvem permeases da membrana mitocondrial interna (Figura 28-16).

A combinação da citrulina com o aspartato forma o argininossuccinato

A **argininossuccinato-sintase** (EC 6.3.4.5) liga o aspartato e a citrulina pelo grupo amino do aspartato (reação 3, Figura 28-16) e proporciona o segundo nitrogênio da ureia. Essa reação requer a presença de ATP e envolve a reação intermediária de citrullil-AMP. O deslocamento subsequente do AMP pelo aspartato forma o argininossuccinato.

A clivagem do argininossuccinato forma arginina e fumarato

A clivagem de argininossuccinato é catalisada pela **argininossuccinato-liase** (EC 4.3.2.1). A reação prossegue com retenção de todos os três nitrogênios na arginina e com liberação do esqueleto do aspartato na forma de fumarato (reação 4, Figura 28-16). A adição subsequente de água ao fumarato forma L-malato, cuja subsequente oxidação depende de NAD^+ forma oxalacetato. Essas duas reações são análogas às reações do ciclo do ácido cítrico, mas são catalisadas pelas enzimas **citosólicas fumarase** e **malato-desidrogenase**. A transaminação do oxalacetato pela glutamato-aminotransferase forma novamente aspartato. Portanto, o esqueleto de carbono do aspartato-fumarato atua como carreador de nitrogênio do glutamato em um precursor da ureia.

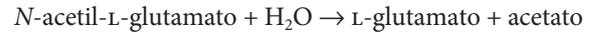
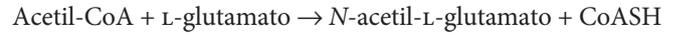
A clivagem da arginina libera ureia e forma ornitina novamente

A clivagem hidrolítica do grupo guanidino da arginina, catalisada pela **arginase** hepática (EC 3.5.3.1), libera ureia (reação 5, Figura 28-16). O outro produto, a ornitina, entra novamente nas mitocôndrias hepáticas e participa de ciclos adicionais de síntese de ureia. A ornitina e a lisina são potentes inibidores da arginase e competem com a arginina. A arginina também atua como precursora do potente relaxante muscular óxido nítrico (NO) em uma reação dependente de Ca^{2+} catalisada pela NO-sintase.

A carbamoil-fosfato-sintase I é a enzima marca-passo do ciclo da ureia

A atividade da carbamoil-fosfato-sintase I é determinada pelo **N-acetilglutamato**, cujo nível no estado de equilíbrio dinâmico é determinado pelo equilíbrio entre a sua taxa de síntese, a partir de acetil-CoA e glutamato, e a sua taxa de hidrólise

a acetato e glutamato, reações catalisadas pela **N-acetilglutamato-sintase** (NAGS) e **N-acetilglutamato-hidrolase**, respectivamente.



Mudanças importantes na dieta podem aumentar em 10 a 20 vezes as concentrações das enzimas individuais do ciclo da ureia. Por exemplo, o jejum prolongado eleva os níveis enzimáticos, presumivelmente, para lidar com a produção aumentada de amônia que acompanha o aumento da degradação proteica induzido pelo jejum prolongado.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Os distúrbios metabólicos comparativamente raros, porém bem caracterizados e clinicamente devastadores, associados às enzimas da biossíntese da ureia ilustram os seguintes princípios gerais das doenças metabólicas hereditárias.

1. Sinais e sintomas clínicos semelhantes ou idênticos podem caracterizar várias mutações genéticas em um gene que codifica determinada enzima ou em enzimas que catalisam reações sucessivas em uma via metabólica.
2. A terapia racional baseia-se na compreensão das reações bioquímicas relevantes catalisadas por enzimas nos indivíduos saudáveis e nos indivíduos acometidos.
3. A identificação de intermediários e de produtos derivados que se acumulam antes de um bloqueio metabólico fornece a base para testes de rastreamento metabólico que podem revelar a reação que está comprometida.
4. O diagnóstico definitivo envolve um ensaio quantitativo da atividade da enzima com suspeita de deficiência.
5. A sequência de DNA do gene que codifica determinada enzima mutante é comparada com a do gene tipo selvagem para identificar a(s) mutação(ões) específica(s) que causa(m) a doença.
6. O aumento exponencial no sequenciamento do DNA dos genes humanos identificou dezenas de mutações de um gene afetado, as quais são benignas ou estão associadas a sintomas de gravidade variável de determinado distúrbio metabólico.

OS DISTÚRBIOS METABÓLICOS ESTÃO ASSOCIADOS COM CADA UMA DAS REAÇÕES DO CICLO DA UREIA

Foram descritos defeitos em cada enzima do ciclo da ureia. Muitas das mutações causadoras foram mapeadas, sendo identificados defeitos específicos nas enzimas codificadas. Cinco doenças bem-documentadas estão associadas a defeitos na biossíntese das enzimas do ciclo da ureia. A análise genética e molecular localizou os *loci* das mutações associadas a cada deficiência, e cada uma delas exibe consideráveis variabilidades genética e fenotípica (**Tabela 28-1**).

TABELA 28-1 Enzimas dos distúrbios metabólicos hereditários do ciclo da ureia

Enzima	Número no catálogo de enzimas	Referência OMIM ^a	Figura e reação
Carbamoil-fosfato-sintase I	6.3.4.16	237300	28-13①
Ornitina-carbamoil-transferase	2.1.3.3	311250	28-13②
Argininossuccinato-sintase	6.3.4.5	215700	28-13③
Argininossuccinato-liase	4.3.2.1	608310	28-13④
Arginase	3.5.3.1	608313	28-13⑤

^aBase de dados da herança mendeliana no homem *online* (Online Mendelian Inheritance in Man): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

Os distúrbios associados ao ciclo da ureia caracterizam-se por hiperamoniemia, encefalopatia e alcalose respiratória. Quatro das cinco doenças metabólicas, as deficiências da carbamoil-fosfato-sintase I, da ornitina-carbamoil-transferase, da argininossuccinato-sintase e da argininossuccinato-liase, resultam em acúmulo de precursores da ureia, principalmente amônia e glutamina. A intoxicação por amônia é mais grave quando o bloqueio metabólico ocorre nas reações 1 ou 2 (Figura 28-16), visto que, se houver síntese de citrulina, alguma amônia já é removida pela sua ligação covalente a um metabólito orgânico.

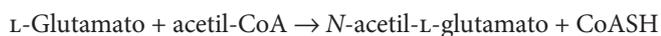
Os sintomas clínicos compartilhados por todos os distúrbios do ciclo da ureia consistem em vômitos, aversão a alimentos ricos em proteínas, ataxia intermitente, irritabilidade, letargia e deficiência intelectual grave. A apresentação clínica mais notável é observada em crianças, que inicialmente têm aparência normal, mas que, em seguida, exibem letargia progressiva, hipotermia e apneia, devido aos níveis plasmáticos elevados de amônia. As manifestações clínicas e o tratamento de todos os cinco distúrbios são semelhantes. Uma dieta hipoproteica ingerida na forma de refeições pequenas e frequentes, para evitar aumentos súbitos nos níveis sanguíneos de amônia, pode ser acompanhada de melhora significativa e minimização da lesão cerebral. A terapia dietética tem por objetivo fornecer proteínas, arginina e energia suficientes para promover o crescimento e o desenvolvimento, bem como minimiza simultaneamente as perturbações metabólicas.

Carbamoil-fosfato-sintase I

O *N*-acetilglutamato é essencial para a atividade da carbamoil-fosfato-sintase I, EC 6.3.4.16 (reação 1, Figura 28-16). Defeitos na carbamoil-fosfato-sintase I são responsáveis pela doença metabólica relativamente rara (frequência estimada de 1:62.000), denominada “hiperamoniemia tipo 1”.

N-Acetilglutamato-sintase

A *N*-acetilglutamato-sintase (NAGS), EC 2.3.1.1, catalisa a formação de acetil-CoA e glutamato a partir de *N*-acetilglutamato, essencial para a atividade da carbamoil-fosfato-sintase I.



Embora as manifestações clínicas e as características bioquímicas da deficiência de NAGS sejam indistinguíveis daquelas observadas em um defeito da carbamoil-fosfato-sintase I, a deficiência de NAGS pode responder à administração de *N*-acetilglutamato.

Ornitina-permease

A síndrome de hiperornitinemia, hiperamoniemia e homocitrulinúria (**síndrome HHH**) resulta da mutação do gene *ORNT1* que codifica a ornitina-permease da membrana mitocondrial. A incapacidade de importar a ornitina citosólica para a matriz mitocondrial torna o ciclo da ureia inoperante, com consequente hiperamoniemia, e hiperornitinemia devido ao acúmulo concomitante de ornitina citosólica. Na ausência de seu receptor normal (ornitina), o carbamoil-fosfato mitocondrial carbamoila a lisina em homocitrulina, resultando em homocitrulinúria.

Ornitina-transcarbamoilase

A deficiência ligada ao cromossomo X, denominada “hiperamoniemia tipo 2”, reflete um defeito da ornitina-transcarbamoilase (reação 2, Figura 28-16). As mães também exibem hiperamoniemia e aversão por alimentos ricos em proteína. Os níveis de glutamina estão elevados no sangue, no líquido cefalorraquidiano (LCS) e na urina, provavelmente em consequência da síntese aumentada de glutamina em resposta aos níveis elevados de amônia nos tecidos.

Argininossuccinato-sintase

Além de os pacientes carecerem de atividade detectável da argininossuccinato-sintase (reação 3, Figura 28-16), foi relatada uma elevação de 25 vezes no valor de K_m para a citrulina. Na citrulinemia resultante, os níveis de citrulina no plasma e no LCS estão elevados, e ocorre excreção diária de 1 a 2 g de citrulina.

Argininossuccinato-liase

A acidúria argininossuccínica, acompanhada por níveis elevados de argininossuccinato no sangue, no LCS e na urina, está associada com cabelo frível, em tufo (tricorrexe nodosa). São conhecidos os tipos de início precoce e tardio. O defeito metabólico reside na argininossuccinato-liase (reação 4, Figura 28-16). O diagnóstico baseia-se na determinação da atividade da argininossuccinato-liase eritrocitária, que pode ser efetuada em amostra de sangue do cordão umbilical ou em células do líquido amniótico.

Arginase

A hiperargininemia é um defeito autossômico recessivo no gene da arginase (reação 5, Figura 28-16). Diferentemente de outros distúrbios do ciclo da ureia, os primeiros sintomas de hiperargininemia, em geral, não aparecem até os 2 a 4 anos de idade. Os níveis de arginina no sangue e no LCS são elevados. O padrão de aminoácidos urinários, que se assemelha ao da

lisinocistinúria (ver Capítulo 29), pode refletir a competição com lisina e cisteína pela arginina para reabsorção nos túbulos renais.

A análise do sangue do recém-nascido por espectrometria de massa em tandem pode detectar doenças metabólicas

As doenças metabólicas causadas pela ausência ou pela disfunção das enzimas metabólicas podem ser devastadoras. Entretanto, a intervenção nutricional precoce pode, em muitos casos, melhorar os efeitos adversos que de outro modo seriam inevitáveis. Assim, a detecção precoce dessas doenças metabólicas é de suma importância. Nos Estados Unidos, desde a implementação dos programas de rastreamento neonatal, na década de 1960, todos os Estados passaram a efetuar um rastreamento metabólico dos recém-nascidos, embora o escopo do rastreamento efetuado varie entre os diferentes Estados. A técnica poderosa e sensível da **espectrometria de massa (MS, mass spectrometry) em tandem** (ver Capítulo 4) pode, em poucos minutos, detectar mais de 40 itens importantes analisados na detecção dos distúrbios metabólicos. Nos Estados Unidos, a maioria dos Estados emprega a espectrometria de massa em sequência para rastreamento em recém-nascidos na detecção de distúrbios metabólicos, como acidemias orgânicas, aminoacidemias, distúrbios da oxidação dos ácidos graxos e defeitos das enzimas do ciclo da ureia. Um artigo publicado na *Clinical Chemistry* 2006 39:315 fornece uma revisão da teoria da MS em tandem, a sua aplicação na detecção de distúrbios metabólicos e as situações que podem produzir resultados falsos-negativos, incluindo uma extensa tabela de itens analisados detectáveis e as doenças metabólicas relevantes.

A terapia gênica pode ser promissora na correção de defeitos na biossíntese da ureia?

A terapia gênica para correção dos defeitos nas enzimas do ciclo da ureia constitui uma área de pesquisa ativa. Apesar dos resultados animadores em modelos animais, usando um vetor de adenovírus para tratamento da citrulinemia, a terapia gênica não fornece nenhuma solução efetiva para os seres humanos no momento atual.

RESUMO

- Os seres humanos degradam 1 a 2% de suas proteínas corporais diariamente, a uma taxa que varia muito entre as proteínas e com o estado fisiológico. As enzimas reguladoras essenciais frequentemente apresentam meias-vidas curtas.
- As proteínas são degradadas por vias dependentes e independentes de ATP. A ubiquitina marca muitas proteínas intracelulares para sofrer degradação. Os receptores de superfície nas células hepáticas ligam-se e internalizam as assialoglicoproteínas circulantes destinadas à degradação lisossômica.
- As proteínas poliubiquitinadas são degradadas por proteases na superfície interna de uma macromolécula cilíndrica, o proteossomo. A entrada no proteossomo é fechada por uma proteína em formato de rosca que impede a entrada de todas as proteínas, exceto as proteínas poliubiquitinadas.
- Os peixes excretam diretamente quantidades altamente tóxicas de NH_3 . Os pássaros convertem NH_3 em ácido úrico. Os vertebrados superiores convertem NH_3 em ureia.

- A transaminação canaliza o nitrogênio dos aminoácidos para o glutamato. A GDH ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio.
- A glutamina-sintase converte a NH_3 em glutamina atóxica. A glutaminase libera NH_3 para uso na síntese de ureia.
- A NH_3 , o CO_2 e o nitrogênio amida do aspartato fornecem os átomos da ureia.
- A síntese hepática de ureia ocorre, em parte, na matriz mitocondrial e, em parte, no citosol.
- A biossíntese da ureia é regulada por alterações dos níveis enzimáticos e pela regulação alostérica da carbamoyl-fosfato-sintase I pelo *N*-acetilglutamato.
- As doenças metabólicas estão associadas a defeitos em cada enzima do ciclo da ureia, da ornitina-permease associada à membrana e da NAGS.
- Os distúrbios metabólicos da biossíntese de ureia ilustram seis princípios gerais de todos os distúrbios metabólicos.
- A espectrometria de massa em tandem constitui a técnica de escolha para o rastreamento em recém-nascidos para doenças metabólicas hereditárias.

REFERÊNCIAS

- Adam S, Almeida MF, Assoun M et al: Dietary management of urea cycle disorders: European practice. *Mol Genet Metab* 2013;110:439.
- Caldovic L, Morizono H, Tuchman M: Mutations and polymorphisms in the human *N*-acetylglutamate synthase (NAGS) gene. *Hum Mutat* 2007;28:754.
- Crombez EA, Cederbaum SD: Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab* 2005;84:243.
- Elpeleg O, Shaag A, Ben-Shalom E, et al: *N*-acetylglutamate synthase deficiency and the treatment of hyperammonemic encephalopathy. *Ann Neurol* 2002;52:845.
- Garg U, Dasouki M: Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry. *Clinical and laboratory aspects. Clin Biochem* 2006;39:315.
- Gyato K, Wray J, Huang ZJ, et al: Metabolic and neuropsychological phenotype in women heterozygous for ornithine transcarbamylase deficiency. *Ann Neurol* 2004;55:80.
- Häberle J, Görg B, Rutsch F, et al: Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N Engl J Med* 2005;353:1926.
- Häberle J, Pauli S, Schmidt E, et al: Mild citrullinemia in caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase deficiency (citrullinemia type 1). *Mol Genet Metab* 2003;80:302.
- Jiang YH, Beaudet AL: Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Pediatr* 2004;16:419.
- Pal A, Young MA, Donato NJ: Emerging potential of therapeutic targeting of ubiquitin-specific proteases in the treatment of cancer. *Cancer Res* 2014;14:721.
- Pickart CM: Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001;70:503.
- Scriver CR: Garrod's foresight; our hindsight. *J Inher Metab Dis* 2001;24:93.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Sylvestersen KB, Young C, Nielsen ML: Advances in characterizing ubiquitylation sites by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 2013;17:49.
- Yi JJ, Ehlers MD: Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev* 2007;59:206.

Catabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar os principais catabólitos dos esqueletos de carbono dos aminoácidos comuns e os principais destinos metabólicos desses catabólitos.
- Escrever a equação para uma reação da aminotransferase (transaminase) e ilustrar o papel desempenhado pela coenzima.
- Resumir as vias metabólicas de cada um dos aminoácidos comuns e identificar as reações associadas a distúrbios metabólicos clinicamente significativos.
- Fornecer exemplos de aminoacidúrias que surgem em decorrência de defeitos na reabsorção tubular glomerular e descrever as consequências do comprometimento da absorção intestinal de triptofano.
- Explicar por que os defeitos metabólicos em diferentes enzimas envolvidas no catabolismo de um aminoácido específico podem estar associados a sinais e sintomas clínicos semelhantes.
- Descrever as implicações do defeito metabólico na Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase para o catabolismo da prolina e da 4-hidroxiprolina.
- Relatar como o nitrogênio α -amino da prolina e da lisina é removido por processos diferentes de transaminação.
- Estabelecer analogias entre as reações que participam do metabolismo dos ácidos graxos e dos aminoácidos de cadeia ramificada.
- Identificar os defeitos metabólicos específicos na hipervalinemia, na doença da urina do xarope de bordo, na cetonúria intermitente de cadeias ramificadas, na acidemia isovalérica e na acidúria metilmalônica.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

O Capítulo 28 descreveu a remoção por transaminação e o destino metabólico dos átomos de nitrogênio da maioria dos L- α -aminoácidos das proteínas. Este capítulo aborda os destinos metabólicos dos esqueletos hidrocarbônicos resultantes de cada um dos aminoácidos proteicos. Os tópicos incluem as enzimas, os intermediários formados durante o catabolismo dos esqueletos de carbono para intermediários anfíóicos e as diversas doenças metabólicas associadas, ou “erros inatos do metabolismo”. A maioria dos distúrbios do catabolismo de aminoácidos é rara, mas, se não tratados podem levar a dano cerebral irreversível e mortalidade precoce. Portanto, a detecção pré-natal ou pós-natal imediata dos distúrbios metabólicos e a instituição do tratamento no momento apropriado são essenciais. A capacidade de detectar as atividades de enzimas

em culturas de células do líquido amniótico facilita o diagnóstico pré-natal por amniocentese. Atualmente, todos os estados norte-americanos realizam testes em recém-nascidos para até 40 doenças metabólicas. Esses testes incluem, entre outros, os distúrbios associados a defeitos no catabolismo dos aminoácidos. Os testes de triagem mais confiáveis utilizam a espectrometria de massa em *tandem* ou sequencial para detectar, em algumas gotas de sangue do recém-nascido, catabólitos sugestivos de determinado defeito metabólico. Os metabólitos detectados identificam o defeito metabólico através da atividade reduzida ou ausente de determinada enzima. O tratamento consiste, basicamente, em dietas com baixo teor do aminoácido cujo catabolismo está comprometido.

Mutações de um gene ou de regiões reguladoras do DNA associadas podem resultar tanto em falha na síntese da enzima codificada como na síntese de uma enzima parcial ou

completamente não funcional. Algumas mutações não afetam a atividade enzimática de maneira negativa, ao passo que as mutações que comprometem a estrutura tridimensional da enzima ou que perturbam sítios catalíticos ou reguladores de uma enzima podem ter consequências metabólicas graves. A baixa eficiência catalítica de uma enzima mutante pode resultar do posicionamento inadequado de resíduos envolvidos na catálise ou na ligação de um substrato, coenzima ou íon metálico. As mutações também podem comprometer a capacidade de determinadas enzimas responderem apropriadamente aos sinais que modulam sua atividade, alterando a afinidade da enzima por um regulador alostérico da atividade. Tendo em vista que diferentes mutações podem produzir efeitos semelhantes sobre qualquer um dos fatores já mencionados, várias mutações podem resultar nos mesmos sinais e sintomas clínicos. Portanto, constituem doenças moleculares distintas em nível molecular. Para complementar os estudos sobre os distúrbios do metabolismo de aminoácidos discutidos neste capítulo, o leitor pode consultar trabalhos de referência sobre este tópico, como Scriver e colaboradores, 2001.

OS AMINOÁCIDOS SÃO CATABOLIZADOS A INTERMEDIÁRIOS PARA BIOSÍNTESE DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS

Estudos nutricionais realizados no período de 1920 a 1940, reforçados e confirmados por estudos que utilizaram aminoácidos marcados com isótopos, conduzidos de 1940 a 1950, estabeleceram a interconversão dos átomos de carbono dos lipídeos, dos carboidratos e das proteínas. Esses estudos também revelaram que todo o esqueleto de carbono de todos os aminoácidos, ou parte dele, é convertido a carboidratos (13 aminoácidos), lipídeos (1 aminoácido) ou lipídeos e carboidratos (5 aminoácidos) (Tabela 29-1). A Figura 29-1 fornece uma visão geral dos aspectos globais dessas interconversões.

TABELA 29-1 Destino dos esqueletos de carbono dos L- α -aminoácidos das proteínas

Convertidos em intermediários anfibólicos que formam			
Carboidratos (glicogênicos)	Lipídeos (cetogênicos)	Glicogênio e lipídeos (glicogênicos e cetogênicos)	
Ala	Hip	Leu	Ile
Arg	Met		Lis
Asp	Pro		Phe
Cis	Ser		Trp
Glu	Tre		Tir
Gli	Val		
His			

O CATABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS GERALMENTE INICIA COM TRANSAMINAÇÃO

A remoção do nitrogênio α -amino por transaminação, catalisada por uma aminotransferase (uma transaminase; ver Figura 28-9), é a primeira reação catabólica da maior parte dos aminoácidos proteicos. As exceções são prolina, hidroxiprolina, treonina e lisina, cujos grupos α -amino não participam de transaminação. Em seguida, os esqueletos hidrocarbonados remanescentes são degradados em intermediários anfibólicos, conforme ilustrado na Figura 29-1.

A asparagina e o aspartato formam oxalacetato

Todos os quatro carbonos da asparagina e do aspartato formam **oxalacetato** por meio de reações catalisadas pela **asparaginase** (EC 3.5.1.1) e por uma **transaminase** (Figura 29-2, parte superior). Os defeitos metabólicos nas transaminases, que desempenham funções anfibólicas centrais, podem ser

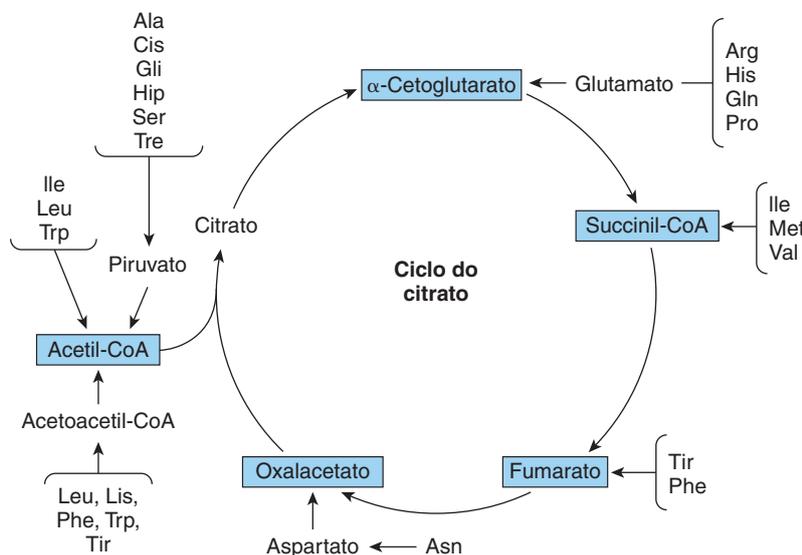


FIGURA 29-1 Visão geral dos intermediários anfibólicos que resultam do catabolismo dos aminoácidos proteicos.

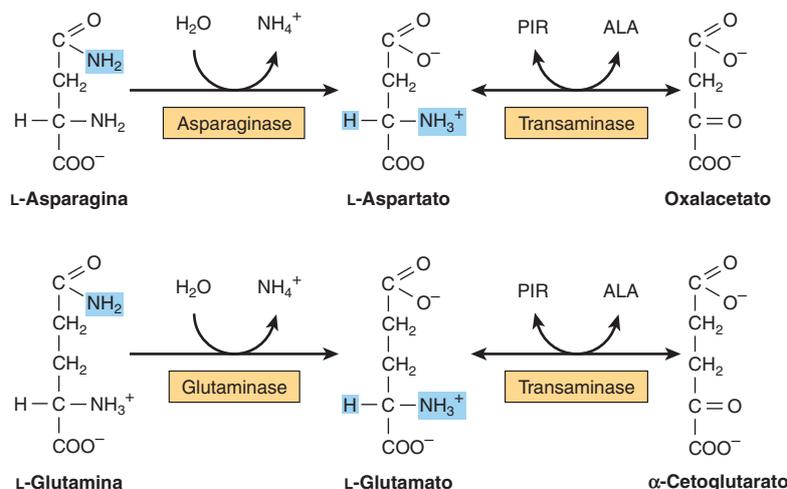


FIGURA 29-2 Catabolismo da L-asparagina (parte superior) e da L-glutamina (parte inferior) a intermediários anfíbióticos. (ALA, L-alanina; PIR, piruvato.) Nesta figura e nas seguintes, a cor azul realça as porções das moléculas que sofrem alteração química.

incompatíveis com a vida. Consequentemente, não existe nenhum defeito metabólico conhecido associado a essa via catabólica curta.

A glutamina e o glutamato formam α -cetoglutarato

O catabolismo da glutamina e do glutamato equipara-se ao da asparagina e do aspartato em reações catalisadas pela **glutaminase** (EC 3.5.1.2) e por uma **transaminase**, formando α -cetoglutarato (Figura 29-2, parte inferior). O glutamato e o aspartato são substratos para a mesma transaminase, ao passo que a desamidação de suas amidas correspondentes é catalisada por enzimas diferentes: a asparaginase e a glutaminase. Possivelmente pela razão já citada, não existe nenhum defeito metabólico conhecido da via catabólica da glutamina e do glutamato.

Entretanto, o catabolismo de muitos outros aminoácidos está associado a distúrbios metabólicos significativos. Esses distúrbios metabólicos são discutidos a seguir, nos tópicos do catabolismo de cada aminoácido, e estão resumidos na **Tabela 29-2**. Esta tabela lista a enzima comprometida, o seu número (EC) no catálogo de enzimas da IUB (International Union of Biochemistry), uma referência a uma figura específica e reação numerada e o código numérico no banco de dados da Online Mendelian Inheritance in Man (**OMIM**).

Prolina

O catabolismo da prolina ocorre nas mitocôndrias. Como a prolina não participa em transaminação, o seu nitrogênio do grupo α -amino permanece retido ao longo de uma oxidação de duas fases que forma glutamato. A oxidação a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato é catalisada pela prolina-desidrogenase, EC 1.5.99.8. A oxidação subsequente a glutamato é catalisada pela Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase (também chamada de glutamato- γ -semialdeído-desidrogenase, EC 1.5.1.12) (**Figura 29-3**). Existem dois distúrbios metabólicos do catabolismo da prolina. Herdados de forma autossômica recessiva, ambos são compatíveis com uma vida adulta normal. O bloqueio

metabólico na **hiperprolinemia tipo I** ocorre na **prolina-desidrogenase**. Não há nenhum comprometimento associado ao catabolismo da hidroxiprolina. O bloqueio metabólico na **hiperprolinemia tipo II** é na Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase, que também participa no catabolismo da arginina, da ornitina e da hidroxiprolina (ver a seguir). Como o catabolismo da prolina e da hidroxiprolina é afetado, tanto Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato quanto Δ^1 -pirrolina-3-hidroxi-5-carboxilato são excretadas (ver Figura 29-12).

Arginina e ornitina

As reações iniciais do catabolismo da arginina consistem na conversão em ornitina, seguida de transaminação da ornitina formando glutamato- γ -semialdeído (**Figura 29-4**). O catabolismo subsequente do glutamato- γ -semialdeído a α -cetoglutarato ocorre conforme descrito para a prolina (ver Figura 29-3). A ocorrência de mutações na **ornitina- δ -aminotransferase** (ornitina-transaminase, EC 2.6.1.13) provoca elevações dos níveis plasmáticos e urinários de ornitina e está associada à **atrofia girata da coróide e da retina**. O tratamento consiste em restrição da arginina na dieta. Na **síndrome hiperornitínia-hiperamônia**, o **cotransportador ornitina-citrulina** mitocondrial defeituoso (ver Figura 28-16) prejudica o transporte de ornitina para a mitocôndria, onde ela participa como intermediária na síntese da ureia.

Histidina

O catabolismo da histidina ocorre por meio do urocato, 4-imidazolona-5-propionato e *N*-formiminoglutamato (Figlu). A transferência do grupo formimino para o tetraidrofolato forma glutamato e, em seguida, α -cetoglutarato (**Figura 29-5**). Na **deficiência de ácido fólico**, a transferência do grupo formimino está comprometida, e o Figlu é excretado. Desse modo, a excreção de Figlu após uma dose de histidina pode ser utilizada para detectar a deficiência de ácido fólico. Os distúrbios benignos do catabolismo da histidina incluem a **histidinemia** e a **acidúria urocânica** associada ao comprometimento da **histidase**.

TABELA 29-2 Doenças metabólicas do catabolismo dos aminoácidos

Enzima deficiente	Número no catálogo de enzimas	Referência OMIM ^a	Principais sinais e sintomas	Figura e reação
S-Adenosil-homocisteína-hidrolase	3.3.1.1	180960	Hipermetioninemia	29-19 ③
Arginase	3.5.3.1	207800	Argininemia	29-4 ①
Cistationa-β-sintase	4.2.1.22	236200	Homocistinúria	29-19 ④
Fumarilacetato-hidrolase	3.7.1.12	276700	Tirosinemia tipo I (tirosinose)	29-13 ④
Glicina N-metiltransferase	2.1.1.20	606664	Hipermetioninemia	29-13 ②
Histidina-amônia-liase (histidase)	4.3.1.3	609457	Histidinemia e acidemia urocânica	29-5 ①
Homogentisato-oxidase	1.13.1.5	607474	Alcaptonúria; excreção de homogentisato	29-13 ③
p-Hidroxfenilpiruvato-hidroxilase	1.13.1.27	276710	Tirosinemia neonatal	29-13 ③
Isovaleril-CoA-desidrogenase	1.3.99.10	607036	Acidemia isovalérica	29-20 ③
Complexo da descarboxilase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada		248600	Cetonúria de cadeias ramificadas (MSUD)	29-20 ①
Metionina-adenosiltransferase	2.5.1.6	250850	Hipermetioninemia	29-18 ①
Ornitina-δ-amino transferase	2.6.1.13	258870	Ornitemia, atrofia girata	29-4 ②
Fenilalanina-hidroxilase	1.14.16.1	261600	Fenilcetonúria tipo I (clássica)	27-10 ①
Prolina-desidrogenase	1.5.99.8	606810	Hiperprolinemia tipo I	29-3 ①
Δ ¹ -Pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase	1.5.1.12	606811	Hiperprolinemia tipo II e hiper-4-hidroxi-prolinemia	29-3 ②
Sacaropina-desidrogenase	1.5.1.7	268700	Sacaropinúria	29-15 ②
Tirosina-amino transferase	2.6.1.15	613018	Tirosinemia tipo II	29-13 ①

^aBanco de dados Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

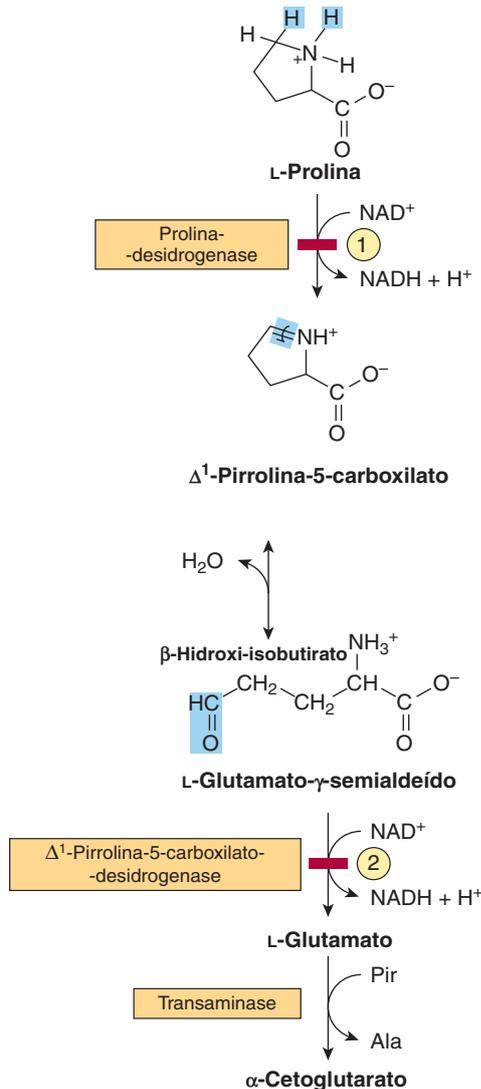
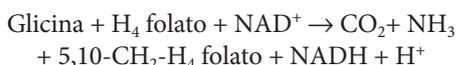


FIGURA 29-3 Catabolismo da prolina. As barras vermelhas e os números dentro dos círculos indicam o local dos defeitos metabólicos hereditários: ① hiperprolinemia tipo I e ② hiperprolinemia tipo II.

CATABOLISMO DE GLICINA, SERINA, ALANINA, CISTEÍNA, TREONINA E 4-HIDROXIPROLINA

Glicina

O complexo de clivagem da glicina das mitocôndrias hepáticas degrada a glicina em CO_2 e NH_4^+ e forma $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno tetra-hidrofolato.



O sistema de clivagem da glicina (Figura 29-6) consiste em três enzimas e uma “H-proteína” que apresenta uma fração di-hidrolipoil ligada de modo covalente. A Figura 29-6 também ilustra as reações individuais e os intermediários na clivagem da glicina. Na **hiperglicinemia não cetótica** – um erro inato raro

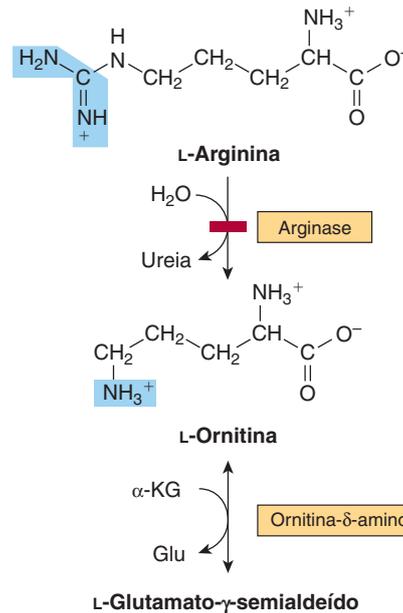


FIGURA 29-4 Catabolismo da arginina. A clivagem da L-arginina, catalisada pela arginase, forma ureia e L-ornitina. Essa reação (barra vermelha) representa o local do defeito metabólico hereditário na hiperargininemia. A subsequente transaminação da ornitina a glutamato-γ-semialdeído é seguida pela conversão a α-cetoglutarato.

da degradação da glicina, atualmente detectado apenas na Finlândia –, a glicina acumula-se em todos os tecidos do corpo, inclusive no sistema nervoso central. O distúrbio **hiperoxalúria primária** consiste na incapacidade de catabolizar o glioxilato formado pela desaminação da glicina. A oxidação subsequente do glioxilato a oxalato resulta em urolitíase, nefrocalcinose e mortalidade precoce por insuficiência renal ou hipertensão. A **glicinúria** resulta de defeito na reabsorção tubular renal.

Serina

Após a sua conversão em glicina, catalisada pela glicina hidroximetiltransferase (EC 2.1.2.1), o catabolismo da serina funde-se com o da glicina (Figura 29-7).

Alanina

A transaminação da α-alanina forma piruvato. Provavelmente em virtude de seu papel central no metabolismo, não existe nenhum defeito metabólico conhecido no catabolismo da α-alanina.

Cistina e cisteína

A cistina é primeiramente reduzida a cisteína pela **cistina-reductase**, EC 1.8.1.6 (Figura 29-8). Em seguida, duas vias diferentes convertem a cisteína a piruvato (Figura 29-9). Existem várias anormalidades no metabolismo da cisteína. Ocorre excreção de cistina, lisina, arginina e ornitina na **cistina-lisinúria (cistinúria)**, um defeito na reabsorção renal desses aminoácidos. Com exceção dos cálculos de cistina, a cistinúria é benigna. O dissulfeto misto de L-cisteína e L-homocisteína (Figura 29-10) excretado por pacientes com cistinúria é mais solúvel do que a cistina e diminui a formação de cálculos de cistina.

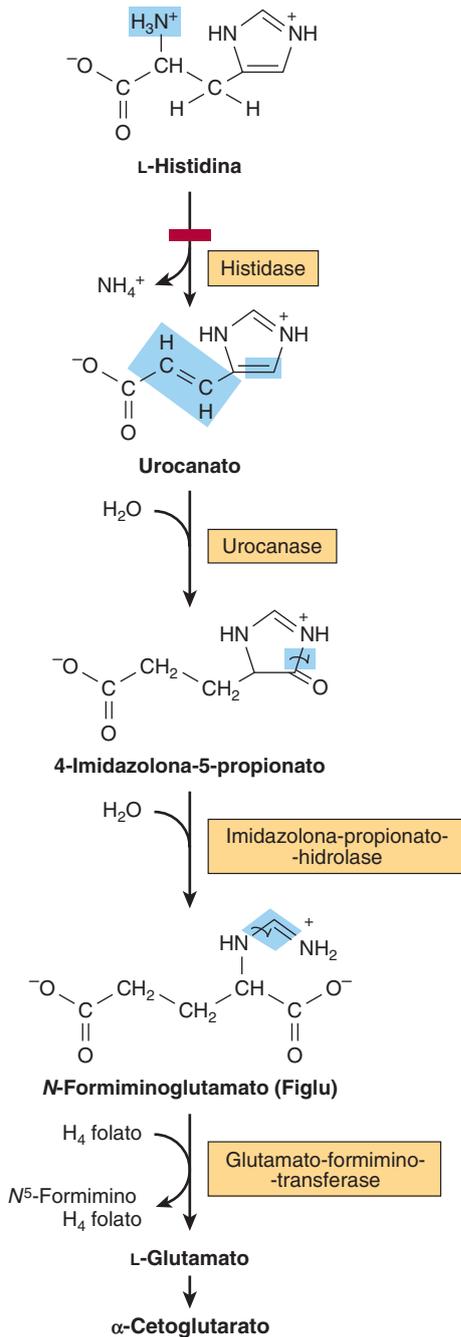
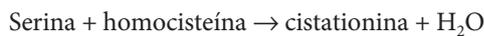


FIGURA 29-5 Catabolismo de L-histidina a α -cetoglutarato. (H_4 folato, tetra-hidrolato.) A barra vermelha indica o local de um defeito metabólico hereditário.

Vários defeitos metabólicos resultam em **homocistinúria** responsiva ou não responsiva à vitamina B_6 . Entre estes encontra-se a deficiência na reação catalisada pela cistationina β -sintase, EC 4.2.1.22:



As consequências incluem osteoporose e deficiência intelectual. O transporte deficiente da cistina mediado por carreador resulta em **cistinose (doença de armazenamento de cistina)** com depósito de cristais de cistina nos tecidos e mortalidade

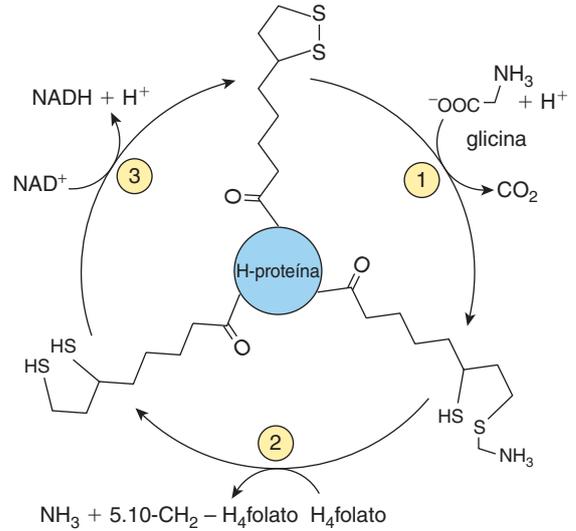


FIGURA 29-6 O sistema de clivagem da glicina das mitocôndrias hepáticas. O complexo de clivagem da glicina consiste em três enzimas e uma “H-proteína” que apresenta di-hidrolipoato ligado de modo covalente. Os catalisadores das reações numeradas são ① glicina-desidrogenase (descarboxilação), ② uma aminometiltransferase formadora de amônia e ③ di-hidrolipoamida-desidrogenase. (H_4 folato, tetra-hidrolato.)

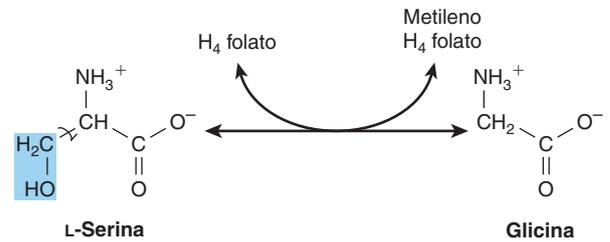


FIGURA 29-7 Interconversão de serina e glicina pela glicina hidroximetiltransferase. (H_4 folato, tetra-hidrolato.)

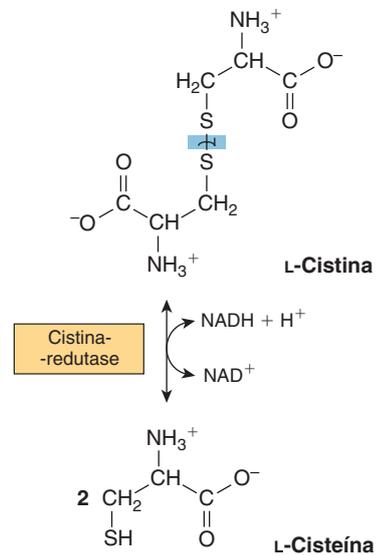


FIGURA 29-8 Redução de cistina à cisteína pela reação da cistina-reductase.

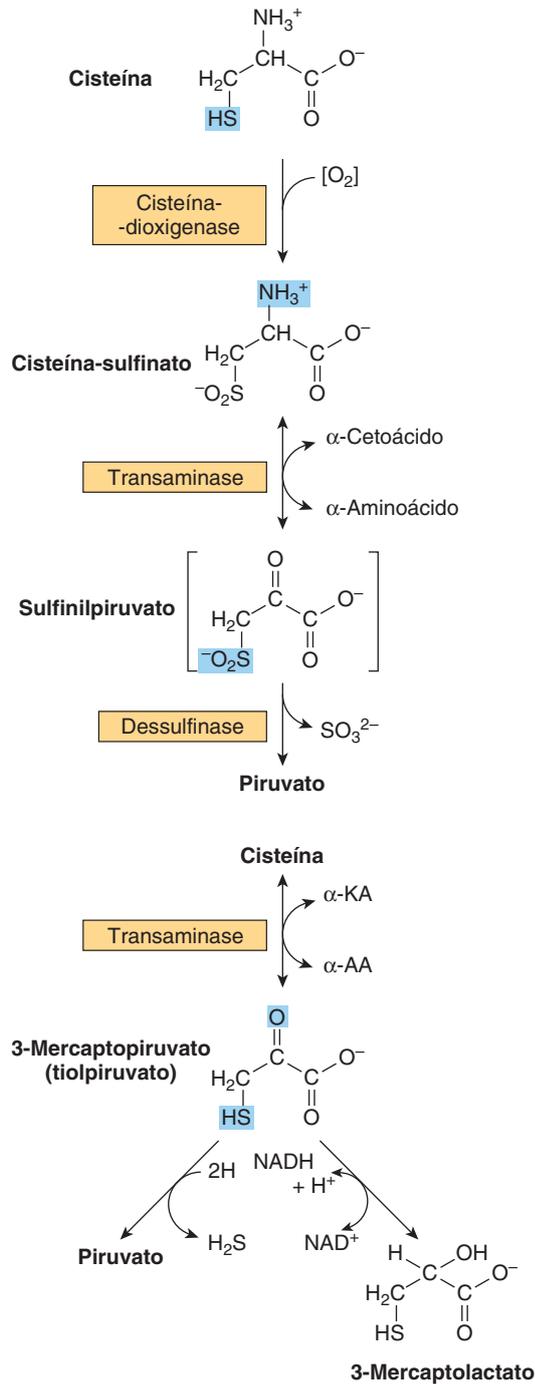


FIGURA 29-9 Duas vias catabolizam a cisteína: a via da cisteína-sulfinato (*parte superior*) e a via do 3-mercaptopiruvato (*parte inferior*).

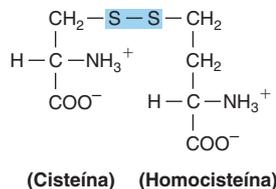


FIGURA 29-10 Estrutura do dissulfeto misto de cisteína e homocisteína.

precoce por insuficiência renal aguda. Dados epidemiológicos e outras informações associam os níveis plasmáticos de homocisteína a risco cardiovascular, mas o papel da homocisteína como causa de risco cardiovascular permanece controverso.

Treonina

A treonina-aldolase (EC 4.1.2.5) cliva a treonina a glicina e acetaldeído. O catabolismo da glicina já foi discutido. A oxidação do acetaldeído a acetato é seguida de formação de acetil-CoA (**Figura 29-11**).

4-Hidroxi prolina

O catabolismo de 4-hidroxi-L-prolina forma, sucessivamente, L-Δ¹-pirrolina-3-hidroxi-5-carboxilato, γ-hidroxi-L-glutamato-γ-semialdeído, eritro-γ-hidroxi-L-glutamato e α-ceto-γ-hidroxi-glutarato. Em seguida, uma clivagem do tipo aldol forma glioxilato e piruvato (**Figura 29-12**). Um defeito na **4-hidroxi-prolina-desidrogenase** resulta em **hiper-hidroxi-prolinemia**, que é benigna. Não existe nenhum comprometimento associado ao catabolismo da prolina. Um defeito na **glutamato-γ-semialdeído-desidrogenase** é acompanhado pela excreção de Δ¹-pirrolina-3-hidroxi-5-carboxilato.

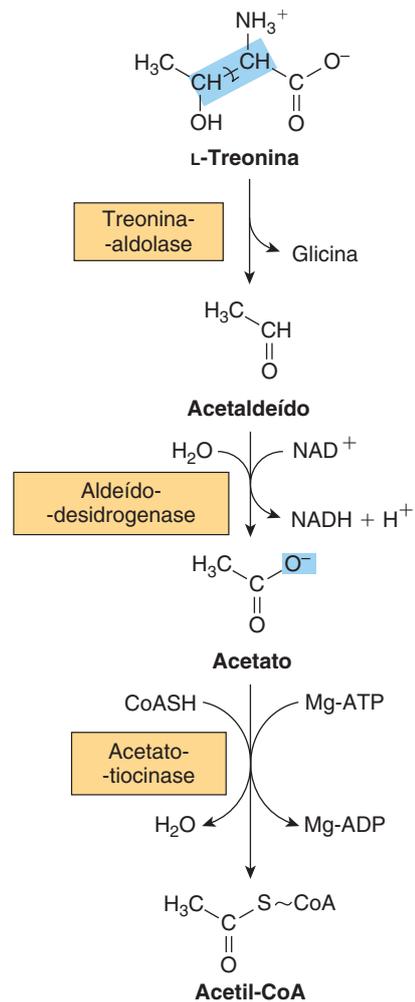


FIGURA 29-11 Intermediários na conversão de treonina a glicina e acetil-CoA.

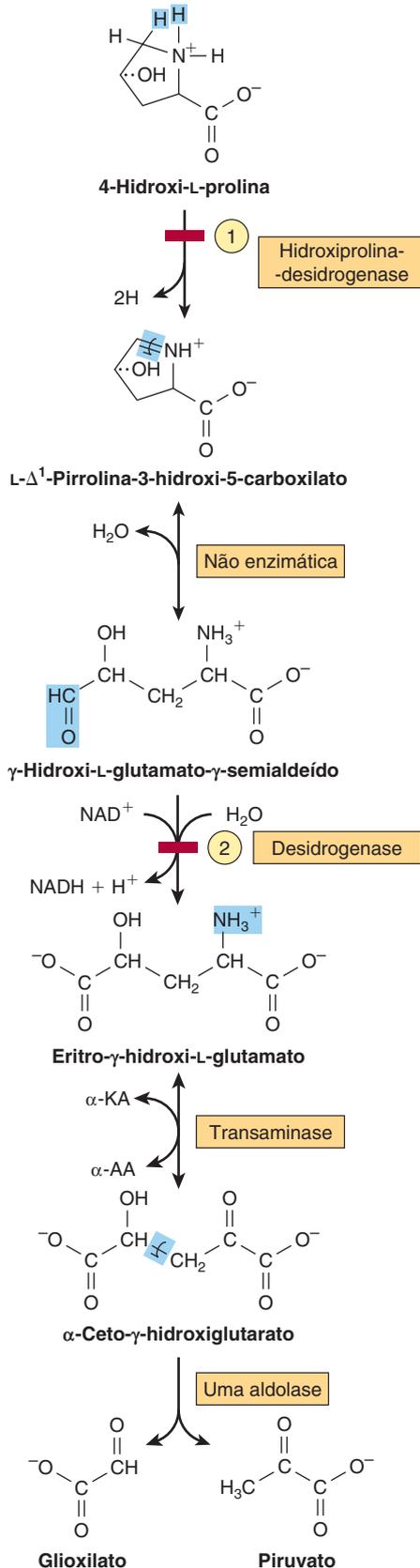


FIGURA 29-12 Intermediários no catabolismo da hidroxiprolina. (α -AA, α -aminoácido; α -KA, α -cetoácido.) As barras vermelhas indicam os sítios dos defeitos metabólicos hereditários ① na hiper-hidroxiprolinemia e ② na hiperprolinemia tipo II.

AMINOÁCIDOS ADICIONAIS QUE FORMAM ACETIL-COA

Tirosina

A **Figura 29-13** ilustra os intermediários e as enzimas que participam do catabolismo da tirosina a intermediários anfibólicos. Após a transaminação da tirosina para formar *p*-hidroxifenilpiruvato, reações sucessivas formam maleilacetato, fumarilacetato, fumarato, acetacetato e, por fim, acetil-CoA e acetato.

Vários distúrbios metabólicos estão associados à via do catabolismo da tirosina. O provável defeito metabólico da **tirosinemia tipo I (tirosinose)** envolve a **fumarilacetato-hidrolase**, EC 3.7.1.12 (reação 4, **Figura 29-13**). O tratamento consiste em dieta com baixo teor de tirosina e fenilalanina. Sem tratamento, a tirosinose aguda e crônica leva à morte por insuficiência hepática. Metabólitos alternativos da tirosina também são excretados na **tirosinemia tipo II (síndrome de Richner-Hanhart)**, um defeito na **tirosina-aminotransferase** (reação 1, **Figura 29-13**), e na **tirosinemia neonatal**, devido à redução na atividade da *p*-hidroxifenilpiruvato-hidroxilase, EC 1.13.11.27 (reação 2, **Figura 29-13**). O tratamento consiste em dieta com baixo teor de proteínas.

O defeito metabólico na **alcaptonúria** é uma disfunção da **homogentisato-oxidase** (EC 1.13.11.5), a enzima que catalisa a reação 3 da **Figura 29-13**. A urina escurece quando exposta ao ar devido à oxidação do homogentisato excretado. Nos estágios avançados da doença, ocorrem artrite e pigmentação do tecido conectivo (ocronose) em consequência da oxidação do homogentisato a benzoquinona acetato, que sofre polimerização e se liga ao tecido conectivo. Descrita pela primeira vez no século XVI, com base na observação de que a urina escurecia quando exposta ao ar, a alcaptonúria forneceu a base para as ideias clássicas de Sir Archibald Garrod, no início do século XX, sobre os distúrbios metabólicos hereditários. Com base na presença de ocronose e evidências químicas, o primeiro caso conhecido de alcaptonúria foi descrito em 1977, com a sua detecção em uma múmia egípcia datando de 1500 a.C.

Fenilalanina

A fenilalanina é inicialmente convertida em tirosina (ver **Figura 27-12**). As reações subsequentes são as mesmas envolvidas no metabolismo da tirosina (**Figura 29-13**). As **hiperfenilalaninemias** surgem em decorrência de defeitos na fenilalanina-hidroxilase, EC 1.14.16.1 (**fenilcetonúria [PKU] clássica tipo I**, com frequência de 1 em cada 10 mil nascimentos), na di-hidrobiopterina-redutase (**tipos II e III**) ou na biossíntese de di-hidrobiopterina (**tipos IV e V**) (ver **Figura 27-12**). Catabólitos alternativos são excretados (**Figura 29-14**). Uma dieta com baixo teor de fenilalanina pode evitar a ocorrência de deficiência intelectual da PKU.

As sondas de DNA facilitam o diagnóstico pré-natal de defeitos na fenilalanina-hidroxilase ou da di-hidrobiopterina-redutase. A fenilalanina elevada no sangue pode não ser detectável até três a quatro dias após o parto. Nos lactentes prematuros, os resultados falso-positivos podem refletir maturação tardia das enzimas envolvidas no catabolismo da fenilalanina.

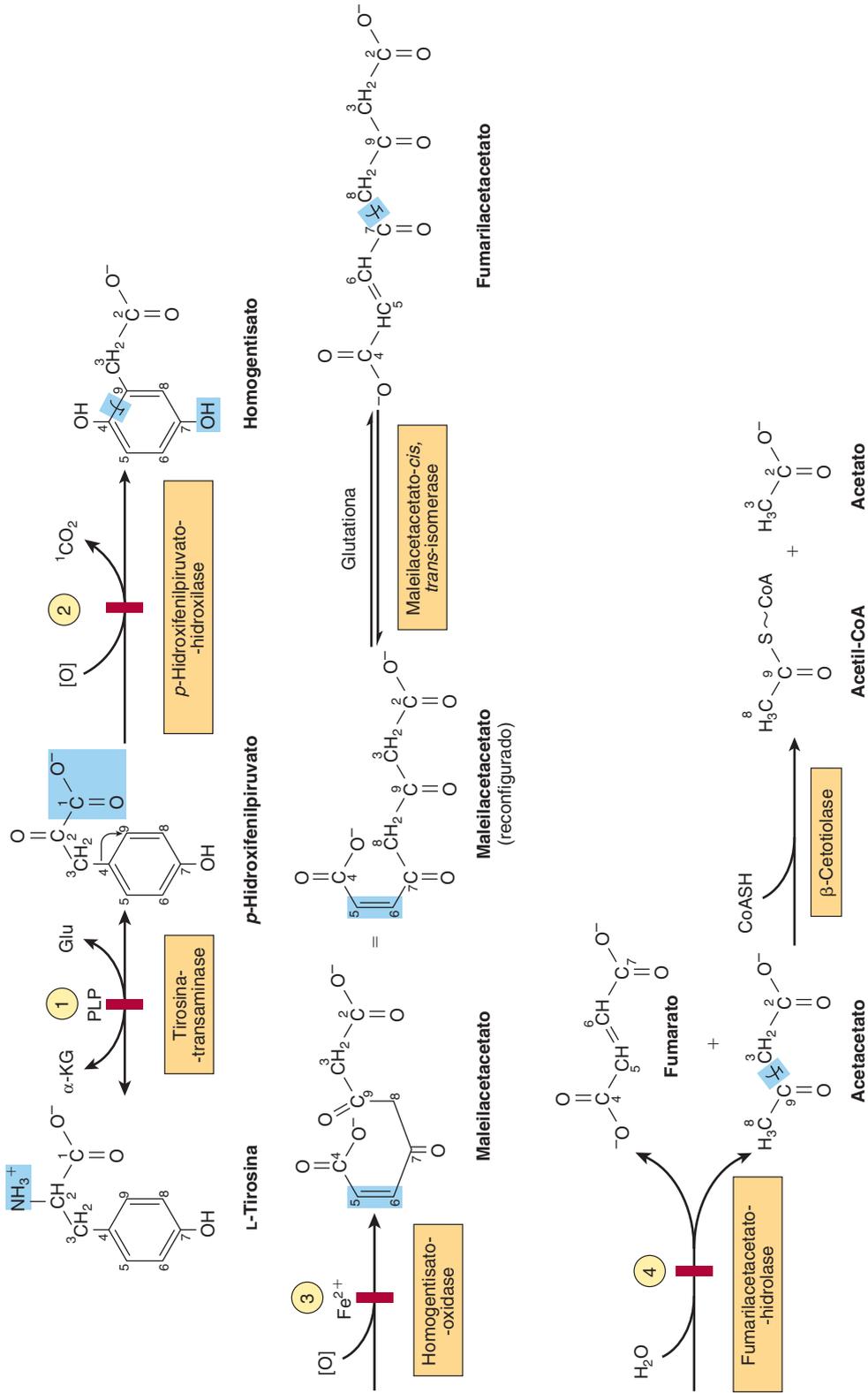


FIGURA 29-13 Intermediários do catabolismo da tirosina. Os carbonos são numerados para ressaltar o seu destino final. (α -KG, α -cetogluturato; Glu, glutamato; PLP, piridoxal-fosfato.) As barras vermelhas indicam os prováveis locais dos defeitos metabólicos hereditários na ① tirosinemia tipo I; ② na tirosinemia neonatal; ③ na alcaptonúria; e ④ na tirosinemia tipo II, ou tirosinose.

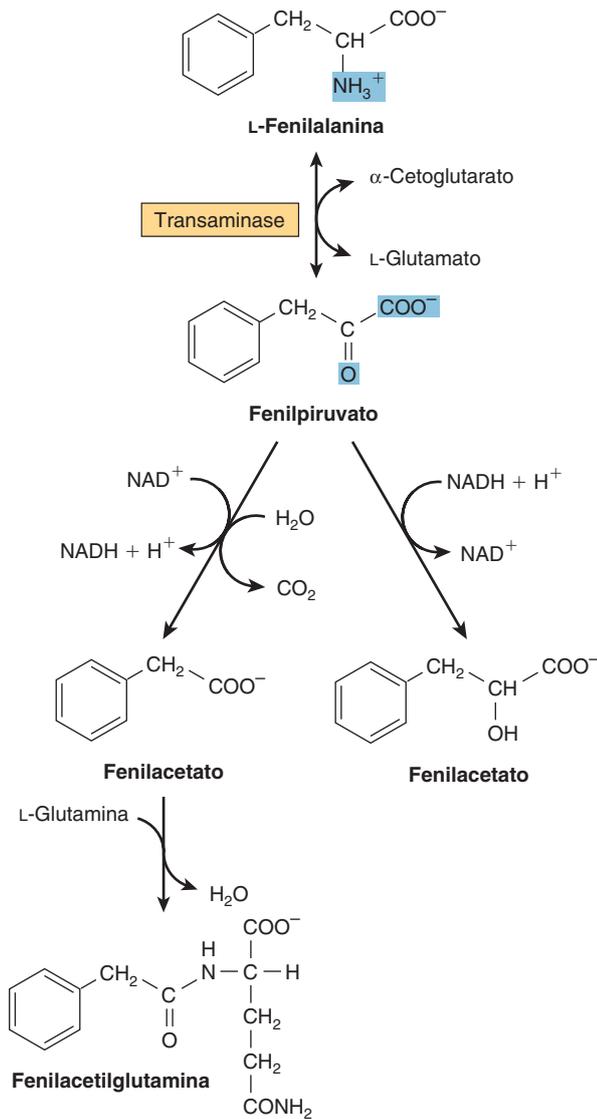


FIGURA 29-14 Vias alternativas do catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria. As reações também ocorrem no tecido hepático normal, porém têm pouco significado.

Um teste de triagem mais antigo e menos confiável emprega o FeCl₃ para detectar o fenilpiruvato na urina. A triagem com FeCl₃ para PKU na urina de recém-nascidos é obrigatória em muitos países, porém nos Estados Unidos foi suplantada, em grande parte, pela espectrometria de massa em *tandem* (sequencial).

Lisina

As primeiras seis reações do catabolismo da L-lisina no fígado humano formam crotonil-CoA, que é degradada em acetil-CoA pelas reações do catabolismo de ácidos graxos (ver Capítulo 22). A seguir, os números circulosados referem-se às reações correspondentes aos números na **Figura 29-15**. As reações 1 e 2 convertem a base de Schiff formada entre o α-cetoglutarato e o grupo ε-amino da lisina em L-α-aminoadipato-δ-semialdeído. As reações 1 e 2 são catalisadas por uma única enzima

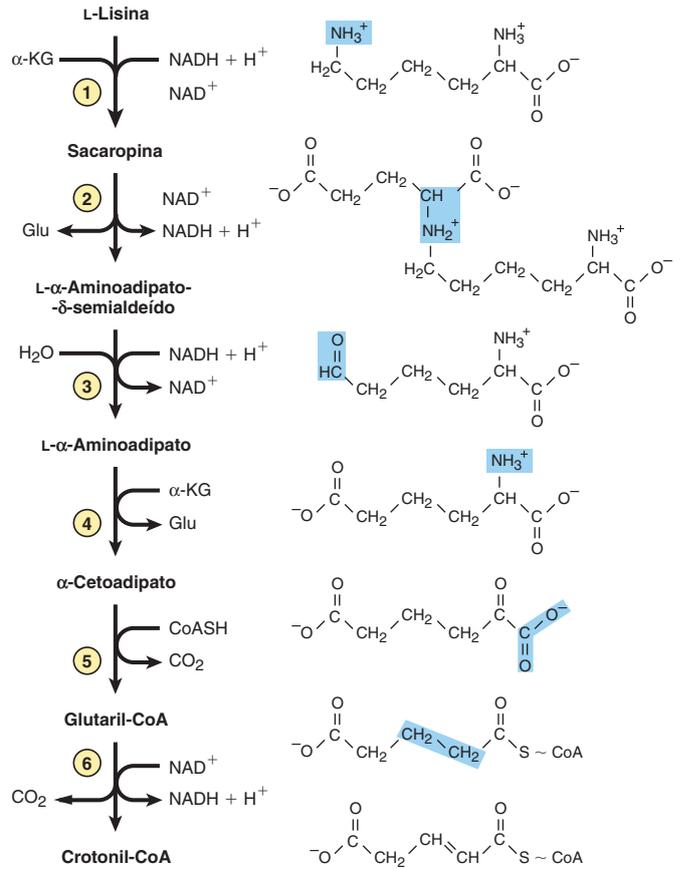


FIGURA 29-15 Reações e intermediários do catabolismo da lisina.

bifuncional, a aminoadipato-semialdeído-sintase (EC 1.5.1.8), cujos domínios N e C-terminal contêm as atividades lisina-α-cetoglutarato-redutase e sacaropina-desidrogenase, respectivamente. A redução do L-α-aminoadipato-δ-semialdeído a L-α-aminoadipato (reação 3) é seguida pela transaminação a α-cetoadipato (reação 4). A conversão a tioéster-glutaril-CoA (reação 5) é seguida pela descarboxilação de glutaril-CoA a crotonil-CoA (reação 6). As reações subsequentes são as do catabolismo dos ácidos graxos.

A hiperlisinemia pode resultar do defeito metabólico tanto na primeira quanto na segunda atividade da enzima bifuncional aminoadipato-semialdeído-sintase, mas isso é acompanhado por níveis elevados de sacaropina no sangue apenas se o defeito envolver a segunda atividade. Um defeito metabólico na reação 6 resulta em doença metabólica hereditária associada à degeneração estriatal e cortical; caracteriza-se por concentrações elevadas de glutarato e seus metabólitos, glutaconato e 3-hidroxi-glutarato. O desafio no tratamento desses defeitos metabólicos consiste em restringir a ingestão alimentar de L-lisina sem causar desnutrição.

Triptofano

O triptofano é degradado em intermediários anfíóxicos através da via quinurenina-antranilato (**Figura 29-16**). A **triptofano-2,3-dioxigenase**, EC 1.13.11.11 (**triptofano-pirrolase**),

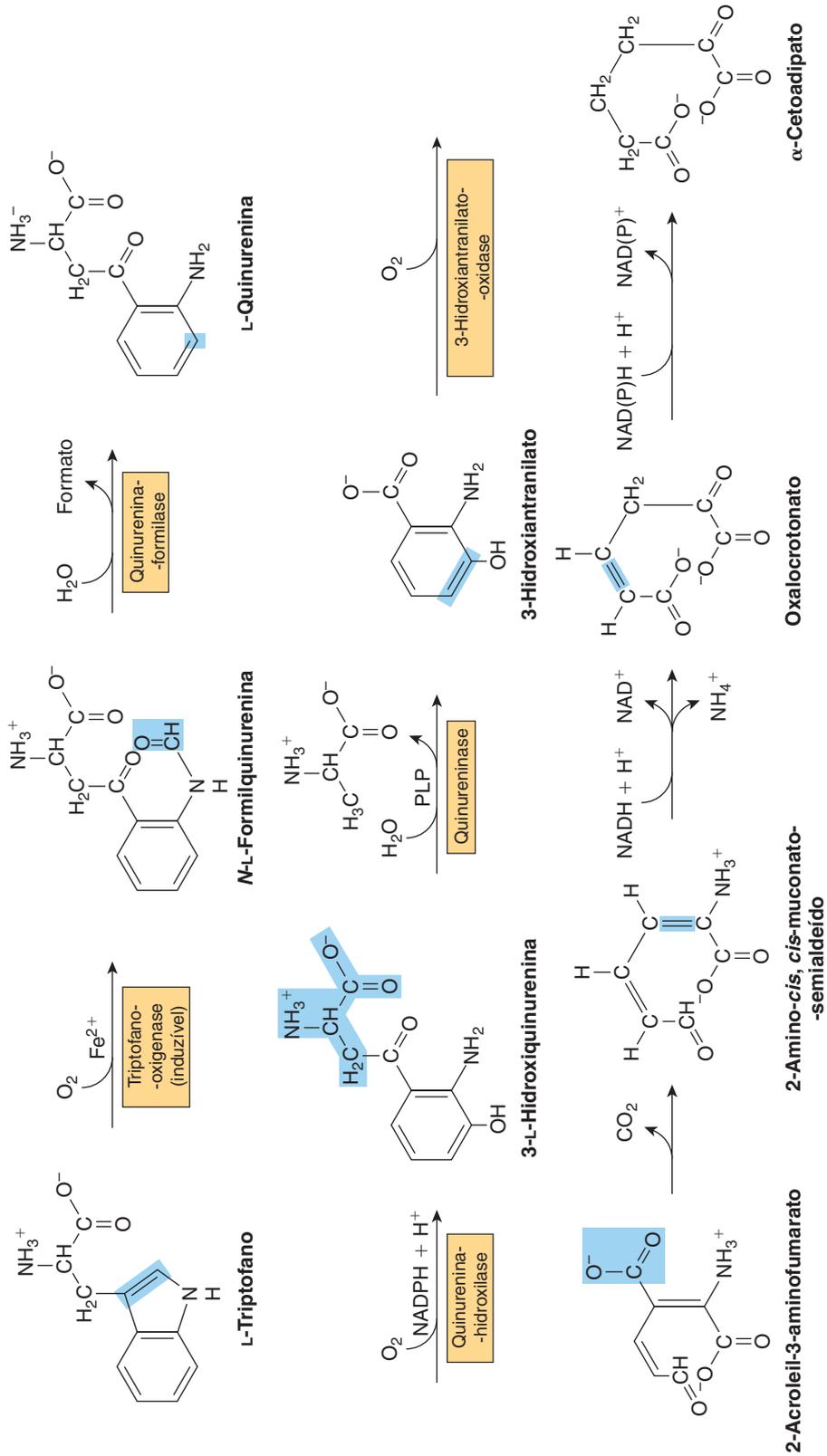


FIGURA 29-16 Reações e intermediários do catabolismo do triptofano. (PLP, piridoxal-fosfato.)

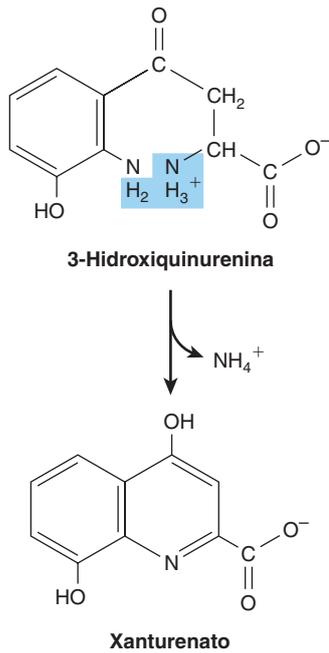


FIGURA 29-17 Formação de xanturenato na deficiência de vitamina B₆. A conversão do metabólito triptofano 3-hidroxiquinurenicina a 3-hidroxi-antranilato está prejudicada (ver Figura 29-16). Em consequência, uma grande fração é convertida a xanturenato.

abre o anel indol, incorpora o oxigênio molecular e forma *N*-formilquinurenicina. A triptofano-oxigenase, uma metaloproteína de ferro-porfirina induzível no fígado pelos corticosteroides suprarrenais e pelo triptofano, é inibida por retroalimentação pelos derivados do ácido nicotínico, incluindo NADPH. A remoção hidrolítica do grupo formil da *N*-formilquinurenicina, catalisada pela **quinurenicina-formilase** (EC 3.5.1.9), produz cinurenicina. Uma vez que a **quinureninase** (EC 3.7.1.3) requer piridoxal-fosfato, a excreção de

xanturenato (**Figura 29-17**) em resposta a uma carga de triptofano confirma o diagnóstico de deficiência de vitamina B₆. A **doença de Hartnup** reflete o comprometimento do transporte intestinal e renal do triptofano e de outros aminoácidos neutros. São excretados derivados indólicos do triptofano não absorvidos, formados pelas bactérias intestinais. O defeito limita a disponibilidade de triptofano para a biossíntese de niacina e é responsável pelos sinais e sintomas semelhantes aos da pelagra.

Metionina

A metionina reage com ATP, formando *S*-adenosilmetionina, a “metionina ativa” (**Figura 29-18**). As reações subsequentes formam propionil-CoA (**Figura 29-19**), que é convertido em succinil-CoA por três reações subsequentes (ver Figura 19-2).

AS REAÇÕES INICIAIS SÃO COMUNS PARA OS TRÊS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

As primeiras três reações do catabolismo da isoleucina, da leucina e da valina (**Figura 29-20**) são análogas às reações do catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 22-3). Após a transaminação (Figura 29-20, reação 1), os esqueletos de carbono dos α -cetoácidos resultantes sofrem descarboxilação oxidativa e conversão a tioésteres de coenzima A. Esse processo em múltiplas etapas é catalisado pelo **complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada mitocondrial**, cujos componentes são funcionalmente idênticos aos do complexo da piruvato-desidrogenase (PDH) (ver Figura 18-5). À semelhança da PDH, o complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada consiste em cinco componentes.

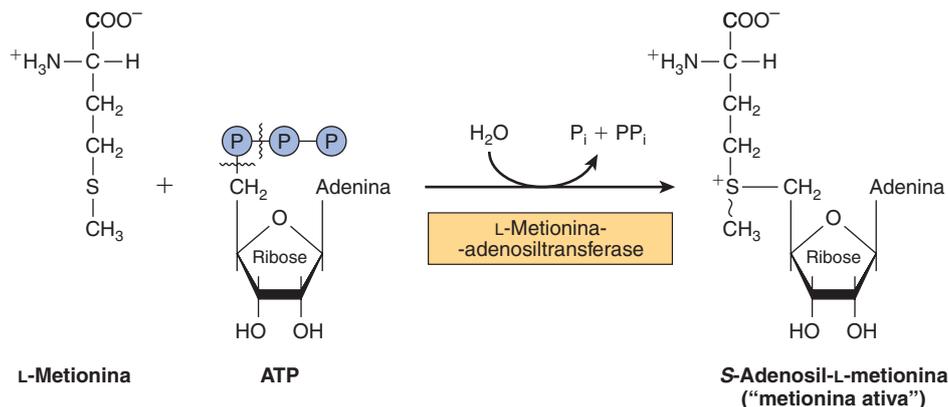


FIGURA 29-18 Formação de *S*-adenosilmetionina. $\sim\text{CH}_3$ representa o grupo de alto potencial de transferência da “metionina ativa”.

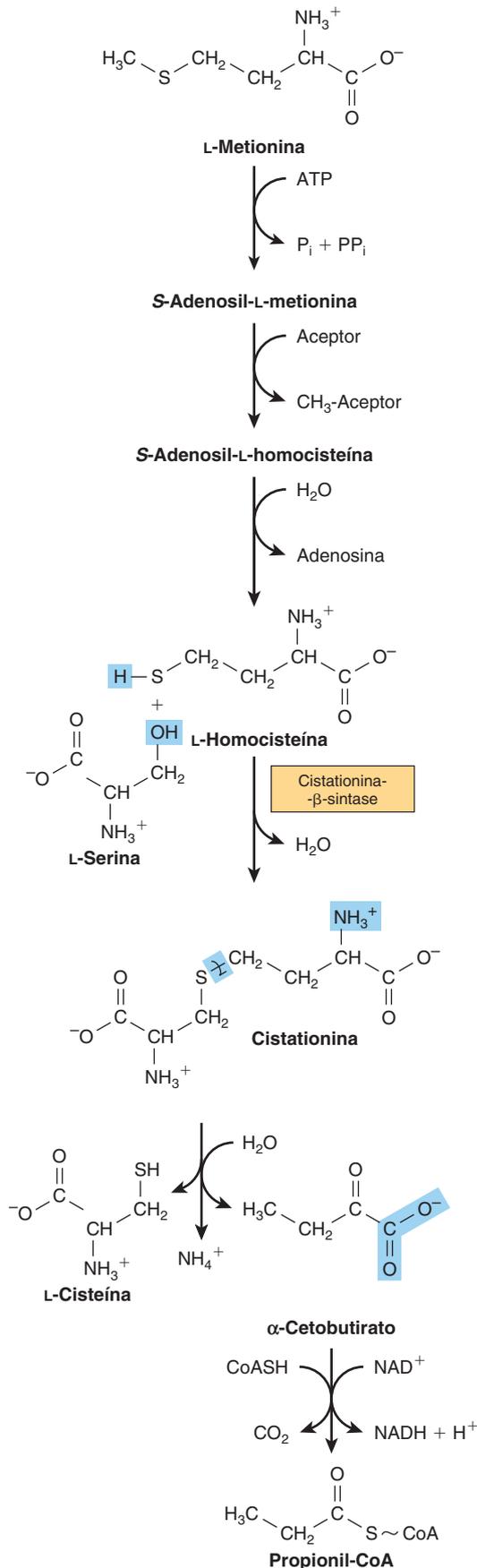


FIGURA 29-19 Conversão da metionina em propionil-CoA.

E1: descarboxilase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada dependente de tiamina-pirofosfato (TPP)

E2: di-hidrolipoil-transacilase (contém lipoamida)

E3: di-hidrolipoamida-desidrogenase (contém FAD)

Proteína-cinase

Proteína-fosfatase

Assim como para a piruvato-desidrogenase, a proteína-cinase e a proteína-fosfatase regulam a atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada via fosforilação (inativação) e desfosforilação (ativação).

A desidrogenação dos tioésteres de coenzima A resultantes (reação 3, Figura 29-20) prossegue como a desidrogenação dos tioésteres de acil-CoA graxo derivados de lipídeos (ver Capítulo 22). As reações subsequentes, exclusivas para o esqueleto de cada aminoácido, são apresentadas nas Figuras 29-21, 29-22 e 29-23.

DISTÚRBIOS METABÓLICOS DO CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Como o próprio nome indica, o odor da urina na **doença da urina do xarope de bordo (cetonúria de cadeia ramificada, ou MSUD)** sugere ser o mesmo do xarope de bordo ou de açúcar queimado. O defeito bioquímico na MSUD envolve o **complexo da descarboxilase dos α -cetoácidos** (reação 2, Figura 29-20). Os níveis plasmáticos e urinários de leucina, isoleucina, valina e seus α -cetoácidos e α -hidroxiácidos (α -cetoácidos reduzidos) estão elevados, porém os cetoácidos urinários provêm principalmente da leucina. Os sinais e sintomas da MSUD frequentemente consistem em cetoacidose fatal, sintomas neurológicos, deficiência intelectual e odor da urina semelhante ao do xarope de bordo. O mecanismo da toxicidade não é conhecido. O diagnóstico precoce estabelecido por análise enzimática é essencial para evitar lesão cerebral e mortalidade precoce, mediante substituição de proteínas alimentares por uma mistura de aminoácidos sem leucina, isoleucina e valina.

A genética molecular da MSUD é heterogênea. A MSUD pode resultar de mutações nos genes que codificam E1 α , E1 β , E2 e E3. Com base no *locus* afetado, são reconhecidos subtipos genéticos de MSUD. A MSUD tipo IA decorre de mutações no gene E1 α ; o tipo IB, no gene E1 β ; o tipo II, no gene E2; e o tipo III, no gene E3 (Tabela 29-3). Na **cetonúria intermitente de cadeias ramificadas**, a α -cetoácido-descarboxilase conserva alguma atividade, e os sintomas surgem mais tardiamente durante a vida. Na **acidemia isovalérica**, a ingestão de alimentos ricos em proteínas aumenta os níveis de isovalerato, o produto de desacetilação da isovaleril-CoA. A enzima danificada na **acidemia isovalérica** é a **isovaleril-CoA-desidrogenase**, EC 1.3.99.10 (reação 3, Figura 29-20). A ingestão de proteína em excesso é seguida de vômitos, acidose e coma. A isovaleril-CoA acumulada é hidrolisada a isovalerato e excretada.

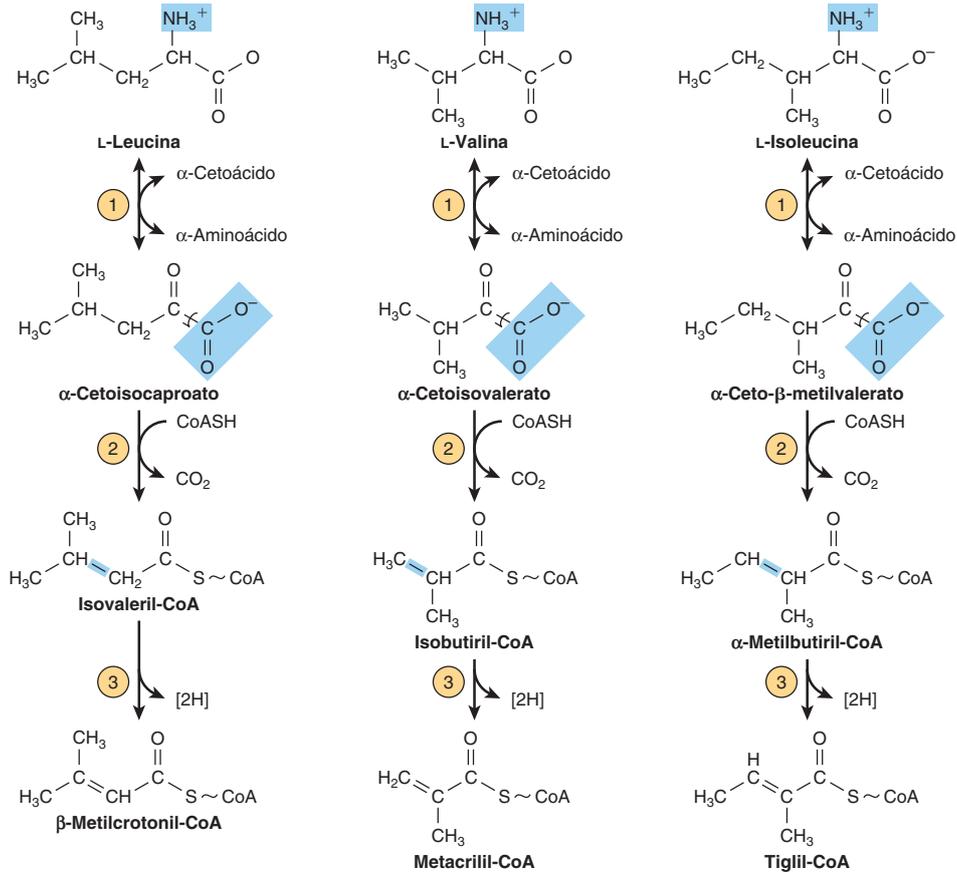


FIGURA 29-20 As primeiras três reações no catabolismo da leucina, da valina e da isoleucina. Observe a analogia das reações 2 e 3 com as reações do catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 22-3). A analogia com o catabolismo dos ácidos graxos continua, como mostram as figuras seguintes.

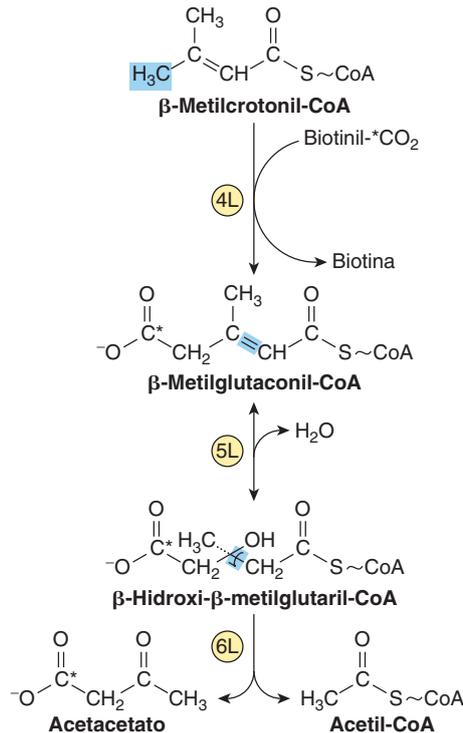


FIGURA 29-21 Catabolismo da β -metilcrotonil-CoA formada a partir da L-leucina. Os asteriscos indicam átomos de carbono derivados do CO_2 .

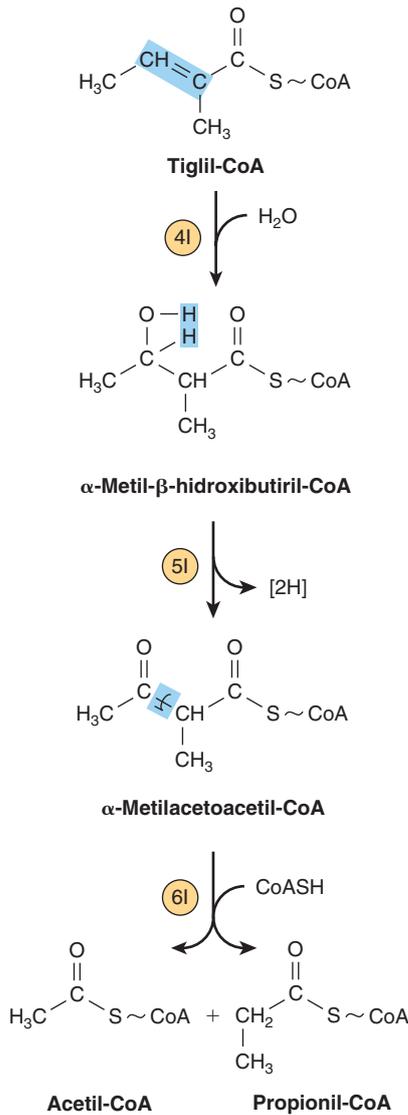


FIGURA 29-22 Catabolismo subsequente da tigilil-CoA formada a partir da L-isoleucina.

TABELA 29-3 A doença da urina do xarope de bordo pode refletir o comprometimento da função de vários componentes do complexo da α -cetoácido-descarboxilase

Componente da descarboxilase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada	Referência OMIM ^a	Doença da urina do xarope de bordo
E1 α α -Cetoácido-descarboxilase	608348	Tipo 1A
E1 β α -Cetoácido-descarboxilase	248611	Tipo 1B
E2 Di-hidrolipoil-transacilase	608770	Tipo II
E3 Di-hidrolipoamida-desidrogenase	238331	Tipo III

^aBanco de dados Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

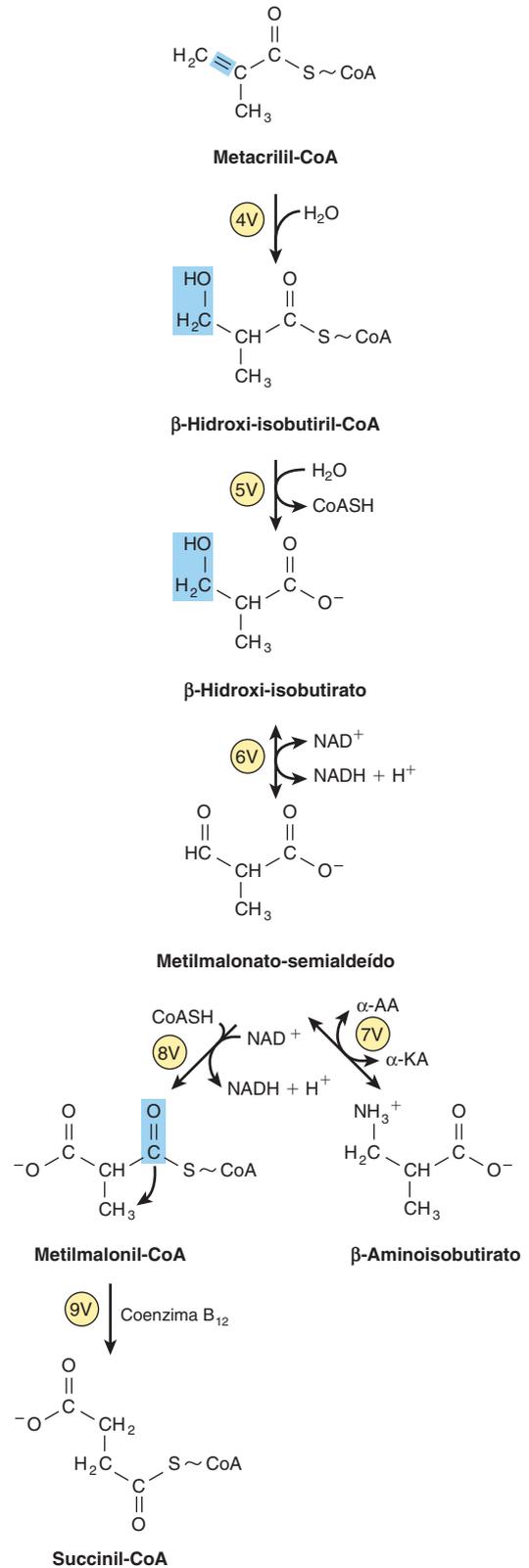


FIGURA 29-23 Catabolismo subsequente da metacrilil-CoA formada a partir da L-valina (ver Figura 29-20). (α -AA, α -aminoácido; α -KA, α -cetoácido.)

RESUMO

- Os aminoácidos em excesso são catabolizados a intermediários anfíbios, que atuam como fontes de energia ou para a biossíntese de carboidratos e lipídeos.
- A transaminação é a reação inicial mais comum no catabolismo dos aminoácidos. As reações subsequentes removem qualquer nitrogênio adicional e reestruturam os esqueletos hidrocarbonados para conversão em oxalacetato, α -cetogluturato, piruvato e acetil-CoA.
- As doenças metabólicas associadas ao catabolismo da glicina incluem a glicinúria e a hiperoxalúria primária.
- Duas vias distintas convertem a cisteína em piruvato. Os distúrbios metabólicos do catabolismo da cisteína incluem cistina-lisínúria, doença de armazenamento de cistina e as homocistinúrias.
- O catabolismo da treonina mistura-se com o da glicina após a clivagem da treonina pela treonina-aldolase, formando glicina e acetaldeído.
- Após a transaminação, o esqueleto de carbono da tirosina é degradado a fumarato e acetacetato. As doenças metabólicas do catabolismo da tirosina incluem a tirosinose, a síndrome de Richner-Hanhart, a tirosinemia neonatal e a alcaptonúria.
- Os distúrbios metabólicos do catabolismo da fenilalanina são a PKU e várias hiperfenilalaninemias.
- Nenhum dos nitrogênios da lisina participa de transaminações. Entretanto, o mesmo efeito é obtido pela formação intermediária de sacaropina. As doenças metabólicas do catabolismo da lisina incluem as formas periódica e persistente de hiperlisinemia com hiperamoniemia.
- O catabolismo da leucina, da valina e da isoleucina apresenta muitas analogias com o catabolismo dos ácidos graxos. Os distúrbios metabólicos do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada incluem a hipervalinemia, a doença da urina do xarope de bordo, a cetonúria intermitente de cadeia ramificada, a acidemia isovalérica e a acidúria metilmalônica.

REFERÊNCIAS

- Blikrud YT, Brodtkorb E, Andresen PA, et al: Tyrosinemia type I, de novo mutation in liver tissue suppressing an inborn splicing defect. *J Mol Med* 2005;83:406.
- Dobrowolski, SF Pey AL, Koch R, et al: Biochemical characterization of mutant phenylalanine hydroxylase enzymes and correlation with clinical presentation in hyperphenylalaninaemic patients. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:10.
- Faggioli S, Daina E, D'Antiga L, et al: Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. *J Hepatol* 2013;59:595.
- Garg U, Dasouki M: Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry. Clinical and laboratory aspects. *Clin Biochem* 2006;39:315.
- Geng J, Liu A: Heme-dependent dioxygenases in tryptophan oxidation. *Arch Biochem Biophys* 2014;44:18.
- Häussinger D, Schliess F: Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci* 2007;12:371.
- Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, et al: Diagnosis of maple syrup urine disease by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Mol Genet Metab* 2005;84:313.
- Houten SM, Te Brinke H, Denis S, et al: Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:57.
- Lamp J, Keyser B, Koeller DM, et al: Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells. *J Biol Chem* 2011;286:17,777.
- Mayr JA, Feichtinger RG, Tort F, et al: Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis* 2014;37:553.
- Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, et al: Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr* 2008;138:2016S.
- Moshal K, Camel CK, Kartha GK, et al: Cardiac dys-synchronization and arrhythmia in hyperhomocysteinemia. *Curr Neurovasc Res* 2007;4:289.
- Muller E, Kolker S: Reduction of lysine intake while avoiding malnutrition: major goals and major problems in dietary treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2004;27:903.
- Nagao M, Tanaka T, Furujo M: Spectrum of mutations associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency among individuals identified during newborn screening in Japan. *Mol Genet Metab* 2013;110:460.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Stenn FF, Milgram JW, Lee SL, et al: Biochemical identification of homogentisic acid pigment in an ochronotic Egyptian mummy. *Science* 1977;197:566.
- Tondo M, Calpena E, Arriola G, et al: Clinical, biochemical, molecular and therapeutic aspects of 2 new cases of 2-aminoadipic semialdehyde synthase deficiency. *Mol Genet Metab* 2013;110:231.
- Wilcken B, Wiley V: Newborn screening. *Pathology* 2008;40:104.

Conversão dos aminoácidos em produtos especializados

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar exemplos da participação dos aminoácidos em uma variedade de processos biossintéticos, além da síntese de proteínas.
- Delinear como a arginina participa da biossíntese da creatina, do óxido nítrico (NO), da putrescina, da espermina e da espermidina.
- Indicar a contribuição da cisteína e da β -alanina para a estrutura da coenzima A.
- Discutir o papel exercido pela glicina no catabolismo e na excreção de fármacos.
- Descrever, de modo sucinto, o papel da glicina na biossíntese do heme, das purinas, da creatina e da sarcosina.
- Identificar a enzima e a reação que converte um aminoácido ao neurotransmissor histamina.
- Descrever o papel da S-adenosilmetionina no metabolismo.
- Reconhecer os metabólitos do triptofano serotonina, da melatonina, da triptamina e do di-indol-3-acetato.
- Indicar o papel da tirosina na formação da norepinefrina e da epinefrina.
- Ilustrar os papéis essenciais da peptidil-serina, da treonina e da tirosina na regulação metabólica e nas vias de transdução de sinais.
- Delinear os papéis da glicina, da arginina e da S-adenosilmetionina na biossíntese da creatina.
- Descrever o papel da creatina-fosfato na homeostasia energética.
- Descrever a formação do γ -aminobutirato (GABA) e dos distúrbios metabólicos raros associados a defeitos no catabolismo do GABA.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Certas proteínas contêm aminoácidos que foram modificados após o processo de tradução, para permitir que atuem em funções específicas. Entre os exemplos, destacam-se a carboxilação do glutamato, para formar γ -carboxiglutamato, que atua na ligação de Ca^{2+} , a hidroxilação da prolina, para incorporação na tripla-hélice do colágeno, e a hidroxilação da lisina em hidroxilisina, cuja modificação subsequente e ligação cruzada estabilizam as fibras de colágeno em processo de maturação. Além de servirem como unidades básicas na síntese de proteínas, os aminoácidos atuam como precursores de materiais

biológicos, como o heme, as purinas, as pirimidinas, os hormônios, os neurotransmissores e os peptídeos biologicamente ativos. A histamina desempenha um papel central em muitas reações alérgicas. Os neurotransmissores derivados de aminoácidos incluem o γ -aminobutirato, a 5-hidroxitriptamina (serotonina), a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina. Muitos fármacos utilizados no tratamento de distúrbios neurológicos e transtornos psiquiátricos atuam alterando o metabolismo desses neurotransmissores. A seguir, serão discutidos o metabolismo e as funções metabólicas de alguns α -aminoácidos e não α -aminoácidos.

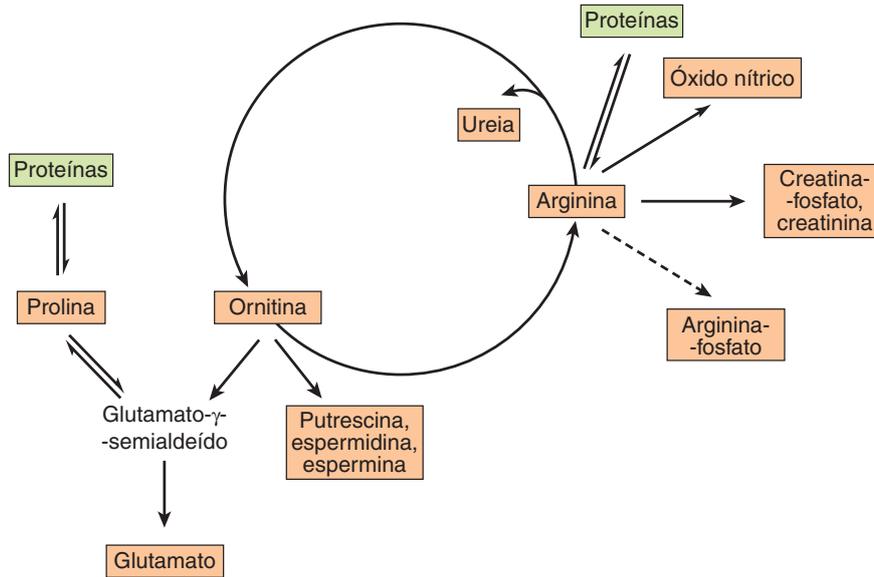


FIGURA 30-1 Metabolismo da arginina, da ornitina e da prolina. Todas as reações com setas de traço contínuo ocorrem nos tecidos dos mamíferos. A síntese de putrescina e de espermina ocorre tanto em mamíferos quanto em bactérias. A arginina-fosfato do músculo dos invertebrados funciona como análogo fosfagênico da creatina-fosfato do músculo dos mamíferos.

L-α-AMINOÁCIDOS

Alanina

A alanina atua como carreador de amônia e dos carbonos do piruvato do músculo esquelético para o fígado por meio do ciclo de Cori (ver Capítulo 19) e, junto com a glicina, constitui uma importante fração dos aminoácidos livres no plasma.

Arginina

A **Figura 30-1** resume os destinos metabólicos da arginina. Além de atuar como carreador de átomos de nitrogênio na biossíntese da ureia (ver Figura 28-16), o grupo guanidino da arginina é incorporado na creatina e, após conversão em ornitina, o seu esqueleto de carbono passa a constituir o esqueleto das poliaminas putrescina e espermina (ver a seguir).

A reação catalisada pela NO-sintase, EC 1.14.13.39 (**Figura 30-2**), uma oxidoredutase de cinco elétrons com múltiplos cofatores, converte um nitrogênio do grupo guanidino da arginina em L-ornitina e NO, uma molécula de sinalização intercelular que atua como neurotransmissor, como relaxante do músculo liso e como vasodilatador (ver Capítulo 51).

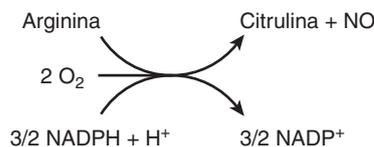


FIGURA 30-2 A reação catalisada pela óxido nítrico-sintase.

Cisteína

A cisteína participa da biossíntese da coenzima A (ver Capítulo 44) por reagir com pantotenato, formando 4-fosfopantotenoil-cisteína (**Figura 30-3**). Três reações catalisadas por enzimas convertem a cisteína em taurina, a qual pode deslocar a fração coenzima A da colil-CoA, com formação do ácido taurocólico, um ácido biliar (ver Capítulo 26). A conversão de cisteína a taurina é iniciada pela sua oxidação a sulfinoalanina (cisteína-sulfinato), catalisada pela cisteína-disoxigenase contendo Fe²⁺ não heme, EC 1.13.11.20. A descarboxilação da cisteína-sulfinato pela sulfinoalanina-decarboxilase, EC 4.1.1.29, forma hipotaurina, cuja oxidação pela hipotaurina-desidrogenase (EC 1.8.1.3) forma taurina (**Figura 30-4**).

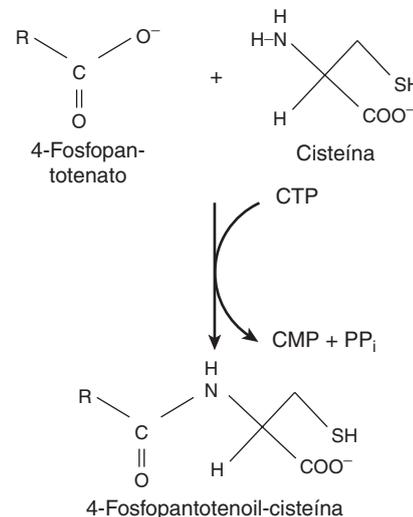


FIGURA 30-3 A reação catalisada pela fosfopantotenato-cisteína-ligase (EC 6.3.2.5).

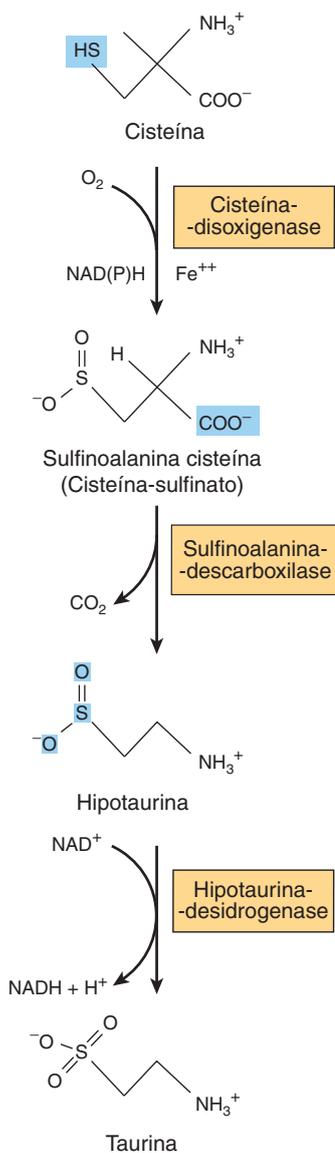


FIGURA 30-4 Conversão de cisteína à taurina. As reações são catalisadas pela cisteína-disoxigenase, pela cisteína-sulfinato-descarboxilase e pela hipotaurina-descarboxilase, respectivamente.

Glicina

Muitos metabólitos e medicamentos são excretados como conjugados de glicina hidrossolúveis. Exemplos incluem ácido glicocólico (ver Capítulo 26) e ácido hipúrico formado a partir do aditivo alimentar benzoato (Figura 30-5). Muitos fármacos, metabólitos de fármacos e outros compostos com grupos carboxilas são conjugados com glicina, o que os torna mais hidrossolúveis e, conseqüentemente, facilita sua excreção na urina. A glicina é incorporada à creatina, e o nitrogênio e o α-carbono da glicina são incorporados nos anéis pirrólicos e nos carbonos da ligação metileno do heme (ver Capítulo 31), e toda a molécula de glicina passa a constituir os átomos 4, 5 e 7 das purinas (ver Figura 33-1).

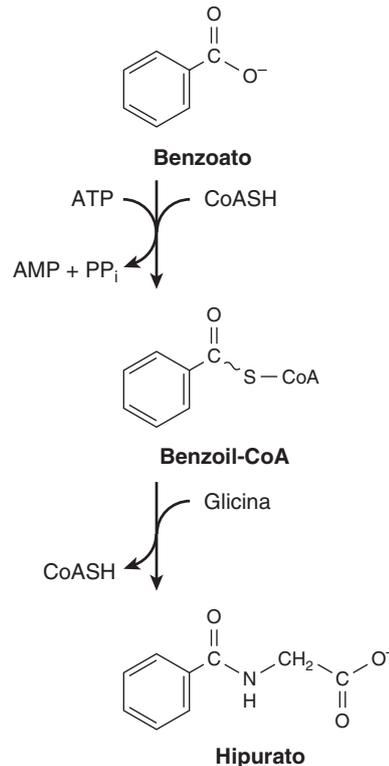


FIGURA 30-5 Biossíntese do hipurato. Ocorrem reações análogas com muitos medicamentos e catabólitos ácidos.

Histidina

A descarboxilação da histidina à histamina é catalisada pela enzima dependente de piridoxal 5'-fosfato, histidina-descarboxilase, EC 4.1.1.22 (Figura 30-6). A histamina, uma amina biogênica que atua em reações alérgicas e na secreção gástrica, é encontrada em todos os tecidos. A sua concentração no hipotálamo varia de acordo com o ritmo circadiano. Compostos de histidina presentes no corpo humano incluem carnosina e os derivados da dieta ergotioneína e anserina (Figura 30-7). Embora suas funções fisiológicas não sejam conhecidas, a carnosina (β-alanil-histidina) e a homocarnosina (γ-aminobutiril-histidina) são os principais constituintes dos tecidos excitáveis, do encéfalo e do músculo esquelético. Os níveis urinários de 3-metil-histidina estão acentuadamente baixos em pacientes com doença de Wilson.

Metionina

O principal destino não proteico da metionina consiste em sua conversão em S-adenosilmetionina, a principal

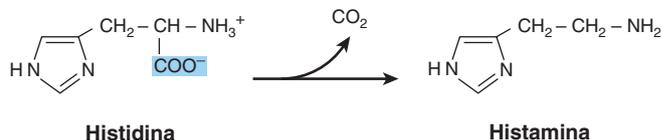


FIGURA 30-6 A reação catalisada pela histidina-descarboxilase.

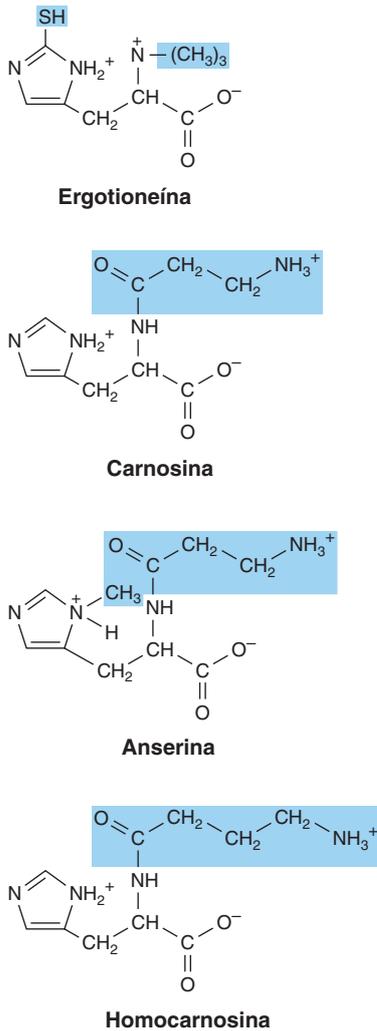


FIGURA 30-7 Derivados da histidina. Os quadros coloridos contêm os componentes não derivados da histidina. O grupo SH da ergotioneína deriva da cisteína.

fonte de grupos metil no corpo. A biossíntese de *S*-adenosilmetionina a partir de metionina e ATP é catalisada pela metionina-adenosiltransferase (MAT), EC 2.5.1.6 (**Figura 30-8**). Os tecidos humanos contêm três isoenzimas de MAT: MAT-1

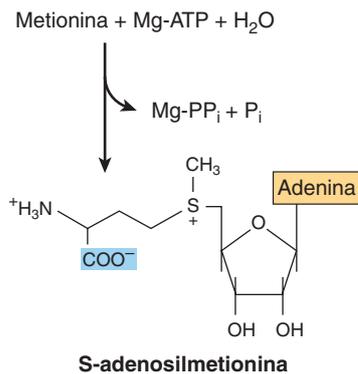


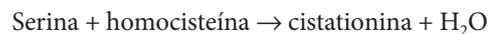
FIGURA 30-8 Biossíntese da *S*-adenosilmetionina, catalisada pela metionina-adenosiltransferase.

e MAT-3 no fígado, e MAT-2 nos tecidos extra-hepáticos. Embora uma acentuada redução da atividade hepática da MAT-1 e da MAT-3 possa resultar em **hipermetioninemia**, se houver atividade residual da MAT-1 ou da MAT-3 e a atividade da MAT-2 estiver normal, uma alta concentração tecidual de metionina assegurará a síntese de quantidades adequadas de *S*-adenosilmetionina.

Após a descarboxilação de *S*-adenosilmetionina pela metionina-decarboxilase (EC 4.1.1.57), três carbonos e o grupo α -amino da metionina contribuem para a biossíntese das poliaminas, a espermina e a espermidina (**Figura 30-9**). Essas poliaminas atuam na proliferação e no crescimento das células, são fatores de crescimento para células de mamíferos em cultura e estabilizam células intactas, organelas subcelulares e membranas. As poliaminas em doses farmacológicas são hipotérmicas e hipotensoras. Como elas carregam múltiplas cargas positivas, as poliaminas associam-se prontamente com DNA e RNA. A Figura 30-9 fornece um resumo da biossíntese das poliaminas a partir da metionina e da ornitina, e a **Figura 30-10** apresenta o catabolismo das poliaminas.

Serina

A serina participa da biossíntese da esfingosina (ver Capítulo 24), bem como de purinas e pirimidinas, onde fornece os carbonos 2 e 8 das purinas e o grupo metil da timina (ver Capítulo 33). Os defeitos genéticos na cistationina- β -sintase, EC 6.3.2.3,



uma proteína heme que catalisa a condensação dependente de piridoxal 5'-fosfato de serina com homocisteína para formar cistationina, resultam em **homocistinúria**.

Triptofano

Após a hidroxilação de triptofano a 5-hidroxitriptofano pela triptofano-hidroxilase hepática (EC 1.14.16.4), a descarboxilação subsequente forma serotonina (5-hidroxitriptamina), um vasoconstritor potente e estimulador da contração dos músculos lisos. O catabolismo de serotonina é iniciado pela desaminação a 5-hidroxiindol-3-acetato, uma reação catalisada pela monoaminoxidase (MAO), EC 1.4.3.4 (**Figura 30-11**). A estimulação psíquica que ocorre após a administração de iproniazida resulta de sua capacidade de prolongar a ação da serotonina por meio da inibição da MAO. No carcinoide (argentinafinoma), as células tumorais produzem serotonina em excesso. Os metabólitos urinários da serotonina em pacientes com carcinoide incluem o glicuronídeo de *N*-acetilsserotonina e o conjugado de glicina do 5-hidroxiindolacetato. A serotonina e a 5-metoxitriptamina são metabolizadas aos ácidos correspondentes pela MAO. A *N*-acetilação da serotonina, seguida de sua *O*-metilação na glândula pineal, forma a melatonina. A melatonina circulante é captada por todos os tecidos, incluindo o encéfalo, porém é rapidamente metabolizada por hidroxilação, seguida de conjugação com sulfato ou com ácido glicurônico. O tecido renal, o tecido hepático e as bactérias fecais convertem o triptofano em triptamina e, a seguir, em indol-3-acetato. Os principais catabólitos urinários normais do triptofano são o 5-hidroxiindolacetato e o indol-3-acetato.

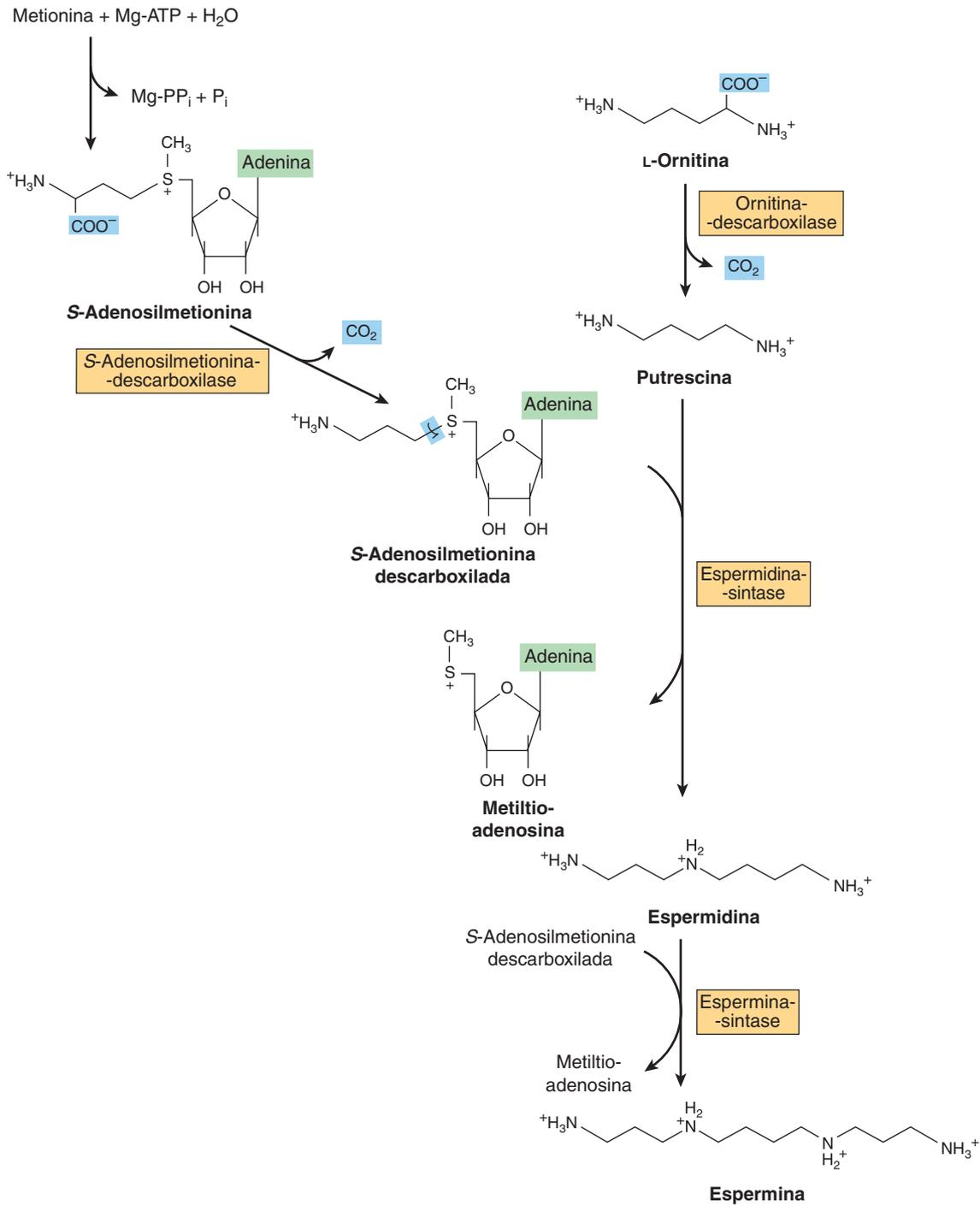


FIGURA 30-9 Intermediários e enzimas que participam da biossíntese da espermidina e da espermina.

Tirosina

As células neurais convertem a tirosina em epinefrina e norepinefrina (Figura 30-12). Embora a dopa também seja um intermediário na formação da melanina, a tirosina é hidroxilada por diferentes enzimas nos melanócitos. A dopa-decarboxilase, EC 4.1.1.28, uma enzima dependente de piridoxal-fosfato, forma dopamina. A hidroxilação subsequente, catalisada pela dopamina-β-oxidase (EC 1.14.17.1), forma norepinefrina. Na medula da glândula suprarrenal, a

feniletanolamina-*N*-metiltransferase (EC 2.1.1.28) utiliza *S*-adenosilmetionina para metilar a amina primária de norepinefrina, formando epinefrina (Figura 30-12). A tirosina também é um precursor da tri-iodotironina e da tiroxina (ver Capítulo 41).

Fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina

A fosforilação e a desfosforilação de resíduos específicos de seril, treonil ou tirosil de proteínas regulam a atividade de

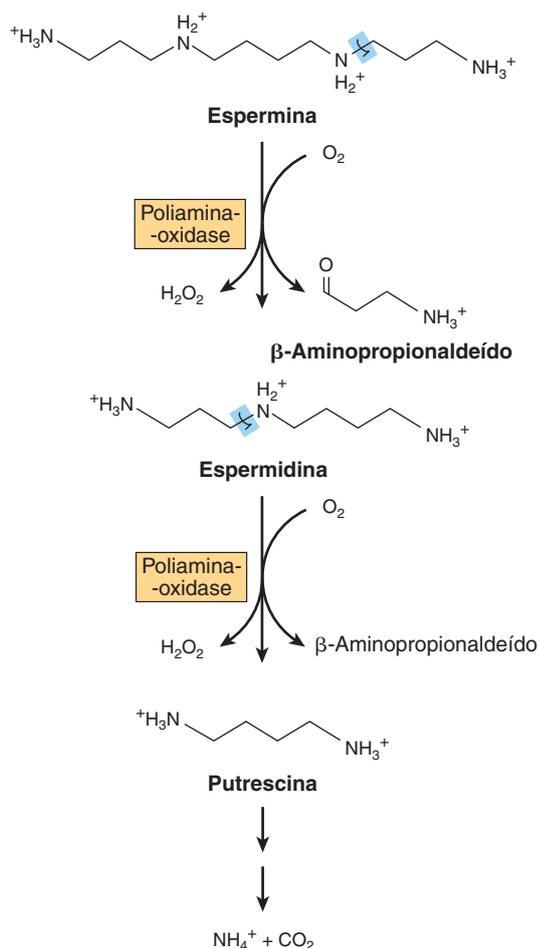
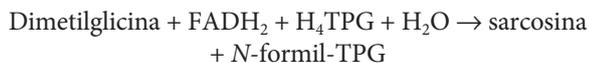


FIGURA 30-10 Catabolismo das poliaminas.

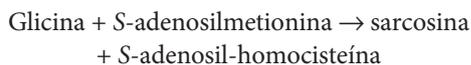
certas enzimas do metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos (ver Capítulo 9 e Figuras 18-20 e 22-26), bem como de proteínas que participam de cascatas de transdução de sinais (ver Capítulo 42).

Sarcosina (*N*-metilglicina)

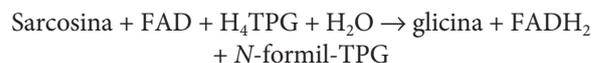
A biossíntese e o catabolismo da sarcosina (*N*-metilglicina) ocorrem nas mitocôndrias. A formação de sarcosina a partir de dimetilglicina é catalisada pela flavoproteína dimetilglicina-desidrogenase, EC 1.5.99.2, que requer pteroilpentaglutamato reduzido (TPG).



Traços de sarcosina também podem surgir pela metilação da glicina, uma reação catalisada pela glicina *N*-metiltransferase, EC 2.1.1.20.



O catabolismo de sarcosina a glicina, catalisado pela flavoproteína sarcosina-desidrogenase, EC 1.5.99.1, também requer pteroilpentaglutamato reduzido.



As reações de desmetilação que formam e degradam a sarcosina representam importantes fontes de unidades de um carbono. O $FADH_2$ é reoxidado através da cadeia de transporte de elétrons (ver Capítulo 13).

Creatina e creatinina

A creatinina é formada nos músculos a partir da creatina-fosfato por desidratação não enzimática irreversível e perda de fosfato (Figura 30-13). Considerando que a excreção urinária diária de creatinina é proporcional à massa muscular, ela fornece uma medida de quando uma amostra completa de urina de 24 horas foi coletada. A glicina, a arginina e a metionina participam da biossíntese de creatina. A síntese da creatina é concluída pela metilação do guanidoacetato pela *S*-adenosilmetionina (Figura 30-13).

AMINOÁCIDOS NÃO α

Os aminoácidos não α presentes em tecidos na forma livre incluem β -alanina, β -aminoisobutirato e γ -aminobutirato (GABA). A β -alanina também está presente na forma combinada com coenzima A, e nos dipeptídeos β -alanil carnosina, anserina e homocarnosina (ver a seguir).

β -Alanina e β -aminoisobutirato

A β -alanina e o β -aminoisobutirato são formados durante o catabolismo das pirimidinas uracila e timina, respectivamente (ver Figura 33-9). Traços de β -alanina também resultam da hidrólise dos dipeptídeos β -alanil pela enzima carnosinase, EC 3.4.13.20. O β -aminoisobutirato também surge pela transaminação do semialdeído metilmalonato, um catabólito de *L*-valina (ver Figura 29-23).

A reação inicial do catabolismo da β -alanina consiste em transaminação a malonato semialdeído. A transferência subsequente da coenzima A da succinil-CoA forma a malonil-CoA semialdeído, que é oxidada à malonil-CoA e descarboxilada no intermediário anfíbolico acetil-CoA. O catabolismo do β -aminoisobutirato é caracterizado por reações análogas. A transaminação forma o semialdeído metilmalonato, que é convertido ao intermediário anfíbolico succinil-CoA pelas reações 8V e 9V da Figura 29-23. Os distúrbios do metabolismo da β -alanina e do β -aminoisobutirato decorrem de defeitos nas enzimas da via catabólica das pirimidinas. Entre os principais distúrbios destacam-se os que resultam de uma deficiência total ou parcial da di-hidropirimidina-desidrogenase (ver Capítulo 33).

β -Alanil dipeptídeos

Os β -alanil dipeptídeos, carnosina e anserina (*N*-metilcarnosina) (Figura 30-7), ativam a miosina ATPase (EC 3.6.4.1), efetuam a quelação e aumentam a captação do cobre. O β -alanilimidazol tampona o pH do músculo esquelético durante a contração anaeróbia. A biossíntese de carnosina é catalisada pela carnosina-sintase (EC 6.3.2.11), em uma reação em dois estágios, que envolve a formação inicial de um intermediário

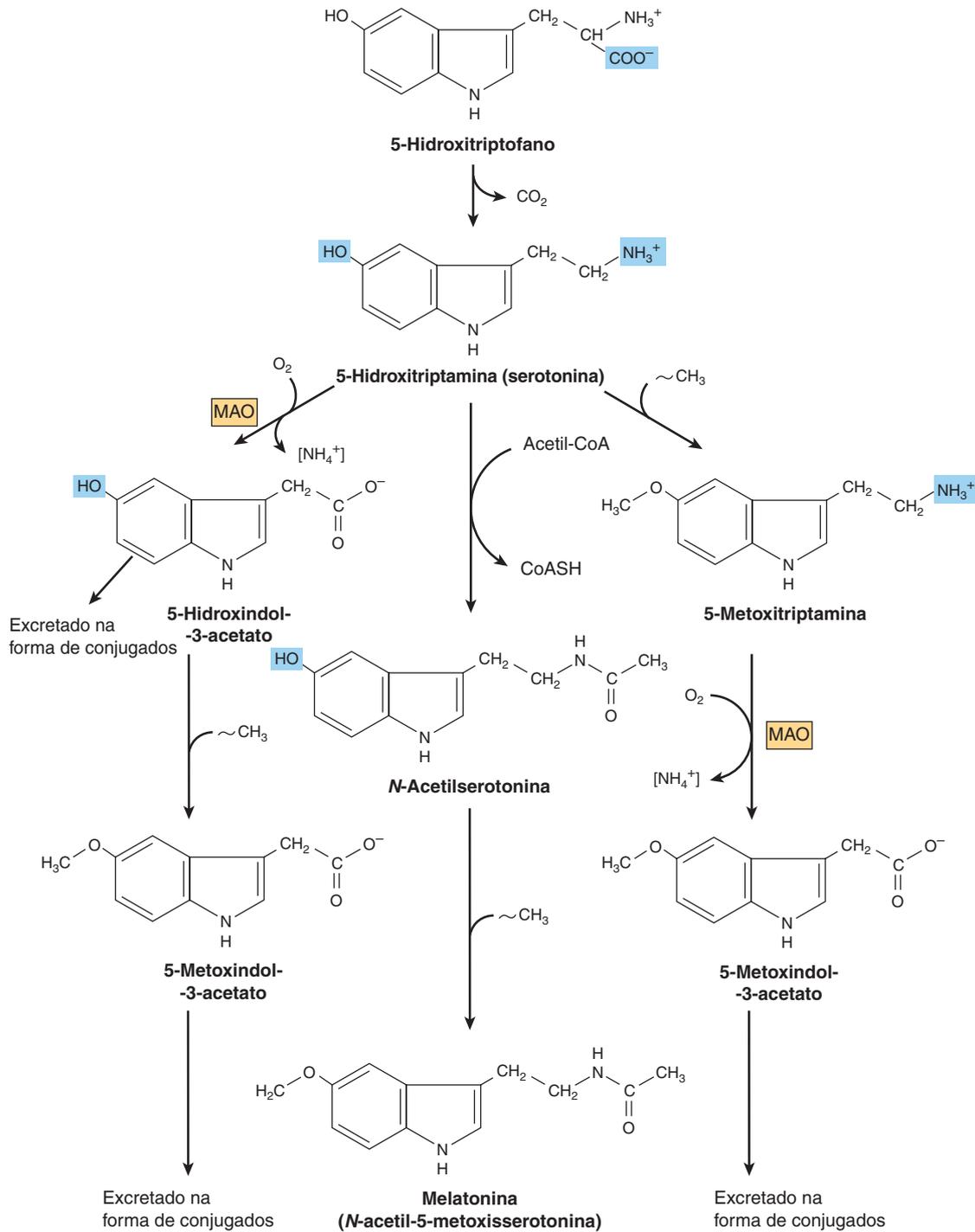
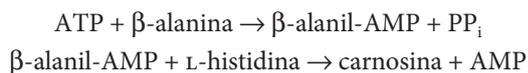


FIGURA 30-11 Biossíntese e metabolismo da serotonina e da melatonina. ([NH₄⁺], por transaminação; MAO, monoaminoxidase; ~CH₃, proveniente da S-adenosilmetionina.)

acil-adenilato da β-alanina ligado à enzima e subsequente transferência da porção β-alanil para a L-histidina.



A hidrólise de carnosina a β-alanina e L-histidina é catalisada pela carnosinase, EC 3.4.13.20. O distúrbio here-

ditário de deficiência de carnosinase caracteriza-se por **carnosinúria**.

A homocarnosina (Figura 30-7), presente no encéfalo humano em níveis mais altos do que a carnosina, é sintetizada no tecido cerebral pela carnosina-sintase. A carnosinase sérica não hidrolisa a homocarnosina. A **homocarnosinose**, um raro distúrbio genético, está associada à paraplegia espástica progressiva e à deficiência intelectual.

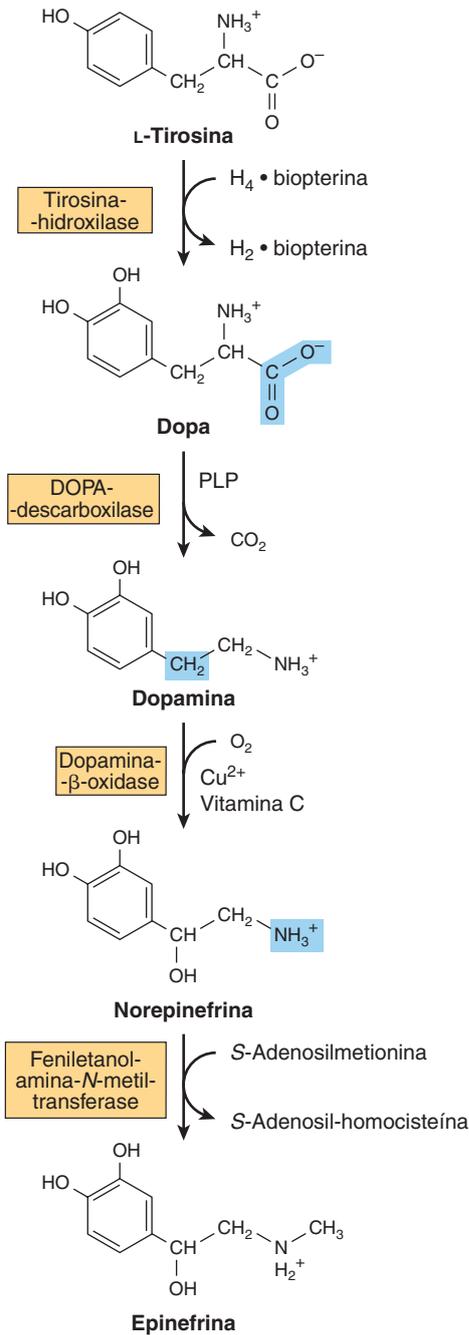


FIGURA 30-12 Conversão da tirosina em epinefrina e norepinefrina nas células neuronais e suprarrenais. (PLP, piridoxal-fosfato.)

γ-Aminobutirato

O γ-aminobutirato (GABA) atua no tecido cerebral como neurotransmissor inibidor, alterando as diferenças de potencial trans-membrana. O GABA é formado pela descarboxilação de glutamato pela L-glutamato-descarboxilase, EC 4.1.1.15 (Figura 30-14). A transaminação do γ-aminobutirato produz o succinato semialdeído, que pode ser reduzido a γ-hidroxiubutirato pela L-lactato-desidrogenase, ou oxidado a succinato e, em seguida, por meio do ciclo do ácido cítrico,

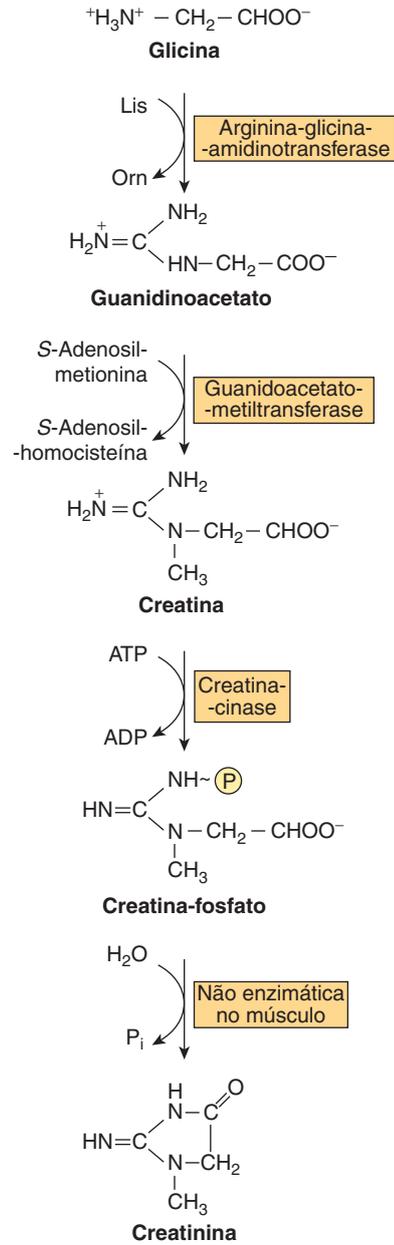


FIGURA 30-13 Biossíntese de creatina e creatinina. A conversão da glicina e do grupo guanidino da arginina em creatina e creatina-fosfato. A figura também mostra a hidrólise não enzimática da creatina-fosfato em creatinina.

a CO₂ e a H₂O (Figura 30-14). Um raro distúrbio genético do metabolismo do GABA se caracteriza por uma anormalidade da GABA-aminotransferase, uma enzima que participa do catabolismo de GABA após a sua liberação pós-sináptica no tecido cerebral. Defeitos na succinato semialdeído-desidrogenase, EC 1.2.1.24 (Figura 30-14) são responsáveis pela **acidúria 4-hidroxiubutírica**, uma disfunção metabólica rara do catabolismo de γ-aminobutirato caracterizada pela presença de 4-hidroxiubutirato na urina, no plasma e no líquido cerebrospinal (LCS). Atualmente, não há tratamento disponível para o acompanhamento dos sintomas neurológicos que variam de leves a graves.

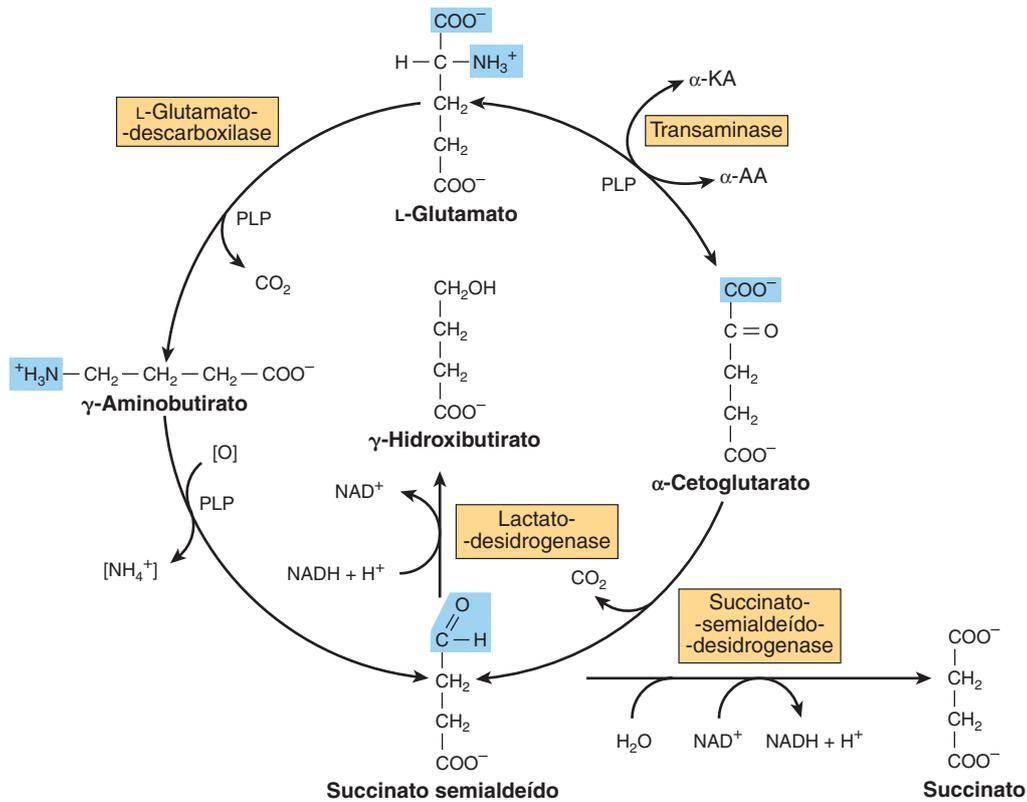


FIGURA 30-14 Metabolismo do γ -aminobutirato. (α -AA, α -aminoácidos; α -KA, α -cetoácidos; PLP, piridoxal-fosfato.)

RESUMO

- Além de desempenhar papéis estruturais e funcionais nas proteínas, os α -aminoácidos participam de uma grande variedade de outros processos biossintéticos.
- A arginina fornece o grupo formamídina da creatina e o nitrogênio do NO. Por meio da ornitina, a arginina fornece o esqueleto das poliaminas putrescina, espermina e espermidina.
- A cisteína fornece a porção tioetanolamina da coenzima A e, após a sua conversão em taurina, parte do ácido biliar ácido taurocólico.
- A glicina participa da biossíntese do heme, das purinas, da creatina e da *N*-metilglicina (sarcosina). Muitos fármacos e seus metabólitos são excretados sob a forma de conjugados de glicina, aumentando a sua solubilidade em água para excreção urinária.
- A descarboxilação da histidina forma o neurotransmissor histamina. Os compostos de histidina encontrados no corpo humano incluem a ergotioneína, a carnosina e a anserina.
- A S-adenosilmetionina, que constitui a principal fonte de grupos metil do metabolismo, contribui com o seu esqueleto de carbono na biossíntese das poliaminas espermina e espermidina.
- Além de suas funções na biossíntese de fosfolípidos e de esfingosina, a serina fornece os carbonos 2 e 8 das purinas e o grupo metil da timina.
- Os principais metabólitos do triptofano incluem a serotonina e a melatonina. Os tecidos renal e hepático, bem como as bacté-

rias fecais, convertem o triptofano em triptamina e, a seguir, em indol-3-acetato. Os principais catabólitos do triptofano na urina são o indol-3-acetato e o 5-hidroxiindolacetato.

- A tirosina forma a norepinefrina e a epinefrina e, após iodação, os hormônios tireoideanos, a tri-iodotironina e a tiroxina.
- A interconversão catalisada por enzima das formas fosfo e desfosfo da serina, da treonina e da tirosina ligadas a peptídeos desempenha um papel essencial na regulação metabólica, inclusive na transdução de sinais.
- A glicina, a arginina e a S-adenosilmetionina participam da biossíntese da creatina que, na forma de creatina-fosfato, atua como importante reserva de energia nos tecidos muscular e cerebral. A excreção de seu catabólito creatina na urina é proporcional à massa muscular.
- A β -alanina e o β -aminoisobutirato estão presentes nos tecidos na forma de aminoácidos livres. A β -alanina também ocorre na forma ligada à coenzima A, à carnosina, à anserina e à homocarnosina. O catabolismo da β -alanina envolve a conversão sequencial em acetil-CoA. O β -aminoisobutirato é catabolizado em succinil-CoA por reações análogas. Os distúrbios do metabolismo da β -alanina e do β -aminoisobutirato surgem em decorrência de defeitos nas enzimas do catabolismo das pirimidinas.
- A descarboxilação do glutamato forma o neurotransmissor inibidor, o γ -aminobutirato (GABA). Dois distúrbios metabólicos raros estão associados a defeitos no catabolismo do GABA.

REFERÊNCIAS

- Allen GF, Land JM, Heales SJ: A new perspective on the treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2009;97:6.
- Blaesi EJ, Fox BG, Brunold TC: Spectroscopic and computational investigation of iron(III) cysteine dioxygenase: implications for the nature of the putative superoxo-Fe(III) intermediate. *Biochemistry* 2014;53:5759.
- Conti M, Beavo J: Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* 2007;76:481.
- Karagiannidis I, Dehning S, Sandor P, et al: Support of the histaminergic hypothesis in Tourette syndrome: association of the histamine decarboxylase gene in a large sample of families. *J Med Genet* 2013;50:760.
- Komori H, Nitta Y, Ueno H, et al: Structural study reveals that Ser-354 determines substrate specificity on human histidine decarboxylase. *J Biol Chem* 2012;287:291.
- Manegold C, Hoffmann GF, Degen I, et al: Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and followup. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:371.
- Moinard C, Cynober L, de Bandt JP: Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 2005; 24:184.
- Montioli R, Dindo M, Giorgetti A, et al: A comprehensive picture of the mutations associated with aromatic amino acid decarboxylase deficiency: from molecular mechanisms to therapy implications. *Hum Mol Genet* 2014;23: 5429.
- Pearl PL, Gibson KM, Cortez MA, et al: Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: lessons from mice and men. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:343.
- Pearl PL, Taylor JL, Trzcinski S, et al: The pediatric neurotransmitter disorders. *J Child Neurol* 2007;22:606.
- Pegg AE: The function of spermine. *IUBMB Life* 2014;66:8.
- Schippers KJ, Nichols, SA: Deep, dark secrets of melatonin in animal evolution. *Cell* 2014;159:9.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Wu F, Yu J, Gehring H: Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase. *FASEB J* 2008;3:890.

Porfirinas e pigmentos biliares

Victor W. Rodwell, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Identificar os dois intermediários anfibólicos a partir dos quais o heme é sintetizado.
- Nomear as enzimas reguladoras essenciais da biossíntese hepática do heme.
- Explicar por que, embora os porfirinogênios e as porfirinas sejam tetrapirrólicos, as porfirinas possuem cor, e os porfirinogênios são incolores.
- Perceber que algumas das enzimas da biossíntese do heme são mitocondriais e outras são citosólicas.
- Indicar quais etapas na conversão do heme em bilirrubina são citosólicas e quais são mitocondriais.
- Compreender as causas e os quadros clínicos gerais das várias porfirias.
- Explicar a natureza bioquímica da icterícia, nomear algumas de suas causas e sugerir como abordar suas bases bioquímicas.
- Explicar o significado de “bilirrubina direta” e “bilirrubina indireta”.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A bioquímica das porfirinas e dos pigmentos biliares são tópicos intimamente relacionados. O heme é sintetizado a partir das porfirinas e do ferro, e os produtos da degradação do heme são os pigmentos biliares e o ferro. A bioquímica das porfirinas e do heme é fundamental para o entendimento das variadas funções das **hemoproteínas** e para o entendimento das **porfirias**, um grupo de doenças causadas por anormalidades na via de biossíntese de porfirinas. Uma condição clínica muito mais comum é a **icterícia**, uma consequência de níveis elevados de bilirrubina no plasma, causada pela produção excessiva de bilirrubina ou por uma falha na sua excreção. A icterícia ocorre em inúmeras doenças, variando de anemias hemolíticas até hepatite viral e câncer de pâncreas.

PORFIRINAS

As **porfirinas** são compostos cíclicos formados pela ligação de quatro **anéis pirrólicos** por meio de ligações de meteno ($=HC-$) (**Figura 31-1**). Nas porfirinas de ocorrência natural, várias **cadeias laterais** substituem os oito átomos de hidrogênios

numerados dos anéis pirrólicos. A **Figura 31-2** mostra uma representação de forma abreviada dessas substituições. As **Figuras 31-3** e **31-4** ilustram esses substituintes em porfirinas selecionadas.

As porfirinas formam complexos com íons metálicos que se ligam ao átomo de nitrogênio de cada um dos quatro anéis pirrólicos. Os exemplos incluem as **ferro porfirinas**, como o **heme** da hemoglobina, e a porfirina **clorofila contendo magnésio**, o pigmento fotossintético de plantas. As hemoproteínas estão por toda parte na biologia e atuam em diversas funções, incluindo, mas não limitadas a, transporte e armazenamento de oxigênio (p. ex., hemoglobina e mioglobina) e transporte de elétrons (p. ex., citocromo c e citocromo P450). Os hemes são **tetrapirróis**, dos quais dois tipos predominam, o heme *b* e o heme *c* (**Figura 31-5**). No heme *c*, os grupos vinílicos do heme *b* estão substituídos por ligações covalentes tioéter a uma apoproteína, comumente, via resíduos cisteinil. Ao contrário do heme *b*, o heme *c* não se dissocia prontamente de sua apoproteína. Em geral, as holoproteínas de vertebrados ligam 1 mol de heme *c* por mol, embora as de invertebrados possam ligar significativamente mais moléculas de heme. As proteínas que contêm heme são amplamente distribuídas na natureza (**Tabela 31-1**).

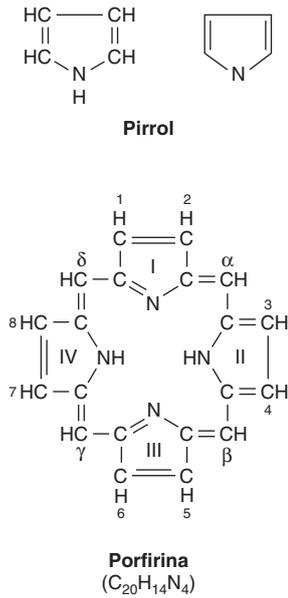


FIGURA 31-1 A molécula de porfirina. Os anéis são numerados como I, II, III e IV. As posições dos substituintes estão marcadas de 1 a 8. As quatro ligações de meteno (=HC—) estão marcadas como α , β , γ e δ .

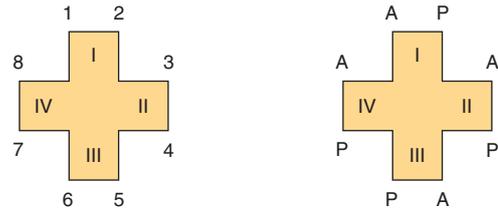
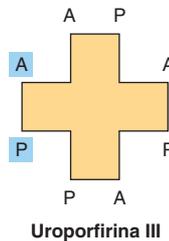
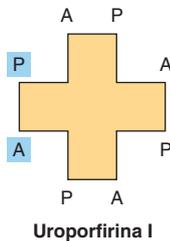
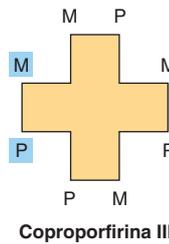
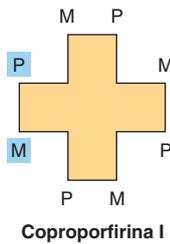


FIGURA 31-2 Representação de uma forma abreviada de uma porfirina, a uroporfirina III. À esquerda: os números 1 a 8 correspondem aos da Figura 31-1. À direita: os substituintes na uroporfirina III são A = acetato (—CH₂COO⁻) e P = propionato (—CH₂CH₂COO⁻). Observe a assimetria dos substituintes do anel 4.



As uroporfirinas foram encontradas primeiramente na urina, mas não são restritas a ela.



As coproporfirinas foram encontradas primeiramente nas fezes, mas também são encontradas na urina.

FIGURA 31-3 Uroporfirinas e coproporfirinas. A, acetato; M, metil; P, propionato. Observe que as posições dos substituintes acetato e propionato destacados são inversas nas uroporfirinas I e II, e nas coproporfirinas I e II.

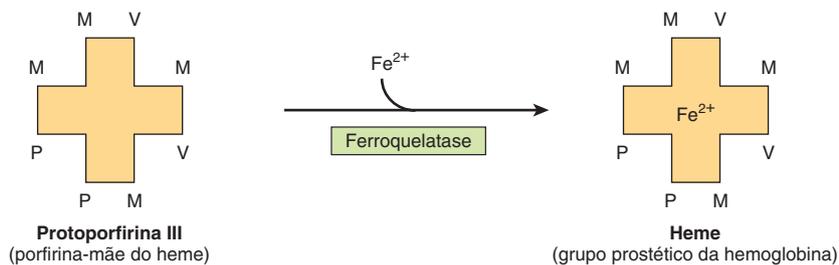
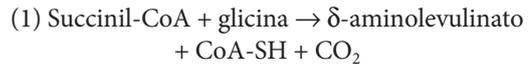


FIGURA 31-4 A adição de ferro à protoporfirina III forma o heme. V, vinil; (—CH=CH₂).

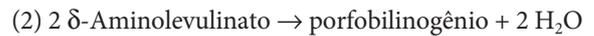
O HEME É SINTETIZADO A PARTIR DE SUCCINIL-COA E GLICINA

A biossíntese do heme ocorre na maioria das células de mamíferos, exceto em hemácias maduras, que carecem de mitocôndrias. Aproximadamente 85% da síntese do heme ocorre em células precursoras eritroides na **medula óssea**, e a maior parte do restante, nos **hepatócitos**. A biossíntese do heme é iniciada pela condensação de succinil-CoA e glicina em uma reação dependente de piridoxal-fosfato catalisada pela **δ -aminolevulinato-sintase (ALA-sintase, EC 2.3.1.37)** mitocondrial.



Os seres humanos expressam duas isoenzimas da ALA-sintase. A ALAS1 é ubiquamente expressa em todo o organismo, e a ALAS2 é expressa nas células precursoras eritroides. A velocidade da reação é limitada pela síntese de porfirina no fígado de mamíferos. O produto inicial formado é o **α -amino- β -cetoaladiato**, que é rapidamente descarboxilado a **δ -aminolevulinato (Figura 31-6, parte superior)**.

A condensação de duas moléculas de ALA, catalisada pela **ALA-desidratase (4.2.1.24)** citosólica, forma **porfobilinogênio**:



(Figura 31-6, parte inferior). A ALA-desidratase é uma metaloproteína contendo zinco sensível à inibição por **chumbo**, o que pode ocorrer em situações de intoxicação por chumbo.

A reação catalisada pela **hidroximetilbilano-sintase (uroporfirinogênio-sintase I, EC 2.5.1.61)** citosólica forma **hidroximetilbilano**:

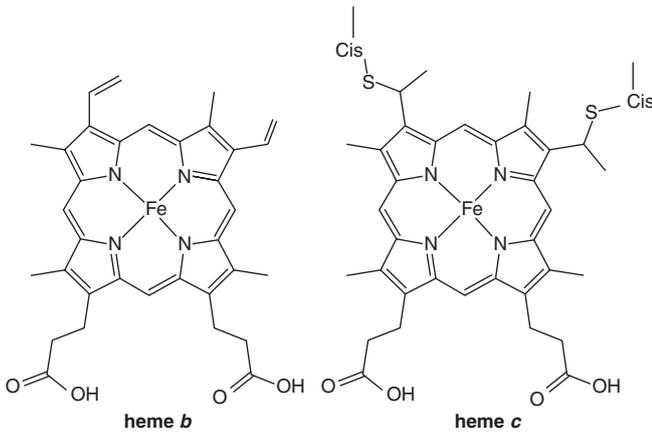
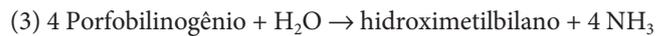


FIGURA 31-5 Estruturas do heme b e do heme c.

TABELA 31-1 Exemplos de algumas importantes hemo-proteínas humanas e animais^a

Proteína	Função
Hemoglobina	Transporte de oxigênio no sangue
Mioglobina	Armazenamento de oxigênio no músculo
Citocromo c	Envolvimento na cadeia de transporte de elétrons
Citocromo P450	Hidroxilação dos xenobióticos
Catalase	Degradação do peróxido de hidrogênio
Triptofano-pirrolase	Oxidação do triptofano

^aAs funções das proteínas citadas estão descritas em vários capítulos deste livro.

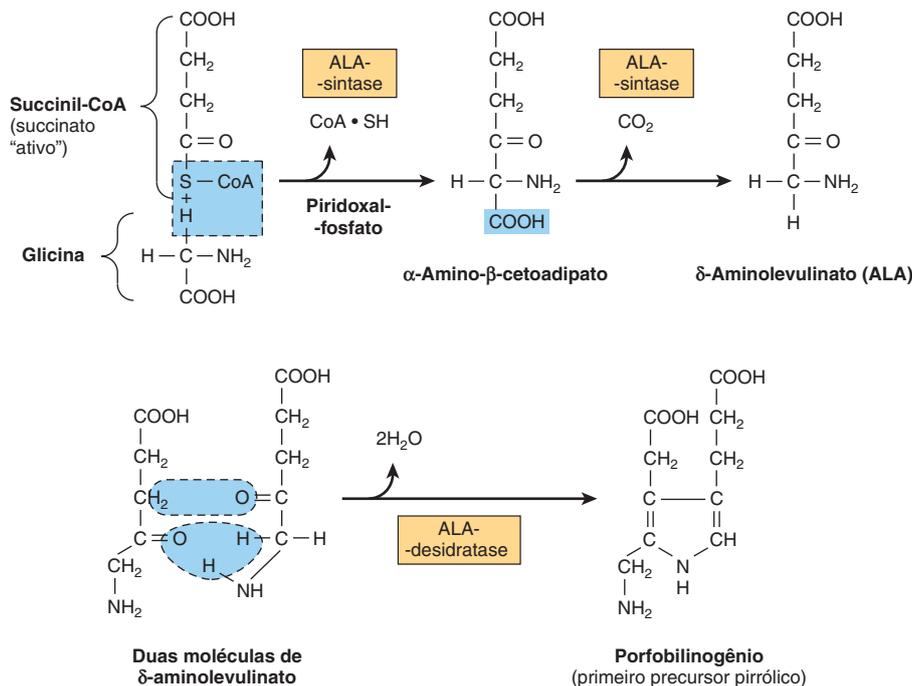


FIGURA 31-6 Biossíntese do porfobilinogênio. A ALA-sintase está presente nas mitocôndrias, e a ALA-desidratase, no citosol.

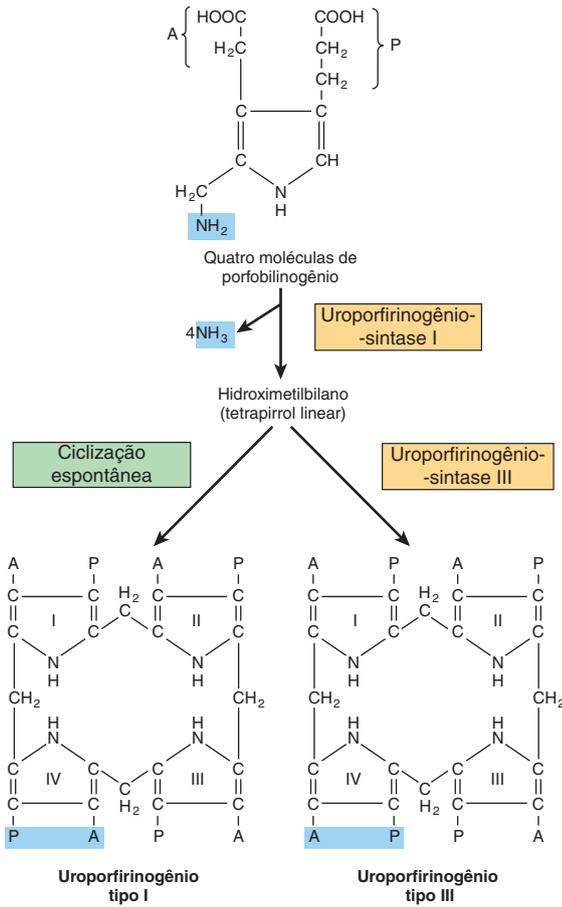
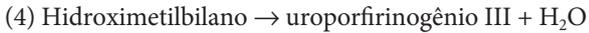


FIGURA 31-7 Conversão do porfobilinogênio em uroporfirinogênios. A linearização do porfobilinogênio é catalisada pela hidroximetilbilano-sintase (também chamada de uroporfirinogênio-sintase I, ou porfobilinogênio-desaminase).

A catálise envolve a condensação tipo cabeça-cauda de quatro moléculas de porfobilinogênio, formando o tetrapirrol linear hidroximetilbilano (Figura 31-7, centro).

A ciclização de hidroximetilbilano é catalisada pela **uroporfirinogênio-sintase III**, EC 4.2.1.75:



e forma **uroporfirinogênio III** (Figura 31-7, à direita). O hidroximetilbilano também pode ciclizar espontaneamente, formando **uroporfirinogênio I** (Figura 31-7, à esquerda), mas, em condições normais, o uroporfirinogênio formado é quase exclusivamente o isômero tipo III. Os isômeros de porfirinogênios tipo I são, no entanto, formados em excesso em certas porfírias. Como os anéis pirrólicos desses uroporfirinogênios são conectados por **metilenos** (—CH₂—), em vez de por ligações de meteno, eles não formam um sistema de anéis conjugados e, por isso, eles, e na verdade todos os porfirinogênios, são **incoloros**. Eles são, no entanto, prontamente auto-oxidados às suas respectivas **porfirinas coloridas**.

Todas as quatro porções acetato do uroporfirinogênio III sofrem, na sequência, descarboxilação a substituintes metil (M), formando **coproporfirinogênio III** em uma reação citosólica catalisada pela **uroporfirinogênio-descarboxilase**, EC 4.1.1.37 (Figuras 31-8 e 31-9):

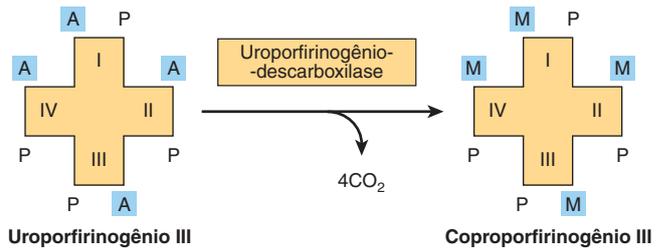
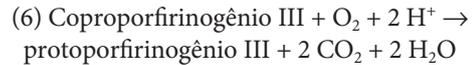


FIGURA 31-8 Descarboxilação de uroporfirinogênio III a coproporfirinogênio III. A, acetil; M, metil; P, propionil.



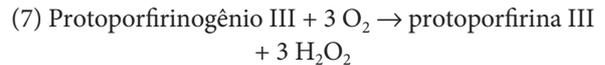
Essa descarboxilase também pode converter uroporfirinogênio I, se presente, a coproporfirinogênio I.

As três reações finais da biossíntese do heme ocorrem nas mitocôndrias. O coproporfirinogênio III entra na mitocôndria e é convertido a **protoporfirinogênio III** e, então, à **protoporfirina III**. Essas reações são catalisadas pela **protoporfirinogênio-oxidase** (EC 1.3.3.3), que descarboxila e oxida as duas cadeias de ácidos propiônicos, formando **protoporfirinogênio III**:

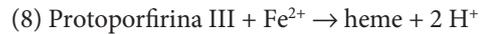


Essa oxidase é específica para o coproporfirinogênio tipo III, de forma que, em geral, as protoporfirinas tipo I não ocorrem em seres humanos.

O protoporfirinogênio III é, na sequência, oxidado à **protoporfirina III** em uma reação catalisada pela **protoporfirinogênio-oxidase**, EC 1.3.3.4:



A etapa final da síntese do heme envolve a incorporação do ferro ferroso na protoporfirina III em uma reação catalisada pela **ferroquelatase** (heme-sintase, EC 4.99.1.1):



A Figura 31-9 resume os estágios, e suas localizações intracelulares, da biossíntese dos derivados de porfirina a partir do porfobilinogênio. Para as reações anteriores, os números correspondem aos da Figura 31-10 e da Tabela 31-2.

A ALA-sintase é a enzima reguladora essencial na biossíntese hepática do heme

Existem duas isoenzimas da **ALA-sintase**. A ALAS1 é expressa por todo o corpo; a ALAS2 é expressa nas células precursoras de hemácias. A reação catalisada pela ALA-sintase I (Figura 31-6) é limitante da velocidade de biossíntese de heme no fígado. Acredita-se que o **heme**, provavelmente atuando por meio de uma molécula aporressora, atue como **regulador negativo** da síntese de ALAS1 (Figura 31-10). A velocidade de síntese de ALAS1, portanto, aumenta significativamente na *ausência*

FIGURA 31-10 Intermediários, enzimas e regulação da síntese do heme. Os números das enzimas que catalisam as reações indicadas são aqueles utilizados no texto e na coluna 1 da Tabela 31-2. As enzimas 1, 6, 7 e 8 são mitocondriais, e as enzimas 2 a 5 são citosólicas. A regulação da síntese hepática do heme ocorre na etapa da ALA-sintase (ALAS1) por um mecanismo de repressão-desrepressão mediado pelo heme e seu aporrepressor hipotético. As linhas tracejadas indicam a regulação ⊖ negativa por repressão. As mutações no gene que codifica a enzima 1 causam a anemia sideroblástica ligada ao X. As mutações nos genes que codificam as enzimas 2 a 8 dão origem às porfirias.

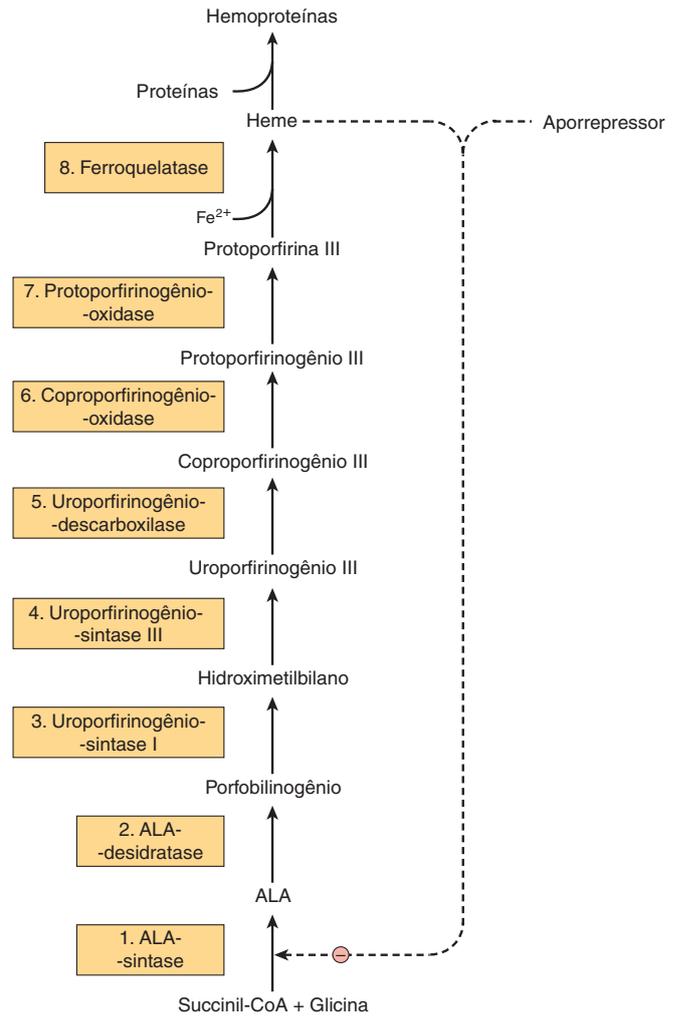


TABELA 31-2 Resumo das principais características das porfirias^a

Enzima envolvida ^b	Tipo, classe e número OMIM	Principais sinais e sintomas	Resultados dos exames laboratoriais
1. ALA-sintase 2 (ALAS2), EC 2.3.1.37	Anemia sideroblástica ligada ao X ^c (eritropoiética) (OMIM 301300)	Anemia	Baixas contagens de hemácias e níveis diminuídos de hemoglobina
2. ALA-desidratase, EC 4.2.1.24	Deficiência de ALA-desidratase (hepática) (OMIM 125270)	Dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA e coproporfirina III
3. Uroporfirinogênio-sintase, ^d EC 2.5.1.61	Porfíria intermitente aguda (hepática) (OMIM 176000)	Dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA e de PBG ^e
4. Uroporfirinogênio-sintase III, EC 4.2.1.75	Porfíria eritropoiética congênita (eritropoiética) (OMIM 263700)	Fotossensibilidade	Níveis urinários, fecais e eritrocitários elevados de uroporfirinas I
5. Uroporfirinogênio-descarboxilase, EC 4.1.1.37	Porfíria cutânea tardia (hepática) (OMIM 176100)	Fotossensibilidade	Níveis urinários elevados de uroporfirina I
6. Coproporfirinogênio-oxidase, EC 1.3.3.3	Coproporfíria hereditária (hepática) (OMIM 121300)	Fotossensibilidade, dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA, PBG e coproporfirina III, e níveis fecais elevados de coproporfirina III
7. Protoporfirinogênio-oxidase, EC 1.3.3.4	Porfíria variegata (hepática) (OMIM 176200)	Fotossensibilidade, dor abdominal, sintomas neuropsiquiátricos	Níveis urinários elevados de ALA, PBG e coproporfirina III, e níveis fecais elevados de protoporfirina IX
8. Ferroquelatase, EC 4.99.1.1	Protoporfíria (eritropoiética) (OMIM 177000)	Fotossensibilidade	Níveis fecais e eritrocitários elevados de protoporfirina IX

^aApenas os achados bioquímicos nos estágios ativos dessas doenças são listados. Algumas anormalidades bioquímicas podem ser detectadas nos estágios latentes de alguns dos distúrbios listados. Os distúrbios 3, 5 e 8 são, em geral, as porfirias mais prevalentes. O distúrbio 2 é raro.

^bA numeração das enzimas nesta tabela corresponde à utilizada na Figura 31-10.

^cA anemia sideroblástica ligada ao X não é uma porfíria, porém está incluída aqui devido ao envolvimento da ALA-sintase.

^dEssa enzima também é chamada de PBG-desaminase ou hidroximetilbilano-sintase.

^ePBG, porfobilinogênio III.

Abreviações: ALA, ácido δ-aminolevulínico; PBG, porfobilinogênio.

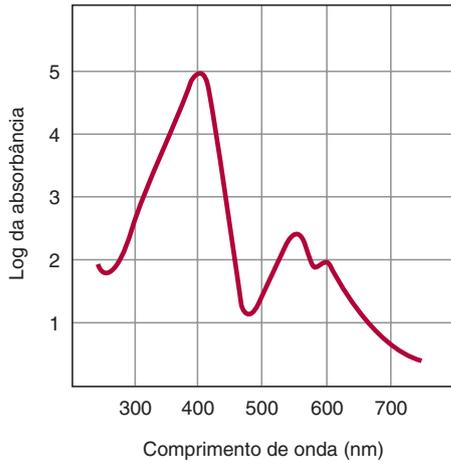


FIGURA 31-11 Espectro de absorção da hemato porfirina. Está representado o espectro de uma solução de 0,01% de hemato porfirina em HCl 5%.

DISTÚRBIOS DA BIOSÍNTESE DE HEME

Os distúrbios da biossíntese do heme podem ser genéticos ou adquiridos. Um exemplo de um defeito adquirido é a intoxicação por chumbo. O chumbo pode inativar a ferroquelatase e a ALA-desidratase por se combinar com grupos tióis essenciais. Os sinais incluem níveis elevados de protoporfirina nas hemácias e níveis elevados de ALA e coproporfirina na urina.

Os distúrbios genéticos do metabolismo do heme e da bilirrubina (ver a seguir) compartilham as mesmas características dos distúrbios metabólicos da biossíntese da ureia (ver Capítulo 28):

1. Os sinais e sintomas clínicos semelhantes ou idênticos podem surgir de diferentes mutações em genes que codificam uma determinada enzima ou a enzima que catalisa uma reação sucessiva.
2. A terapia racional requer um entendimento da bioquímica das reações catalisadas por enzimas em indivíduos normais e afetados.
3. A identificação de intermediários e produtos colaterais que acumulam antes de um bloqueio metabólico pode fornecer a base para os testes de rastreamento metabólico que podem implicar a reação prejudicada.
4. O diagnóstico definitivo envolve um ensaio quantitativo da atividade da enzima com suspeita de deficiência.
5. A comparação da sequência de DNA do gene que codifica uma determinada enzima mutante com aquela do gene selvagem pode identificar a(s) mutação(ões) específica(s) que causa(m) a doença.

As porfirias

Os sinais e sintomas da porfiria resultam da **deficiência** de intermediários além do bloqueio enzimático, ou do **acúmulo** de metabólitos antes do bloqueio. A Tabela 31-2 lista os seis principais tipos de **porfiria** que refletem a atividade baixa ou ausente de enzimas que catalisam as reações 2 a

8 da Figura 31-10. Possivelmente devido à potencial letalidade, não há defeito conhecido da ALAS1. Os indivíduos com baixa atividade de ALAS2 desenvolvem anemia, não porfiria (Tabela 31-2). A porfiria devida à baixa atividade da ALA-desidratase, chamada de porfiria por deficiência de ALA-desidratase, é extremamente rara.

Porfiria eritropoiética congênita

A a maior parte das porfirias é herdada de **forma autossômica dominante**, ao passo que a porfiria eritropoiética congênita é herdada de **forma recessiva**. A enzima defeituosa na porfiria eritropoiética congênita é a **uroporfirinogênio-sintase III**, o catalisador da reação 4. A fotossensibilidade e a desfiguração grave exibida por algumas vítimas da porfiria eritropoiética congênita as indicou como protótipos dos chamados lobisomens.

Porfiria intermitente aguda

A enzima defeituosa na porfiria intermitente aguda é a hidroximetilbilano-sintase (uroporfirinogênio-sintase I), o catalisador da reação 3. ALA e porfirobilinogênio acumulam-se nos tecidos e líquidos corporais (Figura 31-12).

Bloqueio no fim da via

O bloqueio no fim da via resulta no **acúmulo de porfirinogênios**, como indicado nas Figuras 31-10 e 31-12. Os seus produtos de oxidação, os derivados porfirínicos correspondentes, causam **fotossensibilidade** à luz visível em torno do comprimento de onda de 400 nm. Possivelmente, como resultado de sua excitação e reação com oxigênio molecular, os radicais de oxigênio resultantes danificam os lisossomos e outras organelas subcelulares, liberando enzimas degradativas que causam graus variados de danos à pele, incluindo cicatrizes.

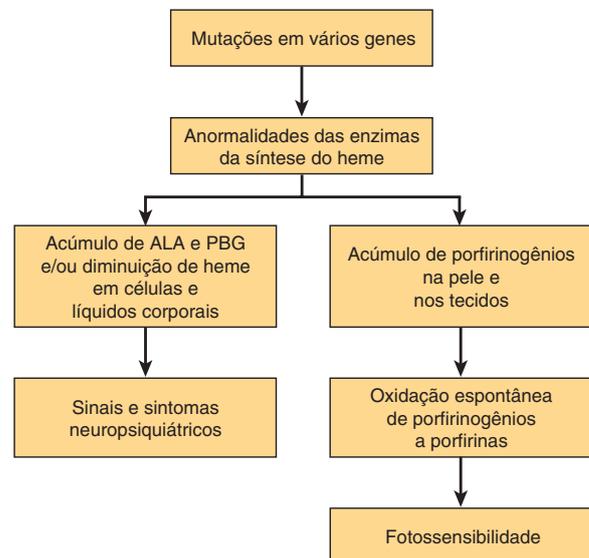


FIGURA 31-12 Base bioquímica dos principais sinais e sintomas das porfirias.

CLASSIFICAÇÃO DAS PORFIRIAS

As porfirias podem ser chamadas de **eritropoiéticas** ou **hepáticas** com base nos órgãos mais afetados; em geral, a medula óssea e o fígado (Tabela 31-2). Os níveis diferentes e variáveis de heme, precursores tóxicos ou metabólitos provavelmente explicam por que porfirias específicas afetam alguns tipos de células e órgãos de maneira distinta. Alternativamente, as porfirias podem ser classificadas como **agudas** ou **cutâneas** com base em suas características clínicas. O diagnóstico de um tipo específico de porfiria geralmente pode ser estabelecido pela análise da história clínica e familiar, exame físico e exames laboratoriais apropriados. A Tabela 31-2 lista os principais sinais e sintomas e parâmetros laboratoriais relevantes nos seis principais tipos de porfiria.

Porfiria induzida por fármaco

Certos fármacos (p. ex., barbitúricos, griseofulvina) induzem a produção de citocromo P450. Em pacientes com porfiria, isso pode precipitar um ataque de porfiria por esgotar os níveis de heme. Como compensação, a desrepressão da síntese de ALAS1 resulta nos níveis elevados de precursores de heme potencialmente tóxicos.

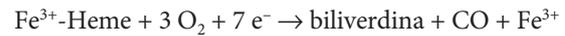
Possíveis tratamentos para as porfirias

Embora o tratamento a nível de gene possa vir a ser possível, hoje o tratamento das porfirias é essencialmente sintomático. Isso inclui evitar os fármacos que induzem a produção de citocromo P450, a ingestão de grandes quantidades de carboidratos e a administração de hematina para reprimir a síntese de ALAS1 e diminuir a produção de precursores tóxicos do heme. Pacientes que exibem fotossensibilidade se beneficiam dos protetores solares e, possivelmente, da administração de β -caroteno, que parece diminuir a produção de radicais livres, reduzindo a fotossensibilidade.

O CATABOLISMO DO HEME PRODUZ BILIRRUBINA

Em geral, os seres humanos adultos destroem cerca de 200 bilhões de hemácias por dia. Assim, para um ser humano de 70 kg, a renovação diária é de cerca de **6 g de hemoglobina**. A **globina** é degradada a seus aminoácidos constituintes, o **ferro** liberado entra no conjunto de ferro e todos os produtos são reutilizados. A porção **porfirina** desprovida de ferro também é degradada, principalmente nas células reticuloendoteliais do fígado, do baço e da medula óssea.

O catabolismo do heme de todas as hemoproteínas ocorre na **fração microsomal** das células por **heme-oxigenase**, EC 1.4.99.3. A síntese da heme-oxigenase é induzida pelo substrato, e o heme também serve como substrato e como cofator para a reação. Em geral, o ferro do heme que alcança a heme-oxigenase foi oxidado à sua **forma férrica (hemina)**. A conversão de 1 mol de heme- Fe^{3+} a biliverdina, monóxido de carbono e Fe^{3+} consome 3 moles de O_2 , mais 7 elétrons fornecidos pelo NADH e pela NADPH-citocromo P450-reductase:



Apesar de sua alta afinidade por heme- Fe^{2+} (ver Capítulo 6), o monóxido de carbono produzido não inibe a heme-oxigenase com gravidade. Pássaros e anfíbios excretam biliverdina de cor verde diretamente. Em seres humanos, a **biliverdina-reductase** (EC 1.3.1.24) reduz a ligação metileno central da biliverdina a um grupo metil, produzindo o pigmento amarelo **bilirrubina**:



A **Figura 31-13** resume ambas as reações anteriores.

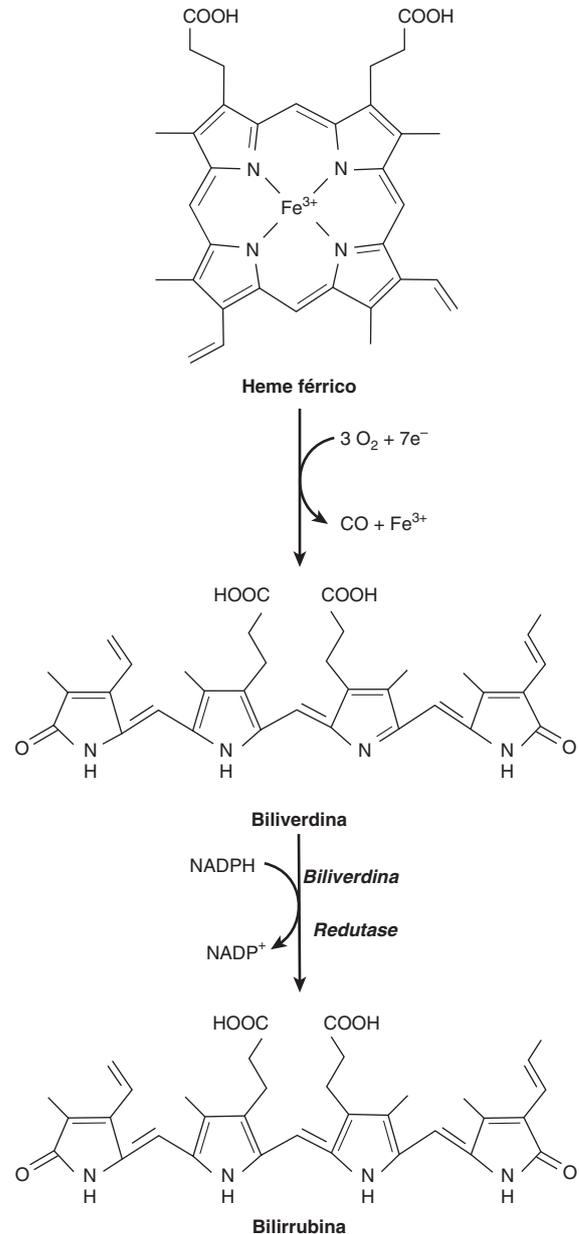


FIGURA 31-13 Conversão de heme férrico à biliverdina e, então, à bilirrubina. O sistema da heme-oxigenase forma biliverdina, que a enzima biliverdina-reductase reduz à bilirrubina. A conversão de 1 mol de heme- Fe^{3+} a biliverdina, monóxido de carbono e Fe^{3+} consome 3 moles de O_2 , mais 7 elétrons fornecidos pelo NADH e pela NADPH-citocromo P450-reductase.

Como 1 g de hemoglobina rende cerca de 35 mg de bilirrubina, **os seres humanos adultos formam 250 a 350 mg de bilirrubina por dia**. Isso é derivado, principalmente, da hemoglobina, mas também da eritropoiese inefetiva e do catabolismo de outras proteínas heme.

A conversão do heme à bilirrubina pelas células reticulo-endoteliais pode ser observada visualmente à medida que a cor púrpura do heme em um **hematoma** é lentamente convertida ao pigmento amarelo da bilirrubina.

A bilirrubina é transportada para o fígado ligada à albumina sérica

A bilirrubina é apenas moderadamente solúvel em água, mas a bilirrubina ligada à albumina sérica é facilmente transportada para o fígado. A albumina parece ter um sítio de alta afinidade e um sítio de baixa afinidade pela bilirrubina. O sítio de alta afinidade pode ligar cerca de 25 mg de bilirrubina/100 mL de plasma. A bilirrubina mais fracamente ligada pode ser liberada de imediato e se difundir para os tecidos. Antibióticos ou alguns outros medicamentos podem competir com, e deslocar, a bilirrubina pelo sítio de alta afinidade na albumina.

O metabolismo adicional da bilirrubina ocorre principalmente no fígado

O catabolismo hepático da bilirrubina ocorre em três estágios: captura pelo fígado, conjugação com ácido glicurônico e secreção na bile.

Captação de bilirrubina pelas células do parênquima hepático

A bilirrubina é removida da albumina e capturada pela superfície sinusoidal dos hepatócitos por um **sistema de transporte facilitado** de grande capacidade e saturável. Mesmo em condições patológicas, o transporte não parece ser o fator limitante da velocidade do metabolismo de bilirrubina. A captação líquida de bilirrubina depende de sua **remoção** por metabolismo subsequente. Uma vez internalizada, a bilirrubina liga-se a proteínas citosólicas, como a glutatona-S-transferase, antes conhecida como uma **ligandina**, para prevenir a reentrada da bilirrubina na corrente sanguínea.

Conjugação de bilirrubina com glicuronato

A bilirrubina é **apolar** e persistiria nas células (p. ex., ligada a lipídeos), se não fosse convertida a uma forma mais solúvel em água. A bilirrubina é convertida a uma molécula mais **polar** por conjugação com o ácido glicurônico. Uma **UDP-glicosil-transferase** (EC 2.4.1.17) específica para bilirrubina, do retículo endoplasmático, catalisa a transferência gradual para a bilirrubina de duas porções glicosil do UDP-glicuronato:

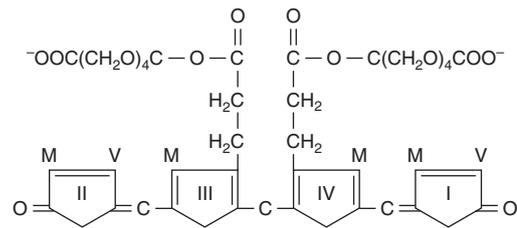
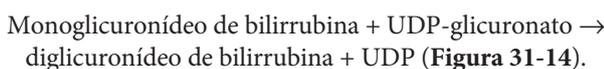
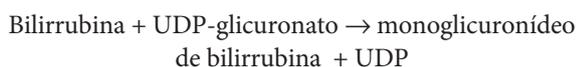


FIGURA 31-14 Estrutura do diglicuronídeo de bilirrubina. Porções glicuronato são acopladas por meio de ligações éster aos dois grupos propionatos da bilirrubina. Clinicamente, o diglicuronídeo também é chamado de bilirrubina “reagente direto”.

Secreção de bilirrubina na bile

A secreção da bilirrubina conjugada na bile ocorre por um mecanismo de **transporte ativo**, que provavelmente constitui a etapa limitante da velocidade de todo o processo de metabolismo hepático da bilirrubina. A proteína envolvida é um **transportador multiespecífico de ânions orgânicos (MOAT)** localizado na **membrana plasmática** do canalículo biliar. Um membro da família dos transportadores cassete de ligação ao ATP, o MOAT, transporta inúmeros ânions orgânicos. O transporte hepático de bilirrubina conjugada até a bile é **induzível** pelos mesmos fármacos que podem induzir a conjugação de bilirrubina. A conjugação e a excreção de bilirrubina, portanto, constituem uma unidade funcional coordenada.

A maior parte da bilirrubina excretada na bile de mamíferos está na forma de diglicuronídeo de bilirrubina. A atividade da bilirrubina UDP-glicosil-transferase pode ser **induzida** por diversos fármacos, incluindo fenobarbital. Entretanto, mesmo quando os conjugados de bilirrubina aparecem anormalmente no plasma humano (p. ex., na icterícia obstrutiva), eles são, predominantemente, **monoglicuronídeos**. A **Figura 31-15**

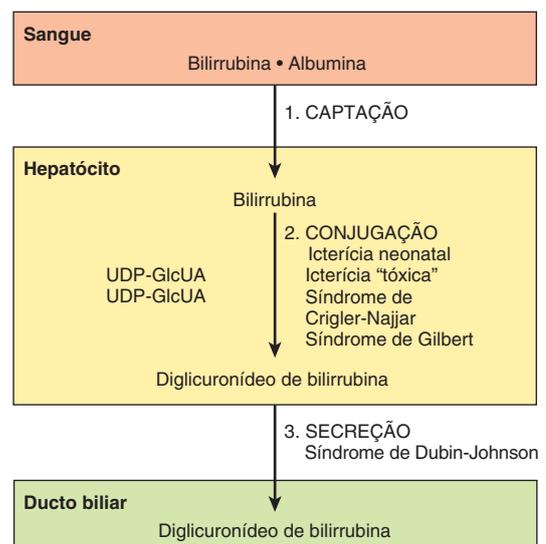


FIGURA 31-15 Representação esquemática dos três principais processos (captação, conjugação e secreção) envolvidos na transferência da bilirrubina do sangue para a bile. Certas proteínas dos hepatócitos ligam-se à bilirrubina intracelular e podem prevenir seu efluxo para a corrente sanguínea. Os processos afetados em certas condições que causam icterícia também são mostrados.

fornece um resumo dos três processos principais envolvidos na transferência da bilirrubina do sangue para a bile. Os locais afetados em inúmeras condições que causam icterícia também são indicados.

A bilirrubina conjugada é reduzida a urobilinogênio pelas bactérias intestinais

Quando a bilirrubina conjugada alcança a região terminal do íleo e do intestino grosso, as porções glicuronosil são removidas por β -glicuronidases (EC 3.2.1.31) bacterianas específicas. A subsequente redução pela microbiota fecal forma um grupo de tetrapirróis incolores, chamados de **urobilinogênios**. Pequenas porções de urobilinogênios são reabsorvidas na região terminal do íleo e do intestino grosso e, subsequentemente, são reexcretadas através do **ciclo entero-hepático do urobilinogênio**. Sob condições anormais, sobretudo quando é formada grande quantidade de pigmento biliar ou quando uma disfunção hepática interrompe esse ciclo intra-hepático, o urobilinogênio também pode ser excretado na urina. A maior parte dos urobilinogênios incolores formados no colo é **oxidada** ali mesmo a **urobilinas** coloridas e são excretadas nas fezes. O escurecimento fecal após à exposição ao ar resulta da oxidação de urobilinogênios a urobilinas.

Quantificação de bilirrubina no soro

A quantificação de bilirrubina emprega um método colorimétrico com base na cor púrpuro-avermelhada formada quando a bilirrubina reage com o ácido sulfanílico diazotizado. Um ensaio conduzido na *ausência* de metanol mede a “**bilirrubina direta**”, que é o de **glicuronídeo bilirrubina**. Um ensaio conduzido na *presença* de metanol mede a **bilirrubina total**. A *diferença* entre bilirrubina total e bilirrubina direta é conhecida como “**bilirrubina indireta**”, que é a **bilirrubina não conjugada**.

A HIPERBILIRRUBINEMIA CAUSA ICTERÍCIA

A **hiperbilirrubinemia**, condição em que o nível sanguíneo de bilirrubina excede 1 mg por dL (17 μ mol/L), pode resultar da **produção** de mais bilirrubina do que o fígado normal pode excretar, ou devido à falha de o fígado danificado **excretar** quantidades normais de bilirrubina. Na ausência de dano hepático, a **obstrução** dos ductos excretadores do fígado impede a excreção de bilirrubina, e também causará hiperbilirrubinemia. Em todas essas situações, quando a concentração sanguínea atinge 2 a 2,5 mg de bilirrubina por dL, ela difunde para os tecidos, tornando-os amarelos, uma condição chamada de **icterícia**.

Ocorrência de bilirrubina não conjugada no sangue

Dependendo do tipo de bilirrubina presente no plasma, a hiperbilirrubinemia pode ser classificada como **hiperbilirrubinemia de retenção**, devido à superprodução de bilirrubina, ou como **hiperbilirrubinemia de regurgitação**, devido ao refluxo na corrente sanguínea em decorrência da obstrução biliar.

Devido à sua **hidrofobicidade**, apenas a bilirrubina *não conjugada* pode atravessar a barreira hematencefálica para o

TABELA 31-3 Algumas causas de hiperbilirrubinemias não conjugada e conjugada

Não conjugada	Conjugada
Anemias hemolíticas	Obstrução da árvore biliar
“Icterícia fisiológica” neonatal	Síndrome de Dubin-Johnson
Síndrome de Crigler-Najjar tipos I e II	Síndrome de Rotor
Síndrome de Gilbert	Doenças hepáticas, como os vários tipos de hepatite
Hiperbilirrubinemia tóxica	

Essas causas são discutidas de modo sucinto no texto. As causas comuns de obstrução da árvore biliar consistem em cálculo no ducto biliar comum e câncer da cabeça do pâncreas. Várias doenças hepáticas (p. ex., os vários tipos de hepatite) constituem causas frequentes de hiperbilirrubinemia predominantemente conjugada.

sistema nervoso central. A encefalopatia devida à hiperbilirrubinemia (**kernicterus**) ocorre, portanto, apenas com bilirrubina não conjugada, como na hiperbilirrubinemia de retenção. Alternativamente, devido à sua solubilidade em água, apenas a bilirrubina *conjugada* pode aparecer na urina. Portanto, a **icterícia colúrica** (colúria refere-se à presença de pigmentos biliares na urina) só ocorre na hiperbilirrubinemia de regurgitação, e a **icterícia acolúrica** só é observada na presença de quantidades excessivas de bilirrubina não conjugada. A **Tabela 31-3** fornece uma lista de algumas causas de hiperbilirrubinemias não conjugada e conjugada. Uma hiperbilirrubinemia moderada acompanha as **anemias hemolíticas**. A hiperbilirrubinemia é geralmente modesta (< 4 mg de bilirrubina por dL; < 68 μ mol/L) apesar da extensa hemólise, devida à alta capacidade de o fígado saudável metabolizar a bilirrubina.

DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DA BILIRRUBINA

“Icterícia fisiológica” neonatal

A hiperbilirrubinemia não conjugada do recém-nascido, “icterícia fisiológica”, resulta da hemólise acelerada e de um sistema hepático imaturo para a captação, a conjugação e a secreção de bilirrubina. Nessa condição transitória, a atividade da bilirrubina-glicosil-transferase e, provavelmente, também a síntese de UDP-glicuronato estão reduzidas. Quando a concentração plasmática da bilirrubina não conjugada excede aquela que pode estar firmemente ligada à albumina (20-25 mg/dL), a bilirrubina pode penetrar na barreira hematencefálica. Se deixada sem tratamento, a **encefalopatia tóxica hiperbilirrubínica**, ou **kernicterus**, resultante pode causar deficiência intelectual. A exposição de recém-nascidos com icterícia à luz azul (fototerapia) promove a excreção hepática da bilirrubina não conjugada por meio da conversão de alguns derivados que são excretados na bile; o fenobarbital, um promotor do metabolismo de bilirrubina, pode ser administrado.

Defeitos da bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase

As glicuronosil-transferases (EC 2.4.1.17) são uma grande família de enzimas com diferentes especificidades ao substrato.

A maioria serve para aumentar a polaridade de vários fármacos e seus metabólitos e, conseqüentemente, facilitar sua excreção. As mutações no gene que codifica a **bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase** podem fazer a enzima codificada ter atividade reduzida ou ausente. As síndromes cuja apresentação clínica refletem a gravidade da deficiência incluem a síndrome de Gilbert e dois tipos da síndrome de Crigler-Najjar.

Síndrome de Gilbert

Uma vez que aproximadamente 30% da atividade da bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase é mantida na síndrome de Gilbert, a condição é inofensiva.

Síndrome de Crigler-Najjar tipo I

A icterícia congênita grave (mais de 20 mg de bilirrubina por dL de soro) e o dano cerebral que acompanha a síndrome de Crigler-Najjar tipo I refletem a ausência completa da atividade hepática da enzima UDP-glicuronosil-transferase. A fototerapia reduz um pouco os níveis de bilirrubina no plasma, mas o fenobarbital não tem efeito benéfico. Com frequência, a doença é fatal nos primeiros 15 meses de vida.

Síndrome de Crigler-Najjar tipo II

Na síndrome de Crigler-Najjar tipo II, parte da atividade da enzima bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase é mantida. Conseqüentemente, essa condição tem um curso mais benigno do que a síndrome tipo I. A bilirrubina sérica tende a não exceder 20 mg por dL de soro, e os pacientes respondem ao tratamento com grandes doses de fenobarbital.

Hiperbilirrubinemia tóxica

A **hiperbilirrubinemia não conjugada** pode resultar da **disfunção hepática induzida por toxina** causada por clorofórmio, arsfenaminas, tetracloreto de carbono, paracetamol, hepatite viral, cirrose ou envenenamento pelo cogumelo *Amanita*. Essas disfunções adquiridas envolvem danos nas células do parênquima hepático, que prejudicam a conjugação de bilirrubina.

A obstrução da árvore biliar constitui a causa mais comum de hiperbilirrubinemia conjugada

Em geral, a **hiperbilirrubinemia conjugada** resulta da obstrução dos ductos hepáticos ou do ducto colédoco, mais frequentemente devido a um **cálculo biliar** ou a um **câncer da cabeça do pâncreas** (Figura 31-16). O diglicuronídeo de bilirrubina, que não pode ser excretado, entra nas veias e nos vasos linfáticos hepáticos, a bilirrubina conjugada aparece no sangue e na urina (**icterícia colúrica**), e as fezes são, na maioria das vezes, de cor clara.

O termo **icterícia colestática** inclui todos os casos de icterícia obstrutiva extra-hepática e também de icterícia que exhibe hiperbilirrubinemia conjugada devida à micro-obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos por edema ou hepatócitos danificados, como pode ocorrer na hepatite infecciosa.

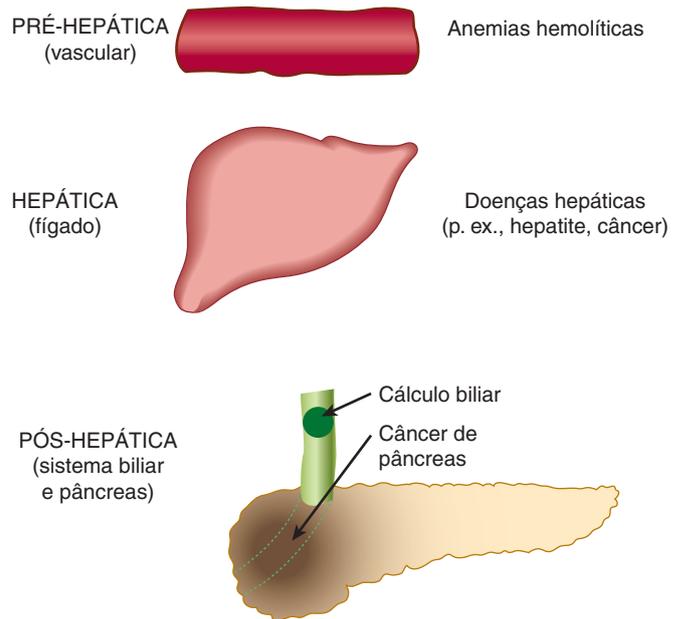


FIGURA 31-16 Representação esquemática de algumas das principais causas de icterícia. A **icterícia pré-hepática** indica eventos na corrente sanguínea; a principal causa consiste nas várias formas de anemia hemolítica (ver Capítulo 53). A **icterícia hepática** refere-se a eventos que ocorrem no fígado, como os vários tipos de hepatite ou outras formas de doença hepática (p. ex., câncer). A **icterícia pós-hepática** refere-se a eventos na árvore biliar, em que as principais causas são a obstrução do ducto biliar comum por um cálculo biliar ou câncer da cabeça do pâncreas.

Síndrome de Dubin-Johnson

Esse distúrbio autossômico recessivo benigno consiste em **hiperbilirrubinemia conjugada** na infância ou na vida adulta. A hiperbilirrubinemia é causada por mutações no gene que codifica a proteína envolvida na **secreção** da bilirrubina conjugada na bile.

Parte da bilirrubina conjugada pode ligar-se de modo covalente à albumina

Quando os níveis de bilirrubina permanecem altos no plasma, uma fração pode ligar-se covalentemente à albumina. Essa fração, chamada de **δ -bilirrubina**, possui **maior tempo de meia-vida** no plasma do que a bilirrubina conjugada convencional e permanece elevada durante a recuperação da icterícia obstrutiva. No entanto, alguns pacientes continuam a apresentar icterícia mesmo após o nível de bilirrubina conjugada circulante retornar ao normal.

Urobilinogênio e bilirrubina na urina são indicadores clínicos

Na **obstrução completa do ducto biliar**, a bilirrubina não tem acesso ao intestino para conversão em urobilinogênio, de forma que o urobilinogênio não está presente na urina. A presença de bilirrubina conjugada na urina sem urobilinogênio sugere icterícia obstrutiva intra-hepática ou pós-hepática.

TABELA 31-4 Resultados laboratoriais em indivíduos saudáveis e em pacientes com três causas diferentes de icterícia

Condição	Bilirrubina sérica	Urobilinogênio urinário	Bilirrubina urinária	Urobilinogênio fecal
Normal	Direta: 0,1-0,4 mg/dL Indireta: 0,2-0,7 mg/dL	0-4 mg/24 h	Ausente	40-280 mg/24 h
Anemia hemolítica	↑ Indireta	Aumentado	Ausente	Aumentado
Hepatite	↑ Direta e indireta	Reduzido se houver micro- -obstrução	Presente se houver micro- -obstrução	Reduzido
Icterícia obstrutiva ^a	↑ Direta	Ausente	Presente	De traços a ausente

^aAs causas mais comuns de icterícia obstrutiva (pós-hepática) consistem em câncer da cabeça do pâncreas e cálculo alojado no ducto colédoco. A presença de bilirrubina na urina é, algumas vezes, designada como colúria – assim, a hepatite e a obstrução do ducto colédoco causam icterícia colúrica, ao passo que a icterícia da anemia hemolítica é designada como acolúrica. Os resultados laboratoriais em pacientes com hepatite são variáveis, dependendo da extensão da lesão das células parenquimatosas e do grau de micro-obstrução dos ductos biliares. Os níveis séricos de **alanina-aminotransferase (ALT)** e **aspartato-aminotransferase (AST)** estão, em geral, acentuadamente elevados na hepatite, e os níveis séricos de **fosfatase alcalina** estão elevados na doença hepática obstrutiva.

Na **icterícia secundária à hemólise**, a produção aumentada de bilirrubina resulta em aumento da produção de **urobilinogênio**, que aparece na urina em grandes quantidades. Em geral, a bilirrubina não é encontrada na urina na icterícia hemolítica. Assim, a combinação de urobilinogênio aumentado e ausência de bilirrubina é sugestiva de icterícia hemolítica. A destruição aumentada no sangue por qualquer etiologia provoca aumento do urobilinogênio urinário.

A **Tabela 31-4** resume os resultados laboratoriais obtidos em pacientes com icterícia devido a causas pré-hepáticas, hepáticas ou pós-hepáticas: **anemia hemolítica** (pré-hepática), **hepatite** (hepática) e **obstrução do ducto biliar comum** (pós-hepática). Ver Figura 31-16. Os testes laboratoriais no **sangue** (avaliação da possibilidade de anemia hemolítica e medida do tempo de protrombina) e no **soro** (p. ex., eletroforese de proteínas; fosfatase alcalina e atividades das enzimas alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase) também ajudam a distinguir as causas da icterícia entre pré-hepática, hepática e pós-hepática.

RESUMO

- O heme de hemoproteínas, como a hemoglobina e os citocromos, é uma porfirina contendo ferro que consiste em quatro anéis pirrólicos unidos por pontes metileno.
- Um total de oito substituintes metil, vinil e propionil nos quatro anéis pirrólicos do heme são arranjados em uma sequência específica. O íon metálico (Fe^{2+} na hemoglobina; Mg^{2+} na clorofila) está ligado aos quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos.
- A biossíntese do anel do heme envolve oito reações catalisadas por enzimas. Algumas dessas reações ocorrem na mitocôndria, outras, no citosol.
- A síntese do heme inicia com a condensação de succinil-CoA e glicina formando δ -aminolevulinato (ALA). Essa reação é catalisada pela ALA-sintase 1 (ALAS1), a enzima reguladora da biossíntese do heme.
- A síntese de ALAS1 aumenta em resposta a um baixo nível de heme disponível. Certos fármacos (p. ex., fenobarbital) disparam indiretamente o aumento na síntese de ALAS1, por promover a síntese de citocromo P450, que esgota o conjunto de heme da célula. Uma segunda ALA-sintase, ALAS2, não é regulada pelo nível de heme ou por fármacos que promovam a síntese de citocromo P450.
- As anormalidades genéticas em 7 das 8 enzimas da biossíntese do heme resultam em porfirias hereditárias. As hemácias e o fígado são os principais locais de expressão das porfirias. Queixas comuns consistem em fotossensibilidade e problemas neurológicos. A ingestão de certas toxinas (p. ex., chumbo) pode causar porfirias adquiridas. Quantidades aumentadas de porfirinas ou de seus precursores podem ser detectadas no sangue e na urina, facilitando o estabelecimento do diagnóstico.
- O catabolismo do anel do heme, iniciado pela enzima mitocondrial heme oxigenase, produz a biliverdina, um tetrapirrol linear. A redução subsequente de biliverdina no citosol forma bilirrubina.
- A bilirrubina liga-se à albumina para o transporte dos tecidos periféricos até o fígado, onde é capturada pelos hepatócitos. O ferro do heme é liberado e reutilizado.
- A solubilidade em água da bilirrubina é aumentada pela adição de 2 moles da cadeia glicuronosil altamente polar, derivada do UDP-glicuronato, por mol de bilirrubina. O acoplamento das cadeias glicuronosil é catalisado pela enzima bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase, a qual faz parte de uma grande família de enzimas com diferentes especificidades de substrato que aumenta a polaridade de vários medicamentos e de seus metabólitos, facilitando sua excreção.
- Mutações genéticas resultam em atividade reduzida ou ausente da bilirrubina UDP-glicuronosil-transferase. Situações clínicas que refletem a gravidade da(s) mutação(ões) incluem a síndrome de Gilbert e dois tipos de síndrome de Crigler-Najjar, condições cuja gravidade dependem da extensão da atividade enzimática remanescente.
- Após a secreção de bilirrubina da bile para o intestino, enzimas bacterianas convertem a bilirrubina em urobilinogênio e urobilina, que são excretadas nas fezes e na urina.
- As análises colorimétricas da bilirrubina empregam a cor formada quando a bilirrubina reage com o ácido sulfanílico diazotizado. Os ensaios conduzidos na *ausência* de metanol medem a “bilirrubina direta” (i.e., glicuronídeo de bilirrubina). Os ensaios conduzidos na *presença* de metanol medem a bilirrubina total. A diferença entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta, chamada de “bilirrubina indireta”, é a bilirrubina não conjugada.
- A icterícia resulta de um nível elevado de bilirrubina no plasma. As causas da icterícia podem ser classificadas em pré-hepática (p. ex., anemias hemolíticas), hepática (p. ex., hepatite) e pós-hepática (p. ex., obstrução do ducto colédoco). A quantificação de bilirrubina total e não conjugada no plasma, de urobilinogênio e bilirrubina na urina, da atividade de certas enzimas séricas e a análise de amostras de fezes ajudam a distinguir entre as causas da icterícia.

REFERÊNCIAS

- Bowman SE, Bren KL: The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment. *Nat Prod Rep* 2008;25:1118.
- Blouin JM, Duchartre Y, Costet P, et al: Therapeutic potential of proteasome inhibitors in congenital erythropoietic porphyria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:18238.
- Deacon AC, Whatley SD, Elder GH: Porphyrins and disorders of porphyrin metabolism. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. Ch. 32. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors). Elsevier Saunders, 2006.
- Desnick RJ, Astrin KH: The porphyrias. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 352. McGraw-Hill, 2008.
- Kim DH, Jin YH: Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001;24:564.
- Leroyer A, Leleu B, Dehon B, et al: Influence of delta-aminolevulinic acid dehydratase gene polymorphism on selected lead exposure biomarkers in a cohort of ex-smelter workers. *J Toxicol Environ Health A* 2013;76:895.
- Li T, Bonkovsky HL, Guo J-T: Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *BMC Structural Biology* 2011;11:13.
- Sticova E, Jirsa M: New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World J Gastroenterol* 2013; 19:6398.
- Unno M, Matsui T, Ikeda-Saito, M: Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Nat Prod Rep* 2007;24:553.
- van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, et al: Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest* 2012;122:519.
- Watchko JF, Tiribelli C: Bilirubin-induced neurologic damage: mechanisms and management approaches. *N Engl J Med* 2013;369:2021
- Wolkoff AW: The hyperbilirubinemias. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS et al (editors). Ch. 297. McGraw-Hill, 2008.
- Yoshida T, Migita CT: Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* 2000;82:33.

Questões para estudo

Seção VI – Metabolismo de proteínas e aminoácidos

1. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato é um intermediário tanto na biossíntese quanto no catabolismo de L-prolina.
 - B. Os tecidos humanos podem formar aminoácidos não essenciais na dieta a partir de intermediários anfibiólicos e a partir de aminoácidos essenciais na dieta.
 - C. O tecido hepático humano pode formar serina a partir do intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato.
 - D. A reação catalisada pela fenilalanina-hidroxilase interconverte fenilalanina e tirosina.
 - E. O poder redutor da tetra-hidrobiopterina deriva do NADPH.
2. Identifique o metabólito que NÃO serve como precursor dos aminoácidos essenciais na dieta.
 - A. α -Cetoglutarato.
 - B. 3-Fosfoglicerato.
 - C. Glutamato.
 - D. Aspartato.
 - E. Histamina.
3. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. A selenocisteína está presente nos sítios ativos de certas enzimas humanas.
 - B. A selenocisteína é inserida nas proteínas por um processo pós-traducional.
 - C. A transaminação de α -cetoácidos da dieta pode substituir os aminoácidos essenciais na dieta, leucina, isoleucina e valina.
 - D. A conversão de peptidil-prolina a peptidil-4-hidroxiprolina é acompanhada pela incorporação de oxigênio no succinato.
 - E. Serina e glicina são interconvertidas em uma única reação em que participam derivados do tetra-hidrofolato.
4. Selecione a resposta CORRETA:

A primeira reação na degradação da maioria dos aminoácidos proteicos envolve a participação de:

 - A. NAD⁺.
 - B. Tiamina-pirofosfato (TPP).
 - C. Piridoxal-fosfato.
 - D. FAD.
 - E. NAD⁺ e TPP.
5. Identifique o principal aminoácido contribuinte para o transporte de nitrogênio destinado à excreção como ureia:
 - A. Alanina.
 - B. Glutamina.
 - C. Glicina.
 - D. Lisina.
 - E. Ornitina.
6. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. A síndrome de Angelman está associada à enzima ubiquitina E3-ligase defeituosa.
 - B. Após uma refeição rica em proteína, os tecidos esplênicos liberam predominantemente aminoácidos de cadeia lateral ramificada, que são captados pelos tecidos musculares periféricos.
 - C. A taxa da gliconeogênese hepática a partir de glutamina excede a de qualquer outro aminoácido.
 - D. A conversão de um α -aminoácido, catalisada pela L- α -amino-oxidase, ao seu α -cetoácido correspondente é acompanhada pela liberação de NH₄⁺.
 - E. Os sinais e sintomas semelhantes ou mesmo idênticos podem estar associados com diferentes mutações do gene que codifica uma determinada enzima.
7. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. As sequências PEST direcionam algumas proteínas para degradação rápida.
 - B. ATP e ubiquitina, em geral, participam na degradação de proteínas associada à membrana e outras proteínas com períodos de meia-vida longos.
 - C. As moléculas de ubiquitina são acopladas às proteínas-alvo através de ligações não α -peptídicas.
 - D. Os descobridores da degradação proteica mediada por ubiquitina receberam o Prêmio Nobel.
 - E. A degradação das proteínas marcadas com ubiquitina ocorre no proteossomo, uma macromolécula contendo múltiplas subunidades presente em todos os eucariotos.
8. Para os distúrbios metabólicos do ciclo da ureia, qual afirmativa está INCORRETA:
 - A. A intoxicação por amônia é mais grave quando o bloqueio metabólico no ciclo da ureia ocorre antes da reação catalisada pela argininossuccinato-sintase.
 - B. Os sintomas clínicos incluem deficiência intelectual e esquivas de alimentos ricos em proteínas.
 - C. Os sinais clínicos podem incluir acidose.
 - D. O aspartato fornece o segundo nitrogênio do argininossuccinato.
 - E. A gestão da dieta concentra-se em uma dieta de baixa ingestão proteica, em pequenas refeições frequentes.
9. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. Uma função metabólica da glutamina é sequestrar nitrogênio na forma não tóxica.
 - B. A glutamato-desidrogenase hepática é alostericamente inibida por ATP e ativada por ADP.
 - C. A ureia é formada tanto a partir da amônia absorvida produzida por bactérias entéricas quanto a partir da amônia gerada pela atividade metabólica tecidual.
 - D. A ação conjunta da glutamato-desidrogenase e da glutamato-aminotransferase pode ser denominada transdesaminação.
 - E. O fumarato gerado durante a biossíntese de argininossuccinato forma oxalacetato em reações mitocondriais catalisadas sucessivamente pela fumarase e pela malato-desidrogenase.
10. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
 - A. A treonina fornece a porção tioetanol para biossíntese da coenzima A.
 - B. A histamina surge pela descarboxilação da histidina.

- C. A ornitina serve como precursor de espermina e de espermidina.
- D. A serotonina e a melatonina são metabólitos de triptofano.
- E. Glicina, arginina e metionina, cada uma, contribuem para a biossíntese de creatina.
11. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
- A. A creatinina excretada é uma função da massa muscular e pode ser utilizada para determinar se um paciente forneceu uma amostra completa de urina em 24 horas.
- B. Muitos fármacos e catabólitos de fármacos são excretados na urina como conjugados de glicina.
- C. O principal destino metabólico não proteico da metionina é a conversão a S-adenosilmetionina.
- D. A concentração de histamina no hipotálamo cerebral exhibe um ritmo circadiano.
- E. A descarboxilação da glutamina forma o neurotransmissor inibidor GABA (γ -aminobutirato).
12. O que distingue as vias pelas quais os aminoácidos seguintes aparecem em proteínas humanas:
- A. 5-Hidroxilisina.
- B. γ -Carboxiglutamato.
- C. Selenocisteína.
13. Qual vantagem evolucionária pode ser adquirida pelo fato de que certos aminoácidos são essenciais *na dieta* para os seres humanos?
14. Como você explicaria o fato de que defeitos metabólicos que resultam na ausência completa da atividade da glutamato-desidrogenase não tenham sido detectados?
15. Qual das seguintes NÃO é uma hemoproteína?
- A. Mioglobina.
- B. Citocromo c.
- C. Catalase.
- D. Citocromo P450.
- E. Albumina.
16. Um homem de 30 anos apresentou um histórico clínico de dor abdominal intermitente e episódios de confusão e problemas psiquiátricos. Os testes laboratoriais revelaram aumento de δ -aminolevulinato e porfobilinogênio na urina. A análise gênica revelou uma mutação no gene da uroporfirinogênio-sintase I (porfobilinogênio-desaminase). O diagnóstico provável foi:
- A. Porfiria aguda intermitente.
- B. nemia sideroblástica ligado ao X.
- C. Porfiria eritroblástica congênita.
- D. Porfiria cutânea tardia.
- E. Porfiria variegata.
17. Selecione a afirmativa a seguir que está INCORRETA:
- A. A bilirrubina é um tetrapirrol cíclico.
- B. A bilirrubina ligada à albumina é transportada ao fígado.
- C. Altos níveis de bilirrubina podem causar dano ao cérebro de recém-nascidos.
- D. A bilirrubina contém grupos metil e vinil.
- E. A bilirrubina não contém ferro.
18. Uma mulher de 62 anos apresenta intensa icterícia, que aumentou constantemente durante os últimos 3 meses. Ela relatou um histórico de dor abdominal superior grave irradiando para as costas, e perda de peso considerável. Ela observou que suas fezes tinham se tornado claras há algum tempo. Os testes laboratoriais revelaram um nível muito alto de bilirrubina direta além de bilirrubina muito elevada na urina. O nível plasmático da alanina-aminotransferase (ALT) estava apenas levemente alterado, ao passo que o nível da fosfatase alcalina estava significativamente elevado. A ultrassonografia abdominal não revelou evidência de cálculos biliares. Dos seguintes, qual é o diagnóstico mais provável?
- A. Síndrome de Gilbert.
- B. Anemia hemolítica.
- C. Síndrome Crigler-Najjar tipo 1.
- D. Carcinoma de pâncreas.
- E. Hepatite infecciosa.
19. Os laboratórios clínicos geralmente utilizam ácido sulfanílico diazotado para medir bilirrubina sérica e seus derivados. Qual é a base física que permite ao laboratório relatar os resultados aos médicos em termos dessas duas formas de bilirrubina?
20. O que sinaliza a ocorrência de síntese do heme?

Nucleotídeos

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Escrever as fórmulas estruturais que representam os amino e oxotautômeros de uma purina e de uma pirimidina e especificar qual tautômero predomina em condições fisiológicas.
- Reproduzir as fórmulas estruturais dos principais nucleotídeos presentes no DNA e no RNA e dos nucleotídeos menos comuns: a 5-metilcitosina, a 5-hidroximetilcitosina e a pseudouridina (ψ).
- Representar a D-ribose ou a 2-desoxi-D-ribose ligadas com conformação *sin* ou *anti* a uma purina, nomear a ligação entre o açúcar e a base e indicar qual conformação predomina na maioria das condições fisiológicas.
- Numerar os átomos de C e N de um ribonucleosídeo pirimidínico e de um desoxirribonucleosídeo purínico, incluindo o uso de um número primo para os átomos de C dos açúcares.
- Comparar o potencial de transferência do grupo fosforil de cada grupo fosforil de um nucleosídeo-trifosfato.
- Descrever, em linhas gerais, as funções fisiológicas dos fosfodiésteres cíclicos cAMP e cGMP.
- Reconhecer que os polinucleotídeos são macromoléculas direcionais compostas por mononucleotídeos ligados por ligações fosfodiéster $3' \rightarrow 5'$.
- Compreender que, nas representações abreviadas das estruturas dos polinucleotídeos, como pTpGpT ou TGCATCA, a extremidade $5'$ é sempre mostrada à esquerda, e todas as ligações fosfodiéster são $3' \rightarrow 5'$.
- Indicar os mecanismos pelos quais os análogos sintéticos específicos de bases purínicas e pirimidínicas e seus derivados, que atuam como agentes antineoplásicos, inibem o metabolismo.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além de atuar como precursores de ácidos nucleicos, os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos atuam em funções metabólicas diversificadas, como o metabolismo energético, a síntese de proteínas, a regulação da atividade enzimática e a transdução de sinal. Quando ligados a vitaminas ou derivados de vitaminas, os nucleotídeos constituem uma porção de

muitas coenzimas. Como principais doadores e aceptores de grupos fosforil no metabolismo, os nucleosídeos tri e difosfatos, como ATP e ADP, desempenham o principal papel na transdução de energia que acompanha as interconversões metabólicas e a fosforilação oxidativa. Os nucleosídeos, ligados a açúcares ou a lipídeos, constituem intermediários essenciais de biossíntese. Os derivados de açúcar, UDP-glicose e UDP-galactose, participam das interconversões de açúcares, bem

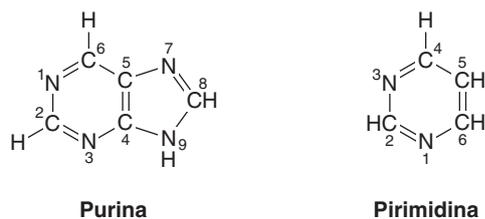


FIGURA 32-1 Purina e pirimidina. Os átomos estão numerados de acordo com o sistema internacional.

como da biossíntese de amido e glicogênio. De modo semelhante, os derivados de nucleosídeo-lípido, como o CDP-acilglicerol, são intermediários na biossíntese de lipídeos. Os papéis desempenhados pelos nucleotídeos na regulação metabólica incluem a fosforilação dependente de ATP de enzimas metabólicas essenciais, a regulação alostérica de enzimas por ATP, ADP, AMP e CTP e o controle da taxa de fosforilação oxidativa pelo ADP. Os nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP atuam como segundos mensageiros em eventos regulados por hormônios, e tanto o GTP quanto o GDP desempenham papéis fundamentais na cascata de eventos que caracterizam as vias de transdução de sinais. Além das funções centrais que os nucleotídeos exercem no metabolismo, as suas aplicações médicas incluem o uso de análogos sintéticos purínicos e pirimídicos, que contêm halogênios, tióis ou átomos de nitrogênio adicional, na quimioterapia do câncer e na Aids e como supressores da resposta imune durante o transplante de órgãos.

QUÍMICA DE PURINAS, PIRIMIDINAS, NUCLEOSÍDEOS E NUCLEOTÍDEOS

As purinas e as pirimidinas são compostos heterocíclicos

As purinas e as pirimidinas são estruturas cíclicas **heterocíclicas** contendo nitrogênio que apresentam, além dos átomos de carbono, outros átomos (heteroátomos), como o nitrogênio. A molécula menor de pirimidina é a que tem o nome *maior*, e a molécula maior de purina tem o nome *menor*, com os anéis de seis átomos numerados em sentidos opostos (**Figura 32-1**).

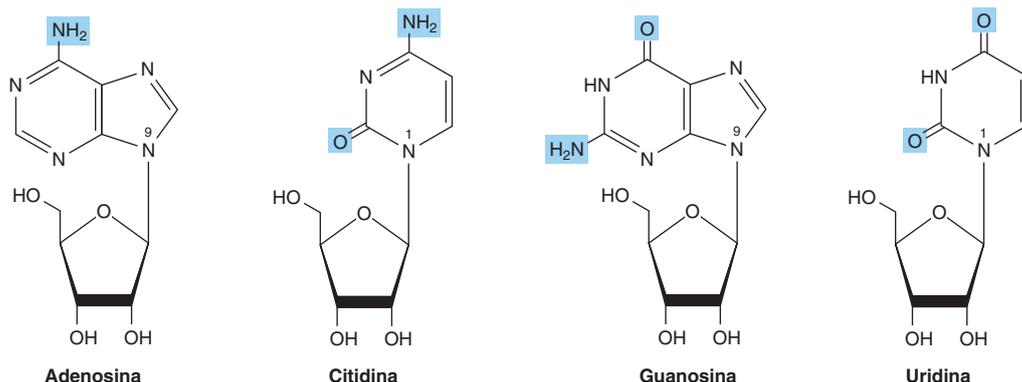


FIGURA 32-3 Ribonucleosídeos apresentados em sua conformação *sin*.



FIGURA 32-2 Tautomerismo dos grupos funcionais oxo e amino das purinas e pirimidinas.

As purinas ou as pirimidinas com um grupo —NH₂ são bases fracas (valores de pK_a de 3-4), embora o próton presente em pH baixo esteja associado, não ao grupo amino exocíclico como seria de esperar, mas a um nitrogênio do anel, geralmente N1 da adenina, N7 da guanina e N3 da citosina. A estrutura planar das purinas e das pirimidinas facilita a sua estreita associação, ou “empilhamento”, o que estabiliza o DNA de dupla-fita (ver Capítulo 34). Os grupos oxo e amino das purinas e das pirimidinas exibem **tautomerismo** cetoenol e amino-imina (**Figura 32-2**), porém as condições fisiológicas favorecem fortemente as formas amino e oxo.

Os nucleosídeos são N-glicosídeos

Os nucleosídeos são derivados das purinas e das pirimidinas com um açúcar ligado a um nitrogênio do anel de uma purina ou pirimidina. Os números com apóstrofo (2' ou 3') distinguem os átomos de açúcar dos átomos do heterociclo. O açúcar nos **ribonucleosídeos** é a D-ribose, ao passo que nos **desoxirribonucleosídeos**, é a 2-desoxi-D-ribose. Ambos os açúcares estão ligados ao heterociclo por uma **ligação β-N-glicosídica**, quase sempre no N-1 de uma pirimidina ou no N-9 de uma purina (**Figura 32-3**).

Os nucleotídeos são nucleosídeos fosforilados

Os mononucleotídeos são nucleosídeos com um grupo fosforil esterificado a um grupo hidroxila do açúcar. Os nucleotídeos 3' e 5' são nucleosídeos com um grupo fosforil no grupo hidroxila 3' ou 5' do açúcar, respectivamente. Como os nucleotídeos são, em sua maioria, 5', o prefixo “5'-” é geralmente omitido em sua denominação. Por isso, o UMP e o dAMP representam nucleotídeos com um grupo fosforil no C-5 da pentose. Outros grupos fosforil, ligados por **ligações de anidrido ácido** ao grupo fosforil de um mononucleotídeo, formam os **nucleosídeos difosfatos** e **trifosfatos** (**Figura 32-4**).

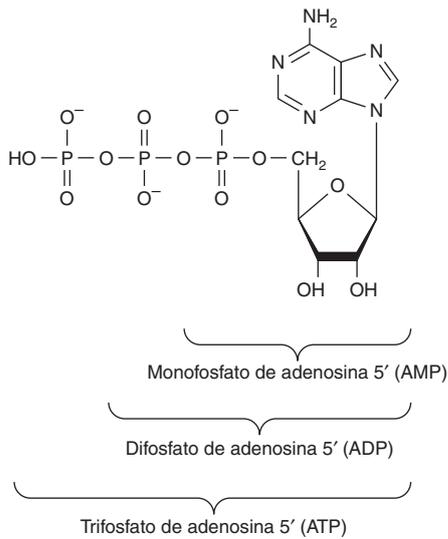


FIGURA 32-4 ATP, seu difosfato e seu monofosfato.

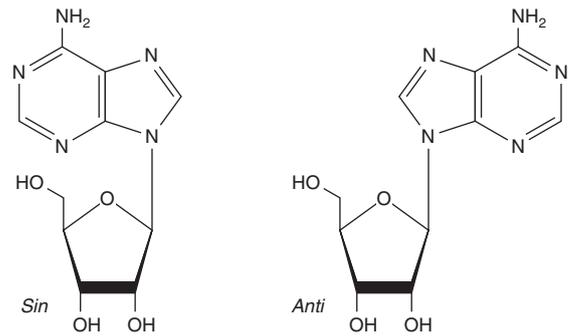
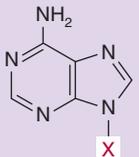
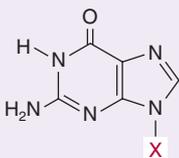
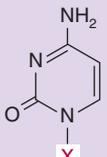
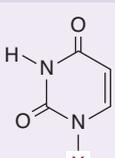
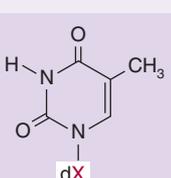


FIGURA 32-5 As conformações *sin* e *anti* da adenosina diferem quanto à sua orientação ao redor da ligação *N*-glicosídica.

Os *N*-glicosídeos heterocíclicos existem nas conformações *sin* e *anti*

O impedimento estérico proporcionado pela base heterocíclica não permite a liberdade de rotação em torno da ligação β -*N*-glicosídica dos nucleosídeos ou nucleotídeos. Logo, ambos ocorrem nas **conformações *sin*** ou ***anti*** não interconvertíveis (**Figura 32-5**). Ambas as conformações, *sin* e *anti*, ocorrem na natureza, mas a conformação *anti* é a predominante.

TABELA 32-1 Bases purínicas, ribonucleosídeos e ribonucleotídeos

Purina ou pirimidina	X = H	X = Ribose	X = Ribose-fosfato
	Adenina	Adenosina	Monofosfato de adenosina (AMP)
	Guanina	Guanosina	Monofosfato de guanosina (GMP)
	Citosina	Citidina	Monofosfato de citidina (CMP)
	Uracila	Uridina	Monofosfato de uridina (UMP)
	Timina	Timidina	Monofosfato de timidina (TMP)

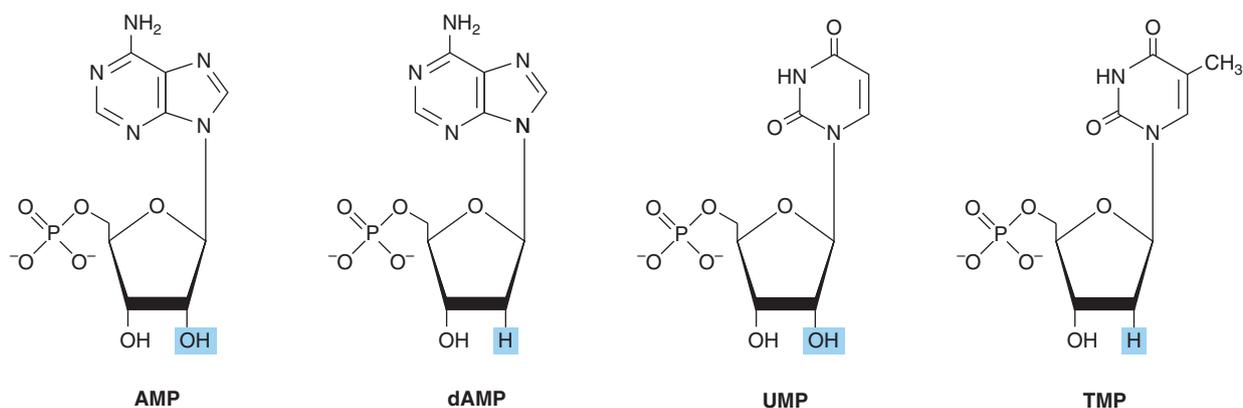


FIGURA 32-6 Estruturas do AMP, do dAMP, do UMP e do TMP.

A **Tabela 32-1** fornece uma lista das principais purinas e pirimidinas e seus nucleosídeos e nucleotídeos derivados. São utilizadas abreviaturas de uma letra para identificar a adenina (A), a guanina (G), a citosina (C), a timina (T) e a uracila (U), estejam em sua forma livre ou presentes em nucleosídeos ou nucleotídeos. O prefixo “d” (desoxi) indica que o açúcar é 2'-desoxi-D-ribose (p. ex., no dATP) (**Figura 32-6**).

A modificação de polinucleotídeos pode gerar estruturas adicionais

Ocorrem pequenas quantidades de purinas e pirimidinas adicionais no DNA e nos RNAs. Exemplos incluem a 5-metilcitosina do DNA bacteriano e humano, a 5-hidroximetilcitosina dos ácidos nucleicos bacterianos e virais e a adenina e a guanina mono e di-*N*-metiladas dos RNAs mensageiros de mamíferos (**Figura 32-7**), que atuam no reconhecimento de oligonucleotídeos e na regulação das meias-vidas dos RNAs. Bases heterocíclicas livres incluem hipoxantina, xantina e ácido úrico (**Figura 32-8**), intermediários no catabolismo de

adenina e guanina (ver Capítulo 33). Os heterocíclis metilados de vegetais incluem os derivados da xantina – a cafeína do café, a teofilina do chá e a teobromina do cacau (**Figura 32-9**).

Os nucleotídeos são ácidos polifuncionais

Os grupos fosforil primários e secundários dos nucleosídeos apresentam valores de pK_a de cerca de 1,0 e 6,2, respectivamente. Por isso, os nucleotídeos apresentam carga negativa significativa em pH fisiológico. Os valores de pK_a dos grupos fosforil secundários permitem que eles atuem tanto como doadores quanto como aceptores de prótons em valores de pH de aproximadamente duas ou mais unidades acima ou abaixo da neutralidade.

Os nucleotídeos absorvem luz ultravioleta

As ligações duplas conjugadas dos derivados purínicos e pirimidínicos absorvem luz ultravioleta. Embora os espectros sejam dependentes do pH, no pH 7,0 todos os nucleotídeos comuns absorvem luz em um comprimento de onda próximo

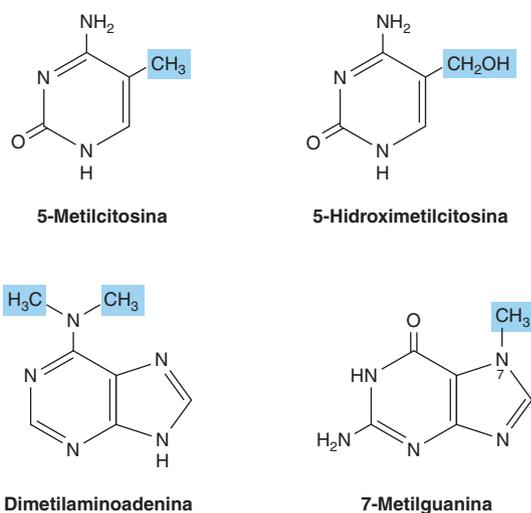


FIGURA 32-7 Quatro pirimidinas e purinas incomuns de ocorrência natural.

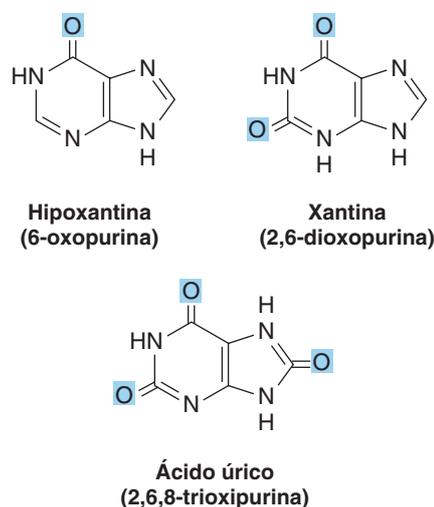


FIGURA 32-8 Estruturas da hipoxantina, da xantina e do ácido úrico mostradas como tautômeros oxo.

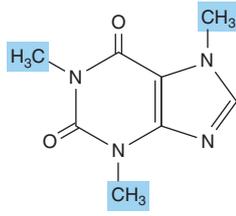


FIGURA 32-9 Cafeína, uma trimetilxantina. As dimetilxantinas teobromina e teofilina são semelhantes, mas carecem do grupo metila em *N*-1 e *N*-7, respectivamente.

a 260 nm. Desse modo, a concentração de nucleotídeos e de ácidos nucleicos é frequentemente expressa em termos de “absorbância a 260 nm”. O efeito mutagênico da luz ultravioleta deve-se à sua absorção por nucleotídeos no DNA, resultando em modificações químicas (ver Capítulo 35).

Os nucleotídeos desempenham diversas funções fisiológicas

Além de seus papéis como precursores dos ácidos nucleicos, o ATP, o GTP, o UTP, o CTP e seus derivados desempenham, cada um deles, funções fisiológicas específicas discutidas em outros capítulos. Entre os exemplos, destacam-se o papel do ATP como principal transdutor biológico de energia livre, e o segundo mensageiro cAMP (Figura 32-10). A concentração intracelular média de ATP, o nucleotídeo livre mais abundante nas células de mamíferos, é de cerca de 1 mmol/L. Uma vez que existe pouca necessidade de cAMP, a concentração intracelular de cAMP (cerca de 1 nmol/L) é seis ordens de magnitude abaixo da concentração de ATP. Outros exemplos incluem adenosina 3'-fosfato-5'-fosfossulfato (Figura 32-11), o doador de sulfato para os proteoglicanos sulfatados (ver Capítulo 50) e para a conjugação de fármacos com sulfato; e o doador de grupo metil, *S*-adenosilmetionina (Figura 32-12). O GTP funciona como regulador alostérico e como fonte de energia para a síntese de proteínas, e o cGMP (Figura 32-10) atua como segundo mensageiro em resposta ao óxido nítrico (NO) durante o relaxamento do músculo liso (ver Capítulo 51).

Os derivados de UDP-açúcar participam das epimerizações dos açúcares e da biossíntese de glicogênio (ver Capítulo 18), de glicosil dissacarídeos e de oligossacarídeos das

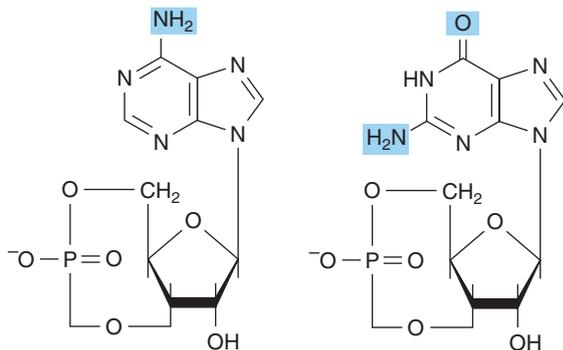


FIGURA 32-10 cAMP, 3', 5'-AMP cíclico e cGMP, 3', 5'-GMP cíclico.

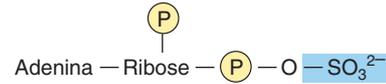


FIGURA 32-11 Adenosina 3'-fosfato-5'-fosfossulfato.

glicoproteínas e dos proteoglicanos (ver Capítulos 46 e 50). O UDP-ácido glicurônico forma os conjugados de glicurônio urinário da bilirrubina (ver Capítulo 31) e de muitos fármacos, incluindo o ácido acetilsalicílico (AAS). O CTP participa da biossíntese de fosfoglicerídeos, de esfingomielina e de outras esfingosinas substituídas (ver Capítulo 24). Por fim, muitas coenzimas também incorporam nucleotídeos e estruturas semelhantes aos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (Tabela 32-2).

Os nucleosídeos trifosfatos possuem alto potencial de transferência de grupos

Os nucleosídeos trifosfatos têm duas ligações anidrido ácido e uma ligação éster. Diferentemente dos ésteres, os anidridos ácidos exibem alto potencial de transferência de grupos. O valor de $\Delta G^{0'}$ para a hidrólise de cada um dos dois grupos fosforil (β e γ) terminais de um nucleosídeo trifosfato é de cerca de -7 kcal/mol (-30 kJ/mol). Esse alto potencial de transferência de grupos não apenas permite que os nucleosídeos trifosfatos de purina e pirimidina funcionem como reagentes de transferência de grupos, mais comumente do grupo γ -fosforil, mas também, em certas ocasiões, permite a transferência de um nucleotídeo monofosfato, com liberação concomitante de PP_i . Em geral, a clivagem de uma ligação anidrido ácida está acoplada a um processo altamente endergônico, como, por exemplo, a síntese de ligações covalentes, a polimerização de nucleosídeos trifosfatos para formar um ácido nucleico (ver Capítulo 34).

OS ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE NUCLEOTÍDEOS SÃO UTILIZADOS NA QUIMIOTERAPIA

Os análogos sintéticos das purinas, das pirimidinas, dos nucleosídeos e dos nucleotídeos modificados no anel heterocíclico

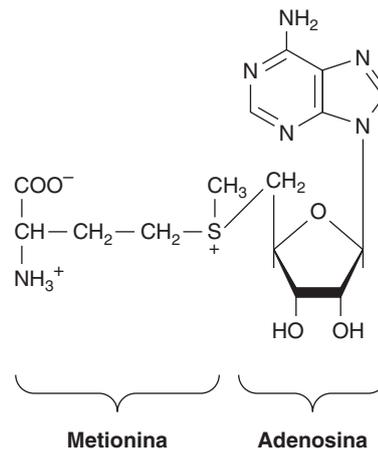
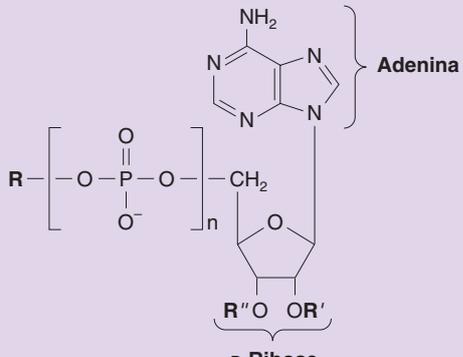


FIGURA 32-12 *S*-Adenosilmetionina.

TABELA 32-2 Muitas coenzimas e compostos relacionados são derivados do monofosfato de adenosina


Coenzima	R	R'	R''	n
Metionina ativa	Metionina ^a	H	H	0
Adenilatos de aminoácidos	Aminoácido	H	H	1
Sulfato ativo	SO ₃ ²⁻	H	PO ₃ ²⁻	1
3',5'-AMP cíclico		H	PO ₃ ²⁻	1
NAD ^b	Nicotinamida	H	H	2
NADP ^b	Nicotinamida	PO ₃ ²⁻	H	2
FAD	Riboflavina	H	H	2
Coenzima A	Pantotenato	H	PO ₃ ²⁻	2

^aSubstitui o grupo fosforil.

^bR é um derivado da vitamina B.

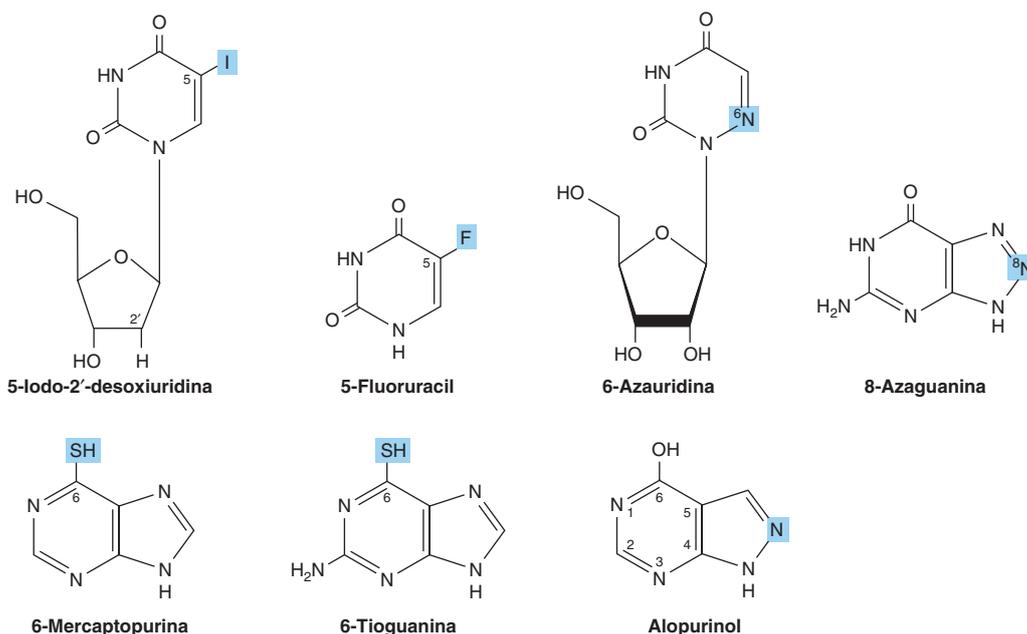
ou na fração açúcar apresentam várias aplicações na medicina clínica. Seus efeitos tóxicos refletem a inibição de enzimas essenciais para a síntese dos ácidos nucleicos ou a sua incorporação em ácidos nucleicos, com conseqüente ruptura do pareamento de bases. Os oncologistas empregam a 5-fluoruracil ou a 5-iodouracila, a 3-desoxiuridina, a 6-tioguanina e a 6-mercaptopurina, a 5 ou 6-azauridina, a 5 ou 6-azacitidina e a 8-azaguanina (**Figura 32-13**), que são incorporadas ao DNA antes da divisão celular. O alopurinol, análogo purínico utilizado no tratamento da hiperuricemia e da gota, inibe a biossíntese de purinas e a atividade da xantina-oxidase. A citarabina é utilizada na terapia do câncer, e a azatioprina, que é catabolizada a 6-mercaptopurina, é empregada durante o transplante de órgãos para suprimir a rejeição imunológica (**Figura 32-14**).

Os análogos não hidrolisáveis de nucleosídeos trifosfatos são utilizados como ferramentas de pesquisa

Os análogos sintéticos não hidrolisáveis de nucleosídeos trifosfatos (**Figura 32-15**) permitem que os pesquisadores diferenciem os efeitos dos nucleotídeos sobre a transferência de grupos fosforil dos efeitos mediados pela ocupação de sítios alostéricos de ligação a nucleotídeos em enzimas que são reguladas (ver Capítulo 9).

O DNA E O RNA SÃO POLINUCLEOTÍDEOS

O grupo 5'-fosforil de um mononucleotídeo pode esterificar um segundo grupo hidroxila, formando um **fosfodiéster**. Mais comumente, esse segundo grupo hidroxila é a 3'-OH da pentose de um segundo nucleotídeo. Assim, é formado um

**FIGURA 32-13** Análogos sintéticos selecionados de pirimidinas e purinas.

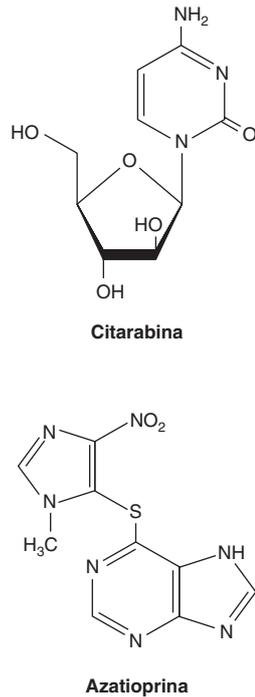


FIGURA 32-14 Arabinosilcitosina (citarabina) e azatioprina.

dinucleotídeo, em que as frações pentose estão ligadas por uma ligação 3', 5'-fosfodiéster para formar o “esqueleto” do RNA e do DNA. A formação de um dinucleotídeo pode ser representada como a eliminação de água entre dois mononucleotídeos. Entretanto, não ocorre formação biológica de dinucleotídeos dessa maneira, visto que a reação inversa, isto é, a hidrólise da ligação fosfodiéster, é fortemente favorecida em termos termodinâmicos. Todavia, apesar de um ΔG extremamente favorável, na ausência de catálise pelas **fosfodiesterases**, a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA só ocorre

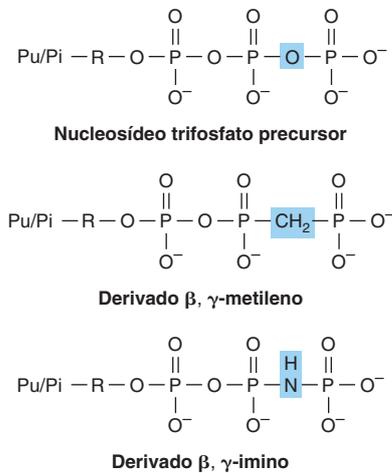


FIGURA 32-15 Derivados sintéticos de nucleosídeos trifosfatos incapazes de sofrer liberação hidrolítica do grupo fosforil terminal. (Pu/Pi, uma base purínica ou pirimidínica; R, ribose ou desoxirribose.) A figura mostra o nucleosídeo trifosfato precursor (hidrolisável) (**parte superior**) e os derivados β -metileno (**centro**) e γ -imino (**parte inferior**) não hidrolisáveis.

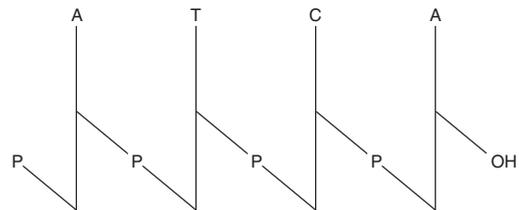
após longos períodos de tempo. Assim, o DNA persiste por períodos consideráveis, e a sua presença foi detectada até mesmo em fósseis. Os RNAs são muito menos estáveis do que o DNA, já que o grupo 2'-hidroxila do RNA (ausente no DNA) funciona como nucleófilo durante a hidrólise da ligação 3', 5'-fosfodiéster.

A modificação pós-traducional de **polinucleotídeos** pré-formados pode gerar estruturas adicionais, como a **pseudouridina**, um nucleosídeo em que a D-ribose está ligada ao C-5 da uracila por uma **ligação carbono-carbono**, em vez de pela ligação β -N-glicosídica habitual. O nucleotídeo ácido pseudouridílico (ψ) surge do rearranjo de um UMP de tRNA pré-formado. De modo semelhante, a metilação da S-adenosilmetionina de um UMP de tRNA pré-formado produz TMP (monofosfato de timidina), que contém ribose, em vez de desoxirribose.

Os polinucleotídeos são macromoléculas direcionais

As ligações fosfodiéster ligam os carbonos 3' e 5' de monômeros adjacentes. Por isso, cada extremidade de um polímero de nucleotídeos é distinta. Portanto, refere-se à “extremidade 5'” ou à “extremidade 3'” de um polinucleotídeo, sendo a extremidade 5' aquela que possui um grupo 5'-hidroxila livre ou fosforilado.

A sequência de bases ou **estrutura primária** de um polinucleotídeo pode ser representada como mostrado a seguir. A ligação fosfodiéster é indicada por P ou p, as bases, por uma única letra, e as pentoses, por uma linha vertical.



Se todas as ligações fosfodiéster forem 3' \rightarrow 5', é possível fazer uma notação mais compacta:



Essa representação indica que o grupo 5'-hidroxila – mas não o grupo 3'-hidroxila – está fosforilado. A representação mais compacta, por exemplo, GGATC, mostra apenas a sequência de bases, escrita por convenção com a extremidade 5' no lado esquerdo, e a extremidade 3' no lado direito. Supõe-se que os grupos fosforil estejam presentes, mas eles não são mostrados.

RESUMO

- Em condições fisiológicas, predominam os tautômeros amino e oxo das purinas, das pirimidinas e de seus derivados.
- Além de A, G, C, T e U, os ácidos nucleicos contêm traços de 5-metilcitosina, 5-hidroxi-metilcitosina, pseudouridina (ψ) e heterociclos N-metilados.
- A maioria dos nucleosídeos contém D-ribose ou 2-desoxi-D-ribose ligada ao N-1 de uma pirimidina ou ao N-9 de uma purina por uma ligação β -glicosídica, cuja conformação *sin* predomina.

- Um número com apóstrofo indica a hidroxila ao qual está ligado o grupo fosforil do açúcar do mononucleotídeo (p. ex., 3'-GMP, 5'-dCMP). Os grupos fosforilas adicionais ligados ao primeiro por ligações de anidrido ácido formam os nucleosídeos difosfatos e trifosfatos.
- Os nucleosídeos trifosfatos apresentam alto potencial de transferência de grupos e participam da síntese de ligações covalentes. Os fosfodiésteres cíclicos cAMP e cGMP atuam como segundos mensageiros intracelulares.
- Os mononucleotídeos ligados por ligações 3' → 5'-fosfodiéster formam polinucleotídeos, macromoléculas direcionais com extremidades 3' e 5' distintas. Quando representado como pTpGpT ou TGCATCA, a extremidade 5' está do lado esquerdo e todas as ligações fosfodiéster são 3' → 5'.
- Os análogos sintéticos das bases purínicas e pirimidínicas e seus derivados são utilizados como agentes antineoplásicos, visto que inibem uma enzima da biossíntese de nucleotídeos ou são incorporados ao DNA ou ao RNA.

REFERÊNCIAS

- Adams RLP, Knowler JT, Leader DP: *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11th ed. Chapman & Hall, 1992.
- Blackburn GM, Gait MJ: *Nucleic Acids in Chemistry & Biology*. IRL Press, 1990.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C: Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006;58:87.

Metabolismo dos nucleotídeos de purinas e pirimidinas

Victor W. Rodwell, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Comparar os papéis dos ácidos nucleicos provenientes da dieta e da biossíntese *de novo* para a produção de purinas e pirimidinas destinadas à biossíntese de polinucleotídeos.
- Explicar por que os antifolatos e os análogos do aminoácido glutamina inibem a biossíntese de purinas.
- Resumir a sequência das reações que convertem o IMP inicialmente em AMP e GMP e, subsequentemente, em seus nucleosídeos trifosfato.
- Descrever a formação dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs) a partir de ribonucleotídeos.
- Indicar o papel regulador do 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) na biossíntese hepática de purinas e a reação específica da biossíntese hepática de purinas, que é inibida por retroalimentação por AMP e GMP.
- Estabelecer a relevância do controle coordenado da biossíntese de nucleotídeos de purina e pirimidina.
- Identificar as reações discutidas que são inibidas por medicamentos anticâncer.
- Escrever a estrutura do produto final do catabolismo das purinas. Comentar a sua solubilidade e indicar o seu papel na gota, na síndrome de Lesch-Nyhan e na doença de von Gierke.
- Identificar as reações cujo comprometimento leva a sinais e sintomas patológicos modificados.
- Determinar por que existem poucos distúrbios clinicamente significativos do catabolismo das pirimidinas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Mesmo que uma dieta seja rica em nucleoproteínas, as purinas e as pirimidinas da dieta não são incorporadas diretamente aos ácidos nucleicos teciduais. Os seres humanos sintetizam os ácidos nucleicos e seus derivados ATP, NAD⁺, coenzima A, etc., a partir de intermediários anfibólicos. Todavia, quando *injetados*, análogos das purinas ou pirimidinas, incluindo agentes antineoplásicos potenciais, podem ser incorporados ao DNA. A biossíntese de ribonucleotídeos trifosfato (NTPs) de purinas e pirimidinas e de dNTPs são eventos minuciosamente regulados. Mecanismos de retroalimentação coordenados asseguram a sua produção em quantidades e em ocasiões apropriadas para suprir as demandas fisiológicas variáveis

(p. ex., divisão celular). As doenças humanas que envolvem anormalidades no metabolismo das purinas incluem a gota, a síndrome de Lesch-Nyhan, a deficiência da adenosina-desaminase e a deficiência da purina nucleosídeo fosforilase. As doenças da biossíntese de pirimidinas são mais raras, mas incluem as acidúrias oróticas. Diferentemente da baixa solubilidade do ácido úrico formado pelo catabolismo das purinas, os produtos finais do catabolismo das pirimidinas (dióxido de carbono, amônia, β-alanina e γ-aminoisobutirato) são altamente hidrossolúveis. Um distúrbio genético do catabolismo das pirimidinas é a acidúria β-hidroxiisovalérica, causada pela deficiência total ou parcial da enzima di-hidropirimidina-desidrogenase. Esse distúrbio do catabolismo das pirimidinas, também conhecido como uracilúria-timinúria combinada, também é um distúrbio

da biossíntese dos β -aminoácidos, visto que a formação de β -alanina e de β -aminoisobutirato está comprometida. Uma forma não genética pode ser desencadeada pela administração de 5-fluoruracil a pacientes com baixos níveis de di-hidropirimidina-desidrogenase.

PURINAS E PIRIMIDINAS NÃO SÃO ESSENCIAIS NA DIETA

Os tecidos humanos normais são capazes de sintetizar purinas e pirimidinas a partir de intermediários anfibiólicos em quantidades e em ocasiões apropriadas para suprir as demandas fisiológicas variáveis. Portanto, os ácidos nucleicos e os nucleotídeos ingeridos não são essenciais do ponto de vista alimentar. Após a sua decomposição no trato intestinal, os mononucleotídeos resultantes podem ser absorvidos ou convertidos em bases purínicas e pirimidínicas. Em seguida, as bases purínicas são oxidadas a ácido úrico, que pode ser absorvido e excretado na urina. Embora pouca, ou nenhuma, purina ou pirimidina alimentar seja incorporada nos ácidos nucleicos dos tecidos, os compostos *injetados* são incorporados. Por isso, a incorporação da [^3H]-timidina injetada ao DNA recém-sintetizado pode ser utilizada para avaliar a velocidade de síntese do DNA.

BIOSSÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS

Com exceção dos protozoários parasitos, todas as formas de vida sintetizam nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. A síntese a partir de intermediários anfibiólicos ocorre em taxas controladas, apropriadas para todas as funções celulares. Para manter a homeostasia, os mecanismos intracelulares percebem e regulam o tamanho dos reservatórios de NTPs, que aumentam durante o crescimento ou a regeneração de tecidos, quando as células estão em rápida divisão.

Os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são sintetizados *in vivo*, em taxas compatíveis com as necessidades fisiológicas. Os primeiros pesquisadores da biossíntese de nucleotídeos utilizaram aves e, posteriormente, *Escherichia coli*. Precursores isotópicos do ácido úrico administrados a pombos estabeleceram a origem de cada átomo de uma purina (Figura 33-1) e possibilitaram o estudo dos intermediários da biossíntese de purinas.

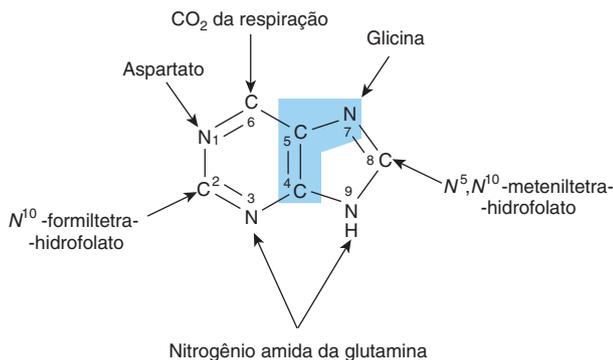


FIGURA 33-1 Fontes dos átomos de nitrogênio e carbono do anel purínico. Os átomos 4, 5 e 7 (destacados em azul) derivam da glicina.

Os tecidos das aves também serviram como fonte de genes clonados que codificam enzimas da biossíntese de purinas e proteínas reguladoras que controlam a velocidade de biossíntese das purinas.

Os três processos que contribuem para a biossíntese dos nucleotídeos purínicos são, por ordem decrescente de importância:

1. Síntese a partir de intermediários anfibiólicos (síntese *de novo*).
2. Fosforribosilação das purinas.
3. Fosforilação dos nucleosídeos purínicos.

O MONOFOSFATO DE INOSINA (IMP) É SINTETIZADO A PARTIR DE INTERMEDIÁRIOS ANFIBÓLICOS

A Figura 33-2 ilustra os intermediários e as 11 reações catalisadas por enzimas que convertem o α -D-ribose-5-fosfato em monofosfato de inosina (IMP). O primeiro intermediário formado na via *de novo* para a biossíntese de purinas é o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP; estrutura II, Figura 33-2). O PRPP também é um intermediário na biossíntese dos nucleotídeos pirimidínicos NAD^+ e NADP^+ . Em seguida, ocorre a montagem passo a passo do anel purínico de 9 membros sobre PRPP como estrutura.

Após a síntese de IMP, vias distintas levam o AMP o GMP (Figura 33-3). A transferência subsequente do grupo fosforil do ATP converte AMP e GMP em ADP e GDP, respectivamente. A conversão de GDP em GTP envolve a transferência de um segundo grupo fosforil do ATP, ao passo que a conversão de ADP em ATP é efetuada principalmente pela fosforilação oxidativa (ver Capítulo 13).

Catalisadores multifuncionais participam da biossíntese de nucleotídeos purínicos

Nos procariotos, cada uma das reações da Figura 33-2 é catalisada por um polipeptídeo diferente. Em contrapartida, as enzimas dos eucariotos são polipeptídeos que apresentam múltiplas atividades catalíticas, cujos sítios catalíticos adjacentes facilitam a transferência dos intermediários entre esses sítios. Três enzimas multifuncionais distintas catalisam as reações (3), (4) e (6); as reações (7) e (8); e as reações (10) e (11) da Figura 33-2.

Medicamentos antifolato e análogos de glutamina bloqueiam a biossíntese de nucleotídeos purínicos

Os carbonos acrescentados nas reações (4) e (10) da Figura 33-2 são fornecidos por derivados do tetra-hidrofolato. Embora sejam raros nos seres humanos, os estados de deficiência de purinas geralmente refletem deficiência de ácido fólico. Os compostos que inibem a formação de tetra-hidrofolatos e que, portanto, bloqueiam a síntese de purinas têm sido utilizados na quimioterapia do câncer. Os compostos inibidores e as reações que eles inibem incluem a **azasserina** (reação (5), Figura 33-2), a **diazanorleucina** (reação (2), Figura 33-2), a **6-mercaptapurina** (reações (13) e (14), Figura 33-3) e o **ácido micofenólico** (reação (14), Figura 33-3).

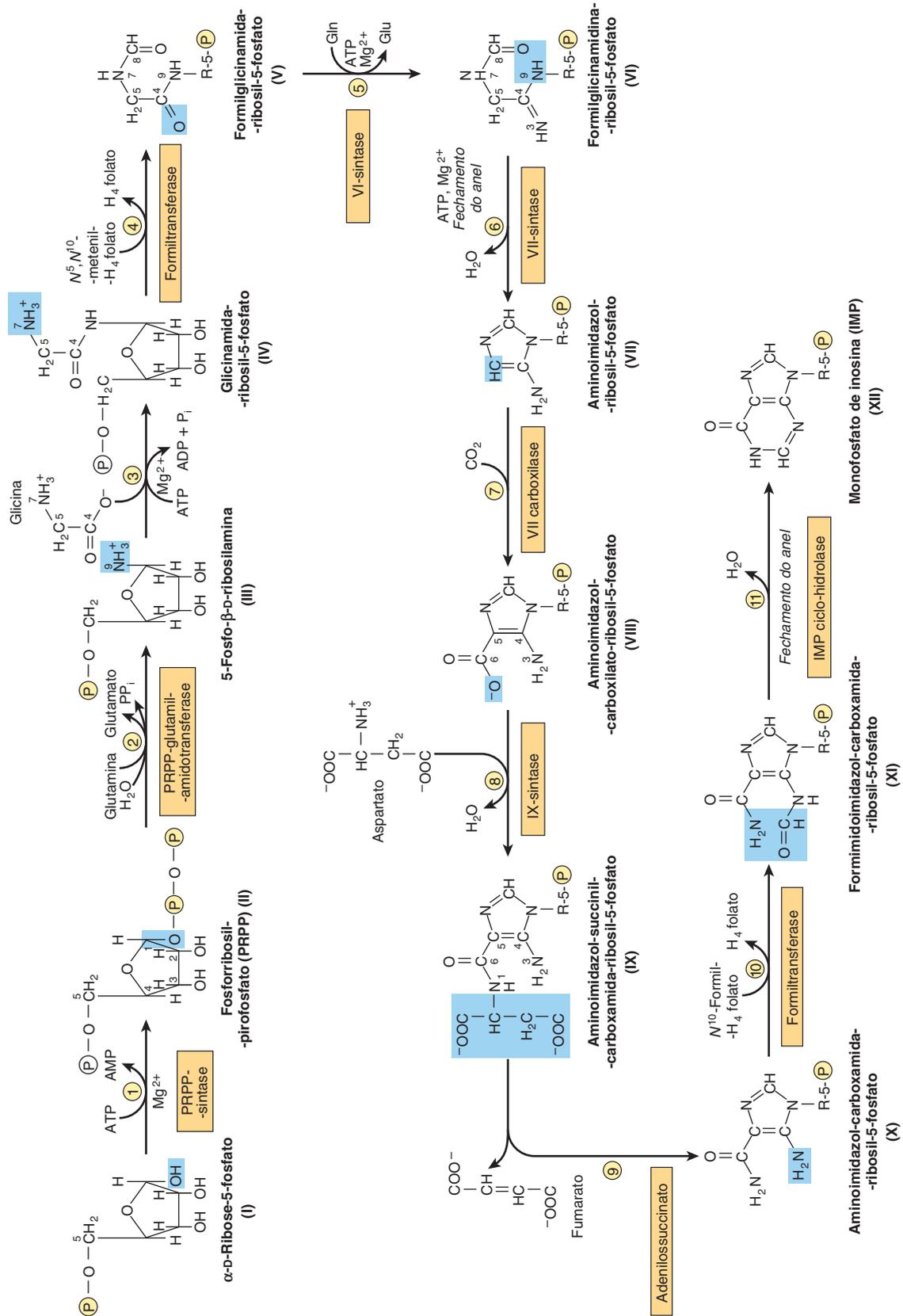


FIGURA 33-2 Biossíntese de purinas a partir da ribose-5-fosfato e do ATP. Ver explicações no texto. ((P), PO_3^{2-} ou PO_2^-).

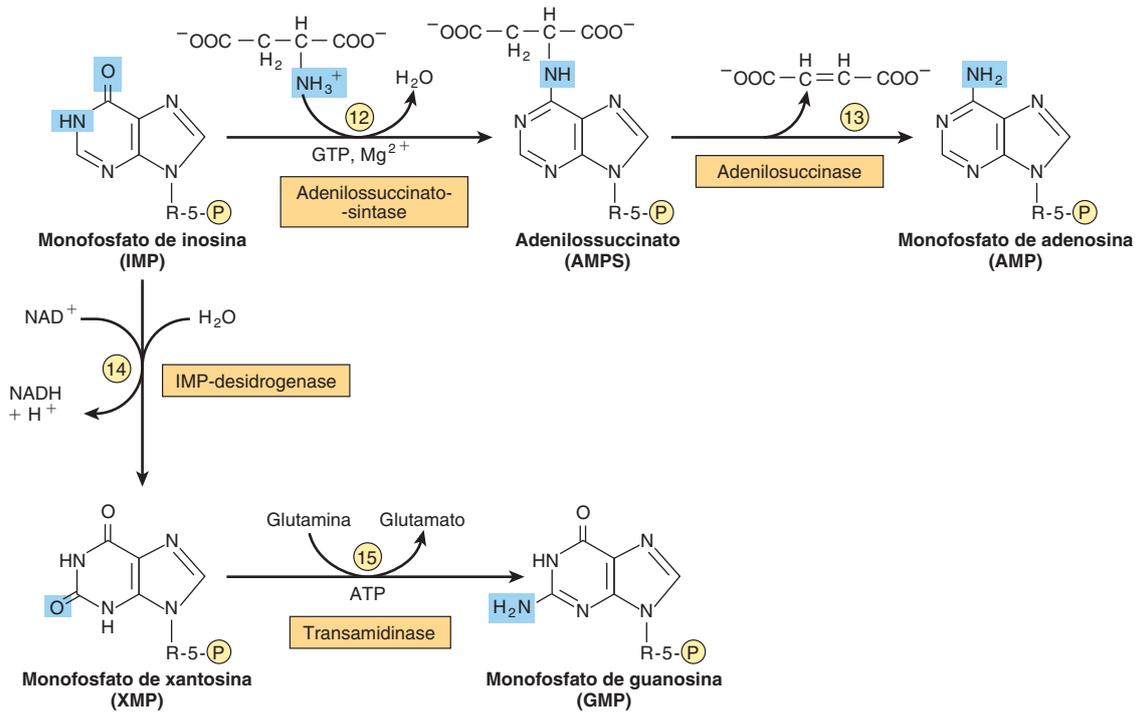
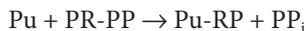


FIGURA 33-3 Conversão do IMP em AMP e GMP.

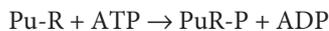
AS “REAÇÕES DE SALVAMENTO” CONVERTEM AS PURINAS E SEUS NUCLEOSÍDEOS EM MONONUCLEOTÍDEOS

A conversão das purinas, dos seus ribonucleosídeos e seus desoxirribonucleosídeos em mononucleotídeos envolve “vias de salvamento”, que requerem muito menos energia do que a síntese *de novo*. O mecanismo mais importante envolve a fosforibosilação pelo PRPP (estrutura II, Figura 33-2) de uma purina (Pu) livre para formar uma purina 5'-mononucleotídeo (Pu-RP).



A transferência de um grupo fosforil do PRPP, catalisada por adenosina e hipoxantina-fosforribosil-transferases (EC 2.4.2.7 e EC 2.4.2.8, respectivamente), converte adenosina, hipoxantina e guanina em seus mononucleotídeos (Figura 33-4).

Um segundo mecanismo de salvamento envolve a transferência do grupo fosforil do ATP para uma ribonucleosídeo de purina (Pu-R):



A fosforilação dos nucleotídeos de purina, catalisada pela adenosina-cinase (EC 2.7.1.20), converte adenosina e desoxiadenosina em AMP e dAMP. Da mesma forma, a desoxicitidina-cinase (EC 2.7.1.24) fosforila a desoxicitidina e a 2'-desoxiguanosina, formando dCMP e dGMP, respectivamente.

O fígado, principal órgão de biossíntese dos nucleotídeos purínicos, fornece purinas e nucleosídeos purínicos para a via de salvamento e para utilização por tecidos incapazes de efetuar

a sua biossíntese. O tecido cerebral humano apresenta baixos níveis de PRPP glutamyl-amidotransferase, EC 2.4.2.14 (reação ②, Figura 33-2) e, portanto, depende, em parte, das purinas exógenas. As hemácias e os leucócitos polimorfonucleares são incapazes de sintetizar a 5-fosforribosilamina (estrutura III, Figura 33-2) e, por conseguinte, utilizam purinas exógenas para a síntese de nucleotídeos.

A BIOSÍNTESE HEPÁTICA DE PURINAS É MINUCIOSAMENTE REGULADA

A retroalimentação por AMP e GMP regula a PRPP glutamyl-amidotransferase

A biossíntese de IMP é energeticamente dispendiosa. Além de ATP, ocorre consumo de glicina, glutamina, aspartato e derivados do tetraidrofolato reduzido. Assim, é vantajoso, para a sobrevivida, regular estreitamente a biossíntese de purinas em resposta às necessidades fisiológicas variáveis. O determinante global da taxa de biossíntese *de novo* dos nucleotídeos purínicos é a concentração de PRPP. Isso, por sua vez, depende da taxa de síntese, utilização, degradação e regulação de PRPP. A taxa de síntese do PRPP depende da disponibilidade de ribose-5-fosfato e da atividade da PRPP-sintase, EC 2.7.6.1 (reação ②, Figura 33-5), enzima cuja atividade é inibida por retroalimentação por AMP, ADP, GMP e GDP. Portanto, a presença de níveis elevados desses nucleosídeos fosfato sinaliza diminuição global e fisiologicamente apropriada de sua biossíntese.

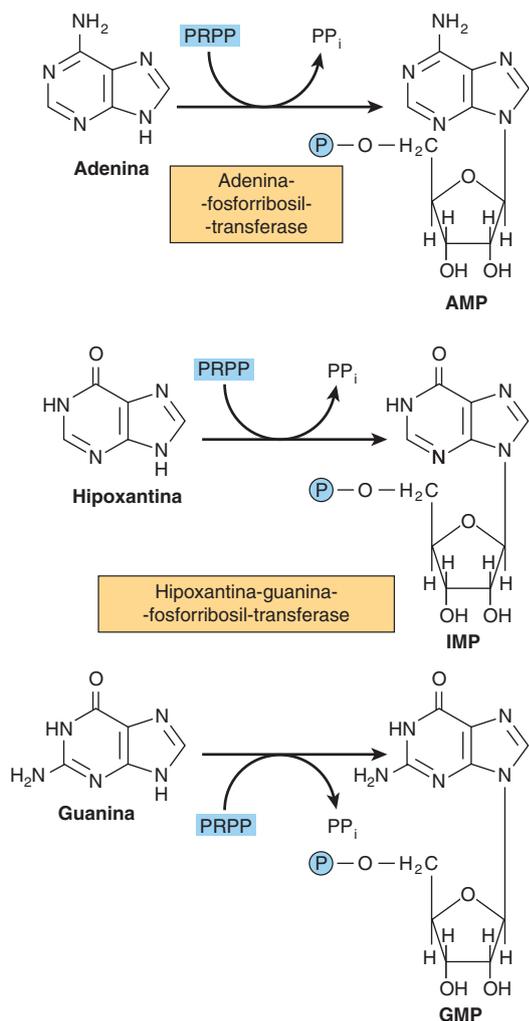


FIGURA 33-4 Fosforribosilação de adenina, hipoxantina e guanina para formar AMP, IMP e GMP, respectivamente.

A retroalimentação por AMP e GMP regula a sua formação a partir do IMP

Além da regulação em nível da biossíntese de PRPP, mecanismos adicionais que regulam a conversão de IMP em ATP e GTP estão resumidos na **Figura 33-6**. A retroalimentação por AMP inibe a adenilsuccinato-sintase, EC 6.3.4.4 (reação ⑫, Figura 33-3), e a retroalimentação por GMP inibe a IMP-desidrogenase, EC 1.1.1.205 (reação ⑭, Figura 33-3). Além disso, a conversão de IMP em adenilsuccinato a caminho do AMP (reação ⑫, Figura 33-3) requer a presença de GTP, ao passo que a conversão do xantilato (XMP) em GMP requer ATP. Portanto, essa regulação cruzada entre as vias do metabolismo do IMP serve para equilibrar a biossíntese de nucleosídeos trifosfato de purina ao diminuir a síntese de nucleotídeo purínico quando há deficiência do outro nucleotídeo. O AMP e o GMP também inibem a hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase, que converte hipoxantina e guanina em IMP e GMP (Figura 33-4), e GMP inibe, por retroalimentação, a PRPP glutamil-amidotransferase (reação ②, Figura 33-2).

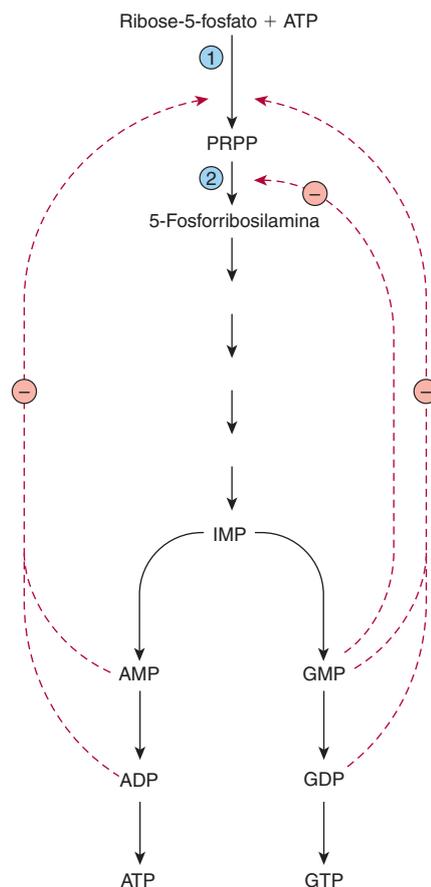


FIGURA 33-5 Controle da taxa de biossíntese *de novo* de nucleotídeos purínicos. As reações ① e ② são catalisadas pela PRPP-sintase e pela PRPP glutamil-amidotransferase, respectivamente. As linhas sólidas representam o fluxo químico. As linhas vermelhas tracejadas representam a inibição por retroalimentação por intermediários da via.

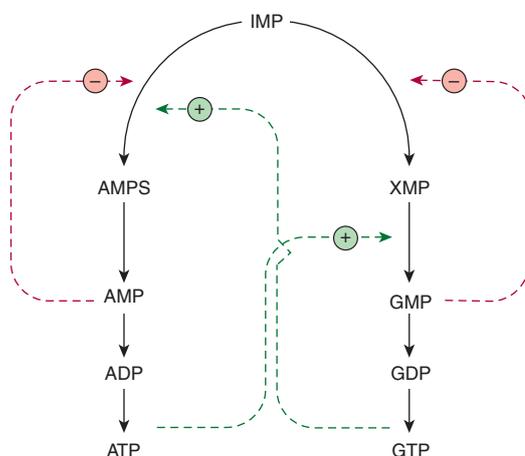


FIGURA 33-6 Regulação da conversão de IMP em nucleotídeos de adenosina e nucleotídeos de guanósina. As linhas sólidas representam o fluxo químico. As linhas verdes tracejadas representam alças de retroalimentação positiva ⊕, e as linhas vermelhas tracejadas representam alças de retroalimentação negativa ⊖. As abreviaturas incluem AMPS (adenilsuccinato) e XMP (monofosfato de xantósina), cujas estruturas são apresentadas na Figura 33-3.

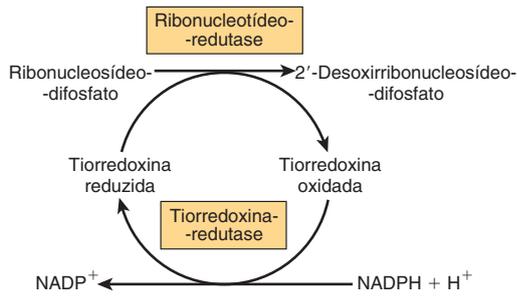


FIGURA 33-7 Redução dos ribonucleosídeos-difosfato a 2'-desoxirribonucleosídeos-difosfato.

A REDUÇÃO DE RIBONUCLEOSÍDEOS-DIFOSFATO FORMA DESOXIRRIBONUCLEOSÍDEOS-DIFOSFATO

A redução da hidroxila 2' dos ribonucleotídeos purínicos e pirimidínicos, catalisada pelo complexo que inclui a **ribonucleotídeo-redutase**, EC 1.17.4.1 (Figura 33-7), fornece os desoxirribonucleosídeos-difosfato (dNDPs), necessários tanto para a síntese quanto para o reparo do DNA (ver Capítulo 35). O complexo enzimático só é funcional quando as células sintetizam ativamente o DNA. A redução requer tiorredoxina reduzida, tiorredoxina-reductase (EC 1.8.1.9) e NADPH. O agente redutor imediato, tiorredoxina reduzida, é produzido pela redução dependente de NADPH da tiorredoxina oxidada (Figura 33-7). A redução dos ribonucleosídeos-difosfato (NDPs) a dNDPs está sujeita a controles reguladores complexos, que possibilitam a produção equilibrada de dNTPs para a síntese de DNA (Figura 33-8).

BIOSSÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIMIDINA

A Figura 33-9 ilustra os intermediários e as enzimas da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. O catalisador para a reação inicial é a carbamoil-fosfato-sintase II *citossólica* (EC 6.3.5.5), uma enzima diferente da carbamoil-fosfato-sintase I *mitocondrial* da síntese da ureia (ver Figura 28-16). Então, a compartimentalização proporciona um reservatório independente de carbamoil-fosfato para cada processo. Ao contrário da biossíntese de purinas, em que PRPP serve de estrutura para a montagem do anel de purina (Figura 33-2), PRPP participa da biossíntese de pirimidinas apenas depois da montagem do anel pirimidínico. O exame dos componentes da reação na Figura 33-9 revela que, à semelhança da biossíntese de pirimidinas, a biossíntese de nucleosídeos purínicos é de alto custo energético.

As proteínas multifuncionais catalisam as primeiras reações da biossíntese de pirimidinas

Cinco das seis primeiras atividades enzimáticas na biossíntese de pirimidinas residem em **polipeptídeos multifuncionais**.

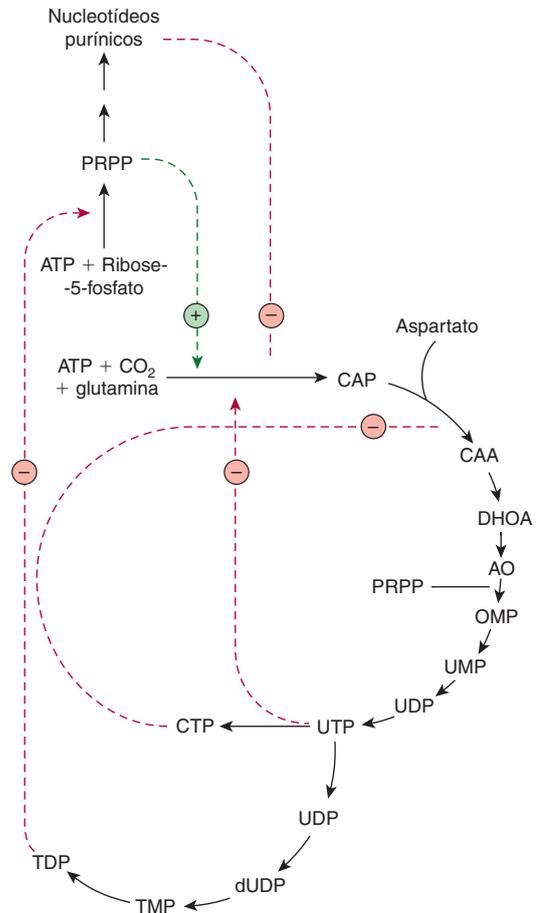


FIGURA 33-8 Aspectos reguladores da biossíntese de ribonucleotídeos purínicos e pirimidínicos e redução a seus respectivos 2'-desoxirribonucleotídeos. A linha verde tracejada representa uma alça de retroalimentação positiva. As linhas vermelhas tracejadas representam alças de retroalimentação negativa. As abreviaturas dos intermediários na biossíntese dos nucleotídeos pirimidínicos cujas estruturas estão apresentadas na Figura 33-9 são: CAA, carbamoil-aspartato; DHOA, di-hidro-ototato; AO, ácido orótico; OMP, monofosfato de orotidina; e PRPP, fosforribosil-pirofosfato.

Um desses polipeptídeos catalisa as três primeiras reações da Figura 33-9. Uma segunda enzima bifuncional catalisa as reações ⑤ e ⑥ da Figura 33-9. A estreita proximidade de múltiplos sítios ativos em um polipeptídeo funcional facilita a canalização eficiente dos intermediários da biossíntese de pirimidinas.

OS DESOXIRRIBONUCLEOSÍDEOS DE URACILA E CITOSINA SÃO RECUPERADOS

A adenina, a guanina e a hipoxantina, liberadas durante a renovação dos ácidos nucleicos, particularmente do RNA mensageiro, são reconvertidas em nucleosídeos trifosfato pelas chamadas **vias de salvamento**. As células de mamíferos reutilizam uma pequena parte de pirimidinas *livres*, ao passo que as “reações de salvamento” convertem os ribonucleosídeos

gerar TMP e di-hidrofolato, são particularmente sensíveis aos inibidores da di-hidrofolato-redutase, como o metotrexato, um agente antineoplásico.

Alguns análogos das pirimidinas atuam como substratos para enzimas da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos

O **alopurinol** e o fármaco anticâncer **5-fluoruracil** (ver Figura 32-13) são substratos alternativos para a orotato-fosforribosiltransferase, EC 2.4.2.10 (reação ⑤, Figura 33-9). Ambos os fármacos são fosforribosilados, e o alopurinol é convertido em um nucleotídeo em que o ribosil-fosfato é ligado ao N¹ do anel pirimidínico.

REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS PIRIMIDÍNICOS

A expressão gênica e a atividade enzimática são reguladas

O principal foco na regulação da biossíntese das pirimidinas é o CAD. A expressão do gene CAD é regulada tanto em nível da transcrição quanto da tradução. Quanto à atividade enzimática, a atividade da carbamoil-fosfato-sintase II (CPS) da CAD é ativada por PRPP e é inibida por retroalimentação por UTP. O efeito do UTP é, no entanto, abolido pela fosforilação da Serina 1406 da CAD.

As biossínteses dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos são reguladas de modo coordenado

As biossínteses das purinas e das pirimidinas correm paralelamente uma à outra do ponto de vista quantitativo, isto é, mol por mol, sugerindo controle coordenado de sua biossíntese. Vários sítios de *regulação cruzada* caracterizam as vias que levam à biossíntese dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. A PRPP sintase (reação ①, Figura 33-2), que forma um precursor essencial a ambos os processos, é inibida por retroalimentação pelos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, assim como a conversão dos NDPs dos nucleotídeos pirimidínicos e purínicos em NTPs (Figura 33-10).

OS SERES HUMANOS CATABOLIZAM AS PURINAS EM ÁCIDO ÚRICO

Os seres humanos convertem a adenosina e a guanosina em ácido úrico (Figura 33-11). A adenosina é primeiramente convertida à inosina pela adenosina-desaminase, EC 3.5.4.4. Em mamíferos, que não primatas superiores, a uricase (EC 1.7.3.3) converte o ácido úrico ao composto hidrossolúvel alantoína. Todavia, como os seres humanos carecem de uricase, o produto final do catabolismo das purinas em seres humanos é o ácido úrico.

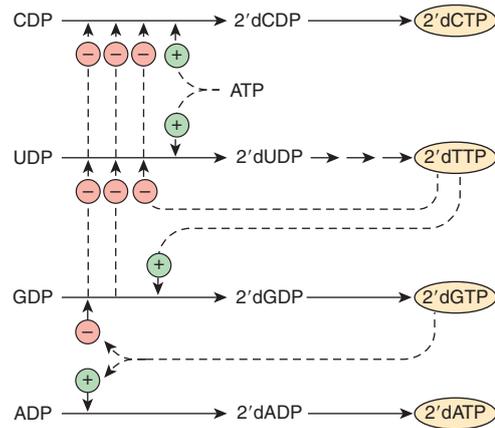


FIGURA 33-10 Regulação da conversão de NDPs purínicos e pirimidínicos em NTPs. As linhas sólidas representam o fluxo químico. As linhas verdes tracejadas representam regulação por retroalimentação positiva (+), e as linhas vermelhas tracejadas, regulação por retroalimentação negativa (-).

A GOTA É UM DISTÚRBO METABÓLICO DO CATABOLISMO DE PURINAS

Vários distúrbios genéticos da PRPP-sintase (reação ①, Figura 33-2) se manifestam clinicamente na forma de gota. Cada um desses distúrbios – por exemplo, elevação de V_{\max} , maior afinidade pela ribose-5-fosfato ou resistência à inibição por retroalimentação – resulta em produção ou excreção excessiva dos catabólitos das purinas. Quando os níveis séricos de urato ultrapassam o limite de solubilidade, o urato de sódio cristaliza nos tecidos moles e nas articulações e provoca uma reação inflamatória conhecida como **artrite gotosa**. Entretanto, a maioria dos casos de gota reflete anormalidades no processamento renal do ácido úrico.

OUTROS DISTÚRBIOS DO CATABOLISMO DE PURINAS

Embora os estados de deficiência de purinas sejam raros nos seres humanos, existem vários distúrbios genéticos do catabolismo das purinas. As **hiperuricemias** podem ser diferenciadas com base na excreção de quantidades normais ou excessivas de uratos totais. Algumas hiperuricemias refletem distúrbios enzimáticos específicos. Outras são secundárias a doenças, como câncer ou psoríase, que aumentam a renovação dos tecidos.

Síndrome de Lesch-Nyhan

A síndrome de Lesch-Nyhan, uma hiperuricemia causada por produção excessiva de ácido úrico, caracterizada por episódios frequentes de litíase e por uma síndrome bizarra de automutilação, reflete um defeito da **hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase**, uma das enzimas que atua no salvamento de purinas (Figura 33-4). A elevação concomitante do PRPP intracelular resulta em produção excessiva de purinas.

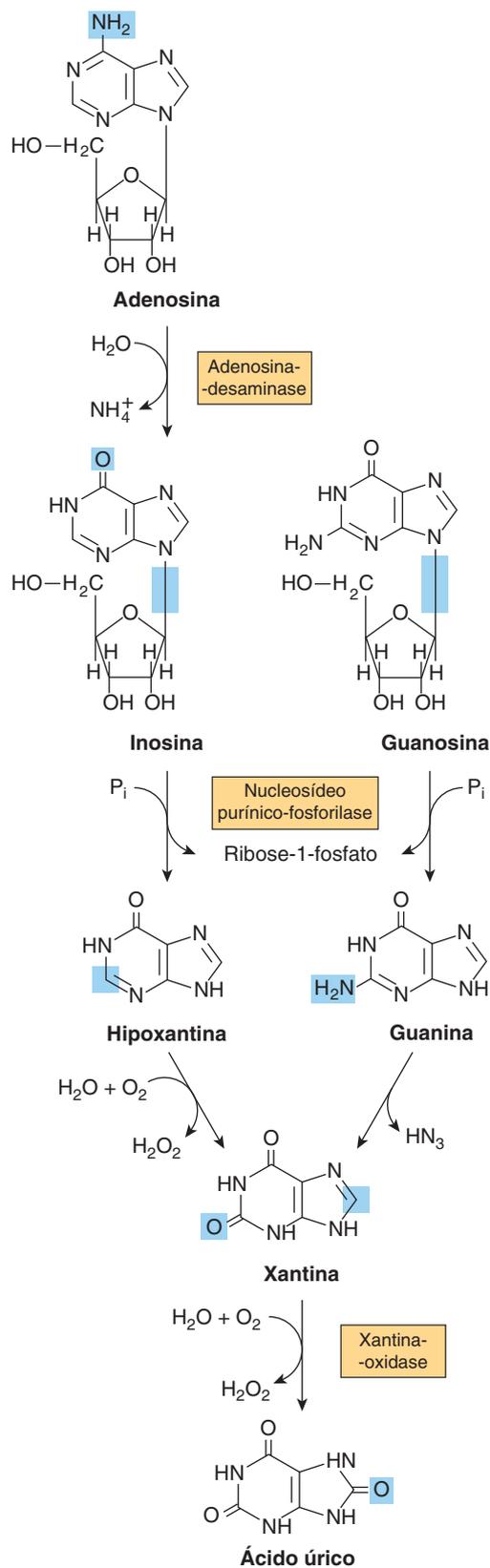


FIGURA 33-11 Formação do ácido úrico a partir de nucleosídeos purínicos por meio das bases purínicas hipoxantina, xantina e guanina. Os desoxirribonucleosídeos purínicos são degradados pela mesma via catabólica e enzimas, presentes na mucosa do trato gastrointestinal dos mamíferos.

As mutações que diminuem ou suprimem a atividade da hipoxantina-guanina-fosforiltransferase incluem deleções, mutações de fase de leitura, substituições de bases e processamento anormal do RNA mensageiro (mRNA).

Doença de von Gierke

Na doença de von Gierke (**deficiência da glicose-6-fosfatase**), a produção excessiva de purinas e a hiperuricemia ocorrem secundariamente à geração aumentada do precursor do PRPP, a ribose-5-fosfato. A acidose láctica associada eleva o limiar renal para o urato, com conseqüente aumento dos uratos corporais totais.

Hipouricemia

Hipouricemia e excreção aumentada de hipoxantina e xantina estão associadas com uma deficiência na **xantina-oxidase**, EC 1.17.3.2 (Figura 33-11) causada por defeito genético ou por dano hepático grave. Os pacientes com deficiência enzimática grave podem apresentar xantínúria e litíase de xantina.

Deficiência da adenosina-desaminase e da purina nucleosídeo fosforilase

A **deficiência da adenosina-desaminase** (Figura 33-11) está associada a uma imunodeficiência na qual tanto os linfócitos derivados do timo (células T) quanto os linfócitos derivados da medula óssea (células B) são escassos e disfuncionais. Os pacientes apresentam imunodeficiência grave. Na ausência de reposição enzimática ou de transplante de medula óssea, os lactentes frequentemente morrem de infecções fatais. A atividade defeituosa da **purina nucleosídeo fosforilase** (EC 2.4.2.1) está associada à deficiência grave de células T, mas, aparentemente, há função normal das células B. As disfunções imunes parecem resultar do acúmulo de dGTP e dATP, que inibem a ribonucleotídeo-reductase e, conseqüentemente, depletam as células de precursores de DNA. A **Tabela 33-1** fornece um resumo dos distúrbios conhecidos do metabolismo das purinas.

O CATABOLISMO DE PIRIMIDINAS PRODUZ METABÓLITOS HIDROSSOLÚVEIS

Diferentemente dos produtos de baixa solubilidade do catabolismo das purinas, o catabolismo das pirimidinas forma produtos altamente hidrossolúveis – CO_2 , NH_3 , β -alanina e β -aminoisobutirato (**Figura 33-12**). Nos seres humanos, ocorre a transaminação do β -aminoisobutirato em metilmalonato-semialdeído, que, em seguida, forma succinil-CoA (ver Figura 19-2). A excreção de β -aminoisobutirato aumenta na leucemia e na exposição intensa à radiação por raios X, devido à destruição aumentada do DNA. Todavia, alguns indivíduos de ascendência chinesa ou japonesa excretam rotineiramente o β -aminoisobutirato.

Os distúrbios do metabolismo da β -alanina e do β -aminoisobutirato surgem de defeitos das enzimas envolvidas no catabolismo das pirimidinas. Entre os defeitos, está a **acidúria**

TABELA 33-1 Distúrbios metabólicos do metabolismo das purinas e das pirimidinas

Enzima deficiente	Número no catálogo de enzimas	Referência OMIM	Principais sinais e sintomas	Figura e reação
Metabolismo das purinas				
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	2.4.2.8	308000	Síndrome de Lesch-Nyhan; uricemia, automutilação	33-4 ②
PRPP-sintase	2.7.6.1	311860	Gota; artrite gotosa	33-2 ①
Adenosina-desaminase	3.5.4.6	102700	Grave comprometimento do sistema imune	33-1 ①
Purina nucleosídeo-fosforilase	2.4.2.1	164050	Distúrbios autoimunes; infecções benignas e oportunistas	33-11 ②
Metabolismo das pirimidinas				
Di-hidropirimidina-desidrogenase	1.3.1.2	274270	Pode desenvolver toxicidade à 5-fluoruracil, também um substrato para essa desidrogenase	33-12 ②
Orotato-fosforribosiltransferase e ácido orotidílico-descarboxilase	2.4.2.10 e 4.1.1.23	258900	Acidúria orótica tipo 1; anemia megaloblástica	33-9 ⑤ e ⑥
Ácido orotidílico-descarboxilase	4.1.1.23	258920	Acidúria ácido orótica tipo 2	33-9 ⑥

β -hidroxibutírica, um distúrbio devido à deficiência total ou parcial da enzima **di-hidropirimidina-desidrogenase**, EC 1.3.1.2 (Figura 33-12). A doença genética reflete a ausência da enzima. Um distúrbio do catabolismo das pirimidinas, conhecido como uracilúria-timinúria combinada, também é um distúrbio do metabolismo de β -aminoácidos, visto que ocorre comprometimento na *formação* de β -alanina e β -aminoisobutirato. Quando causado por um erro inato, surgem complicações neurológicas graves. Uma forma não genética é desencadeada pela administração do agente antineoplásico a 5-fluoruracil (ver Figura 32-13) a pacientes com baixos níveis de di-hidropirimidina-desidrogenase.

A pseudouridina é excretada de modo inalterado

Nenhuma enzima humana catalisa a hidrólise ou a fosforólise da pseudouridina (ψ) derivada da degradação de moléculas de RNA. Como consequência, esse nucleotídeo incomum é excretado de modo inalterado na urina de indivíduos saudáveis. A pseudouridina foi, de fato, isolada pela primeira vez a partir da urina humana (Figura 33-13).

A SUPERPRODUÇÃO DE CATABÓLITOS DE PIRIMIDINA É RARAMENTE ASSOCIADA A ANORMALIDADES CLÍNICAS SIGNIFICATIVAS

Como os produtos finais do catabolismo das pirimidinas são altamente hidrossolúveis, a produção em excesso de pirimidina resulta em poucos sinais clínicos ou sintomáticos. A Tabela 33-1 fornece uma lista das exceções. Na hiperuricemia associada à produção excessiva de PRPP, ocorre formação

excessiva de nucleotídeos pirimidínicos e excreção aumentada de β -alanina. Como o N^5, N^{10} -metileno-tetra-hidrofolato é necessário para a síntese do timidilato, os distúrbios do metabolismo do folato e da vitamina B_{12} resultam em deficiência de TMP.

Acidúria orótica

A acidúria orótica que acompanha a **síndrome de Reye** provavelmente é uma consequência da incapacidade de as mitocôndrias, gravemente danificadas, utilizarem carbamoil-fosfato, que fica, então, disponível para a produção excessiva de ácido orótico no citosol. A **acidúria orótica tipo I** reflete a deficiência das enzimas orotato fosforribosiltransferase, EC 2.1.3.3, e orotidilato-descarboxilase, EC 4.1.1.23 (reações ⑤ e ⑥, Figura 33-9). A **acidúria orótica tipo II**, mais rara, é devida à deficiência apenas da orotidilato-descarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9).

A deficiência de uma enzima do ciclo da ureia resulta em excreção de precursores das pirimidinas

A excreção aumentada de ácido orótico, uracila e uridina acompanha deficiência da ornitina-transcarbamoilase mitocondrial hepática (ver reação ②, Figura 28-16). O carbamoil-fosfato em excesso sai do citosol, onde estimula a biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. A consequente **acidúria orótica** moderada é agravada por alimentos ricos em nitrogênio.

Determinados fármacos podem precipitar acidúria orótica

O **alopurinol** (ver Figura 32-13), um substrato alternativo para a orotato fosforribosiltransferase (reação ⑤, Figura 33-9), compete com o ácido orótico. O produto nucleotídico resultante também inibe a orotidilato-descarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9), resultando em **acidúria orótica** e **orotidinúria**.

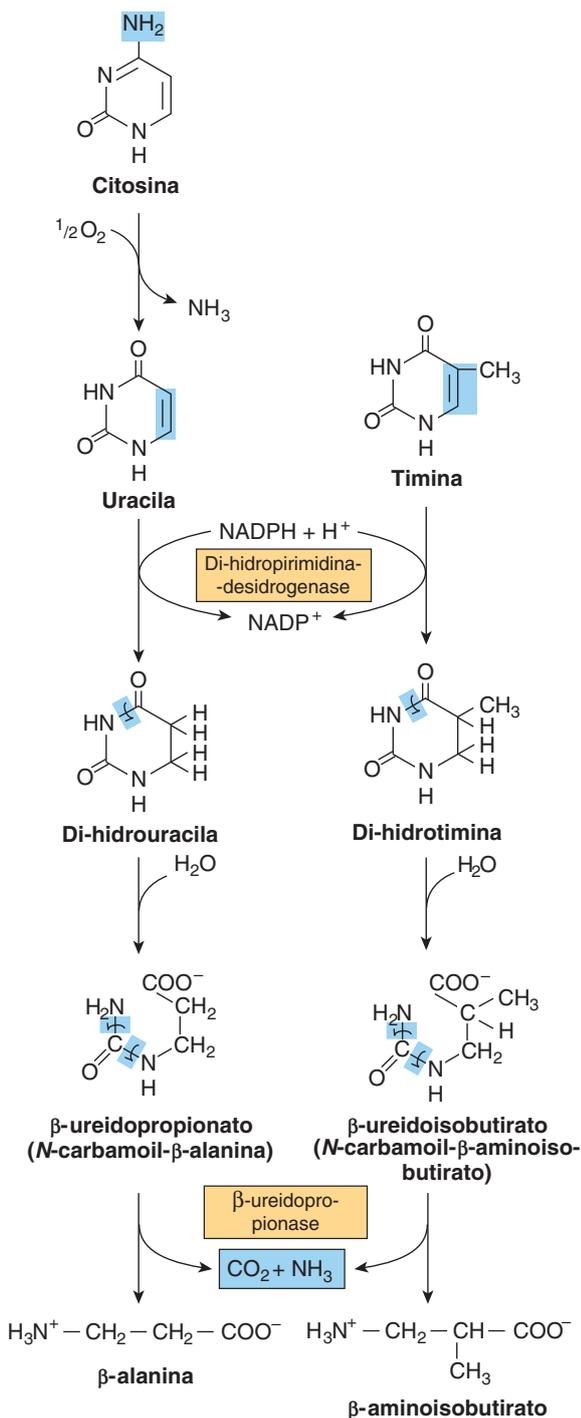


FIGURA 33-12 Catabolismo das pirimidinas. A β -ureidopropionase hepática catalisa a formação de β -alanina e β -aminoisobutirato a partir de precursores pirimidínicos.

A 6-azauridina, após conversão em 6-azauridilato, também inibe competitivamente a orotidilato-decarboxilase (reação ⑥, Figura 33-9), aumentando a excreção de ácido orótico e orotidina. Foram identificados quatro genes que codificam transportadores de urato. Duas das proteínas codificadas estão localizadas na membrana apical das células tubulares proximais.

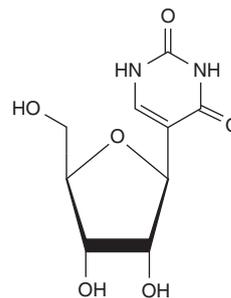


FIGURA 33-13 Pseudouridina, na qual a ribose está ligada ao C5 da uridina.

RESUMO

- Os ácidos nucleicos ingeridos são degradados a purinas e pirimidinas. As purinas e as pirimidinas são formadas a partir de intermediários anfóbicos e, portanto, não são essenciais na dieta.
- Várias reações de biossíntese do IMP necessitam de derivados do folato e da glutamina. Consequentemente, os antifolatos e os análogos da glutamina inibem a biossíntese de purinas.
- IMP é um precursor tanto de AMP quanto de GMP. A glutamina fornece o grupo 2-amino do GMP, e o aspartato, o grupo 6-amino do AMP.
- A transferência de um grupo fosforil do ATP converte AMP e GMP em ADP e GDP. Uma segunda transferência de grupo fosforil do ATP forma GTP, mas ADP é convertido em ATP principalmente por fosforilação oxidativa.
- A biossíntese hepática de nucleotídeos purínicos é minuciosamente regulada pelo tamanho do reservatório de PRPP e por inibição por retroalimentação da PRPP glutamil-amidotransferase por AMP e GMP.
- A regulação coordenada da biossíntese dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos assegura a sua presença em proporções apropriadas para a síntese de ácidos nucleicos e outras necessidades metabólicas do organismo.
- Os seres humanos catabolizam as purinas em ácido úrico (pK_a de 5,8), que está presente na forma de ácido relativamente insolúvel em pH ácido ou na forma de sal de urato de sódio mais solúvel em pH próximo da neutralidade. A presença de cristais de urato é diagnóstica de gota. Outros distúrbios do catabolismo das purinas incluem a síndrome de Lesch-Nyhan, a doença de von Gierke e as hipouricemias.
- Como os catabólitos das pirimidinas são hidrossolúveis, a sua produção excessiva não resulta em anormalidades clínicas. Todavia, a excreção de precursores pirimidínicos pode resultar de deficiência da ornitina-transcarbamoilase, visto que o carbamoil-fosfato em excesso fica disponível para a biossíntese de pirimidinas.

REFERÊNCIAS

- Brassier A, Ottolenghi C, Boutron A, et al: Dihydroliipoamide dehydrogenase deficiency: a still overlooked cause of recurrent acute liver failure and Reye-like syndrome. *Mol Genet Metab* 2013;109:28.
- Christopherson RI, Lyons SD, Wilson PK: Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. *Acc Chem Res* 2002;35:961.
- Evans DR, Guy HI: Mammalian pyrimidine biosynthesis: Fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 2004;279:33035.

- Fu R, Jinnah HA: Genotype-phenotype correlations in Lesch-Nyhan disease: moving beyond the gene. *J Biol Chem* 2012;287:2997.
- Fu W, Li Q, Yao J, et al: Protein expression of urate transporters in renal tissue of patients with uric acid nephrolithiasis. *Cell Biochem Biophys* 2014;70:449.
- Kamal MA, Christopherson RI: Accumulation of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate in human CCRF-CEM leukemia cells treated with antifolates. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:957.
- Martinez J, Dugaiczuk LJ, Zielinski R, et al: Human genetic disorders, a phylogenetic perspective. *J Mol Biol* 2001;308:587.
- Moyer RA, John DS: Acute gout precipitated by total parenteral nutrition. *J Rheumatol* 2003;30:849.
- Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, et al: Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem* 2013;288:27315.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Uehara I, Kimura T, Tanigaki S, et al: Paracellular route is the major urate transport pathway across the blood-placental barrier. *Physiol Rep* 2014;20:2.
- Wu VC, Huang JW, Hsueh PR, et al: Renal hypouricemia is an ominous sign in patients with severe acute respiratory syndrome. *Am J Kidney Dis* 2005;45:88.

Estrutura e função dos ácidos nucleicos

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a estrutura química monomérica e polimérica do material genético, o ácido desoxirribonucleico (DNA), que é encontrado no interior do núcleo das células eucarióticas.
- Explicar por que o DNA eucariótico nuclear genômico é de dupla-fita e altamente carregado negativamente.
- Compreender um esboço de como a informação genética do DNA pode ser duplicada com fidelidade.
- Entender como a informação genética do DNA é transcrita, ou copiada, para uma miríade de diferentes formas de ácido ribonucleico (RNA).
- Inferir que uma forma de RNA rico em informação, o RNA mensageiro (mRNA), pode ser subsequentemente traduzido em proteínas, as moléculas que constroem as estruturas, os formatos e, em última análise, as funções das células individuais, dos tecidos e dos órgãos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A descoberta de que a informação genética é codificada ao longo do comprimento de uma molécula composta por apenas quatro tipos de unidades monoméricas foi uma das principais conquistas científicas do século XX. Essa molécula polimérica, o **ácido desoxirribonucleico (DNA)**, é a base química da hereditariedade e está organizada em genes, as unidades fundamentais da informação genética. A via de informação básica – isto é, o DNA, que direciona a síntese de RNA, que, por sua vez, tanto direciona quanto regula a síntese proteica – foi elucidada. Os genes não funcionam de maneira autônoma; suas replicações e funções são controladas por vários produtos gênicos, geralmente em colaboração com componentes de várias vias de transdução de sinais. O conhecimento da estrutura e função dos ácidos nucleicos é essencial na compreensão da genética e de muitos aspectos da fisiopatologia bem como da base genética de doenças.

O DNA CONTÉM A INFORMAÇÃO GENÉTICA

A demonstração de que o DNA continha a informação genética foi feita, pela primeira vez, em 1944, em uma série de experimentos realizados por Avery, MacLeod e McCarty. Eles mostraram que a determinação genética do caráter (tipo) da

cápsula de um pneumococo específico poderia ser transmitida para outro com um tipo de cápsula diferente, por meio da introdução de DNA purificado do primeiro coco para o último. Esses autores chamaram o agente (depois demonstrado como o DNA) que realizava a mudança de “fator de transformação”. Posteriormente, esse tipo de manipulação genética se tornou comum. Hoje, experimentos semelhantes são regularmente realizados utilizando vários tipos de células eucarióticas, incluindo as células humanas e de embriões de mamíferos como receptores e DNA clonado molecularmente como o doador da informação genética.

O DNA contém quatro desoxinucleotídeos

A natureza química das unidades monoméricas de desoxinucleotídeos de DNA – **desoxiadenuilato**, **desoxiguanilato**, **desoxicitidilato** e **timidilato** – está descrita no Capítulo 32. Essas unidades monoméricas de DNA estão dispostas em uma forma polimérica de ligações 3',5'-fosfodiéster, que constituem uma fita simples, como representado na **Figura 34-1**. O conteúdo de informações do DNA (o código genético) reside na sequência em que esses monômeros – os desoxirribonucleotídeos purina e pirimidina – estão ordenados. O polímero, como descrito, possui uma polaridade; uma extremidade tem uma hidroxil 5' ou fosfato terminal, ao passo que a outra tem um fosfato 3' ou hidroxil terminal. A importância dessa polaridade se tornará evidente. Uma vez que a informação genética

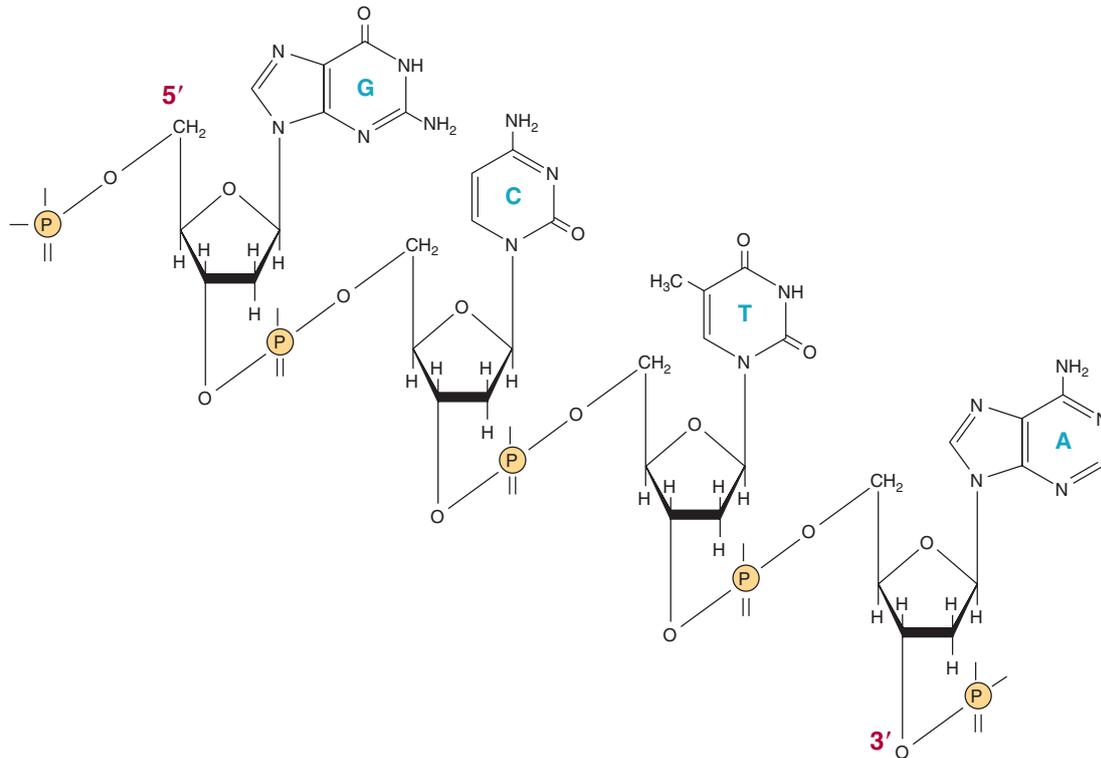


FIGURA 34-1 Um segmento de uma fita de uma molécula de DNA em que as bases purínicas e pirimidínicas guanina (G), citosina (C), timina (T) e adenina (A) são mantidas juntas por um esqueleto fosfodiéster entre as 2'-desoxirriboses presas às bases nucleares por uma ligação N-glicosídica. O esqueleto fosfodiéster é negativamente carregado e apresenta uma polaridade (i.e., uma direção). A convenção estabelece que uma sequência de DNA de fita simples é escrita na direção 5'-3' (i.e., pGpCpTpAp, em que G, C, T e A representam as quatro bases e p representa os fosfatos interconectantes).

reside na ordem das unidades monoméricas no interior dos polímeros, deve existir um mecanismo de reprodução ou replicação dessa informação específica com alto grau de fidelidade. Essa exigência, em conjunto com dados de difração no raio X da molécula de DNA, e com a observação de Chargaff de que nas moléculas de DNA a concentração de nucleotídeos de desoxiadenosina (A) é igual à de nucleotídeos de timidina (T) ($A = T$), ao passo que a concentração de nucleotídeos de desoxiguanosina (G) é igual à de nucleotídeos de desoxicitidina (C) ($G = C$), levou Watson, Crick e Wilkins a propor, no início dos anos 1950, um modelo de dupla-fita da molécula de DNA. O modelo que eles propuseram está representado na **Figura 34-2**. As duas fitas dessa hélice em dupla-fita são mantidas no lugar tanto por **ligações de hidrogênio** entre as bases purínicas e pirimidínicas de suas respectivas moléculas lineares quanto por **interações de van der Waals** e **interações hidrofóbicas** entre as pilhas de pares de bases adjacentes. Os pareamentos entre os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos nas fitas opostas são muito específicos e dependentes de ligações de **A com T** e de **G com C** (Figura 34-2).

A forma comum de DNA é considerada a voltada à direita, pois quando se olha para baixo da dupla-hélice, os resíduos das bases formam uma espiral no sentido horário. Na molécula de dupla-fita, as restrições impostas pela rotação sobre as ligações fosfodiéster, a anticonfiguração favorecida das ligações glicosídicas (ver Figura 32-5) e os tautômeros predominantes (ver Figura 32-2) das quatro bases (A, G, T e C) permitem combinar A somente com T e G somente com C, conforme

representado na **Figura 34-3**. Essa restrição de pareamento de bases explica a observação anterior de que em uma molécula de DNA de dupla-fita o conteúdo de A é igual ao de T e o conteúdo de G é igual ao de C. As duas fitas da molécula de dupla-hélice, cada uma delas com uma **polaridade**, são **anti-paralelas**; isto é, uma fita corre na direção 5'-3' e a outra na direção 3'-5'. No interior de um gene específico nas moléculas de DNA de dupla-hélice, a informação genética reside na sequência de nucleotídeos em uma fita, a **fita-molde**. Essa é a fita de DNA que é copiada durante a síntese do **ácido ribonucleico (RNA)**. Ela é, algumas vezes, chamada de **fita não codificadora**. A fita oposta é considerada a **fita codificadora**, pois corresponde à sequência do RNA transcrito (mas conteúdo uracila no lugar de timina; ver Figura 34-8) que codifica a proteína.

As duas fitas, em que as bases opostas são mantidas juntas por ligações de hidrogênio, rodeiam um eixo central na forma de uma **dupla-hélice**. Em um tubo de ensaio, o DNA de dupla-fita pode existir em pelo menos seis formas (A a E e Z). Essas formas de DNA diferem em relação às interações intra e interfitas e envolvem rearranjos estruturais no interior de unidades monoméricas de DNA. Esses rearranjos são fundamentalmente semelhantes aos descritos para aminoácidos no interior de polipeptídeos (p. ex., Figura 3-4). A forma B é geralmente encontrada em condições fisiológicas (baixa concentração de sais, alto grau de hidratação). Uma única volta do DNA B sobre o eixo longo de uma molécula contém 10 pb. A distância percorrida por uma volta do DNA B é de 3,4 nm (34 Å).

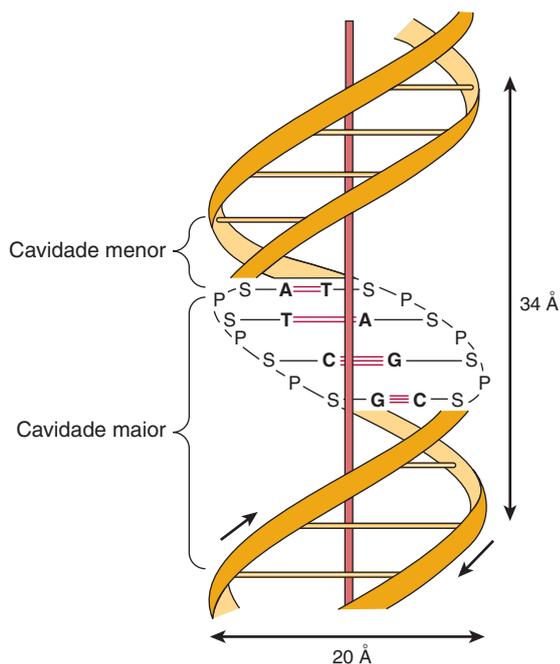


FIGURA 34-2 Uma representação diagramática do modelo de Watson e Crick da estrutura de dupla-hélice da forma B do DNA.

A seta horizontal indica a largura da dupla-hélice (20 Å), e a seta vertical indica a distância alcançada por uma volta completa da dupla-hélice (34 Å). Uma volta do DNA B inclui 10 pares de bases (pb) e, assim, a distância é de 3,4 Å por pb. O eixo central da dupla-hélice é indicado pela haste vertical. As setas pequenas designam a polaridade das fitas antiparalelas. Os sulcos maiores e menores são representados. (A, adenina; C, citosina; G, guanina; P, fosfato; S, açúcar [desoxirribose]; T, timina.) As ligações de hidrogênio entre as bases A/T e G/C são indicadas por linhas horizontais vermelhas curtas.

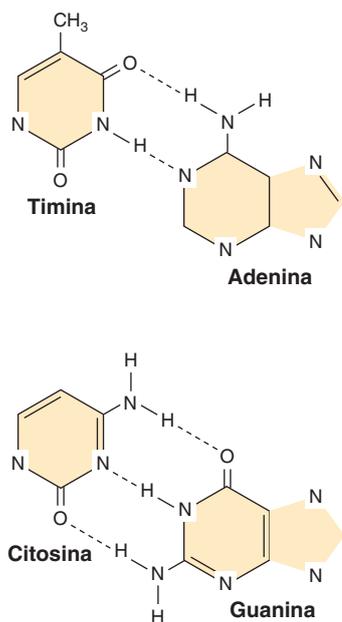


FIGURA 34-3 O pareamento de bases de DNA entre os desoxinucleotídeos complementares envolve a formação de ligações de hidrogênio. Duas dessas ligações de H se formam entre adenina e timina, e três ligações de H formam-se entre citidina e guanina. As linhas tracejadas representam as ligações de H.

A largura (diâmetro helicoidal) da dupla-hélice no DNA B é de 2 nm (20 Å).

Como representado na Figura 34-3, três ligações de hidrogênio, formadas por hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo, como N ou O, mantêm o nucleotídeo desoxiguanosina ligado ao nucleotídeo desoxicitidina, ao ponto que o outro par, o par A-T, é mantido junto por duas ligações de hidrogênio. Assim, as ligações de hidrogênio G-C são mais resistentes à desnaturação, ou separação da fita, um termo chamado de “fusão”, do que as regiões do DNA ricas em A-T.

A desnaturação do DNA é utilizada para analisar a sua estrutura

A estrutura de dupla-fita do DNA pode ser separada nas duas fitas que a compõem, em solução, pelo aumento da temperatura ou diminuição da concentração de sais. Não só as duas pilhas de bases são separadas, mas as próprias bases se desempilham enquanto ainda estão ligadas no polímero pelo esqueleto fosfodiéster. Concomitantemente a essa desnaturação da molécula de DNA, há aumento na absorvância óptica das bases purínicas e pirimidínicas – fenômeno chamado de **hipercromicidade** da desnaturação. Devido ao empilhamento das bases e às ligações de hidrogênio entre as pilhas, a dupla-fita da molécula de DNA exibe as propriedades de um bastonete rígido e, em solução, é um material viscoso que perde sua viscosidade após a desnaturação.

As fitas de determinada molécula de DNA separam-se em uma determinada faixa de temperatura. O ponto médio é chamado de **ponto de fusão**, ou T_m . O T_m é influenciado pela composição da base do DNA e pela concentração de sal (ou outros solutos, ver a seguir) da solução. O DNA rico em pares G-C, que apresentam três ligações de hidrogênio, funde-se em uma temperatura mais elevada que o DNA rico em pares A-T, que possuem duas ligações de hidrogênio. Um aumento de 10 vezes na concentração do cátion monovalente aumenta o T_m em torno de 16,6°C por meio da neutralização da repulsão intrínseca intercadeia entre os fosfatos altamente carregados negativamente do esqueleto fosfodiéster. Por outro lado, o solvente orgânico formamida, que é comumente utilizado em experimentos de DNA recombinante, desestabiliza as ligações de hidrogênio entre as bases, diminuindo, portanto, o T_m . A adição de formamida permite que as fitas de DNA ou híbridos de DNA-RNA sejam separados em temperaturas muito mais baixas e minimiza a quebra da ligação fosfodiéster, que pode ocorrer após incubação prolongada a temperaturas mais elevadas.

A renaturação do DNA exige pares de bases complementares

É importante ressaltar que as fitas de DNA irão se renaturar ou se reassociar quando as condições fisiológicas adequadas de temperatura e concentração de sais forem atingidas; esse processo de recombinação é frequentemente chamado de **hibridização**. A taxa de recombinação depende da concentração de fitas complementares. A recombinação das duas fitas de DNA complementares de um cromossomo após a transcrição é um exemplo fisiológico de renaturação (ver a seguir). Em uma determinada temperatura e concentração de sais,

uma fita particular de ácido nucleico se associará fortemente apenas a uma fita complementar. Moléculas híbridas também se formarão em condições adequadas. Por exemplo, o DNA formará um híbrido com um DNA complementar (cDNA) ou um RNA mensageiro cognato (mRNA; ver a seguir). Quando a hibridização é combinada com técnicas de eletroforese em gel que separam os ácidos nucleicos por tamanho, associadas a marcações com sondas radioativas ou fluorescentes, a fim de proporcionar um sinal detectável, as técnicas analíticas resultantes são chamadas de *Southern* (DNA/DNA) e *Northern* (RNA-DNA) *blotting*, respectivamente. Esses procedimentos permitem uma identificação discriminatória de alta sensibilidade de tipos específicos de ácidos nucleicos a partir de misturas complexas de DNA ou RNA (ver Capítulo 39).

Há cavidades na molécula de DNA

O exame do modelo representado na Figura 34-2 revela uma **cavidade maior** e uma **cavidade menor** serpenteando ao longo da molécula, paralelas ao esqueleto fosfodiéster. Nessas cavidades, as proteínas podem interagir especificamente com átomos expostos dos nucleotídeos (por meio de pontes salinas e hidrofóbicas específicas), desse modo, reconhecendo e se ligando a sequências de nucleotídeos específicas, bem como às formas únicas decorrentes. A ligação geralmente ocorre sem desfazer o pareamento de bases da molécula de DNA de dupla-hélice. Como discutido nos Capítulos 36 e 38, as proteínas reguladoras controlam a expressão de genes específicos por meio dessas interações.

O DNA existe nas formas relaxada e super-helicoidal

Em alguns organismos, como bactérias, bacteriófagos, muitos vírus de animais contendo DNA, assim como organelas como as mitocôndrias (ver Figura 35-8), as extremidades das moléculas de DNA são unidas para criar um círculo fechado com as terminações livres não covalentes. Isto, é claro, não destrói a polaridade das moléculas, mas elimina todos os grupos livres hidroxil 3', hidroxil 5' e grupos fosforil. Círculos fechados existem nas formas relaxadas ou super-helicoidais. Super-hélices são introduzidas quando um círculo fechado é torcido em torno do seu próprio eixo, ou quando uma peça linear do DNA dúplice, cujas extremidades são fixas, é torcida. Este processo dependente de energia coloca a molécula em estresse de torção, e quanto maior o número de super-hélices, maior o estresse de torção (teste isso torcendo um elástico). **Super-hélices negativas** são formadas quando a molécula é torcida no sentido anti-horário da dupla-hélice voltada para a direita encontrada no DNA B. Esse DNA é denominado desenrolado. A energia necessária para atingir esse estágio é, de certo modo, armazenada nas super-hélices. A transição para outra forma que necessite de energia é, portanto, facilitada pelo desenrolamento (ver Figura 35-19). Uma transição desse tipo é a separação das fitas, que é um pré-requisito para a replicação e transcrição do DNA. O DNA super-helicoidal é, portanto, uma forma preferida em sistemas biológicos. Enzimas que catalisam mudanças topológicas de DNA são chamadas de **topoisomerases**. As topoisomerases podem relaxar ou inserir super-hélices, utilizando o ATP como fonte de energia. Existem homólogos dessas enzimas em todos os organismos, e são alvos importantes para

a quimioterapia do câncer. Super-hélices também podem se formar no interior de DNAs lineares, se segmentos específicos do DNA forem restritos por fortes interações com proteínas nucleares, que estabelecem dois sítios de ligação, definindo um domínio topológico.

O DNA FORNECE UM MOLDE PARA A REPLICAÇÃO E PARA A TRANSCRIÇÃO

A informação genética armazenada na sequência de nucleotídeos de DNA serve a dois propósitos. Ela é a fonte de informação para a síntese de todas as moléculas de proteínas das células e dos organismos, fornecendo a informação herdada pelas células-filhas ou pela prole. Ambas as funções exigem que a molécula de DNA funcione como molde – no primeiro caso, para a transcrição da informação em RNA e, no segundo caso, para a replicação da informação nas moléculas-filhas de DNA.

Quando cada fita da molécula de dupla-fita parental de DNA se separa de seu complemento durante a replicação, cada fita, independentemente, serve de molde no qual uma nova fita complementar é sintetizada (Figura 34-4). As duas

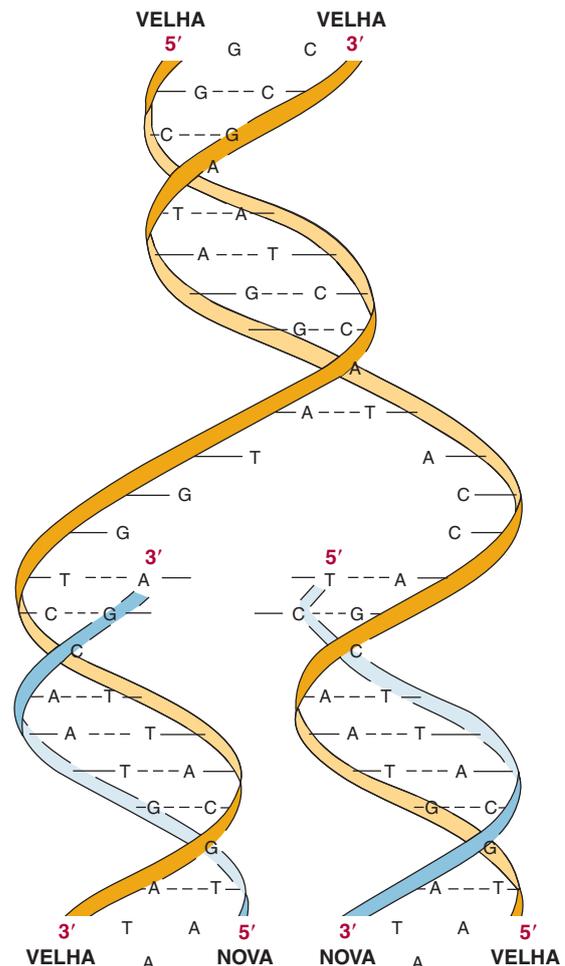


FIGURA 34-4 A síntese do DNA mantém a estrutura do DNA. A estrutura de dupla-fita do DNA e a função molde de cada fita velha (em cor de laranja) em que uma nova fita complementar (em azul) é sintetizada.

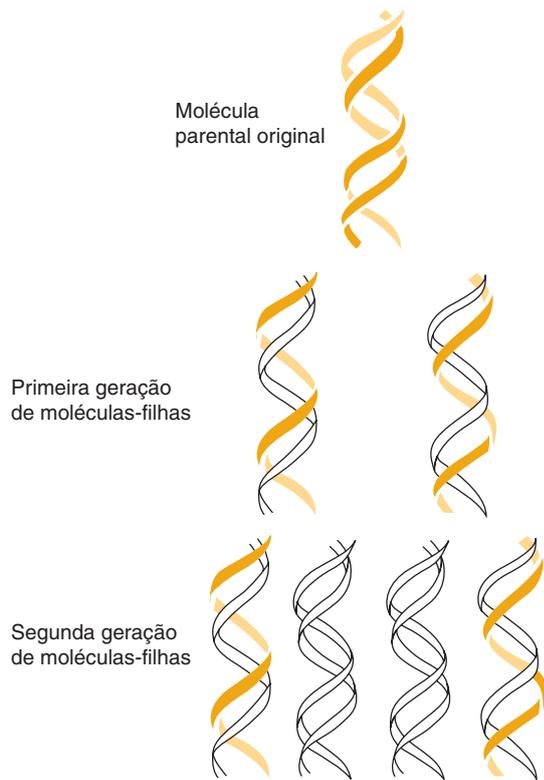


FIGURA 34-5 A replicação do DNA é semiconservativa.

Durante um ciclo de replicação, cada uma das duas fitas de DNA serve de molde para a síntese de uma nova fita complementar. A natureza semiconservativa da replicação do DNA apresenta implicações bioquímicas (ver Figura 35-16), citogenéticas (ver Figura 35-2) e de controle epigenético da expressão gênica (ver Figuras 38-8 e 38-9).

moléculas-filhas de DNA de dupla-hélice recém-formadas, cada uma contendo uma fita (complementar, mas não idêntica) da molécula do DNA parental de dupla-hélice, são, então, separadas entre as duas células-filhas (Figura 34-5). Cada célula-filha contém as moléculas de DNA com informação idêntica à que a célula parental possuía, embora em cada célula-filha a molécula de DNA da célula parental tenha sido apenas semiconservada.

O DNA E O RNA APRESENTAM NATUREZAS BIOQUÍMICAS DIFERENTES

O RNA é um polímero de ribonucleotídeos de purinas e pirimidinas ligados entre si por ligações 3',5'-fosfodiéster, análogo às do DNA (Figura 34-6). Apesar de compartilhar muitas características com o DNA, o RNA tem várias diferenças específicas:

1. No RNA, a porção do açúcar em que os fosfatos e as bases purínicas e pirimidínicas estão ligadas à ribose e não à 2'-desoxirribose do DNA (ver Figuras 19-2 e 32-3).
2. Os componentes de pirimidina do RNA podem ser diferentes dos do DNA. Embora o RNA contenha os ribonucleotídeos de adenina, guanina e citosina, ele não tem

timina, exceto nos raros casos mencionados adiante. Em vez de timina, o RNA contém o ribonucleotídeo de uracila.

3. O RNA geralmente existe como fita simples, ao passo que o DNA existe como uma molécula helicoidal de dupla-fita. Entretanto, a partir da sequência de bases complementares adequada, com polaridade oposta, a fita simples de RNA – como demonstrado na Figura 34-7 e na Figura 34-11 – é capaz de se dobrar para trás sobre si, como um grampo de cabelo, adquirindo as características de dupla-fita: G pareando com C, e A pareando com U.
4. Uma vez que a molécula de RNA é uma fita simples complementar a apenas uma ou duas fitas de um gene, seu conteúdo de guanina não é necessariamente igual ao seu conteúdo de citosina, assim como o seu teor de adenina não é necessariamente igual ao seu teor de uracila.
5. A molécula de RNA pode ser hidrolisada por bases em 2',3'-diésteres cíclicos de mononucleotídeos, compostos que não podem ser formados a partir do DNA tratado com bases (álcalis) devido à ausência do grupo 2'-hidroxila. A labilidade alcalina do RNA é útil tanto para o diagnóstico quanto para a análise.

A informação dentro de uma fita simples de RNA está contida em sua sequência (“estrutura primária”) de nucleotídeos de purina e pirimidina no interior do polímero. A sequência é complementar à fita-molde do gene a partir da qual ela foi transcrita. Devido a essa complementaridade, uma molécula de RNA pode se ligar especificamente por regras de pareamento das bases à sua fita-molde de DNA (A–T, G–C, C–G, U–A; bases de RNA em negrito); ela não se ligará (“hibridizará”) com a outra (codificadora) fita do seu gene. A sequência da molécula de RNA (exceto para U no lugar de T) é a mesma da fita que codifica o gene (Figura 34-8).

QUASE TODAS AS DIVERSAS ESPÉCIES DE RNAs ABUNDANTES E ESTÁVEIS ESTÃO ENVOLVIDAS EM ALGUM ASPECTO DA SÍNTESE PROTEICA

As moléculas citoplasmáticas de RNA que funcionam como modelos para a síntese de proteínas (i.e., que transferem informação genética do DNA para uma maquinaria sintetizadora de proteínas) são designadas **mRNAs**. Muitas outras moléculas de RNA citoplasmáticas abundantes (**RNAs ribossomais; rRNAs**) têm funções estruturais em que contribuem para a formação e a função dos ribossomos (a maquinaria organelar para a síntese de proteínas) ou funcionam como moléculas adaptadoras (**RNAs de transferência; tRNAs**) para a tradução da informação do RNA em sequências específicas de aminoácidos polimerizados.

Curiosamente, algumas moléculas de RNA possuem atividade catalítica intrínseca. A atividade dessas enzimas de RNA, ou **ribozimas**, frequentemente envolve a clivagem de um ácido nucleico. Duas ribozimas são a peptidiltransferase que catalisa a formação das ligações peptídicas no ribossomo, e as ribozimas que estão envolvidas no processamento do RNA.

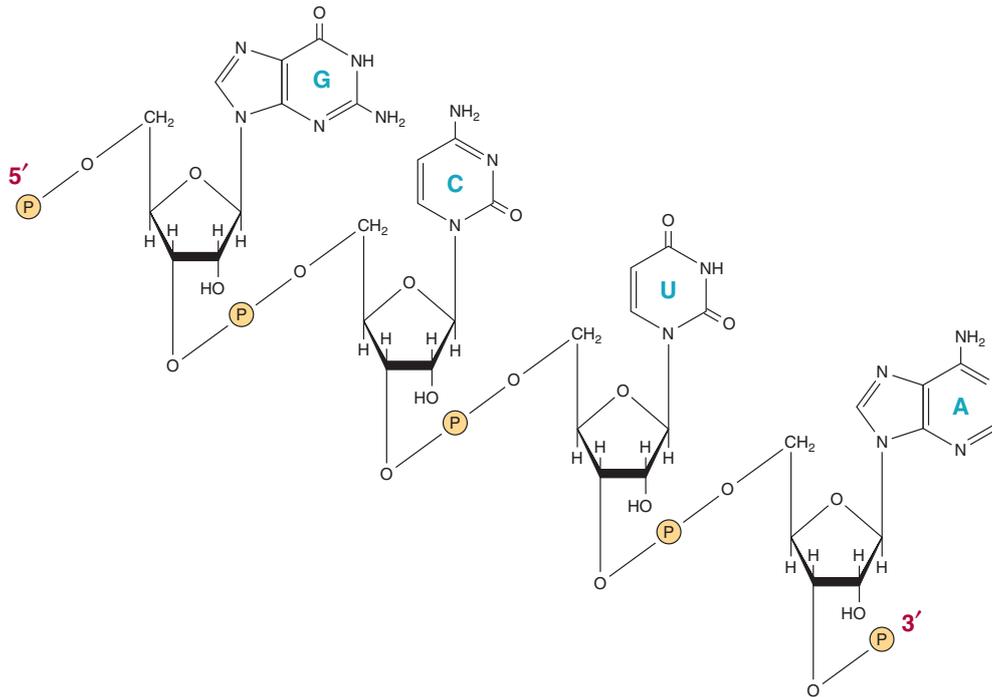


FIGURA 34-6 Um segmento da molécula de ácido ribonucleico (RNA) em que as bases purínicas e pirimidínicas – guanina (G), citosina (C), uracila (U) e adenina (A) – são mantidas juntas por ligações fosfodiéster entre as riboses presas às bases nucleares por ligações N-glicosídicas. Observe que as cargas negativas no esqueleto fosfodiéster não estão representadas (i.e., Figura 34-1), e o polímero apresenta polaridade indicada pelos fosfatos 3' e 5' marcados na figura.

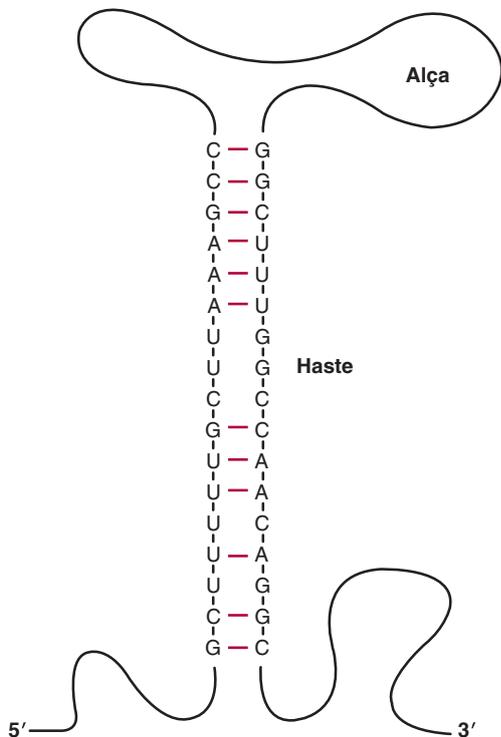


FIGURA 34-7 Representação diagramática da estrutura secundária de uma molécula de fita simples de RNA na qual um stem loop, ou “grampo de cabelo”, formou-se. A formação desta estrutura depende do pareamento de bases intramoleculares indicadas (linhas horizontais coloridas entre as bases). Observe que A forma ligações de hidrogênio com U no RNA.

Em todas as células eucarióticas, existem espécies de RNA nuclear pequeno (snRNA) que não estão diretamente envolvidas na síntese proteica, mas desempenham papel fundamental no processamento do RNA, particularmente no processamento do mRNA. Essas moléculas relativamente pequenas variam em tamanho de 90 a cerca de 300 nucleotídeos (Tabela 34-1). As propriedades das diversas classes de RNAs celulares são detalhadas a seguir.

O material genético de alguns vírus de animais e plantas é RNA, em vez de DNA. Embora alguns vírus de RNA nunca tenham suas informações transcritas para uma molécula de DNA, muitos vírus de RNA animais – especificamente, os retrovírus (p. ex., o HIV) – são transcritos por DNA-polimerase dependente de RNA viral, a chamada transcriptase reversa, para produzir uma cópia de dupla-fita de DNA de seu genoma de RNA. Em muitos casos, a transcrição resultante da dupla-fita de DNA é integrada ao genoma do hospedeiro e, posteriormente, funciona como modelo para a expressão gênica a partir da qual novos genomas de RNA e mRNAs virais podem ser transcritos. A inserção genômica dessas moléculas de DNA “proviral” integrantes pode, dependendo do local envolvido, ser mutagênica, inativando um gene ou desregulando a sua expressão (ver Figura 35-11).

EXISTEM VÁRIAS CLASSES DISTINTAS DE RNA

Como observado anteriormente, em todos os organismos procarionóticos e eucarióticos, existem quatro classes principais de moléculas de RNA: mRNA, tRNA, rRNA e RNAs pequenos. Cada uma difere das outras pela quantidade, pelo tamanho, pela função e pela estabilidade geral.



FIGURA 34-8 A relação entre as sequências de um transcrito de RNA e seu gene, no qual as fitas codificadora e molde são mostradas com suas polaridades. O transcrito de RNA com polaridade 5' para 3' é complementar à fita-molde com polaridade 3' para 5'. A sequência no transcrito de RNA e sua polaridade são as mesmas da fita codificadora, exceto pelo fato de o U no transcrito substituir o T do gene; o nucleotídeo iniciador dos RNAs contém um 5'-trifosfato terminal (i.e., pppA-acima).

RNA mensageiro

Essa classe é a mais heterogênea em quantidade, tamanho e estabilidade; por exemplo, na levedura da cerveja, os mRNAs específicos estão presentes em centenas por célula para, em média, $\leq 0,1$ /mRNA/célula em uma população geneticamente homogênea. Como detalhado nos Capítulos 36 e 38, os mecanismos específicos de transcrição e pós-transcrição contribuem para essa grande faixa dinâmica em conteúdo de mRNA. Em células de mamíferos, a quantidade de mRNA provavelmente varia em uma faixa maior que 10^4 vezes. Todos os membros da classe funcionam como mensageiros que transportam a informação de um gene para a maquinaria sintetizadora de proteínas, onde cada mRNA funciona como um modelo em que uma sequência específica de aminoácidos é polimerizada para formar uma molécula de proteína específica, o último produto do gene (**Figura 34-9**).

Os mRNAs eucarióticos têm características químicas únicas. O terminal 5' do mRNA é “coberto por um capuz” de trifosfato de 7-metilguanósina, que está ligado a um 2'-O-metil ribonucleosídeo adjacente na sua porção 5' através de três fosfatos (**Figura 34-10**). As moléculas de mRNA frequentemente contêm 6-metiladenilatos internos e outros nucleotídeos 2'-O-ribose-metilados. O capuz está envolvido no reconhecimento do mRNA pela maquinaria de síntese de tradução, e também ajuda a estabilizá-lo, evitando o ataque de 5'-exonucleases. A maquinaria da síntese de proteína começa a tradução do mRNA em proteínas, começando do terminal 5', ou capeamento terminal, e seguindo a jusante na molécula. A outra extremidade da molécula de mRNA, o terminal 3'-hidroxil, está ligada a um polímero não geneticamente codificado de resíduos de adenilato, com 20 a 250 nucleotídeos de comprimento.

TABELA 34-1 Algumas espécies de RNAs pequenos estáveis encontradas em células de mamíferos

Nome	Comprimento (nucleotídeos)	Moléculas por célula	Localização
U1	165	1×10^6	Nucleoplasma
U2	188	5×10^5	Nucleoplasma
U3	216	3×10^5	Nucléolo
U4	139	1×10^5	Nucleoplasma
U5	118	2×10^5	Nucleoplasma
U6	106	3×10^5	Grânulos de pericromatina
4,5S	95	3×10^5	Núcleo e citoplasma
7SK	280	5×10^5	Núcleo e citoplasma

A “cauda” poli(A) no terminal 3'-hidroxil dos mRNAs mantém a estabilidade intracelular dos mRNAs específicos, evitando o ataque de 3'-exonucleases e facilitando a tradução (ver **Figura 37-7**). Alguns mRNAs, incluindo aqueles para algumas histonas, não contêm uma cauda poli(A). Tanto o “capuz” do mRNA quanto a “cauda poli(A)” são adicionados pós-transcrição por enzimas diretas, sem modelos, às moléculas precursoras de mRNA (pré-mRNA). O mRNA representa 2 a 5% do total de RNA celular de eucariotos.

Em células de mamíferos, incluindo as células humanas, as moléculas de mRNA presentes no citoplasma não são os produtos de RNA imediatamente sintetizados a partir de um modelo de DNA, mas devem ser formados por processamento a partir de pré-mRNA antes de penetrar no citoplasma. Assim, em núcleos de mamíferos, os produtos imediatos da transcrição do gene (transcritos primários) são muito heterogêneos, e podem ser de 10 a 50 vezes maiores que as moléculas de mRNA maduras. Como discutido no Capítulo 36, as moléculas de pré-mRNA são processadas para gerar as moléculas de mRNA que, então, entram no citoplasma para atuar como modelos para a síntese proteica.

RNA de transferência

As moléculas de tRNA variam em comprimento, de 74 a 95 nucleotídeos, e, como muitos outros RNAs, também são geradas por processamento nuclear de uma molécula precursora (ver Capítulo 36). As moléculas de tRNA funcionam como adaptadores para a tradução da informação na sequência de nucleotídeos do mRNA para aminoácidos específicos. Há pelo

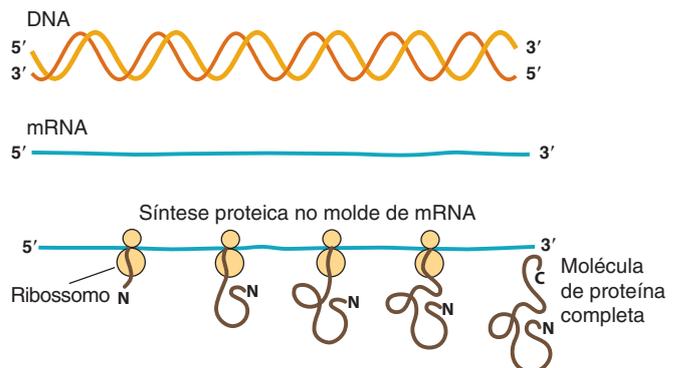


FIGURA 34-9 A expressão da informação genética do DNA na forma de um mRNA transcrito com polaridade 5'-3' é apresentada. O mRNA é posteriormente traduzido pelos ribossomos em uma molécula específica de proteína que também exibe uma polaridade N-terminal (N) para C-terminal (C).

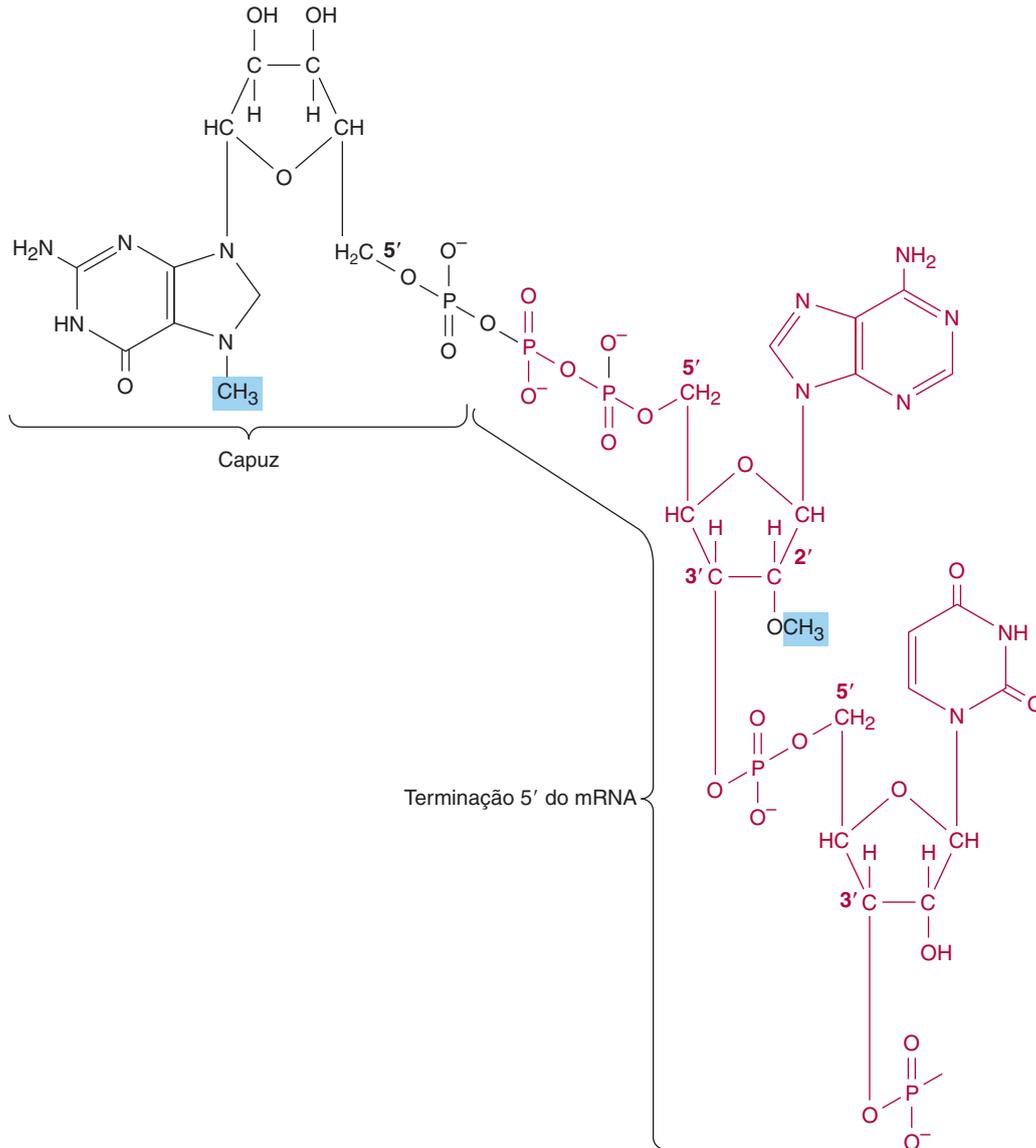


FIGURA 34-10 A estrutura do capuz preso ao terminal 5' da maioria das moléculas de mRNA de eucariotos. Um trifosfato de 7-metilguanosina (em preto) está ligado ao terminal 5' do mRNA (em vermelho), que geralmente também contém um nucleotídeo 2'-O-metilpurina. Estas modificações (o capuz e o grupo metil) são adicionadas após o mRNA ser transcrito a partir do DNA. Os γ e β -fosfatos do GTP adicionados para formar o capuz (em preto na figura) são perdidos após a adição do capuz, ao passo que o γ -fosfato do nucleotídeo iniciador (aqui um resíduo A; em vermelho na figura) é perdido durante a adição do capuz.

menos 20 espécies de moléculas de tRNA em cada célula, sendo que pelo menos uma (e, frequentemente, várias) corresponde a cada um dos 20 aminoácidos necessários para a síntese proteica. Embora cada tRNA específico seja diferente dos demais em sua sequência de nucleotídeos, as moléculas de tRNA, como uma classe, têm muitas características em comum. A estrutura primária – isto é, a sequência de nucleotídeos – de todas as moléculas de tRNA permite o dobramento extenso e a complementaridade entre as fitas para gerar uma estrutura secundária que aparece em duas dimensões, como uma folha de trevo (**Figura 34-11**).

Todas as moléculas de tRNA contêm quatro braços principais. O **braço acceptor** termina nos nucleotídeos CpCpA_{OH}. Esses três nucleotídeos são adicionados pós-transcrição por

uma enzima nucleotidiltransferase específica. O aminoácido adequado ao tRNA é ligado, ou “carregado”, para o grupo 3'-OH da parte A do braço acceptor (ver **Figura 37-1**). Os **D**, **T ψ C** e **braços extras** ajudam a definir um tRNA específico. Os tRNAs compõem cerca de 20% do RNA celular total.

RNA ribossomal

Um ribossomo é uma estrutura de nucleoproteína citoplasmática que atua como a maquinaria para a síntese de proteica a partir de modelos de mRNA. Nos ribossomos, as moléculas de mRNA e tRNA interagem para traduzir a informação transcrita no gene durante a síntese de mRNA em uma proteína específica. Nos períodos de síntese proteica ativa, muitos ribossomos

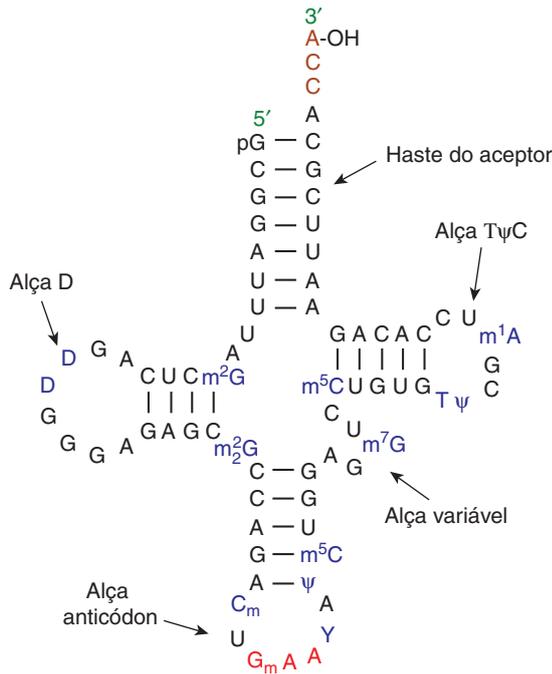


FIGURA 34-11 Representação linear de um tRNA, fenilalanina-tRNA de levedura. As linhas retas representam as ligações de hidrogênio intramoleculares (A—U; G—C) entre as bases. As três bases da alça anticódon são representadas em vermelho. Em um tRNA carregado, uma fração de aminoácido liga-se ao terminal 3'-CCA_{OH} (em marrom). Os tipos em azul destacam os nucleotídeos não tradicionais introduzidos por modificação pós-tradução, abreviados do seguinte modo: m²G, 2-metilguanósina; D, 5,6-di-hidroxuridina; m²G, N2-dimetilguanósina; C_m, O²-metilcitidina; G_m, O²-metilguanósina; T, 5-metiluridina; Y, vibutosina; j, pseudouridina; m⁵C, 5-metilcitidina; m⁷G, 7-metilguanósina; m¹A, 1-metiladenosina. Esta é uma ilustração pública retirada da Wikipedia.

podem ser associados a qualquer molécula de mRNA para formar um conjunto chamado de **polissomo** (ver Figura 37-7).

Os componentes dos ribossomos de mamíferos, que têm peso molecular de cerca de $4,2 \times 10^6$ e coeficiente de velocidade de sedimentação de 80S (**S**, unidades **Svedberg**, parâmetro sensível ao tamanho e ao formato molecular), são mostrados na **Tabela 34-2**. O ribossomo de mamíferos contém duas subunidades principais de nucleoproteínas – uma maior, com peso molecular de $2,8 \times 10^6$ (60S) e uma subunidade menor, com peso molecular de $1,4 \times 10^6$ (40S). A subunidade 60S contém um rRNA 5S, um rRNA 5,8S e um rRNA 28S; há também mais

de 50 polipeptídeos específicos. A subunidade 40S é menor e contém um único rRNA 18S e, aproximadamente, 30 cadeias de polipeptídeos diferentes. Todas as moléculas de rRNA, exceto o rRNA 5S, que é transcrito de maneira independente, são processadas a partir de uma única molécula precursora de RNA 45S, no nucléolo (ver Capítulo 36). As moléculas de rRNA altamente metiladas são acondicionadas no nucléolo com proteínas ribossomais específicas. No citoplasma, os ribossomos permanecem bastante estáveis e capazes de realizar vários ciclos de tradução. As funções exatas das moléculas de rRNA na partícula ribossomal não são completamente compreendidas, mas são necessárias para a montagem ribossomal e também desempenham papéis fundamentais na ligação dos mRNAs aos ribossomos e na sua tradução. Estudos recentes indicam que o componente maior de rRNA desempenha a atividade de peptidiltransferase e, portanto, é uma ribozima. Os rRNAs (28S + 18S) representam cerca de 70% do total de RNA celular.

RNA pequeno

Uma grande quantidade de RNAs pequenos, discretos e altamente conservados é encontrada nas células eucarióticas; alguns são bastante estáveis. A maior parte dessas moléculas está complexada com proteínas para formar as ribonucleoproteínas e está distribuída no núcleo, no citoplasma ou em ambos. Elas variam em tamanho de 20 a 1.000 nucleotídeos e estão presentes em 100.000 a 1.000.000 de cópias por célula, representando coletivamente $\leq 5\%$ do RNA celular.

RNAs nucleares pequenos

Os snRNAs, um subconjunto de pequenos RNAs (Tabela 34-1), estão significativamente envolvidos no processamento do rRNA e do mRNA e na regulação gênica. Dos diversos snRNAs, U1, U2, U4, U5 e U6 estão envolvidos na remoção de íntrons e no processamento de precursores de mRNA em mRNA (ver Capítulo 36). O snRNA U7 está envolvido na produção da extremidade 3' correta do mRNA da histona – sem uma cauda poli(A). O RNA 7SK associa-se a várias proteínas para formar um complexo de ribonucleoproteína, denominado P-TEFb, que modula o alongamento da transcrição do gene do mRNA pela RNA-polimerase II (ver Capítulo 36).

RNAs grandes e pequenos não codificadores reguladores: micro-RNAs (miRNAs), RNAs silenciadores (siRNAs) e RNAs não codificadores longos (lncRNAs)

Uma das descobertas mais animadoras e imprevistas da biologia reguladora eucariótica na última década foi a identificação

TABELA 34-2 Componentes dos ribossomos de mamíferos

Componente	Massa (MW)	Proteína		RNA		
		Número	Massa	Tamanho	Massa	Bases
Subunidade 40S	$1,4 \times 10^6$	33	7×10^5	18S	7×10^5	1.900
Subunidade 60S	$2,8 \times 10^6$	50	1×10^6	5S	$3,5 \times 10^4$	120
				5,8S	$4,5 \times 10^4$	160
				28S	$1,6 \times 10^6$	4.700

Nota: as subunidades ribossomais estão definidas de acordo com a velocidade de sedimentação em unidades Svedberg (S; 40S ou 60S). Estão listados o número de proteínas únicas e suas massas totais (MW), os componentes de RNA de cada subunidade em tamanho (unidades Svedberg), a massa e o número de bases.

e a caracterização de RNAs reguladores que não codificam proteínas (ncRNAs). Os ncRNAs existe em duas classes gerais de tamanho, grande (50 a 1.000 nt) e pequena (20 a 22 nt). Os ncRNAs reguladores foram descritos na maioria dos eucariotos (ver Capítulo 38).

Os **ncRNAs pequenos, chamados de miRNAs e siRNAs, normalmente inibem a expressão gênica** no nível da produção de proteínas específicas, por meio do direcionamento de mRNAs por um de vários mecanismos distintos. Os miRNAs são gerados por processamento nucleolítico específico dos produtos de genes distintos/unidades de transcrição (ver Figura 36-17). Os precursores de miRNAs, que têm capuz 5' e são 3'-poliadenilados, variam geralmente em tamanho de cerca de 500 a 1.000 nucleotídeos.

Por outro lado, os siRNAs são gerados por processamento nucleolítico específico de dsRNAs grandes, que podem ser produzidos a partir de outros RNAs endógenos ou a partir de dsRNAs introduzidos na célula, como o RNA viral. **Os siRNAs e os miRNAs normalmente hibridizam, por meio da formação da hibridização RNA-RNA com seus mRNAs alvos** (ver Figura 38-19). Até a presente data, já foram descritas centenas de miRNAs e siRNAs diferentes em seres humanos; as estimativas sugerem que existam cerca de 1.000 genes humanos codificadores de miRNA. Em função de sua primorosa especificidade genética, os miRNAs e os siRNAs representam interessantes novos **agentes potenciais para o desenvolvimento de fármacos terapêuticos**. Os siRNAs são frequentemente utilizados para diminuir ou realizar “*knock-down*” de níveis de proteínas específicas (por meio da degradação do mRNA dirigida por homologia ao siRNA) em contextos experimentais no laboratório, uma alternativa extremamente útil e poderosa para a tecnologia do nocaut genético (ver Capítulo 39). De fato, vários ensaios clínicos terapêuticos com base em siRNA estão em andamento para testar a eficácia dessas novas moléculas como fármacos para doenças humanas.

Outra interessante descoberta recente no âmbito do RNA é a identificação e a caracterização de **RNAs não codificadores longos, ou lncRNAs**. Os lncRNAs que, como indicado em seu nome, não codificam proteínas, variam de tamanho de cerca de 300 a milhares de nucleotídeos de comprimento. Esses RNAs são normalmente transcritos a partir de grandes regiões de genomas eucarióticos que não codificam proteínas (i.e., genes que codificam mRNA). De fato, a análise de transcriptomas indica que **> 90% de todo o DNA genômico eucariótico é transcrito**. Os ncRNAs perfazem uma porção significativa dessa transcrição. Os ncRNAs desempenham muitos papéis, que podem variar desde a contribuir para aspectos estruturais da cromatina até regular a transcrição gênica de mRNA pela RNA-polimerase II. Trabalhos futuros caracterizarão melhor essa importante e recentemente descoberta classe de moléculas de RNA.

Curiosamente, as bactérias também contêm RNAs reguladores, pequenos e heterogêneos, chamados de sRNAs. Os sRNAs bacterianos variam em tamanho de 50 a 500 nucleotídeos e, como os mi/si/lncRNAs de eucariotos, também controlam uma grande variedade de genes. Os sRNAs frequentemente reprimem, mas algumas vezes ativam, a síntese proteica, por meio da ligação a um mRNA específico.

NUCLEASES ESPECÍFICAS DIGEREM OS ÁCIDOS NUCLEICOS

As enzimas capazes de degradar os ácidos nucleicos foram identificadas há muitos anos. Estas nucleases podem ser classificadas de vários modos. As que exibem especificidade para o DNA são chamadas de **desoxirribonucleases**. As nucleases que hidrolisam especificamente o RNA são as **ribonucleases**. Algumas nucleases degradam tanto o DNA quanto o RNA. No interior de ambas as classes, as enzimas são capazes de clivar as ligações fosfodiéster internas para produzir tanto as terminações 3'-hidroxil e 5'-fosforil quanto as extremidades 5'-hidroxil e 3'-fosforil. Elas são chamadas de **endonucleases**. Algumas são capazes de hidrolisar ambas as fitas de uma molécula de **dupla-fita**, ao passo que outras podem apenas clivar **fitas simples** de ácidos nucleicos. Algumas nucleases podem hidrolisar apenas fitas simples não pareadas, ao passo que outras são capazes de hidrolisar fitas simples que participam na formação de uma molécula de dupla-fita. Existem classes de endonucleases que reconhecem sequências específicas no DNA; a maioria delas consiste em **endonucleases de restrição**, que são ferramentas importantes na genética molecular e nas ciências médicas. Uma lista com algumas das endonucleases de restrição atualmente reconhecidas é apresentada na Tabela 39-2.

Algumas nucleases são capazes de hidrolisar um nucleotídeo apenas quando ele está presente na extremidade de uma molécula; elas são chamadas de **exonucleases**. As exonucleases atuam apenas em uma direção (3' → 5' ou 5' → 3'). Em bactérias, uma exonuclease 3' → 5' é uma parte integrante da maquinaria de replicação do DNA e funciona nesse local para editar – ou revisar – os erros no pareamento das bases mais recentemente adicionadas ao desoxinucleotídeo.

RESUMO

- O DNA consiste em quatro bases – A, G, C e T – mantidas em um arranjo linear por ligações fosfodiéster, por meio das posições 3' e 5' de desoxirriboses adjacentes.
- O DNA está organizado em duas fitas pelo pareamento de bases A com T e G com C de fitas complementares. Essas fitas formam uma dupla-hélice em volta de um eixo central.
- Os 3×10^9 pb de DNA em seres humanos estão organizados em um complemento haploide de 23 cromossomos. A sequência exata desses 3 bilhões de nucleotídeos define a singularidade de cada indivíduo.
- O DNA fornece um modelo para sua própria replicação e, portanto, para a manutenção do genótipo e para a transcrição de cerca de 25 mil genes codificadores de proteínas humanas, bem como para uma grande matriz de RNAs reguladores que não codificam proteínas.
- O RNA existe em várias estruturas de fitas simples diferentes, a maior parte delas direta ou indiretamente envolvidas na síntese proteica ou em sua regulação. O arranjo linear de nucleotídeos no RNA consiste em A, G, C e U, e o açúcar é a ribose.
- As principais formas de RNA incluem mRNA, rRNA, tRNA e snRNAs e ncRNAs reguladores. Algumas moléculas de RNA agem como catalisadores (ribozimas).

REFERÊNCIAS

- Dunkle JA, Cate JH: Ribosome structure and dynamics during translation. *Annu Rev Biophys* 2010;39:227–244.
- Green R, Noller HF: Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* 1997;66:689–716.
- Guthrie C, Patterson B: Spliceosomal snRNAs. *Ann Rev Genet* 1988;22:387–419.
- Han J, Xiong J, Wang D, Fu XD: Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol* 2011;21:336–343.
- Keene JD: Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic acid. *Endocrinology* 2010;151:1391–1397.
- Moore M: From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 2005;309:1514–1518.
- Moore PB: How should we think about the ribosome? *Annu Rev Biophys* 2012;41:1–19.
- Narla A, Ebert BL: Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010;115:3196–3205.
- Phizicky EM, Hopper AK: tRNA biology charges to the front. *Genes Dev* 2010;24:1832–1860.
- Skalsky RL, Cullen BR: Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:123–141.
- Teng T, Thomas G, Mercer CA: Growth control and ribosomopathies. *Curr Opin Genet Dev* 2013;63–71.
- Wang G-S, Cooper TA: Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Rev Genetics* 2007;8:749.
- Watson JD, Crick FH: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737–738.
- Yang L, Froberg JE, Lee JT: Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci* 2014; 39:35–43.

Organização, replicação e reparo do DNA

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Observar que os cerca de 3×10^9 pares de bases de DNA que compõem o genoma humano haploide são divididos singularmente entre 23 unidades de DNA lineares, os cromossomos. Os seres humanos, sendo diploides, têm 23 pares de cromossomos: 22 autossomos e 2 cromossomos sexuais.
- Compreender que o DNA do genoma humano, se estendido de ponta a ponta, teria metros de comprimento, mas ainda assim cabe no interior do núcleo da célula, uma organela que tem apenas microns (μ ; 10^{-6} metros) de diâmetro. Essa condensação no comprimento do DNA é induzida após a sua associação com histonas, proteínas altamente carregadas positivamente, resultando na formação de um complexo DNA-histona único, denominado nucleossomo. Os nucleossomos contêm DNA enrolado em volta da superfície de um octâmero de histonas.
- Explicar que as cadeias de nucleossomos se formam ao longo de sequências lineares de DNA genômico para formar a cromatina que, por si só, pode ser mais fortemente embalada e condensada, o que, em última análise, leva à formação dos cromossomos.
- Reconhecer que os cromossomos são as unidades funcionais macroscópicas para a recombinação do DNA, ao passo que ordenação dos genes e divisão celular são funções do DNA, no nível dos nucleotídeos individuais, que compõe as sequências reguladoras ligadas a genes específicos, os quais são essenciais para a vida.
- Elucidar os estágios, as fases do ciclo celular e as moléculas responsáveis pela replicação, pelo reparo e pela recombinação do DNA, e compreender os efeitos negativos de erros em qualquer um desses processos sobre a integridade e a saúde celular e do organismo.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA*

A informação genética no DNA de um cromossomo pode ser transmitida por replicação exata ou pode ser trocada por meio de diversos processos, incluindo *crossing over*, recombinação, transposição e conversão. Isso fornece um meio de garantir adaptabilidade e diversidade ao organismo, mas quando esses processos não funcionam normalmente, pode também resultar em doenças. Diversos sistemas enzimáticos estão envolvidos

*Na medida do possível, a discussão neste capítulo e nos Capítulos 36, 37 e 38 será sobre mamíferos que, é claro, estão entre os eucariotos superiores. Às vezes, será necessário fazer referência a observações em organismos procarióticos, como bactérias e vírus, ou sistemas de modelos de eucariotes inferiores, como *Drosophila*, *C. elegans* ou leveduras. Entretanto, nesses casos, a informação será de um tipo capaz de ser extrapolada para mamíferos.

na replicação, na alteração e no reparo do DNA. As mutações se devem a mudança nas sequências de bases do DNA e podem resultar em replicação, movimento ou reparo do DNA incorreto e ocorrer com uma frequência de cerca de uma em cada 10^6 divisões celulares. As anormalidades nos produtos gênicos (seja no RNA, na função proteica ou na quantidade) podem resultar de mutações que ocorrem na codificação de proteínas transcritas e no DNA que não codifica proteínas ou na região reguladora não transcrita do DNA. Uma mutação em uma célula germinativa é transmitida para a prole (a chamada transmissão vertical de doença hereditária). Diversos fatores, incluindo vírus, substâncias químicas, raios ultravioleta e radiação ionizante, aumentam a taxa de mutação. As mutações frequentemente afetam as células somáticas e, assim, são transmitidas às gerações sucessivas de células, mas apenas no interior de um organismo (i.e., horizontalmente). Torna-se

evidente que várias doenças – e provavelmente a maioria dos cânceres – se devem aos efeitos combinados de transmissão vertical de mutações, bem como transmissão horizontal de mutações induzidas.

A CROMATINA É O MATERIAL CROMOSSÔMICO NOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS DE ORGANISMOS EUCARIÓTICOS

A **cromatina** consiste em **moléculas de DNA de dupla-fita (dsDNA)** muito longas e massa aproximadamente igual à de proteínas básicas muito pequenas, chamadas de **histonas**, bem como uma quantidade menor de **proteínas não histonas** (a maior parte delas é ácida e maior do que as histonas) e uma pequena quantidade de **RNA**. As proteínas não histonas incluem enzimas envolvidas na replicação e no reparo do DNA e as proteínas envolvidas na síntese, no processamento e no transporte de RNA para o citoplasma. A hélice do dsDNA em cada cromossomo tem um comprimento que é milhares de vezes o diâmetro do núcleo da célula. Um dos objetivos das moléculas que compõem a cromatina, particularmente as histonas, é o de condensar o DNA; entretanto, é importante observar que as histonas também participam integralmente na regulação dos genes (Capítulos 36, 38 e 42); de fato, as histonas contribuem, de forma importante, para a totalidade das operações moleculares direcionadas pelo DNA. Estudos de microscopia eletrônica da cromatina mostraram a presença de partículas esféricas densas, chamadas de **nucleossomos**, com aproximadamente 10 nm de diâmetro e conectadas por filamentos de DNA (**Figura 35-1**). Os nucleossomos são compostos por emaranhados de DNA em volta de um complexo octamérico de moléculas de histona.

As histonas são as proteínas mais abundantes da cromatina

As histonas são uma pequena família de proteínas básicas estreitamente relacionadas. As **histonas H1** são as que se ligam

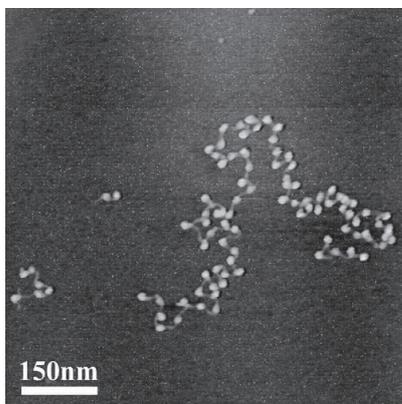


FIGURA 35-1 Eletromicrografia de nucleossomos (brancos, esféricos) presos a fitas de DNA (finas, linha cinza); ver também **Figura 35-2**. (Reproduzida, com permissão, de Shao Z: Probing nanometer structures with atomic force microscopy. *News Physiol Sci* 1999;14: 142–149. Cortesia do Professor Zhifeng Shao, University of Virginia.)

menos fortemente à cromatina (**Figuras 35-1, 35-2 e 35-3**) e são, portanto, facilmente removidas com uma solução salina, após a qual a cromatina se torna mais solúvel. A unidade organizacional dessa cromatina solúvel é o nucleossomo. **Os nucleossomos contêm quatro tipos principais de histonas: H2A, H2B, H3 e H4**. As estruturas de todas as quatro histonas – H2A, H2B, H3 e H4, as chamadas histonas do cerne que formam o nucleossomo – têm sido altamente conservadas entre as espécies, embora variantes dessas histonas existam e sejam utilizadas com fins especializados. Essa conservação extrema indica que a função das histonas é idêntica em todos os eucariotos, e que a molécula inteira está envolvida muito especificamente no exercício dessas funções. O terminal carboxila de dois terços das moléculas de histona é hidrofóbico, e o terminal amina de um terço das moléculas é particularmente rico em aminoácidos básicos. **Essas quatro histonas do cerne estão sujeitas a pelo menos seis tipos de modificações covalentes ou modificações pós-tradução (PTMs):** acetilação, metilação, fosforilação, ADP-ribosilação, monoubiquitinação e sumoilação. Essas modificações na histona desempenham um importante papel na estrutura e na função da cromatina, como ilustrado na **Tabela 35-1**.

As histonas interagem umas com as outras de maneiras muito específicas: **H3 e H4 formam um tetrâmero**, contendo duas moléculas de cada (H3-H4)₂, ao passo que **H2A e H2B formam dímeros** (H2A-H2B). Sob condições fisiológicas, esses oligômeros de histona se associam para formar o **octâmero de histona** da composição (H3-H4)₂-(H2A-H2B)₂.

O nucleossomo contém histona e DNA

Quando o octâmero de histona é misturado com dsDNA purificado sob condições iônicas adequadas, o padrão de difração formado no raio X é o mesmo observado em cromatinas recém-isoladas. Estudos bioquímicos e com microscopia eletrônica confirmam a existência de nucleossomos reconstituídos. Além disso, a reconstituição de nucleossomos a partir do

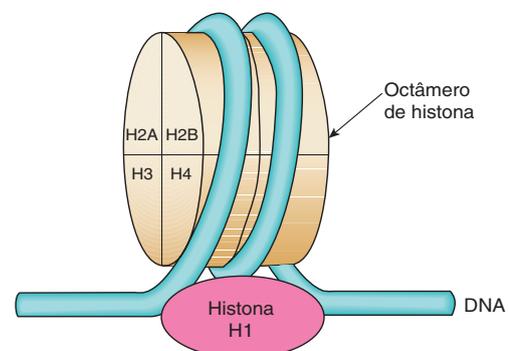


FIGURA 35-2 Modelo para a estrutura do nucleossomo, no qual o DNA está embrulhado em volta da superfície de um cilindro de proteína achatada consistindo em duas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam o octâmero de histona. Os cerca de 145 pb de DNA, consistindo em 1,75 volta super-helicoidal, estão em contato com o octâmero de histonas. A posição da histona H1, quando ela está presente, é indicada pelo contorno na parte inferior da figura. A histona H1 interage com o DNA à medida que ela entra e sai do nucleossomo.

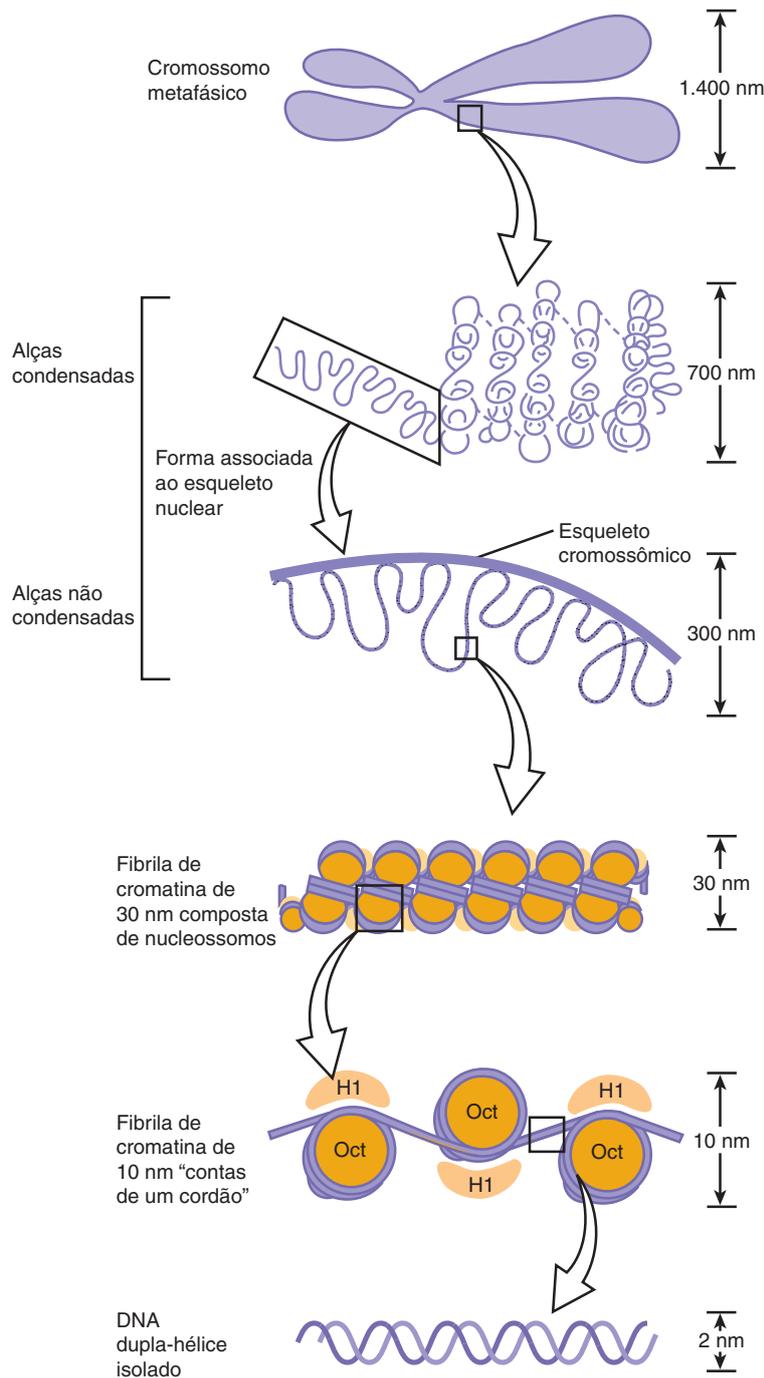


FIGURA 35-3 Apresentação do grau de compactação do DNA nos cromossomos metafásicos (parte superior) a partir da dupla-fita de DNA observada (parte inferior). O DNA cromossômico é compactado e organizado em vários níveis como mostrado (ver Tabela 35-2). Cada fase de condensação ou compactação e organização (de baixo para cima) diminui a acessibilidade geral do DNA ao ponto de as sequências de DNA nos cromossomos metafásicos serem quase totalmente inertes em termos de transcrição. Ao todo, esses cinco níveis de compactação resultam em diminuição do comprimento linear de aproximadamente 10^4 vezes de ponta a ponta. A condensação completa e a descompactação do DNA linear nos cromossomos ocorrem em um espaço de horas durante o ciclo celular replicativo normal (ver Figura 35-20).

DNA e das histonas H2A, H2B, H3 e H4 é independente da origem celular ou do organismo de seus vários componentes. Nem a histona H1 nem as proteínas não histonas são necessárias para a reconstituição do núcleo do nucleossomo.

No nucleossomo, o DNA é super-helicoidal, com uma hélice enrolada para a esquerda sobre a superfície de um octâmero

de histona em forma de disco (Figura 35-2). A maioria das proteínas histonas do cerne interage com o DNA no interior da super-hélice sem se projetar, embora se acredite que as caudas aminoterminais de todas as histonas se estendam para fora dessa estrutura e estejam disponíveis para as PTMs reguladoras (ver Tabela 35-1).

TABELA 35-1 Possíveis papéis das histonas modificadas

1. A acetilação das histonas H3 e H4 é associada à ativação ou à inativação da transcrição gênica.
2. A acetilação das histonas do cerne é associada à formação de cromossomos durante a replicação de DNA.
3. A fosforilação da histona H1 é associada à condensação dos cromossomos durante o ciclo de replicação.
4. A ADP-ribosilação das histonas é associada ao reparo do DNA.
5. A metilação das histonas é correlacionada à ativação e à repressão da transcrição gênica.
6. A monoubiquitinação é associada à ativação gênica, à repressão e ao silenciamento dos genes heterocromáticos.
7. A sumoilação das histonas (SUMO; modificador pequeno relacionado à ubiquitina) é associada à repressão da transcrição.

O tetrâmero (H3-H4)₂ pode, por si só, conferir propriedades semelhantes às do nucleossomo ao DNA e, portanto, desempenhar um papel central na formação do nucleossomo. A adição de dois dímeros H2A-H2B estabiliza a partícula primária e liga firmemente duas meias-voltas adicionais de DNA, previamente ligadas apenas frouxamente a (H3-H4)₂. Assim, as 1,75 voltas de DNA super-helicoidal são enroladas em torno da superfície do octâmero de histona, protegendo os 145 a 150 pb de DNA e formando a partícula do núcleo do nucleossomo (Figura 35-2). Na cromatina, **as partículas nucleares são separadas por uma região de aproximadamente 30 pb de DNA, denominada “ligadora”**. A maior parte do DNA está em uma série de repetições dessas estruturas, conferindo a aparência de contas de um cordão quando observadas por microscopia eletrônica (ver Figura 35-1).

A montagem dos nucleossomos *in vivo* é mediada por um dentre diversos fatores de montagem da cromatina nuclear, facilitados pelas chaperonas de histonas, um grupo de proteínas que exibe alta afinidade de ligação às histonas. À medida que o nucleossomo é montado, as histonas são liberadas das chaperonas. Os nucleossomos parecem ter preferência por certas regiões específicas das moléculas de DNA, mas a base dessa distribuição não aleatória, chamada de **faseamento**, ainda não foi completamente compreendida. O faseamento está provavelmente relacionado tanto à relativa flexibilidade física de sequências nucleotídicas específicas para acomodar as regiões de torção no interior da super-hélice, bem como à presença de outros fatores ligados ao DNA, que limitam os locais de deposição de nucleossomos.

ESTRUTURAS DE ORDEM SUPERIOR PROPORCIONAM A COMPACTAÇÃO DA CROMATINA

A microscopia eletrônica da cromatina revela duas ordens de estrutura superior – a fibrila de 10 nm e a fibra de cromatina de 30 nm – além daquela do próprio nucleossomo. A estrutura do nucleossomo é semelhante à de um disco, possuindo 10 nm de diâmetro e 5 nm de altura. A **fibrila de 10 nm** consiste em nucleossomos dispostos com suas bordas separadas por uma

pequena distância (30 pb de DNA) com suas faces planas paralelas ao eixo da fibrila (Figura 35-3). A fibrila de 10 nm é provavelmente supertorcida adicionalmente com seis ou sete nucleossomos por volta da super-hélice para formar a **fibra de cromatina de 30 nm** (Figura 35-3). Cada volta da super-hélice é relativamente plana, e as faces dos nucleossomos de voltas sucessivas seriam aproximadamente paralelas umas às outras. As histonas H1 parecem estabilizar a fibra de 30 nm, mas suas posições e a do espaçador de DNA de comprimento variável não são claras. É provável que os nucleossomos possam formar diversas estruturas compactadas. Para formar um cromossomo mitótico, a fibra de 30 nm deve ser compactada em comprimento outras 100 vezes (ver adiante).

Nos **cromossomos da interfase**, as fibras de cromatina parecem estar organizadas em **alças ou domínios** de 30.000 a 100.000 pb ancorados em um **esqueleto** (ou matriz de suporte) no interior do núcleo, a chamada **matriz nuclear**. No interior desses domínios, algumas sequências de DNA podem estar localizadas de modo não aleatório. Foi sugerido que cada volta ou domínio de cromatina corresponde a uma ou mais funções genéticas separadas, contendo tanto regiões codificadoras quanto não codificadoras do gene ou genes cognatos. Essa arquitetura nuclear é provavelmente dinâmica, tendo importantes efeitos reguladores sobre a regulação do gene. Dados recentes sugerem que certos genes ou regiões de genes são móveis no interior do núcleo, movendo-se obrigatoriamente para *loci* distintos no interior do núcleo a partir de ativação. Trabalhos adicionais determinarão quais são os mecanismos moleculares responsáveis.

ALGUMAS REGIÕES DA CROMATINA SÃO “ATIVAS” E OUTRAS SÃO “INATIVAS”

Em geral, cada célula de um organismo metazoário individual contém a mesma informação genética. Assim, as diferenças entre os tipos de células no interior de um organismo podem ser explicadas pela expressão diferenciada da informação genética comum. A cromatina que contém genes ativos (i.e., a cromatina ativa de modo transcricional ou potencialmente transcricional) mostrou-se diferente, de várias maneiras, daquelas de regiões inativas. A estrutura do nucleossomo de cromatina ativa parece estar alterada, algumas vezes de modo muito extenso, em regiões altamente ativas. O DNA na cromatina ativa contém grandes regiões (em torno de 100 mil bases de extensão) relativamente mais **sensíveis à digestão por uma nuclease**, como a DNase I. A DNase I faz cortes na fita simples em quase todo segmento de DNA (i.e., baixa especificidade de sequência). Ela digerirá o DNA que não estiver protegido ou ligado por uma proteína aos desoxinucleotídeos que o compõem. A sensibilidade à DNase I das regiões de cromatina ativa reflete apenas um potencial para a transcrição, em vez da transcrição em si, e em vários sistemas pode estar correlacionada a uma relativa perda de 5-metildesoxicitidina (meC) no DNA e em variantes de histonas particulares e/ou nas PTMs (fosforilação, acetilação, etc.; ver Tabela 35-1).

No interior de grandes regiões de cromatina ativa existem segmentos mais curtos de 100 a 300 nucleotídeos, que exibem sensibilidade ainda maior (outras 10 vezes) à DNase I. Esses **locais de hipersensibilidade** provavelmente resultam de uma conformação estrutural que favorece o acesso da nuclease ao DNA. Essas regiões são, com frequência, localizadas imediatamente a montante do gene ativo e são o local da estrutura nucleossômica interrompida, causada por uma ligação de proteínas não histonas que são fatores reguladores da transcrição (proteínas ativadoras transcricionais de ligação a estimuladores; ver Capítulos 36 e 38). Em muitos casos, parece que, se um gene é capaz de ser transcrito, ele com bastante frequência apresenta um local (ou locais) de hipersensibilidade à DNase I na cromatina do trecho imediatamente a montante. Como observado, as proteínas não histonas reguladoras envolvidas no controle da transcrição e as envolvidas na manutenção do acesso à fita-molde levam à formação de locais de hipersensibilidade. Esses locais muitas vezes fornecem a primeira pista sobre a presença e a localização de um elemento de controle da transcrição.

Em contrapartida, a cromatina inativa transcricionalmente é densamente compactada durante a interfase, como observado por estudos de microscopia eletrônica, e é chamada de **heterocromatina**; a cromatina ativa transcricionalmente cora menos densamente e é chamada de **eucromatina**. Em geral, a eucromatina é replicada mais cedo que a heterocromatina nos ciclos celulares dos mamíferos (ver a seguir). A cromatina nessas regiões de inatividade é, com frequência, alta no conteúdo de meC, e as histonas contêm níveis relativamente mais baixos de algumas modificações covalentes de “ativação” e níveis mais elevados de histonas PTMs de “repressão”.

Há dois tipos de heterocromatina: constitutiva e facultativa. A **heterocromatina constitutiva** está sempre condensada e, portanto, é essencialmente inativa. Ela é encontrada em regiões próximas ao centrômero cromossômico e nas extremidades cromossômicas (telômeros). A **heterocromatina facultativa** está, algumas vezes, condensada, mas outras vezes é transcrita ativamente e, portanto, não é condensada, sendo semelhante à eucromatina. Dos dois membros do par de cromossomos X de fêmeas de mamíferos, um cromossomo X é quase completamente inativo na transcrição e é heterocromático. Entretanto, o cromossomo X heterocromático descondensa durante a gametogênese e se torna ativo na transcrição no início da embriogênese – assim, ele é uma heterocromatina facultativa.

Certas células de insetos, por exemplo, de *Chironomus* e *Drosophila*, contêm cromossomos gigantes que foram replicados por ciclos múltiplos sem separação das cromátides-filhas. Essas cópias de DNA alinham-se lado a lado em um registro preciso e produzem um cromossomo com bandas que contêm regiões de cromatina condensada e bandas mais claras de cromatina mais solta. Regiões transcricionalmente ativas desses **cromossomos politênicos** são especialmente descondensadas em *puffs*, que podem conter as enzimas responsáveis pela transcrição e serem locais de síntese de RNA (**Figura 35-4**). Utilizando-se sondas de hibridização altamente sensíveis marcadas com fluorescência, sequências de genes específicas podem ser mapeadas, ou “pintadas”, no interior de núcleos de células humanas, mesmo sem a formação de cromossomos politênicos, utilizando técnicas de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência; ver Capítulo 39).

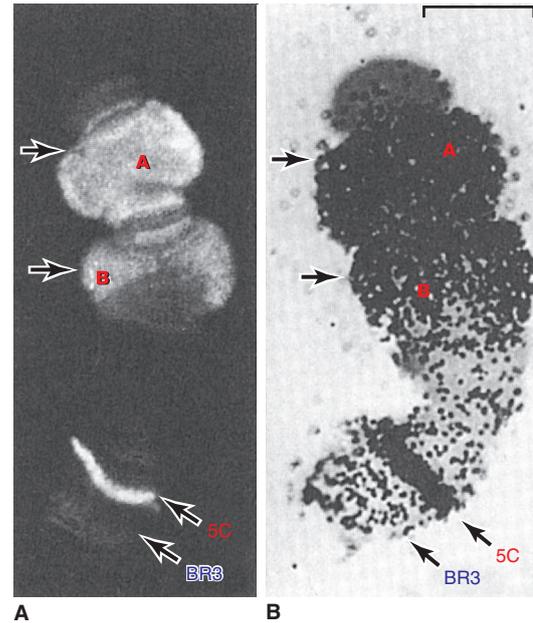


FIGURA 35-4 Ilustração da correlação estreita entre a presença da RNA-polimerase II (Tabela 36-2) e a síntese do RNA mensageiro. Vários genes, chamados de A, B (parte superior) e 5C, mas não os genes no locus (banda) BR3 (5C, BR3, parte inferior), são ativados quando larvas da mosca *Chironomus tentans* são submetidas a choque térmico (39°C por 30 minutos). **(A)** Distribuição da RNA-polimerase II no cromossomo IV isolado de glândula salivar (**nas setas**). A enzima foi detectada por imunofluorescência, utilizando um anticorpo marcado com fluorescência direcionado contra a polimerase. As áreas 5C e BR3 são bandas específicas do cromossomo IV, e as setas indicam *puffs*. **(B)** Autorradiografia de um cromossomo IV que foi incubado em ^3H -uridina para marcar o RNA. Observe a correspondência entre a imunofluorescência e a presença de RNA radioativo (pontos pretos). Bar, 7 mm. (Reproduzida, com permissão, de Sass H: RNA polymerase B in polytene chromosomes. Cell 1982;28:274. Copyright © 1982. Reimpressa, com permissão, de Elsevier).

O DNA É ORGANIZADO EM CROMOSSOMOS

Na metáfase, os **cromossomos** de mamíferos têm simetria dupla, com **cromátides-irmãs** idênticas duplicadas, conectadas no **centrômero**, cuja posição relativa é característica de um determinado cromossomo (**Figura 35-5**). O centrômero é uma região rica em adenina-timina (A-T) contendo sequências de DNA repetidas, que variam em tamanho de 10^2 (levedura de cerveja) a 10^6 (mamíferos) **pares de bases (pb)**. Os centrômeros dos metazoários estão presos por nucleossomos contendo a proteína variante de histona H3 CENP-A e outras proteínas específicas ligadoras de centrômero. Esse complexo, chamado de **cinetocoro**, fornece a âncora para o fuso mitótico. Assim, ele é uma estrutura essencial para a segregação cromossômica durante a mitose.

As extremidades de cada cromossomo contêm estruturas chamadas de **telômeros**. Os **telômeros consistem em repetições curtas ricas em TG**. Os telômeros humanos apresentam um número variável de repetições da sequência 5'-TTAGGG-3', que pode se estender por várias quilobases.

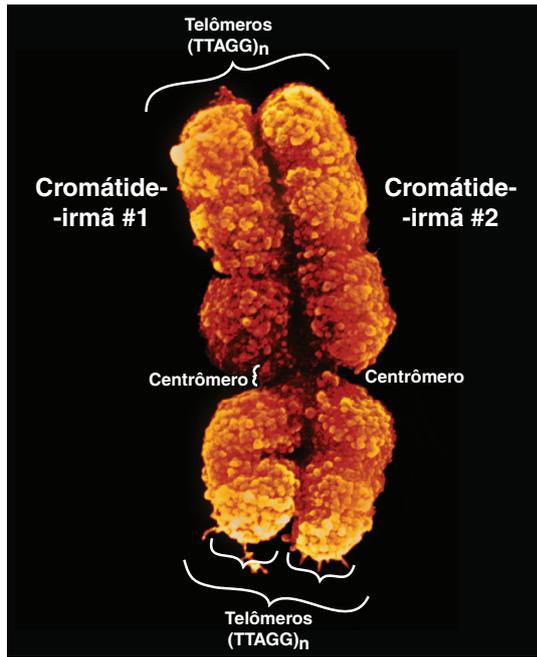


FIGURA 35-5 As duas cromátides-irmãs do cromossomo humano 12 em mitose. A localização da região do centrômero rica em A-T conectando as duas cromátides-irmãs é indicada, bem como dois dos quatro telômeros, encontrados nas extremidades das cromátides que se prendem uma à outra no centrômero. (Reimpressa, com permissão, de Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.)

A **telomerase**, subunidade múltipla contendo moldes de RNA, relacionada de maneira complexa à DNA-polimerase dependente de RNAs virais (transcriptases reversas), é a enzima responsável pela síntese telomérica e, portanto, por manter o comprimento do telômero. Como o encurtamento do telômero foi associado à transformação maligna e ao envelhecimento (ver Figura 54-7), essa enzima se tornou um alvo atraente para a quimioterapia do câncer e para o

TABELA 35-2 Proporções de empacotamento ou compactação de cada uma das ordens da estrutura de DNA

Forma da cromatina	Taxa de compactação
Dupla-hélice de DNA isolada	~ 1,0
Fibrilas de nucleossomos de 10 nm	7-10
Fibra de cromatina de 30 nm de nucleossomos super-helicoidais	40-60
Alças de cromossomo metafásico condensado	8.000

desenvolvimento de fármacos (ver Figura 55-17). Cada cromátide-irmã contém uma molécula de dsDNA. Durante a interfase, a condensação da molécula de DNA é menor do que a condensação do cromossomo durante a metáfase. Os cromossomos metafásicos são quase completamente inativos transcricionalmente.

O genoma haploide humano consiste em cerca de 3×10^9 pb e cerca de $1,7 \times 10^7$ nucleossomos. Assim, cada uma das 23 cromátides no genoma haploide humano conteria, em média, $1,3 \times 10^8$ nucleotídeos em uma molécula de dsDNA. Portanto, o comprimento de cada molécula de DNA deve ser comprimido cerca de 8 mil vezes para gerar a estrutura de um cromossomo metafásico condensado. Nos cromossomos metafásicos, as fibras de cromatina de 30 nm também são dobradas em uma série de **domínios em alça**, cujas porções proximais estão ancoradas na matriz nuclear, provavelmente por meio de interações com proteínas denominadas **lâminas**, que constituem **componentes integrais da membrana nuclear interna** no interior do núcleo (Figuras 35-3 e 49-4). As proporções de compactação de cada uma das ordens da estrutura do DNA estão resumidas na **Tabela 35-2**. A compactação das nucleoproteínas no interior da cromátide não é aleatória, como evidenciado por padrões característicos observados quando os cromossomos são corados com corantes específicos como a quinacrina ou a coloração de Giemsa (**Figura 35-6**).

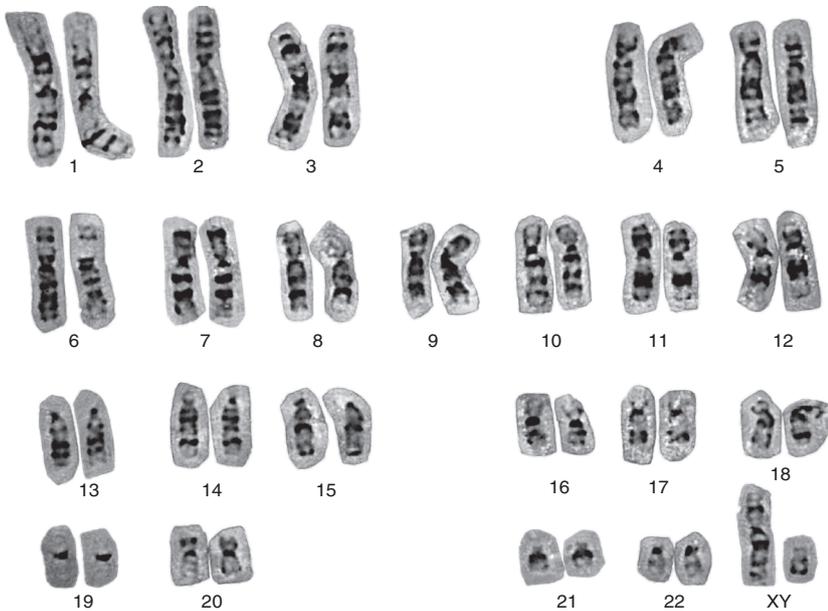


FIGURA 35-6 Cariótipo humano (de um homem com constituição normal 46, XY) no qual os cromossomos metafásicos foram corados pelo método de Giemsa e dispostos de acordo com a **Convenção de Paris**. (Reimpressa, com permissão, de H Lawce e F Conte).

De indivíduo para indivíduo em uma mesma espécie, o padrão de coloração (bandeamento) do complemento do cromossomo inteiro é altamente reproduzível; entretanto, ele difere significativamente entre espécies, mesmo entre as proximamente relacionadas. Assim, a compactação das nucleoproteínas nos cromossomos de eucariotos superiores deve ser, de algum modo, dependente de características específicas das moléculas de DNA de cada espécie.

Uma combinação de técnicas de coloração especializadas e de microscopia de alta resolução tem permitido aos citogeneticistas mapear com muita precisão vários genes para regiões específicas de cromossomos de ratos e de seres humanos. Com a elucidação recente das sequências dos genomas de ratos e de seres humanos (entre outros), ficou claro que muitos desses métodos de mapeamento visual eram notavelmente precisos.

Regiões de codificação são frequentemente interrompidas por sequências intervenientes

As **regiões codificadoras de proteínas no DNA**, cujas transcrições, em última análise, aparecem no citoplasma como moléculas únicas de mRNA, são geralmente **interrompidas no genoma eucariótico por grandes sequências intervenientes de DNA não codificador de proteína**. Conseqüentemente, os **transcritos primários do DNA, precursores de mRNA** (originalmente denominado **hnRNA**, uma vez que esse tipo de RNA era bastante heterogêneo em tamanho [comprimento] e praticamente restrito ao núcleo), contêm sequências

intervenientes não codificadoras de RNA que devem ser removidas em um processo que também une os segmentos de codificação adequados para formar um mRNA maduro. A maior parte das sequências codificadoras para um único mRNA é interrompida no genoma (e, portanto, no transcrito primário) por pelo menos uma – e, em alguns casos, por até 50 – sequências intervenientes não codificadoras (**íntrons**). Na maioria dos casos, os íntrons são muito maiores do que as regiões codificadoras (**éxons**). O processamento do transcrito primário, que envolve a remoção precisa de íntrons e o *splicing* de éxons adjacentes, é descrito no Capítulo 36.

A função das sequências intervenientes, ou íntrons, não está totalmente esclarecida. Entretanto, as moléculas precursoras de mRNA podem sofrer *splicing* de modo diferente, aumentando, portanto, o número de proteínas distintas (ainda relacionadas) produzidas por um único gene e seu correspondente transcrito gênico primário de mRNA. Os íntrons podem servir também para separar domínios funcionais (éxons) de informação codificadora, de modo a permitir a ocorrência mais rápida de rearranjo genético por recombinação do que se todas as regiões codificadoras para uma determinada função genética fossem contíguas. Tal proporção melhorada de rearranjo genético de domínios funcionais poderia permitir uma evolução mais rápida das funções biológicas. Em alguns casos, outros RNAs, codificadores ou não codificadores de proteínas, estão localizados no interior do DNA intrônico de alguns genes (ver Capítulo 34). As relações entre o DNA cromossômico, os agrupamentos de genes no cromossomo, a estrutura éxon-íntron dos genes e o produto final do mRNA estão ilustradas na **Figura 35-7**.

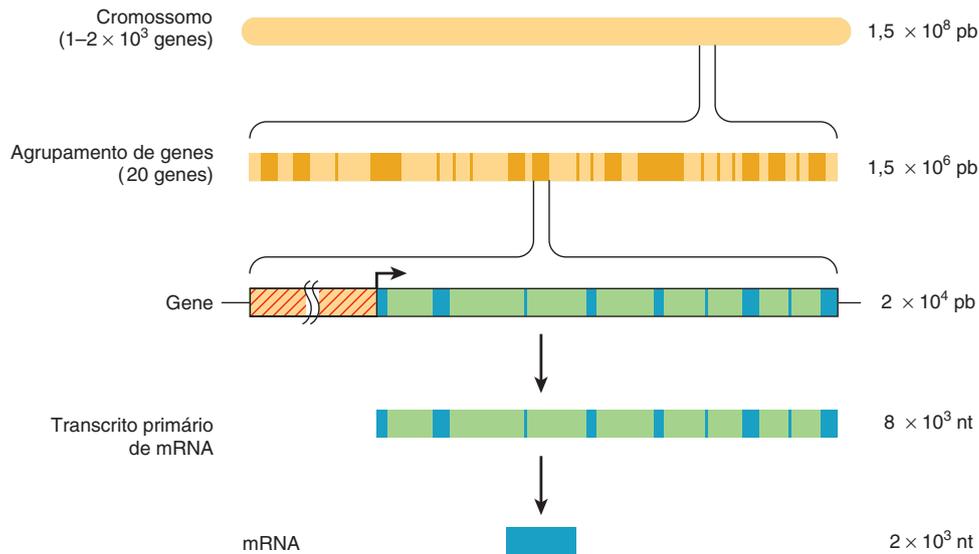


FIGURA 35-7 A relação entre DNA cromossômico e mRNA. O complemento do DNA haploide humano de 3×10^9 pb é distribuído não uniformemente entre os 23 cromossomos (ver Figura 35-6). Os genes estão, com frequência, reunidos em grupos nesses cromossomos. Um gene médio tem 2×10^4 pb de comprimento, incluindo a região reguladora (área hachurada de vermelho), a qual é, em geral, localizada na extremidade 5' do gene. A região reguladora é apresentada aqui como adjacente ao local de início da transcrição (seta). A maioria dos genes de eucariotos tem éxons e íntrons alternados. Neste exemplo, há nove éxons (áreas coloridas em azul) e oito íntrons (áreas coloridas em verde). Os íntrons são removidos do transcrito primário por meio de reações de processamento, e os éxons são ligados entre si em sequência para formar um mRNA maduro por um processo denominado *splicing* do RNA. (nt, nucleotídeos.).

A FUNÇÃO EXATA DE GRANDE PARTE DO GENOMA DE MAMÍFEROS NÃO É BEM COMPREENDIDA

O genoma haploide de cada célula humana consiste em 3×10^9 pb de DNA subdividido em 23 cromossomos. O genoma haploide completo contém DNA suficiente para codificar aproximadamente 1,5 milhão de genes de tamanho médio. Entretanto, estudos sobre as taxas de mutação e sobre a complexidade dos genomas dos organismos superiores sugerem fortemente que os seres humanos possuem significativamente menos de 100 mil proteínas codificadas por aproximadamente 1% do genoma humano, o qual é composto por DNA exônico. De fato, as estimativas atuais sugerem que existam 25 mil ou menos genes codificadores de proteínas em seres humanos. Isso implica que a maior parte do DNA é não codificador de proteína – isto é, sua informação nunca é traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma molécula de proteína. Certamente, uma parte das sequências de DNA em excesso serve para regular a expressão de genes durante o desenvolvimento, a diferenciação e a adaptação ao meio, servindo tanto como sítios de ligação para proteínas reguladoras quanto para a codificação de ncRNAs reguladores. Alguns excessos claramente constituem as sequências intervenientes ou íntrons que separam as regiões codificadoras dos genes, e outra porção dos excessos parece ser composta por muitas famílias de sequências repetidas para as quais ainda não foram definidas funções claras, embora alguns RNAs pequenos transcritos a partir dessas repetições possam modular a transcrição, tanto diretamente, pela interação com a maquinaria de transcrição, quanto indiretamente, afetando a atividade do molde de cromatina. Curiosamente o ENCODE Project Consortium (ver Capítulos 10 e 39) mostrou que a maioria das sequências genômicas foi realmente transcrita, ainda que em um nível baixo, e uma grande fração dessa transcrição parece gerar os lncRNAs (ver Capítulo 34). Pesquisas adicionais irão elucidar o(s) papel(éis) desempenhado(s) por esses transcritos.

O DNA em um genoma eucariótico pode ser dividido em diferentes “classes de sequências”. Elas são sequências únicas de DNA, ou sequências de DNA repetitivo e de DNA não repetitivo. No genoma haploide, a sequência única de DNA geralmente inclui os genes de cópia única que codificam proteínas. O DNA repetitivo no genoma haploide inclui sequências que variam em número de cópias de 2 até 10^7 por célula.

Mais da metade do DNA em organismos eucarióticos está em sequências únicas ou não repetitivas

Essa estimativa (e a distribuição do DNA de sequência repetitiva) se baseia em uma variedade de técnicas de hibridização de DNA-RNA e, mais recentemente, no sequenciamento direto do DNA. Técnicas semelhantes são utilizadas para estimar o número de genes ativos em uma população de DNA de sequência única. Na levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*, um eucarioto inferior), cerca de dois terços dos 6.200 genes são expressos, mas apenas cerca de um quinto é necessário para a viabilidade em condições de crescimento em laboratório.

Nos tecidos típicos de eucariotos superiores (p. ex., rins e fígado de mamíferos), entre 10.000 a 15.000 genes são ativamente expressos. É claro que diferentes combinações de genes são expressas em cada tecido, e a maneira como isso é realizado constitui uma das principais questões não respondidas em biologia.

No DNA humano, pelo menos 30% do genoma consistem em sequências repetitivas

O DNA de sequência repetitiva pode ser amplamente classificado como moderadamente repetitivo ou muito repetitivo. As sequências muito repetitivas consistem em 5 a 500 pares de bases de comprimento repetido várias vezes em sequência. Essas sequências estão geralmente agrupadas nos centrômeros e telômeros do cromossomo, e algumas estão presentes em cerca de 1 a 10 milhões de cópias por genoma haploide. A maioria dessas sequências é inativa transcricionalmente, e algumas desempenham função estrutural no cromossomo (Figura 35-5; ver Capítulo 39).

As sequências moderadamente repetitivas, que são definidas como estando presentes em um número de menos de 10^6 cópias por genoma haploide, não estão agrupadas, mas são intercaladas com sequências únicas. Em muitos casos, essas repetições longas intercaladas são transcritas pela RNA-polimerase II e contêm coberturas indistinguíveis daquelas do mRNA.

Dependendo do seu comprimento, as sequências moderadamente repetitivas são classificadas em **sequências repetitivas intercaladas longas (LINEs)** ou **sequências repetitivas intercaladas curtas (SINEs)**. Ambos os tipos parecem ser **retroposons**; isto é, elas surgiram a partir do movimento de um local para o outro (**transposição**) por meio de um intermediário de RNA, pela ação da transcriptase reversa que transcreve um molde de RNA em DNA. Os genomas de mamíferos contêm 20.000 a 50.000 cópias de LINEs de 6 a 7 kpb. Eles representam famílias de elementos repetitivos específicos de cada espécie. Os SINEs são mais curtos (70-300 pb), e podem existir mais de 100 mil cópias por genoma. Dos SINEs no genoma humano, uma família, a **família Alu**, está presente em cerca de 500 mil cópias por genoma haploide e representa cerca de 10% do genoma humano. Os membros da família humana Alu e seus análogos estreitamente relacionados em outros animais são transcritos como componentes integrais de precursores de mRNA, ou como moléculas de RNA discretas, incluindo os bem estudados RNA 4,5S e RNA 7S. Os membros dessa família particular são altamente conservados dentro de uma mesma espécie, bem como entre espécies de mamíferos. Os componentes das repetições intercaladas curtas, incluindo os membros da família Alu, podem ser elementos móveis, capazes de saltar para dentro e para fora de vários sítios no interior do genoma (ver a seguir). Esses eventos de transposição podem ter resultados desastrosos, como exemplificado pela inserção de sequências Alu em um gene que, quando sofre uma mutação, provoca a neurofibromatose. Além disso, os RNAs SINE Alu B1 e B2 parecem regular a produção de mRNA em níveis de transcrição e *splicing* de mRNA.

Sequências de repetição microssatélites

Uma categoria de sequências repetitivas existe tanto dispersa quanto agrupada em conjuntos de sequências. As sequências

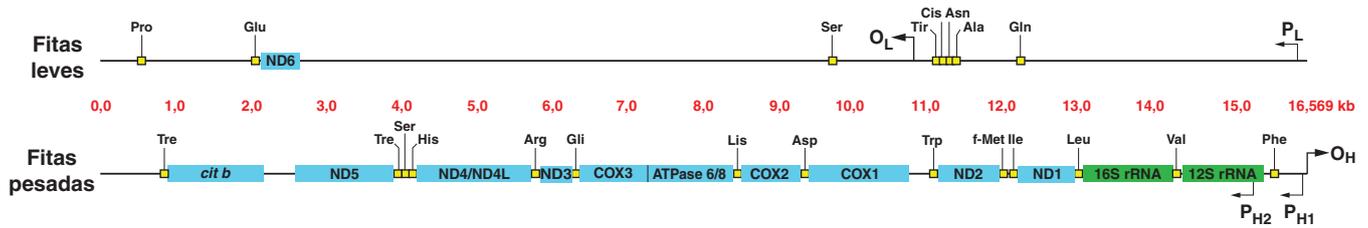


FIGURA 35-8 Mapas dos genes mitocondriais humanos. Os mapas representam as chamadas fitas leves (L; parte superior) e pesadas (H; parte inferior) de 16.569 pares de bases de DNA mitocondrial (mt) linearizado. Os mapas mostram os genes mt que codificam subunidades de NADH-coenzima Q oxidoreductase (ND1 até ND6), citocromo *c*-oxidase (COX1 até COX3), citocromo *b* (*cit b*), ATP-sintase (ATPase 6 e 8) e os rRNAs 12S e 16S mt ribossomais. Os RNAs de transferência (tRNAs) mt, que codificam genes, são destacados por pequenos quadrados amarelos e pelo código de 3 letras, que indica os aminoácidos cognatos especificados durante a tradução. A origem da replicação do DNA de fita pesada (O_H) e fita leve (O_L), bem como os promotores para iniciação da transcrição da fita pesada (P_{H1} e P_{H2}) e fita leve (P_L) são indicados por setas e letras (ver também Tabela 57-3). Figura gerada utilizando mitocôndria de *Homo sapiens*, genoma completo; sequência: NCBI referência NC_012920.1 e suas anotações.

consistem em 2 a 6 pb repetidas até 50 vezes. Essas **sequências microssatélites** são encontradas mais comumente como repetições de dinucleotídeos de AC em uma fita e TG na fita oposta, mas várias outras formas podem ocorrer, incluindo CG, AT e CA. As sequências repetitivas AC ocorrem em 50.000 a 100.000 locais no genoma. Em qualquer *locus*, o número dessas repetições pode variar nos dois cromossomos e, assim, fornecer heterozigiosidade no número de cópias de um número particular de microssatélites em um indivíduo. Este é um traço hereditário, e devido ao seu número e à facilidade de detectá-las utilizando a **reação em cadeia da polimerase (PCR)** (ver Capítulo 39), essas repetições são úteis na construção de mapas de ligação genética. A maior parte dos genes está associada a um ou mais marcadores microssatélites, assim, pode ser avaliada tanto a posição relativa dos genes nos cromossomos quanto a associação entre um gene e uma doença. Utilizando a PCR, um grande número de membros de uma família pode ser rapidamente rastreado para um determinado **polimorfismo de microssatélite**. A associação de um polimorfismo específico com um gene em membros de uma família afetada – e a ausência dessa associação em membros não afetados – pode ser a primeira pista sobre a base genética de uma doença.

Sequências de trinucleotídeos que aumentam em número (instabilidade de microssatélite) podem provocar doenças. A sequência repetitiva instável $(CGG)_n$ está associada à síndrome do X frágil. Outras repetições de trinucleotídeos que sofrem mutação dinâmica (geralmente, um aumento) estão associadas à coreia de Huntington (CAG), à distrofia miotônica (CTG), à atrofia muscular espinobulbar (CAG) e à doença de Kennedy (CAG).

UM POR CENTO DO DNA CELULAR ESTÁ NAS MITOCÔNDRIAS

A maioria dos polipeptídeos nas mitocôndrias (cerca de 54 de 67) é codificada por genes nucleares, ao passo que o restante é codificado por genes encontrados no DNA mitocondrial (mtDNA). A mitocôndria humana contém 2 a 10 cópias de moléculas de dsDNA circular pequeno de cerca de 16 kpb, que compreende aproximadamente 1% do total do DNA celular. Esse mtDNA codifica RNAs ribossomais e transportadores

específicos das mitocôndrias e também codifica 13 proteínas que desempenham papéis essenciais na cadeia respiratória (ver Capítulo 13). O mapa estrutural linearizado dos genes mitocondriais humanos é mostrado na **Figura 35-8**. Algumas das características do mtDNA são mostradas na **Tabela 35-3**.

Uma característica importante do mtDNA humano é que – como todas as mitocôndrias são fornecidas pelo óvulo durante a formação do zigoto – ele é transmitido por herança materna não mendeliana. Assim, em doenças que resultam de mutações no mtDNA, uma mãe afetada poderia, teoricamente, transmitir a doença para todas as suas crianças, mas apenas as suas filhas poderiam transmitir o traço. Entretanto, em alguns casos, deleções no mtDNA ocorrem durante a oogênese e, portanto, não são herdadas da mãe. Várias doenças já mostraram resultar de mutações no mtDNA. Elas incluem uma variedade de miopatias, doenças neurológicas e alguns casos de diabetes melito.

TABELA 35-3 Principais características do DNA mitocondrial humano

<ul style="list-style-type: none"> • É circular, dupla-fita e composto por cadeias ou fitas pesadas (H) e leves (L)
<ul style="list-style-type: none"> • Contém 16.569 pb
<ul style="list-style-type: none"> • Codifica 13 subunidades de proteínas da cadeia respiratória (de um total de cerca de 67). <ul style="list-style-type: none"> Sete subunidades da NADH-desidrogenase (complexo I) Citocromo <i>b</i> do complexo III Três subunidades da citocromo-oxidase (complexo IV) Dois subunidades da ATP-sintase
<ul style="list-style-type: none"> • Codifica RNAs ribossomais mt grandes (16S) e pequenos (12S)
<ul style="list-style-type: none"> • Codifica 22 moléculas de tRNA mt
<ul style="list-style-type: none"> • O código genético difere ligeiramente do código-padrão <ul style="list-style-type: none"> UGA (códon de término padrão) é lido como Trp AGA e AGG (códon padrão para Arg) são lidos como códon de término
<ul style="list-style-type: none"> • Contém poucas sequências não traduzidas
<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa de mutação (5-10 vezes mais do que a do DNA nuclear)
<ul style="list-style-type: none"> • Comparações das sequências de mtDNA fornecem evidência acerca das origens evolutivas de primatas e outras espécies.

Fonte: adaptada de Harding AE: Neurological disease and mitochondrial genes. Trends Neurol Sci 1991;14:132. Copyright © 1991. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.

O MATERIAL GENÉTICO PODE SER ALTERADO E REARRANJADO

Uma alteração na sequência de bases purínicas e pirimidínicas em um gene, em função de uma mudança – uma remoção ou uma inserção – de uma ou mais bases, pode resultar em um produto gênico alterado ou em uma alteração da expressão genica, se houver envolvimento do DNA que não codifica proteínas. Essa alteração no material genético leva a uma **mutação**, cujas consequências são discutidas em detalhes no Capítulo 37.

A recombinação cromossômica é um modo de rearranjar o material genético

A informação genética pode ser trocada entre cromossomos semelhantes ou homólogos. A troca, ou evento de **recombinação**, ocorre principalmente durante a meiose nas células de mamíferos e requer o alinhamento de cromossomos homólogos metafásicos, o que quase sempre ocorre com grande exatidão. Um processo de *crossing over* ocorre como mostrado na **Figura 35-9**. Isso geralmente resulta em uma troca igual e recíproca de informação genética entre cromossomos homólogos.

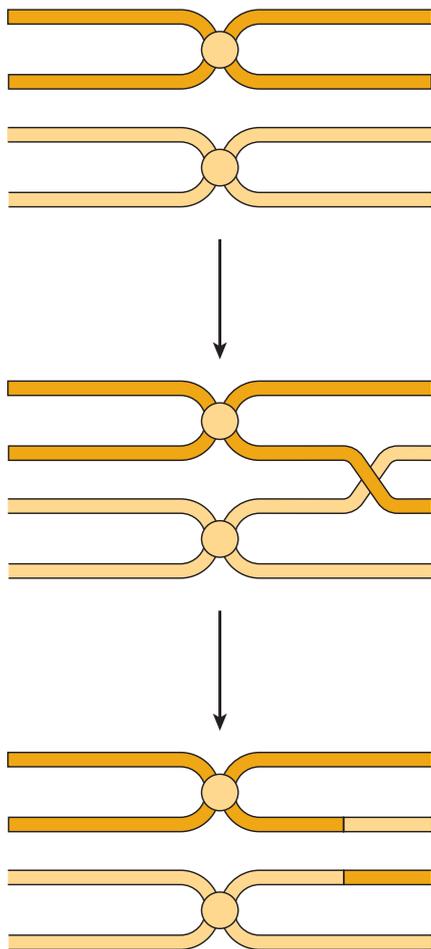


FIGURA 35-9 O processo de *crossing over* entre cromossomos homólogos metafásicos para gerar cromossomos recombinantes. Ver também Figura 35-12.

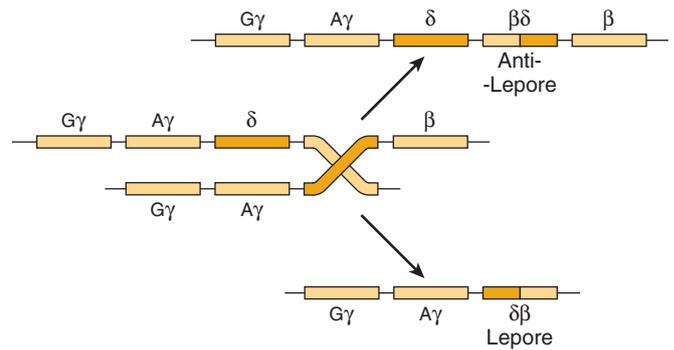


FIGURA 35-10 O processo de *crossing over* desigual na região do genoma de mamíferos que abriga os genes estruturais que codificam as hemoglobinas e a geração dos produtos recombinantes desiguais hemoglobina δ - β Lepore e β - δ anti-Lepore. Os exemplos fornecidos mostram as localizações das regiões de recombinação no interior das regiões codificadoras de aminoácidos dos genes indicados (i.e., genes das globinas β e δ). (Redesenhada e reproduzida, com permissão, de Clegg JB, Weatherall DJ: *b⁰ Thalassemia: time for a reappraisal?* Lancet 1974;2:133. Copyright © 1974. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.)

Se os cromossomos homólogos possuem alelos diferentes dos mesmos genes, a troca pode produzir diferenças genéticas perceptíveis e hereditárias. Em casos raros, em que o alinhamento de cromossomos homólogos não é exato, o *crossing over* ou o evento de recombinação pode resultar em uma troca de informação desigual. Um cromossomo pode receber menos material genético e, portanto, uma deleção, o outro parceiro do par de cromossomos recebe mais material genético e, assim, uma inserção ou duplicação (Figura 35-9). *Crossing over* desigual ocorre em seres humanos, como evidenciado pela existência de hemoglobinas chamadas de Lepore e anti-Lepore (**Figura 35-10**). Quanto mais distante estiver qualquer um dos dois genes em um cromossomo específico, maior a probabilidade de um evento de recombinação de *crossing over*. Essa é a base dos métodos de mapeamento genético. Um **crossing over desigual** afeta conjuntos de sequências de DNAs repetidos, sejam eles relacionados aos genes da globina, como na Figura 35-10, ou a DNAs repetitivos mais abundantes. Um *crossing over* desigual por um deslizamento no emparelhamento pode resultar em expansão ou contração no número de cópias de uma família repetida e pode contribuir para a expansão e a fixação de membros variantes em todo o conjunto repetido.

A integração cromossômica ocorre em alguns vírus

Alguns vírus de bactérias (bacteriófagos) são capazes de se recombinar com o DNA de um hospedeiro bacteriano de modo que a informação genética do bacteriófago é incorporada de maneira linear à informação genética do hospedeiro. Essa integração, a qual é uma forma de recombinação, ocorre por um mecanismo ilustrado na **Figura 35-11**. O esqueleto do genoma circular do bacteriófago é quebrado, assim como a molécula de DNA do hospedeiro; as extremidades adequadas são religadas com a polaridade correta. O DNA do bacteriófago é, de modo figurativo, esticado (“linearizado”) à medida que

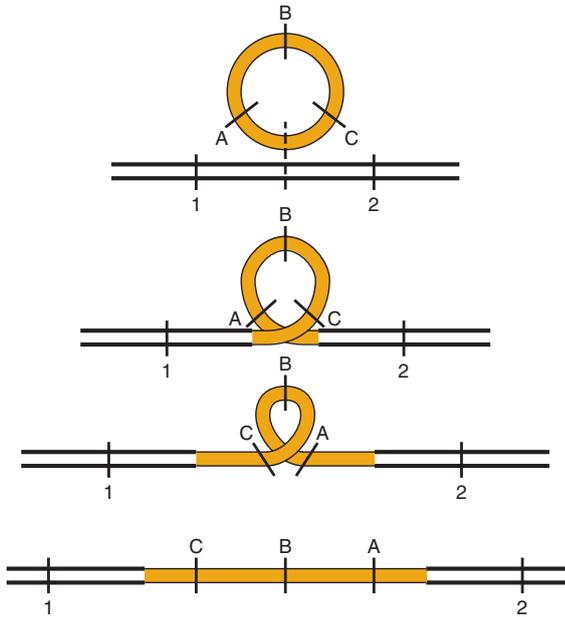


FIGURA 35-11 A integração de um genoma circular de um vírus (com genes A, B e C) na molécula de DNA de um hospedeiro (com genes 1 e 2) e a consequente ordenação dos genes.

é integrado a uma molécula de DNA bacteriano – frequentemente também um círculo fechado. O local em que o genoma do bacteriófago irá se reintegrar ou recombinar com o genoma bacteriano é escolhido por um de dois mecanismos. Se o bacteriófago contém uma sequência de DNA **homóloga** a uma sequência na molécula de DNA do hospedeiro, pode ocorrer um evento de recombinação análogo ao que acontece entre cromossomos homólogos. Entretanto, alguns bacteriófagos sintetizam proteínas que ligam sítios específicos dos cromossomos bacterianos a sítios **não homólogos** característicos da molécula de DNA do bacteriófago. A integração que ocorre nesse local é chamada de **sítio-específica**.

Muitos vírus de animais, em particular os vírus oncogênicos – direta ou indiretamente, no caso dos vírus de RNA, como o HIV que causa a Aids, seus transcritos de DNA gerados por ação de **DNA-polimerase dependente de RNA**, ou **transcriptase reversa** –, podem ser integrados nos cromossomos das células de mamíferos. A integração do DNA de um vírus animal ao genoma animal geralmente não é “sítio-específica”, porém apresenta preferência por locais.

A transposição pode produzir genes transformados

Em células eucarióticas, pequenos elementos de DNA que claramente não são vírus são capazes de autotransposição para dentro e para fora do genoma do hospedeiro de modo a afetar a função das sequências de DNA próximas. Esses elementos móveis, algumas vezes chamados de “DNAs saltadores”, ou genes saltadores, podem carregar regiões adjacentes de DNA e, portanto, afetar profundamente a evolução. Como mencionado, a família Alu de sequências moderadamente repetitivas de DNA tem características estruturais semelhantes às dos terminais

dos retrovírus, o que explicaria a capacidade destes últimos se moverem para dentro e para fora do genoma de mamíferos.

Evidências diretas para a transposição de outros elementos pequenos de DNA para o genoma humano foram fornecidas pela descoberta de **genes transformados** para moléculas de imunoglobulinas, moléculas de α -globinas e várias outras. Esses genes transformados consistem em sequências de DNA idênticas ou quase idênticas às do mRNA para o produto adequado do gene. Isto é, a região 5' não traduzida, a região codificadora sem representação de íntrons e a cauda 3' de poli(A) estão presentes contiguamente. Esse arranjo de sequência particular de DNA deve ter resultado de transcrição reversa de uma molécula de mRNA adequadamente transformada, da qual as regiões de íntrons foram removidas e a cauda poli(A) foi adicionada. O único mecanismo reconhecido que essa transcrição reversa poderia ter utilizado para se integrar ao genoma teria sido um evento de transposição. De fato, esses “genes transformados” apresentam repetições terminais curtas em cada extremidade, como as sequências transpostas conhecidas em organismos inferiores. Na ausência da transcrição e, portanto, da seleção gênica para função, muitos dos genes processados são aleatoriamente alterados por meio da evolução, de modo que, hoje, eles contêm códonos *sem sentido* que impossibilitam sua capacidade de codificar proteínas funcionais intactas (ver Capítulo 37), mesmo que possam ser transcritos. Assim, eles são chamados de **pseudogenes**.

A conversão gênica produz rearranjos

Além da recombinação e transposição desiguais, um terceiro mecanismo pode efetuar mudanças rápidas no material genético. Sequências semelhantes em cromossomos homólogos ou não homólogos podem, ocasionalmente, emparelhar e eliminar quaisquer sequências incompatíveis entre elas. Isso pode levar à fixação acidental de uma variante ou outra ao longo de uma família de sequências repetidas e, portanto, homogeneizar as sequências dos membros de famílias de DNAs repetitivos. Este último processo é chamado de **conversão do gene**.

Troca de cromátides-irmãs

Em organismos eucarióticos diploides, como os seres humanos, as células passam a ter um conteúdo tetraploide de DNA após a sua passagem pela fase S. Esse conteúdo se encontra na forma de cromátides-irmãs de pares de cromossomos (Figura 35-6). Cada uma dessas cromátides-irmãs contém informação genética idêntica, pois cada uma é produto da replicação semiconservativa da molécula parental original de DNA daquele cromossomo. O *crossing over* pode ocorrer entre essas cromátides-irmãs geneticamente idênticas. Naturalmente, essas **trocas de cromátides-irmãs** (Figura 35-12) não têm qualquer consequência genética desde que a troca resulte de um *crossing over* igual.

Rearranjo dos genes de imunoglobulinas

Em células de mamíferos, alguns interessantes rearranjos de genes ocorrem normalmente durante o desenvolvimento e a diferenciação. Por exemplo, os genes V_L e C_L , que codificam as porções variável (V_L) e conservada (C_L) da cadeia leve da



FIGURA 35-12 Trocas de cromátides-irmãs entre os cromossomos humanos. As trocas são detectáveis pela coloração de Giemsa dos cromossomos de células replicadas por dois ciclos na presença de bromodesoxiuridina. As setas indicam algumas regiões de troca. (Reimpressa, com permissão, de S Wolff e J Bodycote.)

imunoglobulina G (IgG) em uma única molécula de IgG (ver Capítulo 38), são amplamente separados no DNA da linhagem germinativa. No DNA de uma célula diferenciada produtora de IgG (plasma), os mesmos genes V_L e C_L foram aproximados fisicamente e ligados entre si no genoma em uma unidade única de transcrição. Entretanto, ainda assim, esse rearranjo de DNA durante a diferenciação não torna os genes V_L e C_L contíguos no DNA. Ao contrário, o DNA contém um íntron de aproximadamente 1.200 pb na ou próximo da junção das regiões V e C. Essa sequência intrônica é transcrita no RNA em conjunto com os éxons de V_L e C_L , e a informação da sequência de IgG não intrônica intercalada é removida do RNA durante seu processamento nuclear (ver Capítulos 36 e 38).

A SÍNTESE E A REPLICAÇÃO DO DNA SÃO RIGIDAMENTE CONTROLADAS

A principal função da replicação do DNA é fornecer descendência proveniente da informação genética dos pais. Assim, a replicação do DNA deve ser completa e realizada de modo a manter a estabilidade genética no interior do organismo e das espécies. O processo de replicação do DNA é complexo e envolve muitas funções celulares e vários procedimentos de verificação para garantir a fidelidade na replicação. Cerca de 30 proteínas estão envolvidas na replicação do cromossomo de *Escherichia coli*, e esse processo é mais complexo em organismos eucarióticos. As primeiras observações enzimológicas sobre a replicação do DNA foram feitas por Arthur Kornberg, que descreveu em *E. coli* a presença de uma enzima atualmente

TABELA 35-4 Etapas envolvidas na replicação de DNA em eucariotos

1. Identificação das origens da replicação
2. Desenrolamento do dsDNA direcionado pela hidrólise do ATP para fornecer um molde de ssDNA
3. Formação da forquilha de replicação; síntese do <i>primer</i> de RNA
4. Iniciação da síntese de DNA e alongamento
5. Formação de bolhas de replicação com a ligação dos segmentos de DNA recentemente sintetizados
6. Reconstituição da estrutura da cromatina

chamada de DNA-polimerase I. Essa enzima possui múltiplas atividades catalíticas, uma estrutura complexa e uma necessidade dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos de adenina, guanina, citosina e timina. A reação de polimerização catalisada pela DNA-polimerase I de *E. coli* serviu como protótipo para todas as DNA-polimerases tanto de procariotos quanto de eucariotos, embora seja atualmente reconhecido que a função principal dessa polimerase seja a de revisão e reparo.

Em todas as células, a replicação pode ocorrer apenas a partir de um molde de fita simples de DNA (ssDNA). Portanto, devem existir mecanismos que têm como alvo os sítios de iniciação de replicação e que desenrolem o dsDNA naquela região. O complexo de replicação deve então se formar. Depois que a replicação está completa nessa área, as fitas parentais e filhas devem voltar a formar o dsDNA. Em células eucarióticas, uma etapa adicional precisa ocorrer. O dsDNA deve voltar a formar a estrutura de cromatina, incluindo os nucleossomos, que existiam antes do início da replicação. Embora todo esse processo não seja completamente compreendido em células eucarióticas, a replicação tem sido descrita com bastante precisão em células procarióticas, e os princípios gerais são os mesmos em ambas. As principais etapas estão listadas na Tabela 35-4, ilustradas na Figura 35-13 e discutidas, em sequência, adiante. Algumas proteínas, a maioria com ação enzimática específica, estão envolvidas nesse processo (Tabela 35-5).

A origem da replicação

Na **origem da replicação (ori)**, há uma associação de proteínas de ligação de dsDNA de sequência específica com uma série de sequências de DNA de repetição direta. Em bacteriófagos λ , a $ori\lambda$ está ligada a uma proteína O, λ -codificada, em quatro sítios adjacentes. Em *E. coli*, a $oriC$ está ligada pela proteína $dnaA$. Em ambos os casos, um complexo é formado, consistindo em 150 a 250 pb de DNA e múltiplos de proteína ligada ao DNA. Isso leva à desnaturação local e ao desenrolamento de uma região adjacente do DNA rica em A+T. **Sequências de replicação autônomas (ARSs)** ou **replicadores**, funcionalmente semelhantes, foram identificados em células de leveduras. As ARSs contêm uma sequência um tanto degenerada de 11 pb, chamada de **elemento de origem da replicação (ORE)**. O ORE liga-se a um conjunto de proteínas, análogas à proteína $dnaA$ de *E. coli*, sendo o grupo de proteínas coletivamente chamado de **complexo de reconhecimento da origem (ORC)**. Os homólogos ORC foram encontrados em todos os

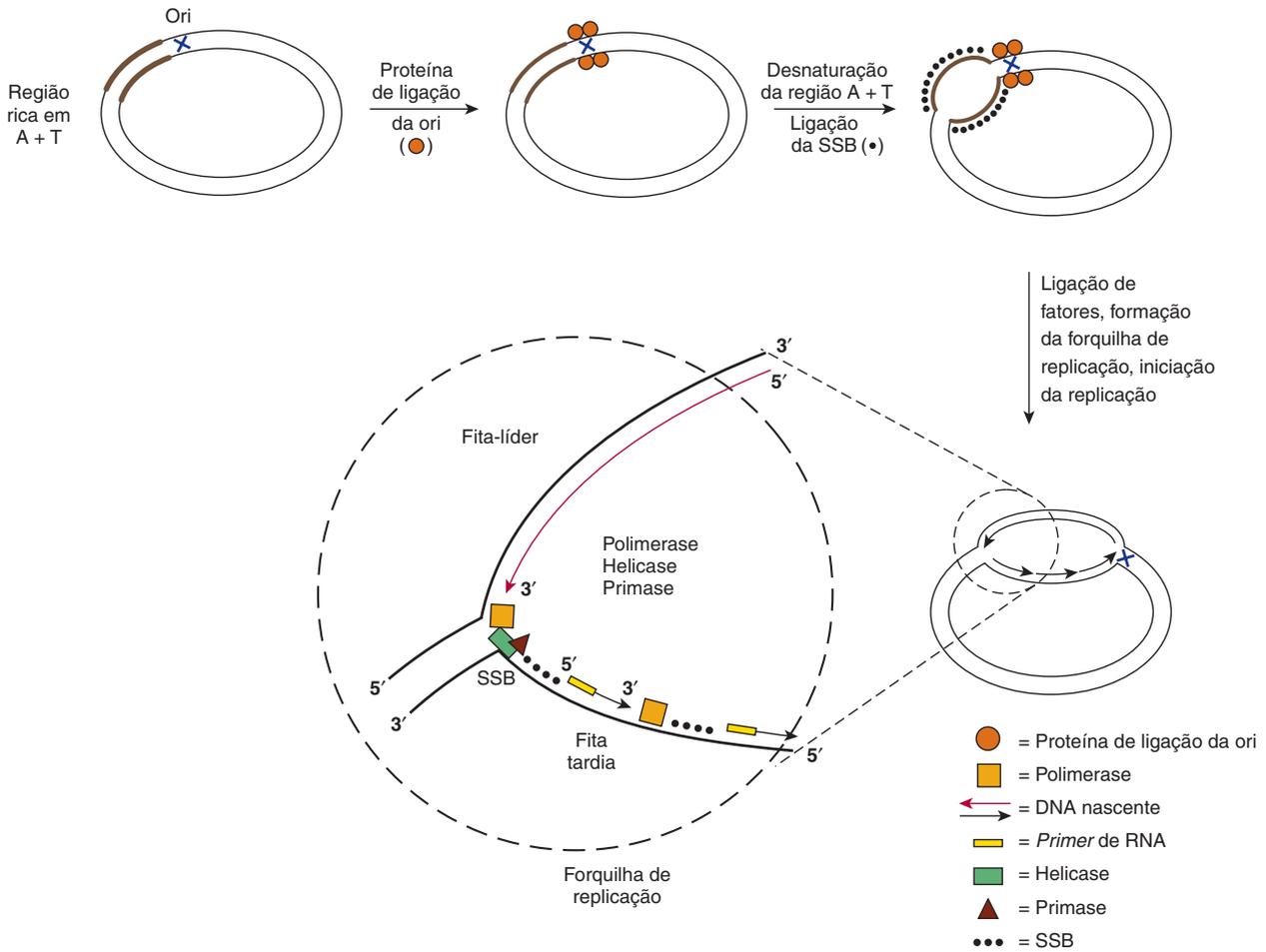


FIGURA 35-13 Etapas envolvidas na replicação de DNA. Esta figura descreve a replicação de DNA em uma célula de *E. coli*, porém as etapas gerais são semelhantes nos eucariotos. Uma interação específica da proteína (a proteína *dnaA*) à origem da replicação (*oriC*) resulta em desenrolamento local do DNA em uma região adjacente rica em A + T. Nessa região, o DNA é mantido em uma conformação de fita simples (ssDNA) por proteínas de ligação de fita simples (SSBs). Isso permite que várias proteínas, incluindo a helicase, a primase e a DNA-polimerase, liguem-se e iniciem a síntese de DNA. A forquilha de replicação procede à medida que a síntese de DNA ocorre continuamente (seta vermelha longa) na fita-líder e descontinuamente (setas pretas pequenas) na fita tardia. O DNA nascente é sempre sintetizado na direção 5' para 3', uma vez que as DNA-polimerases podem adicionar nucleotídeos apenas à extremidade 3' de uma fita de DNA.

TABELA 35-5 Classes de proteínas envolvidas na replicação

Proteína	Função
DNA-polimerase	Polimerização de desoxinucleotídeos
Helicase	Desenrolamento processual do DNA direcionado pelo ATP
Topoisomerase	Liberação da força de torção que resulta do desenrolamento induzido pela helicase
DNA-primase	Iniciação da síntese dos primers de RNA
Proteínas de ligação de fita simples (SSBs)	Impedimento do reanelamento prematuro do dsDNA
DNA-ligase	Fechamento do corte da fita simples entre a cadeia nascente e os fragmentos de Okazaki na fita tardia

eucariotos examinados. O ORE está localizado adjacente a uma sequência rica em A+T de aproximadamente 80 pb, que é fácil de desenrolar. Isso é chamado de **elemento de desenrolamento do DNA (DUE)**. O DUE é a origem da replicação em leveduras e está ligado ao complexo de proteínas MCM.

Sequências de consenso com estrutura semelhante ao ori ou à ARS não foram precisamente definidas nas células de mamíferos, embora várias das proteínas que participam no reconhecimento e na função de ori tenham sido identificadas e pareçam ser muito semelhantes aos seus congêneres de leveduras tanto na sequência quanto na função dos aminoácidos.

O desenrolamento do DNA

A interação de proteínas com a ori define o sítio de início da replicação e fornece uma região curta de ssDNA essencial para o início da síntese da fita de DNA nascente. Esse processo requer a formação de algumas interações proteína-proteína

e proteína-DNA. Uma etapa essencial é realizada por uma DNA-helicase que permite o processo de desenrolamento do DNA. Em *E. coli* não infectadas, essa função é realizada por um complexo de dnaB-helicases e pela proteína dnaC. As proteínas de ligação de DNA de fita simples (SSBs) estabilizam esse complexo. Em uma *E. coli* infectada por fagos λ , a proteína P do fago liga-se à dnaB e o complexo P/dnaB liga-se à ori λ por interação com a proteína O. A dnaB não é uma helicase ativa quando está no complexo P/dnaB/O. Três proteínas de choque térmico de *E. coli* (dnaK, dnaJ e GrpE) cooperam para remover a proteína P e ativar a dnaB-helicase. Em cooperação com a SSB, isso leva ao desenrolamento do DNA e à replicação ativa. Desse modo, a replicação do fago λ é realizada à custa da replicação da célula hospedeira de *E. coli*.

Formação da forquilha de replicação

A forquilha de replicação consiste em quatro componentes que se formam na seguinte sequência: (1) a DNA-helicase desenrola um segmento curto de um DNA dúplice parental; (2) uma primase inicia a síntese de uma molécula de RNA que é essencial para o *priming* da síntese de DNA; (3) a DNA-polimerase inicia a síntese da fita-filha nascente; e (4) as SSBs ligam-se ao ssDNA e evitam a combinação prematura do ssDNA ao dsDNA. Essas reações estão ilustradas na Figura 35-13.

A enzima DNA-polimerase III (o produto do gene *dnaE* em *E. coli*) liga-se ao molde de DNA como parte de um complexo multiproteico que consiste em vários fatores acessórios de polimerases (β , γ , δ , δ' e τ). As DNA-polimerases apenas sintetizam o DNA na direção 5'-3', e somente um dos vários tipos diferentes de polimerases está envolvido na forquilha de replicação. Como as fitas de DNA são antiparalelas (ver Capítulo 34), a polimerase funciona de forma assimétrica. Na **fita-líder (para a frente)**, o DNA é sintetizado continuamente. Na **fita tardia (retrógrada)**, o DNA é sintetizado em fragmentos curtos (1-5 kb; ver Figura 35-16), chamados de **fragmentos de Okazaki**, assim denominados em homenagem ao cientista que os descobriu. Vários fragmentos de Okazaki (até mil) devem ser sequencialmente sintetizados para cada forquilha de replicação. Para garantir que isso ocorra, a helicase atua na fita tardia para desenrolar o dsDNA na direção 5'-3'. A helicase associa-se à primase, a fim de proporcionar o acesso adequado desta última ao molde. Isso permite que o *primer* de RNA seja feito e que, por sua vez, a polimerase inicie a replicação do DNA. Essa é uma sequência de reação importante, uma vez que as DNA-polimerases não podem iniciar a síntese de DNA *de novo*. O complexo móvel entre a helicase e a primase foi chamado de **primossomo**. À medida que a síntese de um fragmento de Okazaki se completa e a polimerase é liberada, um novo *primer* é sintetizado. A mesma molécula de polimerase permanece associada à forquilha de replicação e passa a sintetizar o novo fragmento de Okazaki.

O complexo DNA-polimerase

Algumas moléculas de DNA-polimerase estão envolvidas na replicação do DNA. Elas compartilham três propriedades importantes: (1) **alongamento da cadeia**, (2) **processividade** e (3) **revisão**. O alongamento da cadeia é responsável

TABELA 35-6 Uma comparação das DNA-polimerases de procariotos e eucariotos

<i>E. coli</i>	Eucariotos	Função
I		Preenchimento de lacunas após a replicação, o reparo e a recombinação do DNA
II		Revisão e reparo do DNA
	β	Reparo do DNA
	γ	Síntese do DNA mitocondrial
III	ϵ	Processividade, síntese da fita-líder
DnaG	α	Primase
	δ	Processividade, síntese da fita tardia

pela razão (em **nucleotídeos por segundo; nt/s**) com que a polimerização ocorre. A processividade é uma expressão do número de nucleotídeos adicionados à cadeia nascente antes que a polimerase se separe do molde. A função de revisão é a identificação de erros nas cópias e sua subsequente correção. Em *E. coli*, a DNA-polimerase III (pol III) funciona na forquilha de replicação. De todas as polimerases, ela catalisa a maior taxa de alongamento de cadeia e é a mais ativa na processividade. Ela é capaz de polimerizar 0,5 Mb de DNA em um ciclo da fita-líder. Pol III é um grande complexo (> 1 MDa) de multissubunidades de proteínas em *E. coli*. A DNA-pol III associa-se a duas subunidades β idênticas do “grampo” deslizante de DNA; essa associação aumenta drasticamente a estabilidade do complexo de DNA-pol III, a processividade (de 100 para mais de 50 mil nucleotídeos) e a taxa de alongamento da cadeia (20-50 nt/s), gerando o alto grau de processividade que a enzima apresenta.

A polimerase I (pol I) e a polimerase II (pol II) estão envolvidas principalmente na revisão e no reparo do DNA. As células eucarióticas possuem congêneres para cada uma dessas enzimas, além de um grande número de polimerases adicionais envolvidas principalmente no reparo do DNA. Uma comparação é mostrada na **Tabela 35-6**.

Em células de mamíferos, a polimerase é capaz de polimerizar em um ritmo um pouco mais lento do que a taxa de polimerização de nucleotídeos pelo complexo DNA-polimerase bacteriano. Esse ritmo diminuído pode ser o resultado da interferência de nucleossomos.

Iniciação e alongamento da síntese de DNA

A iniciação da síntese de DNA (**Figura 35-14**) necessita de um **priming por um RNA de comprimento curto**, de cerca de 10 a 200 nucleotídeos de comprimento. Em *E. coli*, ele é catalisado por uma dnaG (primase); em eucariotos, a DNA-pol α sintetiza esses *primers* de RNA. O processo de *priming* envolve um ataque nucleofílico pelo grupo 3'-hidroxil do *primer* de RNA no fosfato do primeiro desoxinucleosídeo trifosfato que entra (*N* na Figura 35-14), com a quebra do pirofosfato; essa transição para a síntese de DNA é catalisada por DNA-polimerases adequadas (DNA-pol III em *E. coli*; DNA-pol δ e ϵ em eucariotos). Então, o grupo 3'-hidroxil do recentemente ligado desoxirribonucleosídeo monofosfato fica livre para

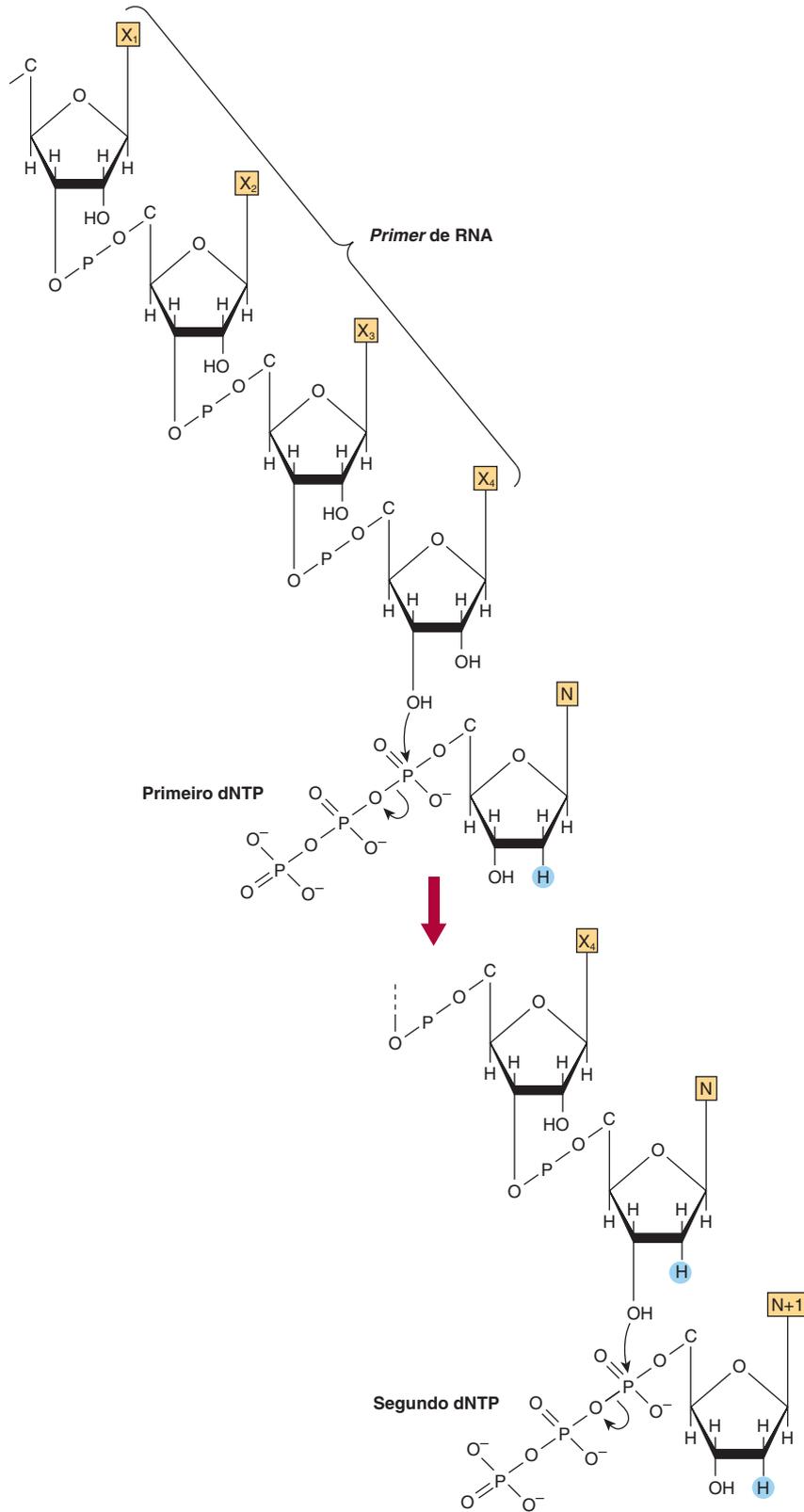


FIGURA 35-14 A iniciação da síntese de DNA a partir de um *primer* de RNA e a subsequente ligação do segundo desoxirribonucleosídeo trifosfato.

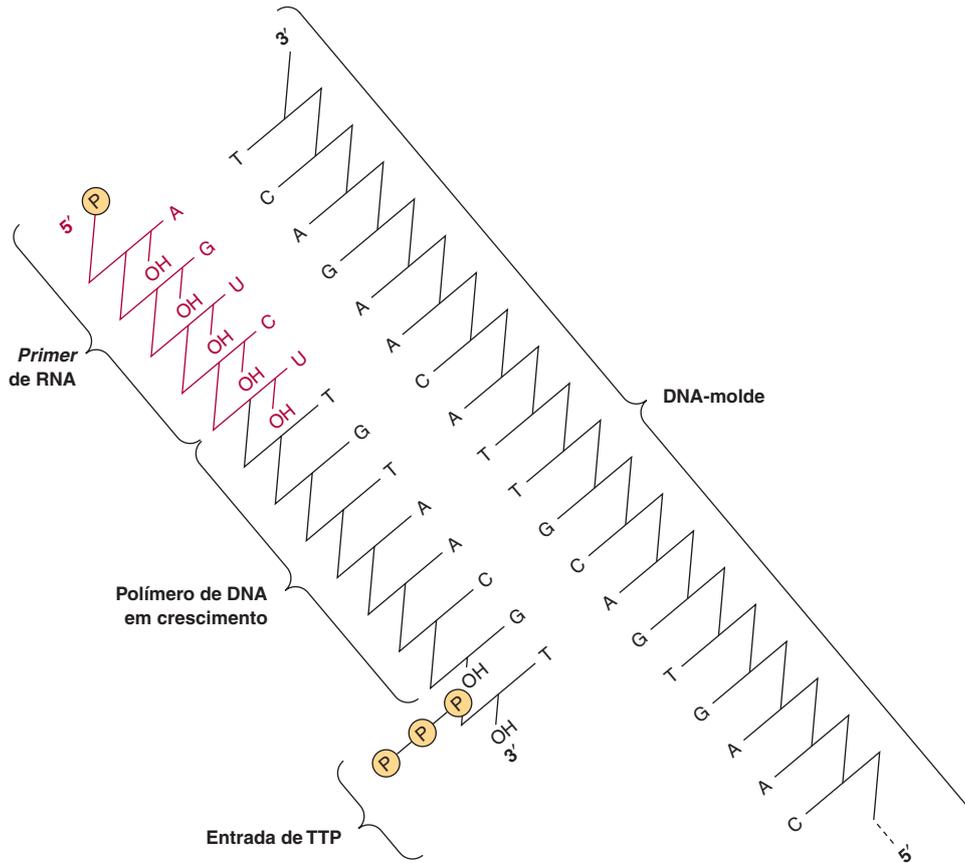


FIGURA 35-15 A síntese do DNA a partir do *primer* de RNA mostrando a função de molde da fita complementar do DNA parental.

realizar o **ataque nucleofílico** no próximo desoxirribonucleosídeo trifosfato que entrar ($N + 1$ na Figura 35-14), mais uma vez no seu radical fosfato α com a quebra do pirofosfato. É claro que a seleção do desoxirribonucleotídeo adequado, cujo grupo 3'-hidroxil terminal deve ser atacado, é dependente de um **pareamento adequado de bases com outra fita** da molécula de DNA, de acordo com as regras de pareamento de bases de Watson e Crick (**Figura 35-15**). Quando um radical adenina desoxirribonucleosídeo monofosforilado está na posição de molde, uma timidina-trifosfato entrará, e seu fosfato α será atacado pelo grupo 3'-hidroxil de desoxirribonucleosídeo monofosforilado mais recentemente adicionado ao polímero. Por esse processo em etapas, o molde determina

qual desoxirribonucleosídeo trifosfato é complementar e, através de ligações de hidrogênio, mantém-no em seu lugar, ao passo que o grupo 3'-hidroxil da fita em crescimento ataca e incorpora os novos nucleotídeos no polímero. Esses segmentos de DNA ligados a um componente de RNA iniciador são os **fragmentos de Okazaki** (**Figura 35-16**). Em mamíferos, após a geração de muitos fragmentos de Okazaki, o complexo de replicação começa a remover os *primers* de RNA, a fim de preencher as lacunas deixadas por sua remoção com os pares de bases de desoxinucleotídeos adequados e, em seguida, religar os fragmentos do DNA recém-sintetizado. Para que isso ocorra, são empregadas as enzimas chamadas de **DNA-ligases**.

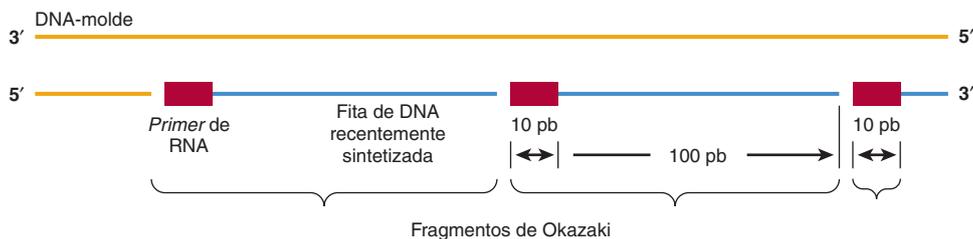


FIGURA 35-16 A polimerização descontínua de desoxirribonucleotídeos na fita tardia; a formação dos fragmentos de Okazaki durante a síntese de DNA na fita tardia é ilustrada. Os fragmentos de Okazaki possuem 100 a 250 nucleotídeos de comprimento em eucariotos e 1.000 a 2.000 nucleotídeos em procaríotos.

A replicação exibe a polaridade

Como já foi mencionado, as moléculas de DNA são de dupla-fita e as duas fitas são antiparalelas. A replicação do DNA em procariotos e eucariotos ocorre em ambas as fitas simultaneamente. Entretanto, uma enzima capaz de polimerizar o DNA na direção 3'-5' não existe em nenhum organismo, de modo que ambas as fitas de DNA recém-duplicadas não podem crescer na mesma direção de maneira simultânea. No entanto, em bactérias, a mesma enzima replica ambas as fitas ao mesmo tempo (em eucariotos, Pol ϵ e Pol δ catalisam a síntese da fita-líder e da fita tardia; ver Tabela 35-6). A única enzima replica uma fita ("fita-líder") de modo contínuo na direção 5'-3', com a mesma orientação geral para adiante. Ela replica a outra fita ("fita tardia") descontinuamente enquanto polimeriza os nucleotídeos em surtos curtos de 150 a 250 nucleotídeos, mais uma vez na direção 5'-3', mas ao mesmo tempo está voltada para a extremidade traseira do *primer* de RNA precedente, em vez de voltada para a porção não replicada. Esse processo de **síntese semidescontínua de DNA** é mostrado esquematicamente nas Figuras 35-13 e 35-16.

Formação de bolhas de replicação

A replicação de um cromossomo bacteriano circular, composto por aproximadamente 5×10^6 pb de DNA, ocorre a partir de uma única ori. Esse processo termina em cerca de 30 minutos, com velocidade de replicação de 3×10^5 pb/min. O genoma completo de um mamífero replica em aproximadamente 9 horas, o tempo médio necessário para a formação de um genoma tetraploide a partir de um genoma diploide em uma célula replicadora. Se um genoma de mamífero (3×10^9 pb) fosse replicado na mesma proporção que o de uma bactéria (i.e., 3×10^5 pb/min), mas a partir de uma única ori, a replicação levaria mais de 150 horas. Os organismos metazoários contornam esse problema utilizando duas estratégias. Primeiro, a replicação é bidirecional. Segundo, a replicação ocorre a partir de origens múltiplas em cada cromossomo (um total de até 100 em seres humanos). Assim, a replicação ocorre em ambas as direções ao longo de todos os cromossomos, e ambas as fitas são replicadas simultaneamente. Esse processo de replicação gera **bolhas de replicação** (Figura 35-17).

Os múltiplos sítios de ori que servem como origens para a replicação do DNA em eucariotos são pouco definidos, exceto em alguns vírus de animais e em leveduras. Entretanto,

está claro que a iniciação é regulada tanto espacial quanto temporalmente, uma vez que grupos de sítios adjacentes iniciam a replicação simultaneamente. O disparo da replicação, ou o início da replicação do DNA em um replicador/ori, é influenciado por algumas propriedades distintas da estrutura da cromatina que estão apenas começando a ser compreendidas. É evidente, entretanto, que há mais replicadores e ORC em excesso do que o necessário para replicar o genoma de mamíferos no tempo de uma fase S típica. Portanto, devem existir mecanismos que controlem o excesso de replicadores ligados ao ORC. A compreensão do controle da formação e do disparo de complexos de replicação é um dos principais desafios nesse campo.

Durante a replicação do DNA, deve haver uma separação das duas fitas para permitir que cada uma sirva como molde pelas ligações de hidrogênio de suas bases de nucleotídeos aos desoxinucleosídeos trifosfatos que entram. A separação das fitas de DNA é promovida por **proteínas de ligação de DNA de fita simples (SSBs)** em *E. coli* e por uma proteína denominada **proteína de replicação A (RPA) em eucariotos**. Essas moléculas estabilizam a estrutura de fita simples à medida que a forquilha de replicação progride. As proteínas estabilizadoras ligam-se cooperativa e estequiometricamente às fitas simples, sem interferir na capacidade de os nucleotídeos servirem como moldes (Figura 35-13). Além de separar as duas fitas da dupla-hélice, deve haver um desenrolamento da molécula (uma vez a cada 10 pares de nucleotídeos) para permitir a separação das fitas. O complexo proteico β de DNA hexamérico desenrola o DNA em *E. coli*, ao mesmo tempo que o complexo hexamérico MCM desenrola o DNA eucariótico. Esse desenrolamento acontece em segmentos adjacentes à bolha de replicação. Para neutralizar esse desenrolamento, existem múltiplos "suportes giratórios" intercalados nas moléculas de DNA de todos os organismos. A função do suporte giratório é realizada por enzimas específicas, que introduzem "cortes" **em uma fita da dupla-hélice desenrolada**, permitindo, assim, que o processo de desenrolamento aconteça. Os cortes são rapidamente religados sem a necessidade de fornecimento de energia, devido à formação de uma ponte covalente rica em energia entre o esqueleto de fosfodiéster cortado e a enzima religadora do corte. As enzimas religadoras de cortes são chamadas de **DNA-topoisomerases**. Esse processo é apresentado esquematicamente na Figura 35-18 e comparado à religação dependente de ATP realizada pelas DNA-ligasas. As topoisomerases também são

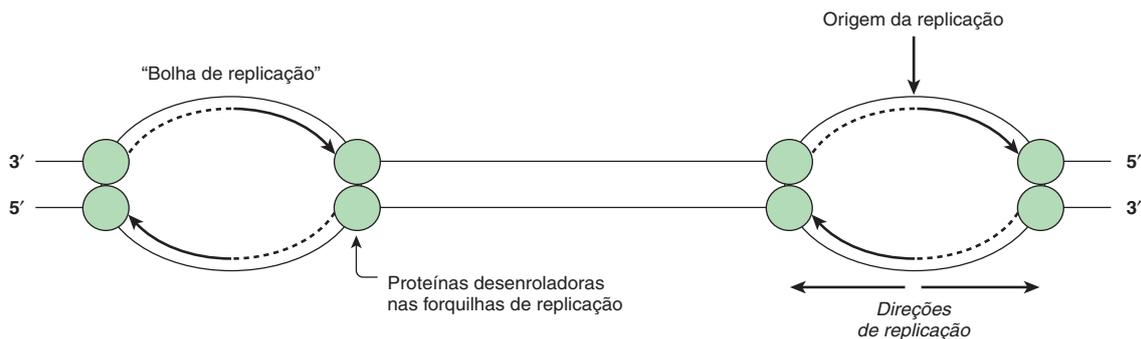


FIGURA 35-17 A geração de "bolhas de replicação" durante o processo de síntese de DNA. A replicação bidirecional e as posições esperadas das proteínas desenroladoras nas forquilhas de replicação são mostradas.

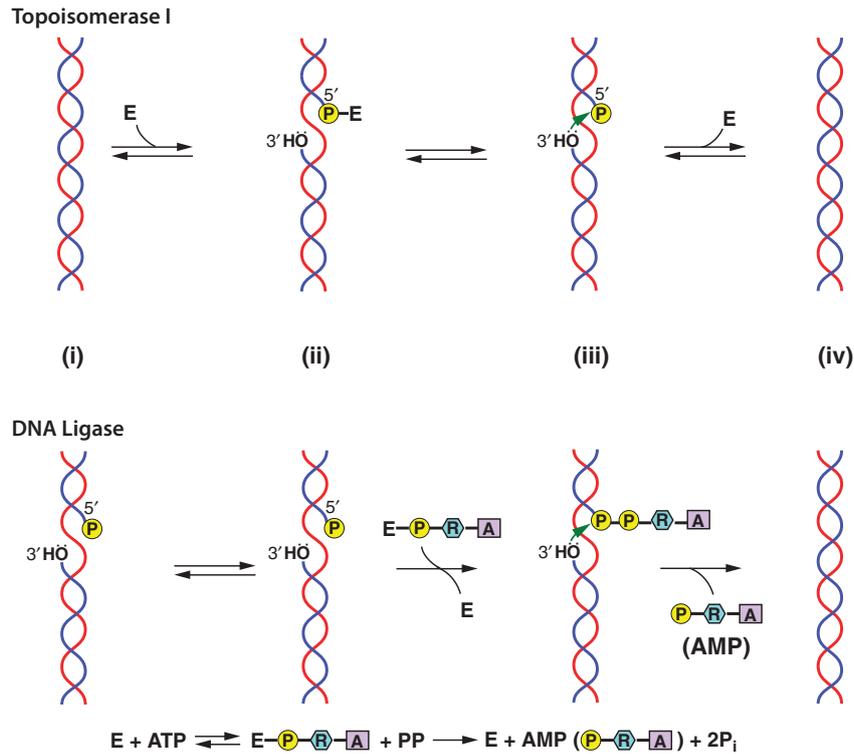


FIGURA 35-18 Os dois tipos de reações de corte-religação do DNA. As duas formas de corte e religação estão representadas; esses processos procedem em quatro passos (i) → (iv). As enzimas envolvidas estão representadas por **E** (partes superior e inferior), ao passo que as pequenas moléculas de reagentes e produtos estão indicadas como fosfato (**P**); pirofosfato (**PP**); fosfato inorgânico (**P_i**); gerado a partir do **PP** pela ação de pirofosfatases ubíquas), ribose (**R**) e adenina (**A**). A reação corte-religação na parte superior é catalisada pela DNA-topoisomerase I, e é independente da energia de ATP, pois a energia para a reformação das ligações fosfodiéster do DNA está estocada na ligação covalente da topoisomerase ao DNA (**-P-E**, parte superior) como mostrado pelo ataque nucleofílico do grupo OH 3' (seta verde, passo iii) ao fosfato do complexo P-E. A reação de corte-religação catalisada pela DNA-ligase (parte inferior) repara quebras no esqueleto fosfodiéster do DNA resultantes da replicação e/ou reparo do DNA. A reação completa da DNA-ligase requer a hidrólise de duas ligações fosfodiéster de alta energia do ATP. O esquema da reação geral da DNA-ligase como enzima livre, ativação da enzima que libera pirofosfato (**PP**), até a liberação da enzima livre e de AMP é mostrada (parte inferior; como mencionado acima, **PP** é rapidamente convertido em 2 mols de **P_i** pelas pirofosfatases ubíquas). A ligase ativada (**E-P-R-A**) reage com o P 5' no sítio de corte para formar um complexo **DNA-P-P-R-A (P-R-A=AMP)** temporário que libera a enzima, **E**. O ataque nucleofílico do grupo OH 3' livre com o P 5' do complexo DNA-5'P-AMP (seta verde, passo iii) sela o corte e libera AMP. A reação enzimática geral convertendo o DNA cortado ao DNA intacto ($E + ATP \rightarrow E + AMP + 2P_i$) é esquematizada na parte inferior da figura.

capazes de desenrolar o DNA super-helicoidal. O DNA super-helicoidal é uma estrutura de ordem superior que ocorre em moléculas de DNA circular enroladas em volta de um núcleo, como representado nas **Figuras 35-2 e 35-19**.

Em uma determinada espécie de vírus de animais (retrovírus), existe uma classe de enzimas capazes de sintetizar uma fita simples e, em seguida, uma molécula de dsDNA a partir de um RNA-molde de fita simples. Essa polimerase, a DNA-polimerase dependente de RNA, ou “**transcriptase reversa**”, primeiro sintetiza uma molécula híbrida de DNA-RNA utilizando o genoma de RNA como molde. Uma nuclease codificadora específica de vírus, a **RNase H**, degrada o molde hibridizado de fita de RNA, e a fita de DNA restante, por sua vez, serve como molde para formar uma molécula de dsDNA que contém a informação originalmente presente no genoma de RNA do vírus de animais.

Reconstituição da estrutura de cromatina

Há evidências de que a organização nuclear e a estrutura da cromatina estão envolvidas na determinação da regulação e

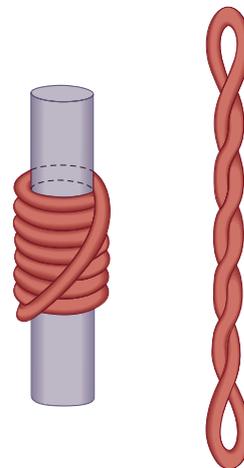


FIGURA 35-19 DNA super-helicoidal. Uma super-hélice toroidal (solenoidal) voltada para a esquerda será convertida em uma super-hélice voltada para a direita quando o núcleo cilíndrico for removido. Esta transição é análoga à que ocorre quando os nucleossomos são desfeitos pela extração de histonas da cromatina por meio da alta concentração de sais.

no iniciação da síntese de DNA. Como observado, a frequência de polimerização em células eucarióticas, que possuem cromatina e nucleossomos, é mais lenta do que em células procarióticas, que não possuem nucleossomos canônicos. É também claro que a estrutura de cromatina deve ser reformada após a replicação. O DNA recém-replicado é rapidamente reunido em nucleossomos, e os octâmeros de histona preexistentes e recentemente reunidos são distribuídos de maneira aleatória para cada braço da forquilha de replicação. Essas reações são facilitadas por meio da ação de proteínas chaperonas de histona, trabalhado em conjunto com os complexos de montagem e remodeladores de cromatina.

A síntese do DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular

Em células animais, incluindo as células humanas, a replicação do genoma de DNA ocorre apenas em um tempo específico durante o período de vida da célula. Esse tempo é chamado de **fase de síntese**, ou **fase S**. Ele é, em geral, temporariamente separado da **fase mitótica**, ou **fase M**, por períodos sem síntese, chamados de **fases gap 1 (G₁)** e **gap 2 (G₂)**, que ocorrem antes e após à fase S, respectivamente (Figura 35-20). Entre outras ações, a célula prepara-se para a síntese do DNA em G₁ e para a mitose em G₂. A célula regula a síntese do DNA, permitindo que ela ocorra apenas uma vez por ciclo celular, e apenas durante a fase S, em células que se preparam para se dividir por processo mitótico.

Todas as células eucarióticas possuem produtos de genes que controlam a transição de uma fase do ciclo celular para

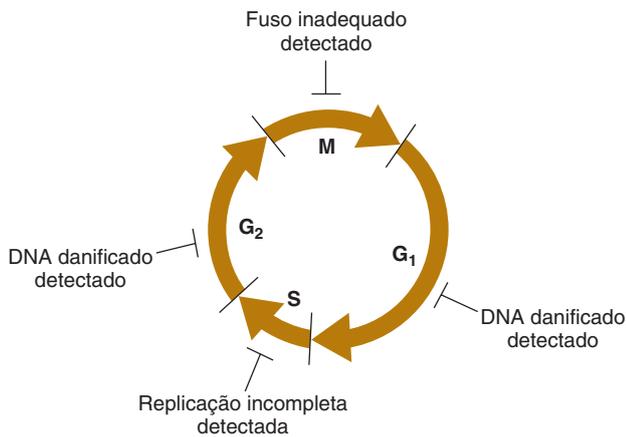


FIGURA 35-20 O progresso ao longo do ciclo celular de mamíferos é continuamente monitorado por múltiplos pontos de verificação no ciclo celular. O DNA, os cromossomos e a integridade da segregação cromossômica são continuamente monitorados durante todo o ciclo celular. Se for detectado dano ao DNA tanto na fase G₁ quanto na G₂ do ciclo celular, se o genoma for replicado incompletamente ou se a maquinaria da segregação cromossômica normal estiver incompleta (i.e., um fuso defeituoso), as células não progredirão além da fase do ciclo em que os defeitos são detectados. Em alguns casos, se o dano não puder ser reparado, essas células passam pelo processo de morte celular programada (apoptose). As células podem deixar reversivamente o ciclo celular durante G₁, entrando em um estado não replicativo, denominado G₀ (não apresentado, ver Figura 9-8). Quando ocorrem sinais/condições adequadas, as células entram novamente em G₁ e progredem normalmente até o fim do ciclo celular.

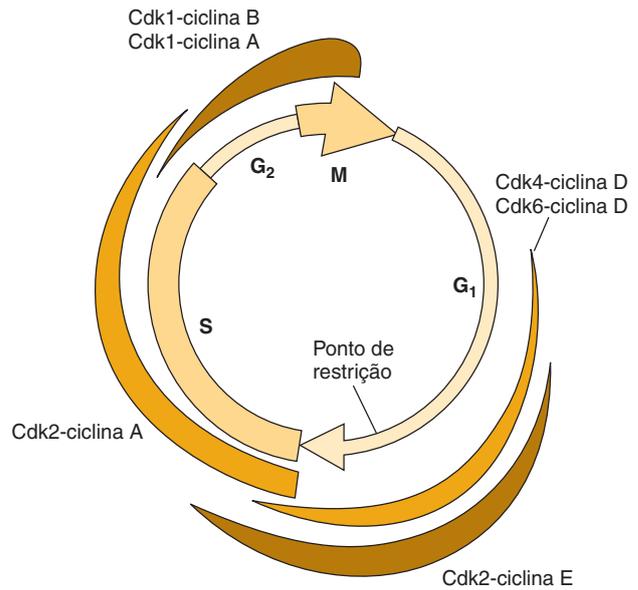


FIGURA 35-21 Ilustração esquemática dos pontos durante o ciclo celular de mamíferos, no qual as ciclinas indicadas e as cinases dependentes de ciclinas são ativadas. A espessura das várias linhas coloridas é indicativa do grau de atividade.

outra. As **ciclinas** são uma família de proteínas cujas concentrações aumentam e diminuem em tempos específicos, isto é, “passam por ciclos” durante o ciclo celular – daí o seu nome. As ciclinas ativam, no tempo certo, diferentes **proteínas-cinase dependentes de ciclinas (CDKs)** que fosforilam substratos essenciais para a progressão pelo ciclo celular (Figura 35-21). Por exemplo, os níveis de ciclina D aumentam na fase tardia de G₁ e permitem a progressão para além do **ponto de início (levedura)** ou **ponto de restrição (mamíferos)**, o ponto além do qual as células irrevogavelmente progredem para a fase S, ou fase de síntese do DNA.

As ciclinas D ativam CDK4 e CDK6. Essas duas cinases também são sintetizadas durante G₁ nas células que passam por divisão celular ativa. As ciclinas D e CDK4 e CDK6 são proteínas nucleares que se reúnem como um complexo na fase G₁ tardia. O complexo ciclina-CDK é, então, uma proteína-cinase serina-treonina ativa. Um substrato para essa cinase é a proteína do retinoblastoma (Rb). O Rb é um regulador do ciclo celular, pois se liga a e inativa um fator de transcrição (E2F) necessário para a transcrição de alguns genes (genes de histona, proteínas de replicação do DNA, etc.) necessários para a progressão de G₁ até a fase S. A fosforilação de Rb por CDK4 ou CDK6 resulta na liberação de E2F da repressão transcricional

TABELA 35-7 Ciclinas e cinases dependentes de ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular

Ciclina	Cinase	Função
D	CDK4, CDK6	Progressão além do limite do ponto de restrição G ₁ /S
E, A	CDK2	Início da síntese de DNA na fase S inicial
B	CDK1	Transição da fase G ₂ para a fase M

mediada por Rb – garantindo, assim, a ativação da transcrição gênica e que ocorra a progressão do ciclo celular.

Outras ciclinas e CDKs estão envolvidas em diferentes aspectos da progressão do ciclo celular (Tabela 35-7). A ciclina E e a CDK2 formam um complexo na G_1 tardia. A ciclina E é rapidamente degradada, e a CDK2 liberada forma, então, um complexo com a ciclina A. Essa sequência é necessária para a iniciação da síntese do DNA na fase S. Um complexo entre a ciclina B e a CDK1 é um limitante de velocidade para a transição G_2/M nas células eucarióticas.

Muitos dos vírus causadores de câncer (oncovírus) e dos genes indutores de câncer (oncogenes) são capazes de atenuar ou interromper a aparente restrição que normalmente controla a entrada de G_1 na fase S nas células de mamíferos. A partir do exposto, seria possível supor que a produção excessiva de ciclina, a perda de um inibidor específico de CDK (ver a seguir) ou a produção ou ativação de uma ciclina/CDK em um momento inadequado poderia resultar em uma divisão celular anormal ou sem controle. Nesse contexto, é válido salientar que o oncogene *bcl* associado ao linfoma de células B parece ser o gene da ciclina D1. Do mesmo modo, as oncoproteínas (ou proteínas transformadoras), produzidas por vários vírus de DNA, têm como alvo inativar o repressor da transcrição de Rb, induzindo a divisão celular de maneira inadequada, ao passo que a inativação de Rb, que em si é um gene supressor de tumor, leva ao crescimento celular descontrolado e à formação de tumores.

Durante a fase S, as células de mamíferos contêm quantidades maiores de DNA-polimerase do que durante as fases não sintetizadoras do ciclo celular. Além disso, as enzimas responsáveis pela formação dos substratos para a síntese de DNA – isto é, desoxirribonucleosídeos trifosfatos – também aumentaram suas atividades, e sua expressão diminuirá após a fase de síntese até o reaparecimento do sinal para uma nova síntese de DNA. Durante a fase S, o DNA nuclear é completamente replicado uma vez, e apenas uma vez. Após a replicação da cromatina, ela é marcada de modo a evitar que continuem novas replicações até que ela passe novamente pela mitose. Esse processo é denominado licença de replicação. Os mecanismos moleculares para esse fenômeno nas células humanas envolve a dissociação e/ou a fosforilação de ciclina-CDK e a subsequente degradação de várias proteínas de ligação da origem, que desempenham papéis fundamentais na formação do complexo de replicação. Consequentemente, as origens disparam apenas uma vez por ciclo celular.

Em geral, um determinado par de cromossomos se replicará simultaneamente no interior de uma porção fixa da fase S em cada replicação. Em um cromossomo, grupos de unidades de replicação replicam de maneira coordenada. A natureza dos sinais que regulam a síntese de DNA nesses níveis é desconhecida, mas a regulação parece ser uma propriedade intrínseca de cada cromossomo individual que é mediada por várias origens de replicação contidas nele.

Todos os organismos contêm mecanismos elaborados conservados evolutivamente para reparar o DNA danificado

O reparo do DNA danificado é essencial para a manutenção da integridade genômica e, portanto, para impedir a propagação

TABELA 35-8 Tipos de dano ao DNA

I. Alteração de uma única base
A. Despurinação
B. Desaminação da citosina à uracila
C. Desaminação da adenina à hipoxantina
D. Alquilação da base
E. Incorporação do análogo de uma base
II. Alteração de duas bases
A. Indução do dímero timina-timina (pirimidina) por luz ultravioleta
B. Ligação cruzada de agente alquilante bifuncional
III. Quebra da cadeia
A. Radiação ionizante
B. Desintegração radioativa do esqueleto estrutural da molécula
C. Formação de radicais livres oxidativos
IV. Ligações cruzadas
A. Entre bases da mesma fita ou de fitas opostas
B. Entre moléculas de DNA e proteínas (p. ex., histonas)

de mutações, tanto horizontalmente, isto é, mudanças nas sequências de DNA nas células somáticas, quanto verticalmente, em que lesões não reparadas estão presentes no DNA do espermatozoide ou do oócito e, portanto, podem ser transmitidas à prole. O DNA está sujeito a uma grande variedade de agressões diárias por substâncias químicas, físicas e biológicas (Tabela 35-8) e, portanto, o reconhecimento e o reparo nas lesões do DNA são essenciais. Consequentemente, as células eucarióticas contêm cinco principais vias de reparo de DNA, cada uma delas contendo múltiplas proteínas, por vezes compartilhadas; em geral, essas proteínas de reparo do DNA contêm ortólogos nos procaríotos. Os mecanismos de reparo do DNA incluem o **reparo por excisão de nucleotídeo (NER)**; o **reparo errôneo (MMR)**; o **reparo por excisão de base (BER)**; a **recombinação homóloga (HR)**; e as vias de reparo de **união de extremidades não homólogas (NHEJ)** (Figura 35-22). O experimento para testar a importância de muitas dessas proteínas de reparo de DNA para a biologia humana tem sido realizado pela natureza – mutações naturais em grande número desses genes que levam a doenças em seres humanos (Tabela 35-9). Além disso, experimentos sistemáticos direcionados ao gene “nocaute” (ver Capítulo 39), com camundongos de laboratório, também atribuíram claramente as funções de manutenção da integridade gênica fundamental a esses genes. Em estudos genéticos em camundongo, foi observado que, de fato, as mutações que tiveram esses genes como alvo induziram defeitos no reparo do DNA, ao passo que, muitas vezes, também aumentaram muito a suscetibilidade ao câncer.

Um dos mecanismos mais intensivamente estudados de reparo do DNA é aquele utilizado para reparar **quebras no DNA de dupla-hélice**, ou **DSBs**; elas serão discutidas aqui com algum detalhe. Há duas vias, **HR** e **NHEJ**, que as células eucarióticas utilizam para remover DSBs. A escolha entre as duas depende da fase do ciclo celular (Figuras 35-20 e 35-21) e do tipo exato de quebra de DSB que deve ser reparado (Tabela 35-8). Durante as fases G_0/G_1 do ciclo celular, DSBs são corrigidas pela via de NHEJ, e durante as fases S, G_2 e M do ciclo celular, HR é utilizada. Todas as etapas de reparo do dano ao DNA são catalisadas por moléculas conservadas evolutivamente, que incluem **sensores de danos de DNA**, **transdutores** e **mediadores de reparo de danos**. Coletivamente, essas cascatas

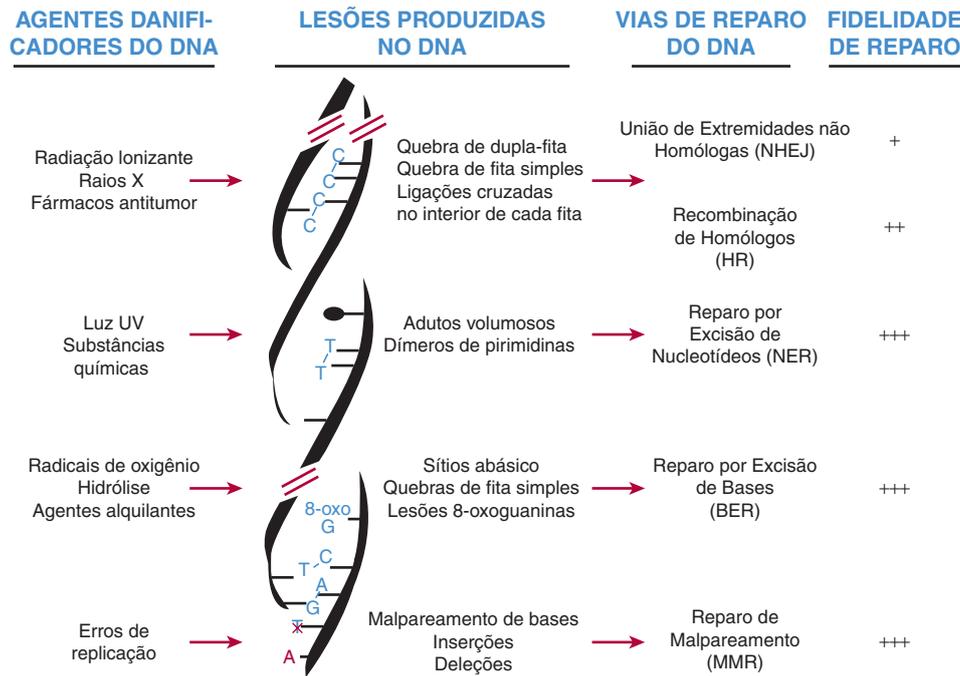


FIGURA 35-22 Os mamíferos utilizam múltiplas vias de reparo de DNA de precisão variável para reparar as miríades formas de danos ao DNA às quais o DNA genômico se encontra sujeito. São listados os principais tipos de agentes danificadores do DNA, as lesões de DNA por eles produzidas (esquematizadas e listadas), a via de reparo de DNA responsável pelo reparo das diferentes lesões, e a fidelidade relativa dessas vias. (Modificada, com permissão, de: "DNA-Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells" *Cell Stem Cell* 8:16–29 (2011) Copyright © 2011 Elsevier Inc.)

TABELA 35-9 Doenças humanas de reparo do DNA danificado

<p>Reparo da união de extremidades não homólogas defeituosas (NHEJ) Doença da imunodeficiência combinada severa (SCID) Doença da imunodeficiência combinada severa sensível à radiação (RS-SCID)</p>
<p>Reparo do homólogo defeituoso (HR) Distúrbio semelhante à AT (ATLD) Síndrome de quebra de Nijmegen (NBS) Síndrome de Bloom (SB) Síndrome de Werner (SW) Síndrome de Rothmund-Thomson (SRT) Suscetibilidade ao câncer de mama 1 e 2 (BRCA1, BRCA2)</p>
<p>Reparo defeituoso por excisão de nucleotídeos do DNA (NER) Xeroderma pigmentoso (XP) Síndrome de Cockayne (SC) Tricotiodistrofia (TTD)</p>
<p>Reparo defeituoso por excisão de bases do DNA (BER) Polipose associada à MUTYH (MAP)</p>
<p>Reparo defeituoso do malpareamento no DNA (MMR) Câncer colorretal não poliposo hereditário (HNPCC)</p>

de proteínas participam na resposta celular a danos ao DNA. De modo importante, os resultados celulares finais de dano ao DNA e das tentativas das células em reparar esses danos variam de **atraso no ciclo celular**, para permitir o reparo do DNA, à parada do ciclo celular à **apoptose** ou **senescência** (ver **Figura 35-23**; e mais detalhes adiante). As moléculas envolvidas nesses complexos e processos altamente integrados

variam de modificações de histona específica do dano (i.e., desmetilação de histona H4 em lisina 20; H4K20me2) e incorporação de variantes de isotipos de histonas, como a histona **H2AX** nos nucleossomos nos locais de dano do DNA (ver Tabela 35-1), poli-ADP-ribose-polimerase, **PARP**, o complexo proteico MRN (subunidades Mre11-Rad50-NBS1); até proteínas de sinalização/reconhecimento de cinases ativadas pelo dano ao DNA (**ATM** [ataxia telangiectasia, mutada] e cinase relacionada à ATM, **ATR**, a multissubunidade de proteína-cinase dependente de DNA [**DNA-PK** e **Ku70/80**], e cinases 1 e 2 de ponto de verificação [**CHK1**, **CHK2**]). Essas cinases múltiplas fosforilam e, conseqüentemente, modulam as atividades de muitas proteínas, como as numerosas proteínas reparadoras de DNA, controle de pontos de verificação, e proteínas de controle do ciclo celular como CDC25A, B, C, Wee1, p21, p16 e p19 (todas as reguladoras de ciclina-CDK [ver Figura 9-8; e a seguir]; várias exonucleases e endonucleases; proteínas de ligação específicas de DNA de fita simples – DNA [RPA]; PCNA e DNA-polimerases específicas [DNA-pol delta, δ ; e eta, η]). Muitos desses tipos de proteínas/enzimas foram discutidos no contexto da replicação do DNA. O reparo do DNA e sua relação com o controle do ciclo celular constituem áreas muito ativas de pesquisa devido aos seus papéis centrais na biologia celular e ao potencial para gerar e prevenir o câncer.

A integridade do DNA e dos cromossomos é monitorada ao longo do ciclo celular

Dada a importância do DNA e do funcionamento cromossômico normais para a vida, não surpreende o fato de as células

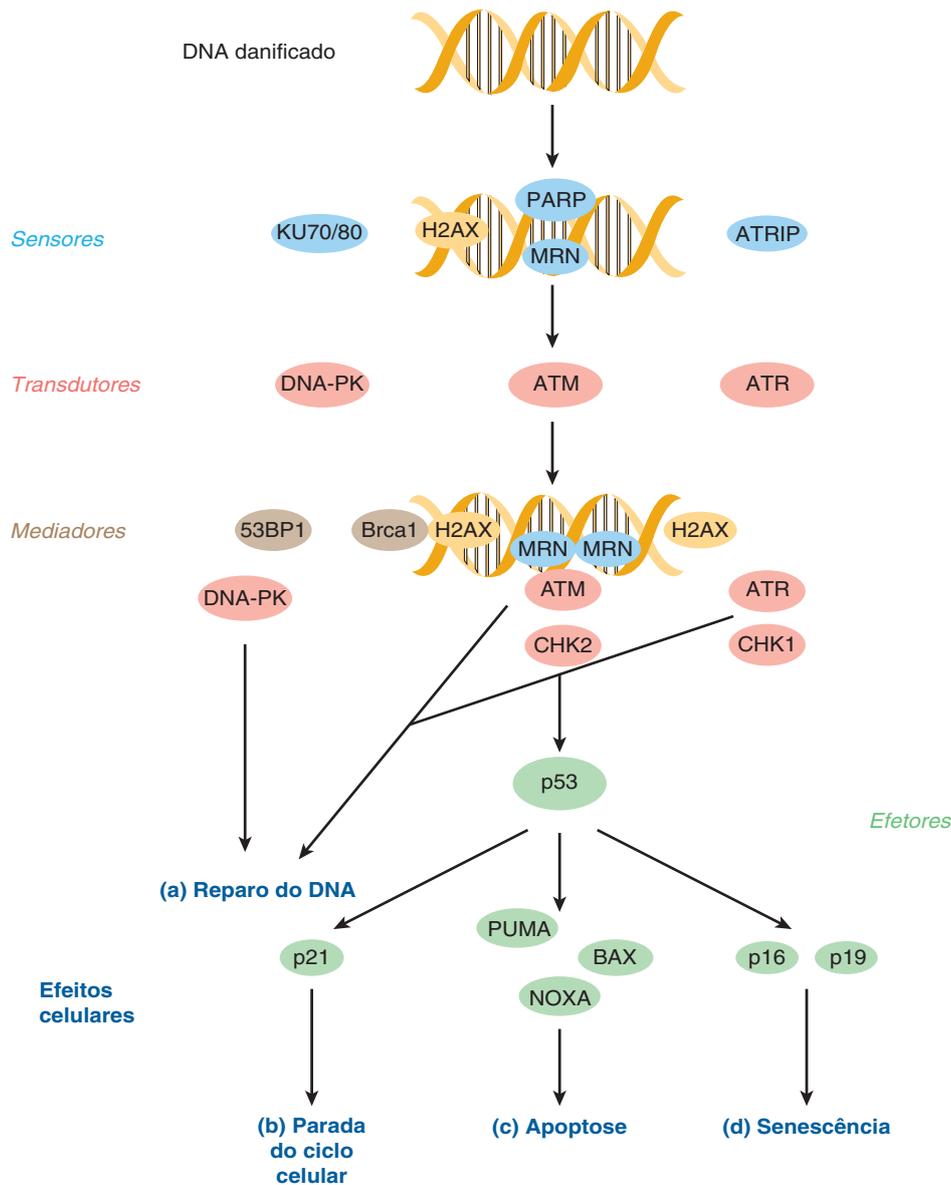


FIGURA 35-23 O mecanismo de múltiplas etapas do reparo da quebra da dupla-fita de DNA. São mostradas, de cima para baixo, as proteínas (complexos proteicos) que: identificam DSBs no DNA genômico (sensores), fazem a transdução e amplificam o dano identificado no DNA (transdutores e mediadores), bem como as moléculas que determinam os resultados finais da resposta ao dano no DNA (efetores). O DNA danificado pode ser: (a) reparado diretamente (reparo de DNA) ou, por vias mediadas por p53 e, dependendo do grau de gravidade da lesão no DNA, por genes induzidos ativados por p53, (b) as células podem ter o seu ciclo celular parado por p21/WAF1, o potente inibidor do complexo CDK-ciclina, a fim de obter tempo para que o DNA extensamente danificado possa ser reparado, ou (c) e (d) se a extensão da lesão do DNA for grande demais para ser reparada, as células podem entrar em apoptose ou em senescência – ambos os processos impedem que as células que contêm o DNA danificado se dividam e, portanto, possam induzir câncer ou outros resultados biológicos deletérios. (Com base em: “DNA Damage Response in Tissue-Specific and Cancer Stem Cells” *Cell Stem Cell* 8:16–29 (2011) Copyright © 2011 Elsevier Inc.)

eucarióticas terem desenvolvido mecanismos elaborados para monitorar a integridade do material genético. Como detalhado, alguns sistemas complexos de múltiplas subunidades de enzimas evoluíram para reparar o DNA danificado no nível da sequência de nucleotídeos. De modo semelhante, os acidentes do DNA no nível dos cromossomos também são monitorados e reparados. Como mostrado na Figura 35-20, tanto a integridade do DNA quanto a do cromossomo são continuamente monitoradas ao longo do ciclo celular. As quatro etapas específicas em que esse monitoramento ocorre foram chamadas

de **controles de pontos de verificação**. Se problemas são detectados em quaisquer desses pontos de verificação, a progressão pelo ciclo é interrompida, e o trânsito pelo ciclo celular é suspenso até que o dano seja reparado. Os mecanismos moleculares subjacentes à detecção de danos no DNA durante as fases G₁ e G₂ do ciclo celular são mais bem compreendidos do que os que ocorrem durante as fases S e M.

A **proteína supressora de tumor p53**, uma proteína de peso molecular (PM) aparente de 53 kDa na SDS-PAGE, desempenha papel fundamental nos controles de pontos

de verificação G_1 e G_2 . Em geral, uma proteína muito instável, a p53, é um fator de transcrição de ligação ao DNA, um **membro de uma família de proteínas relacionadas** (i.e., p53, p63 e p73), que, de algum modo, se estabiliza em resposta ao dano ao DNA, provavelmente por interações diretas da p53 com o DNA. Como as histonas já mencionadas, ela está sujeita a um arsenal de PTMs reguladoras, e é provável que todas elas modifiquem suas múltiplas atividades biológicas. Níveis aumentados de p53 ativam a transcrição de um conjunto de genes que atuam coletivamente para retardar o trânsito por meio do ciclo. Uma dessas proteínas induzidas, a p21, é um **potente inibidor de CDK-ciclina (CKI)** que é capaz de inibir, de maneira eficaz, a ação de todas as CDKs. Claramente, a inibição das CDKs irá interromper a progressão ao longo do ciclo celular (ver Figuras 35-19 e 35-20). Se o dano ao DNA é muito extenso para ser reparado, as células afetadas sofrem **apoptose** (morte celular programada) de modo dependente da p53. Nesse caso, a p53 induz a ativação de um conjunto de genes que induz a apoptose. As células sem p53 funcional não conseguem sofrer apoptose em resposta a níveis elevados de radiação ou a agentes quimioterápicos ativadores do DNA. Não é de surpreender, então, que o p53 seja um dos mais frequentes genes mutados em cânceres humanos (Capítulo 56). Na verdade, estudos recentes de sequenciamento genômico de múltiplas amostras de DNA de tumores sugerem que mais de 80% dos cânceres humanos contêm mutações de perda de função da p53. Pesquisas adicionais sobre os mecanismos de controle dos pontos de verificação serão extremamente valiosas para o desenvolvimento de opções terapêuticas efetivas contra o câncer.

RESUMO

- O DNA nas células eucarióticas está associado a uma variedade de proteínas, resultando em uma estrutura chamada de cromatina.
- A maior parte do DNA está associada a proteínas histonas para formar uma estrutura chamada de nucleossomo. Os nucleossomos são compostos por um octâmero de histonas em volta do qual está enrolado o DNA de cerca de 150 pb.
- As histonas estão sujeitas a um amplo conjunto de modificações covalentes dinâmicas que possuem consequências reguladoras importantes.
- Os nucleossomos e as estruturas de ordem superior formadas a partir deles servem para compactar o DNA.
- O DNA em regiões transcricionalmente ativas é relativamente mais sensível ao ataque de nucleases *in vitro*; algumas regiões, chamadas de sítios hipersensíveis, são excepcionalmente sensíveis e nelas, com frequência, são encontrados sítios de controle de transcrição.
- O DNA muito ativo em termos de transcrição (genes) está frequentemente agrupado em regiões de cada cromossomo. No interior dessas regiões, os genes podem ser separados por DNA inativo nas estruturas dos nucleossomos. Muitas unidades de transcrição eucarióticas (i.e., a porção de um gene que é copiada pela RNA-polimerase) frequentemente consistem em regiões codificadoras de DNA (éxons) interrompidas por sequências intervenientes de DNA não codificador (íntrons). Isso é particularmente verdadeiro para os genes que codificam mRNA.
- Após a transcrição, durante o processamento do RNA, os íntrons são removidos e os éxons são ligados em conjunto para formar o mRNA maduro que aparece no citoplasma; esse processo é chamado de *splicing* do RNA.
- O DNA em cada cromossomo é replicado exatamente de acordo com as regras de pareamento de bases durante a fase S do ciclo celular.
- Cada fita da dupla-hélice é replicada simultaneamente, mas por mecanismos um pouco diferentes. Um complexo de proteínas, incluindo a DNA-polimerase, replica a fita-líder continuamente na direção 5'–3'. A fita tardia é replicada de modo descontínuo, em pequenas partes de 100 a 250 nucleotídeos pela DNA-polimerase, sintetizando na direção 5'–3'.
- A replicação do DNA inicia em sítios especiais, denominados origens ou oris, e produz bolhas de replicação. Cada cromossomo eucariótico contém múltiplas origens. Todo o processo leva cerca de 9 horas em uma célula humana típica e ocorre apenas durante a fase S do ciclo celular.
- Vários mecanismos que empregam diferentes sistemas enzimáticos reparam o DNA celular danificado após a exposição das células a mutagênicos químicos e físicos.
- Células normais que contêm DNA que não pode ser reparado sofrem morte celular programada.

REFERÊNCIAS

- Blanpain C, Mohrin M, Sotiropoulou PA, et al: DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2011;8:16–29.
- Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R: DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr* 2010;1:15–29.
- Campbell RM, Tummino PJ: Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark. *J Clin Invest* 2014;124:64–69.
- Campos EL, Reinberg D: Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009;43:559–599.
- Collas C, Lund EG, Oldenburg AR: Closing the (nuclear) envelope on the genome: how nuclear lamins interact with promoters and modulate gene expression. *Bioessays* 2013;6:75–83.
- David CJ, Manley JL: Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 2010;24:2343–2364.
- Doolittle WF, Fraser P, Gerstein MB, et al. Sixty years of genome biology 2013;14:113. PMID: PMC3663092.
- Gerstein M: Genomics: ENCODE leads the way on big data. *Nature* 2012;489:208.
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, et al: What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet* 2008;40:275–279.
- Kurth I, O'Donnell M: New insights into replisome fluidity during chromosome replication. *Trends Biochem Sci* 2013;38:195–203.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, et al: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;389:251–260.
- Margueron R, Reinberg D: Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* 2010;11:285–296.

- Misteli T: The cell biology of genomes: bringing the double helix to life. *Cell* 2013;152:1209–1212.
- Navarro FJ, Weston L, Nurse P: Global control of cell growth in fission yeast and its coordination with the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24:833–837.
- Nelson DL, Orr HT, Warren ST: The unstable repeats—three evolving faces of neurological disease. *Neuron* 2013;77:825–843.
- O'Donnell M, Langston L, Stillman B: Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013 Jul 1;5:a010108.
- Ponicsan SL, Kugel JF, Goodrich JA: Genomic gems: SINE RNAs regulate mRNA production. *Curr Opin Genet Develop* 2010;20:149–155.
- Pope BD, Gilbert DM: The replication domain model: regulating replicon firing in the context of large-scale chromosome architecture. *J Mol Biol* 2013;425:4690–4695.
- Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR: Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:708–721.
- Skene PJ, Henikoff S: Histone variants in pluripotency and disease. *Development* 2013;140:2513–2524.
- Tanaka TU, Clayton L, Natsume T: Three wise centromere functions: see no error, hear no break, speak no delay. *EMBO Rep* 2013;14:1073–1083.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al: The sequence of the human genome. *Science* 2002;291:1304–1351.
- Voigt P, Tee WW, Reinberg D: A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* 2013;27:1318–1338.
- Zaidi SK, Young DW, Montecino M, et al: Bookmarking the genome: maintenance of epigenetic information. *J Biol Chem* 2011;286:18355–183561.

Síntese, processamento e modificação do RNA

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as moléculas envolvidas e o mecanismo da síntese do RNA.
- Explicar como as RNA-polimerases dependentes de DNA de eucariotos, em colaboração com um conjunto de fatores acessórios específicos, podem transcrever diferencialmente o DNA genômico para produzir moléculas precursoras de mRNA específicas.
- Descrever a estrutura dos precursores do mRNA eucariótico, que são altamente modificados internamente e em ambas as terminações.
- Avaliar o fato de que a maioria dos genes codificadores de mRNA de mamíferos são interrompidos por múltiplas sequências que não codificam proteínas, denominadas íntrons, que são intercaladas entre regiões codificadoras de proteínas, denominadas éxons.
- Elucidar que uma vez que o íntron de RNA não codifica proteínas, o RNA intrônico deve ser removido especifica e precisamente de modo a gerar mRNAs funcionais a partir das moléculas precursoras de mRNA, em uma série de eventos moleculares precisos, denominados *splicing* do RNA.
- Detalhar as etapas e as moléculas que catalisam o *splicing* de mRNA, um processo que converte as moléculas precursoras com terminações modificadas em mRNAs que são funcionais para a tradução.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A síntese de uma molécula de RNA a partir do DNA é um processo complexo que envolve uma enzima do grupo das RNA-polimerases dependentes de DNA e algumas proteínas associadas. As etapas gerais necessárias para sintetizar o transcrito primário são iniciação, alongamento e terminação. A mais conhecida é a iniciação. Algumas regiões do DNA (geralmente localizadas a montante do sítio de iniciação) e fatores proteicos que se ligam a essas sequências para regular a iniciação da transcrição foram identificados. Certos RNAs – mRNAs, em particular – possuem tempos de vida muito diferentes em uma célula. As moléculas de RNA sintetizadas nas células de mamíferos são compostas como moléculas precursoras que devem ser processadas em RNAs ativos maduros. É importante entender os princípios básicos da síntese e do metabolismo do RNA mensageiro (mRNA), para que a modulação desse processo resulte em taxas alteradas de síntese de proteínas e, portanto, em uma variedade tanto de mudanças metabólicas quanto fenotípicas. Essa é a maneira como todos os

organismos se adaptam às mudanças do ambiente. É também a maneira como são estabelecidas e mantidas as estruturas e funções celulares diferenciadas. Erros ou mudanças na síntese, no processamento, no *splicing*, na estabilidade ou na função das transcrições de mRNA são causas de doenças.

O RNA EXISTE EM DUAS CLASSES PRINCIPAIS

Todas as células eucarióticas apresentam duas classes principais de RNA (**Tabela 36-1**), os **RNAs codificadores de proteínas**, ou RNAs mensageiros (**mRNAs**), e duas formas abundantes de **RNAs não codificadores de proteínas**, delineados com base no tamanho: os RNAs ribossomais (**rRNAs**) grandes e os RNAs não codificadores longos (**lncRNAs**) e os RNAs de transferência (**tRNAs**) de RNAs não codificadores pequenos, os RNAs nucleares pequenos (**snRNAs**) e os micro-RNAs (**miRNAs**) e RNAs silenciadores (**siRNAs**). Os mRNAs, os rRNAs e os tRNAs estão diretamente envolvidos na síntese proteica, ao

TABELA 36-1 Classes de RNAs eucarióticos

RNA	Tipos	Abundância	Estabilidade
<i>RNAs codificadores de proteínas</i>			
Mensageiro (mRNA)	≥ 10 ⁵ espécies diferentes	2 a 5% do total	Instável a muito estável
<i>RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs)</i>			
ncRNAs grandes			
Ribossomal (rRNA)	28S, 18S, 5,8S, 5S	80% do total	Muito estável
lncRNAs	~ 1.000s	~ 1 a 2%	Instável a muito estável
ncRNAs pequenos			
RNAs de transferência	~ 60 espécies diferentes	~ 15% do total	Muito estável
Nuclear pequeno (snRNA)	~ 30 espécies diferentes	≤ 1% do total	Muito estável
Micro/silenciadores (mi/SiRNAs)	100s a 1.000	< 1% do total	Estável

passo que os outros RNAs participam do *splicing* de mRNA (SnRNAs) ou da modulação da expressão gênica, por meio de alteração da função do mRNA (mi/SiRNAs) e/ou sua expressão (lncRNAs). Esses RNAs diferem em suas diversidades, estabilidades e abundância nas células.

O RNA É SINTETIZADO A PARTIR DE UM MOLDE DE DNA POR UMA RNA-POLIMERASE

Os processos de síntese de DNA e RNA são semelhantes porque envolvem (1) as etapas gerais de iniciação, de alongamento e de terminação com polaridade 5'–3'; (2) complexos de iniciação grandes e com múltiplos componentes; e (3) fidelidade às regras de pareamento de bases de Watson e Crick. Entretanto, as sínteses de DNA e RNA são diferentes em vários aspectos importantes, incluindo os seguintes: (1) os ribonucleotídeos são utilizados na síntese do RNA, em vez de desoxirribonucleotídeos; (2) U substitui T como base complementar para A no RNA; (3) um *primer* não está envolvido na síntese do RNA, uma vez que as RNA-polimerases possuem a capacidade para iniciar a síntese *de novo*; (4) uma determinada célula, apenas partes do genoma são vigorosamente transcritas ou copiadas em RNA, ao passo que todo o genoma deve ser copiado, uma vez e apenas uma vez durante a replicação do DNA; e (5) não há função de revisão eficaz e altamente ativa durante a transcrição do RNA.

O processo de síntese de RNA a partir de um molde de DNA foi mais bem caracterizado em procariotos. Embora nas células de mamíferos a regulação da síntese do RNA e o processamento das transcrições de RNA sejam diferentes daqueles nos procariotos, o processo de síntese de RNA em si é muito semelhante nessas duas classes de organismos. Portanto, a descrição da síntese de RNA em procariotos, nos quais é mais bem compreendida, é aplicável a eucariotos, embora as enzimas envolvidas e os sinais reguladores, ainda que relacionados, sejam diferentes.

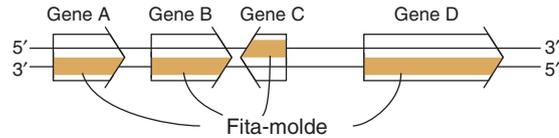


FIGURA 36-1 Genes podem ser transcritos a partir de ambas as fitas de DNA. As pontas das setas indicam a direção de transcrição (polaridade). A fita-molde sempre é lida na direção 3'–5'. A fita oposta é chamada de fita codificadora, uma vez que ela é idêntica (exceto pela troca de T por U) ao transcrito do mRNA (transcrito primário em células eucarióticas) que codifica o produto proteico do gene.

A fita-molde de DNA é transcrita

A sequência de ribonucleotídeos em uma molécula de RNA é complementar à sequência de desoxirribonucleotídeos em uma fita da molécula de dupla-fita de DNA (ver Figura 34-8). A fita que é transcrita ou copiada em uma molécula de RNA é chamada de **fita-molde** do DNA. A outra fita do DNA, a **fita não molde**, é frequentemente chamada de **fita codificadora** daquele gene. É assim denominada porque, com exceção da troca de T por U, ela corresponde exatamente à sequência do transcrito primário do mRNA, que codifica o produto (proteína) do gene. No caso de uma molécula de dupla-fita de DNA que contém muitos genes, a fita-molde para cada gene não será necessariamente a mesma fita do DNA de dupla-hélice (**Figura 36-1**). Assim, uma determinada fita de uma molécula de dupla-fita de DNA servirá de fita-molde para alguns genes e de fita codificadora para outros genes. Observe que a sequência de nucleotídeos de uma transcrição de RNA será a mesma (exceto para U substituindo T) que a da fita codificadora. A informação na fita-molde é lida na direção 3'–5'. Embora não seja mostrado na Figura 36-1, há exemplos de genes incorporados no interior de outros genes.

A RNA-polimerase dependente de DNA se liga a um sítio distinto, o promotor, e inicia a transcrição

A RNA-polimerase dependente de DNA é a enzima responsável pela polimerização de ribonucleotídeos em uma sequência

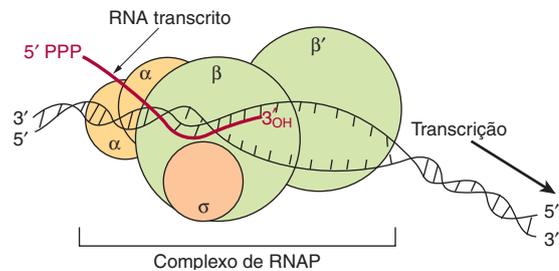


FIGURA 36-2 A RNA-polimerase catalisa a polimerização de ribonucleotídeos em uma sequência de RNA que é complementar à fita-molde do gene. O transcrito de RNA apresenta a mesma polaridade (5'–3') que a fita codificadora, mas contém U no lugar de T. A RNAP bacteriana consiste em um complexo central de duas subunidades β (β e β') e duas subunidades α. A holoenzima contém a subunidade σ ligada ao conjunto α₂ ββ' do núcleo da enzima. A subunidade σ não é mostrada. A "bolha" de transcrição é uma área de aproximadamente 20 pb de DNA desfeito, e o complexo inteiro cobre de 30 a 75 pb de DNA, dependendo da conformação da RNAP.

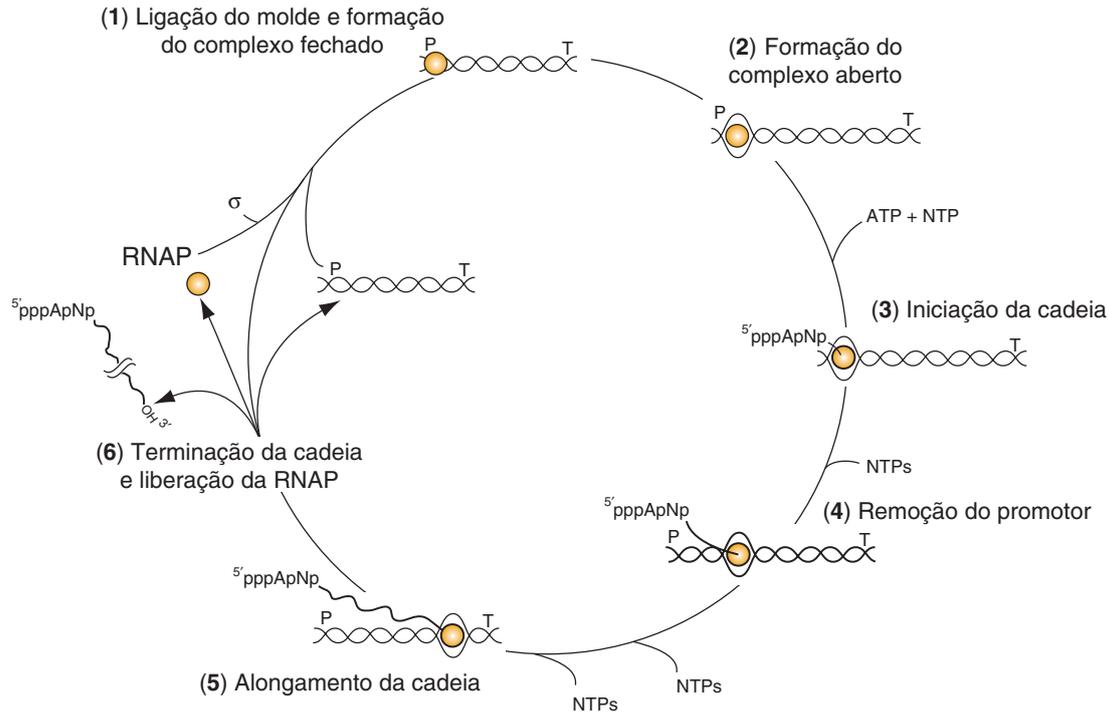


FIGURA 36-3 O ciclo de transcrição. O ciclo de transcrição pode ser descrito em seis etapas. **(1) Ligação ao molde e formação fechada do complexo RNA-polimerase-promotor:** a RNAP liga-se ao DNA e, então, localiza um promotor (P). **(2) Formação do complexo aberto do promotor:** uma vez ligado ao promotor, a RNAP funde as duas fitas de DNA para formar o complexo aberto do promotor; esse complexo também é chamado de complexo de pré-iniciação (PIC). A separação das fitas permite que a polimerase acesse a informação codificadora na fita-molde de DNA. **(3) Iniciação da cadeia:** usando a informação codificadora do molde, a RNAP catalisa o acoplamento da primeira base (frequentemente uma purina) à segunda, um ribonucleosídeo trifosfato direcionado pelo molde para formar um dinucleotídeo (neste exemplo, formando o dinucleotídeo 5' pppApN_{OH 3'}). **(4) Remoção do promotor:** depois que o comprimento da cadeia de RNA atinge ~10 a 20 nt, a polimerase sofre uma mudança conformacional e, então, torna-se capaz de se afastar do promotor, transcrevendo a unidade de transcrição. **(5) Alongamento da cadeia:** resíduos sucessivos são adicionados ao terminal -OH 3' da molécula de RNA nascente até ser encontrado o sinal de terminação da transcrição (T). **(6) Terminação da cadeia e liberação da RNAP:** ao encontrar o local de terminação da transcrição, a RNAP sofre uma alteração conformacional adicional que leva à liberação da cadeia de RNA completa, do molde de DNA e da RNAP. A RNAP pode se religar ao DNA começando o processo de busca do promotor, e o ciclo é repetido. Todas as etapas do ciclo de transcrição são facilitadas por proteínas adicionais e, de fato, estão frequentemente sujeitas à regulação por fatores que atuam como positivos e/ou negativos.

complementar à fita-molde do gene (ver **Figuras 36-2 e 36-3**). A enzima liga-se a um sítio específico – o promotor – na fita-molde. Segue-se o início da síntese de RNA no ponto de partida, e o processo continua até que uma sequência de terminação seja alcançada (**Figura 36-3**). Uma **unidade de transcrição** é definida como a região do DNA que inclui os sinais para a iniciação, o alongamento e a terminação da transcrição. O produto de RNA, que é sintetizado na direção 5'– 3', é o **transcrito primário**. A frequência de transcrição varia de gene para gene, mas pode ser muito elevada. Uma micrografia eletrônica da transcrição em ação é apresentada na **Figura 36-4**. Em procariotos, ela pode representar o produto de vários genes contíguos; em células de mamíferos, em geral, representa o produto de um único gene. Os terminais 5' do transcrito de RNA primário e o RNA citoplasmático maduro são idênticos. Portanto, o **local de início da transcrição (TSS)** corresponde ao nucleotídeo 5' do mRNA. Ele é chamado de posição + 1, assim como o nucleotídeo correspondente no DNA. Os números aumentam positivamente à medida que a sequência prossegue a jusante do ponto de partida. Essa convenção facilita a localização de regiões específicas, como

as fronteiras dos íntrons e éxons. O nucleotídeo no promotor adjacente ao sítio de início da transcrição a montante é chamado de - 1, e esses números negativos aumentam à medida que a sequência segue *a montante* e se afasta do TSS. Esse sistema de numeração +/- fornece um modo convencional de definição do local de elementos reguladores em um gene (**Figura 36-5**).

Ostranscritos primários gerados pela RNA-polimerase II – uma das três RNA-polimerases dependentes de DNA nucleares distintas em eucariotos – são imediatamente modificados pela adição de capeamentos de 7-metilguanosina-trifosfato (ver **Figura 34-10**), que persistem e eventualmente aparecem na extremidade 5' do mRNA citoplasmático maduro. Esses capeamentos são necessários para o processamento subsequente do transcrito primário em mRNA, para a tradução do mRNA e para a proteção do mRNA contra o ataque nucleolítico por exonucleases 5'.

A RNA-polimerase bacteriana dependente de DNA é uma enzima de múltiplas subunidades

A RNA-polimerase dependente de DNA básica, ou RNAP, da bactéria *Escherichia coli* existe como um complexo nuclear

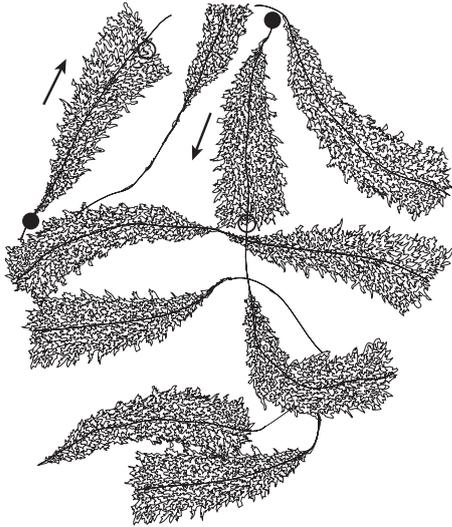


FIGURA 36-4 Representação esquemática de uma eletrofotografia de cópias múltiplas dos genes codificadores de rRNA de um anfíbio no processo da sua transcrição. O aumento é de aproximadamente 6.000 \times . Observe que o comprimento dos transcritos aumenta à medida que as moléculas de RNA-polimerase progredem ao longo dos genes de rRNA individuais dos locais de início da transcrição (círculos com preenchimento sólido) para os locais de terminação da transcrição (círculos sem preenchimento). A RNA-polimerase I (não visualizada aqui) encontra-se na base dos transcritos nascentes de rRNA. Assim, a terminação proximal do gene transcrito apresenta pequenos transcritos presos a ela, e transcritos muito maiores estão presos à terminação distal do gene. As setas indicam a direção da transcrição (5' \rightarrow 3').

de aproximadamente 400 kDa, consistindo em duas subunidades α idênticas, duas subunidades β e β' grandes e uma subunidade ω . A subunidade β liga-se aos íons Mg^{2+} e compõe a subunidade catalítica (Figura 36-2). A **RNA-polimerase nuclear**, $\beta\beta'\alpha_2\omega$, frequentemente denominada E, associa-se a um fator proteico específico (o **fator sigma** [σ]) para formar

a **holoenzima**, $\beta\beta'\alpha_2\omega\sigma$, ou E σ . A subunidade σ permite que as enzimas nucleares reconheçam e se liguem à região do promotor (Figura 36-5) para formar o **complexo de pré-iniciação** (PIC). Há múltiplos genes codificadores de fatores σ distintos em todas as espécies de bactérias. Os fatores sigma possuem uma função dupla no processo de reconhecimento do promotor; a associação de σ ao núcleo da RNA-polimerase diminui sua afinidade pelo DNA não promotor, ao passo que aumenta simultaneamente a afinidade da holoenzima pelo promotor do DNA. Os múltiplos fatores σ competem pela interação com o núcleo limitante da RNA-polimerase (i.e., E). Cada um desses fatores σ únicos atua como uma proteína reguladora que modifica a especificidade de reconhecimento do promotor da holoenzima RNA-polimerase única resultante (i.e., E σ_1 , E σ_2 ,...). O aparecimento de diferentes fatores σ e sua associação ao núcleo da RNA-polimerase para formar novas formas de holoenzimas podem ser correlacionados temporalmente a vários programas de expressão gênica em sistemas procarióticos, tais como a esporulação, o crescimento em várias fontes pobres em nutrientes e a resposta ao choque térmico.

As células de mamíferos possuem três RNA-polimerases distintas dependentes de DNA nuclear

Algumas propriedades distintas de polimerases nucleares de mamíferos são descritas na Tabela 36-2. Cada uma dessas RNA-polimerases dependentes de DNA é responsável pela transcrição de conjuntos de genes diferentes. Os tamanhos das RNA-polimerases variam de PM 500 a 600 kDa. Essas enzimas exibem perfis de subunidades mais complexos que as RNA-polimerases de procariotos. Todas possuem duas subunidades grandes, que apresentam, notavelmente, sequências fortes e semelhanças estruturais a subunidades β e β' de procariotos e várias subunidades menores – de até 14, como no caso da RNA-pol III. As funções de cada uma das subunidades ainda não são completamente compreendidas. Uma toxina peptídica

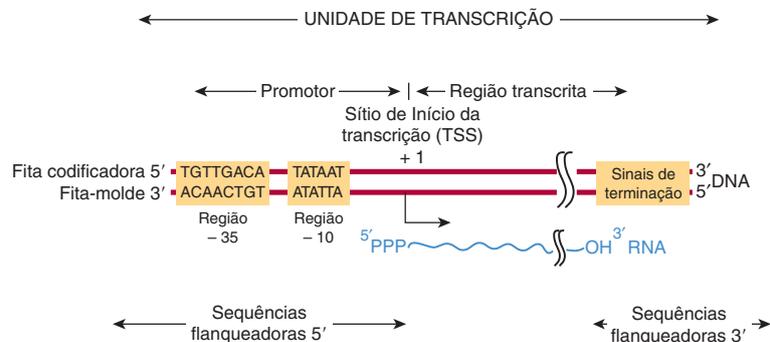


FIGURA 36-5 Promotores procarióticos compartilham duas regiões de sequências de nucleotídeos altamente conservadas. Essas regiões estão localizadas 35 e 10 pb a montante do TSS, o qual é indicado como + 1. Por convenção, todos os nucleotídeos a montante do local de iniciação da transcrição (em + 1) são numerados com um sentido negativo e são chamados de sequências adjacentes 5', ao passo que as sequências a jusante do TSS + 1 são numeradas em sentido positivo. Também por convenção, os elementos da sequência reguladora do DNA promotor, como os elementos TATA - 35 e - 10, são descritos na direção 5' \rightarrow 3', como estão na fita codificadora. Entretanto, esses elementos funcionam apenas no DNA de dupla-fita. Outros elementos reguladores transcricionais, no entanto, podem, com frequência, atuar em uma direção de modo independente, e tais elementos *cis* são desenhados adequadamente em qualquer esquema (ver também Figura 36-8). O transcrito produzido a partir dessa unidade de transcrição tem a mesma polaridade ou "sentido" (p. ex., orientação 5' \rightarrow 3') da fita codificadora. Os elementos *cis* das terminações localizam-se no fim da unidade de transcrição (ver Figura 36-6 para mais detalhes). Por convenção, as sequências a jusante do sítio em que ocorre a terminação da transcrição são chamadas de sequências flanqueadoras 3'.

TABELA 36-2 Nomenclatura e propriedades das RNA-polimerases nucleares dependentes de DNA em mamíferos

Forma da RNA-polimerase	Sensibilidade à α -amanitina	Produtos principais
I	Insensível	rRNA
II	Alta sensibilidade	mRNA, lncRNA, miRNA, SnRNA
III	Sensibilidade intermediária	tRNA, rRNA 5S

do cogumelo *Amanita phalloides*, a α -amanitina, é um inibidor diferencial específico de RNA-polimerases dependentes de DNA do núcleo de eucariotos e, como tal, demonstrou ser uma ferramenta de pesquisa importante (Tabela 36-2). A α -amanitina bloqueia a translocação da RNA-polimerase durante a formação das ligações fosfodiésteres.

A SÍNTESE DE RNA É UM PROCESSO CÍCLICO QUE ENVOLVE A INICIAÇÃO, O ALONGAMENTO E A TERMINAÇÃO DA CADEIA DE RNA

O processo de síntese de RNA em bactérias – descrito na Figura 36-3 – é cíclico e envolve múltiplas etapas. A primeira holoenzima da RNA-polimerase ($E\sigma$) deve localizar e, então, ligar-se especificamente a um promotor (**P**; Figura 36-3). Uma vez localizado o promotor, o complexo DNA- $E\sigma$ -promotor passa por mudança conformacional dependente de temperatura e desenrola ou funde o DNA no sítio de início de transcrição ou em volta dele (em + 1). Esse complexo é denominado PIC. Esse desenrolamento permite que o sítio ativo de $E\sigma$ acesse a fita-molde que, então, determina a sequência de ribonucleotídeos que devem ser polimerizados em RNA. Então, o primeiro nucleotídeo (geralmente, embora nem sempre, uma purina) associa-se ao sítio de ligação do nucleotídeo na subunidade β da enzima e, na presença do próximo nucleotídeo apropriado ligado à polimerase apropriada, a RNAP catalisa a formação da primeira ligação fosfodiéster, e a cadeia nascente é, então, ligada ao sítio de polimerização na subunidade β da RNAP. Essa reação é denominada **iniciação**. A analogia com os sítios A e P no ribossomo deve ser notada; ver Figura 37-9, adiante. O dinucleotídeo nascente mantém o trifosfato 5' do nucleotídeo iniciador (Figura 36-3, ATP).

A RNA-polimerase continua a incorporar nucleotídeos, em torno de 3 a + 10, até o ponto em que a polimerase sofre outra alteração conformacional e se afasta do promotor; essa reação é denominada **remoção do promotor** (*clearance* do promotor). A **fase de alongamento** começa, então, e nela a molécula de RNA nascente cresce na direção 5'–3', à medida que etapas consecutivas de incorporação de NTP continuam de modo cíclico e antiparalelo ao molde. A enzima polimeriza os ribonucleotídeos na sequência específica determinada pela fita-molde e interpretada de acordo com as regras de pareamento de bases de Watson e Crick. O **pirofosfato** (**PP_i**) é liberado após cada ciclo de polimerização. Assim como para a síntese do DNA, esse PP_i é rapidamente degradado a dois moles de **fosfato inorgânico** (**P_i**) pelas **pirofosfatases ubíquas**, promovendo, então,

a irreversibilidade de toda a reação sintética. A decisão de permanecer no promotor em um estado equilibrado ou parado, ou da transição para o alongamento, parece ser uma etapa reguladora importante tanto na transcrição procariótica quanto eucariótica da transcrição dos genes do mRNA.

À medida que o complexo de **alongamento** contendo a RNA-polimerase progride ao longo da molécula de DNA, o **desenrolamento do DNA** deve ocorrer de modo a permitir o acesso para o pareamento de bases adequado aos nucleotídeos da fita codificadora. A extensão dessa bolha de transcrição (i.e., desenrolamento do DNA) é constante durante toda a transcrição e estimada em aproximadamente 20 pb por molécula de polimerase (Figura 36-2). Assim, o tamanho da região desenrolada do DNA é determinado pela polimerase e é independente da sequência de DNA nesse complexo. A RNA-polimerase possui uma atividade intrínseca de “enzima de desenrolar” que abre a hélice do DNA (i.e., ver formação do PIC anteriormente). O fato de que a dupla-hélice de DNA deve se desenrolar e as fitas devem se afastar, pelo menos transitoriamente para a transcrição, significa alguma ruptura da estrutura do nucleossomo nas células eucarióticas. A topoisomerase tanto precede quanto segue a RNA-polimerase para impedir a formação de tensões super-helicoidais que poderiam servir para aumentar a energia necessária para desenrolar o molde de DNA antes da RNAP.

A **terminação** da síntese da molécula de RNA em bactérias é sinalizada por uma sequência na fita-molde da molécula de DNA – um sinal que é reconhecido pela **proteína de terminação**, o **fator rho** (ρ). O fator rho é uma helicase estimulada por RNA dependente de ATP que rompe o complexo de alongamento de transcrição ternária composto por RNA-polimerase e RNA e DNA nascentes. Em alguns genes, a RNA-polimerase bacteriana pode reconhecer diretamente os **sinais de terminação** codificados no DNA (Figura 36-3; **T**) sem a assistência do fator rho. Após o término da síntese do RNA, a enzima separa-se do molde de DNA e dissocia-se, tornando-se uma enzima (**E**) nuclear livre e um fator ρ livre. Com a assistência de outro fator σ , a holoenzima reformada $E\sigma$ reconhece, então, outro promotor, onde inicia a síntese de uma nova molécula de RNA. Em células eucarióticas, o término é menos bem compreendido, mas as enzimas catalisadoras do processamento de RNA, do término e as proteínas de poliadenilação, parecem se acumular na direção da RNA-polimerase II logo após a iniciação (ver a seguir). Mais de uma molécula de RNA-polimerase pode transcrever a mesma fita-molde de um gene simultaneamente, mas o processo é faseado e espaçado, de tal modo que, a qualquer momento, cada uma está transcrevendo uma porção diferente da sequência de DNA (Figuras 36-1 e 36-4).

A FIDELIDADE E A FREQUÊNCIA DA TRANSCRIÇÃO SÃO CONTROLADAS POR PROTEÍNAS LIGADAS A DETERMINADAS SEQUÊNCIAS DE DNA

A análise da sequência de DNA de genes específicos permitiu o reconhecimento de algumas sequências importantes na transcrição de genes. A partir do grande número de genes bacterianos estudados, é possível construir modelos de consenso de sinais de transcrição, de iniciação e de terminação.

A questão “Como a RNAP encontra o local correto para iniciar a transcrição?” não é trivial quando a complexidade do genoma é levada em conta. *E. coli* possui aproximadamente 4×10^3 sítios de iniciação (i.e., promotores de genes) no interior do genoma de $4,2 \times 10^6$ pb. A situação é ainda mais complexa em seres humanos, nos quais até 150 mil locais de iniciação da transcrição diferentes (unidades de transcrição) são distribuídos ao longo de 3×10^9 pb de DNA. A RNAP pode se ligar, com baixa afinidade, a várias regiões do DNA, mas ela verifica a sequência do DNA – em uma taxa ≥ 103 pb/s – até reconhecer certas regiões específicas do DNA, às quais ela se liga com maior afinidade. Essas regiões são denominadas promotoras, e é a associação da RNAP com os promotores que garante o início preciso da transcrição. O processo de reconhecimento e utilização do promotor é o alvo para a regulação tanto em bactérias quanto em seres humanos.

Os promotores bacterianos são relativamente simples

Os promotores bacterianos têm aproximadamente 40 nucleotídeos (40 pb ou quatro voltas de DNA de dupla-hélice) de comprimento, uma região pequena o bastante para ser coberta por uma molécula de RNA-holopolimerase de *E. coli*. Em um promotor de consenso, há dois elementos de sequência curtos conservados. Aproximadamente 35 pb a montante do local de início da transcrição se encontra uma sequência consenso de oito pares de nucleotídeos (consenso: 5'-TGTTGACA-3') à qual a RNAP se liga para formar o chamado **complexo fechado**. Mais próximo do local de início da transcrição – cerca de 10 nucleotídeos a montante –, encontra-se uma sequência de seis pares de nucleotídeos rica em A+T (consenso: 5'-TATAAT-3'). Juntos, esses elementos de sequência conservados incluem o promotor e são mostrados esquematicamente na Figura 36-5. A última sequência tem uma baixa temperatura de fusão porque não possui os pares de nucleotídeos CG. Assim, acredita-se que a chamada **TATA box** (“caixa”) facilite a dissociação das duas fitas de DNA, de modo que a RNA-polimerase ligada à região do promotor possa ter acesso à sequência de nucleotídeos de sua fita-molde imediatamente

a jusante. Uma vez que o processo de separação de fitas ocorra, a combinação de RNA-polimerase mais promotor é chamada de **complexo aberto**. Outras bactérias possuem sequências de consenso um pouco diferentes em seus promotores, mas todas, em geral, têm dois componentes para o promotor; elas tendem a estar na mesma posição em relação ao local de início da transcrição e, em todos os casos, as sequências entre os dois elementos promotores não têm nenhuma semelhança, mas ainda **fornecem funções de espaçamento críticas** que facilitam o reconhecimento de sequências – 35 e – 10 pela holoenzima de RNA-polimerase. No interior da célula bacteriana, diferentes conjuntos de genes são muitas vezes regulados coordenadamente. Um modo importante de se conseguir isso é o fato de esses genes corregulados partilharem sequências promotoras específicas – 35 e – 10. Esses promotores únicos são reconhecidos por diferentes fatores σ ligados ao núcleo da RNA-polimerase (i.e., $E\sigma_1$, $E\sigma_2$,...).

Os **sinais de terminação** de transcrição rho dependentes em *E. coli* também parecem ter uma sequência de consenso distinta, como mostrado na Figura 36-6. A sequência de consenso conservada, que tem cerca de 40 pares de nucleotídeos de comprimento, pode ser vista contendo uma repetição invertida interrompida ou hifenizada, seguida de uma série de pares de bases AT. À medida que a transcrição prossegue por meio da repetição invertida hifenizada, o transcrito gerado pode formar a estrutura intramolecular *hairpin* (“grampo de cabelo”), também apresentada na Figura 36-6. A transcrição segue para a região AT, e, com o auxílio da proteína de terminação ρ , a RNA-polimerase para, dissocia-se do molde de DNA e libera o transcrito nascente.

Como discutido em detalhes no Capítulo 38, a transcrição do gene bacteriano é controlada pela ação de proteínas repressoras e ativadoras. Essas proteínas geralmente se ligam a sequências de DNA únicas e específicas que ficam adjacentes aos promotores. Essas proteínas repressoras e ativadoras afetam a capacidade de a RNA-polimerase se ligar ao promotor do DNA e/ou formar complexos abertos. O efeito resultante é o estímulo ou a inibição da formação do PIC e o início da transcrição – consequentemente, bloqueando ou estimulando a síntese de RNA específico.

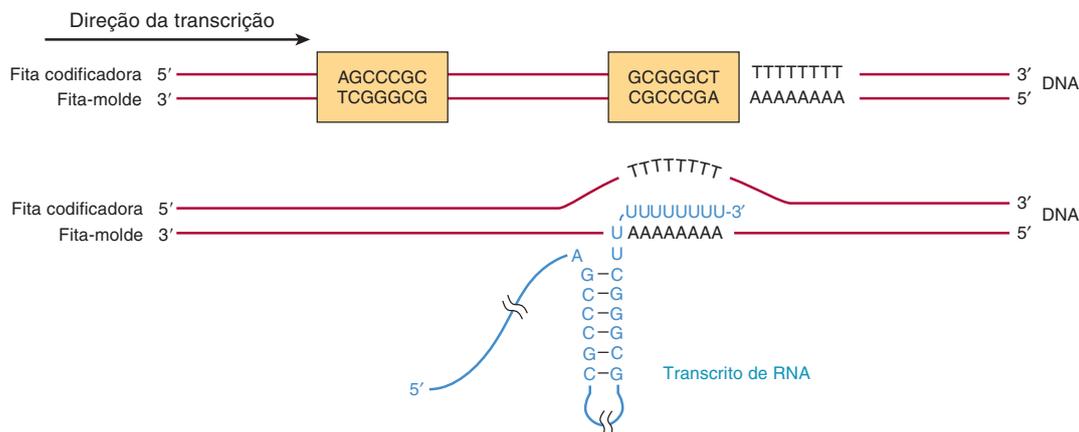


FIGURA 36-6 O sinal de terminação predominante da transcrição bacteriana contém uma repetição hifenizada repetida (as duas áreas em caixas) seguida de um trecho de pares de bases AT (parte superior). A repetição invertida, quando transcrita em RNA, pode gerar a estrutura secundária no transcrito de RNA (parte inferior). A formação desse *hairpin* de RNA leva a uma pausa na RNA-polimerase e, subsequentemente, o fator de terminação ρ (rho) interage com essa polimerase parada e induz a terminação da cadeia.

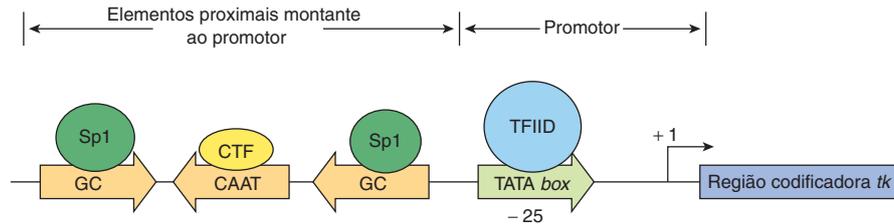


FIGURA 36-7 Elementos de transcrição e fatores de ligação no gene da timidina-cinase (*tk*) no herpes-vírus simples. A RNA-polimerase II dependente de DNA (não mostrada) liga-se à região que abrange a TATA *box* (que é mostrada nessa figura ligada pelo fator de transcrição TFIID) e TSS em + 1 (ver também Figura 36-9) para formar um PIC multicomponente capaz de iniciar a transcrição em um único nucleotídeo (TSS + 1). A frequência desse evento é aumentada pela presença de elementos a montante atuando como *cis* (como caixas GC e CAAT) localizados próximos do promotor (promotores proximais) ou distantes do promotor (elementos distais; Figura 36-8). Os elementos *cis* dos DNAs proximal e distal estão ligados por fatores de transcrição atuando como *trans*, neste exemplo, Sp1 e CTF (também chamados de C/EBP, NF1, NFY). Esses elementos *cis* podem funcionar independentemente da orientação (*setas*).

Os promotores dos eucariotos são mais complexos

É evidente que os sinais no DNA que controlam a transcrição nas células eucarióticas são de vários tipos. **Dois tipos de elementos de sequência são promotores proximais.** Um desses tipos define onde a transcrição deve começar ao longo do DNA, e o outro contribui para os mecanismos que controlam com que frequência esse evento deve ocorrer. Por exemplo, no gene da timidina-cinase do herpes-vírus simples, que utiliza os fatores de transcrição de seu hospedeiro mamífero para seu programa de expressão gênica inicial, há um único TSS específico, e a iniciação precisa da transcrição, a partir desse local, depende de uma sequência de nucleotídeos localizada cerca de 25 nucleotídeos a montante do local do início (i.e., em - 25) (Figura 36-7). Essa região tem a sequência de TATAAAAG e apresenta semelhança notável com a funcionalmente relacionada TATA

box, que está localizada cerca de 10 pb a montante do local de início do mRNA de procariotos (Figura 36-5). A mutação ou inativação da TATA *box* reduz acentuadamente a transcrição desse e de muitos outros genes que contêm esse elemento de consenso *cis-ativo* (ver Figuras 36-7 e 36-8). Em geral, a TATA *box* está localizada 25 a 30 pb a montante do local de início da transcrição em genes de mamíferos que a contêm. A sequência de consenso para a TATA *box* é TATAAA, embora numerosas variações tenham sido descritas. A TATA *box* humana está ligada por uma **proteína de ligação de TATA (TBP)** de 34 kDa, que é uma subunidade em pelo menos dois complexos de múltiplas subunidades, TFIID e SAGA/P-CAF. As subunidades não TBP de TFIID são proteínas chamadas de **fatores associados ao TBP (TAFs)**. A ligação do complexo TFIID TBP-TAF à sequência da TATA *box* representa a primeira etapa na formação do complexo de transcrição no promotor.

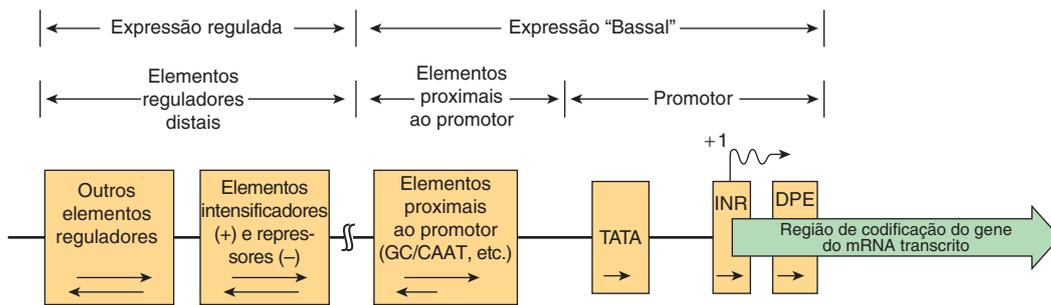


FIGURA 36-8 Diagrama esquemático mostrando as regiões controladoras da transcrição em gene eucariótico hipotético produtor de mRNA transcrito pela RNA-polimerase II. Esse gene pode ser dividido em suas regiões, codificadora e reguladora, como definido pelo sítio de início da transcrição (*seta*; + 1). A região codificadora contém a sequência de DNA que é transcrita em mRNA, que, por sua vez, é traduzido em uma proteína, normalmente após o processamento extensivo do mRNA por meio de *splicing* (Figuras 36-12 a 36-16). A região reguladora consiste em duas classes de elementos. Uma delas é responsável por garantir a expressão basal. O “promotor”, frequentemente composto pela TATA *box* e/ou Inr e/ou elementos de DPE (ver Tabela 36-3), direciona a RNA-polimerase II para o local correto (fidelidade). Entretanto, em certos genes que não possuem TATA, os chamados promotores sem TATA, um iniciador (Inr) e/ou elementos DPE podem direcionar a polimerase para esse local. Outro componente, os elementos a montante, especifica a frequência da iniciação; esses elementos podem ser proximais (50-200 pb) ou distais (1.000 a 10⁵ pb) em relação ao promotor, como mostrado. Entre os elementos proximais mais bem estudados, está a CAAT *box*, mas vários outros elementos (ligados pelas proteínas transativadoras Sp1, NF1, AP1, etc., Tabela 36-3) podem ser utilizados em vários genes. Os elementos distais estimulam ou reprimem a expressão, e vários deles medeiam a resposta a vários sinais, incluindo hormônios, choque de calor, metais pesados e substâncias químicas. A expressão tecidual específica também envolve sequências específicas desse tipo. A dependência de orientação de todos os elementos é indicada pelas setas no interior das caixas. Por exemplo, elementos proximais ao promotor (TATA *box*, INR, DPE) devem estar em uma orientação 5’-3’, ao passo que os elementos a montante proximais frequentemente trabalham melhor na orientação 5’-3’, mas alguns podem ser revertidos. As localizações de alguns elementos não são fixas em relação ao sítio de início da transcrição. De fato, alguns elementos responsáveis pela expressão regulada podem se localizar de modo intercalado aos elementos a montante ou podem estar localizados a jusante do local de início, no interior, ou mesmo a jusante do próprio gene regulado.

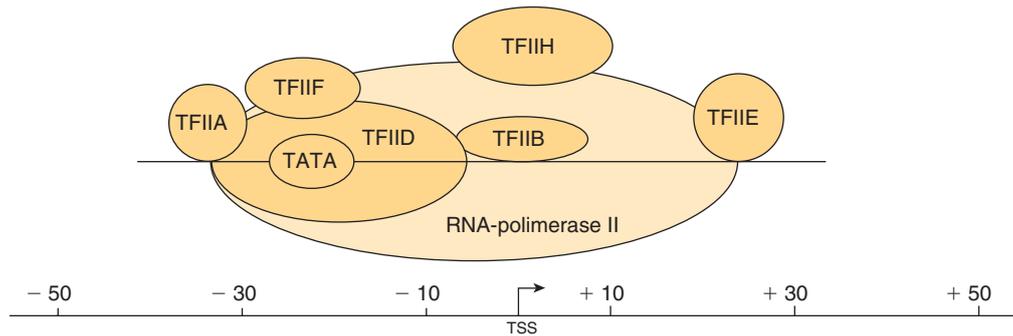


FIGURA 36-9 O complexo de transcrição basal eucariótico. A formação do complexo de transcrição basal começa quando ocorre a ligação de TFIID, por meio da subunidade de sua proteína de ligação de TATA (TBP) e várias subunidades dos 14 fatores associados à TBP (TAF), à TATA *box*. TFIID dirige a reunião de vários outros componentes por meio de interações proteína-DNA e proteína-proteína; TFIIA, B, E, F, H e polimerase II (pol II). Todo o complexo abrange o DNA da posição aproximada de 30 a +30, em relação ao TSS em +1 (marcado pela seta dobrada). No nível atômico, as estruturas derivadas do raio X da RNA-polimerase II sozinha e da TFIID ligada ao promotor de DNA TATA na presença de TFIIB ou de TFIIA foram elucidadas a uma resolução de 3 Å. As estruturas dos complexos TFIID e TFIIH foram determinadas por microscopia eletrônica, com resolução de 30 Å, como se dispõe a estrutura completa dos PICs de pol II+GTF direcionados à TBP. Assim, as estruturas moleculares do maquinário de transcrição em ação começam a ser esclarecidos. A maior parte dessa informação estrutural é consistente com os modelos aqui apresentados.

Um grande número de genes que codificam mRNA em eucariotos não possui uma caixa TATA de consenso. Nesses casos, elementos *cis* adicionais, uma **sequência iniciadora (Inr)** e/ou o **elemento promotor a jusante (DPE)**, direcionam a maquinaria da transcrição da RNA-polimerase II para o promotor e, fazendo isso, proporcionam o início da transcrição basal a partir do local correto. O elemento Inr expande o local de início (de -3 a +5) e consiste em uma sequência geral de consenso TCA₊₁G/T T T/c (A₊₁ indica o primeiro nucleotídeo transcrito, i.e., TSS). As proteínas que se ligam ao Inr para direcionar a ligação da pol II incluem o TFIID. Os promotores que possuem tanto uma TATA *box* quanto o Inr podem ser transcritos “com mais força” e mais vigorosamente do que os promotores com apenas um desses elementos. O DPE possui a sequência-consenso A/GGA/TCGTG e está localizado aproximadamente 25 pb a jusante de TSS +1. Como o Inr, as sequências de DPE também estão ligadas por subunidades TAF de TFIID. Em uma pesquisa com milhares de genes codificadores de proteínas de eucariotos, cerca de 30% continham TATA *box* e Inr, 25% continham Inr e DPE, 15% continham todos os três elementos, e cerca de 30% continham somente o Inr.

Em geral, mas não sempre, as sequências logo a montante do local de início contribuem de modo importante com a frequência com que ocorre a transcrição. As mutações nessas regiões reduzem a frequência de iniciação da transcrição em 10 a 20 vezes. As caixas GC e CAAT são típicas desses elementos de DNA, assim denominadas devido às sequências de DNA envolvidas. Como ilustrado na Figura 36-7, cada um desses elementos de DNA estão ligados por uma proteína específica, Sp1 no caso da caixa GC e CTF para a CAAT *box*; ambos ligam-se aos seus **domínios de ligação ao DNA (DBDs) diferentes**. A frequência do início da transcrição é uma consequência dessas interações proteína-DNA e de interações complexas entre os domínios particulares dos fatores de transcrição (diferentes dos domínios DBD – chamados de **domínios de ativação; ADs**) dessas proteínas e do restante da maquinaria de transcrição (RNA-polimerase II, os **fatores basais**, ou **gerais, GTFs**, TFIIA, B, D, E, F, H e outros fatores correguladores, como o

Mediador, os fatores remodeladores de cromatina e os modificadores de cromatina) (ver a seguir e **Figuras 36-9 e 36-10**.) As interações proteína-DNA na TATA *box* que envolvem a RNA-polimerase II e outros componentes da maquinaria de transcrição basal garantem a fidelidade do início.

Em conjunto, o promotor mais os elementos *cis* ativos proximais ao promotor a montante conferem fidelidade e modulam a frequência da iniciação sobre um gene, respectivamente. A TATA *box* tem uma exigência particularmente rígida tanto para a posição quanto para a orientação. Como com os promotores bacterianos, alterações de uma única base em qualquer um desses elementos *cis* podem ter efeitos drásticos no funcionamento pela redução da afinidade de ligação dos fatores *trans* cognatos (TFIID/TBP ou Sp1, CTF e fatores semelhantes). O espaçamento da caixa TATA, Inr e DPE também é crítico.

Uma terceira classe de elementos da sequência também aumenta ou diminui a velocidade de transcrição de genes em eucariotos. Esses elementos são chamados de **intensificadores** ou **repressores** (ou **silenciadores**), dependendo de como afetam a transcrição. Eles foram encontrados em diversas localizações tanto a montante quanto a jusante do local de início da transcrição e até no interior de proteínas transcritas de porções codificadoras de alguns genes. Intensificadores e silenciadores podem exercer os seus efeitos quando localizados a milhares ou mesmo dezenas de milhares de bases de distância a partir das unidades de transcrição localizadas no mesmo cromossomo. Surpreendentemente, os intensificadores e os silenciadores podem funcionar de modo independente da orientação. Literalmente, centenas desses elementos foram descritos. Em alguns casos, os requisitos da sequência para a ligação são rigidamente restritos; em outros, considerável variação na sequência é permitida. Algumas sequências se ligam apenas a uma única proteína; entretanto, a maioria dessas sequências reguladoras está ligada por várias proteínas diferentes. Juntos, esses muitos transfatores que se ligam aos elementos *cis* distais e proximais aos promotores regulam a transcrição em resposta a um vasto conjunto de sinais biológicos. Os eventos reguladores da transcrição contribuem de modo importante para o controle da expressão gênica.

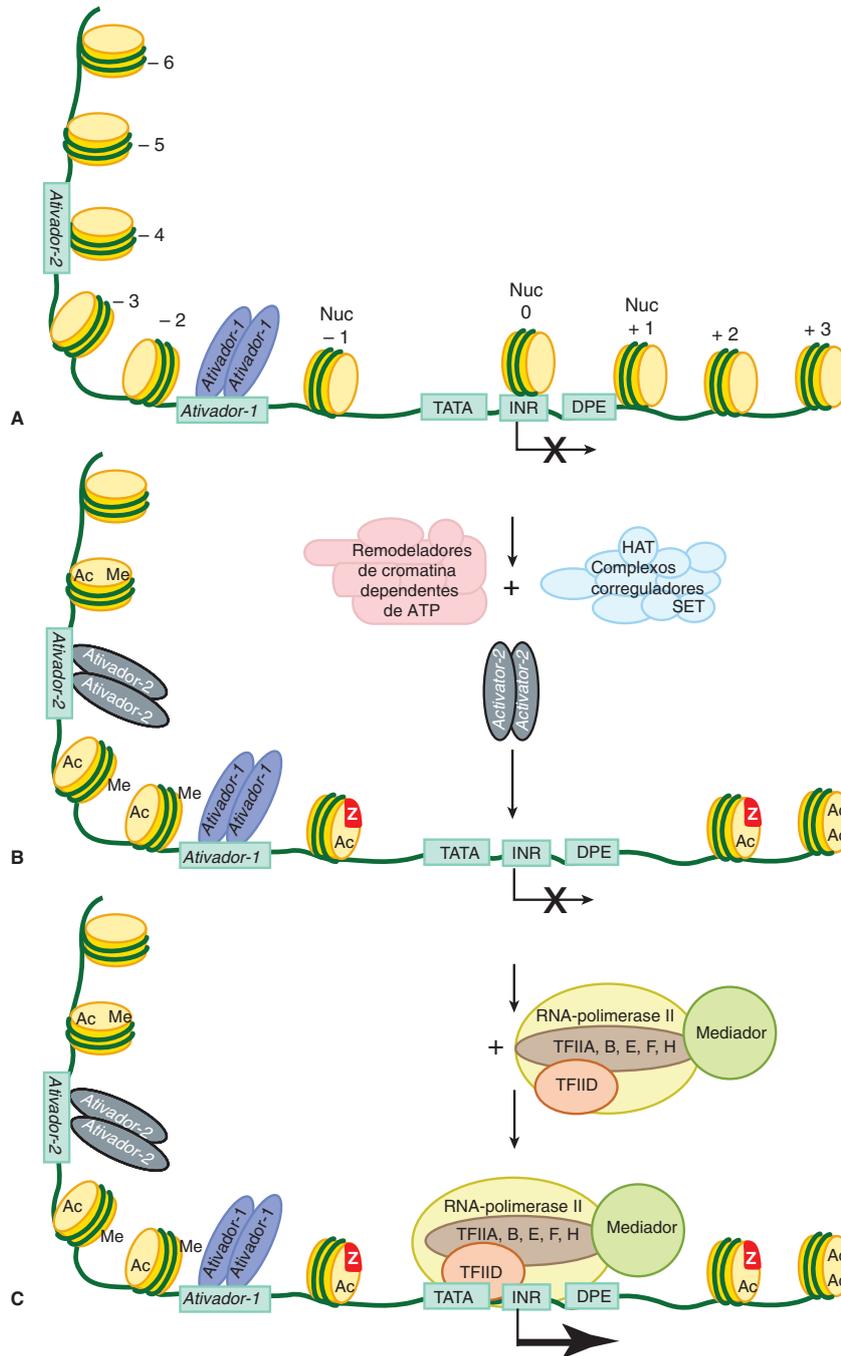


FIGURA 36-10 Modificações covalentes, remodelamento e expulsão dos nucleossomos por correguladores ativos da cromatina modulam a formação e a transcrição do PIC. Um gene inativo codificador de mRNA (ver X sobre TSS), mostrado em **A**, com um único fator de transcrição dimérico (*Ativador 1*; ovas violetas) ligado ao seu sítio de ligação intensificador cognato (*Ativador-1*). Este elemento intensificador particular era livre de nucleossomos e, portanto, disponível para interação com sua proteína de ligação ativadora cognata. Entretanto, esse gene ainda está inativo (X sobre TSS) devido ao fato de uma parte do seu intensificador (neste ilustração, o intensificador é bipartido e composto pelos sítios de ligação do DNA *Ativador-1* e *Ativador-2*) e a totalidade de promotores serem cobertos por nucleossomos. Os nucleossomos apresentam aproximadamente 150 pb de DNA enrolado ao redor do octâmero de histona. Portanto, o único nucleossomo sobre o promotor ocluirá o acesso do maquinário da transcrição (pol II+GTFs) aos elementos dos promotores TATA, Inr e/ou DPE. **(B)** O intensificador *Ativador-1* ligado ao DNA interage com qualquer um de uma série de remodeladores de cromatina dependentes de ATP distintos e com complexos correguladores modificadores de cromatina. Em conjunto, esses correguladores possuem a capacidade para mover ou remodelar (i.e., mudar o conteúdo da histona octomérica e/ou remover os nucleossomos), por meio da ação de vários remodeladores dependentes de ATP, bem como das histonas nucleossômicas modificadas de modo covalente, utilizando acetilases intrínsecas (HAT; resulta na acetilação [Ac]) e metilases (SET; resulta na metilação [Me]), entre outras PTMs; Tabela 35-1) transportadas por subunidades desses complexos. **(C)** As mudanças resultantes na posição e na ocupação do nucleossomo (i.e., nucleossomo - 4 e nucleossomo 0), e na composição (nucleossomo - 1 e nucleossomo + 1) permitem, assim, a ligação do segundo dímero *Ativador-2* às sequências de DNA do *Ativador-2*, que levam à ligação do maquinário de transcrição (TFIIA, B, D, E, F, H; Polimerase II e Mediator) ao promotor (TATA-INR-DPE) e à formação de um PIC ativo, que leva à transcrição ativa.

Sinais específicos regulam a terminação da transcrição

Os **sinais para a terminação da transcrição** pela RNA-polimerase II eucariótica são pouco compreendidos. Os sinais de terminação parecem existir bem mais a jusante da sequência codificadora dos genes de eucariotos. Por exemplo, o sinal de terminação da transcrição para a β -globina de ratos ocorre em várias posições de 1.000 a 2.000 bases além do sítio em que a cauda de poli(A) do mRNA será eventualmente adicionada. Pouco se conhece sobre o processo de terminação ou se os fatores de terminação específicos, semelhantes ao fator bacteriano ρ , podem estar envolvidos. Entretanto, sabe-se que a formação do terminal 3' do mRNA, que é produzido de maneira pós-transcricional, é, de algum modo, acoplada a eventos ou estruturas formadas no momento e no local da iniciação. Além disso, a formação do mRNA e, nesse caso, a formação da terminação 3' do mRNA, depende de uma estrutura especial presente na terminação C da maior subunidade de RNA-polimerase II, o **domínio C-terminal (CTD)** (ver a seguir), e esse processo parece envolver pelo menos duas etapas da seguinte maneira. Após a RNA-polimerase II ter percorrido a região da unidade de transcrição codificadora da extremidade 3' do transcrito, as endonucleases de RNA clivam o transcrito primário em uma posição cerca de 15 bases na direção 3' da sequência-consenso **AAUAAA**, que serve nos transcritos de eucariotos como sinal de clivagem e poliadenilação. Por fim, esse terminal 3' recém-formado é poliadenilado no nucleoplasma, como descrito adiante.

O COMPLEXO DE TRANSCRIÇÃO EM EUCARIOTOS

Um aparato complexo composto por até 50 proteínas exclusivas proporciona uma transcrição precisa e regulável de genes de eucariotos. As enzimas RNA-polimerases (pol I, pol II e pol III) transcrevem a informação contida na fita-molde do DNA em RNA. Essas polimerases devem reconhecer um local específico no promotor para iniciar a transcrição no nucleotídeo certo. Em contrapartida à situação em procariotos, as RNA-polimerases de eucariotos por si não são capazes de discriminar entre as sequências do promotor e outras regiões não promotoras do DNA em tubos de ensaio. Todas as formas de RNA-polimerases de eucariotos necessitam de outras proteínas, chamadas de fatores de transcrição gerais (GTFs). A RNA-polimerase II necessita de TFIIA, B, D (ou TBP), E, F e H tanto para facilitar a ligação ao promotor específico da enzima quanto para a formação do complexo de pré-iniciação (PIC). As RNA-polimerases I e III precisam de suas próprias polimerases e GTFs específicos. Além disso, a RNA-polimerase II e os GTFs não respondem às proteínas ativadoras e podem apenas catalisar a transcrição basal ou não regulada *in vitro*. Outro conjunto de proteínas – **coativadoras** ou **correguladoras** – trabalham em conjunto a proteínas transativadoras ligadoras de DNA, descritas anteriormente, para se comunicar com Pol II/GTFs para regular a velocidade da transcrição (ver a seguir).

Formação do complexo de transcrição Pol II

Em bactérias, o complexo holoenzima da polimerase-fator σ , σ , liga-se seletiva e diretamente ao DNA promotor para formar o PIC. A situação é muito mais complexa em genes de eucariotos. Os genes codificadores de mRNA, que são transcritos pela pol II, são descritos como um exemplo. No caso dos genes transcritos pela pol II, a função dos fatores σ é assumida por várias proteínas. A formação do PIC necessita de pol II e dos seis GTFs (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH). Esses GTFs servem para promover a transcrição da RNA-polimerase II essencialmente em todos os genes. Alguns desses GTFs são compostos por múltiplas subunidades. O **TFIID**, que se liga ao elemento promotor da TATA *box* por meio de sua subunidade TBP, é o único desses fatores que é independentemente capaz de se ligar especificamente e com alta afinidade ao promotor de DNA. O TFIID consiste em 15 subunidades, TBP e 14 fatores associados à TBP (TAFs).

A TBP liga-se à TATA *box* na cavidade menor do DNA (a maioria dos fatores de transcrição liga-se à cavidade maior) e provoca uma curvatura ou dobra de aproximadamente 100 graus na hélice do DNA. Essa curvatura facilita a interação dos TAFs com outros componentes do complexo de iniciação da transcrição, com os promotores multicomponentes de eucariotos e, possivelmente, com os fatores ligados a elementos a montante. Embora inicialmente definido como um componente necessário somente para a transcrição de promotores de genes pol II, a TBP, em virtude de sua associação com conjuntos distintos de TAFs polimerase-específicos, é também um componente importante dos complexos de iniciação da transcrição de pol I e pol II, mesmo que eles não contenham as TATA *box*.

A ligação do TFIID marca um promotor específico para a transcrição. Das várias etapas subsequentes *in vitro*, a primeira é a ligação do TFIIA e, depois, o TFIIB liga-se ao complexo promotor-TFIID. Isso resulta em um complexo ternário estável, que, então, é localizado mais precisamente e ligado mais fortemente ao sítio de início da transcrição. Esse complexo então atrai e amarra o complexo pol II-TFIIF ao promotor. A adição de TFIIE e TFIIH são as etapas finais na formação do PIC. O TFIIE parece se ligar ao complexo com pol II-TFIIF, e o TFIIH é, então, recrutado. Cada um desses eventos de ligação aumenta o tamanho do complexo, de modo que, no fim, são cobertos aproximadamente 60 pb (de -30 a +30 em relação ao TSS + 1) (Figura 36-9). O PIC está agora completo e é capaz da transcrição basal iniciada a partir do nucleotídeo correto. Em genes sem TATA *box*, os mesmos fatores são necessários. Nesses casos, o Inr e/ou o DPE servem para (ver Figura 36-8) posicionar o complexo para a iniciação da transcrição precisa.

A acessibilidade ao promotor – e, portanto, a formação do PIC – é frequentemente modulada por nucleossomos

Em alguns genes de eucariotos, o maquinário da transcrição (pol II, etc.) não pode acessar as sequências do promotor (i.e., TATA–INR–DPE), pois esses elementos essenciais do promotor estão envolvidos nos nucleossomos (ver Figuras 35-2, 35-3 e 36-10). Somente após a ligação dos fatores de transcrição

ao intensificador do DNA a montante do promotor na molécula e após o recrutamento da cromatina, remodelando e modificando os fatores correguladores como Swi/Snf, SRC-1, p300/CBP (ver Capítulo 42), ou fatores P/CAF, é que os nucleossomos repressores são removidos (Figura 36-10). Uma vez que o promotor é “aberto” após a expulsão do nucleossomo, os GTFs e a RNA-polimerase II podem se ligar e iniciar a transcrição do gene de mRNA. Essa ligação de transativadores e correguladores podem ser sensíveis a e/ou diretamente controlar a composição e/ou o estado de modificação covalente do DNA e das histonas no interior dos nucleossomos e ao redor do promotor e do intensificador, aumentando ou diminuindo, portanto, a capacidade de todos os outros componentes necessários para a formação do PIC interagirem com um gene específico. O chamado **código epigenético de DNA e das modificações de histonas e proteínas** pode contribuir de forma importante para o controle da transcrição genética. De fato, as mutações nas proteínas que catalisam (escritoras do código) removem (apagadoras do código) ou se ligam de modo diferenciado (leituras do código) ao DNA modificado e/ou às histonas podem levar à doença humana.

A fosforilação ativa a pol II

A pol II de eucariotos é composta por 12 subunidades. Como observado, as duas subunidades maiores de pol II (PM 220 e 150 kDa) são homólogas às subunidades bacterianas β' e β. Além do maior número de subunidades, a pol II de eucariotos difere de sua equivalente em procariotos-apresentar uma série de repetições hepta com a sequência-consenso Tir-Ser-Pro-Tre-Ser-Pro-Ser no terminal carboxila da maior subunidade de pol II. Esse **domínio carboxiterminal (CTD)** apresenta 26 unidades repetidas em leveduras e 52 unidades em mamíferos. O CTD é um substrato para várias enzimas (cinases, fosfatases, protil-isomerases, glicosilases). A fosforilação do CTD foi descoberta primeiramente como CTD PTM. Em outras proteínas, a subunidade cinase de TFIID pode modificar o CTD. O CTD modificado de modo covalente é o sítio de ligação para um grande conjunto de proteínas e interage com muitas enzimas modificadoras e processadoras de mRNA e proteínas de transporte nuclear. A associação desses fatores com o CTD da RNA-polimerase II (e outros componentes da maquinaria basal) serve, portanto, para acoplar o início da transcrição com o *splicing* do mRNA facilitado pelo capeamento para a formação da extremidade 3' e o transporte da enzima para o citoplasma (ver a seguir). A polimerização da pol II é ativada quando fosforilada nos resíduos Ser e Tre e exibe atividade reduzida quando o CTD é desfosforilado. A fosforilação/desfosforilação do CTD é essencial para a remoção do promotor, o alongamento e a terminação e, ainda, para o processamento adequado do mRNA. A pol II que não possui a cauda de CTD é incapaz de ativar a transcrição, e as células que expressam pol II sem o CTD são inviáveis. Esses resultados diminuem a importância desse domínio para a biogênese do mRNA.

A pol II pode estar associada a outras proteínas, denominadas **mediadoras** ou proteínas **Med**, para formar um complexo, algumas vezes chamado de holoenzima de pol II;

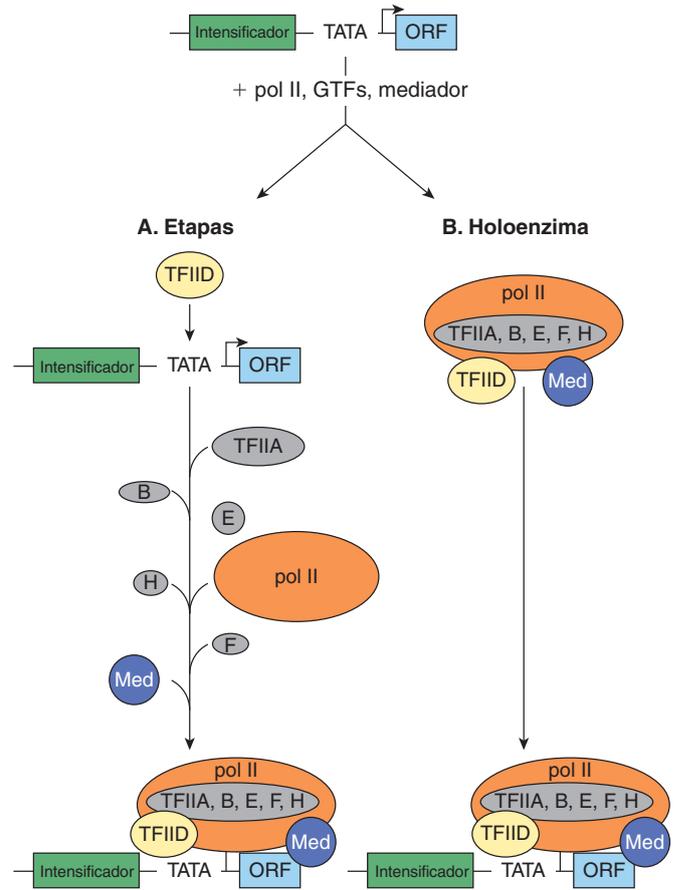


FIGURA 36-11 Modelos para a formação de um complexo pré-iniciação de RNA-polimerase II. Na parte superior, é mostrada uma típica unidade de transcrição do gene que codifica mRNA: intensificador-promotor (TATA)-TSS (seta dobrada) e ORF (quadro de leitura aberto) no interior da região transcrita. Os PICs formam-se por pelo menos dois mecanismos distintos: **(A)** a ligação em etapas de GTFs, pol II e mediador (Med), ou **(B)** pela ligação de um único complexo multiproteínico composto por pol II, Med e seis GTFs. As proteínas transativadoras ligadas ao DNA ligam especificamente a intensificadores e facilitam, em parte, a formação do PIC (ou seu funcionamento) pela ligação direta às subunidades TFIID-TAF ou às subunidades Med do mediador (não mostrado, ver Figura 36-10); os mecanismos moleculares pelos quais as interações proteína-proteína estimulam a transcrição permanecem um assunto de investigação intensa.

esse complexo pode se formar no promotor ou em solução antes da formação do PIC (ver a seguir). As proteínas Med (mais de 30 proteínas; Med1 a Med31) são essenciais para a regulação adequada da transcrição de pol II, servindo para vários papéis, ativando e reprimindo a transcrição. Assim, a mediadora, como o TFIID, é um corregulador transcricional (Figura 36-11).

O papel dos ativadores e correguladores da transcrição

O TFIID foi originalmente considerado como uma proteína única, a TBP. Entretanto, diversas evidências levaram à importante descoberta de que o TFIID é, na verdade, um complexo composto por TBP e por 14 TAFs. A primeira evidência

TABELA 36-3 Alguns dos elementos controladores da transcrição da RNA-polimerase II de mamíferos, suas sequências-consenso e os fatores que se ligam a eles

Elemento	Sequência-consenso	Fator
TATA <i>box</i>	TATAAA	TBP/TFIID
Inr	T/CT/CANT/AT/CT/C	TFIID
DPE	A/GGA/TCGTG	TFIID
CAAT <i>box</i>	CCAATC	C/EBP,* NF-Y*
GC <i>box</i>	GGGCGG	Sp1*
	CAACTGAC	Myo D
	T/CGGa/cN ₃ GCCAA	NF1*
Octâmero Ig	ATGCAAAT	Oct1, 2, 4, 6*
AP1	TGAG/CTC/AA	Jun, Fos, ATF*
Resposta sérica	GATGCCATA	SRF
Choque térmico	(NGAAN) ₃	HSF

Nota: todos os elementos listados são escritos na direção 5'-3', e apenas a fita do topo do elemento duplo é mostrada. Uma lista completa incluiria centenas de exemplos. O asterisco (*) significa que há vários membros dessa família. Os nucleotídeos separados por uma / indicam que um dos dois nucleotídeos pode estar nessa posição (i.e., T/C na primeira posição do Inr indica que tanto T quanto C podem ocupar essa posição); N indica que qualquer uma das quatro bases de DNA A, G, C ou T pode ocupar essa determinada posição no elemento *cis* indicado.

de que o TFIID era mais complexo do que apenas moléculas de TBP veio da observação de que a TBP se liga a um segmento de 10 pb de DNA, imediatamente sobre a TATA *box* do gene, ao passo que holo-TFIID nativo cobre uma região de 35 ou mais pb (Figura 36-9). Segundo, a TBP expressa de *E. coli* recombinante purificada apresenta massa molecular de 20 a 40 kDa (dependendo da espécie), e o complexo TFIID nativo apresenta massa de cerca de 1.000 kDa. Finalmente, e talvez mais importante, a TBP apoia a transcrição basal, mas não a transcrição aumentada gerada por certos ativadores, por exemplo, o Sp1 ligado à GC *box*. O TFIID, por outro lado, apoia tanto a transcrição basal quanto a transcrição intensificada por Sp1, Oct1, AP1, CTF, ATF, etc. (Tabela 36-3). Os TAF são essenciais para essa transcrição intensificada por ativador. Há, provavelmente, várias formas de TFIID que diferem ligeiramente em seus complementos de TAFs. Assim, diferentes combinações de TAFs com TBP – ou um dos vários recentemente descobertos fatores semelhantes à TBP (TLFs) – ligam-se a diferentes promotores, e relatos recentes sugerem que isso pode ser responsável pela ativação gênica seletiva em células ou tecidos, observada em vários promotores e para diferentes intensidades de certos promotores. Os TAFs, uma vez necessários para a ação de ativadores, são, com frequência, chamados de coativadores ou correguladores. Assim, há três classes de fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes da pol II: pol II e GTFs, correguladores e ativadores/repressores ligadores de DNA (Tabela 36-4). A maneira como essas classes de proteínas interagem para controlar tanto o local quanto a frequência da transcrição é uma questão de importância central e investigação ativa. Atualmente, pensa-se que os correguladores atuam como uma ponte entre os transativadores ligadores de DNA e poli II/GTFs e modificam a cromatina.

TABELA 36-4 Três classes de fatores de transcrição envolvidos na transcrição do gene de mRNA

Mecanismos gerais	Componentes específicos
Componentes basais	RNA-polimerase II, TBP, TFIIA, B, D, E, F e H
Correguladores	TAFs (TBP + TAFs) = TFIID; alguns genes
	Mediador, Meds
	Modificadores de cromatina
	Remodeladores de cromatina
Ativadores	SP1, ATF, CTF, AP1, etc.

Dois modelos podem explicar a formação do complexo de pré-iniciação

A formação do PIC descrita é baseada na adição sequencial de componentes purificados, como observado por meio de experimentos *in vitro*. Uma característica essencial desse modelo é que a formação do PIC ocorre em um molde de DNA em que todas as proteínas de transcrição têm livre acesso ao DNA. Por isso, os ativadores de transcrição, que possuem ligações de DNA autônomas e domínios de ativação (ver Capítulo 38), funcionam estimulando a formação do PIC. Aqui, os complexos TAF ou mediadores são considerados como fatores de ponte que fazem a comunicação entre os ativadores ligados a montante da molécula e os GTFs e pol II. Essa imagem assume que há uma **formação em etapas** do PIC – promovido por várias interações entre os ativadores, coativadores e componentes do PIC, como ilustrado no painel A da Figura 36-11. Esse modelo é apoiado por observações de que muitas dessas proteínas podem, na verdade, ligar-se umas às outras *in vitro*.

Evidências recentes sugerem que existe outro mecanismo possível de formação do PIC e, portanto, da regulação da transcrição. Primeiro, os grandes complexos pré-montados de GTFs e pol II são encontrados em extratos celulares, e esses complexos podem se associar ao promotor em uma única etapa. Segundo, a velocidade de transcrição alcançada quando os ativadores são adicionados às concentrações limitantes da holoenzima pol II pode ser combinada por um aumento artificial na concentração de pol II e GTFs, na ausência de ativadores. Assim, pelo menos *in vitro*, pode-se estabelecer condições nas quais os ativadores não são, em si, absolutamente essenciais para a formação do PIC. Essas observações levaram à **hipótese do “recrutamento”**, que já foi testada experimentalmente. Simplificando, o papel dos ativadores e de alguns coativadores pode ser o de apenas recrutar um complexo pré-formado de holoenzima-GTF para o promotor. A exigência para um domínio de ativação é contornada quando um componente de TFIID ou da holoenzima pol II são artificialmente amarrados, utilizando técnicas de DNA recombinante, ao DBD de um ativador. Essa ancoragem, por meio do componente DBD da molécula ativadora, leva a uma estrutura de transcrição competente, e não há qualquer requisito adicional para o domínio de ativação do ativador. Nesse sentido, o papel dos domínios de ativação é o de direcionar os complexos pré-formados de holoenzima-GTF para o promotor; eles não auxiliam na formação do PIC (ver painel B, Figura 36-11). Nesse modelo, a eficácia do processo de recrutamento determina diretamente a taxa de transcrição de um determinado promotor.

AS MOLÉCULAS DE RNA SÃO PROCESSADAS ANTES DE SE TORNAREM FUNCIONAIS

Em organismos procarióticos, os transcritos primários dos genes codificadores de mRNA começam a servir como moldes de tradução antes mesmo de terem completado sua transcrição. Isso pode ocorrer porque o local de transcrição não é compartimentalizado em um núcleo como acontece em organismos eucarióticos. Assim, a transcrição e a tradução são acopladas em células procarióticas. Conseqüentemente, os mRNAs de procariontes são submetidos a pouco processamento antes de realizar sua função planejada na síntese de proteínas. Portanto, a regulação adequada de alguns genes (p. ex., o óperon *Trp*) depende desse acoplamento de transcrição e tradução. As moléculas de rRNA e tRNA de procariontes são transcritas em unidades consideravelmente maiores do que a molécula final. Na verdade, muitas das unidades de transcrição de tRNA codificam mais de uma molécula de tRNA. Assim, em procariotos, o processamento dessas moléculas precursoras de rRNA e tRNA é necessário para a geração de moléculas funcionais maduras.

Quase todas as transcrições primárias de RNAs de eucariotos sofrem um processamento extenso entre o momento que são sintetizadas até o momento de sua última função, seja como mRNA, miRNAs ou como componente da maquinaria de tradução, como rRNA ou tRNA. O processamento ocorre principalmente no interior do núcleo. Os processos de **transcrição**,

de processamento do RNA e, inclusive, de transporte do RNA a partir do núcleo são altamente coordenados. Com efeito, um coativador transcricional denominado SAGA, em leveduras, e P/CAF, em células humanas, “conecta” a ativação da transcrição ao processamento do RNA, recrutando um segundo complexo denominado TREX para alongamento da transcrição, de *splicing* e de exportação nuclear. O TREX (**transcrição-exportação**) representa uma ligação molecular entre os complexos de alongamento da transcrição, o maquinário de *splicing* do RNA e a exportação nuclear (ver **Figura 36-12**). Esse acoplamento, presumivelmente, aumenta muito tanto a fidelidade e taxa de processamento quanto o movimento do mRNA para o citoplasma para ser traduzido.

As porções codificadoras (éxons) da maioria dos genes de eucariotos são interrompidas por íntrons

Sequências de RNA que aparecem em RNAs maduros são denominadas éxons. Em genes que codificam mRNA, os éxons são frequentemente interrompidos por longas sequências de DNA que não aparecem no mRNA maduro e também não contribuem para a informação genética finalmente traduzida em uma sequência de aminoácidos de uma molécula de proteína (ver Capítulo 35). De fato, essas sequências frequentemente interrompem a região codificadora dos genes estruturais. Essas **sequências intervenientes**, ou **íntrons**, existem no interior da

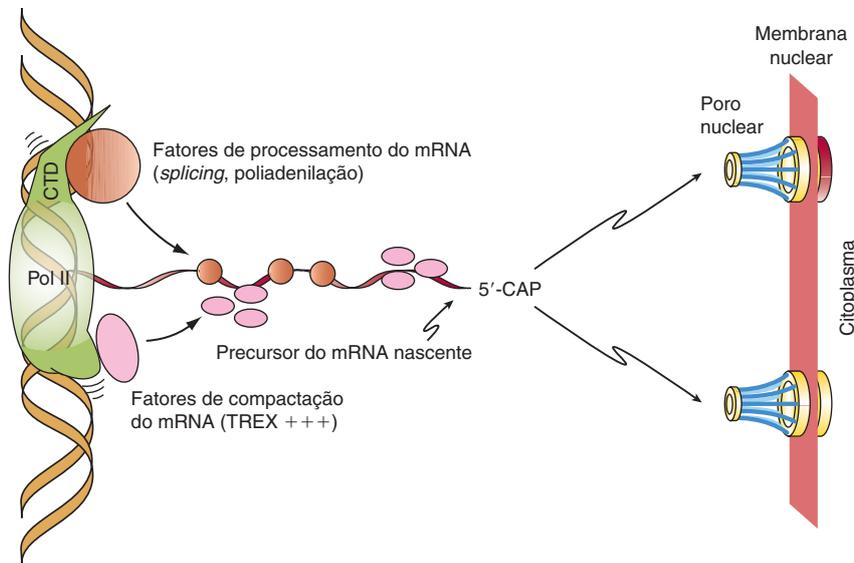


FIGURA 36-12 A transcrição gênica de mRNA mediada pela RNA-polimerase II é cotranscricionalmente acoplada ao processamento e ao transporte de RNA. É mostrada a RNA-pol II transcrevendo ativamente um gene codificador de mRNA (alongamento de cima para baixo na figura). Os fatores de processamento do RNA (i.e., os fatores de *splicing* contendo motivos SR/RRM, bem como poliadenilação e fatores de terminação) interagem com o domínio C-terminal (CTD), composto por múltiplas cópias de um heptapeptídeo com a sequência-consenso -YSPTSPS- de pol II, e fatores de empacotamento do mRNA, como os complexos THO/TREX (ovais cor-de-rosa), são recrutados para o transcrito primário do RNA nascente, por meio de interações diretas com pol II, como mostrado, ou por meio de interações com SR/fatores de *splicing* (círculos marrons), residentes no mRNA nascente. O CTD não é desenhado em escala. O CTD da subunidade Rpb1 da pol II, evolutivamente conservado, tem, na verdade, 5 a 10 vezes o comprimento da polimerase, devido às suas várias prolínas e conseqüente natureza não estruturada, representando, portanto, um significativo local de ancoragem para o processamento de RNA e proteínas de transporte. Em ambos os casos, as cadeias de mRNA nascentes são mais rápida e precisamente processadas devido ao rápido recrutamento desses vários fatores à cadeia crescente de mRNA (precursor). Após o processamento adequado do mRNA, o mRNA maduro é liberado para os poros nucleares (Figuras 36-17 e 46-4), pontilhando a membrana nuclear, em que, sobre o transporte através dos poros, os mRNAs podem ser ligados aos ribossomos e traduzidos em proteínas. (Adaptada de Jensen et al.: *Mol Cell*. 2005;11:1129–1138.)

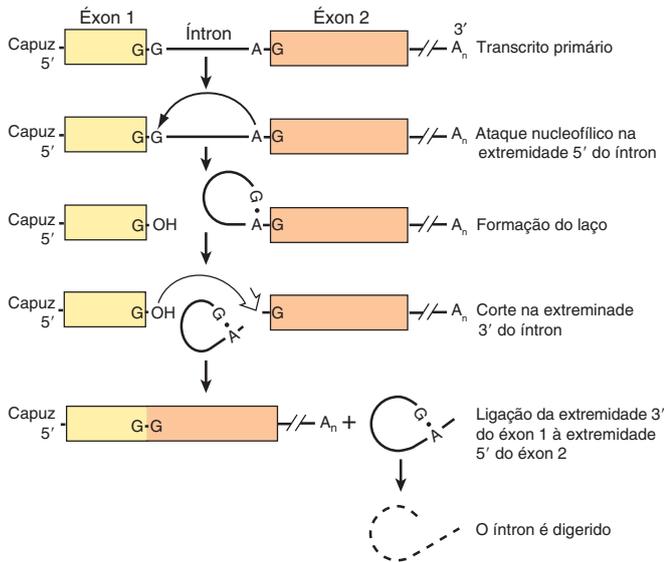


FIGURA 36-13 O processamento do transcrito primário para mRNA. Neste transcrito hipotético, a extremidade 5' (à esquerda) do íntron é cortada (→) e uma estrutura assemelha-se a formas em laço (*lariat*) entre G na extremidade 5' do íntron e um A próximo à extremidade 3', na sequência-consenso UACUAAC. Essa sequência é chamada de ponto de ramificação e é a sequência 3' com mais A que forma a ligação 5'-2' com o G. A extremidade 3' (à direita) do íntron é, então, cortada (↓). Isso libera o laço, que é digerido, e o éxon 1 é unido ao éxon 2 nos resíduos de G.

maioria (mas não de todos) dos genes codificadores de mRNA de eucariotos superiores. Em genes codificadores de mRNAs humanos, os éxons variam em cerca de 150 nt, ao passo que os íntrons são muito mais heterogêneos, variando de 10 a 100 nt até 30 mil nucleotídeos em comprimento. As sequências de íntrons de RNA são clivadas para fora do transcrito e os éxons da transcrição são adequadamente unidos em conjunto no núcleo, antes que a molécula resultante de mRNA apareça no citoplasma para a tradução (Figuras 36-13 e 36-14).

Os íntrons são removidos e os éxons são unidos por *splicing*

Diversos mecanismos de reação de *splicing* diferentes para a remoção de íntrons foram descritos. O mais frequentemente utilizado em células eucarióticas é descrito adiante. Embora as sequências de nucleotídeos nos íntrons de vários transcritos de eucariotos – e até aquelas no interior de um único transcrito – sejam muito heterogêneas, existem sequências razoavelmente conservadas em cada uma das duas junções de éxon-íntron (*splice*) e no ponto de ramificação, que está localizado

20 a 40 nucleotídeos a montante do sítio 3' do *splice* (ver as sequências-consenso na Figura 36-14). Um complexo multicomponente especial, o **spliceossomo**, está envolvido na conversão do transcrito primário em mRNA. Os spliceossomos consistem em transcritos primários, cinco snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) e mais de 60 proteínas, e muitas delas contêm **RRM (RNA de reconhecimento)** conservados e **motivos de proteínas SR (serina-arginina)**. Coletivamente, as cinco proteínas contendo snRNAs e RRM/SR formam uma **ribonucleoproteína nuclear pequena**, chamada de **complexo snRNP**. É provável que esse spliceossomo penta-snRNP se forme antes da interação com os precursores de mRNA. Os snRNPs posicionam os segmentos de RNA de éxons e íntrons para as reações de *splicing* necessárias. A reação de *splicing* inicia com um corte na junção do éxon 5' (doador, à esquerda) e do íntron (Figura 36-13). Isso é realizado por um ataque nucleofílico por um resíduo de adenilato na sequência ponto de ramificação localizada imediatamente a montante da extremidade 3' desse íntron. O terminal 5' livre forma, a seguir, um circuito ou uma estrutura em laço que está ligada por uma ligação fosfodiéster 5'-2' pouco comum a um A reativo na sequência do ponto de ramificação PiNPiPuAPI (Figura 36-14). Esse resíduo adenilato está geralmente localizado 20 a 30 nucleotídeos a montante da extremidade 3' do íntron a ser removido. O ponto de ramificação identifica o sítio do *splicing* 3'. Um segundo corte é feito na junção do íntron com o éxon 3' (doador, à direita). Nessa segunda reação de transesterificação, o hidroxil 3' do éxon a montante da molécula ataca o fosfato 5' na fronteira do éxon-íntron a jusante na molécula, e a estrutura em laço que contém o íntron é liberada e hidrolisada. Os éxons 5' e 3' ligam-se para formar uma sequência contínua.

Os snRNPs e as proteínas associadas são necessários para a formação de várias estruturas e intermediários. O U1 no interior do complexo snRNP liga-se primeiro pelo pareamento de bases à fronteira 5' éxon-íntron. O U2, no interior do complexo snRNP, liga-se, então, por meio do pareamento de bases, ao ponto de ramificação e, assim, expõe o resíduo nucleofílico A. Os U4/U5/U6, no interior do complexo snRNP, medeiam o desenrolamento dependente de ATP mediado por proteína, que resulta na interrupção no complexo de bases pareadas U4-U6, com a liberação de U4. O U6 é, então, capaz de interagir primeiro com o U2 e, a seguir, com o U1. Essas interações servem para aproximar o sítio de *splice* 5', o ponto de ramificação com seu A reativo e o sítio de *splice* 3'. Esse alinhamento é intensificado por U5. O processo também resulta na formação do circuito ou estrutura em laço. As duas extremidades são clivadas, provavelmente pelos U2-U6 no interior do complexo snRNP. O U6 é certamente essencial,

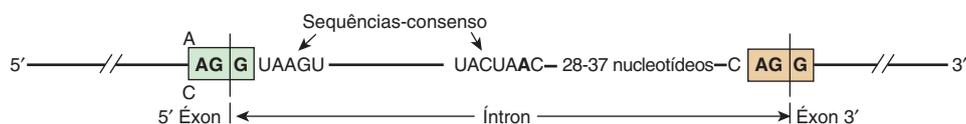


FIGURA 36-14 Sequências-consenso nas junções *splice*. As sequências 5' (doador; à esquerda) e 3' (aceptor; à direita) são mostradas. Também é mostrada a sequência-consenso da levedura (UACUAAC) para o ponto de ramificação. Em células de mamíferos, essa sequência-consenso é PiNPiPuAPI, em que Pi é uma pirimidina, Pu é uma purina e N é qualquer nucleotídeo. O ponto de ramificação está localizado 20 a 40 nucleotídeos a montante do sítio 3' de *splice*.

uma vez que as leveduras deficientes nesse snRNA não são viáveis. É importante notar que o RNA funciona como um agente catalítico. Essa sequência de eventos é, então, repetida em genes que contêm múltiplos íntrons. Nesses casos, um padrão definitivo é seguido por cada gene, embora os íntrons não sejam necessariamente removidos na sequência - 1, depois 2, depois 3, etc.

O *splicing* alternativo proporciona diferentes RNAs mensageiros

O processamento das moléculas de mRNA é um local para a regulação da expressão gênica. Os padrões alternativos de *splicing* de mRNA resultam de mecanismos adaptativos específicos de tecidos e de mecanismos de controle do desenvolvimento. Curiosamente, estudos recentes sugerem que o *splicing* alternativo é controlado, pelo menos em parte, por marcações epigenéticas de cromatina (i.e., Tabela 35-1). Essa forma de acoplamento da transcrição ao processamento do mRNA pode ser mediada cineticamente e/ou por interações entre histonas específicas PTMs e fatores de *splicing* alternativo que podem carregar nos transcritos nascentes do gene de mRNA durante o processo de transcrição (Figura 36-12).

Como mencionado, a sequência de eventos do *splicing* de éxon-íntron geralmente segue uma ordem hierárquica para um determinado gene. O fato de várias estruturas de RNA complexas serem formadas durante o *splicing* - e de alguns snRNAs e proteínas estarem envolvidos - oferece inúmeras possibilidades para uma mudança dessa ordem e para a geração de diferentes mRNAs. Do mesmo modo, a utilização de sítios alternativos de poliadenilação de terminação-clivagem também resulta em variabilidade no mRNA. Alguns exemplos esquemáticos desses processos, todos ocorrendo na natureza, são mostrados na **Figura 36-15**.

Splicings defeituosos podem provocar doenças. Pelo menos uma forma de β-talassemia, uma doença na qual ocorre uma grave subexpressão do gene da β-globina da hemoglobina, parece resultar da troca de um nucleotídeo na junção éxon-íntron, impedindo a remoção do íntron e, portanto, levando a uma diminuição ou ausência da síntese da cadeia β da proteína. Isso deve-se ao fato de a sequência de leitura da tradução normal do mRNA ser interrompida por um defeito no processo fundamental de *splicing* do RNA, ressaltando a precisão que esse processo de *splicing* RNA-RNA deve manter.

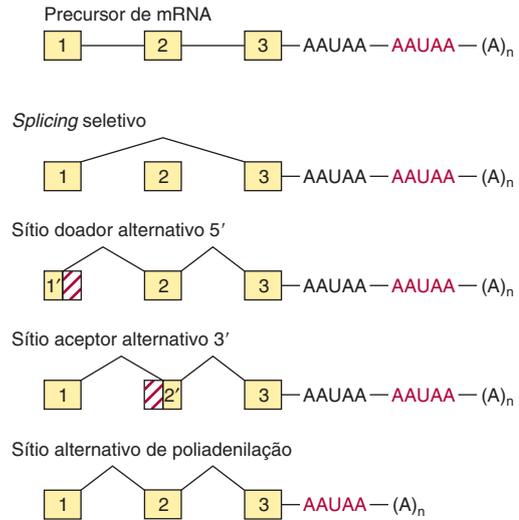


FIGURA 36-15 Mecanismos de processamento alternativo dos precursores de mRNA. Essa forma de processamento do mRNA envolve a inclusão ou a exclusão seletiva de éxons, o uso de sítios de doador 5' ou receptor 3' alternativos e o uso de locais diferentes de poliadenilação, além de aumentar muito o potencial de codificação proteico diferencial do genoma.

A utilização do promotor alternativo proporciona uma forma de regulação

A regulação da expressão do gene tecido-específica pode ser fornecida por *splicing* alternativo, como observado, pelos elementos de controle no promotor ou pelo uso de promotores alternativos. O gene da glicocinase (*GK*) é composto por 10 éxons intercalados por 9 íntrons. A sequência de éxons 2 a 10 é idêntica nas células β-pancreáticas e hepáticas, os principais tecidos que expressam a proteína *GK*. A expressão do gene *GK* é regulada de modo muito diferente - por dois tipos de promotores - nesses dois tecidos. O promotor hepático e o éxon 1L estão localizados próximos aos éxons 2 a 10; o éxon 1L está ligado diretamente ao éxon 2. Por outro lado, o promotor das células β-pancreáticas está localizado cerca de 30 kpb a montante. Nesse caso, a fronteira 3' do éxon 1B está ligada à fronteira 5' do éxon 2. O promotor hepático e o éxon 1L são excluídos e removidos durante a reação de *splicing* (ver **Figura 36-16**). A existência de múltiplos promotores distintos permite padrões de expressão celulares e teciduais específicos de um

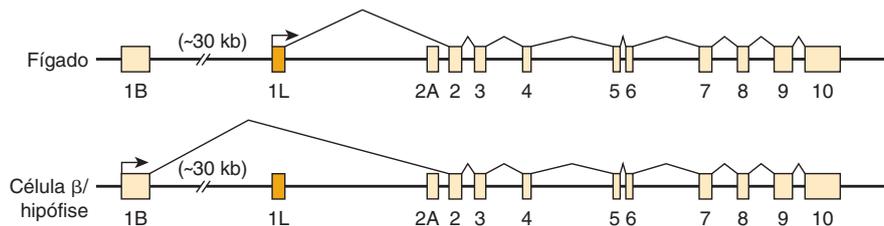


FIGURA 36-16 Uso de promotor alternativo nos genes da glicocinase (*GK*) nas células do fígado e nas células β-pancreáticas. A regulação diferencial do gene da glicocinase é feita por meio do uso de promotores teciduais específicos. O gene promotor *GK* das células β e o éxon 1B estão localizados cerca de 30 kpb a montante do promotor do fígado e do éxon 1L. Cada promotor tem uma estrutura única e é regulado de maneira diferente. Os éxons 2 a 10 são idênticos nos dois genes, e as proteínas *GK* codificadas pelos mRNAs das células hepáticas e células β têm propriedades cinéticas idênticas.

gene específico (mRNA). No caso do *GK*, a insulina e o cAMP (ver Capítulo 42) controlam a transcrição de *GK* no fígado, ao passo que a glicose controla a expressão de *GK* nas células β .

Os RNAs ribossomais e a maior parte dos RNAs de transferência são processados a partir de precursores maiores

Em células de mamíferos, as três moléculas de rRNA (28S, 18S, 5,8S) são transcritas como parte de uma única grande molécula precursora de 45S. O precursor é subsequentemente processado no nucléolo para fornecer esses três componentes de RNA para as subunidades ribossomais encontradas no citoplasma. Os genes de rRNA estão localizados nos nucléolos das células de mamíferos. Centenas de cópias desses genes estão presentes em cada célula. Esse grande número de genes é necessário para sintetizar cópias suficientes de cada tipo de rRNA para formar os 10^7 ribossomos necessários para cada replicação celular. Enquanto uma única molécula de mRNA pode ser copiada em 10^5 moléculas de proteínas, proporcionando uma grande amplificação, os rRNAs são produtos finais. Essa ausência de amplificação requer um grande número de genes e uma alta taxa de transcrição, geralmente sincronizados com a taxa de crescimento celular. Da mesma forma, os tRNAs são frequentemente sintetizados como precursores, com sequências extras tanto de sequências 5' quanto 3' compondo o tRNA maduro. Uma pequena fração de tRNAs contém íntrons.

OS RNAs PODEM SER EXTENSIVAMENTE MODIFICADOS

Essencialmente todos os RNAs são modificados de modo covalente após a transcrição. Está claro que pelo menos algumas dessas modificações são reguladoras.

O RNA mensageiro é modificado nas extremidades 5' e 3'

Como mencionado, as moléculas de mRNA de eucariotos contêm uma **estrutura de capeamento 7-metilguanossina** em seu terminal 5' (ver Figura 34-10), e a maioria possui uma **cauda poli(A)** no terminal 3'. A estrutura de capeamento é adicionada à extremidade 5' do precursor recentemente transcrito de mRNA no núcleo, logo após a síntese e antes do transporte da molécula de mRNA para o citoplasma. O capeamento 5' do transcrito de RNA é necessário tanto para o início da tradução eficaz quanto para a proteção da extremidade 5' do mRNA de ataques de exonucleases 5'-3'. As metilações secundárias das moléculas de mRNA, aquelas em 2'-hidroxi e N⁷ dos resíduos de adenilato, ocorrem após a molécula de mRNA aparecer no citoplasma.

As caudas poli(A) são adicionadas à extremidade 3' das moléculas de mRNA em uma etapa de processamento pós-transcrição. O mRNA é inicialmente clivado em cerca de 20 nucleotídeos a jusante da sequência de reconhecimento, AAUAA. Outra enzima, a **poli(A) polimerase**, adiciona uma cauda poli(A), que, subsequentemente, estende-se em até 200 resíduos A. A cauda poli(A) protege a extremidade 3' do mRNA do ataque

3'-5' da exonuclease e facilita a tradução. A presença ou ausência da cauda poli(A) não determina se uma molécula precursora no núcleo aparece no citoplasma, uma vez que todas as moléculas de mRNA nuclear com cauda poli(A) não contribuem para o mRNA citoplasmático, nem todas as moléculas de mRNA citoplasmático contêm caudas poli(A) (mRNAs de histonas são as mais notáveis nesse sentido). Após o transporte nuclear, as enzimas citoplasmáticas em células de mamíferos podem tanto adicionar quanto remover os resíduos de adenilato das caudas poli(A); esse processo tem sido associado a uma alteração da estabilidade e da capacidade de tradução do mRNA.

O tamanho de algumas moléculas de mRNA citoplasmático, mesmo após a remoção da cauda poli(A), é ainda consideravelmente maior do que o tamanho necessário para codificar proteínas específicas, para as quais elas são os moldes, frequentemente por um fator de 2 ou 3 vezes. Os nucleotídeos extras ocorrem em regiões não traduzidas (codificação não proteica) nas sequências 5' e 3' da região de codificação; as sequências não traduzidas mais longas estão geralmente na extremidade 3'. As sequências 5' UTR e 3' UTR estão implicadas no processamento, no transporte, no armazenamento, na degradação e na tradução do RNA; cada uma dessas reações contribui potencialmente com níveis adicionais de controle da expressão gênica. Muitos desses eventos pós-transcrição envolvendo mRNAs ocorrem em organelas citoplasmáticas, denominadas corpos P (Capítulo 37).

Os micro RNAs são derivados de grandes transcritos primários por processamento nucleolítico específico

A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA-pol II em **transcritos primários**, denominados **pri-miRNAs**. Os pri-miRNAs são encapados em 5'-3' poliadenilados (Figura 36-17). Os pri-miRNAs são sintetizados a partir de unidades de transcrição, que codificam ou mais miRNAs distintos; essas unidades de transcrição estão localizadas de modo independente no genoma ou no interior de DNAs intrônicos de outros genes. Em função dessa organização, os genes que codificam os miRNAs devem minimamente possuir, portanto, um promotor distinto, uma região codificadora e sinais de poliadenilação/terminação. Os pri-miRNAs apresentam uma segunda estrutura extensa, e essa estrutura intramolecular é mantida após o processamento pela **Drosha-DGCR8 nuclease**; a porção que contém o RNA *hairpin* é preservada, transportada pelos poros nucleares por meio da ação da exportina 5 e, uma vez no citoplasma, ela é processada adicionalmente pelo **complexo dicer nuclease-TRBP** heterodimérico a **21** ou **22 mer**. Por fim, uma das duas fitas é selecionada para ser carregada pelo **complexo silenciador induzido por RNA (RISC)**, que é composto por uma das quatro **proteínas Argonautas (Ago 1 → 4)**, para formar um miRNA de fita simples maduro, com 21 a 22 nt funcionais. Os siRNAs são produzidos de modo semelhante. Uma vez no interior do complexo RISC, os miRNAs podem modular a função do mRNA por um dos três mecanismos: (a) promovendo a degradação do mRNA diretamente; (b) estimulando a degradação da cauda poli(A) mediada pelo complexo CCR4/NOT; ou (c) inibindo a tradução por meio da ação no fator de tradução eIF4 ligador do capeamento

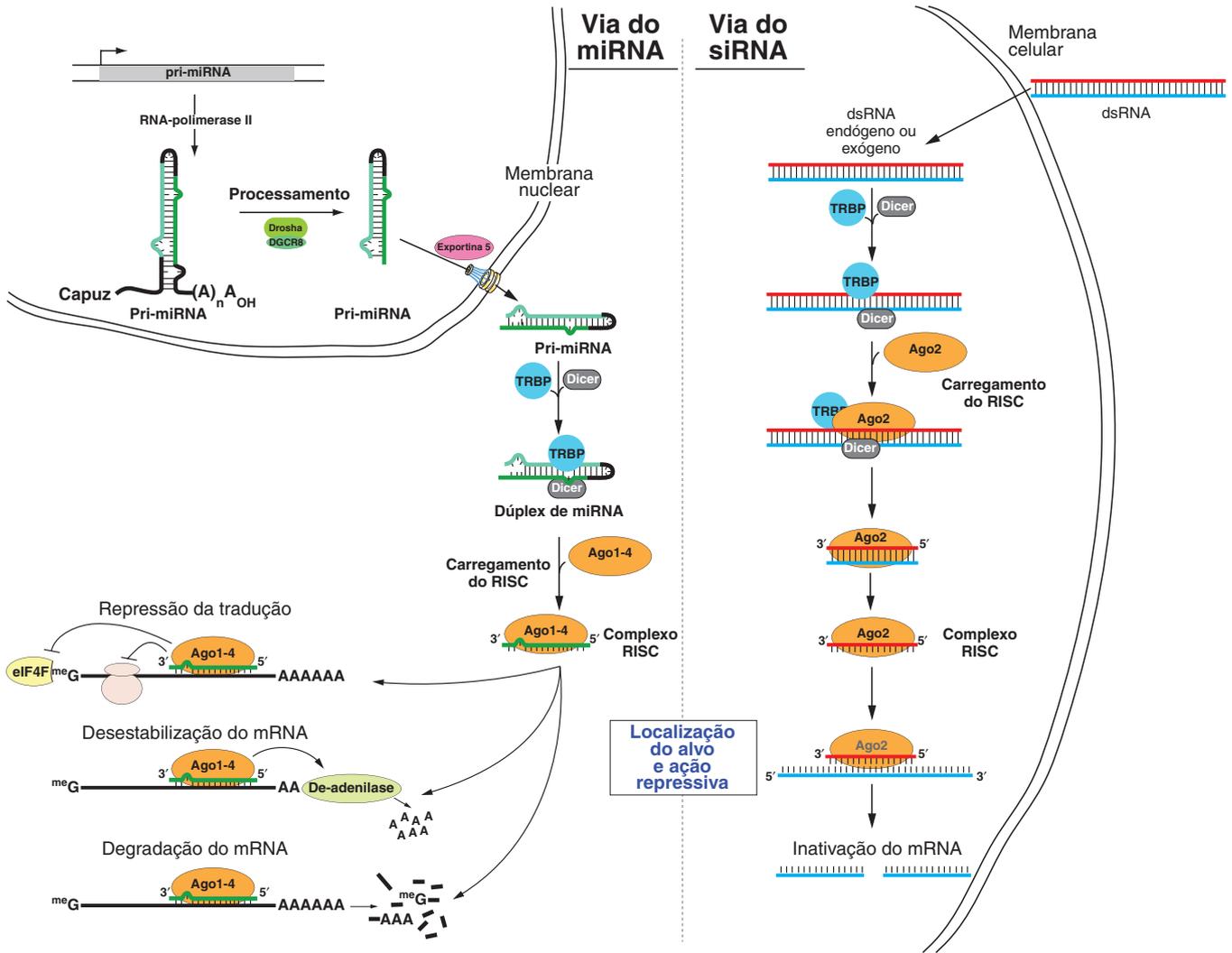


FIGURA 36-17 Biogênese dos microRNAs (mi) e RNAs silenciadores (si). (À esquerda) Genes codificadores de miRNA são transcritos pela RNA-pol II em um miRNA primário (pri-miRNA), que sofre capeamento 5' e é poliadenilado, como é típico para o mRNA codificador de transcritos primários. Esse pri-miRNA é submetido a um processamento no interior do núcleo pela ação da nucleasa Drosha-DGCR8, que remove seqüências tanto da extremidade 5' quanto da 3', gerando o pré-miRNA. Esse RNA de dupla-fita parcialmente processado é transportado para o citoplasma pela exportina 5. O pré-miRNA citoplasmático é, então, aparado adicionalmente pela ação da nucleasa heterodimérica, chamada de Dicer (TRBP-Dicer), para formar o miRNA duplo de 21 a 22 nt. Uma das duas fitas resultantes de RNA longas de 21 a 22 nucleotídeos é selecionada, o duplex é desenrolado, e a fita selecionada é carregada no complexo silenciador induzido por RNA, ou no complexo RISC, gerando, portanto, um miRNA maduro e funcional. Após se dirigir para a localização do mRNA e à seqüência específica de anelamento de miRNA-mRNA, o miRNA funcional pode modular a função do mRNA por um dos três mecanismos: repressão da tradução, desestabilização do mRNA pela desadenilação do mRNA, ou degradação do mRNA. (À direita) A via do siRNA gera siRNAs funcionais a partir das duplas-fitas grandes de RNAs, que são formadas no meio intracelular pela hibridização RNA-RNA (inter ou intramolecular) ou a partir de fontes extracelulares, como vírus de RNA. Esses dsRNAs virais são novamente processados para segmentos de dsRNAs siRNAs de cerca de 22 nt, via nucleasa Dicer heterodimérica, carregada no complexo RISC contendo Ago-2. Uma fita é, então, selecionada para gerar siRNAs que localizam seqüências-alvo de RNA via anelamento de seqüências específicas de siRNA-RNA. Esse complexo ternário direcionado a RNA-siRNA-Ago2 induz a clivagem do RNA, que inativa o RNA-alvo.

5'-metil (Figuras 37-7 e 37-8) ou diretamente nos ribossomos. Dados recentes sugerem que os genes reguladores que codificam o miRNA podem se ligar e, portanto, coevoluir com seus genes-alvo.

A edição de RNA altera o RNA mensageiro após a transcrição

O dogma central afirma que para um determinado gene e produto gênico há uma relação linear entre a seqüência

codificadora no DNA, a seqüência do mRNA e a seqüência de proteína (ver Figura 35-7). Alterações na seqüência de DNA deveriam refletir uma mudança na seqüência de mRNA e, dependendo do códon utilizado, na seqüência de proteína. Entretanto, exceções a esse dogma foram recentemente documentadas. A informação codificadora pode ser alterada no nível do mRNA por uma **edição do RNA**. Nesses casos, a seqüência de codificação de mRNA difere da seqüência do DNA cognato. Um exemplo é o gene da apolipoproteína B (*apoB*) e o mRNA. No fígado, um único gene de *apoB*

é transcrito em um mRNA que direciona a síntese de uma proteína de 100 kDa, a apoB100. No intestino, o mesmo gene direciona a síntese do transcrito primário; entretanto, uma citidina-desaminase converte um códon CAA no mRNA em UAA em um único sítio específico. Em vez de codificar glutamina, esse códon torna-se um sinal de terminação (ver Tabela 37-1) e produz, portanto, uma proteína truncada de 48 kDa (apoB48). A apoB100 e a apoB48 têm funções diferentes nos dois órgãos. Um número crescente de outros exemplos incluem mudança de glutamina para arginina no receptor de glutamato e várias mudanças em mRNAs mitocondriais de tripanossoma, geralmente envolvidos na adição ou deleção de uridina. A extensão exata da edição de RNA é desconhecida, mas estimativas correntes sugerem que < 0,01% dos mRNAs são editados desse modo. Recentemente, a edição de miRNAs foi descrita, sugerindo que essas duas formas de mecanismos de controle de transcrição poderiam contribuir cooperativamente para a regulação do gene.

O RNA de transferência é extensamente processado e modificado

Como descrito nos Capítulos 34 e 37, as moléculas de tRNA servem como moléculas adaptadoras para a tradução do mRNA em sequências de proteínas. Os tRNAs contêm muitas modificações de bases padrão A, U, G e C, incluindo metilação, redução, desaminação e rearranjo de pontes glicosídicas. Modificações pós-transcrição adicionais incluem alquilações de nucleotídeos e a ligação do CpCpA_{OH} terminal característico à extremidade 3' da molécula pela enzima nucleotidil-transferase. O 3' OH da ribose A é o ponto de ligação para o aminoácido específico que entra na reação de polimerização da síntese de proteína. A metilação dos precursores de tRNA de mamíferos provavelmente ocorre no núcleo, ao passo que a clivagem e a ligação do CpCpA_{OH} são funções citoplasmáticas, uma vez que os terminais se renovam de posição mais rapidamente do que as próprias moléculas de tRNA. As enzimas no interior do citoplasma das células de mamíferos são necessárias para a ligação dos aminoácidos aos resíduos de CpCpA_{OH} (ver Capítulo 37).

O RNA PODE ATUAR COMO CATALISADOR

Além da ação catalítica dos snRNAs na formação do mRNA, diversas outras funções enzimáticas foram atribuídas ao RNA. As **ribozimas** são moléculas de RNA com atividade catalítica. Essa atividade geralmente envolve as reações de transesterificação, e a maior parte está envolvida com o metabolismo de RNA (*splicing* e endorribonuclease).

Recentemente, um componente de rRNA foi implicado na hidrólise de um éster de aminoácil e, portanto, desempenha papel central no funcionamento da ponte de peptídeos (peptidil-transferases; ver Capítulo 37). Essas observações, feitas utilizando moléculas de RNA derivadas de organelas de plantas, leveduras, vírus e células de eucariotos superiores, mostram que o RNA pode atuar como uma enzima e revolucionaram as ideias sobre a atuação das enzimas e sobre a própria origem da vida.

RESUMO

- O RNA é sintetizado a partir de um molde de DNA pela enzima RNA-polimerase dependente de DNA.
- As bactérias contêm apenas uma única RNA-polimerase ($\beta\beta\alpha_2\sigma$), ao passo que existem três RNA-polimerases nucleares dependentes de DNA em mamíferos: as RNA-polimerases I, II e III. Essas enzimas catalisam a transcrição dos genes que codificam rRNA (Pol I), mRNA/mi/siRNAs/lncRNAs (Pol II), tRNA e rRNA 5S (Pol III).
- As RNA-polimerases interagem com as regiões únicas dos genes *cis*-ativos, denominadas promotores, para formar complexos de pré-iniciação (PICs) capazes de iniciação. Em eucariotos, o processo de formação do PIC pela pol II necessita, além da polimerase, de múltiplos fatores de transcrição gerais (GTFs), TFIIA, B, D, E, F e H.
- A formação do PIC em eucariotos pode ocorrer em promotores acessíveis passo a passo – por interações ordenadas e sequenciais de GTFs e RNA-polimerase com os promotores de DNA – ou em uma única etapa, por meio do reconhecimento do promotor pelo complexo pré-formado da holoenzima GTF-RNA-polimerase.
- A transcrição ocorre em três fases: iniciação, alongamento e terminação. Todas são dependentes de elementos *cis* distintos de DNA e podem ser moduladas por diferentes fatores proteicos *trans*-ativos.
- A presença de nucleossomos pode aumentar ou impedir a ligação dos transfatores e do maquinário de transcrição para seus elementos *cis* do DNA cognato, inibindo, portanto, a transcrição.
- A maioria dos RNAs de eucariotos é sintetizada na forma de precursores que contêm sequências em excesso, as quais são removidas antes da geração do RNA funcional maduro. Essas reações de processamento fornecem etapas potenciais adicionais para a regulação da expressão gênica.
- A síntese do mRNA em eucariotos resulta em um precursor pré-mRNA que contém grandes quantidades de RNA em excesso (introns) que devem ser removidos com precisão por *splicing* de RNA para gerar o mRNA funcional traduzível composto por sequências codificadoras de éxons e sequências não codificadoras 5' e 3'.
- Todas as etapas – das alterações no molde de DNA, na sequência e na acessibilidade na cromatina para a estabilidade e a capacidade de tradução do RNA – estão sujeitas à modulação e, portanto, são sítios de controle potencial para a regulação de genes de eucariotos.

REFERÊNCIAS

- Bourbon H-M, Aguilera A, Ansari AZ, et al: A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* 2004;14:553-537.
- Buchan JR, Parker R: Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 2009;36:932-941.
- Decker KB, Hinton DM: Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Microbiol* 2013;67:113-139.
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R: Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 2013;14:496-506.
- Geisler S, Collier J: RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:699-712.

- He Y, Fang J, Taatjes DJ, Nogales E: Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* 2013;495:481-486.
- Hood JL, Emeson RB: Editing of neurotransmitter receptor and ion channel RNAs in the nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;353:61-90.
- Hsin JP, Manley JL: The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* 2012;26:2119-2137.
- Kassube SA, Fang J, Grob P, Yakovchuk P, Goodrich JA, Nogales E: Structural insights into transcriptional repression by noncoding RNAs that bind to human Pol II. *J Mol Biol* 2013;425:3639-3648.
- Kawauchi J, Mischo H, Braglia P, et al: Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev* 2008;22:1082-1092.
- Keaveney M, Struhl K: Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol Cell* 1998;1:917-924.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ: Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:153-165.
- Marcia M, Pyle AM: Visualizing group II intron catalysis through the stages of splicing. *Cell* 2012;151:497-507.
- Mapendano CK, Lykke-Andersen S, Kjems J, et al: Crosstalk between mRNA 3' end processing and transcription initiation. *Mol Cell* 2010;40:410-422.
- Mauger DM, Siegfried NA, Weeks KM: The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. *FEBS Lett* 2013 587:1180-1188.
- Murakami K, Elmlund H, Kalisman N, Bushnell DA, Adams CM, Azubel M, Elmlund D, Levi-Kalisman Y, Liu X, Gibbons BJ, Levitt M, Kornberg RD: Architecture of an RNA polymerase II transcription pre-initiation complex. *Science* 2013;342:1238724.
- Nechaev S, Adelman K: Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1809:34-45.
- Ørom UA, Shiekhattar R: Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell* 2013 154:1190-1193.
- Pawlicki JM, Steitz JA: Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol* 2010; 20:52-61.
- Proudfoot NJ: Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev* 2011; 25:1770-1782.
- Reed R, Cheng H: TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:269-273.
- Rhee HS, Pugh BF: Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* 2012;483:295-301.
- Tian B, Manley JL: Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends Biochem Sci* 2013;38:312-320.
- West S, Proudfoot NJ, Dye MJ, et al: Molecular dissection of mammalian RNA polymerase II transcriptional termination. *Mol Cell* 2008;29:600-610.

A síntese de proteínas e o código genético

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender que o código genético é um código de três letras de nucleotídeos que está codificado em uma ordem linear do DNA éxon (composto por trincas de A, G, C e T) de genes codificadores de proteínas, e que esse código de três letras é traduzido em mRNA (composto por trincas de A, G, C e U) para especificar a ordem linear de adição de aminoácidos durante a síntese proteica por meio do processo de tradução.
- Entender que o código genético universal é degenerado, não ambíguo, não sobreposto e sem pontuação.
- Explicar que o código genético é composto por 64 códons, 61 dos quais codificam aminoácidos, ao passo que três induzem o término da síntese de proteínas.
- Especificar como os RNAs de transferência (tRNAs) funcionam como agentes de informação final que decodifica o código genético de RNAs mensageiros (mRNAs).
- Compreender o mecanismo do processo energético intenso de síntese proteica que ocorre nos complexos RNA-proteína, denominados ribossomos.
- Reconhecer que a síntese proteica, como a replicação e a transcrição do DNA, é controlada com precisão pela ação de múltiplos fatores acessórios que são responsáveis por múltiplos estímulos de sinalização reguladora extra e intracelulares.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As letras A, G, T e C correspondem aos nucleotídeos encontrados no DNA. No interior dos genes codificadores de proteínas, esses nucleotídeos estão organizados em palavras-código de três letras, chamadas de **códons**, e o conjunto desses códons constitui o **código genético**. Era impossível compreender a síntese proteica – ou explicar as mutações – antes de o código genético ser elucidado. O código fornece uma base para explicar a maneira como os defeitos nas proteínas podem provocar doenças genéticas e para explicar o diagnóstico e, talvez, o tratamento desses distúrbios. Além disso, a fisiopatologia de muitas infecções virais está relacionada à capacidade desses agentes infecciosos em prejudicar a síntese proteica celular do hospedeiro. Muitos fármacos antibacterianos são eficazes porque seletivamente prejudicam a síntese proteica na célula da bactéria invasora, mas não afetam a síntese proteica nas células eucarióticas.

A INFORMAÇÃO GENÉTICA PASSA DO DNA PARA O RNA E PARA A PROTEÍNA

A informação genética no interior da sequência de nucleotídeos de DNA é transcrita no núcleo para a sequência de nucleotídeos específica de uma molécula de RNA. A sequência de nucleotídeos no transcrito de RNA é complementar à sequência de nucleotídeos da fita-molde de seu gene, de acordo com as regras de pareamento de bases. Muitas classes diferentes de RNA se combinam para controlar a síntese proteica.

Em procaríotos, há uma correspondência linear entre o gene, o **RNA mensageiro (mRNA)** transcrito a partir do gene e o produto polipeptídico. A situação é mais complicada em células de eucariotos superiores, nas quais o transcrito primário é muito maior do que o mRNA maduro. Os grandes precursores de mRNA contêm regiões codificadoras (**éxons**) que formarão o mRNA maduro e longas sequências de intervenção (**íntrons**) que separam os éxons. O mRNA é processado

no interior do núcleo, e os íntrons, que constituem muito mais desse RNA que os éxons, são removidos. Os éxons são ligados em conjunto para formar o mRNA maduro, que é transportado para o citoplasma, onde é traduzido em proteína.

A célula deve possuir a maquinaria necessária para traduzir a informação com precisão e eficácia a partir da sequência de nucleotídeos de um mRNA para a sequência de aminoácidos da proteína específica correspondente. O esclarecimento da nossa compreensão desse processo, denominado **tradução**, esperava pela decifração do código genético. Compreendeu-se logo que as moléculas de mRNA em si não possuem afinidade por aminoácidos e, portanto, que a tradução da informação da sequência de nucleotídeos do mRNA para a sequência de aminoácidos de uma proteína necessita de uma molécula adaptadora intermediária. Essa molécula adaptadora deve reconhecer, por um lado, a sequência de nucleotídeos específica, bem como um aminoácido específico, por outro lado. Com essa molécula adaptadora, a célula pode direcionar um aminoácido específico para a posição sequencial adequada de uma proteína durante a sua síntese, como determinado pela sequência de nucleotídeos do mRNA específico. De fato, os grupos funcionais dos aminoácidos em si não entram em contato com o molde de mRNA.

A SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE UMA MOLÉCULA DE mRNA CONTÉM UMA SÉRIE DE CÓDONS QUE ESPECIFICAM A SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA CODIFICADA

São necessários 20 aminoácidos diferentes para a síntese do complemento celular de proteínas; assim, devem existir pelo menos 20 códons diferentes que constituem o código genético. Uma vez que só existem quatro nucleotídeos diferentes no mRNA, cada códon deve ser composto por mais do que um único nucleotídeo de purina ou pirimidina. Os códons que consistem em dois nucleotídeos poderiam fornecer apenas 16 (4^2) códons diferentes, e os códons de três nucleotídeos poderiam fornecer 64 (4^3) códons específicos.

Sabe-se, atualmente, que cada códon consiste em uma sequência de três nucleotídeos; isto é, é um **código de trinca** (ver Tabela 37-1). A decifração inicial do **código genético** dependeu muito da síntese *in vitro* dos polímeros de nucleotídeos, particularmente as trinca em sequência repetida. Essas trinca de ribonucleotídeos sintéticos foram utilizados como mRNAs para programar a síntese de proteínas no tubo de ensaio e permitiram que os pesquisadores deduzissem o código genético.

O CÓDIGO GENÉTICO É DEGENERADO, NÃO AMBÍGUO, NÃO SOBREPOSTO, SEM PONTUAÇÃO E UNIVERSAL

Três dos 64 códons possíveis não codificam aminoácidos específicos; estes foram denominados **códons sem sentido**

TABELA 37-1 O código genético^a (atribuições dos códons nos RNAs mensageiros de mamíferos)

Primeiro nucleotídeo	Segundo nucleotídeo				Terceiro nucleotídeo
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tir	Cis	U
	Phe	Ser	Tir	Cis	C
	Leu	Ser	Term	Term ^b	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile ^a	Thr	Lis	Arg ^b	A
	Met	Thr	Lis	Arg ^b	G
G	Val	Ala	Asp	Gli	U
	Val	Ala	Asp	Gli	C
	Val	Ala	Glu	Gli	A
	Val	Ala	Glu	Gli	G

^aOs termos primeiro, segundo e terceiro nucleotídeos referem-se aos nucleotídeos individuais de um códon tripla lido na direção 5'-3', da esquerda para a direita. A, nucleotídeo adenina; C, nucleotídeo citosina; G, nucleotídeo guanina; Term, códon de término da cadeia; U, nucleotídeo uridina. AUG, que codifica Met, serve como códon de início nas células de mamíferos e também codifica metioninas internas em uma proteína. (As abreviações dos aminoácidos são explicadas no Capítulo 3.)

^bNas mitocôndrias de mamíferos, AUA codifica Met, UGA codifica Trp, e AGA e AGG servem como terminadores de cadeia.

(*nonsense*). Os códons sem sentido são utilizados na célula como **sinais de término**; eles especificam onde a polimerização de aminoácidos em uma molécula de proteína deve parar. **Os 61 códons restantes codificam para os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente** (Tabela 37-1). Assim, há “**degeneração**” no código genético, isto é, múltiplos códons decodificam o mesmo aminoácido. Alguns aminoácidos são codificados por vários códons; por exemplo, seis códons diferentes – UCU, UCC, UCA, UCG, AGU e AGC – especificam a serina. Outros aminoácidos, como a metionina e o triptofano, possuem um único códon. Em geral, o terceiro nucleotídeo em um códon é menos importante que os dois primeiros na determinação do aminoácido específico a ser incorporado, e isso é responsável pela maior parte da degeneração do código. Entretanto, para qualquer códon específico, apenas um único aminoácido é indicado; com raras exceções, o código genético é **não ambíguo** – isto é, dado um códon específico, apenas um único aminoácido é indicado. **A distinção entre ambiguidade e degeneração é um conceito importante.**

O código não ambíguo, mas degenerado, pode ser explicado em termos moleculares. O reconhecimento de códons específicos no mRNA pelas moléculas adaptadoras de tRNA é dependente da **região anticódon** do tRNA e das regras de pareamento específico das bases que determinam a ligação dos códons de tRNA-mRNA. Cada molécula de tRNA contém

uma sequência específica, complementar a um códon, que é denominada seu anticódon. Para um determinado códon no mRNA, apenas uma única espécie de molécula de tRNA possui o anticódon certo. Uma vez que cada molécula de tRNA pode ser carregada com apenas um aminoácido específico, cada códon especifica, portanto, apenas um aminoácido. Entretanto, algumas moléculas de tRNA podem utilizar o anticódon para reconhecer mais de um códon. **Com raras exceções, considerando um códon específico, apenas um aminoácido específico será incorporado – embora, dado um aminoácido específico, mais de um códon possa ser utilizado.**

Como discutido, a leitura do código genético durante o processo de síntese de proteínas não envolve qualquer sobreposição de códons. **Assim, o código genético não é sobreposto.** Além disso, uma vez iniciada a leitura em um códon específico, **não há pontuação** entre os códons, e a mensagem é lida em uma sequência contínua de trincas de nucleotídeos até que um códon de término de tradução seja alcançado.

Até recentemente, pensava-se que o código genético fosse universal. Hoje, foi demonstrado que o conjunto de moléculas de tRNA nas mitocôndrias (que contêm seus próprios conjuntos de maquinaria de tradução separados e distintos) de eucariotos inferiores e superiores, incluindo os seres humanos, leem quatro códons diferentemente das moléculas de tRNA no citoplasma, até mesmo nas mesmas células. Como observado na Tabela 37-1, nas mitocôndrias de mamíferos, o códon AUA é lido como Met, e os códigos UGA, para Trp. Além disso, nas mitocôndrias, os códons AGA e AGG são lidos como códons de término ou terminadores de cadeia, em vez de serem lidos como Arg. Como resultado das alterações específicas dessas organelas no código genético, as mitocôndrias precisam de apenas 22 moléculas de tRNA para lerem o seu código genético, ao passo que o sistema de tradução citoplasmático possui um complemento completo de 31 espécies de tRNA. Salientadas essas exceções, **o código genético é universal.** A frequência de utilização de cada códon de aminoácido varia consideravelmente entre espécies e entre os diferentes tecidos dentro de uma mesma espécie. Os níveis específicos de tRNA geralmente refletem essas variações na utilização de códons. Assim, um códon particular utilizado abundantemente é decodificado por tRNA específico, da mesma forma abundante, que reconhece esse códon em particular. Os quadros de **utilização de códons** são

TABELA 37-2 Características do código genético

• Degenerado
• Não ambíguo
• Não sobreposto
• Não pontuado
• Universal

atualmente muito precisos, uma vez que muitos genomas foram sequenciados e tais informações são vitais para a produção em grande escala de proteínas para fins terapêuticos (i.e., insulina, eritropoietina). Essas proteínas são frequentemente produzidas em células não humanas utilizando a tecnologia de DNA recombinante (ver Capítulo 39). As principais características do código genético são listadas na **Tabela 37-2**.

AO MENOS UMA ESPÉCIE DE RNA TRANSPORTADOR (tRNA) EXISTE PARA CADA UM DOS 20 AMINOÁCIDOS

As moléculas de tRNA apresentam funções extraordinariamente similares e estruturas tridimensionais. A função de adaptador das moléculas de tRNA exige o carregamento de cada tRNA específico com seu aminoácido específico. Como não há afinidade dos ácidos nucleicos com os grupos de aminoácidos funcionais específicos, esse reconhecimento deve ser feito por uma molécula de proteína capaz de reconhecer tanto uma molécula de tRNA específica quanto um aminoácido específico. Pelo menos 20 enzimas específicas são necessárias para essas funções de reconhecimento específico e para a ligação correta dos 20 aminoácidos às moléculas de tRNA específicas. Esse processo de **reconhecimento e ligação (carregamento)**, que demanda energia, acontece em duas etapas e é catalisado por uma enzima para cada um dos 20 aminoácidos. Essas enzimas são denominadas **aminoacil-tRNA-sintases**. Elas formam um intermediário ativado do complexo aminoacil-AMP-enzima (**Figura 37-1**). O complexo aminoacil-AMP-enzima específico então reconhece um tRNA específico, ao qual ele anexa a porção aminoacil a hidroxil 3'

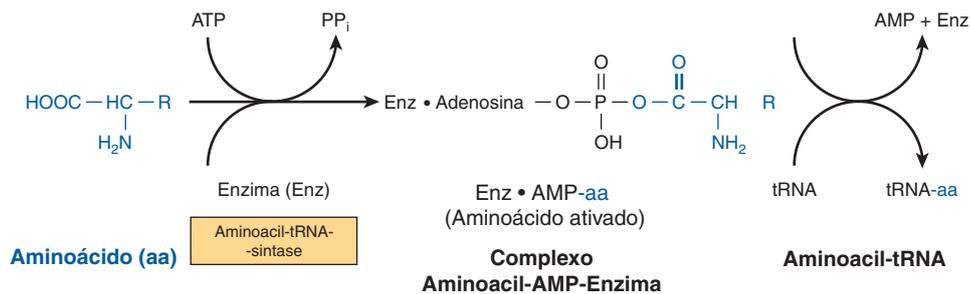


FIGURA 37-1 Formação do aminoacil-tRNA. Uma reação em duas etapas, envolvendo a enzima aminoacil-tRNA-sintase, resulta na formação do aminoacil-tRNA. A primeira reação envolve a formação de um complexo aminoacil-AMP-enzima. Esse aminoácido ativado é, em seguida, transferido para a molécula de tRNA correspondente. O AMP e a enzima são liberados, e o último pode ser reutilizado. As reações de carregamento têm taxa de erro (i.e., esterificação do aminoácido incorreto no tRNA_x) de menos de 10^{-4} .

do terminal adenosil. As reações de carregamento têm uma taxa de erro de menos de 10^{-4} , e assim, são bastante precisas. O aminoácido permanece ligado ao seu tRNA específico em uma ligação éster até ser polimerizado em uma posição específica na fabricação de um polipeptídeo precursor de uma molécula de proteína.

As regiões da molécula de tRNA referidas no Capítulo 34 (e ilustradas na Figura 34-11) agora se tornam importantes. O braço ribotimidina pseudouridina citidina (TΨC) está envolvido na ligação do aminoacil-tRNA à superfície ribossomal no local de síntese de proteínas. O braço D é um dos sítios importantes para o reconhecimento adequado de uma determinada espécie de tRNA por sua aminoacil-tRNA sintase adequada. O braço aceptor, localizado na hidroxil 3' do terminal adenosil, é o sítio de ligação do aminoácido específico.

A região do anticódon (braço) consiste em sete nucleotídeos, e ela reconhece o códon de três letras no mRNA (Figura 37-2). A sequência lida na direção de 3' para 5' na alça anticódon consiste em uma base variável (N)– purina modificada (Pu*)–XYZ (o anticódon)–pirimidina (Pi)–pirimidina (Pi)-5'. Essa direção de leitura do anticódon é 3'-5', e o código genético na Tabela 37-1 é lido na direção 5'-3', uma vez que o códon e a alça do anticódon das moléculas de mRNA e tRNA, respectivamente, são antiparalelas em suas complementaridades, assim como todas as outras interações intermoleculares entre as fitas de ácido nucleico.

A degeneração do código genético reside principalmente no último nucleotídeo do códon em trinca, sugerindo que o pareamento de bases entre este último nucleotídeo e o nucleotídeo correspondente do anticódon não segue estritamente a regra de Watson-Crick. Isso é chamado de oscilação (*wobble*); o pareamento entre códon e anticódon pode "oscilar" nesse

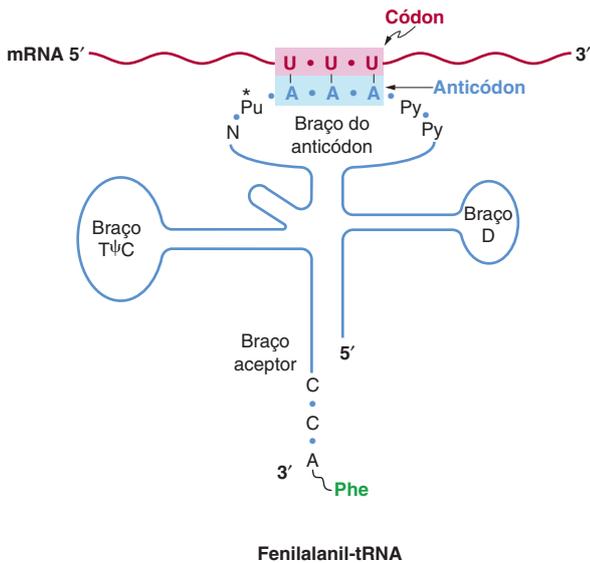


FIGURA 37-2 Reconhecimento do códon pelo anticódon. Um dos códons para fenilalanina é UUU. O tRNA carregado com fenilalanina (Phe) tem a sequência complementar AAA; portanto, ele forma um complexo de pares de bases com o códon. A região anticódon (braço) geralmente consiste em uma sequência de sete nucleotídeos: variável (N), purina modificada (Pu*), X, Y, Z (neste caso, AAA) e duas pirimidinas (Pi) na direção 3'-5'.

local de pareamento específico de nucleotídeo-nucleotídeo. Por exemplo, os dois códons para arginina, AGA e AGG, podem se ligar ao mesmo anticódon tendo uma uracila na sua extremidade 5' (UCU). Do mesmo modo, três códons para glicina – GGU, GGC e GGA – podem formar um par de bases a partir de um anticódon, 3' CCI 5' (i.e., I, inosina, pode parear com U, C e A). A inosina é gerada pela desaminação da adenina (ver Figura 33-2 para estrutura).

AS MUTAÇÕES RESULTAM DE MUDANÇAS NAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

Embora a alteração inicial possa não ocorrer na fita-molde na molécula de DNA dupla-fita para esse gene, após a replicação, as moléculas-filhas de DNA com mutações na fita-molde irão se separar e aparecer na população de organismos.

Algumas mutações ocorrem por substituição de bases

Mudanças de uma única base (**mutações pontuais**) podem ser **transições** ou **transversões**. No primeiro caso, uma determinada pirimidina é trocada por outra pirimidina ou uma purina é trocada por outra purina. As transversões são trocas de uma purina por qualquer uma das duas pirimidinas ou a troca de uma pirimidina por qualquer uma das duas purinas, como mostrado na Figura 37-3.

Quando a sequência de nucleotídeos de um gene codificador de proteína contendo a mutação é transcrita em uma molécula de mRNA, a molécula de RNA certamente possuirá a mudança de base na localização correspondente.

As trocas de uma única base nas moléculas de mRNA podem ocasionar vários efeitos quando traduzidas em proteínas:

1. Os efeitos podem ser não detectáveis devido à degeneração do código; essas mutações são frequentemente chamadas de **mutações silenciosas**. Isso seria mais provável se a base trocada na molécula de mRNA fosse o terceiro nucleotídeo de um códon. Devido à oscilação, a tradução de um códon é menos sensível a uma mudança na terceira posição.
2. Um **efeito de troca** (*missense*) ocorre quando um aminoácido diferente é incorporado no local correspondente na molécula de proteína. Esse aminoácido trocado – ou *missense*, dependendo de sua localização na proteína específica – pode ser aceitável, parcialmente aceitável ou inaceitável para a função dessa molécula de proteína. A partir de um

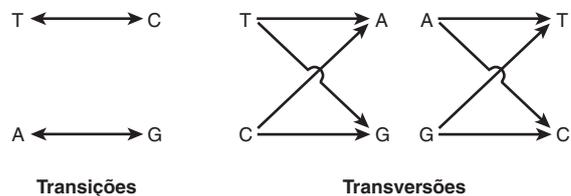


FIGURA 37-3 Representação diagramática de mutações de transição e transversão.

exame cuidadoso do código genético, pode-se concluir que a maioria das trocas de uma única base resultaria na substituição de um aminoácido por outro de grupos funcionais bastante semelhantes. Esse é um mecanismo eficaz para evitar mudanças drásticas nas propriedades físicas de uma molécula de proteína. Se um efeito de troca aceitável ocorre, a molécula de proteína resultante pode não ser distinguível da molécula normal. Um efeito de troca parcialmente aceitável irá resultar em uma molécula com uma função parcial, porém anormal. Se um efeito de troca inaceitável ocorre, a molécula de proteína não será capaz de funcionar normalmente.

3. Pode parecer, então, que um códon **sem sentido** poderia resultar na **terminação prematura** da tradução e na produção de apenas um fragmento da molécula de proteína desejada. É alta a probabilidade de uma molécula de proteína ou um fragmento peptídico, terminados prematuramente, não funcionarem em seu papel prescrito. Exemplos de diferentes tipos de mutações e seus efeitos na codificação potencial do mRNA são mostrados nas **Figuras 37-4 e 37-5**.

Mutações da fase de leitura (*frameshift*) resultam da deleção ou da inserção de nucleotídeos no DNA, gerando mRNAs modificados

A deleção de um único nucleotídeo a partir de uma fita codificadora de um gene resulta em um quadro de leitura modificado no mRNA. A maquinaria de tradução do mRNA não

reconhece a falta da base, uma vez que não há pontuação na leitura dos códons. Assim, ocorre uma alteração importante na sequência de polimerização de aminoácidos, como mostrado no Exemplo 1, na Figura 37-5. A mudança na fase de leitura resulta em tradução alterada do mRNA posterior à deleção de um único nucleotídeo. Não apenas a sequência de aminoácidos distal a essa deleção é alterada, mas a leitura da mensagem também pode resultar na aparência de um códon sem sentido e, portanto, na produção de um polipeptídeo tanto alterado quanto terminado prematuramente (Exemplo 3, Figura 37-5).

Se três nucleotídeos ou um múltiplo de três nucleotídeos forem deletados de uma região codificadora, a tradução do mRNA correspondente gerará uma proteína sem o número correspondente de aminoácidos (Exemplo 2, Figura 37-5). Como a fase de leitura é uma trinca, a leitura não será perturbada para aqueles códons posteriores à deleção. Se, no entanto, a deleção de um ou dois nucleotídeos ocorrer imediatamente antes ou no interior de um códon de término normal (códon sem sentido), a leitura do sinal de terminação normal é alterada. Essa deleção pode resultar em uma leitura além do sinal de terminação, agora “mutante”, até que outro códon sem sentido seja encontrado (Exemplo 1, Figura 37-5).

Inserções em um gene de um, dois ou de um número de nucleotídeos não múltiplo de três resultam em um mRNA em que a fase de leitura é distorcida na tradução, e os mesmos efeitos que ocorrem com as deleções se refletem na tradução do mRNA. Isso pode resultar em sequências truncadas de aminoácidos posteriores à inserção e na geração de um **códon sem sentido** na inserção ou posterior a ela, ou talvez na leitura além do códon de término normal. Após a deleção em um gene, uma inserção (ou vice-versa) pode restabelecer a fase de

	Molécula de proteína	Aminoácido	Códons
Troca aceitável	Hb A, cadeia β ↓ Hb Hikari, cadeia β	61 Lisina ↓ Asparagina	AAA ou AAG ↓ ↓ AAU ou AAC
Troca parcialmente aceitável	Hb A, cadeia β ↓ Hb S, cadeia β	6 Glutamato ↓ Valina	GAA ou GAG ↓ ↓ GUA ou GUG
Troca inaceitável	Hb A, cadeia α ↓ Hb M (Boston), cadeia α	58 Histidina ↓ Tirosina	CAU ou CAC ↓ ↓ UAU ou UAC

FIGURA 37-4 Exemplos de três tipos de mutações de troca resultando em cadeias de hemoglobina anormais. As alterações de aminoácidos e possíveis alterações nos respectivos códons são indicadas. A mutação da cadeia β da hemoglobina Hikari apresenta propriedades fisiológicas aparentemente normais, mas é eletroforéticamente alterada. A hemoglobina S tem uma mutação na cadeia β e função parcial; a hemoglobina S liga-se ao oxigênio, mas precipita quando desoxigenada; isso faz as hemácias assumirem formato de foice e representa a base celular e molecular da doença anemia falciforme (ver Figura 6-13). A hemoglobina M Boston, uma mutação da cadeia α , permite a oxidação do radical heme ferroso ao estado férrico e, assim, não se ligará ao oxigênio de maneira nenhuma.

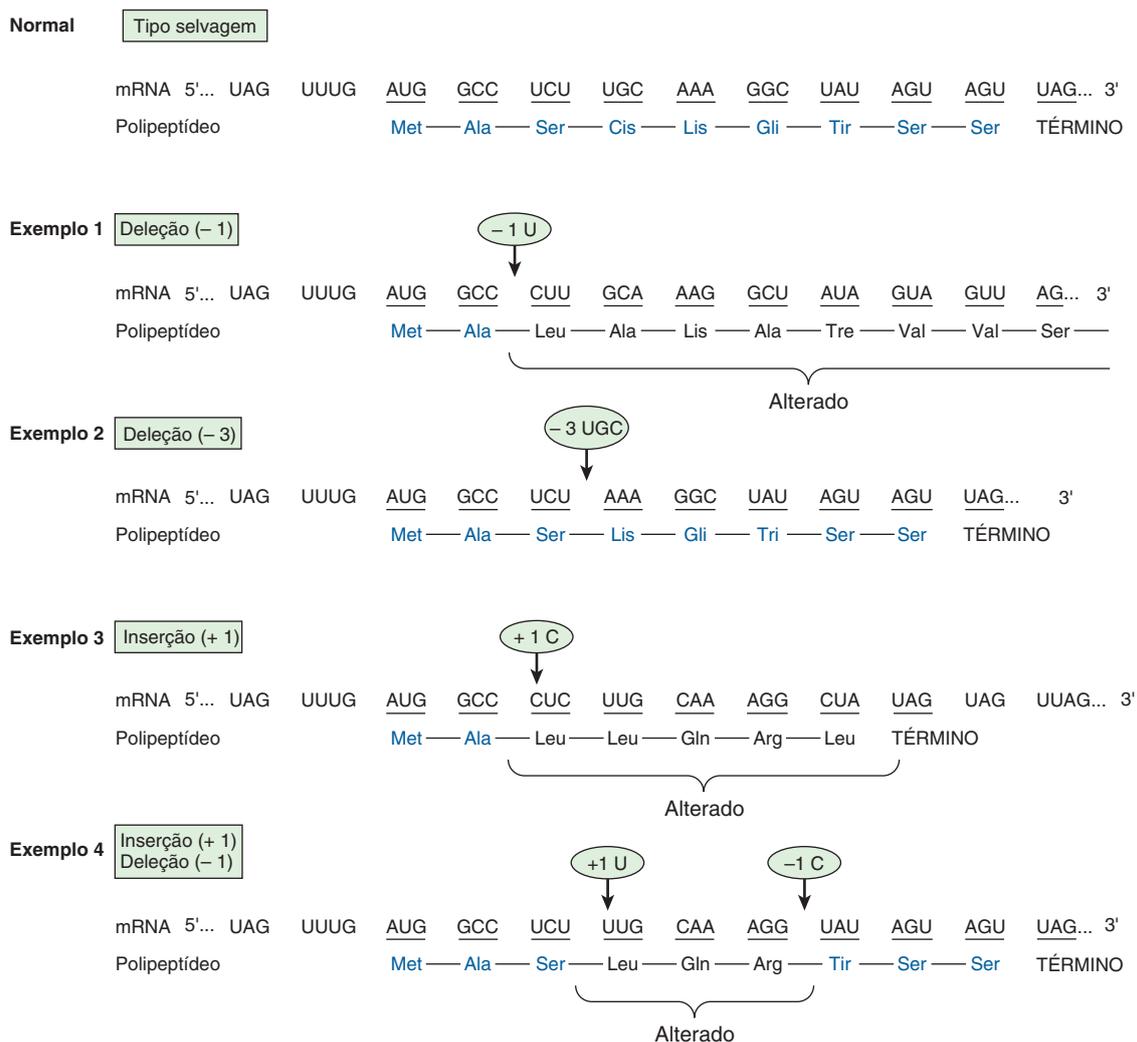


FIGURA 37-5 Exemplos dos efeitos de deleções e inserções em um gene na sequência do transcrito de mRNA e da cadeia de polipeptídeo traduzida a partir disso. As setas indicam os sítios de deleções ou inserções, e os números nos ovais indicam o número de resíduos de nucleotídeos removidos ou inseridos. Letras coloridas indicam aminoácidos na ordem correta.

leitura adequada (Exemplo 4, Figura 37-5). O mRNA correspondente, quando traduzido, poderia conter uma sequência de aminoácidos alterada entre a inserção e a deleção. Além do restabelecimento da fase de leitura, a sequência de aminoácidos seria correta. Pode-se imaginar que diferentes combinações de deleções, inserções ou ambas resultariam na formação de uma proteína em que uma porção é anormal, mas que é cercada pelas sequências normais de aminoácidos. Esses fenômenos foram demonstrados de maneira convincente em várias doenças humanas.

Mutações supressoras podem neutralizar alguns dos efeitos de mutações de troca de sentido, mutações sem sentido e mutações de fase de leitura

A discussão anterior sobre os produtos de proteínas alteradas de mutações de genes é baseada na presença de moléculas de tRNA que funcionam normalmente. Entretanto, em

organismos procarióticos e eucarióticos inferiores, foram descobertas moléculas de tRNA que funcionam anormalmente e que são resultados de mutações. Algumas dessas moléculas de tRNA anormais são capazes de se ligar e decodificar códon alterados e, desse modo, suprimir os efeitos de mutações em genes estruturais mutantes distintos codificadores de mRNA. Essas **moléculas de tRNA supressoras**, geralmente formadas como resultado de alterações em suas regiões de anticódon, são capazes de suprimir certas mutações de troca de sentido, mutações sem sentido e mutações da fase de leitura. Entretanto, uma vez que as moléculas de tRNA supressoras não são capazes de distinguir entre um códon normal e um códon resultante de uma mutação de um gene, sua presença na célula microbiana geralmente resulta em menor viabilidade. Por exemplo, as moléculas de tRNA supressoras sem sentido podem suprimir os sinais de terminação normal para permitir uma leitura além da terminação, quando isso não é desejável. As moléculas de tRNA supressoras da fase de leitura podem ler um códon normal e mais um componente de um códon

justaposto para fornecer uma fase de leitura, mesmo quando não é desejável. Moléculas de tRNA supressoras podem existir em células de mamíferos, pois a leitura além do código de terminação tem sido observada em algumas ocasiões. No contexto laboratorial, esses tRNAs supressores, acoplados a variantes mutadas de aminoacil-tRNA sintases, podem ser utilizados para incorporar aminoácidos não naturais em locais definidos no interior de genes alterados que carregam mutações sem sentido modificadas. As proteínas marcadas resultantes podem ser utilizadas para ligações cruzadas (*cross-linking*) *in vivo* e *in vitro* e estudos biofísicos. Essas novas ferramentas auxiliam, de forma significativa, os biólogos interessados em estudar os mecanismos de uma ampla variedade de processos biológicos.

ASSIM COMO A TRANSCRIÇÃO, A SÍNTESE PROTEICA PODE SER DESCRITA EM TRÊS FASES: INICIAÇÃO, ALONGAMENTO E TERMINAÇÃO

As características estruturais gerais dos ribossomos e seus processos de autoformação são discutidos no Capítulo 34. Essas entidades particulares servem como a maquinaria em que a sequência de nucleotídeos do mRNA é traduzida na sequência de aminoácidos de uma proteína específica. A tradução do mRNA começa próxima à extremidade 5' com a formação do terminal amina correspondente da molécula de proteína. A mensagem é decodificada de 5' para 3', concluindo a formação do terminal carboxila da proteína. Mais uma vez, manifesta-se o conceito de **polaridade**. Como descrito no Capítulo 36, a transcrição de um gene no mRNA correspondente, ou em seu precursor, forma primeiro a extremidade 5' da molécula de RNA. Em procariontes, isso permite o início da tradução do mRNA antes que a transcrição do gene seja concluída. Em organismos eucarióticos, o processo de transcrição é nuclear, ao passo que a tradução do mRNA ocorre no citoplasma, impedindo a transcrição e tradução simultâneas e permitindo o processamento necessário para gerar o mRNA maduro a partir do transcrito primário.

A iniciação envolve vários complexos proteína-RNA

A iniciação da síntese de proteínas requer que uma molécula de mRNA seja selecionada para a tradução por um ribossomo (Figura 37-6). Quando o mRNA se liga ao ribossomo, este deve localizar o códon de início, estabelecendo, assim, a fase de leitura correta no mRNA, e iniciar a tradução. Esse processo envolve tRNA, rRNA, mRNA e pelo menos **10 fatores de iniciação eucarióticos (eIFs)**, alguns dos quais possuem múltiplas subunidades (três a oito). Estão envolvidos também GTP, ATP e aminoácidos. A iniciação pode ser dividida em quatro etapas: (1) dissociação do ribossomo em suas subunidades 40S e 60S; (2) ligação de um complexo ternário composto pelo **iniciador metionil-tRNA (met-tRNAⁱ)**, por GTP e por **eIF-2** ao ribossomo 40S para formar o **complexo de pré-iniciação 43S**; (3) ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 40S

para formar o **complexo de iniciação 48S**; e (4) combinação do complexo de iniciação 48S com a subunidade ribossomal 60S para formar o **complexo de iniciação 80S**.

Dissociação ribossomal

Dois fatores de iniciação, **eIF-3** e **eIF-1A**, ligam-se à subunidade ribossomal 40S recém-dissociada. Isso retarda à sua reassociação com a subunidade 60S e permite que outros fatores de iniciação da tradução se associem com a subunidade 40S.

Formação do complexo de pré-iniciação 43S

A primeira etapa desse processo envolve a ligação do GTP pelo **eIF-2**. Esse complexo binário então se liga ao met tRNAⁱ, um tRNA especificamente envolvido na ligação ao códon de início AUG. (É importante observar que há dois tRNAs para metionina. Um especifica a metionina para o códon de início, e o outro, para metioninas internas. Cada um possui uma sequência de nucleotídeos única; ambos são aminoacetilados pela mesma metionil-tRNA-sintase.) O complexo ternário GTP-eIF-2-tRNAⁱ liga-se à subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S, que é subsequentemente estabilizado pela associação a **eIF-3** e **eIF-1A**.

O **eIF-2** é um dos dois pontos de controle para iniciação da síntese proteica nas células eucarióticas. O **eIF-2** consiste em subunidades α , β e γ . O **eIF-2 α** é **fosforilado** (na serina 51) por pelo menos **quatro proteínas-cinase diferentes (HCR, PKR, PERK e GCN2)** que são ativadas quando a célula está sob estresse e quando o despendimento de energia necessário para a síntese proteica pode ser danoso. Essas condições incluem o jejum prolongado de glicose e aminoácidos, infecções virais, presença intracelular de grandes quantidades de proteínas deformadas, desidratação celular, hiperosmolaridade e choque térmico. A PKR é particularmente interessante nesse aspecto. Essa cinase é ativada por vírus e provoca um mecanismo de defesa no hospedeiro que diminui a síntese de proteínas, incluindo a síntese de proteínas virais, inibindo, dessa forma, a replicação viral. O **eIF-2 α** fosforilado liga-se fortemente a e inativa a proteína **eIF-2B** de reciclagem de GTP-GDP, evitando, assim, a formação do complexo de pré-iniciação 43S e bloqueando a síntese proteica.

Formação do complexo de iniciação 48S

Como descrito no Capítulo 36, os terminais 5' das moléculas de mRNA nas células de eucariotos são "encapadas". O ^{7me}G-cap facilita a ligação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S. Um **complexo de proteína de ligação ao capeamento, eIF-4F (4F)**, que consiste em **eIF-4E (4E)** e no **complexo eIF-4G (4G)-eIF-4A (4A)**, liga-se ao capeamento por meio da proteína 4E. A seguir, o **eIF-4B (4B)** liga-se e reduz a estrutura secundária do complexo da extremidade 5' do mRNA por meio de sua atividade helicase dependente de ATP. A associação do mRNA ao complexo de pré-iniciação 43S para formar o complexo de iniciação 48S requer hidrólise de ATP. O **eIF-3** é uma proteína essencial porque se liga, com alta afinidade, ao componente 4G de 4F, e conecta esse complexo à subunidade ribossomal 40S. Após a associação do complexo de pré-iniciação 43S ao capeamento do mRNA e a redução ("fusão") da estrutura secundária próxima da extremidade 5' do mRNA, pela ação da helicase 4B e do ATP, o complexo transloca na

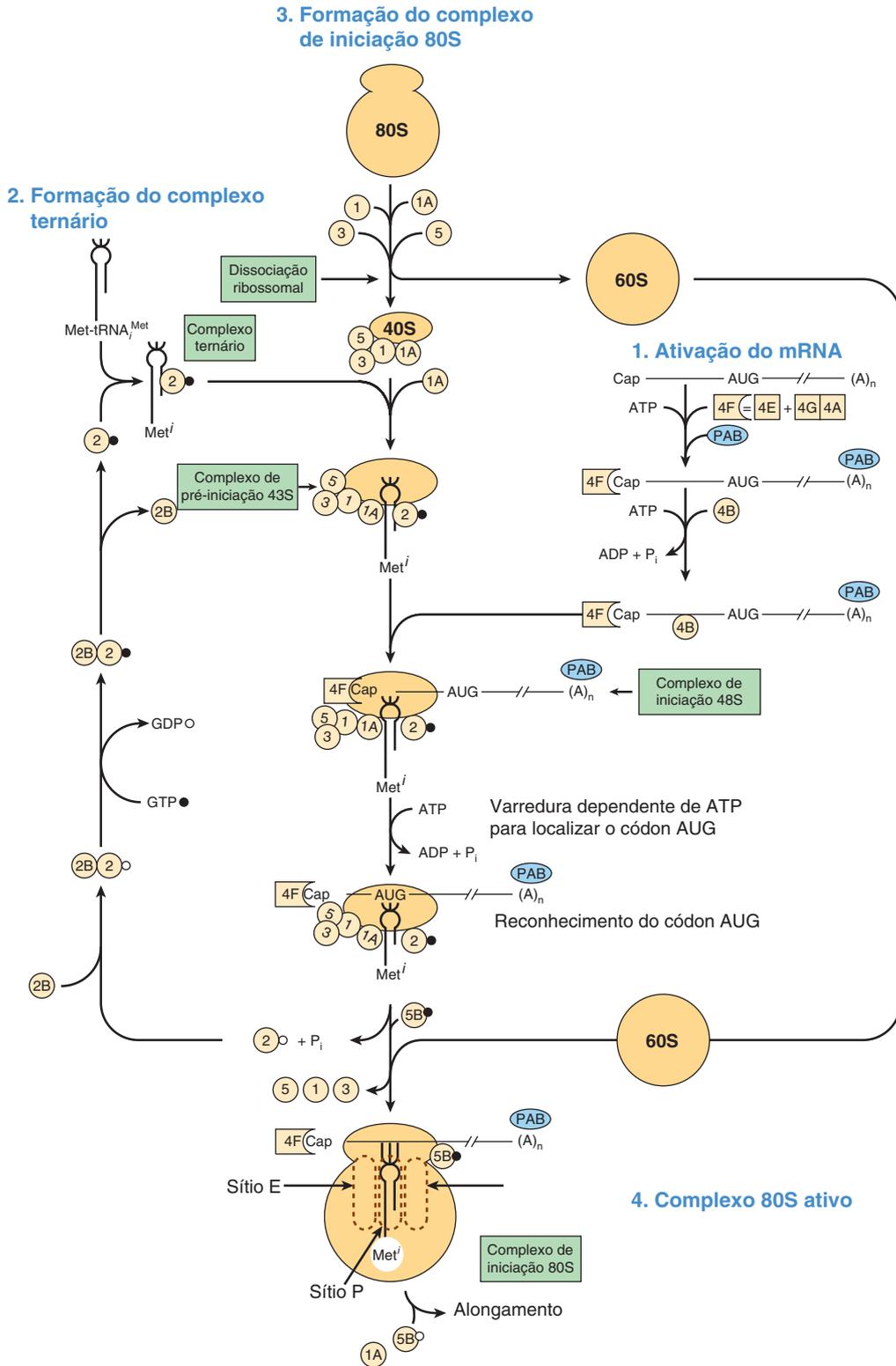


FIGURA 37-6 Representação diagramática da fase de iniciação da síntese proteica em um mRNA eucariótico. Os mRNAs de eucariotos contêm uma 7^{me}G-cap (Cap) 5' e um terminal [(A)_n] poli(A) 3', como mostrado. A formação do complexo de pré-iniciação da tradução ocorre em várias etapas: (1) ativação do mRNA (à direita); (2) formação do complexo ternário consistindo em met-tRNAⁱ, fator de iniciação eIF-2 e GTP (à esquerda); (3) varredura no complexo 43S para localizar o código de iniciação AUG, formando o complexo de iniciação 48S (centro); e (4) formação do complexo de iniciação ativo 80S (parte inferior, centro). (Mais detalhes no texto.) (GTP, ●; GDP, ○). Os vários fatores de iniciação aparecem de forma abreviada como círculos ou quadrados, por exemplo, eIF-3, (3), eIF-4F, (4F), 4•F é um complexo que consiste em 4E e 4A ligados a 4G (ver Figura 37-7). A proteína de ligação de poli(A), que interage com a cauda poli(A) 3' do mRNA, é abreviada como PAB. Esse conjunto de fatores de proteínas e a subunidade ribossomal 40S compreendem o complexo de pré-iniciação 43S, que depois se liga ao mRNA, para formar o complexo de pré-iniciação 48S.

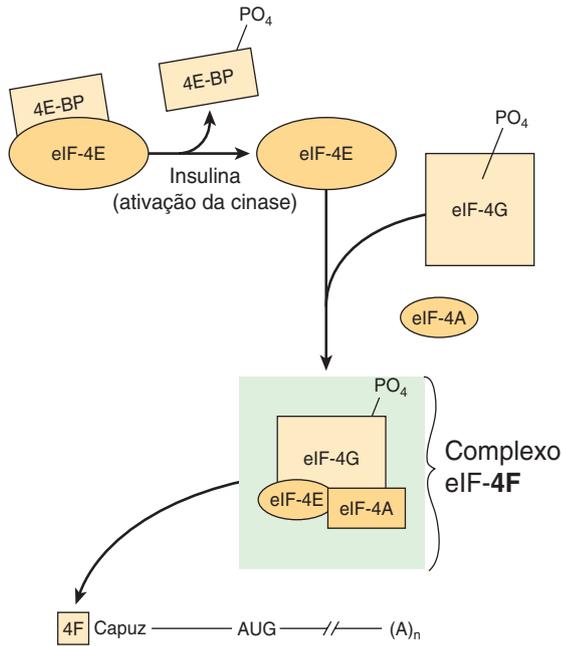


FIGURA 37-8 Ativação do eIF-4E pela insulina e formação do complexo eIF-4F de ligação ao cap. O complexo de cobertura 4F-cap do mRNA é mostrado nas Figuras 37-6 e 37-7. O complexo 4F consiste em eIF-4E (4E), eIF-4A e eIF-4G. O 4E é inativo quando ligado a uma proteína de uma família de proteínas de ligação (4E-BPs). A insulina e os polipeptídeos de crescimento mitogênicos ou fatores de crescimento (p. ex., IGF-1, PDGF, interleucina 2 e angiotensina II) ativam as vias das cinases PI3 / AKT, que ativam a mTOR-cinase, o que resulta na fosforilação de 4E-BP (ver Figura 42-8). O 4E-BP fosforilado dissocia-se de 4E, e o último é então capaz de formar o complexo 4F e se ligar à cobertura do mRNA. Esses polipeptídeos de crescimento também induzem a fosforilação do próprio 4G pelas vias mTOR e MAP-cinase. O 4F fosforilado liga-se mais avidamente ao capeamento do que o 4F não fosforilado, o que estimula a formação do complexo de iniciação 48S e, portanto, a tradução.

A insulina e os fatores de crescimento mitogênicos resultam na fosforilação de 4E na Ser209 (ou Thr210). O 4E fosforilado liga-se ao capuz muito mais avidamente do que a forma não fosforilada, estimulando, assim, a taxa de iniciação. Os componentes das vias da MAP-cinase, PI3K, mTOR, RAS e S6 cinases (ver Figura 42-8) podem, em condições adequadas, ser envolvidos nessas reações de fosforilação reguladoras.

A atividade de 4E é modulada em uma segunda forma e isso também envolve fosforilação; um conjunto de proteínas liga-se a e inativa 4E. Essas proteínas incluem **4E-BP1 (BP1)**, também conhecida como **PHAS-1** e suas proteínas estreitamente relacionadas **4E-BP2** e **4E-BP3**. A BP1 liga-se com alta afinidade à 4E. A associação [4E]•[BP1] impede que 4E se ligue a 4G (para formar 4F). Uma vez que essa interação é essencial para a ligação de 4F à subunidade ribossomal 40S e para seu posicionamento correto no mRNA com cap, o BP-1 inibe efetivamente a iniciação da tradução.

A insulina e outros fatores de crescimento resultam na fosforilação de BP-1 em sete sítios exclusivos. A fosforilação de BP-1 resulta em sua dissociação de 4E, e ele não pode se religar até que sítios críticos sejam desfosforilados. Esses efeitos na ativação de 4E explicam, em parte, como a insulina provoca

aumento pós-transcricional acentuado da síntese proteica no fígado e nos tecidos adiposo e muscular.

O alongamento também é um processo de múltiplas etapas facilitado por fatores acessórios

O alongamento é um processo cíclico no ribossomo, no qual um aminoácido é adicionado de cada vez à cadeia nascente de peptídeos (Figura 37-9). A sequência de peptídeos é determinada pela ordem de códons no mRNA. O alongamento envolve várias etapas catalisadas por proteínas, chamadas de **fatores de alongamento (EFs)**. Essas etapas são (1) ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A, (2) formação da ligação peptídica, (3) translocação do ribossomo no mRNA, e (4) expulsão do tRNA desacilado dos sítios P e E.

Ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A

No ribossomo 80S completo formado durante o processo de iniciação, o **sítio A (sítio aminoacil ou aceptor)** e o **sítio E (sítio de saída do tRNA desacilado)** estão livres. A ligação do aminoacil-tRNA adequado ao sítio A requer o reconhecimento do códon correto. O **fator de alongamento 1A (EF1A)** forma um complexo ternário com o GTP e o aminoacil-tRNA que está entrando (Figura 37-9). Esse complexo permite que o aminoacil-tRNA correto entre no sítio A com a liberação de EF1A•GDP e fosfato. A hidrólise de GTP é catalisada por um sítio ativo no ribossomo; a hidrólise induz uma mudança conformacional no ribossomo, aumentando concomitantemente a afinidade pelo tRNA. Como mostrado na Figura 37-9, o EF1A-GDP então se recicla para EF1A-GTP com o auxílio de outros fatores proteicos solúveis e GTP.

Formação da ligação peptídica

O grupo α amino do novo aminoacil-tRNA, no sítio A, realiza um ataque nucleofílico ao grupo carboxila esterificado do **peptidil-tRNA** que ocupa o **sítio P (sítio peptidil ou polipeptídico)**. Na iniciação, esse sítio é ocupado pelo met-tRNAⁱ iniciador. Essa reação é catalisada por uma **peptidil-transferase**, um componente de RNA 28S da subunidade ribossomal 60S. Este é outro exemplo de atividade de ribozima e indica um importante – e previamente ignorado – papel direto do RNA na síntese de proteínas (Tabela 37-3). Como o aminoácido no aminoacil-tRNA já está “ativado”, nenhuma fonte de energia adicional é necessária para essa reação. A reação resulta na ligação da cadeia de peptídeo em crescimento ao tRNA no sítio A.

Translocação

O agora desacilado tRNA está ligado pelo seu anticódon ao sítio P em uma extremidade e por uma cauda CCA aberta ao sítio de saída (E) na grande subunidade ribossomal (parte central da Figura 37-9). Nesse ponto, o **fator de alongamento 2 (EF2)** liga-se ao peptidil-tRNA e o desloca do sítio A para o sítio P. Por sua vez, o tRNA desacilado está no sítio E, a partir do qual ele deixa o ribossomo. O complexo EF2-GTP é hidrolisado a EF2-GDP, movendo efetivamente o mRNA para a frente por um códon e deixando o sítio A aberto para ser

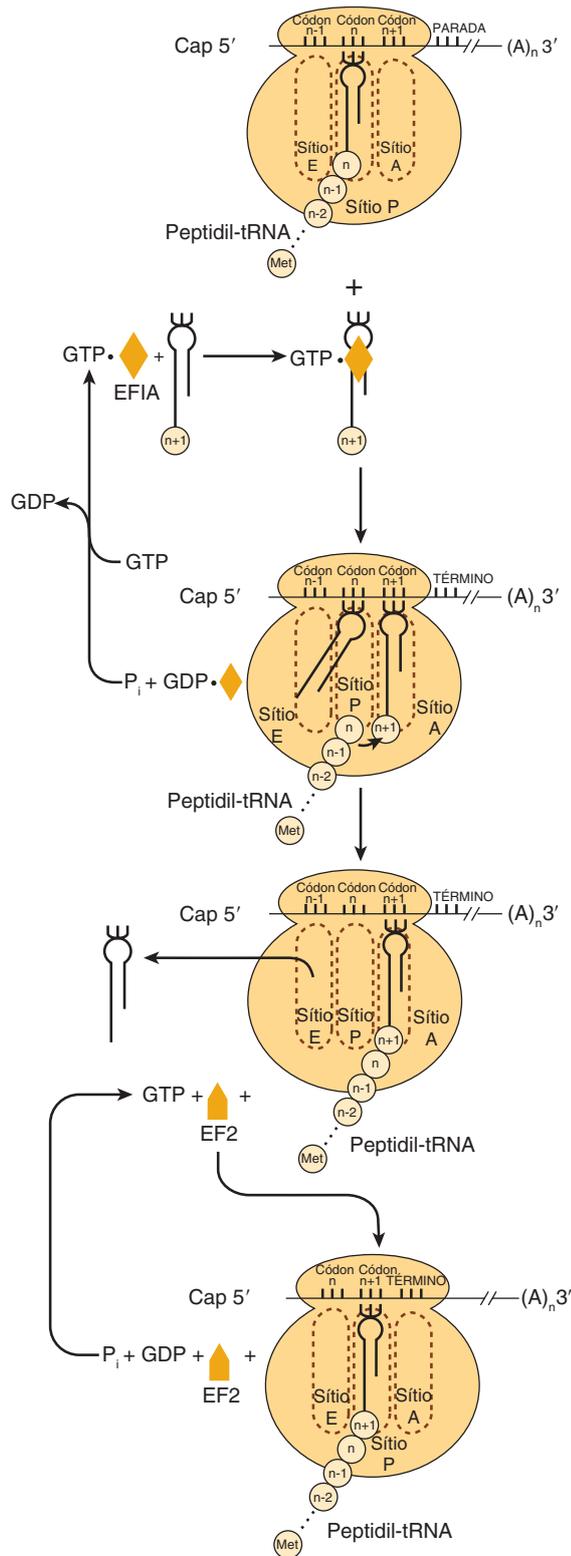


FIGURA 37-9 Representação diagramática do processo de alongamento do peptídeo da síntese proteica. Os pequenos círculos marcados $n-1$, n , $n+1$, etc., representam os resíduos de aminoácidos da molécula de proteína recentemente formada (na orientação N-terminal para C-terminal) e os códons correspondentes no mRNA. EF1A e EF2 representam os fatores de alongamento 1 e 2, respectivamente. Os sítios do peptidil-tRNA, do aminoacil-tRNA e de saída no ribossomo são representados pelos sítios P, A e E, respectivamente.

TABELA 37-3 Evidências de que o rRNA é uma peptidil-transferase

- Ribossomos podem fazer ligações peptídicas (embora de modo ineficiente), mesmo quando as proteínas são removidas ou inativadas.
- Certas partes da sequência de rRNA são altamente conservadas em todas as espécies.
- Essas regiões conservadas estão na superfície da molécula de RNA.
- O RNA pode ser catalítico em muitas outras reações químicas.
- Mutações que resultam em resistência antibiótica no nível da síntese proteica são mais frequentemente encontradas em rRNA do que em componentes proteicos do ribossomo.
- Estrutura cristalográfica de raios X da subunidade grande ligada aos tRNAs sugere o mecanismo detalhado.

ocupado por outro complexo ternário de aminoácido tRNA-EF1A-GTP e outro ciclo de alongamento.

O carregamento da molécula de tRNA com o radical aminoacil requer a hidrólise de um ATP em AMP, equivalente à hidrólise de dois ATPs a dois ADPs e fosfatos. A entrada do aminoacil-tRNA no sítio A resulta na hidrólise de um GTP em GDP. A translocação do recém-formado peptidil-tRNA do sítio A para o sítio P pelo EF2 resulta, do mesmo modo, na hidrólise de GTP em GDP e fosfato. Assim, as necessidades energéticas para a formação de uma ligação peptídica incluem o equivalente à hidrólise de duas moléculas de ATP em ADP e de duas moléculas de GTP em GDP, ou à hidrólise de quatro ligações de fosfato de alta energia. Os ribossomos de eucariotos podem incorporar até seis aminoácidos por segundo, e os de procariotos incorporam até 18 por segundo. Assim, o processo de síntese peptídica, que precisa de energia, ocorre com grande velocidade e precisão até que um códon de terminação seja alcançado.

A terminação ocorre quando um códon de término é reconhecido

Comparada à iniciação e ao alongamento, a terminação é um processo relativamente simples (**Figura 37-10**). Após múltiplos ciclos de alongamento, culminando na polymerização de aminoácidos específicos na molécula de proteína, o códon de término ou de terminação do mRNA (UAA, UAG, UGA) surge no sítio A. Normalmente, não há um tRNA com um anticódon capaz de reconhecer esse sinal de terminação. O **fator de liberação RF1** reconhece que um códon de término está no sítio A (Figura 37-10). O RF1 é ligado por um complexo composto pelo **fator de liberação RF3** com GTP ligado. Esse complexo, com a peptidil-transferase, promove a hidrólise da ponte entre o peptídeo e o tRNA, ocupando o sítio P. Assim, é adicionada uma molécula de água, em vez de um aminoácido. Essa hidrólise libera a proteína e o tRNA do sítio P. Após a hidrólise e a liberação, o ribossomo 80S dissocia-se em suas subunidades 40S e 60S, que são, então, recicladas (Figura 37-7). Portanto, os fatores de liberação são proteínas que hidrolisam a ligação peptidil-tRNA quando um códon de término ocupa o sítio A. O mRNA é, então, liberado do ribossomo, que se dissocia em suas subunidades componentes 40S e 60S, e outro ciclo pode ser repetido.

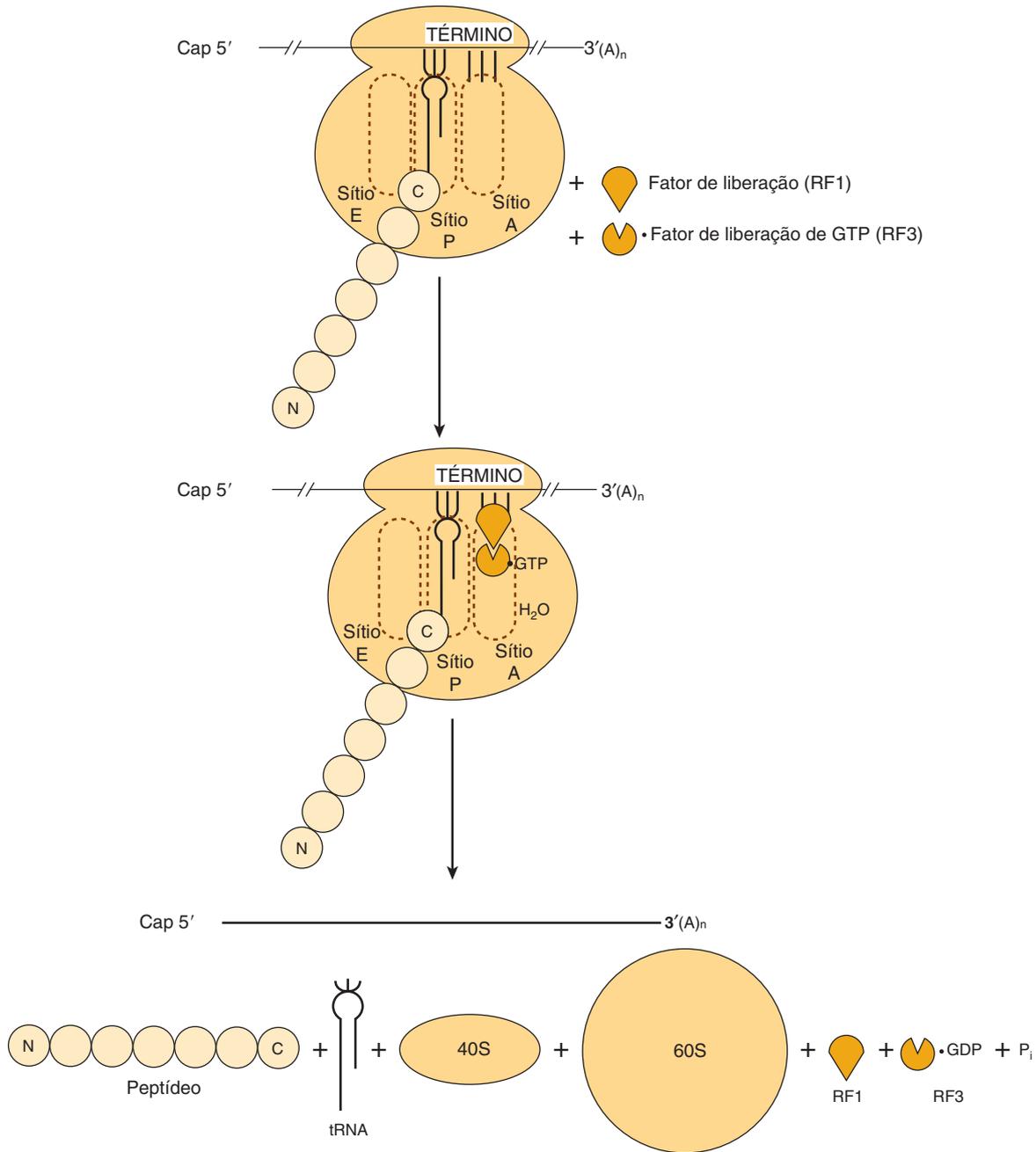


FIGURA 37-10 Representação diagramática do processo da terminação da síntese proteica. Os sítios de peptidil-tRNA, aminoacil-tRNA e de saída estão indicados como sítios P, A e E, respectivamente. O códon de término é indicado pelas três barras verticais e pela palavra “TÉRMINO”. O fator de liberação RF1 liga-se ao códon de término no sítio A. O fator de liberação RF3, com o GTP ligado, liga-se ao RF1. A hidrólise do complexo peptidil-tRNA é mostrada pela entrada de H₂O. N e C indicam os aminoácidos aminoterminais e carboxiterminais da cadeia polipeptídica nascente, respectivamente, ilustrando a polaridade da síntese proteica. A terminação resulta na liberação do mRNA, da proteína recém-sintetizada, do tRNA livre, das subunidades 40S e 60S, bem como de RF1, de RF3 ligado a GDP e de P_i, como mostrado na parte inferior, à direita.

Os polissomos são conjuntos de ribossomos

Muitos ribossomos podem traduzir a mesma molécula de mRNA de maneira simultânea. Devido ao seu tamanho relativamente grande, as partículas ribossomais não podem se ligar a um mRNA a menos de 35 nucleotídeos de distância. Múltiplos ribossomos na mesma molécula de mRNA formam um **polirribossomo**, ou “**polisomo**” (Figura 37-7). Em um

sistema sem restrição, o número de ribossomos ligados a um mRNA (e, portanto, o tamanho dos polirribossomos) correlaciona-se positivamente ao comprimento da molécula de mRNA.

Os polirribossomos que sintetizam proteínas ativamente podem existir como partículas livres no citoplasma celular ou podem estar ligados a lâminas de material citoplasmático membranoso, chamado de **retículo endoplasmático**.

A ligação dos polirribossomos particulados ao retículo endoplasmático é responsável por sua aparência “rugosa”, como observado na microscopia eletrônica. As proteínas sintetizadas pelos polirribossomos ligados são expelidas para o espaço da cisterna entre as lâminas de retículo endoplasmático rugoso, e são exportadas a partir desse local. Alguns dos produtos proteicos do retículo endoplasmático rugoso são empacotados pelo aparelho de Golgi para eventual exportação (ver Capítulo 46). As partículas de polirribossomos livres no citosol são responsáveis pela síntese de proteínas necessárias para as funções intracelulares.

Os mRNAs não traduzidos podem formar partículas de ribonucleoproteínas que se acumulam em organelas citoplasmáticas, denominadas corpos P

Os mRNAs, ligados por proteínas empacotadoras específicas e exportados do núcleo como **partículas de ribonucleoproteínas (mRNPs)**, algumas vezes não se associam imediatamente aos ribossomos para serem traduzidos. Em vez disso, os mRNAs específicos podem se associar aos componentes proteicos que formam os **corpos P**, compartimentos densos pequenos que incorporam os mRNAs como mRNPs (**Figura 37-11**). Essas organelas citoplasmáticas estão relacionadas a pequenos grânulos semelhantes que contêm mRNAs, encontrados em neurônios e em certas células maternas. Os corpos P são sítios de repressão da tradução e de destruição do mRNA. Mais de 35 proteínas diferentes residem exclusiva ou extensivamente nos corpos P. Essas proteínas variam de enzimas de escapeamento de mRNA, RNA helicases e RNA exonucleases (5'-3' e 3'-5'), até componentes envolvidos na função do miRNA e

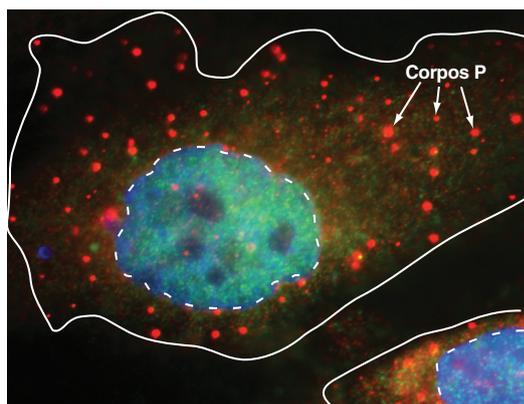


FIGURA 37-11 O corpo P é uma organela citoplasmática envolvida no metabolismo do mRNA. Fotomicrografia de duas células de mamíferos em que uma única proteína distinta constituinte do corpo P foi visualizada usando o anticorpo cognato marcado fluorescentemente. Os corpos P aparecem como pequenos círculos vermelhos de tamanhos variados no citoplasma. As membranas plasmáticas das células são indicadas por uma linha sólida branca e as nucleares por uma linha tracejada. Os núcleos foram contraincolorados com um corante fluorescente com espectros de excitação/emissão de fluorescência diferentes do anticorpo marcado, utilizado para identificar os corpos P; a coloração nuclear intercala-se entre os pares de bases de DNA e aparece como azul/verde. Modificada de <http://www.mcb.arizona.edu/parker/WHAT/what.htm>. (Utilizada com a permissão do Dr. Roy Parker.)

controle de qualidade do mRNA. Entretanto, a incorporação de um mRNP não é uma inequívoca “sentença de morte” do mRNA. De fato, embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos, certos mRNAs parecem ser temporariamente armazenados nos corpos P e, então, recuperados e utilizados na tradução de proteínas. Isso sugere que há um equilíbrio no qual as funções citoplasmáticas do mRNA (tradução e degradação) são controladas por interações dinâmicas do mRNA com os polissomos e os corpos P.

A maquinaria da síntese proteica pode responder a ameaças ambientais

A **ferritina**, uma proteína de ligação ao ferro, evita que o ferro ionizado (Fe^{2+}) atinja níveis tóxicos no interior das células. O ferro elementar estimula a síntese de ferritina, provocando a liberação de uma proteína citoplasmática que se liga a uma região específica na região 5' não traduzida do mRNA da ferritina. O rompimento dessa interação proteína-mRNA ativa o mRNA da ferritina e resulta em sua tradução. Esse mecanismo fornece um rápido controle da síntese de uma proteína que sequestra Fe^{2+} , uma molécula potencialmente tóxica (ver Figura 52-8). Do mesmo modo, o estresse ambiental e a inanição inibem as funções positivas de mTOR (Figuras 37-8 e 42-8) na promoção da ativação do eIF-4F e da formação do complexo 48S.

Muitos vírus cooptam pela maquinaria da síntese proteica da célula do hospedeiro

A maquinaria da síntese proteica também pode ser modificada de modo prejudicial. Os vírus replicam utilizando os processos das células hospedeiras, incluindo aqueles envolvidos na síntese proteica. Alguns mRNAs virais são traduzidos de maneira bem mais eficiente do que aqueles das células do hospedeiro (p. ex., vírus da encefalomiocardite). Outros, como os reovírus e o vírus da estomatite vesicular, replicam de maneira eficiente e, assim, os seus mRNAs muito abundantes possuem vantagem competitiva sobre os mRNAs das células do hospedeiro para fatores de tradução limitados. Outros vírus inibem a síntese proteica da célula do hospedeiro ao impedirem a associação do mRNA com o ribossomo 40S.

O poliovírus e outros picornavírus ganham uma vantagem seletiva interrompendo a função do complexo 4F. Os mRNAs desses vírus não possuem uma estrutura de capuz para direcionar a ligação da subunidade ribossomal 40S (ver anteriormente). Em vez disso, a subunidade ribossomal 40S entra em contato com um **sítio de entrada ribossomal interno (IRES)** em uma reação que requer o 4G, mas não o 4E. O vírus ganha uma vantagem seletiva pela posse de uma protease que ataca o 4G e remove o sítio de ligação aminoterminal do 4E. Agora o complexo 4E-4G (4F) não pode se formar, logo, a subunidade ribossomal 40S não pode ser direcionada aos mRNAs capeados do hospedeiro, abolindo a síntese proteica da célula do hospedeiro. O fragmento 4G pode direcionar a ligação da subunidade ribossomal 40S para os mRNAs que contêm IRES, de modo que a tradução do mRNA viral seja muito eficaz (**Figura 37-12**). Esses vírus também promovem a desfosforilação de BP1 (PHAS-1) e, assim, diminuem a tradução dependente de cap (4E) (Figura 37-8).

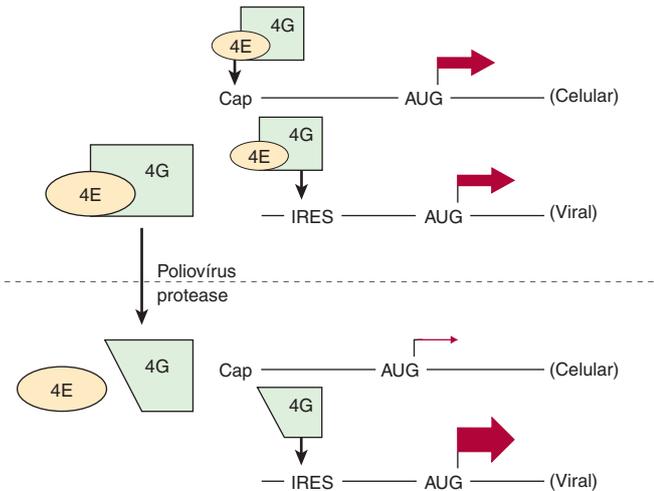


FIGURA 37-12 Picornavírus desfazem o complexo 4F. O complexo 4E-4G (4F) dirige a subunidade ribossomal 40S para o mRNA geralmente capeado (ver texto). Entretanto, o 4G, por si, é suficiente para direcionar a subunidade 40S para o sítio de entrada ribossomal interno (IRES) de alguns mRNAs virais. Para ganhar vantagem seletiva, certos vírus (p. ex., poliovírus) expressam uma protease que cliva o sítio de ligação 4E da extremidade aminoterminal do 4G. Esse 4G truncado pode direcionar a subunidade ribossomal 40S para os mRNAs que possuem um IRES, mas não para aqueles que possuem um capeamento (i.e., mRNAs da célula do hospedeiro). As larguras das setas indicam a taxa de iniciação da tradução a partir do códon AUG em cada exemplo. Outros vírus utilizam processos diferentes para realizar a iniciação seletiva da tradução dos seus mRNAs virais cognatos por meio de elementos IRES.

O PROCESSAMENTO PÓS-TRADUÇÃO AFETA A ATIVIDADE DE MUITAS PROTEÍNAS

Alguns vírus de animais, principalmente o HIV, o poliovírus e o vírus da hepatite A, sintetizam proteínas policistrônicas longas a partir de uma molécula de mRNA longa. As moléculas de proteínas traduzidas a partir desses mRNAs longos são subsequentemente clivadas em sítios específicos para fornecer as várias proteínas específicas necessárias para a função viral. Em células animais, muitas proteínas celulares são sintetizadas a partir do molde de mRNA como uma molécula precursora que, a seguir, deve ser modificada para chegar à proteína ativa. O protótipo é a insulina, uma proteína pequena que possui duas cadeias polipeptídicas com ligações dissulfeto intercadeias e intracadeias. A molécula é sintetizada como uma única cadeia precursora, ou **pró-hormônio**, que se dobra para permitir a formação das ligações dissulfeto. Uma protease específica remove o segmento que conecta as duas cadeias, formando a molécula de insulina funcional (ver Figura 41-12).

Muitos outros peptídeos são sintetizados como pró-proteínas que necessitam de modificações antes de exercer suas atividades biológicas. Muitas das modificações pós-tradução envolvem a remoção de resíduos de aminoácidos aminoterminais por aminopeptidases específicas (ver Figura 41-14). Em contrapartida, o colágeno, uma proteína abundante nos espaços extracelulares em eucariotos superiores, é sintetizado

como procolágeno. Três moléculas polipeptídicas de procolágeno, frequentemente com sequências não idênticas, alinham-se de modo particular dependente da existência de peptídeos aminoterminais específicos (ver Figura 5-11). Enzimas específicas, então, realizam as hidroxilações e oxidações de resíduos de aminoácidos específicos no interior das moléculas de procolágeno, fornecendo as ligações cruzadas para maior estabilidade. Os peptídeos aminoterminais são clivados para fora da molécula para formar o produto final – uma molécula de colágeno forte e insolúvel. Ocorrem muitas outras modificações pós-tradução de proteínas. Modificações covalentes por acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e glicosilação são comuns (ver Capítulo 5; Tabela 35-1).

MUITOS ANTIBIÓTICOS ATUAM INIBINDO SELETIVAMENTE A SÍNTESE PROTEICA EM BACTÉRIAS

Os ribossomos em bactérias e nas mitocôndrias de células de eucariotos superiores são diferentes dos ribossomos de mamíferos descritos no Capítulo 34. O ribossomo bacteriano é menor (70S vs. 80S) e apresenta moléculas proteicas e um complemento de RNA um pouco mais simples e diferentes. Essa diferença pode ser explorada para fins clínicos, pois muitos antibióticos eficazes interagem especificamente com as proteínas e os RNAs de ribossomos de procariotos e, assim, apenas inibem a síntese proteica bacteriana. Isso resulta em parada do crescimento ou morte da bactéria. Os membros mais eficientes dessa classe de **antibióticos** (p. ex., **tetraciclina**, **lincomicina**, **eritromicina** e **cloranfenicol**) não interagem com os componentes de ribossomos de eucariotos e, assim, não são tóxicos para os eucariotos. A tetraciclina impede a ligação dos aminoacil-tRNAs ao ribossomo bacteriano no sítio A. O cloranfenicol e a classe de macrolídeos de antibióticos ligam-se ao rRNA 23S, o que é interessante, levando-se em conta o recente papel do rRNA na formação da ligação peptídica por meio de sua atividade de peptidil-transferase. Deve-se mencionar que a semelhança estreita entre os ribossomos procarióticos e mitocondriais pode levar a complicações na utilização de alguns antibióticos.

Outros antibióticos inibem a síntese proteica em todos os ribossomos (**puromicina**) ou apenas naqueles de células de eucariotos (ciclo-heximida). A puromicina (**Figura 37-13**) é um análogo estrutural do tirosinil-tRNA. A puromicina é incorporada por meio do sítio A ao ribossomo na posição carboxiterminal de um peptídeo, mas provoca a liberação prematura do polipeptídeo. A puromicina, como análogo do tirosinil-tRNA, inibe efetivamente a síntese proteica tanto em procariotos quanto em eucariotos. A ciclo-heximida inibe a peptidil-transferase na subunidade ribossomal 60S em eucariotos, ligando-se, provavelmente, a um componente do rRNA.

A **toxina diftérica**, uma exotoxina do *Corynebacterium diphtheriae* infectado com um fago lisogênico específico, catalisa a ADP-ribosilação de EF-2 no aminoácido peculiar diftamida em células de mamíferos. Essa modificação inativa o EF-2, inibindo, dessa forma, especificamente, a síntese proteica em mamíferos. Vários animais (p. ex., camundongos) são

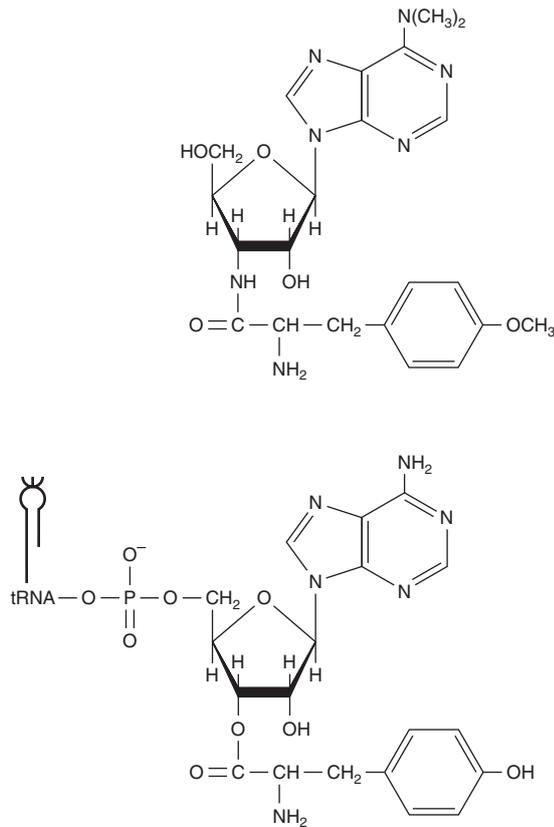


FIGURA 37-13 As estruturas comparativas do antibiótico puromicina (parte superior) e da porção terminal 3' do tirosil-tRNA (parte inferior).

resistentes à toxina diftérica. Essa resistência deve-se à incapacidade de a toxina diftérica cruzar a membrana celular, em vez de ser resultante de insensibilidade do EF-2 dos camundongos à ADP-ribosilação via NAD catalisada pela toxina diftérica.

A **ricina**, uma molécula extremamente tóxica isolada da mamona, inativa o RNA ribossomal 28S de eucariotos catalisando a clivagem N-glicolítica ou a remoção de uma única adenina.

Muitos desses compostos – puromicina e ciclo-heximida, em particular – não são clinicamente úteis, mas têm sido importantes na elucidação do papel da síntese proteica na regulação dos processos metabólicos, sobretudo na indução enzimática por hormônios.

RESUMO

- O fluxo de informação genética obedece à sequência DNA → RNA → proteína.
- A informação genética em um gene é transcrita em uma molécula de RNA, de modo que a sequência do último seja complementar àquela de uma fita de DNA.
- O RNA ribossomal (rRNA), o RNA transportador (tRNA) e o RNA mensageiro (mRNA) estão diretamente envolvidos na síntese proteica.
- Os mi/siRNAs regulam o funcionamento do mRNA no nível da tradução e/ou estabilidade.

- A informação no mRNA está em uma sequência ordenada de códons, e cada um deles tem três nucleotídeos de comprimento.
- O mRNA é lido de maneira contínua do códon de início (AUG) para o códon de término (UAA, UAG, UGA).
- A fase de leitura aberta (ORF) do mRNA é a série de códons, cada um especificando um certo aminoácido, que determina a sequência de aminoácidos precisa da proteína.
- A síntese proteica, como a síntese de DNA e RNA, segue a polaridade 5'-3' do mRNA e pode ser dividida em três processos: iniciação, alongamento e terminação.
- Proteínas mutantes surgem quando substituições de uma única base resultam em códons que especificam um aminoácido diferente em certa posição, quando um códon de término resulta em uma proteína truncada, ou quando adições ou deleções de bases alteram a fase de leitura, de modo que códons diferentes sejam lidos.
- Uma variedade de compostos, incluindo vários antibióticos, inibe a síntese proteica ao afetar uma ou mais etapas envolvidas na síntese de proteínas.

REFERÊNCIAS

- Crick FH, Barnett L, Brenner S, et al: General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 1961;192:1227-1232.
- Decker CJ, Parker R: P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:a012286. doi: 10.1101/cshperspect.a012286.
- Hinnebusch AG: Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:434-467.
- Jenner L, Melnikov S, Garreau de Loubresse N, et al: Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 2012; 22:759-767.
- Kimball SR, Jefferson LS: Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. *J Biol Chem* 2009;285:29027-29032.
- Kozak M: Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 1991;266:1986-1970.
- Liu CC, Schultz PG: Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem* 2010;79:413-444.
- Maquat LE, Tarn WY, Isken O: The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 2010;142:368-374.
- Mauger DM, Siegfried NA, Weeks KM: The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. *FEBS Lett* 2013 587:1180-1188.
- Moore PB, Steitz TA: The roles of RNA in the synthesis of protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a003780. doi: 10.1101/cshperspect.a003780.
- Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ: Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:254-266.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG: Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2010;136:731-745.
- Spriggs KA, Bushell M, Willis AE: Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 2010;40:228-237.
- Thompson SR: Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol* 2012;20:558-566.
- Wang Q, Parrish AR, Wang L: Expanding the genetic code for biological studies. *Chem Biol* 2009;16:323-336.
- Weatherall DJ: Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet* 2004;5:625-631.
- Wilson DN: Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2013;12:35-48.

Regulação da expressão gênica

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar que as muitas etapas envolvidas nos processos vetoriais de expressão gênica, que variam da modulação dirigida do número de cópias de genes ao rearranjo gênico, à transcrição, ao processamento e ao transporte do mRNA a partir do núcleo, à tradução, à compartimentalização subcelular de proteínas, à modificação e à degradação de proteínas pós-tradução, estão submetidas ao controle regulador, tanto positivo quanto negativo. Alterações em um ou em vários desses múltiplos processos podem aumentar ou diminuir a quantidade e/ou atividade do produto gênico cognato.
- Compreender que os fatores de transcrição de ligação ao DNA, proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA que estão fisicamente ligadas a seus elementos promotores de transcrição, podem ativar ou reprimir a transcrição gênica.
- Reconhecer que os fatores de transcrição de ligação ao DNA são frequentemente proteínas modulares compostas por domínios estruturais e funcionais distintos, que podem controlar a transcrição gênica do mRNA, direta ou indiretamente, por meio de contatos com a RNA-polimerase e seus cofatores, ou por meio de interações com correguladores que modulam a estrutura do nucleossomo, a composição e a posição por modificações covalentes e/ou deslocamento do nucleossomo.
- Compreender que os eventos reguladores direcionados pelo nucleossomo geralmente aumentam ou diminuem a acessibilidade do DNA subjacente, como sequências intensificadoras ou promotoras, embora a modificação do nucleossomo também possa criar novos sítios de ligação para outros correguladores.
- Compreender que os processos de transcrição, de processamento do RNA e de exportação nuclear do RNA estão todos acoplados.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os organismos alteram a expressão dos genes em resposta às indicações ou aos programas de desenvolvimento genético, aos desafios ambientais ou às doenças, modulando a quantidade e os padrões espaciais e/ou temporais da expressão gênica. Os mecanismos que controlam a expressão gênica foram estudados em detalhes e frequentemente envolvem a modulação da transcrição gênica. O controle da transcrição resulta, em última análise, em mudanças no modo de interação de moléculas regulatórias específicas, geralmente proteínas, com várias regiões de DNA do gene controlado. Essas interações podem ter tanto efeitos positivos quanto negativos na transcrição. O controle da transcrição pode resultar em expressão gênica específica de tecidos, e a regulação

gênica é influenciada por hormônios, fatores de crescimento, metais pesados e substâncias químicas.

Além dos controles em nível de transcrição, a expressão gênica também pode ser modulada pela amplificação gênica, pelo rearranjo gênico, pelas modificações pós-transcricionais, pela estabilização do RNA, pelo controle de tradução, pela modificação, compartimentalização e estabilização de proteínas. Muitos dos mecanismos que controlam a expressão gênica são utilizados para responder a sinais de desenvolvimento, fatores de crescimento, hormônios, agentes ambientais e medicamentos terapêuticos. A desregulação da expressão gênica pode levar a doenças em seres humanos. Portanto, uma compreensão molecular desses processos levará ao desenvolvimento de agentes que alteram os mecanismos fisiopatológicos ou inibem o funcionamento, ou interrompem o crescimento de organismos patogênicos.

A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA É NECESSÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO, A DIFERENCIAÇÃO E A ADAPTAÇÃO

A informação genética presente em cada célula somática normal de um organismo metazoário é praticamente idêntica. As exceções conectadas, geneticamente reproduzíveis, são encontradas nas poucas células com genes amplificados ou rearranjados para realizar funções celulares especializadas. Em várias doenças, a integridade do cromossomo é alterada (i.e., câncer; Figura 56-11), em alguns casos, de todo o cromossomo (p. ex., trissomia do 21, que causa a síndrome de Down). A expressão da informação genética deve ser regulada durante a ontogenia e a diferenciação do organismo e seus componentes celulares. Além disso, para o organismo se adaptar ao seu ambiente e para conservar energia e nutrientes, a expressão da informação genética deve ser sincronizada a sinais extrínsecos e responder apenas quando necessário. Com a evolução dos organismos, mecanismos reguladores mais sofisticados apareceram, os quais fornecem ao organismo e às suas células a capacidade de resposta necessária para a sobrevivência em um ambiente complexo. As células de mamíferos possuem cerca de mil vezes mais informação genética do que a bactéria *Escherichia coli*. Uma grande parcela dessa informação genética adicional está provavelmente envolvida na regulação da expressão gênica durante a diferenciação de tecidos e em processos biológicos no organismo pluricelular e para assegurar que o organismo possa responder aos desafios ambientais complexos.

Em termos simples, há apenas dois tipos de regulação gênica: **regulação positiva** e **regulação negativa** (Tabela 38-1). Quando a expressão de informação genética é quantitativamente aumentada pela presença de um elemento regulador específico, a regulação é considerada positiva; quando a expressão da informação genética é diminuída pela presença de um elemento regulador específico, a regulação é considerada negativa. O elemento, ou a molécula, mediador da regulação negativa é chamado de **regulador negativo**, **silenciador** ou **repressor**; o mediador da regulação positiva é um **regulador positivo**, um **estimulador** ou um **ativador**. Entretanto, um **duplo-negativo** tem o efeito de ação de um positivo. Assim, um efator que inibe o funcionamento de um regulador negativo aparecerá como responsável por uma regulação positiva. Muitos sistemas regulados que parecem ser induzidos são, na verdade, **desreprimidos** no nível molecular. (Ver Capítulo 9 para a explicação sobre esses termos.)

TABELA 38-1 Efeitos da regulação positiva e negativa na expressão gênica

	Taxa de expressão gênica	
	Regulação negativa	Regulação positiva
Regulador presente	Diminuída	Aumentada
Regulador ausente	Aumentada	Diminuída

OS SISTEMAS BIOLÓGICOS EXIBEM TRÊS TIPOS DE RESPOSTAS TEMPORAIS A UM SINAL REGULADOR

A **Figura 38-1** mostra a extensão ou a quantidade de expressão gênica em três tipos de resposta temporal a um sinal indutor. A **resposta do tipo A** é caracterizada por um aumento da expressão gênica, que é dependente da presença contínua do sinal indutor. Quando o sinal indutor é removido, a quantidade de expressão gênica diminui para seu nível basal, mas a quantidade aumenta repetidamente em resposta ao reaparecimento do sinal específico. Esse tipo de resposta é comumente observado em procariotos como reação a mudanças súbitas da concentração intracelular de um nutriente. É também observado em muitos organismos superiores após exposição a indutores, como hormônios, nutrientes ou fatores de crescimento (ver Capítulo 42).

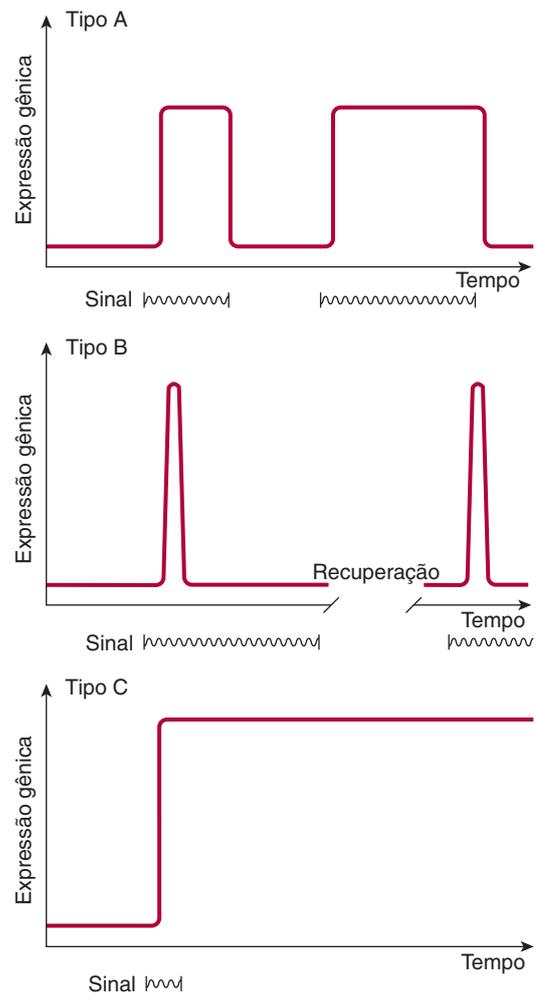


FIGURA 38-1 Representações diagramáticas das respostas do grau de expressão de um gene a sinais reguladores específicos (como um hormônio) em função do tempo.

A **resposta do tipo B** exibe um aumento transitório da expressão gênica, mesmo na presença contínua de um sinal regulador. Após a terminação do sinal regulador e de ter sido permitido que a célula se recuperasse, pode ser observada uma segunda resposta transitória a um sinal regulador subsequente. Esse fenômeno de recuperação da resposta-dessensibilização caracteriza a ação de muitos agentes farmacológicos, mas também é uma característica de muitos processos que ocorrem naturalmente. Em geral, esse tipo de resposta ocorre durante o desenvolvimento de um organismo, quando apenas o aparecimento transitório de um produto gênico específico é necessário, embora o sinal persista.

O padrão de **resposta do tipo C** exibe, em resposta ao sinal regulador, um aumento da expressão gênica que persiste indefinidamente, mesmo após a terminação do sinal. O sinal atua como um gatilho nesse padrão. Uma vez que a expressão gênica é iniciada na célula, ela não pode ser encerrada, mesmo nas células-filhas; ela é, portanto, uma alteração irreversível e herdada. Esse tipo de resposta geralmente ocorre durante o desenvolvimento de funções diferenciadas em um tecido ou órgão.

Organismos unicelulares e pluricelulares simples servem como modelos valiosos para o estudo da expressão gênica em células de mamíferos

A análise da regulação da expressão gênica em células procarióticas ajudou a estabelecer o princípio de que a informação segue do gene para um RNA mensageiro (mRNA) e deste para uma molécula de proteína específica. Esses estudos foram auxiliados pelas análises genéticas avançadas que puderam ser realizadas em organismos procarióticos e em organismos eucarióticos inferiores, como a levedura do fermento de bolo, *Saccharomyces cerevisiae*, e a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, entre outros. Recentemente, os princípios estabelecidos nesses estudos, acoplados a uma variedade de técnicas de biologia molecular, levaram a um notável progresso na análise da regulação gênica em organismos eucarióticos superiores, incluindo mamíferos. Neste capítulo, a discussão inicial será centrada em sistemas de procariotos. Os impressionantes estudos genéticos não serão descritos, mas a fisiologia da expressão gênica será discutida. Entretanto, quase todas as conclusões sobre essa fisiologia derivaram de estudos genéticos e foram confirmadas por experimentos bioquímicos e de genética molecular.

Algumas características da expressão gênica de procariotos são singulares

Antes que a fisiologia da expressão gênica possa ser explicada, alguns termos genéticos especializados e reguladores devem ser definidos para sistemas procarióticos. Em procarióticos, os genes envolvidos na via metabólica estão frequentemente presentes em uma série linear, chamada de **óperon**, por exemplo, o óperon *lac*. O óperon pode ser regulado por um único promotor ou por uma única região reguladora. O **cistron** é a menor unidade de expressão gênica. Um único mRNA que codifica mais de uma proteína traduzida separadamente é chamado de **mRNA policistrônico**. Por exemplo, o mRNA

policistrônico óperon *lac* é traduzido em três proteínas separadas (ver a seguir). Os mRNAs de óperons e policistrônicos são comuns em bactérias, mas não em eucariotos.

Um **gene induzível** é aquele cuja expressão aumenta em resposta a um **indutor** ou **ativador**, um sinal regulador positivo específico. Em geral, genes induzíveis possuem taxas relativamente baixas de transcrição basal. Por outro lado, os genes com taxas basais de transcrição elevadas estão frequentemente sujeitos à regulação para baixo (*down regulation*) pelos repressores.

A expressão de alguns genes é **constitutiva**, isto é, eles são expressos a uma taxa razoavelmente constante e parecem não estar sujeitos à regulação. Eles são, em geral, chamados de **genes constitutivos** (*housekeeping*). Como resultado de mutação, alguns produtos gênicos induzíveis se tornam constitutivamente expressos. Uma mutação que resulta em expressão constitutiva do que era anteriormente um gene regulado é chamada de **mutação constitutiva**.

A análise do metabolismo da lactose em *E. coli* levou à descoberta dos princípios básicos da ativação e da repressão da transcrição gênica

Jacob e Monod, em 1961, descreveram o seu **modelo de óperon** em um artigo clássico. Sua hipótese era, em grande parte, baseada em observações da regulação do metabolismo da lactose da bactéria intestinal *E. coli*. Os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação dos genes envolvidos no metabolismo da lactose estão, atualmente, entre os mais bem compreendidos em qualquer organismo. A β -galactosidase hidrolisa a lactose β -galactosídeo em galactose e glicose. O gene estrutural da β -galactosidase (*lacZ*) é agrupado com os genes responsáveis pela permeação da lactose para o interior da célula (*lacY*) e pela tiogalactosídeo-transacetilase (*lacA*). Os genes estruturais para essas três enzimas, junto com o promotor *lac* e o operador *lac* (uma região reguladora), estão fisicamente associados para constituir o **óperon *lac***, como mostrado na **Figura 38-2**. Esse arranjo genético dos genes estruturais e de seus genes reguladores permite a **expressão coordenada** das três enzimas envolvidas no metabolismo da lactose. Cada um desses genes ligados é transcrito em uma grande molécula policistrônica de mRNA que contém múltiplos códons de início (AUG) e de

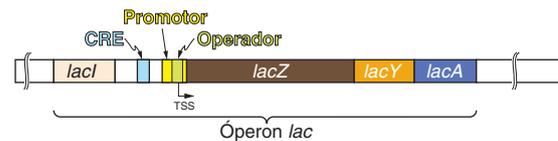


FIGURA 38-2 As relações posicionais de codificação de proteínas e os elementos reguladores do óperon *lac*. O *lacZ* codifica a β -galactosidase, o *lacY* codifica uma permease e o *lacA* codifica uma tiogalactosídeo-transacetilase. O *lacI* codifica a proteína repressora do óperon *lac*. É mostrado também o local de início da transcrição (TSS) para a transcrição do óperon *lac*. O sítio de ligação para a proteína *lacI* (i.e., repressor *lac*) – o operador *lac* (operador) – sobrepõe-se ao promotor *lac*. Imediatamente a montante do promotor do óperon *lac* se situa o sítio de ligação (CRE) para a proteína de ligação de cAMP, CAP, o regulador positivo da transcrição do óperon *lac*. Ver Figura 38-3 para mais detalhes.

término (UAA) independentes de tradução para cada um dos três cístrons. Assim, cada proteína é traduzida separadamente e não são processadas a partir de uma única grande proteína precursora.

Atualmente, é convencional considerar que um gene inclui sequências regulatórias, bem como a região que codifica o transcrito primário. Embora existam muitas exceções históricas, um gene é geralmente escrito em letras minúsculas e em itálico, e a proteína codificada, quando abreviada, é expressa em algarismo romano com a primeira letra maiúscula. Por exemplo, o gene *lacI* codifica a proteína repressora LacI. Quando *E. coli* é colocada em presença da lactose ou de alguns análogos de lactose específicos, em condições apropriadas de não repressão (p. ex., altas concentrações de lactose, nenhuma ou pouca glicose no meio; ver a seguir), a expressão das atividades de β -galactosidase, galactosídeo-permease e tiogalactosídeo-transacetilase é aumentada em cem a mil vezes. Essa é uma resposta do tipo A, como mostrado na Figura 38-1. A cinética de indução pode ser muito rápida; os mRNAs *lac*-específicos são completamente induzidos em 5 a 6 minutos após a adição de lactose à cultura; a proteína β -galactosidase é máxima em 10 minutos. Em condições de indução completa, podem haver até 5 mil moléculas de β -galactosidase por célula, uma quantidade aproximadamente mil vezes maior do que a basal, não induzido. Após a remoção do sinal, isto é, do indutor, a síntese dessas três enzimas diminui.

Quando *E. coli* é exposta tanto à lactose quanto à glicose como fontes de carbono, os organismos metabolizam primeiro a glicose e, então, temporariamente param de crescer, até que os genes do óperon *lac* sejam induzidos a fornecer a habilidade para metabolizar a lactose como fonte de energia utilizável. Embora a lactose esteja presente desde a fase inicial de crescimento da bactéria, a célula não induz as enzimas necessárias para o catabolismo da lactose até que a glicose se tenha esgotado. Esse fenômeno foi inicialmente atribuído à repressão do óperon *lac* por alguns catabólitos de glicose; por isso, foi denominado repressão por catabólitos. Atualmente, sabe-se que a repressão catabólica é, na verdade, mediada por uma **proteína ativadora do catabolismo (CAP) gênico** em conjunto com o cAMP (ver Figura 17-5). Essa proteína também é chamada de proteína reguladora de cAMP (CRP). A expressão de muitos sistemas enzimáticos induzíveis ou óperons em *E. coli* e em outros procarionotes é sensível à repressão catabólica, como discutido adiante.

A fisiologia da indução do óperon *lac* é bem compreendida no nível molecular (Figura 38-3). A expressão do gene *lacI* normal do óperon *lac* é constitutiva; ele é expresso a uma taxa constante, resultando na formação de subunidades do **repressor lac**. Quatro subunidades idênticas com pesos moleculares de 38 mil formam uma molécula tetramérica repressora Lac. A molécula de proteína repressora LacI, produto do *lacI*, possui alta afinidade (constante de dissociação, K_d de cerca de 10^{-13} mol/L) para o *locus* operador. O **locus operador** é uma região de dupla-fita de DNA que exhibe simetria rotacional dupla e um palíndromo invertido (indicado por setas próximas ao eixo pontilhado) em uma região de 21 pb de comprimento, como mostrado a seguir:



A qualquer momento, apenas duas das quatro subunidades do repressor parecem ligar-se ao operador e, no interior da região dos 21 pares de bases, quase todas as bases de cada par estão envolvidas no reconhecimento e na ligação da LacI. A ligação ocorre principalmente na **cavidade maior**, sem interromper a natureza de bases pareadas e dupla-hélice do DNA operador. O **locus operador** está entre o **sítio promotor** – ao qual a RNA-polimerase dependente de DNA se liga para iniciar a transcrição – e o local de início da transcrição do **gene lacZ**, o gene estrutural para a β -galactosidase (Figura 38-2). Quando ligada ao *locus* operador, a molécula repressora LacI impede a transcrição dos genes estruturais distais, *lacZ*, *lacY* e *lacA*, interferindo na ligação da RNA-polimerase ao promotor; a RNA-polimerase e o repressor LacI não podem se ligar efetivamente ao óperon *lac* ao mesmo tempo. Assim, a molécula repressora LacI é um **regulador negativo**; em sua presença (e na ausência de indutor; ver a seguir), a expressão dos genes *lacZ*, *lacY* e *lacA* é muito, muito baixa. Existem normalmente 20 a 40 moléculas tetraméricas do repressor na célula, uma concentração ($20\text{-}40 \times 10^{-9}$ mol/L) de tetrâmeros suficientes para efetuar, em um determinado momento, > 95% de ocupação de um elemento do operador *lac* em uma bactéria, garantindo, assim, uma baixa transcrição basal (mas não zero) do gene óperon *lac* na ausência de sinais de indução.

Um análogo da lactose que é capaz de induzir o óperon *lac*, embora, ele mesmo, não sirva como substrato para a β -galactosidase, é um exemplo de **indutor gratuito**. Um exemplo é o isopropiltiogalactosídeo (IPTG). A adição de lactose ou de um indutor gratuito como o IPTG a bactérias crescendo em uma fonte de carbono pobremente utilizada (como o succinato) resulta na indução imediata de enzimas do óperon *lac*. Pequenas quantidades do indutor gratuito ou de lactose são capazes de entrar na célula, mesmo na ausência de permease. As moléculas repressoras da LacI – tanto as ligadas aos *loci* dos operadores quanto as livres no citosol – possuem alta afinidade pelo indutor. A ligação do indutor à molécula repressora induz uma mudança conformacional na estrutura do repressor e leva a uma diminuição na ocupação do DNA operador, pois sua afinidade ao operador é agora 10^4 vezes menor (K_d cerca de 10^{-9} mol/L) do que a da LacI na ausência de IPTG. A RNA-polimerase dependente de DNA pode, agora, ligar-se ao promotor (i.e., Figuras 36-3 e 36-8), e a transcrição começará, embora esse processo seja relativamente ineficaz (ver a seguir). Desse modo, **um indutor desreprime um óperon lac** e permite a transcrição de genes estruturais de β -galactosidase, galactosídeo-permease e tiogalactosídeo-transacetilase. A tradução do mRNA policistrônico pode ocorrer, mesmo antes de a transcrição ser completada. A desrepressão do óperon *lac* permite que a célula sintetize as enzimas necessárias para catabolizar a lactose como fonte de energia. Com base na fisiologia recém-descrita, a expressão induzida por IPTG de plasmídeos transfectados portando o promotor-operador *lac* ligados às construções adequadas feitas por bioengenharia é comumente utilizada para expressar proteínas recombinantes de mamíferos em *E. coli*.

Para que a RNA-polimerase forme um complexo de pré-iniciação (PIC) no sítio promotor de modo mais eficiente, o complexo cAMP-CAP também deve estar presente na célula.

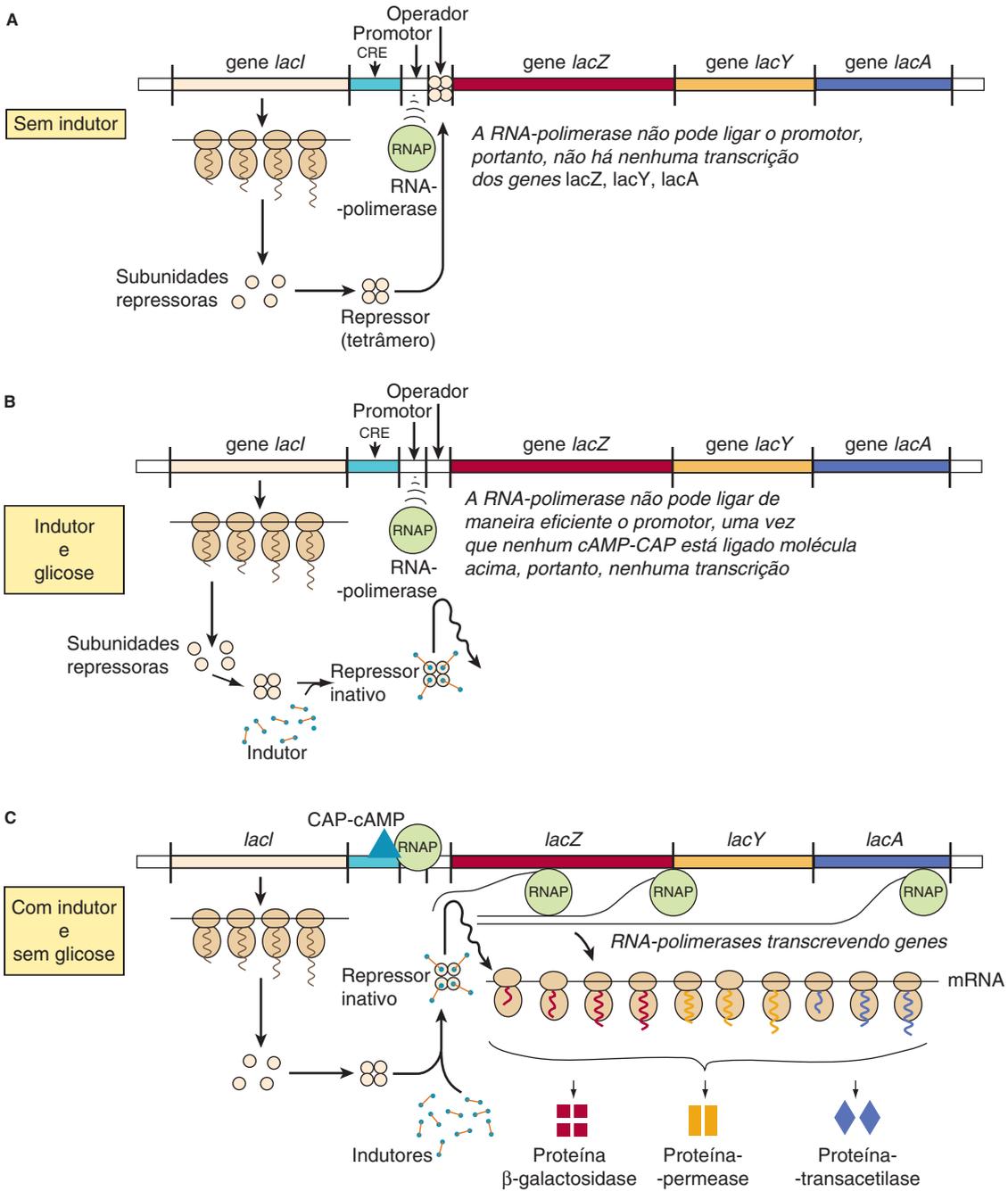


FIGURA 38-3 O mecanismo de repressão e desrepressão do operon *lac*. Quando não há um indutor presente (A), os produtos do gene *lacI* constitutivamente sintetizado forma um tetrâmero repressor que se liga ao operador. A ligação repressor-operador impede a ligação da RNA-polimerase e, conseqüentemente, impede a transcrição dos genes estruturais *lacZ*, *lacY* e *lacA* em um mRNA policistrônico. Quando o indutor está presente, mas também há a presença de glicose no meio de cultura (B), as moléculas repressoras tetraméricas são alteradas de modo conformacional pelo indutor e não conseguem se ligar de maneira eficiente ao locus operador (afinidade da ligação reduzida em mais de mil vezes). Entretanto, a RNA-polimerase não se ligará de modo eficiente ao promotor e iniciará a transcrição, pois as interações positivas proteína-proteína entre a proteína CAP ligada ao CRE não ocorrem; assim, o operon *lac* não é transcrito de maneira eficiente. Entretanto, quando o indutor está presente e o meio está desprovido de glicose (C), a adenilato-ciclase é ativada e o cAMP é produzido. O cAMP liga-se com grande afinidade à sua proteína de ligação, a proteína ativadora de AMP cíclico, ou CAP. O complexo CAP-cAMP liga-se à sua seqüência de reconhecimento (CRE, o elemento de resposta de cAMP) localizado cerca de 15 pb a montante do promotor. Os contatos diretos proteína-proteína entre a CAP ligada ao CRE e a RNA-polimerase aumentam a ligação ao promotor em mais de 20 vezes; portanto, RNAP irá transcrever, de maneira eficiente, o operon *lac*, e a molécula de mRNA policistrônica *lacZ-lacY-lacA* formada poderá ser traduzida nas moléculas das proteínas correspondentes β-galactosidase, permease e transacetilase, como mostrado. Essa produção de proteínas permite o catabolismo celular da lactose como única fonte de carbono para o crescimento.

Por um mecanismo independente, a bactéria acumula cAMP apenas quando é privada de uma fonte de carbono. Na presença de glicose – ou de glicerol em concentrações suficientes para o crescimento –, a bactéria não possuirá cAMP suficiente para se ligar à CAP, porque a glicose inibe a adenilato-ciclase, a enzima que converte ATP em cAMP (ver Capítulo 41). Assim, em presença de glicose ou glicerol, a CAP saturada de cAMP está ausente, de modo que a RNA-polimerase dependente de DNA não pode iniciar a transcrição do óperon *lac* na sua taxa máxima. Entretanto, em presença do complexo CAP-cAMP, que se liga ao DNA logo a montante do sítio promotor, a transcrição ocorre nos níveis máximos (Figura 38-3). Estudos indicam que uma região da CAP se contata diretamente à subunidade α da RNA-polimerase, e essas interações proteína-proteína facilitam a ligação da RNAP ao promotor. Portanto, o regulador CAP-cAMP atua como um **regulador positivo**, uma vez que sua presença é necessária para a expressão gênica ótima. O óperon *lac* é, portanto, controlado por dois diferentes fatores *trans* de ligação ao DNA modulados por ligantes: um que atua positivamente (complexo cAMP-CRP) para facilitar a ligação produtiva da RNA-polimerase ao promotor, e outro que atua negativamente (repressor LacI) para antagonizar a ligação da RNA-polimerase ao promotor. A atividade máxima do óperon *lac* ocorre quando os níveis de glicose estão baixos (alto cAMP com ativação da CAP) e a lactose está presente (a LacI é impedida de ligar-se ao operador).

Quando o gene *lacI* sofre mutações, de modo que o seu produto, LacI, não é capaz de se ligar ao DNA operador, o organismo exibirá **expressão constitutiva** do óperon *lac*. De modo inverso, um organismo com uma mutação do gene *lacI*, que produz uma proteína LacI que impede a ligação de um indutor ao repressor, permanecerá reprimido mesmo na presença da molécula indutora, visto que o indutor não pode se ligar ao repressor no *locus* operador para desreprimir o óperon. Do mesmo modo, bactérias que abrigam mutações em seu *locus* operador *lac*, de modo que a sequência do operador não se ligará a uma molécula repressora normal, expressam constitutivamente os genes do óperon *lac*. Os mecanismos de regulação positiva e negativa, comparáveis aos descritos aqui para o sistema *lac*, foram observados em células de eucariotos (ver a seguir).

O interruptor genético do bacteriófago lambda (λ) fornece outro paradigma para a compreensão do papel das interações proteína-DNA e da regulação transcricional em células eucarióticas

Como alguns vírus de eucariotos (p. ex., herpes-vírus simples e HIV), alguns vírus de bactérias também podem residir em estado inativo no interior dos cromossomos do hospedeiro ou podem se replicar no interior de uma bactéria e, por fim, levar à lise e à morte do hospedeiro bacteriano. Algumas *E. coli* abrigam um desses vírus “temperados”, o bacteriófago lambda (λ). Quando lambda infecta um organismo dessa espécie, ele injeta seu genoma de DNA linear de dupla-fita de 45 mil pb na célula (Figura 38-4). Dependendo do estado nutricional da célula, o DNA lambda **integra-se** ao genoma do hospedeiro

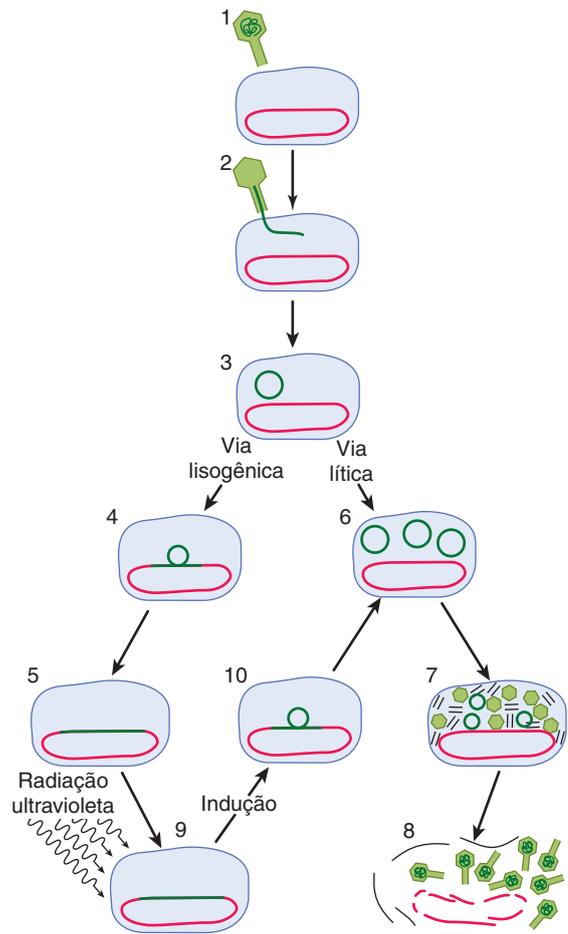


FIGURA 38-4 Modos de vida alternativos do bacteriófago lambda. A infecção da bactéria *E. coli* pelo fago lambda começa quando uma partícula viral se prende a receptores específicos na célula bacteriana (1) e injeta seu DNA (linha verde-escura) na célula (2, 3). A infecção pode tomar um de dois caminhos, dependendo de qual dos dois conjuntos de genes virais é ativado. Na via lisogênica, o DNA viral integra-se ao cromossomo bacteriano (em vermelho) (4, 5), onde se replica passivamente, como parte do DNA bacteriano, durante a divisão celular de *E. coli*. Esse vírus inativo genomicamente integrado é chamado de prófago, e a célula que o abriga é chamada de lisogênica. No modo lítico alternativo de infecção, o DNA viral sai do cromossomo de *E. coli* e autorreplica (6) para direcionar a síntese de proteínas virais (7). Cerca de 100 novas partículas virais são formadas. Os vírus em proliferação induzem a lise da célula (8). Um prófago pode ser “induzido” por um agente danoso ao DNA, como a radiação ultravioleta (9). O agente de indução lança um interruptor (ver texto e Figura 38-5; o “interruptor molecular”), de modo a ligar um conjunto de genes virais diferentes. O DNA viral sai do cromossomo (10) e replica-se; o vírus prossegue ao longo da via lítica. (Reproduzida, com permissão, de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. *Sci Am* [Nov] 1982;247:128.)

(**via lisogênica**) e permanece inativo até ser ativado (ver a seguir), ou começa a **replicar-se** até ter feito cerca de 100 cópias completas de vírus com proteínas virais compactadas, quando, então, provoca a lise do seu hospedeiro (**via lítica**). As partículas virais recém-produzidas podem, então, infectar outros hospedeiros suscetíveis. Condições de crescimento ruins favorecem a lisogenia, ao passo que boas condições de crescimento promovem a via lítica do crescimento lambda.

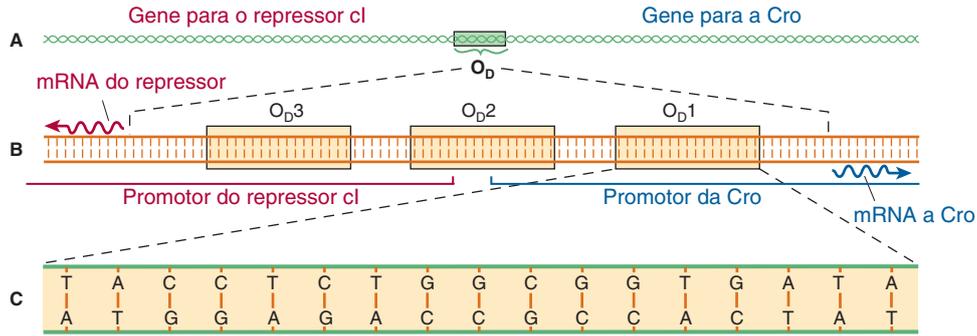


FIGURA 38-5 Organização genética do “interruptor molecular” do modo de vida lambda. O operador direito (O_D) é mostrado em detalhe aumentado nesta série de imagens. O operador está em uma região do SDNA viral com cerca de 70 pb de comprimento (A). À sua esquerda, encontra-se o gene que codifica o repressor lambda (cl); à sua direita, está o gene (cro) que codifica a proteína reguladora Cro. Quando a região do operador aumenta (B), ele inclui três sub-regiões chamadas de operadoras: O_{D1} , O_{D2} e O_{D3} , cada uma com 17 pb de comprimento. Elas são sítios de reconhecimento aos quais o repressor λ e as proteínas Cro podem se ligar. Os sítios de reconhecimento sobrepõem-se a duas sequências de promotores – sequências de bases às quais a RNA-polimerase se liga para transcrever esses genes em mRNA (linhas onduladas), que são traduzidos em proteína. O sítio O_{D1} é aumentado (C) para mostrar sua sequência de bases. (Reproduzida, com permissão, de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. *Sci Am* [Nov] 1982;247:128.)

Quando integrado ao genoma do hospedeiro em seu estado dormente, o lambda permanecerá nesse estado até ser ativado por exposição do seu hospedeiro bacteriano a agentes deletérios ao DNA. Em resposta ao estímulo nocivo, o bacteriófago inativo torna-se “induzido” e começa a transcrever e, subsequentemente, a traduzir os genes do seu próprio genoma que são necessários para a sua excisão do cromossomo do hospedeiro, a replicação do seu DNA e a síntese de sua cobertura proteica e de suas enzimas líticas. Esse evento atua como gatilho ou resposta do tipo C (Figura 38-1); isto é, uma vez que o lambda inativo tenha se comprometido com a indução, não há volta até que a célula seja lisada e o bacteriófago replicado seja liberado. Esse interruptor que passa de um estado inativo ou estado **prófago** para uma **infecção lítica** é bem compreendido nos níveis genético e molecular e será descrito em detalhes neste capítulo; embora menos compreendidos no nível molecular, o HIV e o herpes-vírus podem se comportar de modo semelhante, passando de um estado dormente para um estado de infecção.

O evento de interruptor genético lítico/lisogênico no lambda é centrado em torno de uma região de 80 pb em seu genoma de DNA de dupla-fita, chamado de “operador direito” (O_D) (Figura 38-5A). O **operador direito** situa-se entre o gene para a proteína repressora lambda, cl , e à direita pelo gene que codifica outras proteínas reguladoras, o gene cro . Quando o lambda está em seu estado prófago – isto é, integrado no genoma do hospedeiro –, o gene repressor cl é o *único* gene lambda que é expresso. Quando o bacteriófago está em crescimento lítico, o gene repressor cl não está expresso, mas o gene cro –, bem como muitos outros genes lambda – está expresso. Isto é, quando o **gene repressor cl está ligado, o gene cro está desligado**, e quando o **gene cro está ligado, o gene repressor cl está desligado**. Como será visto, esses dois genes regulam a expressão um do outro e, portanto, em última análise, a decisão entre o crescimento lítico ou lisogênico do lambda. Essa decisão entre a transcrição do gene repressor e a transcrição do gene cro é um exemplo paradigmático de um interruptor transcricional molecular.

O operador direito lambda de 80 pb, O_D , pode ser subdividido em três elementos de DNA *cis*-ativo de 17 pb, discretos e uniformemente espaçados, que representam os sítios de ligação para uma das duas proteínas reguladoras do bacteriófago lambda. De modo importante, as sequências de nucleotídeos desses três sítios arranjados em conjunto são semelhantes, mas não idênticas (Figura 38-5B). Os três elementos *cis* relacionados, denominados operadores O_{D1} , O_{D2} e O_{D3} , podem ser ligados por proteínas cl ou Cro. Entretanto, as afinidades relativas de cl e Cro para cada um dos sítios varia, e essa afinidade de ligação diferenciada é fundamental para o funcionamento adequado do “interruptor molecular” do fago lambda lítico ou lisogênico. A região do DNA entre os genes cro e repressor também contém duas sequências promotoras que direcionam a ligação da RNA-polimerase em uma orientação específica, em que ela começa a transcrever genes adjacentes. Um promotor direciona a RNA-polimerase para transcrever para a direita e, portanto, transcrever o cro e outros genes distais, e o outro promotor direciona a transcrição do gene repressor cl para a esquerda (Figura 38-5B).

O produto do gene repressor cl , a **proteína repressora** de 236 aminoácidos, λ cl , é uma molécula de **dois domínios** com um **domínio de ligação ao DNA aminoterminal** e um **domínio de dimerização carboxiterminal**. A associação entre duas proteínas repressoras forma um dímero. Os **dímeros** repressores cl ligam-se ao DNA operador com muito mais força do que os monômeros (Figuras 38-6A a 38-6C).

O produto do gene cro , a **proteína Cro** de 66 aminoácidos e 9 kDa, possui um único domínio, mas também se liga ao DNA operador mais fortemente como um dímero (Figura 38-6D). O domínio único da proteína Cro faz a mediação tanto da ligação com o operador quanto da dimerização.

Em uma bactéria lisogênica – isto é, uma bactéria que contém um prófago lambda dormente integrado –, o dímero repressor lambda liga-se preferencialmente ao O_{D1} , mas ao fazer isso, por meio de uma interação cooperativa, estimula a ligação (em cerca de 10 vezes) de outro dímero repressor ao O_{D2} (Figura 38-7). A afinidade do repressor por O_{D3} é a menor

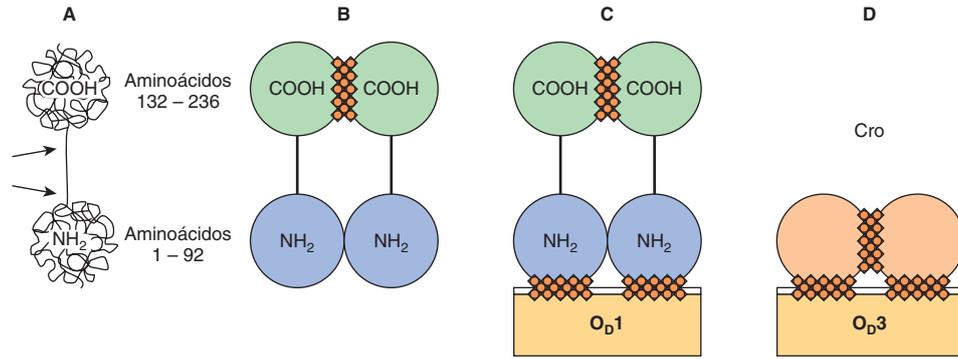


FIGURA 38-6 Estruturas moleculares esquemáticas das proteínas reguladoras lambda *cI* e *cro*. A proteína repressora lambda é uma cadeia polipeptídica de 236 aminoácidos de comprimento. A cadeia dobra-se em formato de halteres com duas subestruturas: um domínio aminoterminal (NH_2) e um domínio carboxiterminal (COOH). Os dois domínios são ligados por uma região da cadeia que é menos estruturada e suscetível à clivagem por proteases (indicada pelas duas setas em **A**). Moléculas repressoras únicas (monômeros) tendem a se associar reversivelmente para formar dímeros. **(B)** Um dímero mantém-se unido principalmente pelo contato entre os domínios carboxiterminais (eclosão). Os dímeros repressores *cI* ligam-se aos (e podem dissociar-se de) sítios de reconhecimento na região do operador; eles apresentam afinidades diferentes para os três sítios do operador, $O_D1 > O_D2 > O_D3$ **(C)**. É o DBD da molécula repressora que entra em contato com o DNA (eclosão). A *Cro* **(D)** apresenta um único domínio que promove a dimerização *cro-cro* e um domínio de ligação ao DNA que promove a ligação dos dímeros ao operador. É importante que *cro* apresente afinidade mais elevada para O_D3 , ao contrário da preferência de ligação da sequência da proteína *cI*. (Reproduzida, com permissão, de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. *Sci Am* [Nov] 1982;247:128.)

das três sub-regiões do operador. A ligação do repressor a O_D1 tem dois efeitos principais. Primeiro, a ocupação do O_D1 pelo repressor bloqueia a ligação da RNA-polimerase ao promotor direcionado para a direita e, desse modo, previne a expressão do *cro*. Segundo, como mencionado, o dímero repressor ligado ao O_D1 estimula a ligação do dímero repressor ao O_D2 . A ligação do repressor ao O_D2 tem um efeito adicional importante de estimular a ligação da RNA-polimerase ao promotor direcionado para a esquerda, que se sobrepõe ao O_D3 e, portanto, estimula a transcrição e subsequente expressão do gene repressor. Esse estímulo à transcrição é mediado por interações diretas proteína-proteína entre a RNA-polimerase ligada ao promotor e o O_D2 ligado ao repressor, sobretudo como descrito para a proteína CAP e a RNA-polimerase no operon *lac*. Portanto, o **repressor *cI*** é tanto um **regulador negativo**, ao impedir a transcrição do *cro*, quanto um **regulador positivo**, estimulando a transcrição do seu próprio gene, *cI*. Esse efeito duplo do repressor é responsável pelo estado estável do bacteriófago lambda dormente; o repressor não apenas evita a expressão dos genes necessários para a lise, mas também promove a sua própria expressão para estabilizar esse estado de diferenciação. Em um evento em que a concentração da proteína repressora intracelular se torna muito alta, esse excesso de repressor se ligará ao O_D3 , e, agindo desse modo, diminuirá a transcrição do gene repressor pelo promotor direcionado para a esquerda, pelo bloqueio da ligação da RNAP ao promotor *cI*, até que a concentração do repressor caia e ele se dissocie do O_D3 . Curiosamente, exemplos semelhantes de proteínas repressoras que também possuem a capacidade de ativar a transcrição foram observados em eucariotos.

Com esse estado lisogênico, estável, reprimido e mediado por *cI*, pode-se perguntar como o ciclo lítico poderia alguma vez ser introduzido. Entretanto, esse processo ocorre de maneira muito eficiente. Quando um sinal danificador do DNA, como a luz ultravioleta, atinge a bactéria lisogênica hospedeira,

fragmentos do DNA de fita simples são produzidos, a fim de ativar uma coprotease específica codificada por um gene-bacteriano, chamado de *recA* (Figura 38-7). A protease *recA* ativada hidrolisa a porção da proteína repressora que conecta os domínios aminoterminal e carboxiterminal dessa molécula (ver Figura 38-6A). A clivagem dos domínios repressores faz os dímeros repressores se dissociarem, o que, por sua vez, leva à dissociação das moléculas repressoras de O_D2 e, por fim, de O_D1 . Os efeitos de remoção de repressor de O_D1 e O_D2 são previsíveis. A RNA-polimerase tem acesso imediato ao promotor direcionado para a direita e inicia a transcrição do **gene *cro***, e o efeito estimulante do repressor no O_D2 , na transcrição direcionada para a esquerda, é perdido (Figura 38-7).

A proteína *Cro* resultante, recém-sintetizada, também se liga à região do operador como um dímero, mas a sua ordem de preferência é oposta à do repressor (Figura 38-7). Isto é, *Cro* liga-se mais fortemente a O_D3 , mas não há efeito cooperativo de *Cro* em O_D3 na ligação de *Cro* a O_D2 . Em concentrações cada vez mais elevadas de *Cro*, a proteína se ligará a O_D2 e, por fim, a O_D1 .

A ocupação de O_D3 por *Cro* desliga imediatamente a transcrição do promotor *cI* direcionado para a esquerda e, desse modo, evita qualquer expressão adicional do gene repressor. O interruptor molecular é, assim, completamente “lançado” na direção lítica. O gene *cro* é agora expresso, e o gene repressor é completamente desligado. Esse evento é irreversível, e a expressão de outros genes lambda inicia como parte do ciclo lítico. Quando a concentração do repressor *Cro* se torna muito alta, ele eventualmente ocupará O_D1 e, agindo dessa forma, reduzirá a expressão de seu próprio gene, processo necessário para efetuar as etapas finais do ciclo lítico.

As estruturas tridimensionais de *Cro* e da proteína repressora lambda foram determinadas por cristalografia de raios X, e modelos para a sua ligação e efeitos nos eventos genéticos e moleculares, anteriormente descritos, foram propostos e

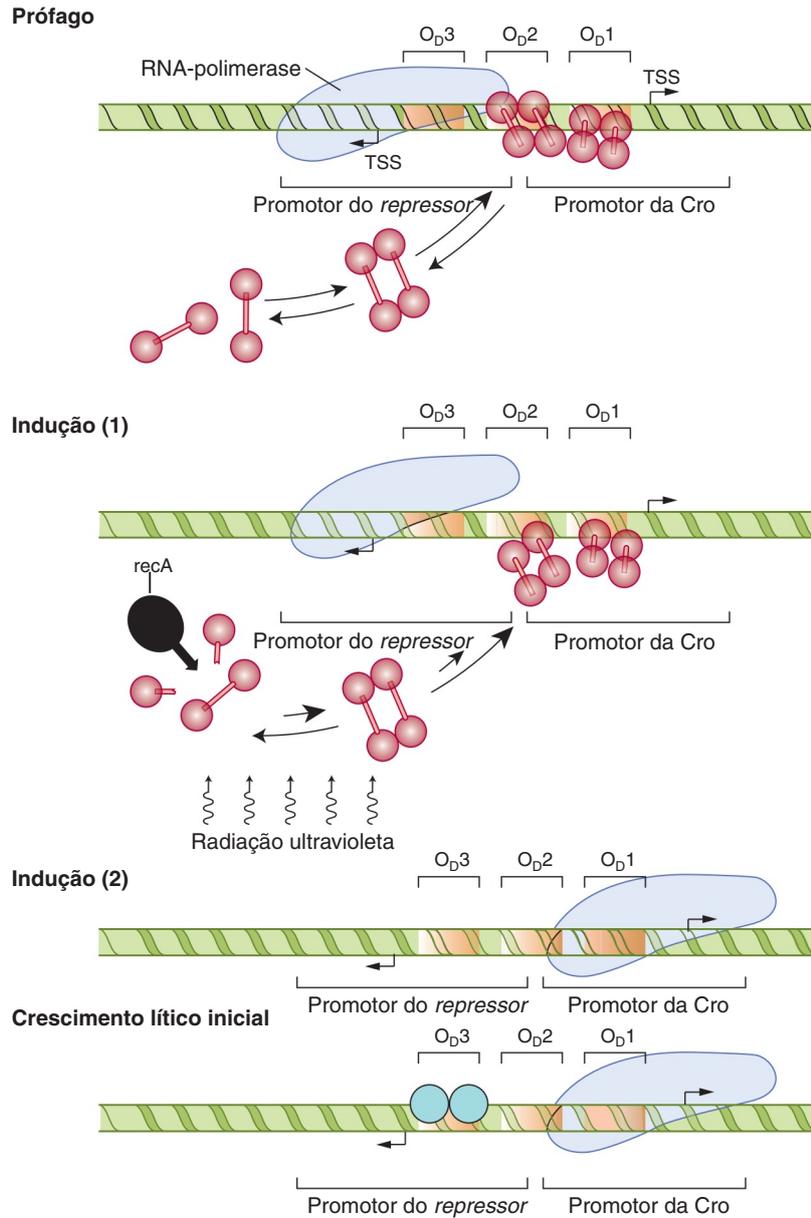


FIGURA 38-7 A configuração do interruptor lítico/lisogênico é mostrada em quatro estágios do ciclo de vida de lambda. A via lisogênica (na qual o vírus permanece dormente como prófago) é selecionada quando um dímero repressor se liga a O_D1 , tornando, assim, mais provável que O_D2 seja imediatamente preenchido por outro dímero, devido à natureza cooperativa da ligação do DNA a $cl-O_D$. No prófago (**parte superior**), os dímeros repressores ligados a O_D1 e O_D2 impedem que a RNA-polimerase se ligue ao promotor direcionado para a direita e bloqueiam a síntese de Cro (controle negativo). Simultaneamente, essas proteínas *cl* de ligação ao DNA aumentam a ligação da polimerase ao promotor à esquerda (controle positivo), o que resulta na transcrição do gene repressor em RNA (linha ondulada; iniciação no local de início da transcrição [TSS] do gene *cl*) e, assim, mais repressores são sintetizados, mantendo o estado lisogênico. O prófago é induzido (**centro**) quando a radiação ultravioleta ativa a protease *recA*, que cliva os monômeros repressores. O equilíbrio entre os monômeros livres, dímeros livres e dímeros ligados é, portanto, deslocado pela ação da massa, e os dímeros dissociam-se dos sítios do operador. A RNA-polimerase não é mais estimulada a se ligar ao promotor direcionado para a esquerda, de modo que o repressor não é mais sintetizado. À medida que a indução continua, todos os sítios do operador tornam-se livres, de modo que a polimerase possa se ligar ao promotor do lado direito e sintetizar Cro (*cro* TSS mostrada). Durante o crescimento lítico inicial, um único dímero Cro liga-se a O_D3 (círculos sombreados de azul-claro), o sítio para o qual ele possui maior afinidade, ocluindo, portanto, o promotor *cl*. Consequentemente, a RNA-polimerase não pode se ligar ao promotor direcionado para a esquerda, mas o promotor direcionado para a direita permanece acessível. A polimerase continua a ligar-se ali, transcrevendo *cro* e outros genes líticos iniciais. Segue-se o crescimento lítico (**parte inferior**). (Reproduzida, com permissão, de Ptashne M, Johnson AD, Pabo CO: A genetic switch in a bacterial virus. *Sci Am* [Nov] 1982;247:128.)

testados. Ambos ligam-se ao DNA utilizando os motivos de domínio de ligação ao DNA (DBD) hélice-volta-hélice (ver a seguir). Até agora, esse sistema fornece, sem dúvida, a melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na ativação e na repressão gênica.

A análise detalhada do repressor lambda levou ao importante conceito de que as proteínas reguladoras de transcrição possuem vários domínios funcionais. Por exemplo, o repressor lambda liga-se ao DNA com grande afinidade. Monômeros repressores formam dímeros, interagem cooperativamente entre si, e o repressor interage com a RNA-polimerase para estimular ou bloquear a ligação do promotor ou a formação do complexo aberto de RNAP (ver Figura 36-3). A interface proteína-DNA e as três interfaces proteína-proteína envolvem domínios da molécula do repressor separados e distintos. Como será descrito adiante (ver Figura 38-19), essa é uma característica compartilhada pela maioria (talvez todas) das moléculas que regulam a transcrição.

CARACTERÍSTICAS ESPECIAIS ESTÃO ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM EUCARIOTOS

A maior parte do DNA nas células procarióticas está organizada nos genes, e como o DNA não é compactado com as histonas do nucleossomo, ele sempre possui o potencial para ser transcrito se fatores *trans* positivos e negativos forem ativados. Uma situação muito diferente ocorre nas células eucarióticas, em que muito pouco do total do DNA está organizado nos genes que codificam o mRNA e suas regiões reguladoras associadas. A função do DNA extra tem sido ativamente investigada (i.e., Capítulo 39; Projetos ENCODE). Como descrito no Capítulo 35, o DNA em células eucarióticas é extensamente dobrado e compactado no complexo proteína-DNA, chamado de cromatina. As histonas são uma parte importante desse complexo, uma vez que formam as estruturas conhecidas como nucleossomos (ver Capítulo 35) e também afetam significativamente os mecanismos reguladores de genes, como destacado adiante.

O molde de cromatina contribui, de modo importante, para o controle da transcrição gênica de eucariotos

A **estrutura da cromatina** fornece um nível adicional de controle da transcrição gênica. Como discutido no Capítulo 35, grandes regiões de cromatina são inativas transcricionalmente, ao passo que outras podem ser ativas ou potencialmente ativas. Com poucas exceções, cada célula contém o mesmo complemento de genes e, portanto, o desenvolvimento de órgãos especializados, tecidos e células e suas funções em todo o organismo dependem da expressão diferencial dos genes.

Algumas dessas expressões diferenciais se devem à presença de diferentes regiões de cromatina disponíveis para a transcrição em células de vários tecidos. Por exemplo, o DNA que

contém o agrupamento de genes da β -globina está em uma **cromatina “ativa”** no reticulócito, mas em uma **cromatina “inativa”** nas células musculares. Ainda não foram elucidados todos os fatores envolvidos na determinação da cromatina ativa. A presença de nucleossomos e de complexos de histonas e DNA (ver Capítulo 35) certamente fornece uma barreira contra a associação imediata entre fatores de transcrição e regiões específicas do DNA. A dinâmica da formação e a interrupção da estrutura do nucleossomo constituem, portanto, uma parte importante da regulação gênica de eucariotos.

A **modificação covalente da histona**, também chamada de **código da histona**, é um determinante importante da atividade gênica. As histonas são submetidas a uma grande variedade de modificações pós-tradução específicas (ver Tabela 35-1). Essas modificações são dinâmicas e reversíveis. A acetilação e a desacetilação de histonas são mais bem compreendidas. A descoberta surpreendente de que a histona acetilase e outras atividades enzimáticas estão associadas a corretores envolvidos na regulação da transcrição gênica (ver Capítulo 42) forneceu um novo conceito de regulação gênica. Sabe-se que a acetilação ocorre nos resíduos de lisina nas caudas aminoterminais das moléculas de histona, e ela tem sido consistentemente correlacionada à transcrição ou, alternativamente, ao potencial transcricional. A acetilação da histona reduz a carga positiva dessas caudas e provavelmente contribui para uma diminuição na afinidade de ligação da histona pelo DNA negativamente carregado. Além disso, a modificação covalente das histonas cria novos sítios de ligação para proteínas adicionais, como os complexos de remodelação da cromatina dependentes de ATP, que contêm subunidades que transportam domínios estruturais que se ligam especificamente às histonas que estavam submetidas às modificações pós-tradução (PTMs) de corretores. Esses complexos podem aumentar a acessibilidade das sequências de DNA adjacentes por meio da remoção das histonas nucleossomais. Então, os corretores (modificadores e remodeladores de cromatina), trabalhando em conjunto, podem abrir os promotores gênicos e as regiões reguladoras, facilitando a ligação de outros fatores *trans* e da RNA-polimerase II e GTFs (ver Figuras 36-10 e 36-11). A desacetilação de histonas, catalisada pelos corretores transcricionais, teria o efeito oposto. Proteínas diferentes com atividades acetilase e desacetilase específicas estão associadas a vários componentes do aparato transcricional. As proteínas que catalisam as PTMs de histonas são, algumas vezes, chamadas de **“escritoras do código”**, e as proteínas que reconhecem, ligam-se e, portanto, interpretam as PTMs de histonas são chamadas de **“leitoras do código”**, e as enzimas que removem as PTMs de histonas são chamadas de **“apagadores do código”**. Coletivamente, as PTMs de histonas representam uma fonte de informação reguladora muito dinâmica e rica. As regras exatas e os mecanismos que definem a especificidade desses vários processos estão em investigação. Alguns exemplos específicos são ilustrados no Capítulo 42. Várias empresas comerciais estão trabalhando no desenvolvimento de medicamentos que alterem especificamente a atividade de proteínas que orquestram o código das histonas.

Como descrito no Capítulo 35, há evidências de que a **metilação dos resíduos de desoxicitidina, 5MeC**, (na sequência

5'-^mCpG-3') no DNA pode efetuar mudanças na cromatina, de modo a impedir a transcrição ativa. Por exemplo, em fígado de camundongo, apenas os genes ribossomais não metilados podem ser expressos, e há evidências de que muitos vírus de animais não são transcritos quando seus DNAs são metilados. A desmetilação intensa dos resíduos de 5MeC em regiões específicas de genes induzíveis por hormônio esteroide tem sido associada a um aumento da taxa de transcrição gênica. Entretanto, ainda não é possível generalizar que o DNA metilado é transcricionalmente inativo, que toda cromatina inativa é metilada ou que o DNA ativo não é metilado.

Por fim, a ligação de fatores de transcrição específicos aos elementos do DNA cognato pode resultar na ruptura da estrutura do nucleossomo. Muitos genes eucarióticos apresentam múltiplas proteínas de ligação a elementos do DNA. A ligação seriada de fatores de transcrição a esses elementos – de modo combinatório – pode romper diretamente a estrutura do nucleossomo, evitando a sua reformação, ou recrutar, por interações proteína-proteína, complexos correguladores multiproteicos que têm a capacidade de modificar e/ou remodelar os nucleossomos de modo covalente. Essas alterações resultam em mudanças estruturais na cromatina que, no fim, aumentam ou diminuem a acessibilidade do DNA a outros fatores e a maquinaria de transcrição.

O DNA eucariótico que está em uma região “ativa” de cromatina pode ser transcrito. Como em células procarióticas, um **promotor** determina onde a RNA-polimerase iniciará a transcrição, mas o promotor em células de mamíferos (ver Capítulo 36) é mais complexo. Uma complexidade adicional é acrescentada por elementos ou fatores que estimulam ou reprimem a transcrição, definem a expressão tecido-específica e modulam as ações de muitas moléculas efetoras. Finalmente, resultados recentes sugerem que a ativação e a repressão gênica devem ocorrer quando genes particulares se movem para dentro ou para fora de diferentes compartimentos ou locais subnucleares.

Mecanismos epigenéticos contribuem, de modo importante, para o controle da transcrição gênica

As moléculas e a biologia regulatória descritas são importantes para a regulação transcricional. De fato, recentemente, o papel da modificação covalente do DNA e das proteínas histonas (e não histonas) e dos recém-descobertos ncRNAs tem recebido enorme atenção no campo da pesquisa da regulação gênica, sobretudo por meio da investigação sobre como tais modificações químicas e/ou moléculas estáveis alteram os padrões de expressão gênica sem alterar a sequência de genes do DNA subjacente. Esse campo de estudo foi chamado de **epigenética**. Como mencionado no Capítulo 35, um aspecto desses mecanismos, as PTMs de histonas, foi chamado de **código de histona** ou código epigenético de histona. O termo “epigenética” significa “acima da genética” e refere-se ao fato desses mecanismos reguladores não alterarem a sequência de DNA regulada subjacente, mas simplesmente alterarem os padrões de expressão desse DNA. Os mecanismos epigenéticos desempenham papéis fundamentais no estabelecimento, na

manutenção e na reversibilidade dos estados transcricionais. Uma característica importante dos mecanismos epigenéticos é a de que os estados transcricionais controlados ligados/desligados podem ser mantidos por muitos ciclos de divisão celular. Essa observação indica que devem existir mecanismos potentes para manter e propagar esses estados epigenéticos de modo estável.

Podem ser descritas **duas formas de sinais epigenéticos: sinais epigenéticos *cis* e *trans***; elas estão ilustradas esquematicamente na **Figura 38-8**. Um evento de sinalização *trans* simples, composto por retroalimentação transcricional positiva, mediado por um abundante transativador difusível que se divide entre a célula-mãe e a célula-filha a cada divisão, mostrado na Figura 38-8A. Desde que o fator de transcrição seja expresso em nível suficiente para permitir que todas as células-filhas subsequentes herdem o sinal epigenético *trans* (fator de transcrição), as células terão o fenótipo molecular ou celular determinado pelos outros genes-alvo desse ativador transcricional. Na Figura 38-8, painel B, está um exemplo de como um sinal epigenético *cis* (aqui como uma marcação específica de metilação 5MeCpG) pode ser propagado de forma estável para as duas células-filhas após a divisão celular. A marcação do DNA hemimetilado (i.e., apenas uma das duas fitas de DNA sofre modificação 5MeC) gerada durante a replicação do DNA direciona a metilação da fita recém-replicada por meio da ação de metilases de DNA de manutenção ubíqua. Essa metilação 5MeC resulta na marcação epigenética *cis* completa em ambas as fitas-filhas de DNA.

Ossinais epigenéticos *cis* e *trans* podem resultar em estados de expressão estáveis e hereditários e, portanto, geralmente representam respostas de expressão gênica tipo C (i.e., Figura 38-1). Entretanto, é importante notar que ambos os estados podem ser reversíveis se os sinais epigenéticos *trans* ou *cis* forem removidos, por exemplo, pela extinção da expressão do fator de transcrição de execução (sinal *trans*) ou por remoção de um sinal epigenético *cis* de DNA (por meio da desmetilação do DNA). Foram descritas enzimas que podem remover as modificações de proteínas PTMs e 5MeC.

A transmissão estável dos estados epigenéticos liga/desliga pode ser afetada por múltiplos mecanismos moleculares. Na **Figura 38-9**, são mostrados três modos pelos quais as marcações epigenéticas *cis* podem ser propagar através de um ciclo de replicação de DNA. O primeiro exemplo da transmissão da marcação epigenética envolve a propagação das marcações 5MeC de DNA e ocorre como descrito na Figura 38-8. O segundo exemplo de transmissão do estado epigenético ilustra como uma PTM de histona nucleossomal (neste exemplo, a histona H3 trimetilada na lisina K-27; H3K27me3) pode ser propagada. Neste exemplo, imediatamente após a replicação do DNA, tanto os nucleossomos H3K27me3 marcados quanto os H3 não marcados se reformam aleatoriamente em ambas as fitas-filhas de DNA. O complexo repressor policomb 2 (PRC2), composto pelas subunidades de EED-SUZ12-EZH2 e RbAP, liga-se ao nucleossomo que contém a marcação preexistente de H3K27me3 por meio da subunidade EED. A ligação de PRC2 a essa histona marcada estimula a atividade de metilação da subunidade EZH2 do PRC2, o que resulta na metilação local da H3 nucleossomal. A metilação da histona H3 leva, assim, à

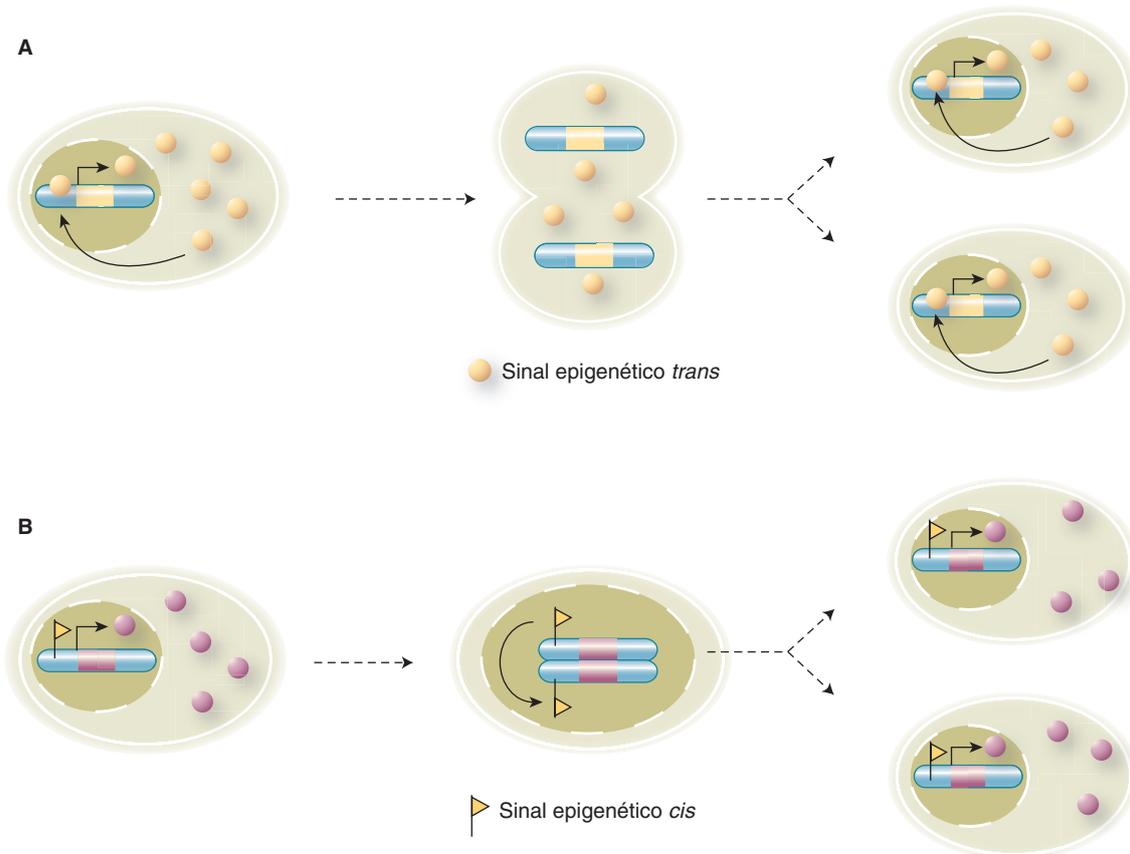


FIGURA 38-8 Sinais epigenéticos *cis* e *trans*. **(A)** Um exemplo de um sinal epigenético que atua em *trans*. Uma proteína transativadora de ligação ao DNA (círculo amarelo) é transcrita a partir de seu gene cognato (barra amarela) localizado em um cromossomo particular (em azul). A proteína expressa é livremente difusível entre os compartimentos nuclear e citoplasmático. O excesso de transativador reentra no núcleo após a divisão celular, liga-se ao seu próprio gene e ativa a transcrição em ambas as células-filhas. Esse ciclo restabelece o circuito de retroalimentação positiva em funcionamento antes da divisão celular e, assim, reforça a expressão estável dessa proteína ativadora transcricional em ambas as células. **(B)** Um sinal *cis*-epigenético; um gene (em cor-de-rosa) localizado em um cromossomo particular (em azul) carrega um sinal epigenético *cis* (pequena bandeira amarela) no interior da região reguladora a montante da unidade de transcrição gênica cor-de-rosa. Nesse caso, o sinal epigenético é associado à transcrição gênica ativa e à subsequente produção do produto gênico (círculos cor-de-rosa). Durante a replicação do DNA, a cromatina recém-replicada serve como um molde que provoca e molda a introdução do mesmo sinal epigenético, ou marcação, na cromátide recém-sintetizada sem marcação. Consequentemente, ambas as células-filhas contêm o gene cor-de-rosa em um estado *cis* epigeneticamente marcado de modo semelhante, o que garante a expressão de um modo idêntico em ambas. Ver o texto para mais detalhes. (Imagem retirada de: Roberto Bonasio, R, Tu, S, Reinberg D: Molecular signals of epigenetic states. Science 2010;330:612–616. Reimpressa, com permissão, de AAAS.)

transmissão estável e completa da marcação epigenética H3K-27me3 para ambas as cromátides. Por fim, o *locus*/sequência que tem como alvo especificamente os sinais epigenéticos *cis* da histona nucleossomal pode ser obtido pela ação dos lncRNA, como mostrado na Figura 38-9, painel C. Nesse caso, um ncRNA específico interage com as sequências de DNA-alvo, e o complexo RNA-DNA resultante é reconhecido por uma proteína ligadora de RNA (RBP). Assim, provavelmente por meio de uma proteína adaptadora específica (A), o complexo RNA-DNA-RBP recruta um complexo modificador de cromatina (CMC) que modifica localmente as histonas nucleossomais. Mais uma vez, esse mecanismo leva à transmissão de uma marcação epigenética estável.

Trabalhos adicionais serão necessários para estabelecer os detalhes moleculares completos desses processos epigenéticos, para determinar quão ubiquamente esses processos ocorrem e para identificar o complemento total das moléculas envolvidas

e os genes controlados. Os sinais epigenéticos são muito importantes para a regulação gênica, como evidenciado pelo fato de as mutações e/ou a superexpressão de muitas das moléculas que contribuem para o controle epigenético levarem a doenças em seres humanos.

Certos elementos do DNA estimulam ou reprimem a transcrição de genes eucarióticos

Além de as alterações grosseiras da cromatina afetarem a atividade transcricional, certos elementos de DNA facilitam ou estimulam a iniciação no promotor e, portanto, são denominados **estimuladores**. Os elementos estimuladores, que geralmente contêm múltiplos sítios de ligação para proteínas transativadoras, diferem do promotor de modo notável. Eles podem exercer sua influência positiva na transcrição mesmo quando

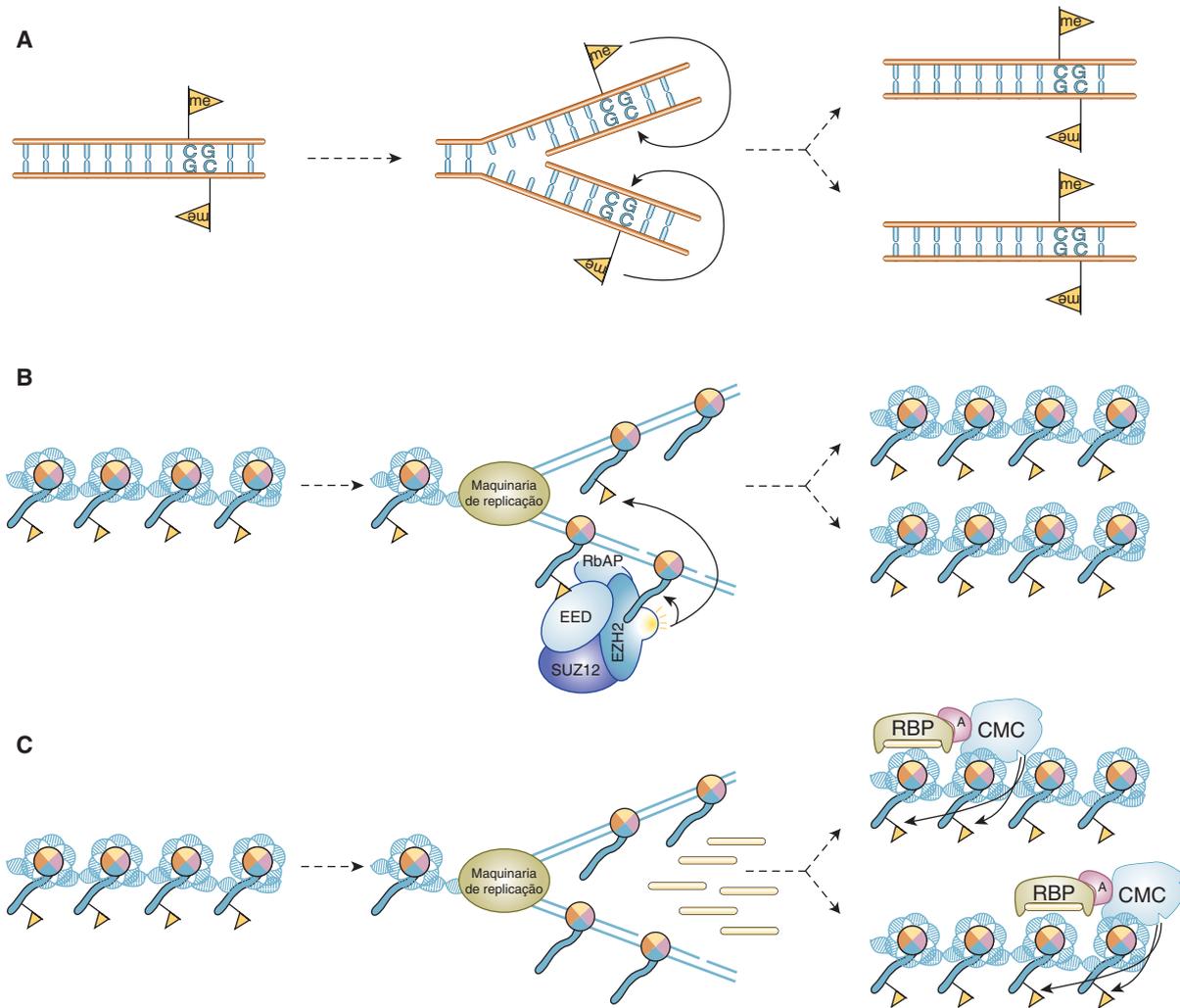


FIGURA 38-9 Mecanismos para transmissão e propagação de sinais epigenéticos após um ciclo de replicação de DNA. (A) Propagação de um sinal 5MeC (bandeira amarela; ver Figura 38-8B). (B) A propagação do sinal epigenético da PTM de histona (H3K27me) é mediada pela ação do PRC2, um complexo de modificação da cromatina, ou CMC. O PRC2 é composto por histonas metilases EED, EZH2, subunidades RbAP e SUZ12. Neste contexto, PRC2 é tanto um leitor do código da histona (pelo domínio de ligação da histona metilada em EED) quanto um escritor do código da histona (por meio do domínio SET da metilase de histona no interior de EZH2). A deposição local-específica do sinal *cis*-epigenético da PTM da histona é direcionada pelo reconhecimento das marcações H3K27me nas histonas nucleossomais preexistentes (bandeira amarela). (C) Outro exemplo da transmissão do sinal epigenético de uma histona (bandeira amarela), exceto pelo fato de aqui o direcionamento dos sinais é mediado pela ação de pequenos ncRNAs que trabalham em conjunto com uma proteína ligadora de RNA (RBP), uma proteína adaptadora (A) e um CMC. Ver o texto para mais detalhes. (Imagem retirada de: Roberto Bonasio, R, Tu, S, Reinberg D: Molecular signals of epigenetic states. Science 2010;330:612–616. Reimpressa, com permissão, de AAAS.)

separados por dezenas de milhares de pares de bases de um promotor; eles funcionam quando orientados em qualquer direção; e podem funcionar a montante (5') ou a jusante (3') do promotor. Os intensificadores podem estimular qualquer promotor próximo e podem atuar em mais de um promotor. O estimulador viral SV40 pode influenciar, por exemplo, a transcrição da β -globina, aumentando sua transcrição 200 vezes em células que contêm tanto o estimulador SV40 quanto o gene da β -globina no mesmo plasmídeo (ver a seguir e a **Figura 38-10**); nesse caso, o gene da β -globina do intensificador SV40 foi construído com a utilização da tecnologia do DNA recombinante – ver Capítulo 39. O elemento estimulador não produz um produto que, por sua vez, atue no promotor, uma vez que ele só é ativo quando está na mesma molécula

do DNA como (i.e., em *cis*, ou fisicamente ligado ao) o promotor. As proteínas de ligação estimuladoras são responsáveis por esse efeito. Os mecanismos exatos pelos quais esses ativadores de transcrição funcionam são objeto de intensa investigação. Os fatores *trans* de ligação ao estimulador interagem com várias outras proteínas de transcrição. Essas interações incluem os coativadores modificadores de cromatina, o mediador, bem como os componentes individuais da maquinaria de transcrição basal da RNA polimerase II. Por fim, os eventos da ligação ao DNA estimulador de fator *trans* resultam em aumento na ligação e/ou atividade da maquinaria de transcrição basal no promotor ligado. Os elementos estimuladores e as proteínas de ligação associadas frequentemente transmitem a hipersensibilidade da nuclease às regiões onde eles residem

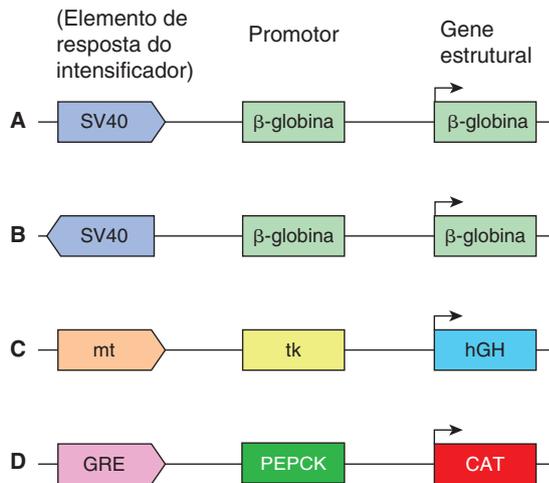


FIGURA 38-10 Esquema ilustrando os métodos utilizados no estudo da organização e ação dos estimuladores e outros elementos reguladores que atuam no *cis*. Esses modelos de genes quiméricos são construídos por técnicas de DNA recombinante *in vitro* (Capítulo 39) e consistem em um gene repórter que codifica uma proteína que pode ser rapidamente analisada e que não é normalmente produzida nas células estudadas, em um promotor que garante a iniciação precisa da transcrição e nos elementos estimuladores indicados (resposta reguladora). Em todos os casos, a transcrição de alto nível das quimeras indicadas depende da presença de estimuladores, os quais estimulam a transcrição mais de 100 vezes acima dos níveis transcripcionais basais (i.e., transcrição dos mesmos genes quiméricos contendo apenas promotores fusionados ao gene repórter indicado). Os exemplos (A) e (B) ilustram o fato de os estimuladores (p. ex., aqui, o SV40) trabalharem na orientação e sobre um promotor heterólogo. O exemplo (C) ilustra que o elemento regulador da metalotioneína (*mt*) (que sob influência de cádmio ou zinco induz a transcrição do gene *mt* endógeno e, portanto, a proteína *mt* de ligação ao metal) trabalhará por meio do promotor do gene da timidina-cinase (*tk*) do herpes-vírus simples (HSV) para aumentar a transcrição do gene repórter do hormônio de crescimento humano (*hGH*). Essa estrutura da engenharia genética foi introduzida no pronúcleo masculino de embriões unicelulares de camundongos e os embriões foram colocados no útero de uma mãe substituta para desenvolver animais transgênicos. Uma prole foi gerada nessas condições e, em alguns indivíduos, a adição de íons de zinco à água de beber teve como efeito um aumento na expressão do hormônio de crescimento no fígado. Nesse caso, esses animais transgênicos responderam aos níveis elevados de hormônio de crescimento, tornando-se duas vezes maiores do que seus companheiros normais de ninhada. O exemplo (D) ilustra que o estimulador do elemento de resposta de glicocorticoide (GRE) trabalhará por meio dos promotores do gene homólogo (gene *PEPCK*) ou heterólogo (não mostrado; i.e., HSV *tk*), promotor de SV40, promotor de β -globina, etc.) para direcionar a expressão do gene repórter do cloranfenicol-acetiltransferase (*CAT*).

(Capítulo 35). Um resumo das propriedades dos estimuladores é apresentado na Tabela 38-2.

Um dos sistemas de intensificadores de mamíferos mais bem compreendidos é o do gene do interferon β . Esse gene é induzido por infecção viral em células de mamíferos. Um dos objetivos da célula, quando infectada por um vírus, é tentar montar uma resposta antiviral – se não para salvar a célula infectada, para ajudar a salvar o organismo todo da infecção viral. A produção de interferon é um dos mecanismos pelo qual isso é obtido. Essa família de proteínas é

TABELA 38-2 Resumo das propriedades dos estimuladores

• Funcionam quando localizados a longas distâncias do promotor
• Funcionam quando estão a montante ou a jusante do promotor
• Funcionam quando orientados em qualquer direção
• Podem funcionar com promotores homólogos ou heterólogos
• Funcionam ligando uma ou mais proteínas
• Funcionam recrutando os complexos correguladores modificadores de cromatina
• Funcionam facilitando a ligação do complexo de transcrição basal ao promotor ligado a <i>cis</i>

secretada por células infectadas por vírus. O interferon secretado interage com as células vizinhas para provocar inibição da replicação viral por vários mecanismos, limitando, desse modo, a extensão da infecção viral. O elemento estimulador que controla a indução do gene do interferon β , que está localizado entre os nucleotídeos – 110 e – 45 em relação ao local de início da transcrição (+ 1), é bem caracterizado. Esse estimulador consiste em quatro elementos *cis* distintos agrupados, cada um ligado por um único fator *trans*. Um elemento *cis* é ligado ao fator de transativação NF- κ B (ver Figuras 42-10 e 42-13), o segundo, por um membro da família de IRF (fator regulador de interferon) dos fatores de transativação, e o terceiro, por um fator heterodimérico do zíper de leucina ATF-2/c-Jun (ver a seguir). O quarto fator é o fator de transcrição arquitetural abundante e ubíquo conhecido como HMG I(Y). Após se ligar aos seus sítios de ligação ricos em A+T, o HMG I(Y) induz uma curvatura significativa no DNA. Há quatro sítios de ligação HMG I(Y) intercalados ao longo do estimulador. Esses sítios desempenham um papel essencial na formação de uma estrutura 3D particular, junto com os três fatores *trans* mencionados, ao induzir uma série de curvas criticamente espaçadas no DNA. Consequentemente, o HMG I(Y) induz a formação cooperativa de uma estrutura 3D única e estereoespecífica, no interior da qual todos os quatro fatores são ativados quando os sinais de infecção viral são percebidos pela célula. A estrutura formada pela montagem cooperativa desses quatro fatores é denominada acentuassomo do interferon β (ver Figura 38-11), assim denominada por sua óbvia semelhança estrutural ao nucleossomo, que também é uma estrutura tridimensional única de proteína-DNA na qual o DNA envolve um conjunto de proteínas (ver Figuras 35-1 e 35-2). O acentuassomo, uma vez formado, induz um grande aumento na transcrição do gene do interferon β mediante uma infecção viral. A transcrição do gene do interferon β não é induzida simplesmente pela ocupação de proteína dos sítios dos elementos *cis* apostos linearmente – ao contrário, é a formação do acentuassomo apropriado que fornece superfícies adequadas para o recrutamento de coativadores que resulta na formação acentuada do PIC em um promotor *cis*-ligado e, assim, na ativação da transcrição.

Os elementos com atuação *cis* que diminuem ou **reprimem/silenciam** a expressão de genes específicos também

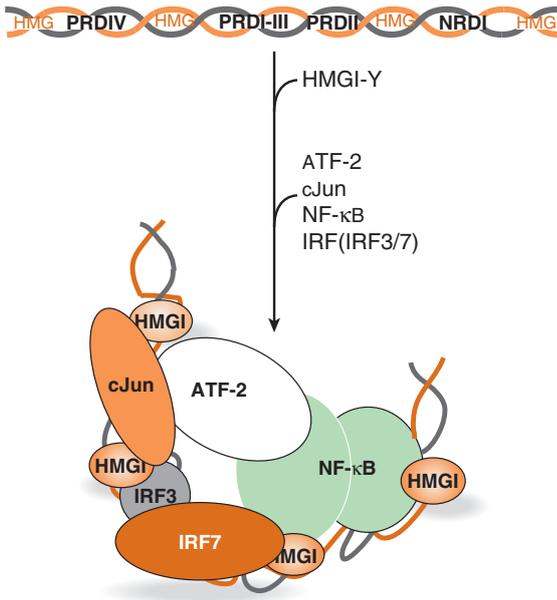


FIGURA 38-11 Formação e estrutura putativa do acentuassomo formado no estimulador do gene humano do interferon β . A distribuição dos elementos *cis* múltiplos (HMG, PRDIV, PRDI-III, PRDII, NRD1) que compõem o estimulador do gene do interferon β está representada diagramaticamente na parte superior. O estimulador intacto medeia a indução transcricional do gene do interferon β (*IFNB1*) mais de 100 vezes diante de uma infecção viral em células humanas. Os elementos *cis* desse estimulador modular representam os sítios de ligação para os fatores *trans* HMGI I(Y), cJun-ATF-2, IRF3-IRF7, e NF- κ B, respectivamente. Os fatores interagem com esses elementos de DNA de modo obrigatório, ordenado e altamente cooperativo, como indicado pela seta. A ligação inicial de quatro proteínas HMG I(Y) induz curvas acentuadas do DNA no estimulador, fazendo toda a região de 70 a 80 pb assumir um alto nível de curvatura. Essa curvatura é integral à subsequente ligação altamente cooperativa dos outros fatores *trans*, uma vez que permite que os fatores ligados ao DNA realizem importantes interações diretas proteína-proteína, que contribuem para a formação e a estabilidade do acentuassomo e geram uma superfície 3D única que serve para recrutar correguladores modificadores de cromatina que realizam atividades enzimáticas (p. ex., Swi/Snf: ATPase, remodeladora de cromatina e P/CAF: histona-acetiltransferase), bem como para a maquinaria de transcrição geral (RNA-polimerase II e GTFs). Embora quatro dos cinco elementos *cis* independentemente (PRDIV, PRDI-III, PRDII, NRD1) possam estimular de maneira moderada (cerca de 10 vezes) a transcrição de um gene repórter em células transfectadas (ver Figuras 38-10 e 38-12), todos os cinco elementos *cis*, em ordem adequada, são necessários para formar um estimulador que possa estimular apropriadamente a transcrição do gene *IFNB1* (i.e., ≥ 100 vezes) em resposta à infecção viral de uma célula humana. Essa distinção indica a necessidade estrita da arquitetura apropriada do acentuassomo para uma ativação *trans* eficiente. Acentuassomos semelhantes, envolvendo distintos fatores *cis* e *trans* e correguladores, devem se formar em muitos outros genes de mamíferos.

foram identificados. Como poucos desses elementos foram estudados, não é possível formular generalizações sobre seu mecanismo de ação – embora novamente, como para a ativação do gene, tenham sido implicadas modificações covalentes no nível da cromatina das histonas e de outras proteínas pelos correpressores das múltiplas subunidades recrutadas por repressores.

A expressão tecidual-específica pode resultar tanto da ação dos estimuladores ou repressores quanto da combinação de ambos os elementos reguladores que atuam como *cis*

Milhares de genes são atualmente reconhecidos por abrigar elementos estimuladores, em várias localizações, em relação a suas regiões codificadoras. Além de serem capazes de estimular a transcrição gênica, alguns desses elementos estimuladores claramente possuem a capacidade de fazer isso de um modo específico para cada tecido. Pela fusão de estimuladores

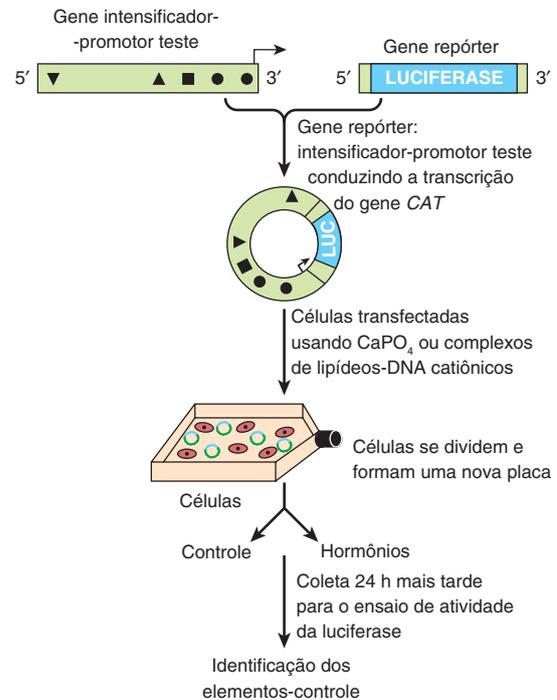


FIGURA 38-12 Uso dos genes repórter para definir os elementos reguladores do DNA. Um fragmento de DNA portando elementos reguladores *cis* (triângulos, quadrado, círculos no diagrama) do gene em questão – neste exemplo, aproximadamente 2 kb de DNA flanqueador 5' e do promotor cognato – é ligado a um vetor de plasmídeo que contém um gene repórter adequado – neste caso, a enzima luciferase de vagalumes, abreviada como LUC. Como observado na Figura 38-10, nesses experimentos, o repórter não pode estar presente de modo endógeno nas células transfectadas pelo plasmídeo. Consequentemente, qualquer detecção dessas atividades em um extrato de células significa que a célula foi transfectada pelo plasmídeo com sucesso. Não é mostrado aqui, mas geralmente um repórter adicional, como a luciferase de *Renilla*, é cotransfectada para servir como controle da eficiência de transfecção. As condições de ensaio para as luciferases de vagalumes e de *Renilla* são diferentes, portanto, as duas atividades podem ser sequencialmente analisadas pelo uso do mesmo extrato celular. Um aumento da atividade de luciferase de vagalumes em relação ao nível basal, por exemplo, após a adição de um ou mais hormônios, significa que a região de inserção de DNA no plasmídeo do gene repórter contém elementos de resposta hormonal (HREs) funcionais. Regiões progressivamente mais curtas do DNA, regiões com deleções internas ou regiões com mutações pontuais podem ser construídas e inseridas a montante do gene reportador para apontar o elemento de resposta (ver Figura 38-13).

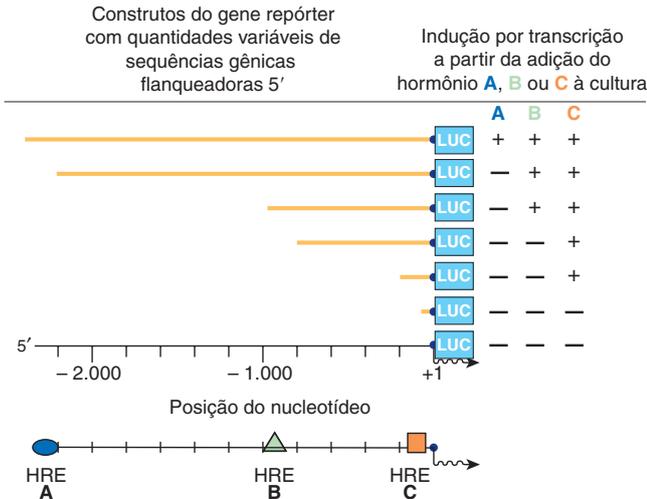


FIGURA 38-13 Mapeamento dos distintos elementos de resposta hormonal (HREs) (A), (B) e (C) usando a abordagem de transfecção do gene repórter. Uma família de genes repórteres, construídos como descrito nas Figuras 38-10 e 38-12, pode ser transfetada individualmente em uma célula receptora. Analisando quando algumas respostas hormonais são perdidas em comparação ao ponto final de deleção 5', os elementos estimuladores de resposta hormonal específica podem ser localizados e definidos com precisão no nível do nucleotídeo.

suspeitos ou conhecidos específicos de tecidos aos genes repórteres (ver a seguir) e pela introdução dessas estruturas químicas estimulador-repórter por microinjeções nos embriões unicelulares, pode-se criar um animal transgênico (ver Capítulo 39) e testar rigorosamente se um determinado estimulador ou silenciador teste pode modular de fato a expressão na célula ou no tecido de maneira específica. Essa abordagem do **animal transgênico** tem revelado ser útil no estudo da expressão gênica específica de tecidos.

Os genes repórteres são utilizados para definir estimuladores e outros elementos reguladores que modulam a expressão gênica

Pela ligação de regiões de DNA suspeitas de abrigar sequências reguladoras a vários genes repórteres (a **abordagem gênica repórter** ou **quimérica**) (Figuras 38-10, 38-12 e 38-13), é possível determinar quais regiões nas proximidades dos genes estruturais influenciam sua expressão. Partes do DNA que abrigam os elementos reguladores, frequentemente identificados por alinhamentos de sequências na bioinformática, são ligadas a um gene repórter específico e introduzidas na célula do hospedeiro (Figura 38-12). A expressão basal do gene repórter aumentará se o DNA possuir um estimulador. A adição de um hormônio ou metal pesado no meio de cultura aumentará a expressão do gene repórter se o DNA possuir um elemento de resposta hormonal (HRE) ou de metal (MRE) (Figura 38-13). A localização do elemento pode ser identificada pela utilização de peças progressivamente mais curtas de DNA, deleções ou mutações pontuais (Figura 38-13).

Essa estratégia, geralmente **utilizando células transfectadas em culturas** (i.e., células induzidas a aceitar DNAs exógenos), permitiu a identificação de centenas de estimuladores,

silenciadores/repressores, como elementos específicos de tecidos, e hormônios, metais pesados e elementos de resposta a medicamentos. A atividade de um gene em qualquer momento reflete a interação desses vários elementos de DNA que atuam como *cis* com seus respectivos fatores que atuam como *trans*. Em geral, a resposta transcricional é determinada pelo equilíbrio entre sinalização positiva e negativa para a maquinaria de transcrição. O desafio agora é descobrir como ocorre exatamente essa regulação no nível molecular, para que se possa, finalmente, ter a capacidade de modular a transcrição gênica em contexto terapêutico.

Combinações dos elementos de DNA e proteínas associadas fornecem diversidade nas respostas

Genes de procaríotos são frequentemente regulados de modo liga/desliga em resposta a estímulos ambientais simples. Alguns genes de eucariotos são regulados no modo simples liga/desliga, mas o processo na maioria dos genes, sobretudo em mamíferos, é muito mais complicado. Sinais que representam vários estímulos ambientais complexos podem convergir para um único gene. A resposta do gene a esses sinais pode ter várias características fisiológicas. Primeiro, a resposta pode variar consideravelmente. Isso é obtido por meio de respostas positivas aditivas e sinérgicas contrabalançadas por efeitos negativos ou repressores. Em alguns casos, tanto as respostas positivas quanto as negativas podem ser dominantes.

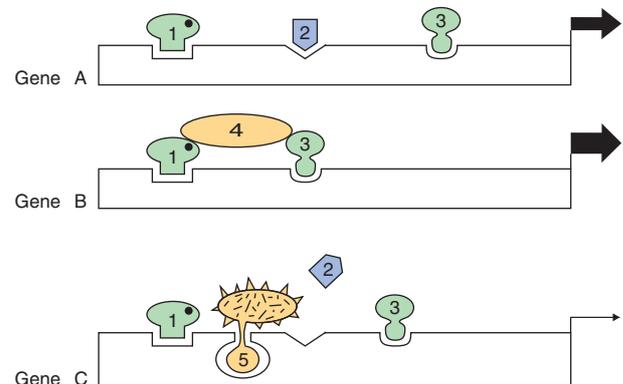


FIGURA 38-14 Combinações de elementos de DNA e proteínas fornecem diversidade na resposta de um gene. O gene A é ativado (a largura da seta indica a extensão) pela combinação de proteínas ativadoras de transcrição 1, 2 e 3 (provavelmente com coativadores, como mostrado nas Figuras 36-10 e 38-11). O gene B é ativado, neste caso, mais efetivamente, pela combinação dos fatores 1, 3 e 4; neste exemplo, o fator de transcrição 4 não entra diretamente em contato com o DNA. Os ativadores podem formar uma ponte linear ligando a maquinaria basal ao promotor, ou alternativamente, isso pode ser feito pela volta do DNA. Em qualquer caso, o propósito é direcionar a maquinaria de transcrição basal para o promotor. O gene C é inativado pela combinação dos fatores de transcrição 1, 5 e 3. Nesse caso, evidencia-se que o fator 5 impede a ligação essencial do fator 2 ao DNA, como ocorre no exemplo A. Se o ativador 1 promove a ligação cooperativa da proteína repressora 5, e se a ligação do ativador 1 precisa de um ligante (ponto sólido), pode-se ver como o ligante poderia ativar um gene em uma célula (gene A) e reprimir outro (gene C) na mesma célula.

Também é necessário um mecanismo em que um efector, como um hormônio, pode ativar alguns genes em uma célula enquanto reprime outros, deixando ainda outros sem serem afetados. Quando todos esses processos são acoplados a elementos de fatores específicos de tecidos, uma flexibilidade considerável é obtida. Essas variáveis fisiológicas necessitam, obviamente, de um arranjo muito mais complicado do que um interruptor liga/desliga. A coleção e a organização de elementos do DNA em um promotor determinam – por fatores associados – como um gene específico responderá e por quanto tempo uma resposta particular será mantida. Alguns exemplos simples são ilustrados na **Figura 38-14**.

Os domínios de transcrição podem ser definidos por regiões de controle do *locus* e isoladores

O grande número de genes em células eucarióticas e o conjunto complexo de fatores reguladores da transcrição apresentam um problema organizacional. Por que alguns genes estão disponíveis para a transcrição em uma determinada célula, e outros, não? Se os estimuladores podem regular vários genes a dezenas de quilobases de distância e não são dependentes de posição ou orientação, como eles são impedidos de desencadear a transcrição de todos os genes *cis*-ligados próximos? Parte da solução desses problemas é obtida tendo a cromatina disposta em unidades funcionais que restringem os padrões de expressão gênica. Isso pode ser obtido porque a cromatina forma uma estrutura com a matriz nuclear ou outra entidade física ou compartimento no interior do núcleo. Como alternativa, algumas regiões são controladas por elementos de DNA complexos, chamados de **regiões de controle do locus (LCRs)**. Uma LCR – com proteínas ligadas associadas – controla a expressão de um grupo de genes. A LCR mais bem compreendida regula a expressão da família do gene da globina sobre uma grande região do DNA. Outro mecanismo é fornecido pelos **isoladores**. Esses elementos de DNA, também em associação a uma ou mais proteínas, impedem um estimulador de atuar sobre um promotor, do outro lado de um isolador, em outro domínio de transcrição. Os isoladores, portanto, servem como **elementos periféricos** transcripcionais.

TABELA 38-3 Exemplos de fatores de transcrição que contêm vários motivos de ligação do DNA

Motivo de ligação	Organismo	Proteína reguladora
Hélice-volta-hélice	<i>E. coli</i>	Repressor lac, CAP
	Fago	Repressores λ cl, cro e 434
	Mamíferos	Proteínas <i>homeobox</i> Pit-1, Oct1, Oct2
Dedo de zinco	<i>E. coli</i>	Proteína do gene 32
	Levedura	Gal4
	<i>Drosophila</i>	Serendipidade, <i>hunchback</i>
	<i>Xenopus</i>	TFIIIA
	Mamíferos	Família do receptor esteroide, Sp1
Zíper de leucina	Levedura	GCN4
	Mamíferos	C/EBP, fos, Jun, Fra-1, proteína de ligação de CRE (CREB), <i>c-myc</i> , <i>n-myc</i> , <i>l-myc</i>

DIVERSOS MOTIVOS COMPÕEM OS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO AO DNA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO REGULADORES PROTEICOS

A especificidade envolvida no controle da transcrição requer que as proteínas reguladoras se liguem com grande afinidade e especificidade à região correta do DNA. Três motivos especiais – a **hélice-volta-hélice**, o **dedo de zinco** e o **zíper de leucina** – explicam muitas dessas interações proteína-DNA específicas. Exemplos de proteínas que contêm esses motivos são apresentados na **Tabela 38-3**.

A comparação das atividades de ligação das proteínas que contêm esses motivos leva a várias generalizações importantes.

1. A ligação deve ser de alta afinidade ao sítio específico e de baixa afinidade a outro DNA.
2. Pequenas regiões da proteína fazem contato direto com o DNA; o restante da proteína, além de fornecer os domínios de ativação *trans*, pode estar envolvido na dimerização de monômeros da proteína de ligação, pode proporcionar uma superfície de contato para a formação de heterodímeros, pode fornecer um ou mais sítios de ligação ao ligante ou pode oferecer superfícies para a interação com coativadores, correpressores ou a maquinaria de transcrição.
3. As interações proteína-DNA feitas por essas proteínas são mantidas por ligações de hidrogênio, interações iônicas e forças de van der Waals.
4. Os motivos encontrados nessas proteínas são especiais; sua presença em uma proteína de função desconhecida sugere que a proteína pode se ligar ao DNA.
5. As proteínas com motivos hélice-volta-hélice ou zíper de leucina formam dímeros, e seus respectivos sítios de ligação do DNA são palíndromos simétricos. Em proteínas com o motivo dedo de zinco, o sítio de ligação é repetido de duas a nove vezes. Essas características permitem interações cooperativas entre os sítios de ligação e estimulam o grau e a afinidade da ligação.

O motivo hélice-volta-hélice

O primeiro motivo descrito foi a **hélice-volta-hélice**. A análise da estrutura 3D do regulador de transcrição lambda Cro revelou que cada monômero é composto por três folhas β antiparalelas e três α -hélices (**Figura 38-15**). O dímero forma-se pela associação de folhas β_3 antiparalelas. As α_3 -hélices formam a superfície de reconhecimento do DNA, e o restante da molécula parece estar envolvido na estabilização dessas estruturas. O diâmetro médio de uma α -hélice é de 1,2 nm, que é aproximadamente a largura da cavidade maior na forma B do DNA.

O domínio de reconhecimento do DNA de cada monômero Cro interage com 5 pb, e os sítios de ligação do dímero abrangem 3,4 nm, permitindo o ajuste em meias-voltas sucessivas da cavidade maior na mesma superfície (**Figura 38-15**). Análises de raio X do repressor λ cI, de CAP (a proteína receptora de cAMP de *E. coli*), do repressor triptofano e do repressor 434 do fago também mostram essa estrutura dimérica

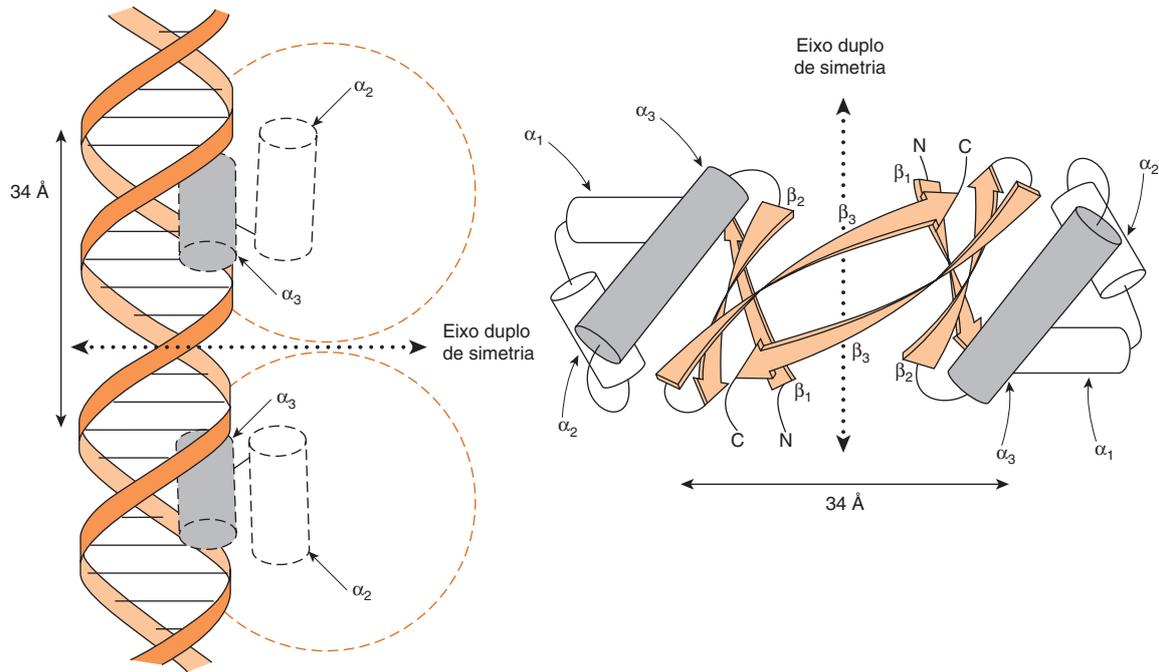


FIGURA 38-15 Representação esquemática da estrutura 3D da proteína Cro e sua ligação ao DNA pelo motivo hélice-volta-hélice (à esquerda). O monômero Cro consiste em três folhas β antiparalelas (β_1 a β_3) e três hélices α (α_1 , α_2 e α_3). O motivo hélice-volta-hélice (HTH) é formado porque as hélices α_2 e α_3 se unem em mais ou menos 90° de cada uma por uma volta de quatro aminoácidos. A α_3 -hélice do Cro é a superfície de reconhecimento do DNA (sombreado). Dois monômeros associam-se por meio de interações entre as duas folhas β_3 antiparalelas para formar um dímero com o dobro de eixo de simetria (à direita). Um dímero Cro liga-se ao DNA por meio de suas α_3 -hélices, e cada uma delas liga-se a cerca de 5 pb na mesma face da cavidade maior (ver Figuras 34-2 e 38-6). A distância entre pontos comparáveis nas duas α -hélices de DNA é 34 Å, que é a distância requerida para uma volta completa da dupla-hélice. (Reimpressa, com permissão, de B Mathews.)

hélice-volta-hélice que está presente igualmente em proteínas de ligação do DNA de eucariotos (ver Tabela 38-3).

O motivo dedo de zinco

O **dedo de zinco** foi o segundo motivo de ligação do DNA a ter sua estrutura atômica elucidada. Sabia-se que a proteína TFIIIA, um regulador positivo da transcrição do gene do RNA 5S, necessitava de zinco para a sua atividade. Análises estruturais

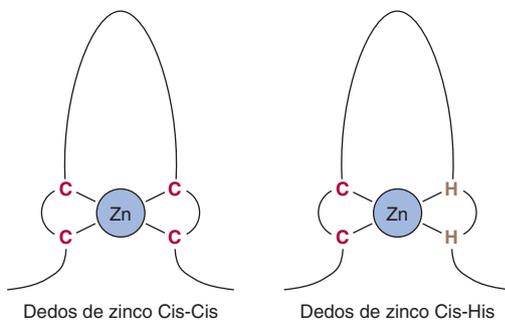


FIGURA 38-16 Os dedos de zinco são uma série de domínios repetidos (dois a nove) em que cada um está centrado em uma coordenação tetraédrica com o zinco. No caso do fator de transcrição de ligação ao DNA TFIIIA, a coordenação é fornecida por um par de resíduos de cistina (C) separados por 12 a 13 aminoácidos a partir de um par de resíduos de histidina (H). Em outras proteínas dedo de zinco, o segundo par também consiste em resíduos C. Os dedos de zinco ligam-se na cavidade maior, com dedos adjacentes entrando em contato com 5 pb ao longo da mesma face da hélice.

e biofísicas revelaram que cada molécula de TFIIIA contém nove íons de zinco em um complexo de coordenação repetido formado por resíduos de cisteína-cisteína rigorosamente espaçados, seguidos de 12 a 13 aminoácidos e depois por um par histidina-histidina (Figura 38-16). Em alguns casos – principalmente a família do receptor hormonal nuclear esteroide-tiroide –, esse par His-His é substituído por um segundo par Cis-Cis. Os motivos dedo de zinco da proteína encontram-se em uma face da hélice do DNA, com dedos sucessivos alternativamente posicionados em uma volta da cavidade maior. Como acontece com o domínio de reconhecimento na proteína hélice-volta-hélice, cada dedo de zinco TFIIIA contata cerca de 5 pb de DNA. A importância desse motivo na ação dos hormônios esteroides é ressaltada por um “experimento da natureza”. A mutação de um único aminoácido em qualquer um dos dois dedos de zinco da proteína receptora $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ resulta em resistência à ação desse hormônio e na síndrome clínica do raquitismo.

O motivo zíper de leucina

A análise cuidadosa de uma sequência de 30 aminoácidos na região carboxiterminal da proteína de ligação estimuladora C/EBP revelou uma nova estrutura, o **motivo zíper de leucina**. Como ilustrado na Figura 38-17, essa região da proteína forma uma α -hélice na qual há uma repetição periódica dos resíduos de leucina a cada sete posições. Isso ocorre para oito voltas helicoidais e quatro repetições de leucina. Estruturas semelhantes foram encontradas em várias outras proteínas

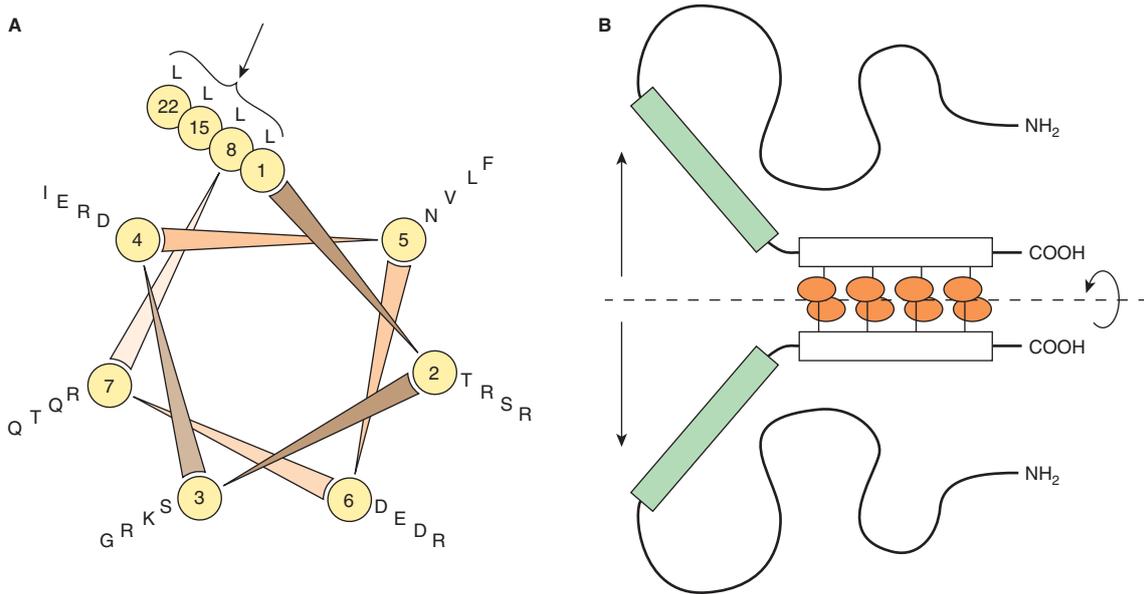


FIGURA 38-17 O motivo zíper de leucina. (A) Análise do giro da hélice de uma porção carboxiterminal da proteína de ligação ao DNA C/EBP (Tabela 36-3). A sequência de aminoácido é apresentada de uma terminação à outra ao longo do eixo de uma α -hélice esquemática. O giro da hélice consiste em sete raios que correspondem a sete aminoácidos que compreendem cada duas voltas da α -hélice. Os resíduos de leucina (L) ocorrem a cada sete posições (neste aminoácido esquemático, C/EBP nos resíduos 1, 8, 15, 22; ver seta). Outras proteínas com “zíperes de leucina” têm padrão semelhante de giro de hélice. (B) Modelo esquemático do domínio de ligação ao DNA de C/EBP. Duas cadeias polipeptídicas idênticas de C/EBP são mantidas em uma formação de dímero pelo domínio do zíper de leucina de cada polipeptídeo (mostrado como retângulos brancos ligados aos círculos ovais sombreados em laranja). Essa associação é necessária para manter os domínios de ligação do DNA de cada polipeptídeo (retângulos sombreados em verde) em conformação adequada e registro para a ligação ao DNA. (Reimpressa, com permissão, de S McKnight.)

associadas à regulação da transcrição em células de mamíferos e leveduras. Essa estrutura permite que dois monômeros idênticos ou não idênticos (p. ex., Jun-Jun ou Fos-Jun) se “fechem em zíper” em uma espiral enrolada e formem um complexo dimérico apertado (Figura 38-17). Essa interação proteína-proteína pode servir para estimular a associação entre os DBDs separados e seus alvos (Figura 38-17).

A LIGAÇÃO AO DNA E OS DOMÍNIOS DE TRANSATIVAÇÃO DA MAIORIA DAS PROTEÍNAS REGULADORAS SÃO SEPARADOS

A ligação do DNA pode resultar em uma mudança conformacional geral que permite que a proteína ligada ative a transcrição, ou essas duas funções podem ser servidas por domínios separados e independentes. Experimentos de troca de domínios sugerem que esta última é a que ocorre geralmente.

O produto do gene *GAL1* está envolvido no metabolismo da galactose em leveduras. A transcrição desse gene é regulada positivamente pela proteína GAL4, que se liga a uma sequência de ativação a montante (UAS), ou estimulador, por um domínio aminoterminal. O DBD aminoterminal de 73 aminoácidos de GAL4 foi removido e substituído pelo DBD de LexA, uma proteína de ligação de DNA de *E. coli*. Essa troca de domínio resultou em uma molécula que não se ligou ao UAS do *GAL1* e, é claro, não ativou o gene *GAL1* (Figura 38-18). Se, no entanto, o operador *lexA* – a sequência de DNA

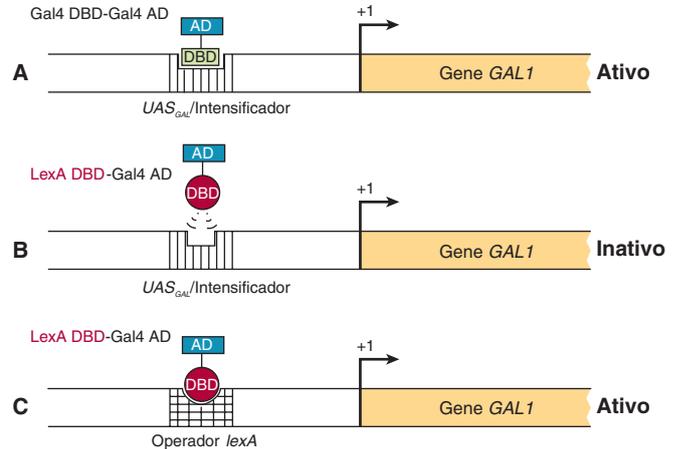


FIGURA 38-18 Experimentos de troca de domínios demonstram a natureza independente da ligação ao DNA e dos domínios de ativação de transcrição. O gene *GAL1* de leveduras contém uma sequência de ativação a montante (UAS) ou estimulador ligado pelo fator de ativação da transcrição regulador GAL4 (A). O GAL4, como a proteína *Ic1*, é modular e contém um DBD N-terminal e um domínio de ativação (AD) C-terminal. Quando o fator de transcrição GAL4 se liga ao estimulador UAS de *GAL1*, a ativação da transcrição do gene *GAL1* ocorre (Ativo). Uma proteína quimérica, na qual o domínio de ligação ao DNA (DBD) aminoterminal de GAL4 é removido e substituído por um DBD da proteína LexA de *E. coli*, a proteína quimérica resultante DBD LexA-GAL4 AD não consegue estimular a transcrição de *GAL1*, uma vez que DBD LexA não pode se ligar ao estimulador UAS de *GAL1* (B). Por outro lado (C), a proteína de fusão DBD LexA-GAL4 AD aumenta a transcrição de *GAL1* quando o operador *lexA* (o alvo natural do DBD LexA) é inserido na região promotora de *GAL1*, substituindo o UAS normal de *GAL1*.

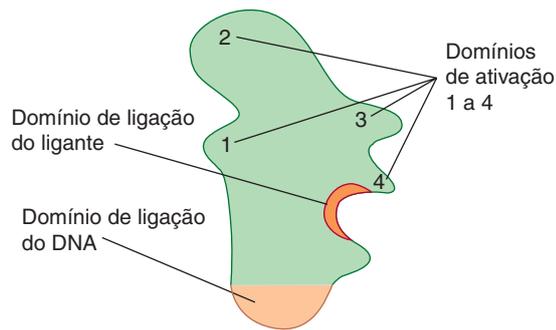


FIGURA 38-19 As proteínas que regulam a transcrição têm vários domínios. Este fator de transcrição hipotético tem um DBD que é distinto de um domínio de ligação ao ligante (LBD) e vários domínios de ativação (ADs) (1 a 4). Outras proteínas podem não ter o DBD ou o LBD e todas podem ter números variáveis de domínios que contatam outras proteínas, incluindo as correguladoras e as do complexo de transcrição basal (ver também Capítulos 41 e 42).

normalmente ligada pelo DBD *lexA* – fosse inserido na região promotora do gene *GAL*, substituindo, assim, o estimulador *GAL1* normal, a proteína híbrida ligada a esse promotor (no operador *lexA*) ativaria a transcrição de *GAL1*. Esse experimento, que foi repetido várias vezes, demonstra que a região carboxiterminal de *GAL4* contém um domínio de ativação transcricional. Esses dados também mostram que DBD e os domínios de transativação (ADs) são independentes. A hierarquia envolvida na montagem dos complexos gênicos de transcrição-ativação inclui proteínas que se ligam ao DNA e fazem a transativação; outras que formam complexos proteína-proteína, que ligam proteínas de ligação ao DNA às proteínas transativadoras; e outras que formam complexos proteína-proteína com componentes de correguladores ou com o aparato de transcrição basal. Uma determinada proteína pode, portanto, ter várias superfícies modulares ou domínios que servem a diferentes funções (Figura 38-19). (Não é mostrado aqui, mas as proteínas repressoras de ligação ao DNA são organizadas de modo semelhante ao DBD separável e aos domínios silenciadores.) Como descrito no Capítulo 36, o objetivo principal desses conjuntos complexos é facilitar a montagem e/ou atividade do aparato de transcrição basal no promotor *cis*-ligado.

A REGULAÇÃO GÊNICA EM PROCARIOTOS E EM EUKARIOTOS DIFERE EM ASPECTOS IMPORTANTES

Além da transcrição, as células eucarióticas empregam vários mecanismos para regular a expressão gênica (Tabela 38-4). Um maior número de etapas, principalmente no processamento do RNA, está envolvido na expressão dos genes de eucariotos do que na dos genes de procariotos, e essas etapas fornecem sítios adicionais para influências reguladoras que não existem em procariotos. Essas etapas de processamento do RNA em eucariotos, descritas em detalhes no Capítulo 36, incluem o cap da extremidade 5' dos transcritos primários, a adição de uma cauda de poliadenilato à extremidade 3' dos

TABELA 38-4 A expressão gênica é regulada pela transcrição e por várias outras formas no nível do RNA em células eucarióticas

• Amplificação gênica
• Rearranjo gênico
• Processamento de RNA
• <i>Splicing</i> alternativo de mRNA
• Transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma
• Regulação da estabilidade do mRNA
• Compartimentalização
• Silenciamento e ativação de ncRNA

transcritos e a excisão das regiões de íntrons para gerar éxons unidos em uma molécula de mRNA madura. Até agora, as análises da expressão gênica de eucariotos forneceram evidências de que a regulação ocorre no nível da **transcrição**, do **processamento nuclear do RNA**, da **estabilidade do mRNA** e da **tradução**. Além disso, **a amplificação e o rearranjo influenciam a expressão gênica**.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e o alto rendimento do sequenciamento do DNA e do RNA (Capítulo 39), muitos progressos foram feitos em anos recentes na compreensão da expressão gênica de eucariotos. Entretanto, como a maioria dos organismos eucarióticos contém muito mais informação genética do que os procariotos e como a manipulação desses genes é muito mais difícil, os aspectos moleculares da regulação gênica de eucariotos são menos bem compreendidos do que os exemplos discutidos neste capítulo. Esta seção descreve brevemente alguns tipos diferentes de regulação gênica em eucariotos.

Os ncRNAs modulam a expressão gênica, alterando a função do mRNA

Como observado no Capítulo 35, a classe de RNAs não codificadores ubíquos de eucariotos recentemente descobertos, denominados mi/siRNAs e lncRNAs, contribuiu muito para o controle da expressão gênica. O mecanismo de ação dos miRNAs e siRNAs pequenos é mais bem compreendido. Esses RNAs, com cerca de 22 nucleotídeos, regulam a função/expressão de mRNAs específicos, pela inibição da tradução ou pela indução da degradação do mRNA, por diferentes mecanismos; em poucos casos, os miRNAs estimulam a função do mRNA. Acredita-se que pelo menos uma parte da modulação do miRNA na atividade do mRNA ocorra no **corpo P** (ver Figura 37-11). A ação do miRNA pode resultar em mudanças drásticas na produção de proteínas e, portanto, na expressão gênica. Esses ncRNAs pequenos estão envolvidos em várias doenças humanas, como cardiopatias, câncer, perda de massa muscular, infecções virais e diabetes.

Os miRNAs e os siRNAs, como os fatores de transcrição de ligação ao DNA descritos em detalhes anteriormente, são transcritos e, uma vez sintetizados e adequadamente processados, interagem com proteínas específicas e se ligam a mRNAs-alvo (ver Figura 36-17). A ligação dos miRNAs aos mRNAs-alvo é

orientada pelas regras normais de pareamento de bases. Em geral, se o pareamento de bases miRNA-mRNA possui um ou mais erros, a tradução do mRNA-“alvo” cognato é inibida, e se o pareamento de bases miRNA-mRNA é perfeito em todos os 22 nucleotídeos, o mRNA correspondente é degradado.

Devido à enorme e sempre crescente importância dos miRNAs, muitos cientistas e empresas de biotecnologia estão estudando ativamente a biogênese, o transporte e a função do miRNA na esperança da cura de doenças humanas. O tempo dirá a magnitude e a universalidade da regulação gênica mediada por ncRNA.

Os genes de eucariotos podem ser amplificados ou rearranjados durante o desenvolvimento ou em resposta a fármacos

Durante o desenvolvimento inicial de metazoários, há aumento súbito na necessidade de moléculas específicas, como moléculas de RNA ribossomal e RNA mensageiro, para produção de proteínas que compõem células ou tecidos específicos. Um modo de elevar a taxa em que tais moléculas podem ser formadas é aumentar o número de genes disponíveis para a transcrição dessas moléculas específicas. Entre as sequências de DNA repetitivo no interior do genoma estão centenas de cópias de genes de RNA ribossomal. Esses genes preexistem repetitivamente no DNA dos gametas e, assim, são transmitidos em um grande número de cópias de geração a geração. Em alguns organismos específicos, como a mosca-da-fruta (*Drosophila*), durante a oogênese, ocorre amplificação de alguns genes preexistentes, como os das proteínas do cório (casca do ovo). Posteriormente, esses genes amplificados, presumivelmente gerados por um processo de iniciações repetidas durante a síntese do DNA, fornecem múltiplos sítios para a transcrição do gene (Figuras 36-4 e 38-20). O lado obscuro da amplificação gênica específica é o fato de, em células humanas, a resistência a fármacos poder se desenvolver em um tratamento terapêutico estendido em função da amplificação e do aumento da expressão de genes que codificam proteínas que degradam ou bombeiam os fármacos nas células-alvo.

Como observado no Capítulo 36, as sequências de codificação responsáveis pela geração de moléculas de proteínas

específicas são frequentemente não contíguas no genoma de mamíferos. No caso dos genes codificadores de anticorpos, isso é particularmente verdadeiro. Como descrito em detalhes no Capítulo 52, as imunoglobulinas são compostas por dois polipeptídeos, as chamadas cadeias pesadas (cerca de 50 kDa) e cadeias leves (cerca de 25 kDa). Os mRNAs que codificam essas duas subunidades de proteínas são codificados por sequências gênicas que estão sujeitas a extensas mudanças na sequência de codificação do DNA. Essas mudanças de codificação do DNA são fundamentais para gerar o requisito de diversidade de reconhecimento, central para o funcionamento adequado da imunidade.

Os mRNAs de cadeias leve e pesada de IgG são codificados por vários segmentos diferentes que são repetidos em conjunto na linha germinativa. Assim, por exemplo, a cadeia leve de IgG consiste em domínios ou segmentos variáveis (V_L), juntos (J_L) e constantes (C_L). Para subconjuntos particulares de cadeias leves de IgG, existem em torno de 300 segmentos que codificam genes de V_L repetidos em *tandem*, 5 sequências codificadoras de J_L arranjadas em *tandem* e cerca de 10 segmentos que codificam genes C_L . Todas essas múltiplas regiões codificadoras distintas estão localizadas na mesma região do mesmo cromossomo, e cada tipo de segmento codificador (V_L , J_L e C_L) é repetido em *tandem* de modo cabeça para cauda no interior da região de repetição do segmento. Tendo múltiplos segmentos de V_L , J_L e C_L para escolher, uma célula imune possui um maior repertório de sequências para trabalhar, a fim de desenvolver tanto a flexibilidade quanto a especificidade imunológica. Entretanto, uma determinada unidade de transcrição de cadeia leve de IgG funcional – como todas as outras unidades de transcrição “normais” de mamíferos – contém apenas as sequências codificadoras para uma única proteína. Portanto, antes que uma cadeia leve de IgG específica possa ser expressa, as sequências codificadoras *individuais* de V_L , J_L e C_L devem ser recombinadas para gerar uma unidade de transcrição única e contígua que exclui os múltiplos segmentos não utilizados (i.e., aproximadamente 300 segmentos V_L não utilizados, 4 segmentos J_L não utilizados e 9 segmentos C_L não utilizados). Essa deleção da informação gênica não utilizada é acompanhada pela recombinação seletiva do DNA que remove o código de DNA não desejado enquanto mantém as sequências codificadoras necessárias: uma sequência V_L , uma J_L e uma C_L . (As sequências V_L sofrem uma mutagênese pontual adicional para gerar ainda mais variabilidade – daí o seu nome.) As sequências recém-recombinadas formam, assim, uma única unidade de transcrição responsável pela transcrição mediada pela RNA-polimerase II em um único mRNA monocistrônico. Embora os genes de IgG representem um dos casos mais bem estudados de rearranjo de DNA direcionado pela modulação da expressão gênica, outros casos de rearranjo do DNA regulado por genes foram descritos na literatura.

O processamento do RNA alternativo é outro mecanismo de controle

Além de afetar a eficiência de utilização do promotor, as células eucarióticas empregam o processamento do RNA alternativo para controlar a expressão gênica. Isso pode ocorrer

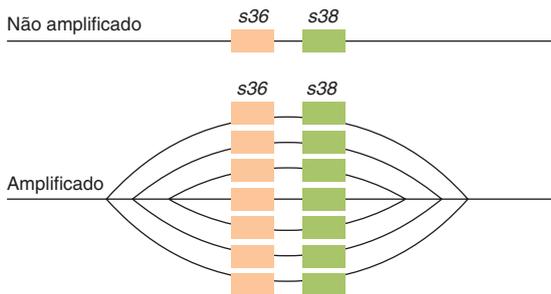


FIGURA 38-20 Representação esquemática da amplificação dos genes *s36* e *s38* das proteínas coriônicas. (Reproduzida, com permissão, de Chisholm R: Gene amplification during development. Trends Biochem Sci 1982;7:161. Copyright © 1982. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.)

quando promotores alternativos, sítios de união íntron-éxon ou sítios de poliadenilação são utilizados. Às vezes, ocorre a heterogeneidade no interior de uma célula, mas é mais comum o mesmo transcrito primário ser processado diferentemente em tecidos distintos. Alguns exemplos de cada um desses tipos de regulação são apresentados a seguir.

A utilização de **sítios de início de transcrição alternativos** resulta em um éxon 5' diferente em mRNAs codificando a amilase e a cadeia leve de miosina em camundongos, glicocinase em ratos e álcool-desidrogenase e actina em drosófilas. Os **sítios de poliadenilação alternativos** do transcrito primário da cadeia pesada de imunoglobulina μ resultam em mRNAs que podem ter 2.700 bases de comprimento (μ_m) ou 2.400 bases de comprimento (μ_s). Isso resulta em uma região carboxiterminal diferente das proteínas codificadas, de forma que a proteína μ_m permanece ligada à membrana do linfócito B, e a imunoglobulina μ_s é secretada. O **splicing** e o **processamento alternativos** resultam na formação de sete mRNAs únicos de α -tropomiosina em sete tecidos diferentes. Não está claro como essas decisões de **splicing** e processamento são feitas ou se essas etapas podem ser reguladas.

A regulação da estabilidade do RNA mensageiro fornece outro mecanismo de controle

Embora a maioria dos mRNAs em células de mamíferos seja muito estável (meias-vidas medidas em horas), alguns são repostos muito rapidamente (meias-vidas de 10 a 30 minutos). Em certos casos, a estabilidade do mRNA está sujeita à regulação. Isso tem importantes implicações, uma vez que há geralmente uma relação direta entre a quantidade de mRNA e a tradução deste mRNA em sua proteína cognata. Mudanças na estabilidade de um mRNA específico podem, portanto, ter efeitos importantes em processos biológicos.

Os RNAs mensageiros existem no citoplasma como **partículas de ribonucleoproteínas (RNPs)**. Algumas dessas proteínas protegem o mRNA da digestão por nucleases, e outras podem, sob certas condições, promover o ataque de nucleases. Acredita-se que os mRNAs sejam estabilizados ou desestabilizados pela interação de proteínas com essas várias estruturas

ou sequências. Certos efetores, tais como hormônios, podem regular a estabilidade do mRNA aumentando ou diminuindo a quantidade dessas proteínas.

As extremidades das moléculas de mRNA parecem estar envolvidas na estabilidade do mRNA (**Figura 38-21**). A estrutura do cap 5' no mRNA de eucariotos impede o ataque de exonucleases 5', e a cauda poli(A) evita a ação de exonucleases 3'. Em moléculas de mRNA com essas estruturas, presume-se que um único corte endonucleolítico permita que as exonucleases ataquem e façam a digestão da molécula inteira. Outras estruturas (sequências) na região não traduzida 5' (5' UTR), na região codificadora e na 3' UTR promovem ou impedem essa ação endonucleolítica inicial (Figura 38-21). Alguns exemplos ilustrativos serão citados.

A deleção da 5' UTR resulta em um prolongamento de três a cinco vezes da meia-vida do mRNA do *c-myc*. O encurtamento da região codificadora do mRNA de histona resulta em meia-vida prolongada. Uma forma de autorregulação da estabilidade do mRNA envolve a região codificadora indiretamente. A tubulina livre liga-se aos primeiros quatro aminoácidos de uma cadeia nascente de tubulina assim que ela emerge do ribossomo. Isso parece ativar uma RNase associada ao ribossomo que, então, digere o mRNA da tubulina.

As estruturas na extremidade 3', incluindo a cauda poli(A), estimulam ou diminuem a estabilidade de mRNAs específicos. A ausência de uma cauda poli(A) está associada a uma rápida degradação do mRNA, e a remoção de poli(A) de alguns RNAs resulta em sua desestabilização. Os mRNAs de histonas não possuem a cauda poli(A), mas têm uma sequência próxima ao terminal 3' que pode formar uma estrutura em grampo, e isso parece conferir resistência ao ataque exonucleolítico. O mRNA de histona H4, por exemplo, é degradado na direção 3'-5', mas apenas após ocorrer um único corte endonucleolítico cerca de nove nucleotídeos de distância da extremidade 3' na região da estrutura em grampo putativa. As estruturas em grampo na sequência não codificadora 3' também são críticas para a regulação, pelo ferro, do mRNA que codifica o receptor de transferrina. As estruturas em grampo também estão associadas à estabilidade do mRNA em bactérias, sugerindo que esse mecanismo possa ser comumente empregado.

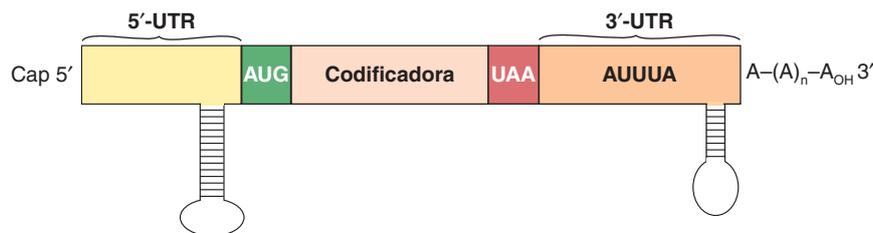


FIGURA 38-21 Estrutura de um mRNA eucariótico típico mostrando elementos que estão envolvidos na regulação da estabilidade do mRNA. O mRNA típico de eucariotos apresenta uma sequência não codificadora (NCS) 5', ou uma região exônica não traduzida (5' UTR), uma região codificadora e uma região NCS não traduzida exônica 3' (3' UTR). Essencialmente todos os mRNAs apresentam capeamento na extremidade 5', e a maioria apresenta uma sequência poliadenilada de 100 a 200 nt em sua extremidade 3'. O cap 5' e a cauda poli(A) 3' protegem o mRNA contra o ataque de exonucleases e estão ligadas a proteínas específicas que interagem para facilitar a tradução (ver Figura 37-7). Estruturas de alça em grampo na NCS 5' e 3', e a região rica em AU na NCS 3' representam os sítios de ligação para proteínas específicas que modulam a estabilidade do mRNA.

Outras sequências nas extremidades 3' de alguns mRNAs de eucariotos parecem estar envolvidas na desestabilização dessas moléculas. Algumas delas são mediadas pela ação de miRNAs específicos, como discutido. Além disso, particularmente interessantes são as regiões ricas em AU, e muitas delas contêm a sequência AUUUA. Essa sequência aparece em mRNAs que têm meia-vida muito curta, incluindo alguns oncogenes codificadores de proteínas e citocinas. A importância dessa região é destacada por um experimento em que uma sequência correspondente à 3' UTR do mRNA do fator estimulante de colônias (CSF) de meia-vida curta, que contém o motivo AUUUA, foi adicionada à terminação 3' do mRNA da β -globina. Em vez de se tornar muito estável, esse mRNA híbrido de β -globina agora tinha a meia-vida curta característica do mRNA do CSF. A maior parte desse metabolismo do mRNA provavelmente ocorre em corpos P citoplasmáticos.

A partir dos poucos exemplos citados, fica evidente que vários mecanismos são utilizados para regular a estabilidade do mRNA e, portanto, funcionam – assim como vários mecanismos são usados para regular a síntese de mRNA. A regulação coordenada desses dois processos confere uma extraordinária adaptabilidade à célula.

RESUMO

- As constituições genéticas das células somáticas de metazoários são quase todas idênticas.
- O fenótipo (especificidade de tecidos ou células) é determinado por diferenças na expressão gênica do complemento celular dos genes.
- Alterações na expressão gênica permitem que uma célula se adapte às mudanças ambientais, aos estímulos de desenvolvimento e a sinais fisiológicos.
- A expressão gênica pode ser controlada em níveis múltiplos por mudanças na transcrição, no processamento de RNA, na localização e na estabilidade ou utilização. A amplificação gênica e os rearranjos também influenciam a expressão gênica.
- Controles de transcrição operam no nível das interações proteína-DNA e proteína-proteína. Essas interações apresentam modularidade do domínio proteico e alta especificidade.
- Várias classes diferentes de domínios de ligação ao DNA foram identificadas em fatores de transcrição.
- Modificações da cromatina e do DNA contribuem de modo importante para o controle da transcrição eucariótica, modulando a acessibilidade do DNA e especificando o recrutamento de coativadores e correpressores específicos para os genes-alvo.
- Vários mecanismos epigenéticos para o controle gênico foram descritos, e os mecanismos moleculares pelos quais esses processos operam estão sendo elucidados no nível molecular.
- Os ncRNAs modulam a expressão gênica. Os miRNAs e siRNAs curtos modulam a tradução e a estabilidade do mRNA; esses mecanismos complementam os controles de transcrição para regular a expressão gênica.

REFERÊNCIAS

- Bonasio R, Tu S, Reinberg D: Molecular signals of epigenetic states. *Science* 2010;330:612–616.
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R: Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 2013;14:496–506.
- Geisler S, Coller J: RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:699–712.
- Hsin JB, Manley JL: The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* 2012;26:2119–2137.
- Ishihama A: Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88:485–508.
- Jacob F, Monod J: Genetic regulatory mechanisms in protein synthesis. *J Mol Biol* 1961;3:318–356.
- Klug A: The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 2010;79:213–231.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ: Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:153–165.
- Lemon B, Tjian R: Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 2000;14:2551–2569.
- Margueron R, Reinberg D: The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 2011;469:343–349.
- Nabel CS, Kohli RM: Demystifying DNA demethylation. *Science* 2011;333:1229–1230.
- Ørom UA, Shiekhattar R: Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell* 2013;154:1190–1193.
- Pawlicki JM, Steitz JA: Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol* 2010;20:52–61.
- Ptashne M: *A Genetic Switch*, 2nd ed. Cell Press and Blackwell Scientific Publications, 1992.
- Pugh BF: A preoccupied position on nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:923.
- Roeder RG: Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* 2005;579:909–915.
- Schleif RF: Modulation of DNA binding by gene-specific transcription factors. *Biochemistry* 2013;52:6755–6765.
- Small EM, Olson EN: Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011;469:336–342.
- Weingarten-Gabbay S, Segal E: The grammar of transcriptional regulation. *Human Genetics* 2014;133:701–711.
- Zhang Z, Pugh BF: High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell* 2011;144:175–186.

Genética molecular, DNA recombinante e tecnologia genômica

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os procedimentos básicos e os métodos envolvidos na tecnologia do DNA recombinante e na engenharia genética.
- Reconhecer a base lógica contida nos métodos utilizados para sintetizar, analisar e sequenciar o DNA e o RNA.
- Explicar como identificar e quantificar proteínas individuais, tanto solúveis quanto insolúveis (i.e., ligadas à membrana ou compartimentalizadas intracelularmente), bem como as proteínas ligadas a sequências específicas do DNA e do RNA genômicos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA*

O desenvolvimento do DNA recombinante, dos microarranjos de DNA de alta densidade, dos rastreamentos de alto rendimento, das análises em escala genômica de baixo custo, do sequenciamento de DNA e de outras metodologias de genética molecular revolucionou a biologia e tem apresentado impacto crescente na medicina clínica. Embora se tenha aprendido muito sobre as doenças genéticas humanas por meio da análise genealógica e do estudo das proteínas afetadas, essas abordagens não podem ser utilizadas em muitos casos em que o defeito genético é desconhecido. As novas tecnologias contornam essas limitações, buscando informações diretamente nas moléculas de DNA e RNA celulares. A manipulação de uma sequência de DNA e a construção de moléculas quiméricas – a chamada engenharia genética – proporcionam meios de estudo sobre o funcionamento de um segmento específico de DNA. Novas ferramentas bioquímicas e de genética molecular permitem que os pesquisadores possam consultar e manipular sequências genômicas, bem como examinar todo o complemento do RNA celular, a proteína e o estado de PTM da proteína no nível molecular.

A compreensão da tecnologia de genética molecular é importante por várias razões. (1) Ela oferece uma abordagem racional para a compreensão das bases moleculares das doenças. Por exemplo, a hipercolesterolemia familiar, a doença falciforme, as talassemias, a fibrose cística, a distrofia muscular, bem como doenças multifatoriais mais complexas, como as doenças cardíacas e vasculares, a doença de Alzheimer, o câncer, a obesidade e o diabetes. (2) Proteínas humanas podem ser produzidas em grande quantidade para terapia (p. ex., insulina, hormônio do crescimento, ativador do plasminogênio tecidual).

(3) Proteínas para vacinas (p. ex., hepatite B) e para testes diagnósticos (p. ex., testes para Aids e Ebola) podem ser obtidas. (4) Essa tecnologia é utilizada para diagnosticar doenças existentes, assim como para prever o risco de desenvolvimento de uma determinada doença e a resposta individual à terapêutica farmacológica. (5) Técnicas especiais têm levado a avanços notáveis na medicina forense. (6) Podem ser desenvolvidas terapias gênicas para curar potencialmente doenças causadas por uma deficiência de um único gene, tais como a doença falciforme, as talassemias, a deficiência da adenosina desaminase e outras.

A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE ENVOLVE O ISOLAMENTO E A MANIPULAÇÃO DO DNA PARA FORMAR MOLÉCULAS QUIMÉRICAS

O isolamento e a manipulação do DNA, incluindo as junções término-terminais das sequências de várias fontes diferentes para formar moléculas quiméricas (p. ex., moléculas contendo sequências de DNA humano e de bactérias em uma sequência independente), constituem a essência da pesquisa sobre o DNA recombinante. Ela envolve várias técnicas e reagentes especiais.

Enzimas de restrição clivam cadeias de DNA em localizações específicas

Certas endonucleases – enzimas que cortam o DNA em sequências de DNA específicas no interior da molécula (em oposição às exonucleases, que digerem a partir das extremidades das moléculas de DNA) – são componentes importantes na

*Ver o glossário de termos, no fim deste capítulo.

pesquisa do DNA recombinante. Essas enzimas eram chamadas de **enzimas de restrição**, uma vez que a sua presença em uma determinada bactéria restringia o crescimento de determinados vírus bacterianos, chamados de bacteriófagos. As enzimas de restrição cortam o DNA de qualquer fonte em pequenos pedaços únicos em uma sequência específica – ao contrário da maioria das outras enzimas, substâncias químicas ou métodos físicos, que quebram o DNA aleatoriamente. Essas enzimas defensivas (foram descobertas centenas) protegem o DNA do hospedeiro bacteriano do genoma do DNA de organismos estranhos (principalmente fagos infecciosos), inativando especificamente o DNA do fago invasor por meio da digestão. O sistema interferon induzido por RNA viral (ver Capítulo 38; Figura 38-11) proporciona o mesmo tipo de defesa molecular contra vírus de RNA em células de mamíferos. Entretanto, as endonucleases de restrição estão presentes apenas em células que também possuem uma enzima associada que metila especificamente o sítio do DNA do hospedeiro, tornando-o um substrato inadequado para a digestão por aquela enzima de restrição especial. Assim, as **metilases de DNA sítio-específicas** e as enzimas de restrição, que têm como alvo exatamente os mesmos sítios, sempre existem em pares em uma bactéria.

As **enzimas de restrição são nomeadas considerando-se o nome da bactéria a partir da qual elas foram isoladas**. Por exemplo, *EcoRI* vem de *Escherichia coli*, e *BamHI*, de *Bacillus amyloliquefaciens* (Tabela 39-1). As primeiras três letras no nome das enzimas de restrição consistem na primeira letra do gênero (*E*) e nas duas primeiras letras da espécie (*co*). Elas podem ser seguidas por uma designação da cepa (*R*) e por um numeral romano (*I*), para indicar a ordem da descoberta (p. ex., *EcoRI* e *EcoRII*). Cada enzima reconhece e cliva uma sequência de DNA de dupla-fita específica, em geral, com 4 a 7 pb de comprimento. Essa clivagem do DNA resulta em **extremidades cegas** (p. ex., *HpaI*) ou **extremidades sobrepostas (adesivas ou coesivas)** (p. ex., *BamHI*) (Figura 39-1), dependendo do mecanismo utilizado pela enzima. As extremidades adesivas são particularmente úteis na construção de moléculas de DNA híbridas ou quiméricas (ver a seguir). Se os quatro nucleotídeos forem distribuídos aleatoriamente em uma determinada molécula de DNA, pode-se calcular a frequência com que uma determinada enzima clivará um comprimento de DNA. Para cada posição na molécula de DNA, há quatro possibilidades (A, C, G e T); portanto, uma enzima de restrição que reconhece a sequência de 4 pb cliva, em média, uma vez a cada 256 pb (4^4), ao passo que outra enzima que reconhece uma sequência de 6 pb cliva uma vez a cada 4.096 pb (4^6). Um determinado pedaço de DNA possui um arranjo linear característico de sítios para as várias enzimas determinado pela sequência linear de suas bases; portanto, um **mapa de restrição** pode ser construído. Quando o DNA é digerido por uma enzima particular, as extremidades de todos os fragmentos possuem a mesma sequência de DNA. Os fragmentos produzidos podem ser isolados por eletroforese em gel de agarose ou de poli-acrilamida (ver a discussão sobre *blotting* a seguir); essa etapa é essencial na clonagem do DNA, bem como em várias análises do DNA, e é uma utilização importante dessas enzimas.

Várias outras enzimas que agem no DNA e no RNA constituem uma parte importante da tecnologia do DNA recombinante. Muitas delas são referidas neste capítulo e nos próximos (Tabela 39-2).

TABELA 39-1 Endonucleases de restrição selecionadas e suas especificidades de sequência

Endonuclease	Sequência reconhecida Sítios de clivagem mostrados	Fonte bacteriana
<i>BamHI</i>	↓ GGATCC CCTACC ↑	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglII</i>	↓ AGATCT TCTAGA ↑	<i>Bacillus globigii</i>
<i>EcoRI</i>	↓ GAATTC CTTAAC ↑	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRII</i>	↓ CCTGG GGACC ↑	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>HindIII</i>	↓ AAGCTT TTCGAA ↑	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
<i>HhaI</i>	↓ GCGC CGCG ↑	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>HpaI</i>	↓ GTTAAC CAATTC ↑	<i>Haemophilus Parainfluenza</i>
<i>MstII</i>	↓ CCTnAGG GGAnTCC ↑	<i>Microcoleus</i> strain
<i>PstI</i>	↓ CTGCAG GACGTC ↑	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>TaqI</i>	↓ TCGA AGCT ↓	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

Abreviações: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. As setas mostram o sítio de clivagem; dependendo do sítio, as terminações da dupla-fita de DNA clivado resultante são denominadas terminações adesivas (*BamHI*) ou terminações cegas (*HpaI*). O comprimento da sequência de reconhecimento pode ser de 4 pb (*TaqI*), 5 pb (*EcoRII*), 6 pb (*EcoRI*), 7 pb (*MstII*) ou mais longo. Por convenção, eles são escritos na direção 5'-3' para a fita superior de cada sequência de reconhecimento, e a fita inferior é apresentada com a polaridade oposta (i.e., 3'-5'). A maioria das sequências de reconhecimento é formada por palíndromos (i.e., a sequência é a mesma lida em ambas as direções nas duas fitas). Um resíduo denominado n significa que qualquer nucleotídeo é permitido.

Enzimas de restrição, endonucleases, recombinases e DNA-ligasas são utilizadas para modificar e preparar moléculas quiméricas de DNA

A ligação de extremidades coesivas ou adesivas complementares de fragmentos de DNA é tecnicamente fácil, mas, com frequência, algumas técnicas especiais são necessárias para superar

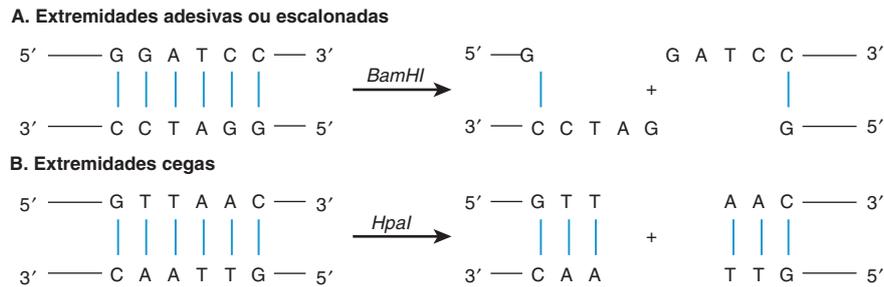


FIGURA 39-1 Resultados da digestão de endonuclease de restrição. A digestão com uma endonuclease de restrição pode resultar na formação de fragmentos de DNA com extremidades adesivas ou coesivas (**A**) ou extremidades cegas (**B**); esqueleto fosfodiéster, linhas pretas; ligações de hidrogênio entre as fitas entre bases purínicas e pirimidínicas, linhas azuis. Essa é uma importante consideração ao se desenvolverem estratégias de clonagem.

problemas inerentes a essa abordagem. Extremidades adesivas de um vetor podem se reconectar, com nenhum ganho final de DNA. Extremidades adesivas de fragmentos também se anelam, de modo que inserções heterogêneas em *tandem* se formam. Os sítios das extremidades adesivas também podem não estar disponíveis ou em uma posição conveniente. Para contornar esses problemas, pode ser utilizada uma enzima que produza extremidades cegas. As extremidades cegas podem ser ligadas diretamente; entretanto, a ligação não é direcional. Existem duas alternativas: extremidades novas são adicionadas utilizando-se a enzima transferase terminal, ou extremidades adesivas sintéticas são adicionadas. Se poli d(G) é adicionada à extremidade 3' do vetor e poli d(C) é adicionada à extremidade 3' do DNA estranho utilizando-se a transferase terminal,

as duas moléculas podem apenas anelar entre si, contornando, assim, os problemas recém-listados. Esse procedimento é chamado de formação da cauda de homopolímero. Como alternativa, os ligantes do oligonucleotídeo dúplice de extremidade cega sintéticos, contendo a sequência de reconhecimento para uma sequência de enzima de restrição conveniente, são ligados ao DNA de extremidade cega. A ligação direta da extremidade cega é realizada utilizando-se a enzima DNA-ligase do bacteriófago T4. Essa técnica, embora menos eficiente do que a ligação da extremidade adesiva, tem a vantagem de unir quaisquer pares de extremidades. Se as extremidades cegas ou os métodos de formação da cauda de homopolímero forem utilizados, não há maneira fácil de recuperar a inserção. Em vez disso, as extremidades coesivas adequadas podem ser

TABELA 39-2 Algumas das enzimas utilizadas na pesquisa com DNA recombinante

Enzima	Reação	Uso primário
Fosfatases	Desfosforila as extremidades 5' do RNA e do DNA	Remoção de grupos 5'-PO ₄ antes da marcação por cinase; também é utilizada para evitar a autoligação
DNA-ligase	Catalisa as ligações entre moléculas de DNA	União de moléculas de DNA
DNA-polimerase I	Sintetiza o DNA dupla-fita a partir de DNA de fita simples	Síntese do cDNA dupla-fita; tradução de cadeia com quebras; produção de terminações cegas a partir de terminações adesivas
DNA-polimerases termoestáveis	Sintetiza o DNA em temperaturas elevadas (60-80°C)	Reação em cadeia da polimerase (síntese de DNA)
DNase I	Em condições apropriadas, produz cortes em uma das fitas do DNA	Tradução de cadeia com quebras; mapeamento de sítios hipersensíveis; mapeamento das interações proteína-DNA
Exonuclease III	Remove nucleotídeos das terminações 3' do DNA	Sequenciamento do DNA; ChIP-exo, mapeamento das interações DNA-proteína
Exonuclease λ	Remove os nucleotídeos das extremidades 5' do DNA	Sequenciamento do DNA
Cinase polinucleotídeo	Transfere o fosfato terminal (posição γ) do ATP para grupos 5-OH do DNA ou do RNA	Marcação das extremidades ³² P do DNA ou do RNA
Transcriptase reversa	Sintetiza DNA a partir do molde de RNA	Síntese do cDNA a partir do mRNA; estudos de mapeamento do RNA (extremidade 5')
RNase H	Degrada a porção de RNA de um híbrido DNA-RNA	Síntese de cDNA a partir de mRNA
Nuclease S1	Degrada DNA de fita simples	Remoção do <i>hairpin</i> na síntese do cDNA; estudos de mapeamento do RNA (extremidades 5' e 3')
Transferase terminal	Adiciona nucleotídeos às extremidades 3' do DNA	Formação da cauda de homopolímero
Recombinases (CRE, INT, FLP)	Catalisam recombinações sítio-específicas entre moléculas de DNA contendo sequências-alvo homólogas	Produção de moléculas de DNA quiméricas específicas, atuando <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
CRISPER-Cas9	Nuclease direcionada por DNA tendo o RNA como alvo	Edição do genoma e modulação da expressão gênica

adicionadas pelo uso da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR; ver a seguir).

Como complemento para o uso das endonucleases de restrição, os cientistas começaram a utilizar as recombinases específicas de procariotos e eucariotos, tais como os sítios P lox bacterianos, que são reconhecidos pela recombinase CRE, o bacteriófago λ nos sítios reconhecidos pela proteína INT que codifica o fago λ ou os sítios FRT de leveduras reconhecidos pela recombinase Flp de leveduras. Esses sistemas de recombinases catalisam a incorporação específica de dois fragmentos de DNA, que possuem as sequências de reconhecimento adequadas e realizam a recombinação homóloga (ver Figura 35-9) entre os sítios de reconhecimento relevantes. Muito recentemente, um novo sistema regulador de edição de DNA/gene, chamado de CRISPR-Cas9 (repetições palindrômicas curtas dispersas agrupadas regularmente-CRISPR associadas ao gene 9) foi desenvolvido. O sistema CRISPR, encontrado em muitas bactérias, representa uma forma de imunidade adquirida a infecções de bacteriófagos, que complementam o sistema de endonucleases de restrição e as metilases descritas. O CRISPR utiliza alvos com base no RNA para levar a nuclease Cas9 até o DNA estranho (ou qualquer complementar). No interior da bactéria, esse complexo CRISPR-RNA-Cas9 degrada

e inativa o DNA-alvo. O sistema CRISPR foi adaptado para o uso em células eucarióticas, incluindo as células humanas. Variações no uso do CRISPR permitem deleção gênica, edição de genes e até mesmo a modulação da transcrição gênica. Assim, o CRISPR adicionou uma nova tecnologia interessante, muito eficiente e altamente específica ao conjunto de métodos para a análise genética de células de mamíferos. As semelhanças entre o CRISPR-Cas direcionado ao RNA e os métodos de inativação gênica e a repressão da expressão mediada por mi/siRNA em eucariotos superiores são notáveis.

A clonagem amplifica o DNA

Um **clone** é uma grande população de moléculas idênticas, bactérias ou células que surgem de um ancestral comum. A clonagem molecular permite a produção de um grande número de moléculas de DNA idênticas que podem ser caracterizadas ou utilizadas para outros propósitos. Essa técnica é baseada no fato de que as moléculas de DNA quiméricas ou híbridas podem ser construídas em **vetores de clonagem** – em geral, plasmídeos bacterianos, fagos ou cosmídeos – que continuam a se replicar em uma célula hospedeira a partir de seus próprios sistemas de controle. Desse modo, o DNA quimérico é amplificado. O procedimento geral é ilustrado na **Figura 39-2**.

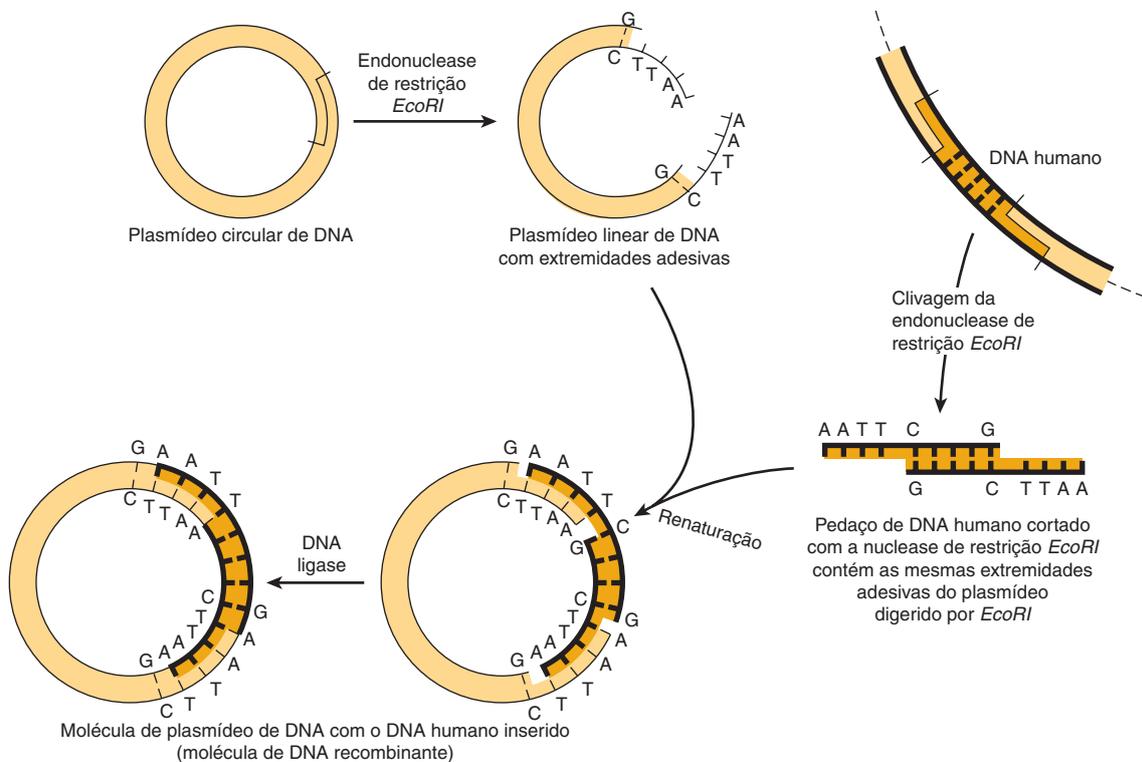


FIGURA 39-2 Uso de endonucleases de restrição para produzir novas moléculas de DNA recombinantes ou quiméricas. Quando inseridos de volta em uma célula bacteriana (pelo processo chamado de transformação mediada por DNA), em geral apenas um único plasmídeo é incorporado por uma única célula, e o plasmídeo de DNA replica não apenas a si, mas também o novo DNA inserido fisicamente ligado. Como a recombinação das extremidades adesivas, conforme indicado, normalmente regenera a mesma sequência de DNA reconhecida pela enzima de restrição original, a inserção de DNA clonado pode ser corretamente removido do círculo de plasmídeo recombinante com essa endonuclease. Se uma mistura de todos os pedaços de DNA criados pelo tratamento da totalidade do DNA humano com uma única nuclease de restrição for usada como fonte de DNA humano, podem ser obtidos cerca de 1 milhão de diferentes tipos de moléculas de DNA recombinante, cada uma delas pura em seu próprio clone bacteriano. (Modificada e reproduzida, com permissão, de Cohen SN: The manipulation of genes. Sci Am [July] 1975;233:25. Copyright © The Estate of Bunji Tagawa.)

Os **plasmídeos** bacterianos são moléculas de DNA dúplice pequenas e circulares cuja função natural é conferir resistência a antibióticos para a célula do hospedeiro. Os plasmídeos têm várias propriedades que os tornam extremamente úteis como vetores de clonagem. Eles existem como cópias únicas ou múltiplas no interior da bactéria e replicam de modo independente do DNA bacteriano como **epissomos** (i.e., um genoma acima ou fora do genoma bacteriano) enquanto utilizam principalmente o mecanismo de replicação do hospedeiro. A sequência completa do DNA de centenas a milhares de plasmídeos é conhecida; portanto, fica disponível a localização precisa dos sítios de clivagem da enzima de restrição para inserção do DNA estranho. Os plasmídeos são menores do que o cromossomo do hospedeiro e são, portanto, facilmente separados do último, e o DNA desejado inserido no plasmídeo pode ser facilmente removido clivando o plasmídeo com a enzima específica para o sítio de restrição no qual a peça original de DNA foi inserida.

Os **fagos** (**vírus bacterianos**) frequentemente possuem moléculas de DNA linear nos quais o DNA estranho pode ser inserido em vários sítios de enzimas de restrição. O DNA quimérico é coletado após o fago passar por seu ciclo lítico e produzir partículas de fago maduras e infectantes. A principal vantagem dos vetores de fagos é que enquanto os plasmídeos aceitam pedaços de DNA de até 10 kb de comprimento, os fagos podem rapidamente aceitar fragmentos de DNA de 10 a 20 kb de comprimento, uma limitação imposta pela quantidade de DNA que pode ser compactada na cabeça do fago durante a propagação do vírus.

Fragmentos maiores de DNA podem ser clonados em **cosmídeos**, que combinam as melhores características de plasmídeos e fagos. Os cosmídeos são plasmídeos que contêm as sequências de DNA, chamadas de **sítios cos**, necessárias para o acondicionamento do DNA lambda em uma partícula do fago. Esses vetores crescem sob a forma de plasmídeos na bactéria, mas uma vez que a maior parte do DNA lambda desnecessário foi removido, mais DNA quimérico pode ser acumulado na cabeça da partícula. Os cosmídeos podem transportar inserções de DNA quimérico de 35 a 50 kb de comprimento. Mesmo pedaços maiores do DNA podem ser incorporados ao cromossomo artificial bacteriano (**BAC**), ao cromossomo artificial de levedura (**YAC**) ou a vetores com base em P1 (**PAC**) do bacteriófago de *E. coli*. Esses vetores irão aceitar e propagar as inserções de DNA de várias centenas de quilobases ou mais, substituindo, em grande parte, os vetores de plasmídeos, de fagos e de cosmídeos para algumas aplicações de clonagem e mapeamento genético de eucariotos. Uma comparação desses vetores é mostrada na **Tabela 39-3**.

TABELA 39-3 Capacidades de clonagem de vetores de clonagem comuns

Vetor	Tamanho da inserção de DNA (kb)
Plasmídeo pUC19	0,01-10
Lambda charon 4A	10-20
Cosmídeos	35-50
BAC, P1	50-250
YAC	500-3.000

Como a inserção do DNA em uma região funcional do vetor interferirá na ação dessa região, deve-se tomar cuidado para não interromper uma função essencial desse vetor. Esse conceito pode ser explorado, no entanto, para proporcionar uma técnica de seleção poderosa duplo-positiva/negativa. Por exemplo, um vetor inicial de plasmídeo comum, **pBR322**, possui os genes de resistência para **tetraciclina (Tet)** e **ampicilina (Amp)**. Um único sítio da enzima de restrição *Pst*I no interior do gene de resistência Amp é comumente utilizado como sítio de inserção para um pedaço de DNA estranho. Além de possuir extremidades adesivas (Tabela 39-1 e Figura 39-1), o DNA inserido nesse sítio destrói o gene de resistência à ampicilina (*bla*) que codifica a β -lactamase, tornando a bactéria que possui esse plasmídeo sensível a Amp. Assim, as células que carregam o plasmídeo parental, que fornece a resistência a ambos os antibióticos, podem ser facilmente diferenciadas e separadas das células que carregam o plasmídeo quimérico, que é resistente apenas à tetraciclina (**Figura 39-3**). Os YACs contêm funções de seleção, de replicação e de segregação que funcionam tanto em células de bactérias quanto em células de leveduras e, portanto, podem ser propagadas em ambos os organismos.

Além dos vetores descritos na Tabela 39-3, que são desenhados principalmente para a propagação em células bacterianas, vetores para a propagação em células de mamíferos e para inserção do gene (cDNA)/expressão proteica também foram desenvolvidos. Esses vetores se baseiam em diversos vírus de eucariotos compostos por genomas de RNA ou DNA. Exemplos importantes desses **vetores virais** são os que utilizam genomas de **adenovírus (Ad)** ou **vírus associado ao adenovírus (AAV)** (com base em DNA) e de **retrovírus** (com base em RNA). Embora um pouco limitados quanto ao tamanho das sequências de DNA que podem ser inseridas, os **vetores de clonagem viral de mamíferos** compensam essa lacuna, pois, de maneira eficiente, infectarão uma grande variedade de tipos celulares diferentes. Por essa razão, vários vetores virais de mamíferos, alguns com genes de seleção positiva e negativa (“marcadores” de seleção *aka*), como observado para pBR322, estão em investigação para o uso em **terapia gênica** e são comumente utilizados em experimentos de laboratório.

Uma biblioteca é uma coleção de clones recombinantes

A combinação de enzimas de restrição e de vários vetores de clonagem permite que o genoma inteiro de um organismo seja acondicionado individualmente em um vetor. Uma coleção desses diferentes clones recombinantes é chamada de biblioteca. Uma **biblioteca genômica** é preparada a partir do DNA total de uma célula ou de um tecido. Uma **biblioteca de cDNA** compreende as cópias de DNA complementares da população de mRNAs em um tecido. As bibliotecas de DNA genômico são frequentemente preparadas pela realização da **digestão parcial do DNA total** com uma enzima de restrição que corta o DNA com frequência (p. ex., uma cortadora de quatro bases, como a *Taq*I). A ideia é gerar fragmentos bastante grandes para que a maioria dos genes fique intacta. Os vetores BAC, YAC e P1 são os preferidos, uma vez que podem aceitar fragmentos muito grandes de DNA e, assim, oferecer melhor chance de isolamento de um gene codificador de mRNA eucariótico intacto em um único fragmento de DNA.

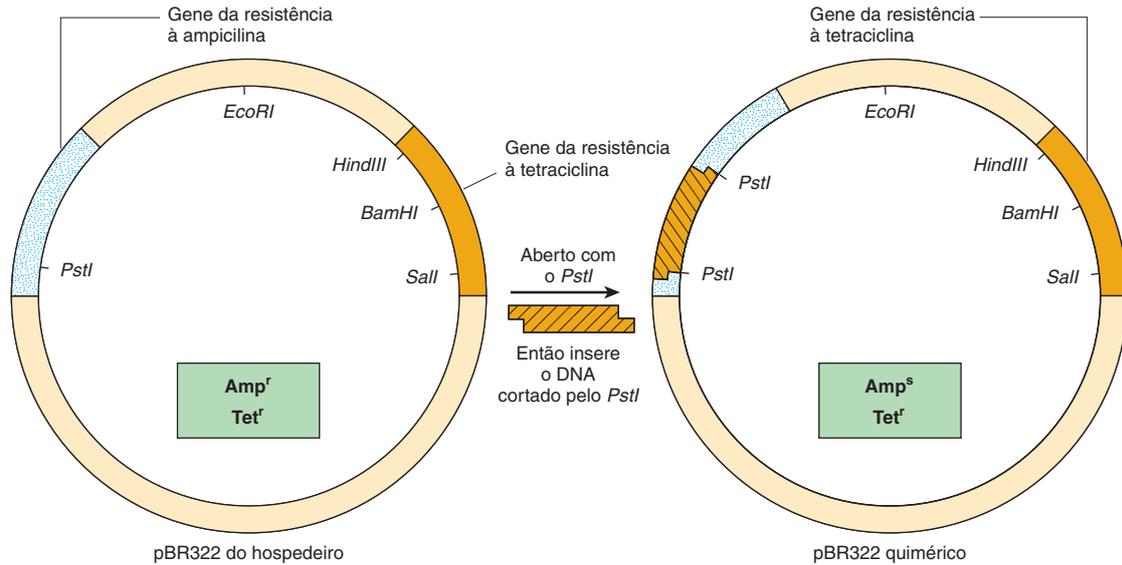


FIGURA 39-3 Um método para detectar recombinantes para os fragmentos de DNA inseridos. Usando o plasmídeo pBR322, um pedaço de DNA é inserido no sítio único *PstI*. Essa inserção destrói o gene que codifica uma proteína que fornece resistência à ampicilina para o hospedeiro bacteriano. Portanto, as células que possuem um plasmídeo quimérico não irão crescer/sobreviver muito mais tempo no meio líquido de cultura, ou em placa contendo esse antibiótico. A sensibilidade diferencial à tetraciclina e à ampicilina pode, portanto, ser usada para distinguir clones de plasmídeos que contenham uma inserção. Um esquema similar que depende da produção de uma fusão *in-frame* de um DNA recém-inserido, produzindo um fragmento de peptídeo capaz de complementar uma forma inativa, truncada e N-terminal da enzima β -galactosidase, um componente do óperon *lac* (Figura 38-2), permite a formação de colônias branco-azuladas nas placas de ágar contendo um corante hidrolisável pelo β -galactosídeo. As colônias β -galactosidase positivas são azuis; elas contêm plasmídeos nos quais um DNA foi inserido de forma bem sucedida.

Um vetor no qual a proteína codificada pelo gene introduzido pela tecnologia do DNA recombinante é, na verdade, sintetizada, é conhecido como **vetor de expressão**. Atualmente, esses vetores são usados, na maioria das vezes, para detectar moléculas de DNA específicas em bibliotecas e para produzir proteínas por meio de técnicas de engenharia genética. Esses vetores são especialmente construídos para conter promotores induzíveis muito ativos, códons de início adequados para tradução em fase, sinais de terminação de transcrição e tradução, e sinais de processamento de proteínas adequados, se necessário. Alguns vetores de expressão contêm até mesmo genes que codificam inibidores de protease, de modo que o rendimento final do produto é aumentado. Curiosamente, como o custo da síntese do DNA sintético caiu, muitos pesquisadores sintetizam um cDNA inteiro (gene) de interesse (em segmentos de 100 a 150 nt), incorporando as preferências de códons do hospedeiro utilizado para expressão, a fim de maximizar a produção de proteína. Novas técnicas eficazes na síntese do DNA sintético permitem hoje a síntese *de novo* de genes completos e até de genomas. Esses avanços inauguram novas e interessantes possibilidades na biologia sintética, mas, ao mesmo tempo, introduzem potenciais dilemas éticos.

Sondas pesquisam bibliotecas ou amostras complexas em busca de genes específicos ou moléculas de cDNA

Várias moléculas podem ser utilizadas como “sondas” em bibliotecas para pesquisar um gene específico ou uma molécula de cDNA ou para definir e quantificar o DNA ou RNA separados por eletroforese por meio de vários géis. As sondas são geralmente partes de DNA ou RNA marcadas com um

nucleotídeo que contém um ^{32}P – ou nucleotídeos marcados com fluorescência (mais utilizados atualmente). É importante observar que nenhuma modificação (^{32}P ou marcação com fluorescência) afeta as propriedades de hibridização das sondas resultantes de ácido nucleico. Para ser efetiva, a sonda deve reconhecer uma sequência complementar. Um cDNA sintetizado a partir de um mRNA específico (ou oligonucleotídeo sintético) pode ser utilizado para o rastreamento de um cDNA mais longo em uma biblioteca de cDNA ou em uma biblioteca genômica, para uma sequência complementar na região codificadora de um gene. As sondas de cDNA/oligonucleotídeo/cRNA são utilizadas para detectar fragmentos de DNA em transferências *Southern blot* e para detectar e quantificar o RNA em transferências *Northern blot* (ver a seguir).

Técnicas de transferência (*blotting*) e hibridização permitem a visualização de fragmentos específicos

A visualização de um fragmento de DNA ou RNA específico, entre as inúmeras moléculas “contaminantes” em uma amostra complexa, requer a convergência de várias técnicas, coletivamente chamadas de **transferência blotting**. A Figura 39-4 ilustra os procedimentos de transferência *Southern* (DNA), *Northern* (RNA) e *Western* (proteína) blot. (O primeiro foi nomeado a partir do nome da pessoa que inventou a técnica [Edward Southern], e os outros nomes começaram como jargões de laboratório e agora são termos aceitos.) Esses procedimentos são úteis para determinar quantas cópias de um gene estão em um determinado tecido ou se há quaisquer alterações em um gene (deleções, inserções ou rearranjos), uma vez que a etapa de eletroforese requisitada separa as moléculas com

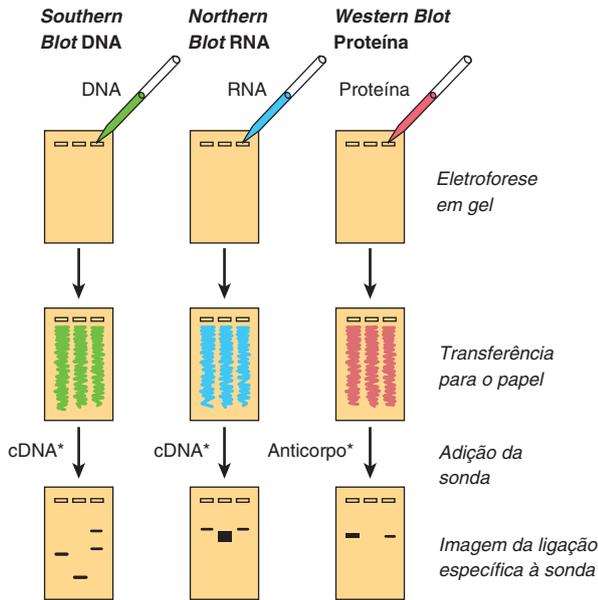


FIGURA 39-4 O procedimento de transferência blot. Em um *Southern blot*, ou transferência de DNA, o DNA isolado de uma linhagem celular ou de um tecido é digerido por uma ou mais enzimas de restrição. Essa mistura é pipetada em um reservatório em gel de agarose ou poliacrilamida e exposto a uma corrente elétrica direta. O DNA, carregado negativamente, migra na direção do ânodo; os fragmentos menores movem-se mais rapidamente. Após um tempo adequado, o DNA no interior do gel é desnaturado pela exposição a bases fracas, sendo transferido para nitrocelulose ou papel náilon, resultando em uma réplica exata do padrão no gel, pela técnica de transferência desenvolvida por Southern. O DNA é ligado ao papel pela exposição ao calor ou UV, e o papel é exposto à sonda marcada de cDNA, que hibridiza com fitas complementares no filtro. Após várias lavagens, o papel é exposto a um filme de raios X ou a uma tela de imagem, que é desenvolvida para revelar várias bandas específicas correspondentes aos fragmentos de DNA que foram reconhecidos (hibridizados para) pelas sequências na sonda de cDNA. O *Northern blot*, ou transferência de RNA, é conceitualmente semelhante. O RNA é submetido à eletroforese antes da transferência. Isso demanda algumas etapas diferentes daquelas da transferência de DNA, principalmente para garantir que o RNA permaneça intacto, e geralmente é um pouco mais difícil. No *Western blot*, ou transferência de proteína, as proteínas são submetidas à eletroforese e transferidas para o papel especial, que avidamente se liga a proteínas, e são marcadas com um anticorpo específico ou outra molécula sonda. (Os asteriscos significam sondas marcadas, por radioatividade ou fluorescência.) No caso do *Southwestern blotting* (ver texto; não mostrado), uma transferência de proteína semelhante àquela mostrada anteriormente como “*Western*” é exposta a ácidos nucleicos marcados, e os complexos de proteína-ácido nucleico que se formam são detectados por autoradiografia ou imagem.

base no tamanho. Ocasionalmente, se uma base específica for trocada e um sítio de restrição for alterado, esses procedimentos poderão detectar uma mutação pontual (i.e., Figura 39-9 a seguir). As técnicas de transferência *Northern* e *Western blot* são usadas para determinar o tamanho e a quantidade de RNA específico e de moléculas de proteínas, respectivamente. Uma quarta técnica de hibridização, o *Southwestern blot*, examina as interações proteína-DNA (não mostrada). Nesse método, as proteínas são separadas por eletroforese, removidas para uma membrana, renaturadas e analisadas em busca de interação

com uma sequência específica por meio da incubação com uma sonda especificamente marcada de ácido nucleico.

Todos os procedimentos de hibridização discutidos nesta seção dependem das propriedades específicas de pareamento de bases de fitas de ácidos nucleicos complementares descritas. Combinações perfeitas hibridizam rapidamente e resistem a altas temperaturas e/ou a tampões de baixa força iônica nas reações de hibridização e de lavagens. Combinações menos perfeitas não toleram as **condições rigorosas** (i.e., temperaturas elevadas e baixas concentrações de sais); assim, a hibridização pode nunca ocorrer ou ser interrompida durante a etapa de lavagem. Foram desenvolvidas condições de hibridização capazes de detectar uma única combinação errônea de pares de bases (pb) entre a sonda e o alvo.

Técnicas manuais e automatizadas estão disponíveis para determinar a sequência do DNA

Os segmentos de moléculas específicas de DNA obtidos por tecnologia do DNA recombinante podem ser analisados para determinar sua sequência de nucleotídeos. O sequenciamento do DNA depende da ocorrência de um grande número de moléculas de DNA idênticas. Essa necessidade pode ser satisfeita pela clonagem do fragmento de interesse, utilizando as técnicas descritas, ou utilizando métodos de PCR (ver a seguir). O **método enzimático manual de Sanger** utiliza didesoxinucleotídeos específicos que terminam a síntese da fita de DNA em nucleotídeos específicos à medida que a fita é sintetizada no molde de ácido nucleico purificado. As reações são ajustadas, de modo que uma população de fragmentos de DNA, que representam a terminação em cada nucleotídeo, é obtida. Com a incorporação de uma marcação radiativa no sítio de terminação, os fragmentos podem ser separados de acordo com o tamanho utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma autoradiografia é feita, e cada um dos fragmentos produz uma imagem (banda) no filme de raios X ou placa de imagem. As imagens são lidas para fornecer a sequência de DNA (Figura 39-5). As técnicas que não necessitam do uso de radioisótopos são empregadas no sequenciamento automatizado do DNA. A mais empregada é um procedimento automatizado em que quatro marcações fluorescentes diferentes – cada uma representando um nucleotídeo – são utilizadas. Cada uma emite um sinal específico após excitação por feixe de *laser* de um determinado comprimento de onda, que é medido por detectores sensíveis, e isso pode ser registrado em um computador. As máquinas de sequenciamento de DNA mais recentes utilizam nucleotídeos marcados com fluorescência, mas detectam a incorporação utilizando a microscopia óptica. Essas máquinas reduzem muito o custo do sequenciamento do DNA, mais de cem vezes. As reduções no custo inauguraram a era do sequenciamento do genoma personalizado. De fato, utilizando essa nova tecnologia, a sequência do genoma do codescobridor da dupla-hélice, James Watson, foi completamente determinada.

A síntese de oligonucleotídeos é agora rotineira

A síntese química automatizada de oligonucleotídeos moderadamente longos (cerca de 100 nucleotídeos) de sequência precisa

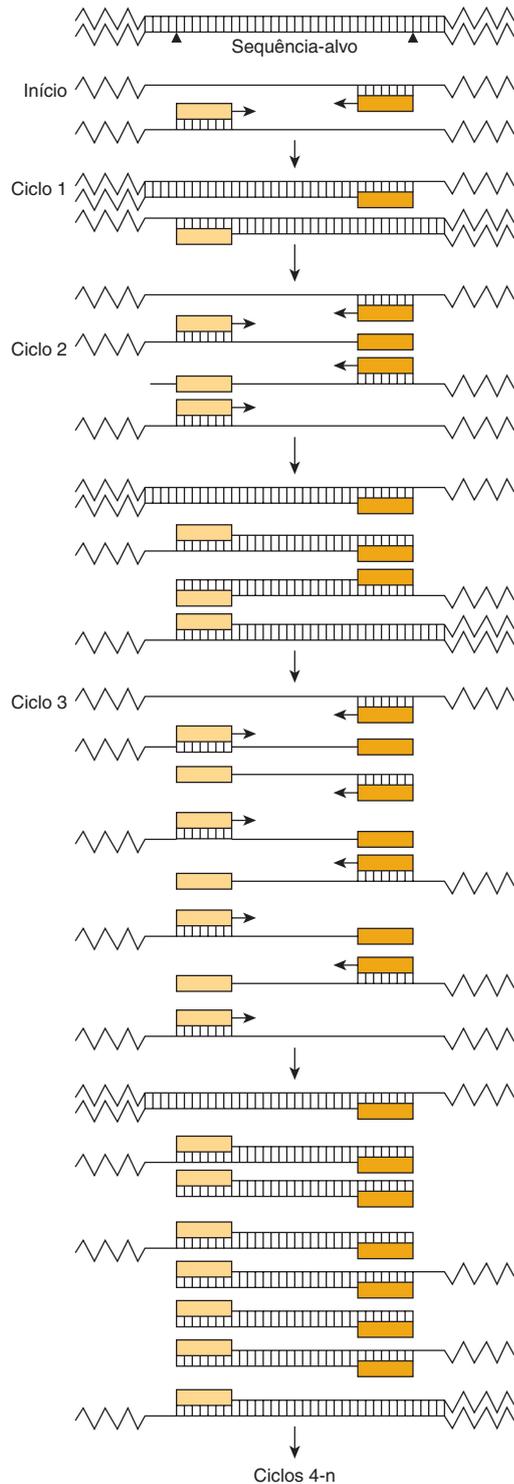


FIGURA 39-6 A reação em cadeia da polimerase é utilizada para amplificar as sequências gênicas específicas. O DNA de dupla-fita é aquecido para ser separado em suas fitas individuais. Essas fitas se ligam a dois *primers* distintos, que são direcionados a sequências específicas nas fitas opostas e que definem o segmento a ser amplificado. A DNA-polimerase estende os *primers* em cada direção e sintetiza duas fitas complementares às duas originais. Esse ciclo é repetido várias vezes, produzindo um produto amplificado de comprimento e sequência definidos. As quatro dXTPs e os dois *primers* estão presentes em excesso, de modo que não são limitantes para a polimerização/amplificação.

As sequências de DNA de apenas 50 a 100 pb e com até 10 kb de comprimento podem ser amplificadas por PCR. Vinte ciclos fornecem uma amplificação de 10^6 (i.e., 2^{20}) e 30 ciclos, 10^9 (2^{30}). Cada ciclo leva £ 5 a 10 minutos, de modo que mesmo moléculas grandes de DNA podem ser amplificadas rapidamente. A PCR permite que o DNA de uma única célula, folículo piloso ou espermatozoide possa ser amplificado e analisado. Assim, as aplicações da PCR para a medicina forense são óbvias. A PCR também é utilizada (1) para detectar agentes infecciosos, sobretudo vírus latentes; (2) para fazer diagnósticos genéticos pré-natais; (3) para detectar polimorfismos alélicos; (4) para estabelecer tipos de tecidos precisos para transplantes; e (5) para estudar a evolução, utilizando o DNA de amostras arqueológicas (6) para análises quantitativas do RNA após copiar o RNA e quantificar o mRNA, pelo método chamado de RT-PCR (cópias de cDNA de mRNA gerado por uma transcriptase reversa retroviral) ou (7) para registrar a ocupação *in vivo* do DNA-proteína, utilizando ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ver a seguir). Novas utilizações para a PCR são desenvolvidas a cada ano.

AS APLICAÇÕES PRÁTICAS DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE SÃO NUMEROSAS

O isolamento de um gene específico codificador de mRNA (cerca de 1.000 pb) a partir de um genoma inteiro exige uma técnica que irá discriminar uma parte em 1 milhão. A identificação de uma região reguladora, que pode ter apenas 10 pb de comprimento, exige sensibilidade de uma parte em 3×10^8 ; uma doença como a anemia falciforme é causada por uma única mudança de base, ou uma parte em 3×10^9 . A tecnologia do DNA é suficientemente poderosa para realizar todas essas atividades.

O mapeamento genético localiza genes específicos em cromossomos distintos

A localização do gene pode definir um mapa do genoma humano e pode gerar informações úteis na definição de doenças humanas. A hibridização de células somáticas e a hibridização *in situ* são duas técnicas utilizadas para cumprir esse objetivo. Na **hibridização *in situ***, o procedimento mais simples e direto, uma sonda radiativa é adicionada a uma dispersão de cromossomos em metáfase sobre uma lâmina de vidro. A área exata da hibridização é localizada por emulsão fotográfica de camadas sobre a lâmina e, após exposição, pelo alinhamento dos grânulos com alguma identificação histológica do cromossomo. A **hibridização por fluorescência *in situ* (FISH)**, que utiliza sondas com marcação fluorescente, em vez de radioativa, é uma técnica muito sensível, também utilizada para esse propósito. Isso frequentemente coloca o gene em um local de uma determinada banda ou região do cromossomo. Alguns dos genes humanos localizados pelo uso dessas técnicas são listados na **Tabela 39-4**. Essa tabela representa apenas uma amostra dos genes mapeados a partir de dezenas de milhares de genes que foram mapeados como resultado do sequenciamento recente do genoma humano. Uma vez localizado o defeito em uma região do DNA que tem a estrutura característica de um gene, uma cópia de cDNA sintético do gene pode ser construída,

TABELA 39-4 Localização dos genes humanos^a

Gene	Cromossomo	Doença
Insulina	11p15	Diabetes
Prolactina	6p23-q12	Síndrome de Sheehan
Hormônio do crescimento	17q21-qter	Deficiência do hormônio do crescimento
α -Globina	16p12-pter	α -Talassemia
β -Globina	11p12	β -Talassemia, células falciformes
Adenosina-desaminase	20q13-qter	Deficiência de adenosina-desaminase
Fenilalanina-hidroxilase	12q24	Fenilcetonúria
Hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase	Xq26-q27	Síndrome de Lesch-Nyhan
Segmento de DNA G8	4p	Coreia de Huntington

^aEsta tabela indica a localização cromossômica de vários genes e as doenças associadas à produção deficiente ou anormal de produtos gênicos. O cromossomo envolvido está indicado pelo primeiro número ou letra. Os outros números e letras referem-se a localizações precisas, como definido em McKusick VA: *Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes*. Copyright © 1983 Johns Hopkins University Press. Reimpressa, com permissão, de Johns Hopkins University Press.

contendo apenas éxons codificadores de mRNA, e expressa em um vetor adequado, e sua função pode ser avaliada – ou o peptídeo putativo, deduzido da fase de leitura aberta na região codificadora, pode ser sintetizado. Os anticorpos direcionados contra essa proteína ou fragmentos de peptídeos derivados podem ser utilizados para avaliar se pessoas saudáveis expressam essa proteína e se ela está ausente, ou alterada nas pessoas com síndromes genéticas.

As proteínas podem ser produzidas para pesquisas, diagnósticos e fins comerciais

Um objetivo prático da pesquisa do DNA recombinante é a produção de materiais para aplicações biomédicas. Essa tecnologia tem dois méritos distintos: (1) ela pode fornecer grandes quantidades de material que não poderia ser obtido por métodos de purificação convencional (p. ex., interferon, fator ativador do plasminogênio tecidual, etc.); e (2) ela pode fornecer material humano (p. ex., insulina e hormônio do crescimento). Em ambos os casos, as vantagens são óbvias. Embora o objetivo principal seja o fornecimento de produtos – em geral, proteínas – para tratamento (insulina) e diagnóstico (teste da Aids) de doenças humanas e de outros animais e para a prevenção de doenças (vacina para hepatite B), há outras aplicações comerciais potenciais, sobretudo na agricultura. Um exemplo desta última é a tentativa para desenvolver plantas mais resistentes à seca ou a temperaturas extremas, mais eficientes na fixação do nitrogênio, ou que produzam sementes contendo o complemento completo de aminoácidos essenciais (arroz, trigo, milho, etc.).

A tecnologia do DNA recombinante é utilizada na análise molecular de doenças

Variações do gene normal

Há uma variação normal da sequência do DNA, como acontece com aspectos mais óbvios da estrutura humana. Variações

da sequência de DNA, os **polimorfismos**, ocorrem aproximadamente uma vez a cada 500 a 1.000 nucleotídeos. Uma comparação recente da sequência de nucleotídeos do genoma de James Watson, o codescobridor da estrutura do DNA, identificou cerca de 3.300.000 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em relação ao “padrão” do genoma humano de referência inicialmente sequenciado. Curiosamente, mais de 80% dos SNPs encontrados no DNA de Watson já foram identificados em outros indivíduos. Há também deleções genômicas e inserções de DNA (i.e., **variações no número de cópias [CNVs]**), bem como substituições de uma única base. Em pessoas saudáveis, essas alterações obviamente ocorrem em regiões não codificadoras do DNA ou em locais que não causam mudança na função da proteína codificada. Esse polimorfismo hereditário da estrutura do DNA pode estar associado a certas doenças no interior de uma grande linhagem, podendo ser utilizado para pesquisar o gene envolvido específico, como ilustrado adiante. Ele também pode ser usado em várias aplicações na medicina forense.

Variações gênicas que provocam doenças

A genética clássica ensinou que a maioria das doenças genéticas era devida a mutações pontuais que resultavam em uma proteína alterada. Isso ainda pode ser verdade, mas se na leitura de capítulos anteriores fosse indicado que a doença genética poderia resultar de um problema de qualquer uma das etapas principais, da replicação até a transcrição, para o transporte/processamento do RNA e síntese proteica, PTMs e/ou localização subcelular e estado físico (i.e., agregação e polimerização), deveria ter sido feita uma avaliação adequada. Esse ponto é novamente bem ilustrado pelo exemplo do gene da β -globina. Esse gene está localizado em um agrupamento no cromossomo 11 (Figura 39-7), e uma versão expandida dele é ilustrada na Figura 39-8. A produção defeituosa da β -globina resulta em várias doenças e deve-se a muitas lesões diferentes no (e em volta) gene da β -globina (Tabela 39-5).

Mutações pontuais

O exemplo clássico é a **doença falciforme**, que é causada por uma mutação de uma única base de um total de 3×10^9 no genoma, uma substituição de T por A no DNA, que, por sua vez, resulta em uma mudança de A para U no mRNA correspondente ao sexto códon do gene da β -globina. O códon alterado especifica um aminoácido diferente (valina no lugar de ácido glutâmico) e isso leva a uma anormalidade estrutural da molécula de β -globina, provocando a agregação da hemoglobina e o “afoçamento” das hemácias. Outras mutações pontuais no e em volta do gene da β -globina resultam na diminuição ou, em alguns casos, na ausência de produção de β -globina; a β -talassemia é o resultado dessas mutações. (As talassemias são caracterizadas por defeitos na síntese de subunidades da hemoglobina e, portanto, a β -talassemia resulta da insuficiência da produção da β -globina.) A Figura 39-8 ilustra as mutações pontuais que afetam cada um dos muitos processos envolvidos na geração de um mRNA normal (e, portanto, uma proteína normal) que foram implicadas como causa de β -talassemia.

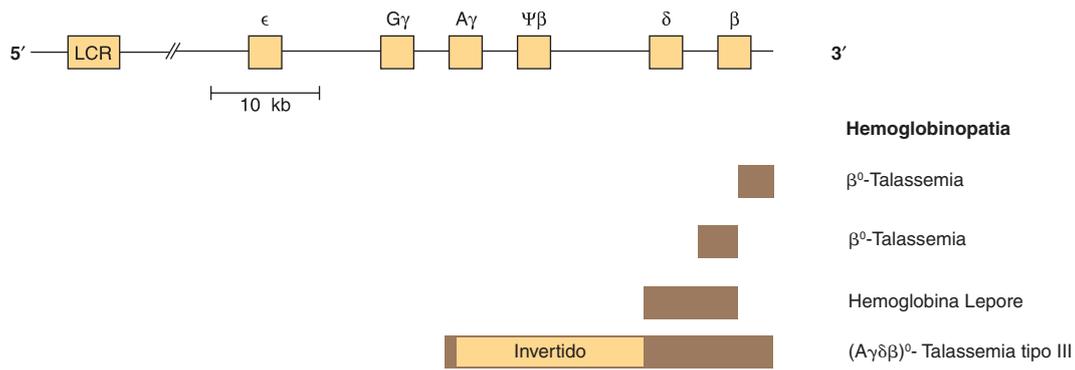


FIGURA 39-7 Representação esquemática do agrupamento do gene da β -globina e das lesões em alguns distúrbios genéticos. O gene da β -globina está localizado no cromossomo 11 em associação estreita com os dois genes da γ -globina e com o gene da δ -globina. A família do gene β é disposta na ordem 5'- ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - δ - β -3'. O locus ϵ é expresso no início da vida embrionária (como $\alpha_2\epsilon_2$). Os genes γ são expressos na vida fetal, formando a hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). A hemoglobina adulta consiste em HbA ($\alpha_2\beta_2$) ou HbA2 ($\alpha_2\delta_2$). O $\Psi\beta$ é um pseudogene que tem homologia de sequência com β , mas contém mutações que impedem a sua expressão. Uma região de controle do locus (LCR), um intensificador poderoso localizado a montante (5') do gene, controla a taxa de transcrição de todo o agrupamento do gene da β -globina. Deleções (barras sólidas escuras, parte inferior) no locus β provocam a β -talassemia (deficiência ou ausência [β^0] de β -globina). A recombinação meiótica entre δ e β leva à hemoglobina Lepore e resulta na deleção no DNA e fusões na sequência que codifica δ - β , reduzindo os níveis de HbB (ver Figuras 6-7 e 35-10). Uma inversão ($A\gamma\delta\beta$)⁰ nessa região (barra maior) interrompe o funcionamento do gene e também resulta em talassemia (tipo III). Cada tipo de talassemia tende a ser encontrada em determinado grupo de pessoas, por exemplo, a inversão da deleção ($A\gamma\delta\beta$)⁰ ocorre em indivíduos provenientes da Índia. A maioria das deleções nessa região foi mapeada, e cada uma delas causa um tipo de talassemia.

Deleções, inserções e rearranjos do DNA

Estudos em bactérias, vírus, leveduras, moscas-da-fruta e, agora, em seres humanos mostraram que pedaços do DNA podem se mover de um lugar para outro no interior do genoma. A deleção de uma parte crítica de DNA, o rearranjo do DNA no interior do gene ou a inserção ou amplificação de uma parte de DNA no interior de uma região codificadora ou reguladora podem causar mudanças na expressão do gene, resultando em doença. Novamente, uma análise molecular de talassemias produz vários exemplos desses processos – sobretudo deleções – como causas de doenças (Figura 39-7). Os agrupamentos de genes da globina parecem particularmente propensos a essa lesão. As deleções no agrupamento da α -globina, localizado no cromossomo 16, causa a α -talassemia. Há forte associação étnica para muitas dessas deleções, de modo que os norte-europeus, os filipinos, os negros e os povos mediterrâneos apresentam diferentes lesões, todas resultando na ausência da hemoglobina A e na α -talassemia.

TABELA 39-5 Alterações estruturais do gene da β -globina

Alteração	Função afetada	Doença
Mutações pontuais	Dobramento de proteínas	Anemia falciforme
	Controle transcricional	β -Talassemia
	Mutações de mudança de fase e sem sentido	β -Talassemia
	Processamento do RNA	β -Talassemia
Deleção	Produção do mRNA	β^0 -Talassemia
		Hemoglobina Lepore
Rearranjo	Produção do mRNA	β -Talassemia tipo III

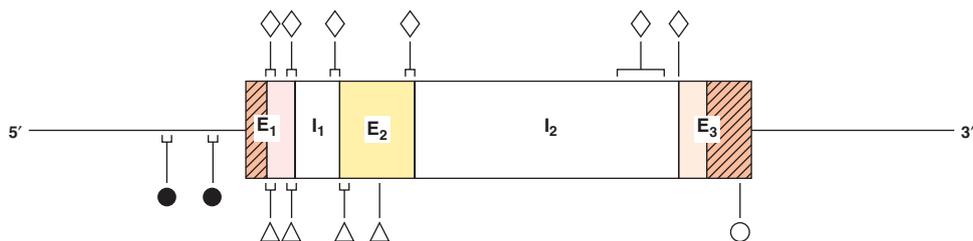
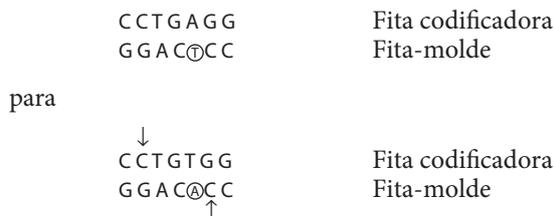


FIGURA 39-8 Mutações no gene da β -globina causando β -talassemia. O gene da β -globina é mostrado na orientação 5'-3'. As áreas hachuradas indicam as regiões não traduzidas 5' e 3'. Lendo na direção 5'-3', as áreas sombreadas são éxons 1 a 3 (E_1 , E_2 , E_3), e os espaços claros são íntrons 1 (I_1) e 2 (I_2). Mutações que afetam o controle da transcrição (●) estão localizadas na região flanqueadora 5' do DNA. Exemplos de mutações sem sentido (Δ), mutações no processamento do RNA (\diamond) e mutações de clivagem do RNA (\circ) foram identificadas e são indicadas. Em algumas regiões, várias mutações distintas foram encontradas. Elas são indicadas pelo tamanho e pela localização dos colchetes.

Uma análise semelhante poderia ser feita para várias outras doenças. As mutações pontuais são geralmente definidas pelo sequenciamento do gene em questão, embora, às vezes, se a mutação destruir ou criar um sítio de enzima de restrição, a técnica de análise do fragmento de restrição poderá ser utilizada para apontar com precisão essa lesão. As deleções ou inserções do DNA maiores do que 50 pb podem, com frequência, ser detectadas por procedimento de *Southern blotting*, ao passo que os ensaios com base em PCR podem detectar mudanças muito menores na estrutura do DNA.

Análise da genealogia

A doença falciforme novamente fornece um excelente exemplo de como a tecnologia do DNA recombinante pode ser aplicada para o estudo da doença humana. A substituição de T por A na fita-molde do DNA no gene da β-globina altera a sequência na região que corresponde ao sexto códon a partir de



destrói um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição + *MstII* (CCTNAGG; mostrado por pequenas setas verticais; Tabela 39-1).

Outros sítios de *MstII* 5' e 3' a partir desse sítio (Figura 39-9) não são afetados e, portanto, serão cortados. Assim, a incubação do DNA de indivíduos saudáveis (AA), heterozigotos (AS) e homozigotos (SS) resulta em três padrões diferentes na transferência *Southern blot* (Figura 39-9). Isso mostra como uma genealogia de DNA pode ser estabelecida utilizando os

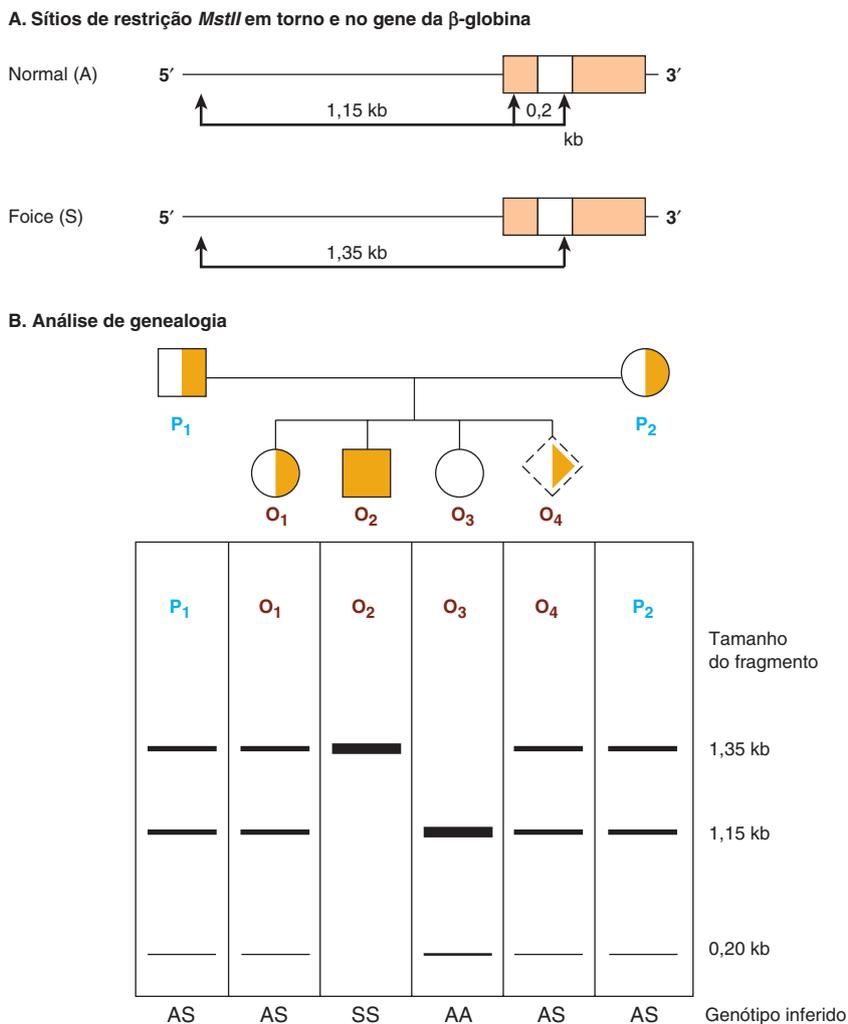


FIGURA 39-9 Análise de genealogia da doença falciforme. A parte superior da figura (A) mostra a primeira parte do gene da β-globina e os sítios da enzima de restrição *MstII* nos genes da β-globina normal (A) e falciforme (S). A digestão com a enzima de restrição *MstII* resulta em fragmentos de DNA de 1,15 kb e 0,2 kb de comprimento em indivíduos saudáveis. A mudança de T para A em indivíduos com doença falciforme elimina um dos três sítios de *MstII* em torno do gene da β-globina; portanto, um único fragmento de restrição de 1,35 kb de comprimento é gerado em resposta a *MstII*. Essa diferença de tamanho é facilmente detectada em um *Southern blot*. (B) A análise de genealogia mostra três possibilidades: AA, normal (círculo aberto); AS, heterozigoto (círculos meio sólidos, quadrado meio sólido); SS, homozigoto (quadrado sólido). Essa abordagem permite o diagnóstico pré-natal da doença falciforme (quadrado com contorno tracejado). Ver texto.

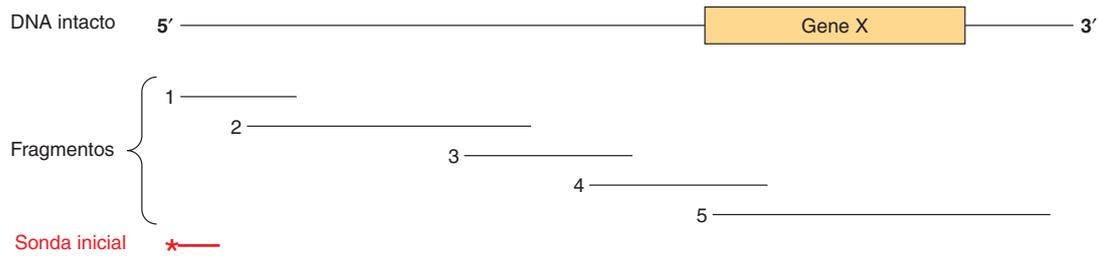


FIGURA 39-10 A técnica do *chromosome walking*. O gene X deve ser isolado de um grande pedaço de DNA. A localização exata desse gene não é conhecida, mas uma sonda (*—) direcionada contra um fragmento de DNA (mostrado na extremidade 5' nesta representação) está disponível, bem como uma biblioteca de clones contendo uma série de fragmentos de inserção de DNA sobrepostos. Para simplificação, apenas cinco desses são apresentados. A sonda inicial hibridizará apenas com clones contendo o fragmento 1, que pode, então, ser isolado e utilizado como uma sonda para detectar o fragmento 2. Esse procedimento é repetido até que o fragmento 4 hibridize com o fragmento 5, que contém toda a sequência do gene X. Um método conceitualmente semelhante de sobreposição da sequência do DNA é utilizado para montar as leituras de sequências contíguas geradas pelo NGS/sequenciamento de alto rendimento de fragmentos de DNA genômico.

princípios discutidos neste capítulo. A análise da genealogia tem sido empregada para várias doenças genéticas e é mais útil naquelas causadas por deleções e inserções, ou nos raros casos em que o sítio de clivagem de uma endonuclease de restrição é afetado, como no exemplo citado aqui. Essas análises são facilitadas atualmente pela reação da PCR, que pode amplificar e, portanto, fornecer DNA suficiente para análise a partir de algumas poucas células nucleadas.

Diagnóstico pré-natal

Se a lesão genética é compreendida e uma sonda específica está disponível, o diagnóstico pré-natal é possível. O DNA das células coletadas de pelo menos 10 mL de líquido amniótico (ou biópsia das vilosidades coriônicas) pode ser analisado por transferência *Southern blot* e, até volumes menores, se for utilizada a PCR. Um feto com padrão de restrição AA na Figura 39-9 não apresenta doença falciforme e também não é portador. Um feto com o padrão SS desenvolverá a doença. Atualmente, estão disponíveis sondas para esse tipo de análise para muitas doenças genéticas.

Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição e SNPs

As diferenças na sequência de DNA citadas podem resultar em variações dos sítios de restrição e, portanto, no comprimento dos fragmentos de restrição. Do mesmo modo, polimorfismos de nucleotídeo único, ou **SNPs**, podem ser detectados pelo sensível método de PCR. Uma diferença herdada no padrão de digestão da enzima de restrição (p. ex., uma variação do DNA que ocorre em mais de 1% da população geral) é conhecida como **polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)**. Foram construídos grandes mapas de RFLP e SNP do genoma humano, que se mostraram úteis no Projeto de Análise do Genoma Humano e são componentes importantes dos esforços para a compreensão de várias doenças de gene único ou multigênicas. Os RFLPs resultam de mudanças em uma única base (p. ex., doença falciforme) ou de deleções ou inserções (CNVs) de DNA em um fragmento de restrição (p. ex., as talassemias) e revelaram-se úteis como ferramentas diagnósticas. Eles têm sido encontrados em *loci* de genes conhecidos e

em sequências que não têm função conhecida; assim, os RFLPs podem interromper a função do gene ou podem não apresentar consequências biológicas aparentes. Como mencionado, 80% dos SNPs no genoma de um único indivíduo conhecido já foram mapeados de maneira independente pelos esforços do componente de mapeamento de SNP do International HapMap Project e são atualmente complementados pelo sequenciamento genômico.

Os RFLPs e SNPs são hereditários e segregam-se de forma mendeliana. A principal utilização dos SNPs/RFLPs é na definição de doenças hereditárias em que o déficit funcional é desconhecido. Os SNPs/RFLPs podem ser utilizados para estabelecer os grupos de ligação, que pelo processo de **chromosome walking** definirão, por fim, o *locus* da doença. Por esse processo (**Figura 39-10**), um fragmento que representa uma extremidade de um longo pedaço de DNA é usado para isolar outro que se sobrepõe ao primeiro, mas que o estende. A direção da extensão é determinada pelo mapeamento de restrição, e o procedimento é repetido sequencialmente até que a sequência desejada seja obtida. Coleções de DNAs mapeados do genoma humano clonado sobrepondo-se a BAC ou PAC estão disponíveis comercialmente. Os distúrbios ligados ao cromossomo X são particularmente sujeitos à abordagem do passeio do cromossomo, uma vez que apenas um único alelo é expresso. Portanto, 20% dos RFLPs definidos estão no cromossomo X, e um mapa de ligação completo (e sequência genômica) desse cromossomo foi definido. Descobriu-se que o gene do distúrbio ligado ao X, a distrofia muscular de Duchenne, utiliza RFLP. Do mesmo modo, o defeito na doença de Huntington foi localizado na região terminal do braço curto do cromossomo 4, e o defeito que provoca a doença do rim policístico está ligado ao *locus* da α -globina no cromossomo 16. O sequenciamento genômico depende dessa “sobreposição” entre os fragmentos sequenciados do DNA para formar sequências de DNA genômico completas.

Os polimorfismos do DNA microssatélite

Unidades de DNA repetidas em *tandem*, curtas (2-6 pb) e herdadas ocorrem cerca de 50.000 a 100.000 vezes no genoma humano (Capítulo 35). Como elas ocorrem mais frequentemente—

e em vista da aplicação rotineira de métodos de PCR sensíveis –, estão substituindo os RFLPs como marcadores de *loci* para várias pesquisas de genoma.

RFLPs e VNTRs na medicina forense

Números variáveis de unidades repetidas em tandem (VNTRs) são um tipo comum de “inserção” que resulta em um RFLP. Os VNTRs podem ser herdados, sendo úteis para estabelecer uma associação genética com uma doença em uma família ou entre parentes; ou podem ser característicos de um indivíduo e, assim, servir como uma impressão digital molecular daquela pessoa.

Sequenciamento direto de DNA genômico

Como observado, os avanços recentes na tecnologia de sequenciamento do DNA, chamado de nova geração (NGS), ou plataformas de sequenciamento de alto rendimento (HTS), reduziram muito o custo por base do sequenciamento do DNA. A sequência inicial do genoma humano custou aproximadamente \$350.000.000 (Estados Unidos). O custo do sequenciamento do mesmo genoma humano diploide de 3×10^9 pb, utilizando as novas plataformas NGS, é estimado em $< 0,03\%$ do original. Muito recentemente, foi desenvolvida uma tecnologia para permitir o sequenciamento do genoma humano por \$1.000 (Estados Unidos). Essa redução acentuada no custo estimulou várias iniciativas internacionais em sequenciar o genoma inteiro de milhares de indivíduos de várias origens raciais e étnicas para determinar a real extensão dos polimorfismos de DNA/genoma presentes no interior da população. A enorme quantidade de informação genética resultante e o custo cada vez menor do sequenciamento do DNA genômico estão aumentando muito a capacidade de diagnosticar e, em última instância, de tratar as doenças humanas. Obviamente, quando o sequenciamento do genoma pessoal se tornar comum, irão acontecer mudanças acentuadas na prática médica porque as terapias serão, em última análise, individualizadas e adaptadas para a exata composição genética de cada indivíduo.

A terapia gênica e a biologia das células-tronco

As doenças causadas por deficiência do produto de um único gene (Tabela 39-4) são todas, teoricamente, sujeitas à terapia de substituição. A estratégia é clonar uma cópia normal do gene relevante (p. ex., o gene que codifica a adenosina-desaminase) em um vetor que será facilmente absorvido e incorporado ao genoma de uma célula hospedeira. Células precursoras da medula óssea estão sendo investigadas com esse propósito porque elas, presumivelmente, irão se restabelecer e replicar na medula óssea. O gene introduzido começaria a dirigir a expressão do seu produto proteico, e este seria capaz de corrigir a deficiência na célula hospedeira.

Como alternativa para “substituir” os genes defeituosos para curar doenças humanas, muitos cientistas estão investigando a viabilidade de identificar e caracterizar células-tronco pluripotentes que tenham a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular no corpo humano. Resultados recentes nesse campo mostraram que células somáticas de seres humanos adultos podem ser convertidas prontamente em aparentes **células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)** por transfecção

com cDNAs que codificam vários fatores de transcrição de ligação ao DNA. Esses e outros novos desenvolvimentos nos campos da terapia gênica e da biologia de células-tronco prometem interessantes novas terapias potenciais para a cura de doenças humanas. Finalmente, a geração de iPSCs a partir de células de um paciente doente também oferece a oportunidade para criar modelos autênticos para estudos em laboratório das bases moleculares das doenças humanas.

Animais transgênicos

A terapia de substituição de genes da célula somática descrita não seria passada para a prole. Outras estratégias para alterar as linhagens de células germinativas foram concebidas, mas foram testadas apenas em animais experimentais. Uma porcentagem dos genes injetados em um ovo fertilizado de camundongo será incorporada ao genoma e encontrada tanto em células somáticas quanto germinativas. Centenas de animais transgênicos foram criadas e são úteis para a análise dos efeitos específicos do tecido na expressão gênica e dos efeitos de superprodução dos produtos gênicos (p. ex., aqueles do gene do hormônio do crescimento ou dos oncogenes) e para a descoberta de genes envolvidos no desenvolvimento – um processo que até agora tem sido difícil de estudar em mamíferos. A abordagem transgênica tem sido usada para corrigir uma deficiência genética em camundongos. Ovos fertilizados obtidos de camundongos com hipogonadismo genético foram injetados com DNA que contém a sequência codificadora da proteína precursora do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Esse gene foi expresso e regulado normalmente no hipotálamo de alguns camundongos resultantes, e todos esses animais eram normais em todos os aspectos. Sua prole também não apresentou qualquer evidência de deficiência de GnRH. Essa é, portanto, a evidência de expressão da célula somática no transgene e de sua manutenção em células germinativas.

Regulação gênica direcionada por destruição ou *knockout*, *knockin*, edição e expressão controlada

Vários avanços técnicos permitiram a modificação precisa de genes de mamíferos. Os métodos exatos utilizados na engenharia genética do genoma de mamíferos evoluíram de outros métodos mais lentos e menos eficientes com base na seleção de fármacos positivos e negativos e na recombinação homóloga (*knockout/knockin*) até chegar ao recentemente descrito sistema CRISPR-Cas9, já apresentado. O objetivo de todos esses métodos é gerar uma família de variantes genéticas de um gene específico: (a) um alelo nulo ou com perda de função completa; (b) alelos recessivos, com perda de função; e (c) idealmente, alelos dominantes com ganho de função. Essas alterações genéticas são geradas em células-tronco pluripotenciais, que permitem a introdução e a propagação em todos os organismos-modelo (moscas, peixes, vermes, roedores, etc.). Possuindo todas as três variantes genéticas, é possível determinar todos os mecanismos de ação de qualquer gene. Entretanto, as análises genéticas de muitos genes podem ser mais complicadas, pois suas funções são essenciais para a viabilidade.

Para contornar esse problema, devem ser geradas variantes genéticas específicas de células ou tecidos. Esse obstáculo foi resolvido com a utilização de estimuladores específicos de células e tecidos, que podem direcionar a expressão condicional (i.e., controlada experimentalmente) de recombinases-alvo (i.e., CRE-lox) e/ou nucleases (CRISPR-Cas) que geram genes alterados, alelos nulos ou com perda/ganho de função. Alternativamente, a perda de função seletiva pode ser gerada pela expressão de siRNA equivalente para acabar com a produção de um produto gênico específico. Coletivamente, esses métodos permitem testes genéticos e bioquímicos sofisticados da função gênica e permitem que os cientistas possam investigar a estrutura e a função de genes de mamíferos em situações fisiológicas. Novas ideias incríveis de mecanismos moleculares continuarão a ser obtidas sobre a etiologia molecular das doenças humanas por essas e outras abordagens bioquímicas.

Perfil de proteína e RNA e mapeamento da interação proteína-DNA

A revolução “-ômica” da última década culminou na determinação da sequência completa de nucleotídeos de dezenas de milhares de genomas, incluindo aqueles de brotamentos e fissão de leveduras, de várias bactérias, da mosca-da-fruta, do verme *Caenorhabditis elegans*, de vegetais, camundongos, ratos, galinhas, macacos e, mais notavelmente, de seres humanos. Genomas adicionais estão sendo sequenciados em ritmo acelerado. A disponibilidade de todas essas informações sobre sequência de DNA, acoplada aos avanços da engenharia genética, levou ao desenvolvimento de várias metodologias revolucionárias, e a maioria delas baseia-se na **tecnologia de microarranjo de alta densidade**, ou em plataformas de **sequenciamento NGS**. No caso dos microarranjos, agora é possível depositar milhares de sequências de DNA específicas e conhecidas em uma lâmina de microscópio ou outro suporte inerte, em um espaço de poucos centímetros quadrados. Pelo acoplamento desses microarranjos de DNA à detecção altamente sensível de sondas de ácidos nucleicos hibridizadas, marcadas com fluorescência e derivadas de mRNA, os pesquisadores podem, rápida e precisamente, gerar perfis de expressão gênica (p. ex., conteúdo celular específico de mRNA) de amostras de células e tecidos de apenas 1 g ou menos. Assim, a **informação do transcriptoma** completo (a coleção inteira de RNAs celulares) para essas fontes de células ou tecidos pode ser obtida rapidamente em apenas poucos dias. No caso do sequenciamento NGS, os mRNAs são convertidos em cDNAs usando a transcrição reversa, e esses cDNAs são amplificados e sequenciados diretamente; esse método é chamado de **RNA-Seq**. Esses métodos permitem a descrição quantitativa de todo o transcriptoma. Relatos recentes na literatura utilizaram o RNA-Seq para descrever o transcriptoma de células individuais, podendo, quando acoplado à proteômica baseada em espectrometria de massas de alta sensibilidade (ver a seguir), definir com confiabilidade os perfis de expressão gênica.

Recentes avanços metodológicos (**GRO-Seq** [sequenciamento Global Run-On] e **NET-Seq** [sequenciamento de alongamento do transcrito nativo]) permitem o sequenciamento do RNA no interior dos complexos ternários de RNA-poli-merase-DNA-RNA, permitindo, portanto, descrições no nível de nucleotídeos, de todo o genoma, da transcrição em células

vivas. Essa informação do transcriptoma permite prever quantitativamente a coleção de proteínas que devem ser expressas em uma célula, um tecido ou um órgão particular, em estados normais e de doença, com base na presença de mRNAs naquelas células.

Complementando os métodos de alto desempenho de perfis de transcrição descritos, estão os métodos recentemente desenvolvidos para mapear a localização ou a ocupação de proteínas específicas ligadas a sequências discretas de DNA no interior das células vivas. Esse método, ilustrado na **Figura 39-11**, é denominado **imunoprecipitação de cromatina (ChIP)**. As proteínas sofrem ligações cruzadas *in situ* em células ou tecidos, a cromatina celular é isolada, cortada e são obtidos complexos de DNA-proteína purificados específicos, utilizando anticorpos que reconhecem uma proteína em particular ou uma isoforma de proteína. O DNA ligado a essa proteína é recuperado e amplificado utilizando a PCR e analisado: por eletroforese em gel, análise de hibridização de microarranjos (**ChIP-chip**) ou por sequenciamento direto. Há duas versões de leitura dos testes de sequenciamento de DNA. Na primeira, o DNA imunopurificado é submetido diretamente ao sequenciamento NGS/alto rendimento (**ChIP-Seq**). Na segunda versão, o complexo de ligação cruzada proteína-DNA é tratado com exonucleases para remover as sequências de DNA de ligação cruzada que não estão em contato próximo com as proteínas de interesse; ela é chamada de **ChIP-Exo**. Coletivamente, os métodos ChIP-chip e ChIP-Seq permitem identificar a localização de uma única proteína ao longo do genoma de todos os cromossomos. O ChIP-Exo possui a vantagem adicional de permitir o mapeamento *in vivo* da ocupação da proteína, no nível da resolução de um único nucleotídeo. Por fim, com os métodos de espectrometria de massas de alta sensibilidade e alto rendimento de metabólitos (**metabolômica**), várias moléculas pequenas (lipídeos, **lipidômica**; carboidratos, **glicômica**, etc.) e amostras de proteínas complexas (**proteômica**) foram desenvolvidos. Novos métodos de espectrometria de massas permitem identificar centenas ou milhares de proteínas em amostras extraídas de um número muito pequeno de células (< 1 g). Essas análises podem agora ser utilizadas para medir as quantidades relativas de proteínas em duas amostras, bem como o nível de alguns PTMs, como fosforilação, acetilação, etc.; e, com o uso desses anticorpos específicos, definir interações proteína-proteína específicas. Essas informações fundamentais indicam aos pesquisadores quais dentre os muitos mRNAs detectados nos estudos de mapeamento do transcriptoma são, na verdade, traduzidos em proteínas, em geral o ditador final do fenótipo.

Novos meios genéticos para a identificação das interações proteína-proteína e da função da proteína também foram concebidos. O *knockdown* da expressão gênica sistemática do genoma amplo utilizando siRNAs, rastreamentos da interação genética fatal sintética ou, mais recentemente, o *knockdown* de CRISPR-Cas9 foram utilizados para avaliar a contribuição de genes individuais em vários processos de modelos sistêmicos (fungos, vermes e moscas) e em células de mamíferos (seres humanos e camundongos). O mapeamento de redes específicas de interações proteína-proteína, com base em um genoma amplo, foi identificado por variantes de alto rendimento de testes de **duas interações híbridas (Figura 39-12)**.

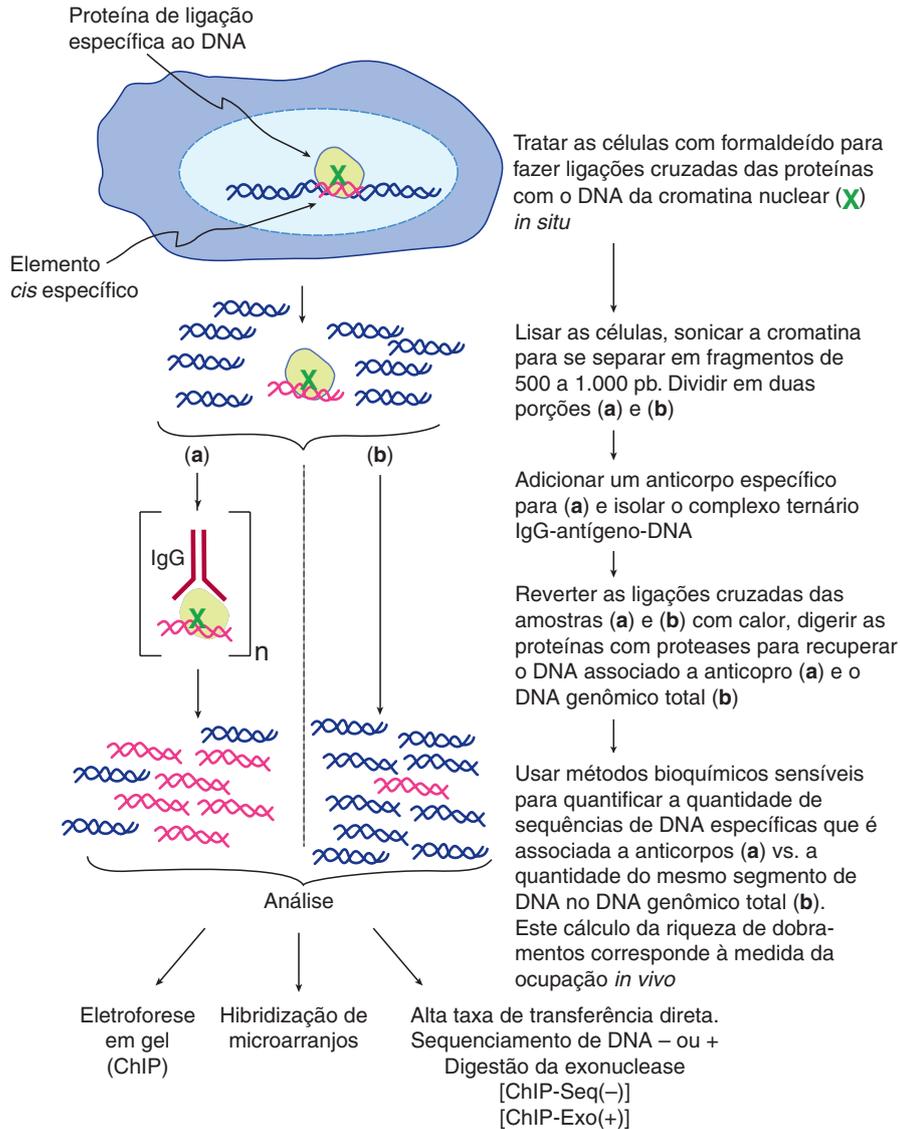


FIGURA 39-11 Esboço da técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Esse método permite a localização precisa de uma proteína particular (ou proteína modificada se um anticorpo apropriado estiver disponível; p. ex., histonas fosforiladas ou acetiladas, fatores de transcrição, etc.) em um elemento de sequência particular em células vivas. Dependendo do método usado para analisar o DNA imunopurificado, alguma informação quantitativa ou semiquantitativa pode ser obtida, próxima do nível de resolução dos nucleotídeos. A ocupação proteína-DNA pode ser registrada em todo o genoma de duas maneiras. Primeiro, por ChIP-*chip*, um método que utiliza uma leitura de hibridização. Em ChIP-*chip*, o DNA genômico total é marcado com um fluoróforo particular e o DNA imunopurificado é marcado com um fluoróforo espectralmente distinto. Esses DNAs marcados diferencialmente são misturados e hibridizados em *chips* de microarranjos (lâminas de microscópio) que contêm fragmentos de DNA específicos, ou mais comumente agora, oligonucleotídeos sintéticos com 50 a 70 nucleotídeos de comprimento. Esses oligonucleotídeos específicos dos genes são depositados e covalentemente ligados em coordenadas/posições X, Y predeterminadas e conhecidas na lâmina. Os DNAs marcados são hibridizados, as lâminas são lavadas e a hibridização para cada sonda de oligonucleotídeo é registrada usando digitalização diferencial à *laser* e fotodetecção em resolução micrométrica. As intensidades dos sinais de hibridização são quantificadas e a razão de IP DNA/sinais de DNA genômico é usada para registrar os níveis de ocupação. O segundo método, chamado de ChIP-Seq, sequencia diretamente os DNAs imunopurificados utilizando métodos de sequenciamento NGS. São mostradas duas variantes de ChIP-Seq: ChIP-Seq “padrão” e ChIP-Exo. Essas duas abordagens diferem em sua capacidade para resolver e mapear as localizações da proteína ligada ao DNA genômico. A resolução do ChIP-Seq padrão é de $\sim \pm 50$ nt, ao passo que ChIP-Exo apresenta quase um único nível de resolução de nt. Ambas as abordagens dependem de algoritmos da bioinformática eficazes para lidar com os conjuntos de dados muito grandes que são gerados. As técnicas ChIP-*chip* e ChIP-Seq fornecem uma medida (semi)quantitativa da ocupação da proteína *in vivo*. Embora não esquematizados na figura, métodos semelhantes, denominados RIP (imunoprecipitação de RNA) ou CLIP (ligação cruzada proteína-RNA e imunoprecipitação), que diferem principalmente no método de ligação cruzada proteína-RNA, podem quantificar *in vivo* a ligação de proteínas específicas a tipos específicos de RNA (em geral, mRNAs, embora qualquer tipo de RNA possa ser analisado por essas técnicas).

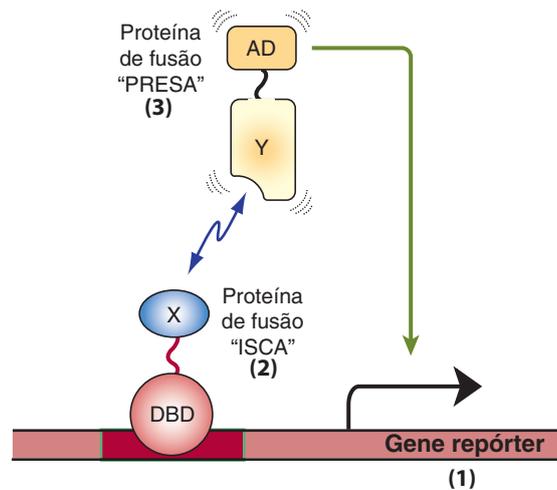


FIGURA 39-12 Visão geral do sistema de duplo-híbrido para identificação e caracterização das interações proteína-proteína. São mostrados os componentes básicos e a operação do sistema de duplo-híbrido, desenvolvido originalmente por Fields e Song (Nature 340:245–246 [1989]) para funcionar no sistema de leveduras. (1) Um gene repórter ou um marcador seletivo (i.e., um gene conferindo crescimento prototrófico em meios seletivos, ou produzindo uma enzima para a qual existe um ensaio colorimétrico para a colônia, como a β -galactosidase) que é expresso apenas quando um fator de transcrição se liga a montante do estimulador *cis*-ligado (barra vermelho-escuro). (2) Uma proteína de fusão “isca” (DBD-X) produzida a partir de um gene quimérico, expressando um domínio modular de ligação do DNA (DBD; frequentemente derivado de uma proteína Gal4 de levedura ou da proteína bacteriana LexA, ambas proteínas de ligação ao DNA de alta afinidade e alta especificidade) fusionado *in-frame* a uma proteína de interesse, neste caso, X. Em experimentos de duplo-híbrido, um está testando se qualquer proteína pode interagir com a proteína X. A proteína X presa pode se fusionar totalmente ou, com frequência, de modo alternativo, apenas uma porção dela é expressa *in-frame* com o DBD. (3) Uma proteína “presa” (Y-AD), que representa uma fusão de uma proteína específica fusionada *in-frame* a um domínio de ativação transcripcional (AD; frequentemente derivado da proteína ativadora VP16 do vírus *Herpes simplex* ou da proteína Gal4 da levedura). Esse sistema serve como um teste útil das interações proteína-proteína entre proteínas X e Y, porque, na ausência da ligação de um transativador funcional ao estimulador indicado, não ocorre transcrição do gene repórter (i.e., ver Figura 38-16). Portanto, observa-se a transcrição apenas se ocorrerem interações entre as proteínas X e Y, trazendo, assim, um AD funcional à unidade de transcrição *cis*-ligada, nesse caso, ativando a transcrição do gene repórter. Nesse cenário, a proteína DBD-X sozinha é incapaz de ativar a transcrição do repórter, pois o domínio X fusionado ao DBD não contém um AD. Do mesmo modo, uma proteína Y-AD sozinha não consegue ativar a transcrição do gene repórter, porque ela não possui um DBD para direcionar a proteína Y-AD para o estimulador. Apenas quando ambas as proteínas estão expressas em uma única célula e se ligam ao estimulador e, via interações proteína-proteína DBD-X-Y-AD, regeneram uma “proteína” binária transativadora funcional, a transcrição do gene repórter resulta na ativação e síntese de mRNA (linha verde do AD ao gene repórter).

Esse método simples, embora poderoso, pode ser realizado em células de bactérias, leveduras ou metazoários e permite a detecção de interações específicas proteína-proteína em células vivas. Experimentos de reconstrução indicam que as interações proteína-proteína, com afinidades de $K_d - 10^{-6}$ mol/L ou mais, podem ser rapidamente detectadas com esse método. Em conjunto, essas tecnologias fornecem novas ferramentas poderosas para dissecar a complexidade da biologia humana.

A BIOLOGIA DE SISTEMAS TEM COMO OBJETIVO INTEGRAR A GRANDE QUANTIDADE DE DADOS “-ÔMICOS” PARA DECIFRAR OS PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DA REGULAÇÃO BIOLÓGICA

Técnicas de microarranjos, sequenciamento de alto rendimento do DNA genômico, *knockdown* genético de dois híbridos do genoma ChIP-Seq e rastreamentos sintéticos fatais acoplados à espectrometria de massas de proteínas e experimentos de identificação de metabólitos levaram à geração de

uma grande quantidade de dados. A gestão e a interpretação adequada dos dados da grande quantidade de informações oriundos a partir de tais estudos se basearam na aplicação de métodos estatísticos e de novos algoritmos para a análise ou a “extração” e visualização de grandes conjuntos de dados, o que levou ao desenvolvimento do campo da **bioinformática** (ver também Capítulo 11). Essas novas tecnologias, vinculadas à grande quantidade de dados experimentais, levou ainda ao desenvolvimento do campo da **biologia de sistemas**, uma disciplina em que o objetivo é a análise quantitativa e a integração de todas essas informações biologicamente importantes. Trabalhos futuros na interseção de bioinformática, engenharia, biofísica, genética, perfis de transcrição de proteínas/PTM e biologia de sistemas revolucionarão a compreensão da fisiologia e da medicina e, por fim, da saúde humana.

RESUMO

- Na clonagem do DNA, um segmento específico de DNA é sintetizado diretamente ou é removido de seu ambiente normal, utilizando PCR ou uma das muitas endonucleases de DNA. Esse DNA é, então, ligado em um vetor, no qual o segmento do DNA pode ser amplificado e produzido em abundância.

- A manipulação do DNA para alterar a sua estrutura, a chamada engenharia genética, é um elemento essencial na clonagem (p. ex., a construção de moléculas quiméricas) e também pode ser utilizada para estudar a função de um fragmento de DNA e para analisar como os genes são regulados.
- Várias técnicas sensíveis podem ser aplicadas para o isolamento e a caracterização de genes e a quantificação desses produtos gênicos de modo estático (i.e., equilíbrio) ou dinâmico (cinético). Esses métodos permitem a identificação dos genes responsáveis por doenças e o estudo de como a falta/regulação de um gene pode causar doença.
- Os genomas de mamíferos podem agora ser precisamente modificados para *knockin* (adicionar/substituir um gene), para *knockout* (deletar ou inativar) e/ou para manipular ativa e condicionalmente genes específicos utilizando novas enzimas de edição de genoma (recombinases) e sistemas enzima-RNA (CRISPR-Cas).

REFERÊNCIAS

- Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al: The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al: Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 2008;319:921.
- Churchman LS, Weissman JS: Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 2011;469:368–373.
- Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT: Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 2008;322:1845–1848.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Myers CL, et al: Charting the genetic interaction map of a cell. *Curr Opin Biotechnol* 2011 Feb;22(1):66–74.
- Deng Q, Ramsköld D, Reinius B, et al: Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 2014;343:193–196.
- Denny JC, Bastarache L, Ritchie MD, et al: Systematic comparison of phenome-wide association study of electronic medical record data and genome-wide association study data. *Nat Biotechnol* 2013;31:1102–1111.
- Gandhi TK, Zhong J, Mathivanan S, et al: Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. *Nat Genet* 2006;38:285.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al: Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010;329:52–56.
- Gilchrist DA, Fargo DC, Adelman K: Using ChIP-chip and ChIP-seq to study the regulation of gene expression: genome-wide localization studies reveal widespread regulation of transcription elongation. *Methods* 2009;48:398–408.
- Green, MR, Sambrook J: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- Horvath P, Barrangou R: CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010;327:167–170.
- Isaacs FJ, Carr PA, Wang HH, et al: Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement. *Science* 2011;333:348–353.
- Kodzius R, Kojima M, Nishiyori H, et al: CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat Meth* 2006;3:211–222.
- Liebler DC, Zimmerman LJ: Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry* 2013;52:3797–3806.
- Martin JB, Gusella JF: Huntington's disease: pathogenesis and management. *N Engl J Med* 1986;315:1267.
- Myers RM, Stamatoyannopoulos J, Snyder M, et al: A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol* 2011;9:e1001046.
- Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, et al: A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Cell* 2013;24:182–196.
- Sampson TR, Weiss DS: Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays* 2014;36:34–38.
- Plass C, Pfister SM, Lindroth AM, et al: Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet*. 2013 Nov;14(11):765–780.
- Rhee HS, Pugh BF: Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* 2011;147:1408–1419.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861.
- Teles F, Gamliel A, Skowronska-Krawczyk D: “Seq-ing” insights into the epigenetics of neuronal gene regulation. *Neuron* 2013;77:606–623.
- Wang L, Wheeler DA: Genomic sequencing for cancer diagnosis and therapy. *Ann Rev Medicine* 2014;65:25.1–25.16.
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES: Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014;343:80–84.
- Weatherall DJ: *The New Genetics and Clinical Practice*, 3rd ed. Oxford University Press, 1991.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al: The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 2008;451:872.

GLOSSÁRIO

- ARS:** sequência de replicação autônoma; a origem da replicação em leveduras.
- Autorradiografia:** detecção de moléculas radioativas (p. ex., DNA, RNA e proteína) pela visualização de seus efeitos em um filme fotográfico ou de raios X.
- Bacteriófago:** um vírus que infecta uma bactéria.
- Biblioteca:** coleção de fragmentos clonados que representam, em grupos, o genoma completo. As bibliotecas podem ser de DNA genômico (nas quais são representados íntrons e éxons) ou de cDNA (nas quais são representados apenas os éxons).
- CAGE:** análise do cap da expressão gênica. Método que permite a captação seletiva, a amplificação, a clonagem e o sequenciamento dos mRNAs por meio da estrutura cap 5'.
- cDNA:** molécula de fita simples de DNA que é complementar a uma molécula de mRNA e é sintetizada a partir desta pela ação da transcriptase reversa.
- ChIP, imunoprecipitação de cromatina:** técnica para a determinação da localização exata de uma proteína particular ou isoforma de proteína, ou qualquer localização genômica particular em uma célula viva. O método se baseia nas ligações cruzadas de células vivas, na interrupção celular, na fragmentação do DNA e na imuno-

precipitação com anticorpos específicos que purificam o cognato de proteína que realiza ligações cruzadas com o DNA. As ligações cruzadas são revertidas, os DNAs associados são purificados e as sequências específicas que são purificadas são medidas se utilizam qualquer um de vários métodos diferentes.

ChIP-chip, imunoprecipitação de cromatina de ensaio por meio de leitura de hibridização com um chip de microarranjo: método com base em hibridização que utiliza as técnicas de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para mapear, em todo o genoma, os sítios de ligação *in vivo* de proteínas específicas no interior da cromatina de células vivas. A sequência da ligação é determinada pela renaturação de amostras de DNA marcado com fluorescência com microarranjos (arranjo).

ChIP-Exo, imunoprecipitação de cromatina de ensaio via NGS/leitura de sequenciamento após tratamento dos complexos proteína-DNA imunoprecipitados com exonucleases: uma variação do ChIP-Seq (ver a seguir) que permite a precisão no nível do nucleotídeo no mapeamento e na descrição dos elementos *cis* de DNA ligados por uma determinada proteína.

ChIP-Seq, imunoprecipitação de cromatina testada por leitura do sequenciamento NGS: local de ligação do DNA genômico em um ChIP determinado por sequenciamento de alto rendimento, em vez de por hibridização com microarranjos.

CLIP: método que utiliza uma ligação cruzada UV para induzir uma ligação covalente de proteínas diferentes a RNAs específicos *in vivo*: RNAs ligados a proteínas podem ser subsequentemente purificados a partir de lisados de células por imunoprecipitação e posterior sequenciamento.

Clone: um grande número de organismos, células ou moléculas idênticos a uma única célula ou molécula de organismo parental.

Código epigenético: padrões de modificação do DNA cromossômico (i.e., metilação da citosina) e modificações pós-tradução da histona nucleossomal. Essas alterações no estado de modificação podem levar a alterações drásticas na expressão gênica. Notavelmente, no entanto, a sequência de DNA subjacente efetivamente envolvida não se altera.

Cosmídeo: plasmídeo em que as sequências de DNA do bacteriófago lambda que são necessárias para o acondicionamento do DNA (sítios *l cos*) foram inseridas; isso permite que o plasmídeo de DNA seja acondicionado *in vitro*.

CRISPR/Cas: “sistema imune” procariótico que confere resistência a genes externos do bacteriófago. Esse sistema fornece uma versão bacteriana da imunidade adquirida. O CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Dispersas Agrupadas Regularmente) RNA derivado de espaçador combina-se com a nuclease Cas para direcionar e clivar especificamente o DNA do fago invasor, inativando, assim, esses genomas invasores e protegendo a bactéria de infecção e lise produzida pelo fago.

DNA de extremidade cega: duas fitas de um DNA dúplice com extremidades alinhadas entre si.

DNA de terminação adesiva: fitas simples complementares de DNA que se projetam a partir de extremidades opostas de um dúplice de DNA ou das extremidades de moléculas duplas diferentes (ver também DNA de extremidade cega).

DNA recombinante: DNA alterado que resulta da inserção de uma sequência de desoxinucleotídeos não encontrados previamente em uma molécula de DNA existente por meios enzimáticos ou químicos.

Endonuclease: enzima que cliva ligações internas no DNA ou no RNA.

Enzima de restrição: uma endodesoxinuclease que provoca a clivagem de ambas as fitas de DNA em sítios altamente específicos determinados pela sequência de bases.

Excinuclease: nuclease de excisão envolvida no reparo por troca de nucleotídeos de DNA.

Exoma: sequência de nucleotídeos de todo o complemento dos éxons de mRNA expressos em uma célula, tecido, órgão ou organismo particular. O exoma difere do transcriptoma, que representa a coleção inteira dos transcritos do genoma; o exoma representa um subconjunto de sequências de RNA que compõem o transcriptoma.

Éxon: sequência de um gene representada (expressa) como mRNA.

Exonuclease: enzima que cliva nucleotídeos de extremidades 3' ou 5' de DNA ou RNA.

FISH: hibridização por fluorescência *in situ* – um método utilizado para mapear a localização de sequências específicas de DNA no interior de núcleos fixos.

Footprinting: o DNA com proteína ligada é resistente à digestão pelas enzimas DNases. Quando uma reação de sequenciamento é realizada utilizando esse DNA, uma área protegida, que representa a “pegada” (*footprint*) da proteína ligada, será detectada, uma vez que as nucleases são incapazes de clivar o DNA diretamente ligado pela proteína.

Grampo (*hairpin*): trecho da dupla-hélice formado pelo pareamento de bases entre as sequências complementares próximas de uma fita simples de DNA ou de RNA.

GRO-Seq, sequenciamento Global Run-On: método em que os transcritos nascentes são especificamente capturados e sequenciados usando NGS/sequenciamento profundo. Esse método permite o mapeamento da localização de complexos de transcrição ativos.

Hibridização: reassociação específica de fitas complementares de ácidos nucleicos (DNA com DNA, DNA com RNA, ou RNA com RNA).

Impressão digital (*fingerprinting*) do DNA: utilização de RFLPs ou sequências repetidas de DNA para estabelecer um padrão único de fragmentos de DNA para um indivíduo.

Inserção: um comprimento adicional de pares de bases no DNA, geralmente introduzido por técnicas da tecnologia do DNA recombinante.

Íntron: a sequência de um gene que codifica mRNA que é transcrita, porém retirada, antes da tradução. Os genes de tRNA também contêm íntrons.

Ligação: união de dois trechos do DNA ou do RNA em um único trecho, catalisada por enzima na ligação fosfodiéster; as enzimas respectivas são DNA e RNA ligases.

Lines: longas sequências de repetição intercaladas.

miRNAs: microRNAs, tipo de RNA com 21 a 22 nucleotídeos de comprimento derivados de unidades de transcrição da RNA-polimerase II, e 500 a 1.500 pb de comprimento via processamento do RNA. Esses RNAs desempenham papéis fundamentais na regulação gênica, alterando a função do mRNA.

Molécula quimérica: uma molécula (p. ex., DNA, RNA e proteína) que contém sequências derivadas de duas espécies diferentes.

NET-Seq, sequenciamento de alongamento nativo: análise de todo o genoma das extremidades 3' das cadeias nascentes de mRNA de eucariotos mapeadas no nível de resolução de nucleotídeos. Os complexos de alongamento da RNA-polimerase II são capturados por imunopurificação com IgG anti-pol II, e os RNAs nascentes que contêm um grupo OH 3' livre são marcados pela ligação com um *linker* de RNA e, subsequentemente, amplificados por PCR e submetidos a sequenciamento NGS.

Northern blot: método de transferência de RNA a partir de um gel de agarose ou poliacrilamida para um filtro de náilon ou nitrocelulose sobre o qual o RNA pode ser detectado por sondas precisas de hibridização específicas.

Oligonucleotídeo: sequência definida de nucleotídeos curtos unida em uma ligação fosfodiéster característica.

Ori: origem da replicação do DNA.

PAC: vetor de clonagem de alta capacidade (70-95 kb) com base no bacteriófago lítico de *E. coli* P1 que replica em bactérias como um elemento extracromossômico.

Palíndromo: sequência de DNA dúplice que é a mesma quando as duas fitas são lidas em direções opostas.

Plasmídeo: pequena molécula circular de DNA extracromossômico, ou epissomo, que se replica independentemente do DNA do hospedeiro.

Polimorfismo microssatélite: heterozigosidade de um determinado microssatélite de repetição em um indivíduo.

Primossomo: complexo móvel de helicase e primase que está envolvido na replicação do DNA.

Projeto ENCODE: projeto da Enciclopédia de Elementos de DNA; um esforço de vários laboratórios em todo o mundo para fornecer uma representação detalhada de informação bioquímica do genoma humano utilizando métodos de sequenciamento de alto rendimento para identificar e catalogar os elementos funcionais no genoma humano.

Proteoma: coleção completa de proteínas expressas em um organismo.

Pseudogene: segmento inativo de DNA que surge por mutação de um gene ativo parental; geralmente gerado por transposição de uma cópia de cDNA de um mRNA.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): método enzimático para a cópia repetida (e, portanto, a amplificação) das duas fitas de DNA que compõem uma sequência gênica particular.

RIP: método de imunoprecipitação de RNA, realizado como ChIP, que é utilizado para quantificar a ligação específica de uma proteína a um RNA específico *in vivo*. A RIP utiliza reações cruzadas de formaldeído para induzir a ligação covalente de proteínas ao RNA (ver também CLIP).

RNA-Seq: método em que populações de RNA celular são convertidas por meio de ligação *linker* e PCR em cDNAs que são, então, submetidas ao sequenciamento profundo para determinar a sequência completa de quase todos os RNAs na preparação.

RT-PCR: método utilizado para quantificar os níveis de mRNA que depende de uma primeira etapa de cópia de cDNA de mRNAs catalisada pela transcriptase reversa antes da amplificação e da quantificação pela PCR.

Sequências de repetição microssatélites: sequências de repetição dispersas ou agrupadas de 2 a 5 pb repetidas até 50 vezes. Podem ocorrer entre 50 a 100 mil localizações no genoma.

Sinal: produto final observado quando uma sequência específica de DNA ou RNA é detectada por autorradiografia ou algum outro método. A hibridização com um polinucleotídeo radioativo complementar (p. ex., por *Southern blotting* ou *Northern blotting*) é comumente usada para gerar o sinal.

Sines: sequências de repetição curtas intercaladas.

siRNAs: RNAs silenciadores, com 21 a 25 nt de comprimento, gerados pela degradação nucleolítica seletiva de RNAs de dupla-fita da célula ou vírus de origem. A hibridização de siRNAs a vários sítios específicos nos RNAs levam à degradação do mRNA e, conseqüentemente, ao *knockdown* gênico.

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único. Refere-se ao fato de a variação genética de um único nucleotídeo na sequência genômica ocorrer em *loci* discretos ao longo dos cromossomos. A medida das diferenças alélicas de SNP é útil para os estudos de mapeamento genético.

snRNA: RNA nuclear pequeno. Essa família de RNAs é mais conhecida por seu papel no processamento do mRNA.

Sonda: molécula utilizada para detectar a presença de um fragmento específico de DNA ou RNA em, por exemplo, uma colônia bacteriana que é formada a partir de uma biblioteca genômica ou durante a análise das técnicas de transferência *blot*; sondas comuns são moléculas de cDNA, oligodesoxinucleotídeos sintéticos de sequência definida ou anticorpos para proteínas específicas.

Southern blot: método de transferência de DNA de um gel de agarose para um filtro de nitrocelulose, no qual o DNA pode ser detectado por uma sonda própria (p. ex., DNA ou RNA complementares).

Southwestern blot: método para detecção de interações proteína-DNA pela aplicação de uma sonda de DNA marcada para uma membrana de transferência que contém uma proteína renaturada.

Spliceossomo: complexo macromolecular responsável pelo *splicing* do mRNA precursor. O spliceossomo é composto por pelo menos cinco pequenos RNAs nucleares (snRNA; U1, U2, U4, U5 e U6) e muitas proteínas.

Splicing: remoção dos íntrons do RNA acompanhada pela junção aos seus éxons.

Tandem: termo utilizado para descrever cópias múltiplas da mesma sequência (p. ex., DNA) que estão adjacentes umas às outras.

Tradução de cadeia com quebras: técnica para marcação do DNA baseada na capacidade da DNA-polimerase de *E. coli* de degradar uma fita de DNA que foi cortada e, em seguida, ressintetizar a fita; se um nucleosídeo trifosfato radioativo for empregado, a fita reconstituída torna-se marcada e pode ser usada como uma sonda radioativa.

Tradução: síntese de proteína que utiliza o mRNA como molde.

Transcrição reversa: síntese direcionada de DNA pelo RNA catalisada pela transcriptase reversa.

Transcrição: síntese de ácidos nucleicos direcionada pelo molde de DNA, geralmente a síntese de RNA direcionada por DNA.

Transcriptoma: coleção inteira de RNAs expressos em uma célula, tecido, órgão ou organismo; inclui mRNAs e ncRNAs.

Transferase terminal: enzima que adiciona nucleotídeos de um tipo (p. ex., resíduos de desoxiadenonucleotídeo) à extremidade 3' das fitas de DNA.

Transgênico: descreve a introdução de um novo DNA em células germinativas por sua injeção no núcleo do óvulo.

Varição no número de cópias (CNV): alteração no número de cópias de regiões genômicas específicas do DNA entre dois ou mais indivíduos. As CNVs podem ter até 10⁶ pb de DNA e incluir deleções ou inserções.

Vetor: plasmídeo ou bacteriófago em que o DNA estranho pode ser introduzido com objetivo de clonagem.

Western blot: método para transferir proteína para um filtro de nitrocelulose, no qual a proteína pode ser detectada por uma sonda adequada (p. ex., um anticorpo).

Questões para estudo

Seção VII – Estrutura, função e replicação de macromoléculas informacionais

- Qual das alternativas a seguir sobre derivados β,γ -metileno e β,γ -imino de purina e pirimidina trifosfatos está CORRETO?
 - Eles são potenciais medicamentos anticâncer.
 - Eles são precursores da vitamina B.
 - Eles passam, facilmente, por remoção hidrolítica do fosfato terminal.
 - Eles podem ser usados para envolver a participação de nucleotídeos trifosfatos por outros efeitos que não a transferência de grupos fosforil.
 - Eles servem como precursores polinucleotídeos.
- Qual das alternativas a seguir sobre a estrutura dos nucleotídeos está INCORRETA?
 - Os nucleotídeos são ácidos polifuncionais.
 - A cafeína e a teobromina diferem estruturalmente apenas em relação ao número de grupos metil ligados aos seus anéis de nitrogênio.
 - Os átomos do anel de purina das pirimidinas são numerados na mesma direção que as de uma pirimidina.
 - NAD⁺, FMN, “metionina ativada” e coenzima A são todos derivados de ribonucleotídeos.
 - 3', 5'-AMP e GMP cíclicos (cAMP e cGMP) atuam como segundos mensageiros na bioquímica humana.
- Qual das alternativas a seguir sobre o metabolismo de nucleotídeos de purina está INCORRETA?
 - Uma etapa inicial na biossíntese de purinas é a formação de PRPP (fosforibosil-1-pirofosfato).
 - O monofosfato de inosina (IMP) é um precursor de AMP e de GMP.
 - O ácido orótico é um intermediário na biossíntese dos nucleotídeos de pirimidinas.
 - Os seres humanos catabolizam uridina e pseudouridina por reações análogas.
 - A ribonucleotídeo-redutase converte nucleosídeos difosfato em desoxirribonucleosídeos difosfato correspondentes.
- Qual das afirmativas a seguir está INCORRETA?
 - Os distúrbios metabólicos são apenas raramente associados a defeitos no catabolismo das purinas.
 - As disfunções imunológicas estão associadas tanto a uma adenosina-desaminase defeituosa quanto a um nucleosídeo de purina-fosforilase defeituoso.
 - A síndrome de Lesch-Nyhan reflete um defeito na hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase.
 - A litíase por xantinas pode ocorrer devido a um defeito grave na xantina-oxidase.
 - A hiperuricemia pode ser resultado de condições como câncer, caracterizadas por aumento da renovação tecidual.
- Qual dos seguintes componentes são encontrados no DNA?
 - Um grupo fosfato, adenina e ribose.
 - Um grupo fosfato, guanina e desoxirribose.
 - Citosina e ribose.
 - Timina e desoxirribose.
 - Um grupo fosfato e adenina.
- A estrutura da molécula de DNA consiste em qual das seguintes?
 - Açúcares e bases nitrogenadas alternadas.
 - Apenas bases nitrogenadas.
 - Apenas grupos fosfatos.
 - Grupos fosfatos e açúcares alternados.
 - Apenas açúcares de cinco carbonos.
- As ligações que conectam os nucleotídeos do RNA e do DNA são denominadas:
 - Ligações N-glicosídicas.
 - Ligações 3'-5'-fosfodiéster.
 - Fosfomonoéster.
 - Ligações 2'-fosfodiéster.
 - Ligações peptídicas.
- Qual componente da dupla-hélice de DNA leva a molécula a ter carga líquida negativa em pH fisiológico?
 - Desoxirribose.
 - Ribose.
 - Grupos fosfato.
 - Íon cloreto.
 - Adenina.
- Qual característica molecular listada faz a dupla-hélice de DNA exibir largura quase constante ao longo do seu eixo longitudinal?
 - Uma base nitrogenada purínica sempre pareia com outra base nitrogenada purínica.
 - Uma base nitrogenada pirimidínica sempre pareia com outra base nitrogenada pirimidínica.
 - Uma base nitrogenada pirimidínica sempre pareia com uma base nitrogenada purínica.
 - A repulsão entre os grupos fosfato mantém as fitas a um intervalo de distância uniforme.
 - A atração entre os grupos fosfato mantém as fitas a um intervalo de distância uniforme.
- O modelo para a replicação do DNA proposto pela primeira vez por Watson e Crick postula que cada molécula-filha de DNA dupla-hélice recém-replicada:
 - É composta por duas fitas da molécula de DNA parental.
 - Contém unicamente as duas cadeias recém-sintetizadas de DNA.
 - Contém duas fitas que são misturas randômicas de DNA novo e parental em cada fita.
 - É composta por uma fita derivada da dupla-hélice de DNA original parental e uma fita recém-sintetizada.
 - É composta por sequências nucleotídicas completamente diferentes de qualquer cadeia de DNA dos pais.
- Nomeie o mecanismo pelo qual os RNAs são sintetizados a partir de DNA.
 - Duplicação replicacional.
 - Tradução.
 - Reparo translesão.
 - Transesterificação.
 - Transcrição.

12. Qual das forças ou interações listadas abaixo exercem função predominante na formação das estruturas secundária e terciária de RNA?
- Repulsão hidrofílica.
 - Formação de regiões de pares de bases complementares.
 - Interações hidrofóbicas.
 - Interações de van der Waals.
 - Formação de pontes salinas.
13. Nomeie a enzima que sintetiza RNA a partir de um molde de DNA de dupla-fita.
- RNA-polimerase dependente de RNA.
 - RNA-convertase dependente de DNA.
 - Replicase dependente de RNA.
 - RNA-polimerase dependente de DNA.
 - Transcriptase reversa.
14. Definir a característica mais notável no que diz respeito à expressão gênica entre eucariotos e procaríotos.
- Comprimento dos nucleotídeos do RNA ribossomal.
 - Mitocôndria.
 - Lisossomos e peroxissomos.
 - Apreensão do material genético no núcleo.
 - Clorofila.
15. Qual entrada abaixo descreve corretamente o número aproximado de pares de bases do DNA de _____, que estão separados em _____ cromossomos em uma célula humana diploide típica em estado não replicativo?
- 64 bilhões, 23.
 - 6,4 trilhões, 46.
 - 23 bilhões, 64.
 - 64 bilhões, 46.
 - 6,4 bilhões, 46.
16. Qual é o número aproximado de pares de bases associados a um único nucleossomo?
- 146.
 - 292.
 - 73.
 - 1.460.
 - 900.
17. Todas, exceto uma, as histonas seguintes são encontradas dentro da super-hélice formada entre o DNA e o octâmero de histonas; essa histona é:
- Histona H2B.
 - Histona H3.
 - Histona H1.
 - Histona H3.
 - Histona H4.
18. A cromatina pode ser amplamente definida como ativa e reprimida; uma subclasse de cromatina que é especificamente inativada em determinados momentos da vida do organismo e/ou em conjuntos específicos de células diferenciadas é denominada:
- Eucromatina constitutiva.
 - Heterocromatina facultativa.
 - Eucromatina.
 - Heterocromatina constitutiva.
19. Qual das alternativas sugere que o estado físico e funcional de uma certa região da cromatina genômica é dependente de padrões de modificações pós-traducionais de histonas específicas (PTMs), e/ou de estado de metilação do DNA?
- Código morse.
 - Hipótese PTM.
 - Hipótese de corpos nucleares.
 - Código epigenético.
 - Código genético.
20. Qual é o nome do trecho repetido incomum de DNA localizado nas pontas de todos os cromossomos eucarióticos?
- Cinetocoro.
 - Telômero.
 - Centríolo.
 - Cromômero.
 - Micrômero.
21. Uma vez que as DNA-polimerases são incapazes de sintetizar DNA na ausência de um iniciador, qual molécula serve de iniciador para as enzimas durante a replicação do DNA?
- Açúcares de cinco carbonos.
 - Apenas desoxirribose.
 - Uma molécula curta de RNA.
 - Proteínas com grupos hidroxil livres.
 - Fosfomonoésteres.
22. A síntese descontínua que ocorre durante a replicação do DNA é catalisada através da produção de pequenos segmentos de DNA, chamados de:
- Fragmentos de Okazaki.
 - Pedaços de Toshihiro.
 - Oligonucleotídeos de Onishi.
 - Fitas de Crick.
 - Fragmentos de Watson.
23. Qual molécula ou força fornece energia para aliviar a tensão mecânica causada pela DNA-girase?
- A conversão de pirimidina à purina.
 - Hidrólise de GTP.
 - Hidrólise de ATP.
 - Glicólise.
 - Uma molécula ou força de gradiente de próton.
24. Qual é o nome da fase do ciclo celular entre a conclusão da divisão celular e o início da síntese de DNA?
- G₁
 - S
 - G₂
 - M
 - G₀
25. Em qual estágio do ciclo celular estão as proteínas-quinase ativadas essenciais, como a cinase dependente de ciclina?
- Logo antes da mitose.
 - No início da fase S.
 - Próximo ao final da fase G₁.
 - Próximo ao final da fase G₂.
 - Todas acima.
26. Qual doença está frequentemente associada à falha na habilidade de uma célula de regular/controlar a sua própria divisão?
- Doença renal.
 - Câncer.
 - Enfisema.
 - Diabetes.
 - Doença cardíaca.

27. Qual é o mecanismo molecular responsável pela diminuição rápida na atividade de Cdk que leva a célula a sair da fase M e entrar na G₁?
- Queda na concentração de ciclina mitótica.
 - Diminuição da concentração da ciclina G₁.
 - Aumento na concentração da ciclina G₂.
 - Aumento da concentração da ciclina mitótica.
 - Aumento da concentração da ciclina G₁.
28. O local ao qual a RNA-polimerase se liga no molde de DNA, antes da iniciação da transcrição.
- Junção íntron/éxon.
 - Fase de leitura aberta do DNA.
 - Terminador.
 - Códon de início de metionina.
 - Promotor.
29. Os grandes genes de rRNA eucarióticos, como os genes que codificam os RNAs 18S e 28S, são transcritos por qual das RNA-polimerases a seguir:
- RNA-polimerase III.
 - RNA-polimerase dependente de RNA.
 - RNA-polimerase I.
 - RNA-polimerase II.
 - RNA-polimerase mitocondrial.
30. Todas as RNAs-polimerases eucarióticas requerem uma grande variedade de proteínas acessórias que lhes permitem ligar promotores e formar complexos de transcrição fisiologicamente relevantes; essas proteínas são chamadas de:
- Fatores de transcrição basais ou gerais.
 - Ativadores.
 - Fatores acessórios.
 - Fatores de alongamento.
 - Polipeptídeos facilitadores.
31. O segmento de DNA a partir do qual o transcrito primário é copiado ou transcrito é chamado de:
- Fita codificadora.
 - Domínio metionina iniciador.
 - Unidade de tradução.
 - Transcriptoma.
 - Códon de início.
32. A qual classe de DNA os rDNA cistrons eucarióticos pertencem?
- DNA de cópia única.
 - DNA altamente repetitivo.
 - DNA moderadamente repetitivo.
 - DNA de sequência mista.
33. As modificações dos nucleotídeos dos pré-tRNAs, pré-rRNAs e pré-mRNAs ocorrem:
- Pós-prandialmente.
 - Pós-mitoticamente.
 - Pré-transcricionalmente.
 - Pós-transcricionalmente.
 - Prematuramente.
34. Os promotores da RNA-polimerase II estão localizados em que lado da unidade transcricional?
- Interna.
 - 3' a jusante.
 - O mais próximo do C-terminal.
 - O mais próximo do N-terminal.
 - 5' a montante.
35. Em relação aos mRNA eucarióticos, uma das propriedades a seguir não é normal nos mRNAs.
- Os mRNAs eucarióticos possuem modificações especiais nas extremidades 5' (cap) e 3' (cauda poli [A]).
 - Eles são ligados aos ribossomos quando são traduzidos.
 - Eles são encontrados no citoplasma dentro de peroxissomos.
 - A maior parte possui um segmento não codificador significativo que não direciona a adição de aminoácidos.
 - Eles contêm sequências nucleotídicas contínuas que codificam um polipeptídeo em particular.
36. A ligação que conecta o nucleotídeo de iniciação do mRNA à estrutura Cap 5_{me}-G é uma:
- 3'-5' ligação fosfodiéster.
 - 5'-5' ligação trifosfato.
 - 3'-3' ligação trifosfato.
 - 3'-5' ligação trifosfato.
 - 5'-3' ligação trifosfato.
37. Qual sequência característica de mRNAs maduros listada abaixo protege os mRNAs da degradação?
- Modificações pós-traducionais especiais.
 - Cauda 3' Poli(C)_n.
 - Cap 5_{me}-G.
 - Íntrons.
 - Estruturas Lariat.
38. Quais poderiam ser as consequências do processamento impreciso do mRNA para o RNA?
- Um único erro de base em uma junção de processamento causará uma grande deleção.
 - Um único erro de base em uma junção de processamento causará uma grande inserção.
 - Um único erro de base em uma junção de processamento causará uma grande inversão.
 - C e E.
 - Um único erro de base em uma junção de processamento mudará a fase de leitura e resultará na tradução errônea do mRNA.
39. Qual é o complexo macromolecular que se associa com os íntrons durante o processamento do mRNA?
- Splicer.
 - Dicer.
 - Corpo nuclear.
 - Spliceossomo.
 - Slicer.
40. Que reação a transcriptase reversa catalisa?
- Tradução do RNA em DNA.
 - Transcrição do DNA em RNA.
 - Conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos.
 - Transcrição de RNA em DNA.
 - Conversão de um ribonucleotídeo a desoxinucleotídeos na dupla-fita de DNA.
41. O RNA de interferência mediado por RNAi ou dsRNA medeia:
- Ligação de RNA.
 - Processamento de RNA.
 - Inversão de RNA.
 - Restauração de RNA.
 - Repressão de RNA.

42. Enquanto o código genético tem 64 códons, existem apenas 20 aminoácidos de ocorrência natural. Consequentemente, alguns aminoácidos são codificados por mais de um códon. Esta característica é uma ilustração do código genético sendo:
- Degenerado.
 - Duplicativo.
 - Não sobreponível.
 - Sobreponível.
 - Redundante.
43. O código genético contém ____ códons de término.
- 3
 - 21
 - 61
 - 64
 - 20
44. Se um tRNA possui a sequência 5'-CAU-3' qual códon ele reconheceria (ignore o pareamento oscilante de bases)
- 3'-UAC-5'
 - 3'-AUG-5'
 - 5'-ATG-3'
 - 5'-AUC-3'
 - 5'-AUG-3'
45. O que está na extremidade 3' de todos os tRNAs funcionais e maduros?
- A alça em trevo.
 - O anticódon.
 - A sequência CCA.
 - O códon.
46. A maioria das aminoácil-tRNA-sintases possui uma atividade que é compartilhada com as DNA-polimerases. Essa atividade é a função _____.
- Revisão.
 - Hidrogenase.
 - Proteolítica.
 - Helicase.
 - Endonucleolítica.
47. As três fases distintas do processo de síntese proteica na ordem CORRETA são:
- Iniciação, terminação, alongamento.
 - Terminação, iniciação, alongamento.
 - Iniciação, alongamento, terminação.
 - Alongamento, iniciação, terminação.
 - Alongamento, terminação, iniciação.
48. Qual é o aminoácido de iniciação para, essencialmente, todas as proteínas?
- Cisteína.
 - Treonina.
 - Triptofano.
 - Metionina.
 - Ácido glutâmico.
49. O tRNA iniciador é posicionado dentro do complexo 80S ativo em qual dos três "sítios" ribossômicos canônicos durante a síntese proteica?
- Sítio E.
 - Sítio I.
 - Sítio P.
 - Sítio A.
 - Sítio de ligação do fator de liberação.
50. Nomeie a enzima que forma a ligação peptídica durante a síntese proteica e defina a sua composição química.
- Pepsintase, proteína.
 - Peptidil-transferase, RNA.
 - Peptidase, glicolípido.
 - Peptidil-transferase, proteína
 - GTPase, glicopeptídeo.
51. As mutações no meio de uma fase aberta de leitura que criam um códon de término são chamadas de:
- Mutação de mudança de fase.
 - Mutação de troca de sentido.
 - Mutação não sem sentido.
 - Mutação pontual.
 - Mutação sem sentido.
52. Qual é a direção da síntese de um polipeptídeo?
- Direção C-terminal para N-terminal.
 - Direção N-terminal para 3'.
 - Direção N-terminal para C-terminal.
 - Direção 3' para 5'.
 - Direção 5' para 3'.
53. Qual dos elementos *cis* a seguir reside, geralmente, adjacente ou sobreposto a muitos promotores procarióticos?
- Gene regulador.
 - Gene(s) estruturais.
 - Repressor.
 - Operador.
 - Terminador.
54. Qual é o termo aplicado a um segmento de um cromossomo bacteriano em que genes que codificam enzimas de uma via metabólica em particular são reunidos e submetidos a um controle coordenado?
- Óperon.
 - Operador.
 - Promotor.
 - Controlador de terminação.
 - Origem.
55. Qual é o termo aplicado à coleção completa de proteínas presentes em um tipo celular em particular?
- Genoma.
 - Coleção de peptídeos.
 - Transcriptoma.
 - Translatoma.
 - Proteoma.
56. Como a formação do nucleossomo no DNA genômico afeta as fases de iniciação e/ou alongamento da transcrição?
- Os nucleossomos inibem o acesso das enzimas envolvidas em todas as fases da transcrição.
 - Os nucleossomos recrutam histonas e enzimas modificadoras de DNA, e a ação dessas enzimas recrutadas afetam o acesso de proteínas de transcrição ao DNA.
 - Os nucleossomos induzem a degradação do DNA no local em que o DNA contata as histonas.
 - Os nucleossomos não possuem efeitos significativos sobre a transcrição.
57. Quais tipos de moléculas interagem com o mRNA eucariótico no local do promotor central para facilitar a associação da RNA-polimerase II?

- A. Fatores de terminação.
B. Fatores de transcrição de sequência específica (transativadores).
C. Fatores de alongamento.
D. GTPases.
E. Fatores de transcrição geral ou basal (GTFs).
58. A maioria dos fatores de transcrição contém pelo menos dois domínios, cada um deles medeia aspectos diferentes da função do fator de transcrição; esses domínios são:
- A. Domínio de ligação ao RNA e domínio de repressão.
B. Domínio de ativação e domínio de repressão.
C. Domínio de ligação ao DNA e domínio de ativação.
D. Domínio de ligação ao DNA e domínio de ligação ao ligante.
E. Domínio de ligação ao RNA e domínio de ativação.
59. Os fatores de transcrição ligados a potenciadores estimulam a iniciação da transcrição no promotor central ligado a elemento *cis* através da ação de intermediários de chamados:
- A. Coativadores.
B. Proteínas co-transcricionais.
C. Correpressores.
D. Receptores.
E. Coordenadores.
60. Qual reação entre proteínas de transcrição expande consideravelmente a diversidade dos fatores reguladores que podem ser gerados a partir de um pequeno número de polipeptídeos?
- A. Recombinação.
B. Homodimerização.
C. Heterozigiosidade.
D. Heterodimerização.
E. Trimerização.
61. A região gênica contendo a TATA *box* e que se estende até o local de iniciação da transcrição é frequentemente chamada de _____.
- A. Local da polimerase.
B. Iniciador.
C. Seletor inicial.
D. Promotor central.
E. Operador.
62. Qual dos possíveis mecanismos a seguir de como os potenciadores podem estimular a transcrição de grandes distâncias se acredita, atualmente, que possa estar CORRETO?
- A. Os potenciadores podem excisar reversivelmente o DNA interveniente entre os potenciadores e os promotores.
B. A RNA-polimerase II liga-se avidamente às sequências potenciadoras.
C. Os potenciadores desenrolam o DNA.
D. Os potenciadores podem procurar ao longo da cadeia de DNA e se ligar diretamente ao promotor central associado.
E. Os potenciadores e os promotores centrais são colocados muito próximos através da formação de uma alça no DNA mediada por proteínas de ligação ao DNA.
63. Qual dos aminoácidos das histonas são geralmente acetilados?
- A. Lisina.
B. Arginina.
C. Asparagina.
D. Histidina.
E. Leucina.
64. Coloque as etapas seguintes em ordem; quais são as etapas que ocorrem sequencialmente durante o evento da ativação da transcrição após a ligação de um fator de transcrição ao seu local de ligação ativador cognato no DNA genômico?
1. O complexo de remodelagem da cromatina se liga às histonas centrais na região-alvo.
2. As ações combinadas dos diversos complexos moleculares aumentam a acessibilidade do promotor à maquinaria transcricional.
3. O ativador recruta um coativador para a região da cromatina que é alvo de transcrição.
4. A maquinaria transcricional associa-se no local onde a transcrição será iniciada.
5. O coativador acetila as histonas centrais próximas dos nucleossomos.
- A. 1 – 2 – 3 – 4 – 5
B. 3 – 1 – 5 – 2 – 4
C. 3 – 5 – 1 – 2 – 4
D. 5 – 3 – 1 – 2 – 4
E. 3 – 5 – 1 – 4 – 2
65. Qual estratégia na pesquisa sobre fatores de transcrição permite a identificação simultânea de todos os sítios genômicos ligados a um determinado fator de transcrição em um determinado conjunto de condições fisiológicas?
- A. Mapeamento de deleções sistemáticas.
B. Sensibilidade da DNase I.
C. Sequenciamento da cromatina imunoprecipitada (ChIP-seq).
D. FISH.
E. Microscopia de fluorescência.
66. Qual sequência se estende entre o Cap 5'-metilguanossina presente nos mRNAs eucarióticos e o códon de início AUG?
- A. Códon de término.
B. Último éxon.
C. Último íntron.
D. 3' UTR.
E. 5' UTR.
67. Quais das características a seguir dos mRNAs eucarióticos contribuem significativamente para o tempo de meia-vida da mensagem?
- A. Sequências 5' UTR.
B. O promotor.
C. O operador.
D. 3' UTR e cauda poli(A).
E. O primeiro íntron.

Membranas: estrutura e função

Robert K. Murray, M.D., Ph.D. e P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Saber que as membranas biológicas são principalmente constituídas de uma bicamada lipídica e de proteínas e glicoproteínas associadas. Os principais lipídeos são os fosfolipídeos, o colesterol e os glicosfingolipídeos.
- Reconhecer que as membranas são estruturas dinâmicas e assimétricas, que contêm uma mistura de proteínas integrais e periféricas.
- Conhecer o modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana e saber que ele é amplamente aceito, com estruturas especializadas que consistem em balsas lipídicas, cavéolas e junções oclusivas.
- Compreender os conceitos de difusão passiva, difusão facilitada, transporte ativo, endocitose e exocitose.
- Reconhecer que os transportadores, os canais iônicos, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, os receptores e as junções comunicantes são protagonistas importantes da função da membrana.
- Saber que diversos distúrbios resultam de anormalidades na estrutura e na função das membranas, incluindo hipercolesterolemia familiar, fibrose cística, esferocitose hereditária e muitos outros distúrbios.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As membranas são estruturas dinâmicas e altamente fluidas, que consistem em uma dupla camada lipídica e proteínas associadas. As **membranas plasmáticas** formam compartimentos fechados em torno do citoplasma para delimitar as células. A membrana plasmática apresenta **permeabilidades seletivas** e atua como barreira, mantendo, assim, as diferenças de composição entre os meios interno e externo da célula. A permeabilidade seletiva da membrana a moléculas é gerada pela ação de **transportadores** específicos e **canais iônicos**. A membrana plasmática também realiza a troca de materiais com o meio extracelular por **exocitose** e **endocitose**, e existem áreas especiais na estrutura da membrana – **junções comunicantes** – através das quais as células adjacentes trocam materiais. Além disso,

a membrana plasmática desempenha funções essenciais nas **interações célula a célula** e na **sinalização transmembrana**.

As membranas também formam **compartimentos especializados** no interior da célula. Essas membranas intracelulares ajudam a **dar forma** a muitas das estruturas morfológicamente distinguíveis (organelas), como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático (RE), o aparelho de Golgi, os grânulos secretores, os lisossomos e o núcleo. As membranas localizam **enzimas**, atuam como elementos integrantes na **relação estímulo-resposta** e constituem locais de **transdução de energia**, como na fotossíntese (cloroplastos) e na fosforilação oxidativa (mitocôndrias).

A ocorrência de **mudanças** nos componentes da membrana pode afetar o balanço hídrico e o fluxo de íons e, portanto, vários processos intracelulares. As deficiências ou alterações

específicas de determinados componentes da membrana (p. ex., causadas por mutações de genes que codificam proteínas da membrana) levam a uma variedade de **doenças** (ver Tabela 40-7). Em resumo, a função celular normal depende de membranas normais.

A MANUTENÇÃO DE UM AMBIENTE NORMAL INTRACELULAR E EXTRACELULAR É FUNDAMENTAL À VIDA

A vida originou-se em um ambiente aquoso; as reações enzimáticas e os processos celulares e subcelulares foram desenvolvidos, portanto, para funcionar nesse ambiente, circunscrito no interior de uma célula.

A água interna do organismo está compartimentalizada

A água constitui cerca de **60%** da massa corporal magra do corpo humano e se distribui em dois grandes compartimentos.

Líquido intracelular (LIC)

Esse compartimento representa **dois terços** da água corporal total e fornece um ambiente especializado para a célula (1) produzir, armazenar e utilizar energia; (2) realizar seu próprio reparo; (3) replicar-se; e (4) desempenhar funções celulares específicas.

Líquido extracelular (LEC)

Esse compartimento contém cerca de **um terço** da água corporal total e está distribuído entre o plasma e os compartimentos intersticiais. O líquido extracelular é um **sistema de distribuição**. Ele traz nutrientes (p. ex., glicose, ácidos graxos e aminoácidos), oxigênio, vários íons e oligoelementos às células, bem como uma variedade de moléculas reguladoras (hormônios) que coordenam as funções de células amplamente distantes umas das outras. O líquido extracelular **remove** CO₂, bem como produtos de degradação metabólica e compostos tóxicos ou substâncias destoxificadas provenientes do ambiente celular imediato.

TABELA 40-1 Comparação das concentrações médias de várias moléculas fora e dentro de uma célula de mamífero

Substância	Líquido extracelular	Líquido intracelular
Na ⁺	140 mmol/L	10 mmol/L
K ⁺	4 mmol/L	140 mmol/L
Ca ²⁺ (livre)	2,5 mmol/L	0,1 mmol/L
Mg ²⁺	1,5 mmol/L	30 mmol/L
Cl ⁻	100 mmol/L	4 mmol/L
HCO ₃ ⁻	27 mmol/L	10 mmol/L
PO ₄ ³⁻	2 mmol/L	60 mmol/L
Glicose	5,5 mmol/L	0-1 mmol/L
Proteína	2 g/dL	16 g/dL

As composições iônicas dos líquidos intracelular e extracelular diferem acentuadamente

Conforme observado na **Tabela 40-1**, o **ambiente interno** é rico em K⁺ e Mg²⁺, sendo o fosfato o principal ânion inorgânico. O citosol das células contém elevada concentração de proteína, que atua como importante tampão intracelular. O **líquido extracelular** caracteriza-se por elevada concentração de Na⁺ e Ca²⁺, sendo o Cl⁻ o principal ânion. Essas diferenças iônicas são mantidas devido às várias membranas encontradas nas células. Essas membranas possuem composições únicas de lipídeos e proteínas. Uma fração dos constituintes proteicos das proteínas de membrana é especializada em gerar e manter as composições iônicas diferenciais dos compartimentos extracelulares e intracelulares.

AS MEMBRANAS SÃO ESTRUTURAS COMPLEXAS FORMADAS POR LIPÍDEOS, PROTEÍNAS E MOLÉCULAS CONTENDO CARBOIDRATOS

São analisadas principalmente as membranas encontradas nas células eucarióticas, embora muitos dos princípios descritos também se apliquem às membranas dos procariotos. As diversas membranas celulares apresentam diferentes composições

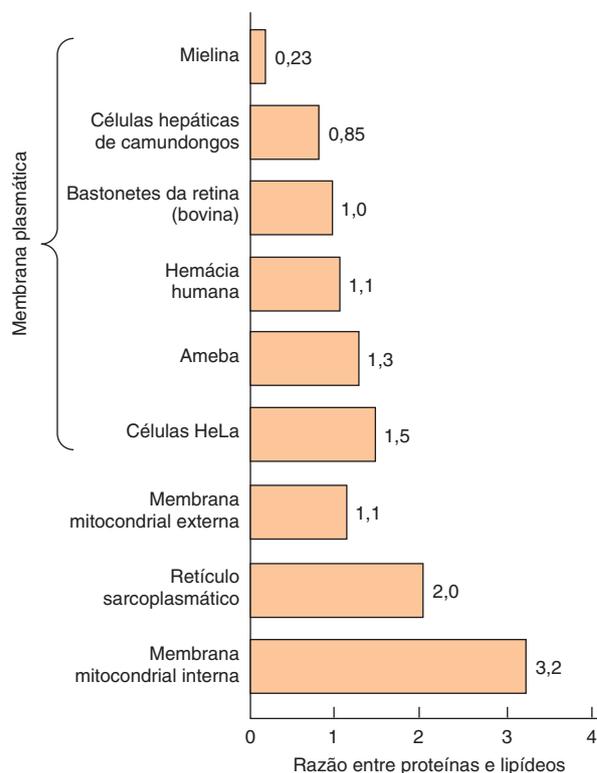


FIGURA 40-1 O conteúdo proteico da membrana é altamente variável. A quantidade de proteínas iguala-se à quantidade de lipídeos ou a excede em quase todas as membranas. A exceção notável é a mielina, um isolante elétrico encontrado em muitas fibras nervosas.

de lipídeos (ver a seguir) e proteínas. A proporção de proteínas e lipídeos nas diferentes membranas está mostrada na **Figura 40-1** e é responsável pelas divergentes funções das organelas celulares. As membranas são estruturas fechadas semelhantes a lâminas, que consistem em uma bicamada lipídica assimétrica, com superfícies interna e externa distintas ou folhetos. Essas estruturas e superfícies são conjuntos laminares não covalentes repletos de proteínas que se formam espontaneamente na água devido à natureza anfipática de lipídeos e proteínas contidos no interior da membrana.

Os principais lipídeos nas membranas dos mamíferos são os fosfolipídeos, os glicosíngolipídeos e o colesterol

Fosfolipídeos

Das duas classes principais de fosfolipídeos presentes nas membranas, os **fosfoglicerídeos** são os mais comuns e consistem em uma estrutura de glicerol à qual estão ligados dois ácidos graxos por ligações ésteres e um álcool (**Figura 40-2**). Em geral, os **ácidos graxos** constituintes são moléculas com números pares de carbonos, contendo, geralmente, 16 ou 18 átomos de carbono. Eles não são ramificados e podem ser saturados ou não com uma ou mais ligações duplas. O fosfoglicerídeo mais simples é o **ácido fosfatídico**, um 1,2-diacilglicerol-3-fosfato, um intermediário essencial na formação de outros fosfoglicerídeos (ver Capítulo 24). Na maioria dos fosfoglicerídeos existentes nas membranas, o 3-fosfato é esterificado em um **álcool**, como colina, etanolamina, glicerol, inositol ou serina (ver Capítulo 21). Em geral, a fosfatidilcolina constitui o principal fosfoglicerídeo por massa nas membranas das células humanas.

A segunda classe principal de fosfolipídeos é constituída de **esfingomielina** (ver Figura 21-13), um fosfolipídeo que contém uma estrutura de esfingosina em lugar de glicerol. Um ácido graxo está ligado ao grupo amino da esfingosina por uma ligação amida, formando a **ceramida**. Quando o grupo hidroxil primário da esfingosina é esterificado em fosforilcolina, forma-se a esfingomielina. Como o nome sugere, a esfingomielina é abundante nas bainhas de mielina.

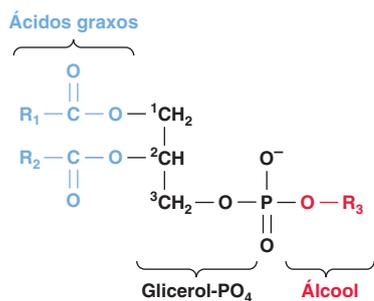


FIGURA 40-2 Um fosfoglicerídeo exibindo os ácidos graxos (R_1 e R_2), o glicerol e um componente de álcool fosforilado. Em geral, os ácidos graxos saturados estão ligados ao carbono 1 do glicerol, e os ácidos graxos insaturados, ao carbono 2. No ácido fosfatídico, R_3 é o hidrogênio.

Glicosíngolipídeos

Os glicosíngolipídeos (GSLs) são lipídeos que contêm açúcares construídos em uma estrutura de **ceramida**. Os GSLs incluem **galactosil** e **glicosil-ceramidas** (cerebrosídeos) e os **gangliosídeos** (ver estruturas no Capítulo 21), localizando-se principalmente nas membranas plasmáticas das células, expondo seus componentes glicídicos para o meio extracelular.

Esteróis

O esteroide mais comum nas membranas das células animais é o **colesterol** (ver Capítulo 21). A maior parte do colesterol encontra-se no interior das **membranas plasmáticas**, porém pequenas quantidades são encontradas nas membranas das mitocôndrias, do aparelho de Golgi e do núcleo. O colesterol fica intercalado entre os fosfolipídeos da membrana, com seu grupamento hidrofílico hidroxil na interface aquosa, e o restante da molécula fica mergulhado no interior do folheto da bicamada lipídica. Do ponto de vista nutricional, é importante saber que o colesterol não ocorre nas plantas.

Os lipídeos podem ser separados uns dos outros e quantificados por técnicas como a cromatografia de coluna, em camada fina e líquido-gasosa, e suas estruturas são estabelecidas por espectrometria de massas e outras técnicas (ver Capítulo 4).

Os lipídeos da membrana são anfipáticos

Todos os lipídeos principais das membranas contêm regiões hidrofóbicas e hidrofílicas e, por conseguinte, são conhecidos como **anfipáticos**. Se a região hidrofóbica fosse separada do restante da molécula, ela seria insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. Por outro lado, se a região hidrofílica estivesse separada do restante da molécula, ela seria insolúvel em solventes orgânicos, mas solúvel em água. A natureza anfipática de um fosfolipídeo está representada na **Figura 40-3**, bem como na Figura 21-24. Assim, os **grupos de cabeças polares** dos fosfolipídeos e o grupo hidroxil do colesterol ficam na interface com o ambiente aquoso; uma situação semelhante é observada com as **porções glicídicas** das GSLs (ver a seguir).

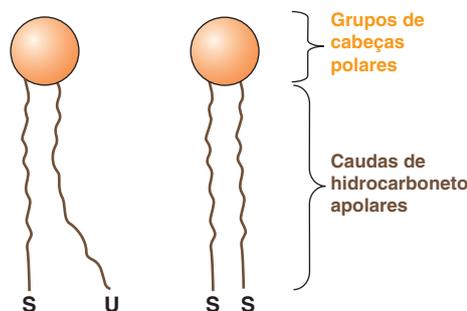


FIGURA 40-3 Representação diagramática de um fosfolipídeo ou outro lipídeo de membrana. O grupo da cabeça polar é hidrofílico, ao passo que as caudas de hidrocarbonetos são hidrofóbicas ou lipofílicas. Os ácidos graxos nas caudas são saturados (S) ou insaturados (I); os primeiros estão geralmente ligados ao carbono 1 do glicerol, e os últimos, ao carbono 2 (ver Figura 40-2). Observe a torção da cauda do ácido graxo insaturado (I), que é importante para conferir à membrana um aumento de fluidez.

Os **ácidos graxos saturados** possuem caudas retas, ao passo que os **ácidos graxos insaturados**, que geralmente ocorrem na forma *cis* nas membranas, possuem caudas “torcidas” (Figura 40-3; ver também Figuras 21-1 e 21-6). Enquanto o número de ligações duplas nas cadeias laterais dos lipídeos aumenta, o número de torções nas caudas aumenta. Como consequência, os lipídeos da membrana apresentam uma disposição mais frouxa e a membrana torna-se mais fluida. O problema causado pela presença dos **ácidos graxos trans** nos lipídeos de membranas está descrito no Capítulo 21.

Os **detergentes** são moléculas anfipáticas importantes em bioquímica bem como no ambiente doméstico. A estrutura molecular de um detergente não é diferente da estrutura de um fosfolipídeo. Certos detergentes são amplamente usados para **solubilizar** e purificar proteínas de membrana. A extremidade hidrofóbica do detergente liga-se às regiões hidrofóbicas das proteínas, deslocando a maior parte dos lipídeos ligados. A extremidade polar do detergente é livre, causando a formação de complexos detergente-proteína pelas proteínas em solução, geralmente contendo também alguns lipídeos residuais.

Os lipídeos da membrana formam bicamadas

O caráter anfipático dos fosfolipídeos sugere que as duas regiões da molécula apresentam solubilidades incompatíveis. Entretanto, em um solvente como a água, os fosfolipídeos organizam-se espontaneamente em **micelas** (Figura 40-4 e Figura 21-24), um conjunto que satisfaz termodinamicamente as exigências de solubilidade das duas regiões quimicamente distintas das moléculas. No interior da micela, as regiões hidrofóbicas dos fosfolipídeos anfipáticos estão protegidas da água, ao passo que os grupos polares hidrofílicos estão imersos no ambiente aquoso. As micelas, em geral, apresentam dimensões relativamente pequenas (p. ex., cerca de 200 nm) e, por isso, são limitadas no seu potencial de formação de membranas. De modo geral, os detergentes formam micelas.

Os fosfolipídeos e as moléculas anfipáticas semelhantes podem formar outra estrutura, a **bicamada lipídica bimolecular**, que também satisfaz as exigências termodinâmicas de moléculas

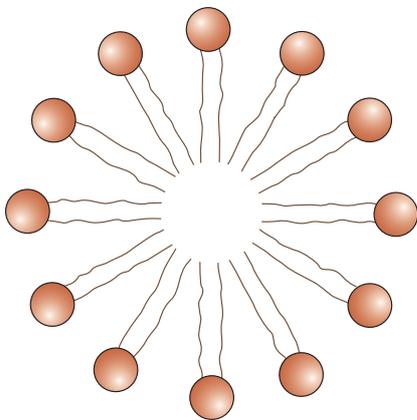


FIGURA 40-4 Seção transversal diagramática de uma micela. Os grupos de cabeças polares estão banhados em água, ao passo que as caudas hidrofóbicas de hidrocarboneto são circundadas por outros hidrocarbonetos e, portanto, ficam protegidas da água. As micelas são estruturas esféricas relativamente pequenas (em comparação com as bicamadas lipídicas).

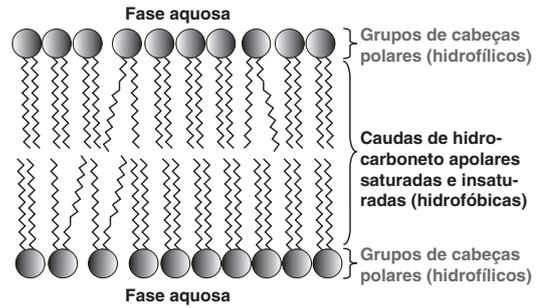


FIGURA 40-5 Diagrama de um corte de uma membrana de bicamada formada por fosfolipídeos. As caudas de ácidos graxos insaturados são torcidas e proporcionam maior espaço entre os grupos de cabeças polares, possibilitando, assim, maior amplitude de movimento. Isso, por sua vez, resulta em aumento de fluidez da membrana.

anfipáticas em um ambiente aquoso. As bicamadas constituem as estruturas fundamentais das membranas biológicas e ocorrem na forma de lâminas, nas quais as regiões hidrofóbicas dos fosfolipídeos ficam isoladas do ambiente aquoso, ao passo que as regiões hidrofílicas são expostas à água (Figura 40-5 e Figura 21-24). As extremidades ou bordas da lâmina em bicamada podem ser eliminadas pelo dobramento da lâmina sobre si mesma, formando uma vesícula fechada sem bordas. A bicamada fechada responde por uma das propriedades mais essenciais das membranas. A bicamada lipídica é **impermeável à maioria das moléculas hidrossolúveis**, visto que essas moléculas carregadas seriam insolúveis no núcleo hidrofóbico da bicamada. A **auto-organização das bicamadas lipídicas** é direcionada pelo **efeito hidrofóbico** (ver Capítulo 2). Quando as moléculas lipídicas se reúnem em uma bicamada, a entropia das moléculas de solvente circundantes aumenta devido à liberação da água imobilizada.

Dois questões surgem a partir da consideração das informações descritas anteriormente. Inicialmente, quantas moléculas biologicamente importantes são **lipossolúveis** e conseguem, portanto, penetrar com facilidade na célula? Os gases, como o oxigênio, o CO_2 e o nitrogênio – moléculas pequenas com pouca interação com solventes –, difundem-se facilmente através das regiões hidrofóbicas da membrana. Os **coeficientes de permeabilidade** de vários íons e de várias outras moléculas em uma bicamada lipídica são apresentados na Figura 40-6. Os eletrólitos Na^+ , K^+ e Cl^- atravessam a bicamada muito mais lentamente do que a água. Em geral, os coeficientes de permeabilidade das moléculas pequenas em uma bicamada lipídica **correlacionam-se com suas solubilidades em solventes apolares**. Por exemplo, os **esteroides** atravessam mais facilmente a bicamada lipídica do que os eletrólitos. O alto coeficiente de permeabilidade da própria **água** é surpreendente, porém é explicado, em parte, pelo seu pequeno tamanho e por sua relativa ausência de carga. Muitos **fármacos** são hidrofóbicos e podem atravessar facilmente as membranas e penetrar nas células.

A segunda questão refere-se às **moléculas não lipossolúveis**. Como são mantidos os gradientes de concentração transmembrana para essas moléculas? A resposta é que as **membranas contêm proteínas**, muitas das quais atravessam a bicamada lipídica. Essas proteínas formam **canais** para o movimento de íons e pequenas moléculas ou funcionam como **transportadores** para

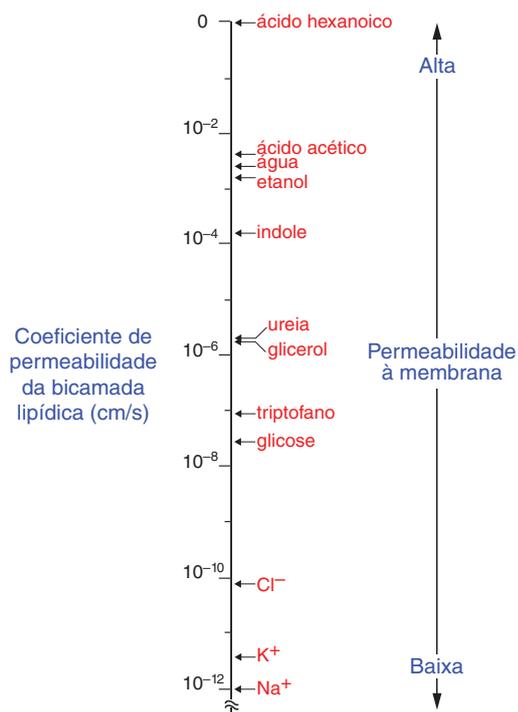


FIGURA 40-6 Coeficientes de permeabilidade da água, de alguns íons e de outras moléculas pequenas nas membranas de bicamadas lipídicas. O coeficiente de permeabilidade é uma medida da capacidade de uma molécula de se difundir através de uma barreira de permeabilidade. As moléculas que atravessam rapidamente determinada membrana apresentam alto coeficiente de permeabilidade.

moléculas que, de outro modo, não conseguiriam atravessar a bicamada lipídica (membrana). A natureza, as propriedades e as estruturas dos canais e dos transportadores de membrana são descritos a seguir.

As proteínas de membrana estão associadas à bicamada lipídica

Os **fosfolípidos** da membrana atuam como solvente para as proteínas de membrana, criando um ambiente no qual essas proteínas podem funcionar. Conforme descrito no Capítulo 5, a **estrutura α -helicoidal das proteínas** minimiza a natureza hidrofílica das próprias ligações peptídicas. Desse modo, as proteínas podem ser anfipáticas e formar parte integral da membrana pela presença de regiões hidrofílicas que penetram nas superfícies interna e externa da membrana, mas que estão conectadas a uma região hidrofóbica que atravessa o núcleo hidrofóbico da dupla camada. Na verdade, as regiões das proteínas de membrana que atravessam as membranas contêm uma quantidade substancial de aminoácidos hidrofóbicos e quase sempre apresentam alto conteúdo α -helicoidal. No caso da maioria das membranas, um trecho de cerca de 20 aminoácidos em uma configuração de α -hélice se estenderá sobre a bicamada lipídica.

É possível calcular se uma determinada sequência de aminoácidos presente em uma proteína é compatível com uma **localização transmembrana**. Isso pode ser feito ao se consultar uma tabela que relaciona as hidrofobicidades de cada um dos 20 aminoácidos comuns e os valores de energia livre para a sua transferência do interior de uma membrana para

a água. Os aminoácidos hidrofóbicos possuem valores positivos; os aminoácidos polares possuem valores negativos. Os valores de energia livre total para a transferência de sequências sucessivas de 20 aminoácidos na proteína são representados graficamente, representando o denominado **gráfico de hidropatia**. Os valores acima de 20 kcal mol⁻¹ são compatíveis com a interpretação de que a sequência hidrofóbica é um segmento transmembrana, embora não a comprovem.

Outro aspecto da interação entre lipídeos e proteínas é o fato de algumas proteínas estarem ancoradas a um folheto da bicamada lipídica por ligações covalentes com determinados lipídeos; esse processo é denominado **lipidação proteica**. A lipidação pode ocorrer nas terminações proteicas (N- ou C-) ou internamente. Os eventos comuns da lipidação proteica são: **isoprenilação** na porção C-terminal da proteína, **adição de colesterol** e **glicofosfatidilinositol (GPI; ver Capítulo 46)**; **miristoilação** da porção N-terminal da proteína e **S-prenilação** da cisteína interna e **S-acilação**. A lipidação ocorre apenas em uma subpopulação específica de proteínas.

Diferentes membranas apresentam composições distintas de proteínas

A **quantidade de proteínas diferentes** em uma membrana varia de menos de uma dúzia no retículo sarcoplasmático das células musculares a centenas nas membranas plasmáticas. As proteínas são as **principais moléculas funcionais** das membranas e consistem em **enzimas, bombas e transportadores, canais, componentes estruturais, antígenos** (p. ex., para histocompatibilidade) e **receptores** para várias moléculas. Como cada tipo de membrana possui um complemento diferente de proteínas, não existe uma estrutura de membrana típica. As enzimas associadas às várias membranas diferentes são apresentadas na **Tabela 40-2**.

As membranas são estruturas dinâmicas

As membranas e seus componentes são **estruturas dinâmicas**. Os lipídeos e as proteínas de membrana sofrem renovação, assim como o fazem em outros compartimentos da célula. Os diversos lipídeos apresentam diferentes taxas de renovação, e as taxas de renovação de espécies distintas de proteínas

TABELA 40-2 Marcadores enzimáticos de diferentes membranas^a

Membrana	Enzima
Plasmática	5'-Nucleotidase Adenilato-ciclase Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
Retículo endoplasmático	Glicose-6-fosfatase
Aparelho de Golgi	
<i>Cis</i>	GlcNAC-transferase I
Medial	Golgi-manosidase II
<i>Trans</i>	Galactosil-transferase
Rede de Golgi <i>trans</i>	Sialil-transferase
Membrana mitocondrial interna	ATP-sintase

^aAs membranas contêm diversas proteínas, e algumas delas possuem atividade enzimática. Algumas dessas enzimas estão localizadas apenas em determinadas membranas e, portanto, podem ser utilizadas como marcadores para acompanhar a purificação dessas membranas.

de membrana podem variar amplamente. Em alguns casos, a própria membrana pode sofrer renovação ainda mais rapidamente do que qualquer um de seus componentes. Essa característica é discutida de modo mais detalhado na seção sobre endocitose.

Outro indicador da natureza dinâmica das membranas é o fato de diversos estudos demonstrarem que os lipídeos e algumas proteínas sofrem **difusão lateral** no plano de suas membranas. Algumas proteínas imóveis não exibem difusão lateral, visto que elas estão ancoradas ao citoesqueleto de actina subjacente. Por outro lado, o movimento **transversal** dos lipídeos através das membranas (*flip-flop*) é extremamente lento (ver adiante) e não parece ocorrer de forma notável no caso das proteínas de membrana.

As membranas são estruturas assimétricas

As proteínas assumem orientações singulares nas membranas, de modo que as **superfícies externas são diferentes das superfícies internas**. Uma **assimetria entre o lado interno e o lado externo** também é assegurada pela localização externa dos carboidratos ligados às proteínas da membrana. Além disso, existem proteínas específicas que estão localizadas exclusivamente no lado externo ou interno das membranas.

Também são observadas **heterogeneidades regionais** nas membranas. Algumas, como as que ocorrem nas bordas vilosas das células da mucosa, são quase visíveis ao exame macroscópico. Outras, como aquelas das junções comunicantes, das junções oclusivas e das sinapses, ocupam regiões muito menores da membrana e produzem assimetrias locais correspondentemente menores.

Também existe uma **assimetria dos fosfolipídeos** entre os lados interno e externo. Os **fosfolipídeos que contêm colina** (fosfatidilcolina e esfingomielina) estão localizados principalmente na **lâmina externa**; os **aminofosfolipídeos** (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) localizam-se preferencialmente na **lâmina interna**. Naturalmente, para que exista essa assimetria, deve haver uma mobilidade transversal (*flip-flop*) limitada dos fosfolipídeos da membrana. Na verdade, os fosfolipídeos em bicamadas sintéticas exibem uma **taxa extraordinariamente lenta de flip-flop**; a meia-vida da assimetria nessas bicamadas sintéticas está em torno de algumas semanas.

Os mecanismos envolvidos no **estabelecimento da assimetria dos lipídeos** não estão bem elucidados. As enzimas envolvidas na síntese dos fosfolipídeos estão localizadas no lado citoplasmático das vesículas de membrana microsomais. Existem translocases (**flipases**) que transferem determinados fosfolipídeos (p. ex., fosfatidilcolina) da lâmina interna para a externa. **Proteínas específicas que se ligam preferencialmente** a determinados fosfolipídeos também parecem estar presentes nas duas lâminas, contribuindo para a distribuição assimétrica dessas moléculas lipídicas. Além disso, as **proteínas de troca de fosfolipídeos** reconhecem certos fosfolipídeos e os transferem de uma membrana (p. ex., retículo endoplasmático [RE]) para outras (p. ex., mitocondriais e peroxissomais). Uma questão relacionada trata de **como os lipídeos penetram nas membranas**. Essa questão não foi estudada tão intensamente quanto a maneira como as proteínas entram nas membranas (ver Capítulo 49), e os conhecimentos ainda são relativamente escassos. Muitos lipídeos da membrana são sintetizados no RE. Pelo menos três

vias foram identificadas: (1) transporte do RE em vesículas, que em seguida transferem o conteúdo lipídico para a membrana receptora; (2) entrada via contato direto de uma membrana (p. ex., o RE) com outra, facilitado por proteínas específicas; e (3) transporte através meio das proteínas de troca de fosfolipídeos (também conhecidas como proteínas de transferência de lipídeos) mencionadas anteriormente, que efetuam apenas a troca de lipídeos, mas não são responsáveis pela transferência total.

Existe uma **assimetria adicional** em relação aos glicosíngolipídeos e às **glicoproteínas**; todas as **frações de açúcar** dessas moléculas são **projetadas para fora** da membrana plasmática e estão ausentes da sua face interna.

As membranas contêm proteínas integrais e periféricas

É útil classificar as proteínas de membrana em dois tipos: **integrais** e **periféricas** (Figura 40-7). A maioria das proteínas de membrana pertence à **classe das proteínas integrais**, isto é, elas interagem extensamente com os fosfolipídeos e **exigem o uso de detergentes** para a sua solubilização. Além disso, elas geralmente se estendem de um lado a outro da bicamada lipídica, sob a forma de um feixe de segmentos transmembrana α -helicoidais. Em geral, as proteínas integrais são globulares e anfipáticas. Essas proteínas consistem em duas extremidades hidrofílicas separadas por uma região hidrofóbica interveniente, que atravessa o núcleo hidrofóbico da dupla camada. À medida que as estruturas das proteínas integrais de membrana foram elucidadas, ficou evidente que algumas delas (p. ex., moléculas transportadoras, canais iônicos, vários receptores e proteínas G) atravessam a bicamada várias vezes de um lado a outro, ao passo que outras proteínas simples de membrana (p. ex., glicoforina A) atravessam a membrana apenas uma vez (ver Figuras 42-4 e 52-5). As proteínas integrais exibem uma distribuição assimétrica por meio da bicamada da membrana. Essa orientação assimétrica é adquirida por ocasião de sua inserção na bicamada lipídica durante a biossíntese no RE. Os mecanismos moleculares envolvidos na inserção das proteínas nas membranas e a montagem das membranas são discutidos no Capítulo 49.

As **proteínas periféricas** não interagem diretamente com os núcleos hidrofóbicos dos fosfolipídeos na bicamada lipídica e, portanto, **não exigem o uso de detergentes** para a sua liberação. Essas proteínas estão ligadas às regiões hidrofílicas de proteínas integrais específicas e aos grupos da cabeça de fosfolipídeos, podendo ser liberadas mediante tratamento com soluções salinas de alta concentração iônica. Por exemplo, a anquirina, uma proteína periférica, está ligada à superfície interna da “banda 3” de proteína integral da membrana da hemácia. A espectrina, estrutura citoesquelética dentro da hemácia, está ligada, por sua vez, à anquirina e, desse modo, desempenha um importante papel na manutenção do formato bicôncavo da hemácia.

MEMBRANAS ARTIFICIAIS COMO MODELO DE FUNÇÃO DAS MEMBRANAS

É possível preparar sistemas de membranas artificiais por técnicas apropriadas. Em geral, esses sistemas consistem em

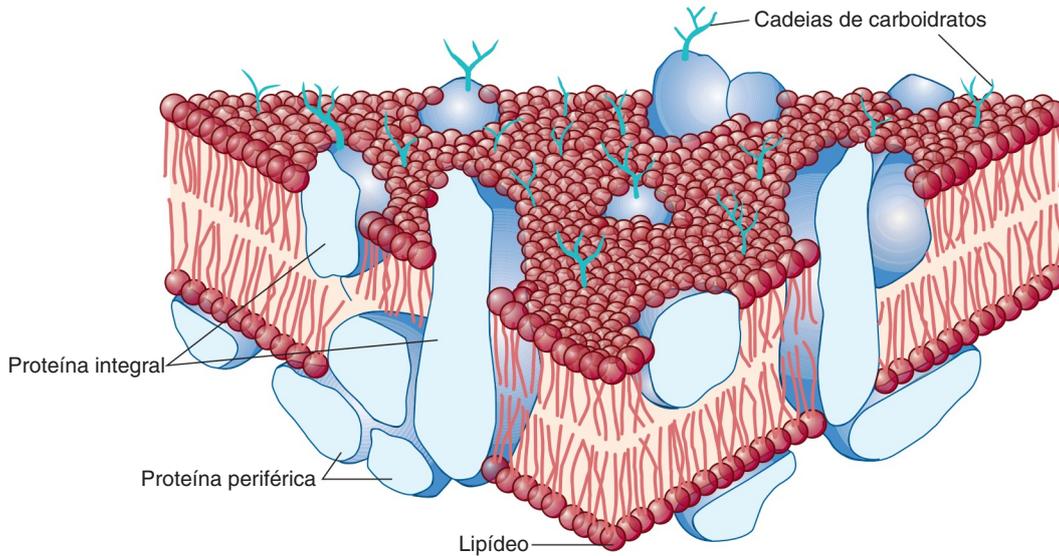


FIGURA 40-7 O modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana. A membrana consiste em uma camada lipídica bimolecular, com proteínas inseridas ou ligadas a uma de suas superfícies. As proteínas de membrana integrais estão firmemente inseridas nas camadas lipídicas. Algumas dessas proteínas atravessam completamente a bicamada e são denominadas proteínas transmembranas, ao passo que outras estão inseridas na camada externa ou interna da bicamada lipídica. As proteínas periféricas estão frouxamente ligadas à superfície externa ou interna da membrana. Muitas das proteínas e todos os glicolipídeos apresentam cadeias de carboidratos oligossacarídicos expostas no lado externo. (Reproduzida, com permissão, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas*, 10th ed., McGraw-Hill, 2003.)

misturas de um ou mais fosfolipídeos de origem natural ou sintética, que podem ser tratados por **sonicação branda** para induzir a formação de vesículas esféricas nas quais os lipídeos formam uma bicamada. Essas vesículas, circundadas por uma bicamada lipídica com interior aquoso, são denominadas **lipossomos** (ver Figura 21-24).

As vantagens e aplicações dos sistemas de membranas artificiais para o estudo bioquímico da função das membranas são:

1. O **teor lipídico** das membranas pode ser variado, possibilitando o exame sistemático dos efeitos da composição variável dos lipídeos sobre determinadas funções.
2. **Proteínas de membrana ou enzimas purificadas** podem ser incorporadas a essas vesículas para determinar os fatores (p. ex., lipídeos específicos ou proteínas complementares) necessários para que as proteínas possam recuperar sua função.
3. O **ambiente** desses sistemas pode ser rigorosamente controlado e sistematicamente variado (p. ex., concentrações iônicas e ligantes).
4. Quando os lipossomos são formados, podem ser preparados para **incorporar** determinados compostos em seu interior, como fármacos e genes isolados. Existe um interesse em utilizar os lipossomos para distribuir fármacos em determinados tecidos, e, se os componentes (p. ex., anticorpos dirigidos contra certas moléculas da superfície celular) pudessem ser incorporados aos lipossomos, de modo que fossem direcionados para tecidos ou tumores específicos, o impacto terapêutico seria considerável. O **DNA** incorporado no interior de lipossomos parece ser menos sensível ao ataque das nucleases; essa abordagem poderá ser útil nos esforços aplicados à **terapia gênica**.

O MODELO DE MOSAICO FLUIDO DA ESTRUTURA DA MEMBRANA É AMPLAMENTE ACEITO

O **modelo de mosaico fluido** da estrutura da membrana, proposto em 1972 por Singer e Nicolson (**Figura 40-7**) é, hoje, amplamente aceito. O modelo é frequentemente comparado a *icebergs* de proteínas integrais de membrana flutuando em um oceano de moléculas de fosfolipídeos (predominantemente) fluidas. A primeira evidência desse modelo foi a descoberta de que proteínas integrais de membrana marcadas por fluorescência poderiam ser vistas a nível microscópico se redistribuindo rápida e aleatoriamente na membrana plasmática de uma célula híbrida formada pela fusão artificial de duas células parentais distintas (murina e humana; uma marcada e a outra não). Foi demonstrado, em seguida, que os **fosfolipídeos** sofrem uma redistribuição ainda mais rápida no plano da membrana. Avaliações indicam que, no plano da membrana, uma molécula de fosfolipídeo pode se mover alguns micrômetros por segundo.

As **mudanças de fase** – e, portanto, a **fluidez** das membranas – em grande parte dependem da composição lipídica da membrana. Em uma bicamada lipídica, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos podem estar altamente alinhadas ou ordenadas, de modo a formar uma estrutura bastante rígida. À medida que a temperatura aumenta, as cadeias laterais hidrofóbicas passam por uma **transição** do **estado ordenado** (fase mais semelhante ao gel ou cristalina) para um **estado desordenado**, assumindo um arranjo mais semelhante ao aspecto líquido ou fluido. A temperatura em que a estrutura sofre transição do estado ordenado para o desordenado (i.e., derrete) é conhecida como **“temperatura de transição”** (T_m). As cadeias de ácidos

graxos mais longas e mais saturadas interagem mais fortemente entre si por meio de suas cadeias de hidrocarboneto estendidas e, portanto, geram valores mais altos de T_m – isto é, são necessárias temperaturas mais elevadas para aumentar a fluidez da bicamada. Por outro lado, as **ligações insaturadas** que existem na **configuração cis** tendem a aumentar a fluidez da bicamada ao reduzir a densidade das cadeias laterais acondicionadas sem diminuir a hidrofobicidade (Figuras 40-3 e 40-5). Os fosfolípidos das membranas celulares, em geral, contêm pelo menos um ácido graxo insaturado com pelo menos uma dupla ligação *cis*.

O colesterol atua como um tampão para modificar a fluidez das membranas. Em temperaturas abaixo da T_m , o colesterol interfere na interação das caudas de hidrocarboneto dos ácidos graxos e, portanto, aumenta a fluidez. Em temperaturas acima da T_m , ele limita a desordem, visto que é mais rígido do que as caudas de hidrocarboneto dos ácidos graxos e não consegue se mover na membrana na mesma extensão, limitando, assim, a fluidez. Nos casos de elevadas proporções entre colesterol e fosfolípidos, as temperaturas de transição também são indistinguíveis.

A fluidez da membrana afeta as suas funções de maneira significativa. À medida que a fluidez da membrana aumenta, o mesmo ocorre com a sua permeabilidade à água e a outras moléculas hidrofílicas pequenas. A mobilidade lateral das proteínas integrais aumenta à medida que a fluidez da membrana aumenta. Se o sítio ativo de uma proteína integral envolvida em determinada função estiver exclusivamente em suas regiões hidrofílicas, a mudança da fluidez lipídica provavelmente terá pouco efeito sobre a atividade da proteína; entretanto, se a proteína estiver envolvida em uma função de transporte, na qual os componentes transportadores atravessam a membrana de um lado a outro, os efeitos da fase lipídica podem alterar significativamente a taxa de transporte. O receptor de insulina (ver Figura 42-8) é um excelente exemplo de alteração da função com as mudanças de fluidez. Conforme a concentração de ácidos graxos insaturados na membrana aumenta (por cultura de células em meio rico nessas moléculas), a fluidez aumenta. A fluidez aumentada altera o receptor, de modo que ele se ligará a uma maior quantidade de insulina. Na temperatura corporal normal (37°C), a bicamada lipídica encontra-se em estado fluido. Ressaltando a importância da fluidez da membrana, tem sido demonstrado que as bactérias podem modificar a composição dos seus lipídeos de membrana para se adaptar às alterações na temperatura.

Balsas lipídicas, cavéolas e junções oclusivas são estruturas especializadas das membranas plasmáticas

As membranas plasmáticas contêm **determinadas estruturas especializadas**, cuja natureza bioquímica foi investigada com alguns detalhes.

As **balsas lipídicas** são áreas especializadas da lâmina exoplasmática (externa) da bicamada lipídica, enriquecidas com colesterol, esfingolípídeos e certas proteínas (Figura 40-8). Existe a hipótese de que elas estejam envolvidas na **transdução de sinal** e em **outros processos**. Acredita-se que a reunião de certos componentes dos sistemas de sinalização possa aumentar a eficiência de sua função.

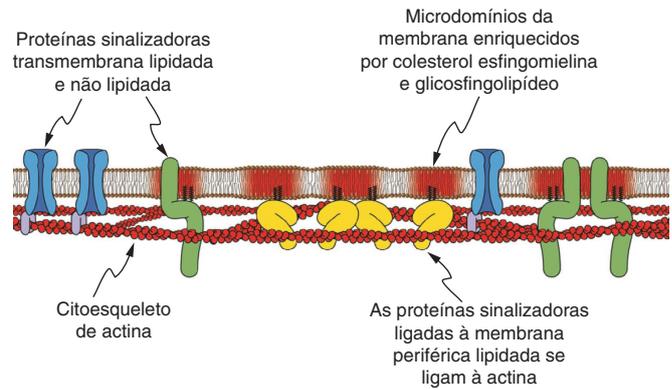


FIGURA 40-8 Ilustração esquemática de uma balsa lipídica. São observadas, de forma esquemática, múltiplas balsas lipídicas (sombreamento da membrana em vermelho) que representam microdomínios ricos localizados nos lipídeos indicados e em proteínas sinalizadoras (azul, verde, amarelo). As balsas lipídicas são estabilizadas por meio de interações (diretas e indiretas) com o citoesqueleto de actina (cadeias bi-helicoidais em vermelho; ver Figura 51-3). (Figura modificada de: The lipid raft hypothesis revisited—new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *Bioessays* 2012; 34:739-747. Wiley Periodical, Inc. Copyright © 2012.)

As **cavéolas** podem originar-se das balsas lipídicas. Muitas delas, senão todas, contêm a proteína **caveolina 1**, que pode estar envolvida na sua formação a partir das balsas. As cavéolas podem ser detectadas por microscopia eletrônica como indentações em formato de balão da membrana celular para o interior do citosol (Figura 40-9). As proteínas detectadas nas cavéolas incluem vários componentes do sistema de transdução de sinais (p. ex., o receptor de insulina e algumas proteínas G), o receptor de folato e a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS). As cavéolas e as balsas lipídicas constituem áreas ativas de pesquisa, e os conceitos relativos a seus possíveis papéis em vários processos biológicos estão evoluindo rapidamente.

As **junções oclusivas** são outras estruturas encontradas nas superfícies das membranas. Com frequência, estão localizadas abaixo das superfícies apicais das células epiteliais e **impedem a difusão de macromoléculas entre as células**. Elas são

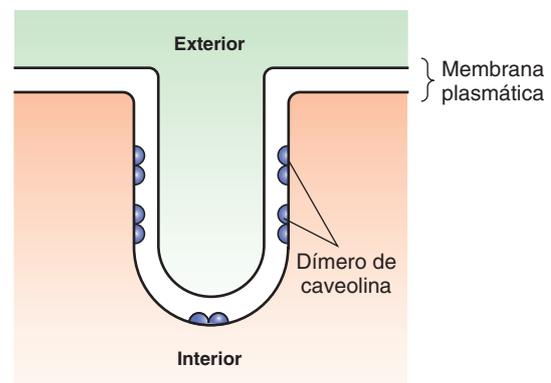


FIGURA 40-9 Ilustração esquemática de uma cavéola. A cavéola é uma invaginação da membrana plasmática. A proteína caveolina parece desempenhar um importante papel na formação das cavéolas e ocorre em forma de dímero. Cada monômero de caveolina está ancorado na camada interna da membrana plasmática por três moléculas de palmitoil (não ilustradas).

constituídas de **diversas proteínas**, incluindo ocludina, várias claudinas e moléculas de adesão juncional.

Outras estruturas especializadas encontradas nas superfícies das membranas incluem **desmossomos**, **junções aderentes** e **microvilosidades**; sua natureza química e funções não são discutidas aqui. A natureza das **junções comunicantes** é descrita a seguir.

A SELETIVIDADE DA MEMBRANA PERMITE AJUSTES NA COMPOSIÇÃO E NA FUNÇÃO DAS CÉLULAS

Se a membrana plasmática é relativamente impermeável, como a maioria das moléculas entra na célula? De que modo a seletividade desse movimento é estabelecida? As respostas a essas perguntas são importantes para compreender como as células se adaptam ao ambiente extracelular em constante mudança. Os organismos metazoários também precisam ter meios de comunicação entre células adjacentes e distantes, de modo que os processos biológicos complexos possam ser coordenados. Esses sinais precisam chegar à membrana e ser transmitidos por ela ou devem ser gerados como consequência de alguma interação com a membrana. A **Tabela 40-3** relaciona alguns dos principais mecanismos utilizados para se atingir esses objetivos distintos.

A difusão passiva envolvendo transportadores e canais iônicos movimenta muitas moléculas pequenas através das membranas

As moléculas podem atravessar **passivamente** a bicamada de acordo com gradientes eletroquímicos por **difusão simples** ou

TABELA 40-3 Transferência de materiais e informações através das membranas

Movimento transversal de pequenas moléculas na membrana
Difusão (passiva e facilitada) Transporte ativo
Movimento transversal de grandes moléculas na membrana
Endocitose Exocitose
Transmissão de sinais através das membranas
Receptores de superfície celular
1. Transdução de sinais (p. ex., glucagon → cAMP)
2. Internalização de sinais (acoplada a endocitose, p. ex., o receptor de LDL)
Movimento para os receptores intracelulares (hormônios esteroides; uma forma de difusão)
Contato e comunicação intercelulares
A difusão passiva (simples) é o fluxo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, devido ao movimento térmico aleatório
A difusão facilitada é o transporte passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, mediado por uma proteína transportadora específica
O transporte ativo é o transporte de um soluto através da membrana na direção da concentração aumentada e, portanto, requer energia (frequentemente obtida a partir da hidrólise do ATP); um transportador específico (bomba) está envolvido

Os outros termos empregados nesta tabela serão explicados posteriormente neste capítulo ou em outra parte do texto.

por **difusão facilitada**. Esse movimento espontâneo em direção ao equilíbrio se diferencia do **transporte ativo**, que **requer energia**, uma vez que representa um movimento contra um gradiente eletroquímico. A **Figura 40-10** fornece uma representação esquemática desses mecanismos.

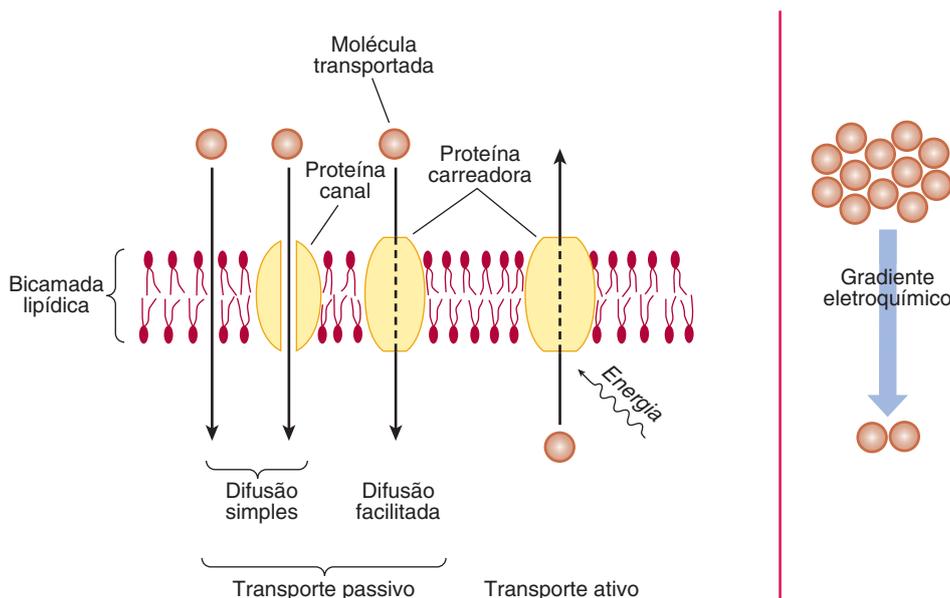


FIGURA 40-10 Muitas moléculas pequenas sem carga atravessam livremente a bicamada lipídica por difusão simples. As moléculas maiores sem carga e algumas moléculas pequenas sem carga são transferidas por proteínas carreadoras específicas (transportadoras) ou por canais ou poros. O transporte passivo ocorre sempre obedecendo a um gradiente eletroquímico (mostrado no esquema, à direita), no sentido do equilíbrio. O transporte ativo ocorre contra um gradiente eletroquímico e requer o consumo de energia, o que não ocorre com o transporte passivo. (Redesenhada e reproduzida, com permissão, de Alberts B et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland, 1983.)

A **difusão simples** refere-se ao fluxo passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, devido ao movimento térmico aleatório. Por outro lado, a **difusão facilitada** é o transporte passivo de um soluto de uma concentração mais alta para uma concentração mais baixa, mediado por uma proteína transportadora específica. O **transporte ativo** é o transporte de um soluto através de uma membrana contra um gradiente de concentração que, portanto, requer energia (frequentemente obtida a partir da hidrólise do ATP); é necessário o envolvimento de um transportador específico (**bomba**).

Conforme mencionado neste capítulo, alguns solutos, como os gases, podem entrar na célula por difusão a favor de um gradiente eletroquímico através da membrana, não exigindo energia metabólica. A **difusão simples** de um soluto através da membrana é limitada por três fatores: (1) a agitação térmica daquela molécula específica; (2) o gradiente de concentração através da membrana; e (3) a solubilidade daquele soluto (o coeficiente de permeabilidade, Figura 40-6) no núcleo hidrofóbico da bicamada da membrana. A solubilidade é inversamente proporcional ao número de ligações de hidrogênio que precisam ser rompidas para que um soluto na fase aquosa externa seja incorporado à bicamada hidrofóbica. Os eletrólitos, que são pouco solúveis em lipídeos, não formam ligações de hidrogênio com a água, mas adquirem um envoltório de água a partir de hidratação por interação eletrostática. O tamanho dessa camada é diretamente proporcional à densidade de carga do eletrólito. Os eletrólitos com alta densidade de carga apresentam uma camada de hidratação maior e, portanto, uma taxa de difusão mais lenta. Por exemplo, o Na^+ apresenta uma densidade de carga maior que a do K^+ . Assim, o Na^+ hidratado é maior do que o K^+ hidratado; esse último, portanto, tende a se mover mais facilmente através da membrana.

Os fatores descritos a seguir afetam a **difusão total** de uma substância. (1) Gradiente de concentração através da membrana: o soluto movimenta-se da alta para a baixa concentração; (2) potencial elétrico através da membrana: o soluto movimenta-se em direção à solução que possui a carga oposta. O interior da célula, em geral, apresenta carga negativa; (3) coeficiente de permeabilidade da substância para a membrana; (4) gradiente de pressão hidrostática através da membrana: a pressão aumentada elevará taxa e a força de colisão entre as moléculas e a membrana; e (5) temperatura, visto que a temperatura elevada aumentará o movimento da partícula e, portanto, aumentará a frequência de colisões entre as partículas externas e a membrana.

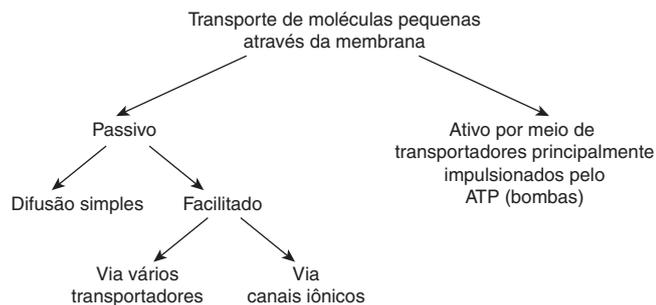


FIGURA 40-11 Representação esquemática dos dois tipos de transporte de pequenas moléculas através da membrana.

TABELA 40-4 Comparação entre transportadores e canais iônicos

Transportadores	Canais iônicos
Ligam-se ao soluto e sofrem alterações de sua conformação, transferindo o soluto através da membrana	Formam poros nas membranas
Envolvidos no transporte passivo (difusão facilitada) e transporte ativo	Envolvidos apenas no transporte passivo
O transporte é significativamente mais lento do que aquele através dos canais iônicos	O transporte é significativamente mais rápido do que aquele através de transportadores

Nota: os transportadores também são conhecidos como carreadores ou permeases. Os transportadores ativos são frequentemente denominados bombas.

A **difusão facilitada** envolve certos transportadores ou canais iônicos (**Figura 40-11**). O transporte ativo é mediado por outros transportadores, e a maior parte deles é impulsionada pelo ATP. Existem numerosos transportadores e canais nas membranas biológicas que representam a via de entrada e saída de íons das células. A **Tabela 40-4** resume algumas diferenças importantes entre transportadores e canais iônicos.

Os transportadores são proteínas específicas envolvidas na difusão facilitada e também no transporte ativo

Os sistemas de transporte podem ser descritos do ponto de vista funcional, de acordo com o número de moléculas transportadas e a direção do movimento (**Figura 40-12**), ou considerando-se se o movimento ocorre em direção ao ou contra o equilíbrio. A seguinte **classificação** dependerá principalmente do primeiro. Um sistema **uniporte** possibilita o movimento bidirecional de um tipo de molécula. Nos sistemas **cotransportadores**, a transferência de um soluto depende da transferência simultânea ou sequencial estequiométrica de outro soluto. O sistema **simporte** transfere dois solutos na mesma direção. São exemplos o transportador de próton-açúcar nas bactérias e os transportadores de Na^+ -açúcar (para a glicose e alguns

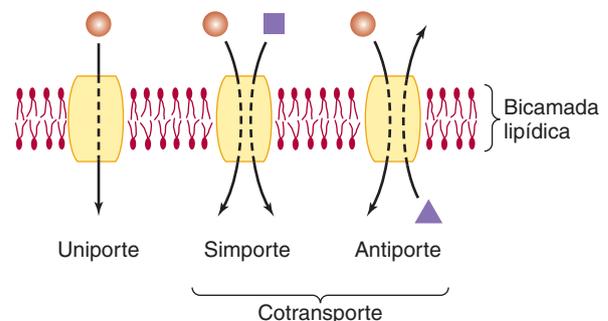


FIGURA 40-12 Representação esquemática dos tipos de sistema de transporte. Os transportadores podem ser classificados com base na direção do movimento e na transferência de uma ou mais moléculas específicas. Um sistema uniporte também pode possibilitar um movimento em direção contrária, dependendo das concentrações da molécula transportada dentro e fora da célula. (Redesenhada e reproduzida, com permissão, de Alberts B et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland, 1983.)

outros açúcares) e de Na^+ -aminoácidos nas células dos mamíferos. Os sistemas **antiporte** transferem duas moléculas em direções contrárias (p. ex., Na^+ para dentro e Ca^{2+} para fora).

As moléculas hidrofílicas que não podem atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana o fazem passivamente por **difusão facilitada** ou por **transporte ativo**. O transporte passivo é impulsionado pelo gradiente transmembrana de substrato. O transporte ativo sempre ocorre contra um gradiente elétrico ou químico, de modo que necessita de energia, em geral ATP. Ambos os tipos de transporte envolvem **proteínas carreadoras específicas** (transportadores) e ambos exibem **especificidade** para íons, açúcares e aminoácidos. Os transportes passivo e ativo **assemelham-se a uma interação enzima-substrato**. Os aspectos semelhantes entre ambos e a ação enzimática são os seguintes: (1) existe um sítio de ligação específico para o soluto; (2) o carreador é saturável, de modo que apresenta uma taxa máxima de transporte ($V_{\text{máx}}$; **Figura 40-13**); (3) existe uma constante de ligação (K_m) para o soluto, de modo que todo o sistema apresenta uma K_m (**Figura 40-13**); (4) inibidores competitivos estruturalmente semelhantes bloqueiam o transporte. Por conseguinte, os transportadores são semelhantes a enzimas, porém geralmente não modificam seus substratos.

Os **cotransportadores** utilizam o gradiente de um substrato criado pelo transporte ativo para impulsionar o movimento do outro substrato. O gradiente de Na^+ produzido pela Na^+ - K^+ -ATPase é utilizado para impulsionar o transporte de vários metabólitos importantes. A ATPase constitui um exemplo muito importante de **transporte primário**, ao passo que os sistemas dependentes de Na^+ são exemplos de **transporte secundário** que dependem do gradiente produzido por outro sistema. Desse modo, a inibição da Na^+ - K^+ -ATPase nas células também bloqueia a captação dependente de Na^+ de substâncias como a glicose.

A difusão facilitada é mediada por uma variedade de transportadores específicos

Alguns solutos específicos se difundem a favor de gradientes eletroquímicos através da membrana mais rapidamente do que

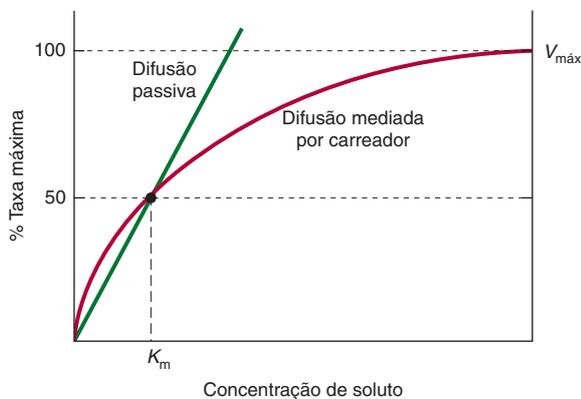


FIGURA 40-13 Uma comparação entre a cinética de difusão mediada por carreador (facilitada) e a difusão passiva. A taxa de movimento na difusão passiva é diretamente proporcional à concentração de soluto, ao passo que o processo é saturável quando estão envolvidos transportadores. A concentração na metade da velocidade máxima é igual à constante de ligação (K_m) do carreador para o soluto. ($V_{\text{máx}}$, velocidade máxima.)

seria esperado com base no seu tamanho, na sua carga ou no seu coeficiente de partição. Isso se deve à participação de transportadores específicos. Essa **difusão facilitada** exibe propriedades distintas das observadas na difusão simples. A taxa de difusão facilitada, que é um sistema uniporte, pode ser saturada; isto é, o número de sítios envolvidos na difusão dos solutos específicos parece ser limitado. Muitos sistemas de difusão facilitada são estereoespecíficos, porém, à semelhança da difusão simples, são impulsionados pelo gradiente eletroquímico transmembrana.

O **mecanismo de “pingue-pongue”** (**Figura 40-14**) ajuda a explicar a difusão facilitada. Nesse modelo, a proteína carreadora existe em duas conformações principais. No estado “**pingue**”, ela fica exposta a altas concentrações do soluto, e as moléculas do soluto ligam-se a sítios específicos na proteína transportadora. A ligação induz uma alteração da conformação, que expõe o carreador a uma concentração mais baixa de soluto (estado “**pongue**”). Esse processo é completamente reversível, e o fluxo final através da membrana depende do gradiente de concentração. A taxa de entrada do soluto em uma célula por difusão facilitada é determinada por: (1) gradiente de concentração através da membrana; (2) quantidade de carreador disponível (essa é uma etapa de controle essencial); (3) afinidade da interação soluto-carreador; (4) rapidez da alteração conformacional no carreador carregado ou descarregado.

Os **hormônios** podem regular a difusão facilitada ao modificar o número de transportadores disponíveis. A insulina, através de uma via de sinalização complexa, aumenta o transporte da glicose no tecido adiposo e no músculo por meio do recrutamento de transportadores de glicose (GLUTs) a partir de um reservatório intracelular. A insulina também aumenta o transporte de aminoácidos no fígado e em outros tecidos. Uma das ações coordenadas dos hormônios glicocorticoides consiste em aumentar o transporte de aminoácidos para o fígado, onde eles servem de substrato para a gliconeogênese. O hormônio do crescimento eleva o transporte de aminoácidos em todas as células, ao passo que os estrogênios exercem a mesma função no útero. Nas células animais, existem pelo menos cinco sistemas de transportadores diferentes para os aminoácidos. Cada um desses sistemas é específico para um grupo de aminoácidos estreitamente relacionados, e a maioria opera como sistemas de simporte de Na^+ (**Figura 40-12**).

Os canais iônicos são proteínas transmembrana que permitem a entrada seletiva de vários íons

As membranas naturais contêm canais transmembrana, isto é, estruturas semelhantes a poros compostas por proteínas que constituem **canais iônicos** seletivos. Os canais que transportam cátions apresentam um diâmetro médio de cerca de 5 a 8 nm. A **permeabilidade** de um canal depende do tamanho, do grau de hidratação e da densidade de cargas do íon. Foram identificados canais específicos para o Na^+ , o K^+ , o Ca^{2+} e o Cl^- . A subunidade α funcional de um canal de Na^+ está ilustrada esquematicamente na **Figura 40-15**. A subunidade α é composta por quatro domínios (I a IV), cada um deles formado por seis α -hélices transmembranas contíguas; cada um desses domínios é conectado por alças intracelulares e extracelulares de comprimento variável. As extremidades aminoterminal e

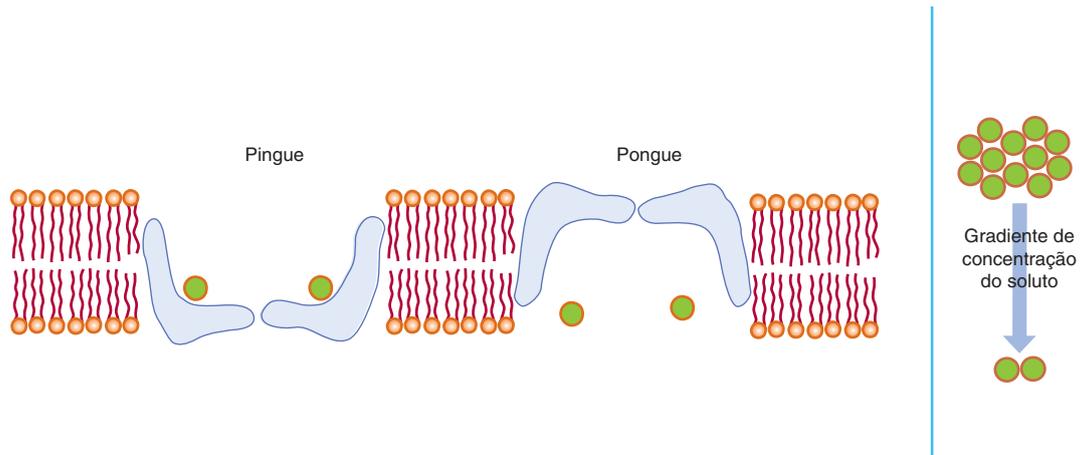


FIGURA 40-14 O modelo de “pingue-pongue” de difusão facilitada. Uma proteína carreadora (estrutura azul) presente na bicamada lipídica se associa a um soluto em alta concentração em um lado da membrana. Ocorre uma alteração de conformação (“pingue” para “pongue”), e o soluto é liberado no lado que favorece o novo equilíbrio (gradiente de concentração do soluto mostrado esquematicamente à direita). Em seguida, o carreador vazio readquire a conformação original (“pongue” para “pingue”) para completar o ciclo.

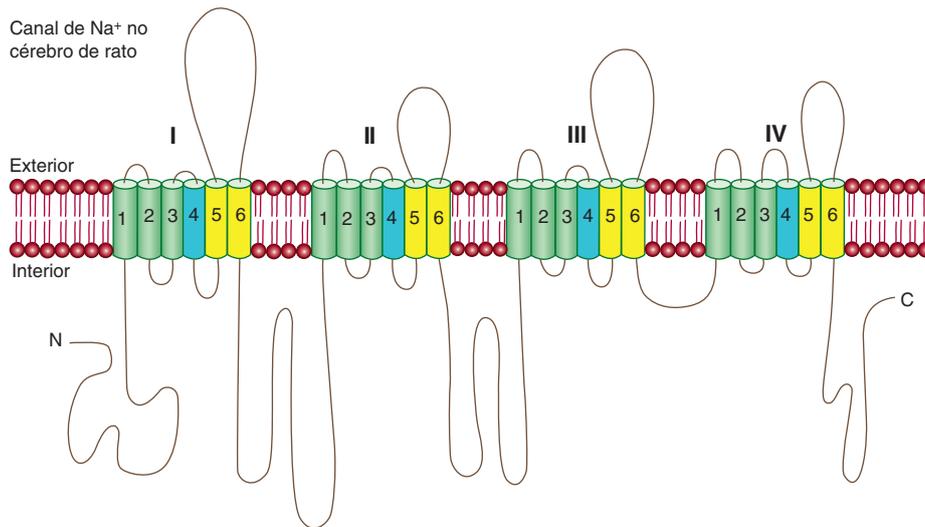


FIGURA 40-15 Representação diagramática das estruturas de um canal iônico (um canal de Na^+ de cérebro de rato). Os algarismos romanos indicam os quatro domínios (I a IV) da subunidade α do canal de Na^+ . Os domínios α -hélice transmembrana de cada domínio estão numerados de 1 a 6. As quatro subunidades sombreadas em azul nos diferentes domínios representam a porção sensível à voltagem da subunidade α . O poro verdadeiro através do qual passam os íons (Na^+) não está mostrado, porém é formado pela aposição das α -hélices transmembranas 5 e 6 dos domínios I a IV (em amarelo). As áreas específicas das subunidades envolvidas na abertura e no fechamento do canal também não estão representadas. (De WK Catterall. Modificada e reproduzida, com permissão, de Hall ZW: *An Introduction to Molecular Neurobiology*. Sinauer, 1992.)

carboxiterminal da subunidade α estão localizadas no citoplasma. O verdadeiro poro no canal através do qual os íons Na^+ atravessam é formado por interações entre os quatro domínios, gerando uma estrutura terciária a partir das interações entre os quatro conjuntos de α -hélices 5 e 6 dos domínios I a IV. Os canais de Na^+ são geralmente **sensíveis à voltagem** ou **regulados por ela**; o sensor de voltagem do canal é formado por meio do domínio de interação I a IV às quatro α -hélices-4 formadas quando os domínios I a IV interagem. Esse poro de cerca de 5 a 8 nm constitui o centro da estrutura do canal terciário.

Os canais iônicos são muito **seletivos**, permitindo, na maioria dos casos, a passagem de apenas um tipo de íon (Na^+ ,

Ca^{2+} , etc.). O **filtro de seletividade** dos canais de K^+ é constituído de um anel de grupos carbonil doados pelas subunidades. Os grupos carbonil deslocam a água ligada do íon e, portanto, restringem o seu tamanho para dimensões precisas apropriadas para a sua passagem pelo canal. Muitas variações do tema estrutural mostrado anteriormente para o canal de Na^+ têm sido descritas. Entretanto, todos os canais iônicos são basicamente formados por subunidades transmembrana, que se reúnem para formar um poro central através do qual os íons passam seletivamente.

As membranas das células nervosas contêm canais iônicos bem estudados, que são responsáveis pela geração dos

TABELA 40-5 Algumas propriedades dos canais iônicos

- Eles são constituídos de subunidades de proteínas transmembrana.
- A maioria é altamente seletiva para determinado íon; alguns não são seletivos.
- Permitem que íons impermeáveis atravessem as membranas em uma taxa que se aproxima dos limites da difusão.
- Podem permitir fluxos iônicos de 10^6 a $10^7/s$.
- As suas atividades são reguladas.
- Os principais tipos são canais dependentes de voltagem, dependentes de ligantes e mecanicamente regulados.
- Em geral, são altamente conservados entre as espécies.
- A maioria das células apresenta uma variedade de canais de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- .
- As mutações nos genes que os codificam podem causar doenças específicas.^a
- As suas atividades são afetadas por determinados fármacos.

^aAlgumas doenças causadas por mutações dos canais iônicos são descritas de modo sucinto no Capítulo 49.

potenciais de ação. A atividade de alguns desses canais é controlada por neurotransmissores; conseqüentemente, a atividade do canal pode ser regulada.

Os canais iônicos abrem-se transitoriamente e, portanto, são “**dependentes**”. Os portões podem ser controlados por abertura ou fechamento. Nos **canais dependentes de ligantes**, uma molécula específica liga-se a um receptor e abre o canal. Os **canais dependentes de voltagem** abrem-se (ou fecham-se) em resposta a mudanças no potencial de membrana. Os **canais regulados mecanicamente** respondem a estímulos mecânicos (pressão e toque). As **Tabelas 40-4 e 40-5** apresentam algumas propriedades dos canais iônicos.

Estudos detalhados de um canal de K^+ e de um canal dependente de voltagem contribuíram para um melhor conhecimento de suas ações

Existem pelo menos quatro aspectos dos canais iônicos que precisam ser elucidados: (1) as suas estruturas gerais; (2) como eles conduzem tão rapidamente os íons; (3) a sua seletividade; e (4) as suas propriedades reguladoras. Conforme descrito adiante, foram realizados progressos consideráveis na solução dessas difíceis questões.

O **canal de K^+ (KvAP)** é uma proteína integral de membrana composta por quatro subunidades idênticas, cada uma com dois segmentos transmembrana, criando uma estrutura invertida **tipo “V”** (**Figura 40-16**). A região dos canais que confere a seletividade iônica (o **filtro de seletividade**) possui 12 Å de comprimento (uma extensão relativamente pequena da membrana, de modo que o K^+ não precisa percorrer um caminho muito longo na membrana) e está situada na extremidade alargada do “V” invertido. A grande cavidade cheia de água e os dipolos em hélice mostrados na **Figura 40-16** ajudam a superar a barreira de energia eletrostática relativamente ampla para que um cátion atravesse a membrana. O filtro de seletividade é revestido por átomos de oxigênio carboxílico (provenientes de uma sequência TVGYG), assegurando um número de sítios com os quais o K^+ pode interagir. Os íons K^+ , que sofrem desidratação à medida que entram no estreito filtro de seletividade,

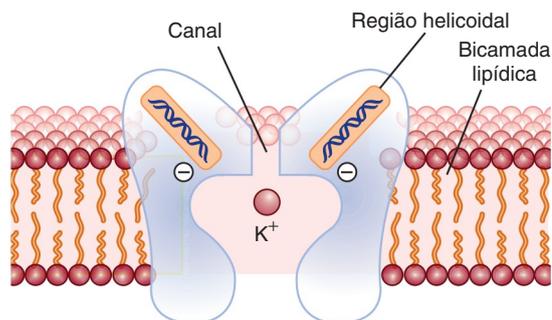


FIGURA 40-16 Ilustração esquemática da estrutura de um canal de K^+ (KvAP) de *Streptomyces lividans*. Um único K^+ está ilustrado em uma grande cavidade aquosa dentro do interior da membrana. As duas regiões helicoidais da proteína do canal estão orientadas com suas extremidades de carboxilato em direção ao local onde se encontra o K^+ . O canal está revestido por oxigênio carboxílico. (Modificada, com permissão, de Doyle DA et al.: *The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity*. Science 1998;280:69. Reimpressa, com permissão, de AAAS.)

encaixam-se com coordenação apropriada no filtro, mas o Na^+ é pequeno demais para interagir com os átomos de oxigênio carboxílico em alinhamento correto, sendo conseqüentemente rejeitado. Dois íons K^+ , quando próximos um do outro no filtro, repelem-se. Essa repulsão supera as interações entre o K^+ e a molécula proteica circundante e possibilita uma condução muito rápida do K^+ com alta seletividade.

Outros estudos sobre um canal iônico regulado por voltagem (HvAP) do *Aeropyrum pernix* revelaram muitos aspectos de seus mecanismos sensíveis a e dependentes de voltagem. Esse canal é constituído de quatro subunidades, cada uma com seis segmentos transmembrana. Um dos seis segmentos (S4 e parte do S3) é o sensor de voltagem. Comporta-se como uma **pá eletricamente carregada** (**Figura 40-17**), visto que pode se mover pelo interior da membrana, transferindo quatro cargas positivas (devido a quatro resíduos de Arg em cada subunidade) de uma superfície da membrana para a outra em resposta a mudanças da voltagem. Existem quatro sensores de voltagem em cada canal, ligados ao portão. A parte do portão do canal é formada por hélices S6 (uma de cada subunidade). Os movimentos dessa parte do canal em resposta a uma mudança de voltagem fecham efetivamente o canal ou o reabrem, permitindo, no último caso, a passagem de uma corrente de íons.

Os ionóforos são moléculas que atuam como transportadores de membrana para vários íons

Certos microrganismos sintetizam pequenas moléculas orgânicas cíclicas, os **ionóforos**, como a **valinomicina**, que funcionam como transportadores para o movimento de íons (K^+ no caso da valinomicina) através das membranas. Os ionóforos contêm centros hidrofílicos que são circundados por regiões hidrofóbicas periféricas. Íons específicos ligam-se no interior do centro hidrofílico da molécula que, em seguida, difunde-se através da membrana, liberando de maneira eficiente o íon em questão para o citosol. Outros ionóforos (o polipeptídeo antibiótico **gramicidina**) se dobram para formar canais ocultos através dos quais os íons podem atravessar a membrana.

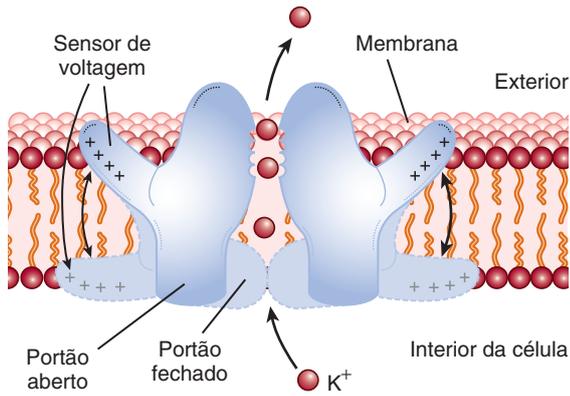


FIGURA 40-17 Ilustração esquemática de um canal de K^+ dependentes de voltagem de *Aeropyrum pernix*. Os sensores de voltagem comportam-se como pás eletricamente carregadas que se movem pelo interior da membrana. Quatro sensores de voltagem (apenas dois estão ilustrados aqui) estão ligados mecanicamente ao portão do canal. Cada sensor tem quatro cargas positivas geradas pelos resíduos de arginina. (Modificada, com permissão, de Sigworth FJ: Nature 2003;423:21. Copyright © 2003. Macmillan Publishers Ltd.)

Toxinas microbianas, como a **toxina diftérica**, e **componentes do complemento sérico** ativados podem produzir grandes poros nas membranas celulares, permitindo, assim, que as macromoléculas tenham acesso direto ao meio interno. A toxina **α -hemolisina** (produzida por certas espécies de *Streptococcus*) consiste em sete subunidades que se reúnem para formar um barril β , que permite o extravasamento de metabólitos, como o ATP, das células, resultando em lise celular.

As aquaporinas são proteínas que formam canais de água em determinadas membranas

Em algumas células (p. ex., hemácias e células dos ductos coletores do rim), o movimento de água por difusão simples é intensificado pelo seu movimento através de **canais de água**. Esses canais são constituídos de proteínas transmembrana tetraméricas, denominadas **aquaporinas**. Foram identificadas pelo menos 10 aquaporinas distintas (AP-1 a AP-10). Estudos cristalográficos, entre outros, revelaram como esses canais possibilitam a passagem de água, porém excluem a passagem de íons e prótons. Em essência, os poros são muito estreitos para permitir a passagem de íons. Os prótons são excluídos, visto que o átomo de oxigênio da água se liga a dois resíduos de asparagina que revestem o canal, tornando a água indisponível para a sua participação em uma substituição de H^+ e impedindo, assim, a entrada de prótons. Constatou-se que a ocorrência de mutações no gene que codifica a AP-2 constitui a causa de um tipo de **diabetes insípido nefrogênico**, uma condição comum na qual existe incapacidade para concentrar a urina.

OS SISTEMAS DE TRANSPORTE ATIVO REQUEREM UMA FONTE DE ENERGIA

O processo de transporte ativo difere da difusão, visto que as moléculas são transportadas contra gradientes de concentração,

TABELA 40-6 Principais tipos de transportadores ativos impulsionados pelo ATP

Tipo	Exemplo com localização subcelular
Tipo P	Ca^{2+} -ATPase (RS); Na^+ - K^+ -ATPase (MP)
Tipo F	ATP-sintase mt da fosforilação oxidativa
Tipo V	ATPase que bombeia prótons para o interior de lisossomos e vesículas sinápticas
Transportador ABC	Proteína CFTR (MP); proteína MDR-1 (MP)

P (em tipo P) refere-se à fosforilação (essas proteínas autofosforilam).

F (em tipo F) indica fatores de acoplamento da energia.

V (em tipo V) significa vacuolar.

ABC refere-se ao transportador de cassete de ligação ao ATP (todos apresentam dois domínios de ligação de nucleotídeos e dois segmentos transmembrana).

RS, retículo sarcoplasmático do músculo; MP, membrana plasmática; mt, mitocondrial; CFTR, proteína reguladora transmembrana da fibrose cística, um transportador de Cl^- e a proteína implicada na causa da fibrose cística (ver posteriormente neste capítulo, bem como no Capítulo 57); proteína MDR-1 (proteína de resistência a múltiplos fármacos 1), uma proteína que bombeia numerosos agentes quimioterápicos para fora das células cancerosas, representando, portanto, um importante fator que contribui para a resistência de certas células cancerosas ao tratamento.

razão pela qual há necessidade de energia. Essa energia pode derivar da hidrólise do ATP, do movimento de elétrons ou da luz. A **manutenção de gradientes eletroquímicos** nos sistemas biológicos é tão importante que consome aproximadamente **30% do gasto total de energia** de uma célula.

Como mostrado na Tabela 40-6, **quatro principais classes de transportadores ativos dependentes de ATP** (transportadores P, F, V e ABC) foram identificados. A nomenclatura é explicada na legenda da tabela. O primeiro exemplo da classe P, a Na^+ - K^+ -ATPase, é discutida adiante. A Ca^{2+} -ATPase do músculo é discutida no Capítulo 51. A segunda classe é conhecida como tipo F. O exemplo mais importante dessa classe é a ATP-sintase mt, descrita no Capítulo 13. Os transportadores ativos tipo V bombeiam prótons para o interior de lisossomos e outras estruturas. Os transportadores ABC incluem a proteína CFTR, um canal de cloreto envolvido na etiologia da fibrose cística (descrita mais adiante, neste capítulo, e no Capítulo 58). Outro membro importante dessa classe é a proteína de resistência a múltiplas drogas 1 (proteína MDR-1). Esse transportador bombeia uma variedade de fármacos, incluindo muitos agentes antineoplásicos, para fora das células. Ele constitui uma causa muito importante para a resistência das células cancerosas à quimioterapia, embora muitos outros mecanismos também estejam implicados.

A Na^+ - K^+ -ATPase da membrana plasmática é uma enzima fundamental na regulação das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+

Conforme mostrado na Tabela 40-1, as células mantêm baixa concentração intracelular de Na^+ e alta concentração intracelular de K^+ (Tabela 40-1), juntamente com um potencial elétrico negativo efetivo no interior. A bomba que mantém esses gradientes iônicos é uma ATPase, que é ativada por Na^+ e K^+ (Na^+ - K^+ -ATPase). As bombas Na^+ - K^+ -ATPase bombeiam três Na^+ para fora e dois K^+ para o interior das células (Figura 40-18). Essa bomba é uma proteína integral de membrana que contém

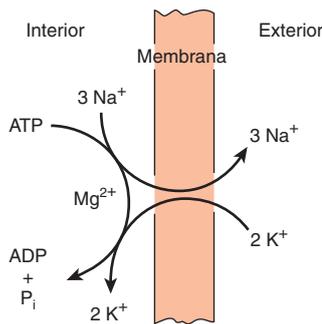


FIGURA 40-18 Estequiometria da bomba Na⁺-K⁺-ATPase. Essa bomba transfere três íons Na⁺ de dentro para fora da célula e transporta dois íons K⁺ de fora para dentro para cada molécula de ATP hidrolisada a ADP pela ATPase associada à membrana. A ouabaina e outros glicosídeos cardíacos inibem essa bomba ao atuar na superfície extracelular da membrana. (Reimpressa, com permissão, de R Post.)

um domínio transmembrana, o qual permite a passagem de íons, e domínios citosólicos que acoplam a hidrólise do ATP ao transporte. Existem centros catalíticos tanto para o ATP quanto para o Na⁺ no lado citoplasmático (interno) da membrana plasmática (MP), ao passo que existem sítios de ligação de K⁺ localizados no lado extracelular da membrana. A fosforilação pelo ATP induz uma alteração conformacional da proteína, levando à transferência de três íons Na⁺ do lado interno para o lado externo da MP. Duas moléculas de K⁺ ligam-se a sítios da proteína na superfície externa da membrana celular, levando à desfosforilação da proteína e à transferência dos íons K⁺ através da membrana para o interior. Assim, três íons Na⁺ são transportados para o exterior para cada dois íons K⁺ que entram. Esse transporte iônico diferencial cria um desequilíbrio de carga entre o interior e o exterior da célula, tornando o interior mais negativo (efeito **eletrogênico**). Dois fármacos cardíacos clinicamente importantes, a **ouabaina** e os **digitálicos**, inibem a Na⁺-K⁺-ATPase, ligando-se ao domínio extracelular. Essa enzima pode consumir quantidades significativas da energia do ATP celular. A Na⁺-K⁺-ATPase pode ser acoplada a vários outros transportadores, como os envolvidos no transporte da glicose (ver adiante).

A TRANSMISSÃO DE IMPULSOS NERVOSOS ENVOLVE CANAIS IÔNICOS E BOMBAS

A membrana que circunda as **células neuronais** mantém uma assimetria de voltagem entre o interior e o exterior (potencial elétrico) e também é **eletricamente excitável** devido à presença de canais dependentes de voltagem. Quando apropriadamente estimulados por um sinal químico mediado por um receptor específico da membrana sináptica (ver discussão sobre a transmissão de sinais bioquímicos adiante), os canais na membrana são abertos para permitir o rápido influxo de Na⁺ ou Ca²⁺ (com ou sem efluxo de K⁺), de modo que a diferença de voltagem desaparece rapidamente e aquele segmento da membrana é **despolarizado**. Todavia, em virtude da ação das bombas iônicas na membrana, o gradiente é rapidamente restabelecido.

Quando grandes áreas da membrana são **despolarizadas** dessa maneira, o distúrbio eletroquímico propaga-se de forma semelhante a uma onda ao longo da membrana, gerando um **impulso nervoso**. As **bainhas de mielina**, formadas pelas células de Schwann, enrolam-se ao redor das fibras nervosas e constituem um **isolante elétrico** que circunda a maior parte do nervo e acelera acentuadamente a propagação da onda (sinal), permitindo a entrada e a saída de íons da membrana apenas nos pontos em que ela não tem isolamento (nos **nós de Ranvier**). A membrana de mielina apresenta um conteúdo de lipídeos muito elevado responsável pela sua notável propriedade isolante. Existem quantidades relativamente pequenas de proteínas na membrana mielínica; aquelas presentes parecem manter unidas várias bicamadas da membrana para formar a estrutura isolante hidrofóbica impermeável aos íons e à água. Algumas doenças, como a **esclerose múltipla** e a **síndrome de Guillain-Barré**, caracterizam-se por desmielinização e comprometimento da condução nervosa.

O TRANSPORTE DE GLICOSE ENVOLVE DIVERSOS MECANISMOS

Uma discussão sobre o transporte da glicose resume muitos dos aspectos discutidos anteriormente. A glicose precisa entrar nas células como primeira etapa na utilização de energia. Vários GLUTs diferentes estão envolvidos, variando nos diferentes tecidos (ver Tabela 19-2). Nos adipócitos e no músculo esquelético, a glicose entra por um sistema de transporte específico (GLUT4) que é estimulado pela insulina. Alterações no transporte são causadas basicamente por alterações da $V_{\text{máx}}$ (presumivelmente por um maior ou menor número de transportadores); no entanto, alterações na K_m também podem estar envolvidas.

O transporte da glicose no intestino delgado envolve alguns aspectos diferentes dos princípios de transporte discutidos anteriormente. A glicose e o Na⁺ ligam-se a diferentes sítios de um **simporte Na⁺-glicose** localizado na **superfície apical**. O Na⁺ entra na célula ao longo de seu gradiente eletroquímico e “arrasta” a glicose com ele (**Figura 40-19**). Por conseguinte, quanto maior o gradiente de Na⁺, mais glicose entrará; e, se a concentração de Na⁺ no líquido extracelular estiver baixa, o transporte de glicose será interrompido. Para manter um gradiente de Na⁺ elevado, esse transportador simporte de Na⁺-glicose depende dos gradientes gerados pela Na⁺-K⁺-ATPase, que mantém uma concentração intracelular baixa de Na⁺. Mecanismos semelhantes são utilizados para transportar outros açúcares, bem como aminoácidos, através do lúmen apical nas células polarizadas, como aquelas encontradas no intestino e no rim. Nesse caso, o movimento transcelular de glicose envolve outro componente: um sistema uniporte (**Figura 40-19**), que permite que a glicose acumulada no interior da célula atravesse a **membrana basolateral** envolvendo um **uniporte de glicose** (GLUT2).

O tratamento de casos graves de **diarreia** (como a que ocorre no cólera) baseia-se nas informações anteriores. No **cólera** (ver Capítulo 57), quantidades maciças de líquido podem ser eliminadas sob a forma de fezes aquosas em um intervalo de tempo muito curto, resultando em grave desidratação

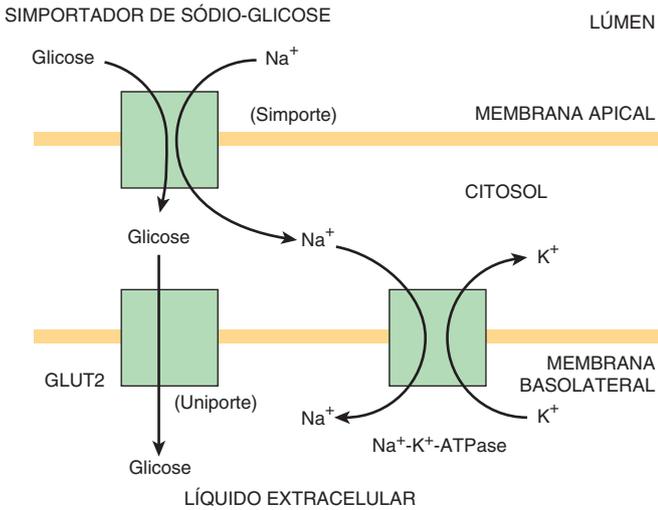


FIGURA 40-19 O movimento transcelular da glicose em uma célula intestinal. A glicose acompanha o Na^+ através da membrana epitelial luminal. O gradiente de Na^+ que impulsiona esse simporte é estabelecido pela troca de Na^+-K^+ , que ocorre na membrana basal voltada para o compartimento do líquido extracelular, pela ação da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$. A glicose em altas concentrações dentro da célula segue um movimento a favor do gradiente para o líquido extracelular por difusão facilitada (um mecanismo uniporte), via GLUT 2 (um transportador de glicose, ver Tabela 19-2). O simporte de sódio-glicose transporta efetivamente 2 Na^+ para cada glicose.

e, possivelmente, morte. A **terapia de reidratação oral**, que consiste principalmente em **NaCl e glicose**, foi desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O transporte da glicose e do Na^+ através do epitélio intestinal força (por osmose) a transferência de água do lúmen intestinal para dentro das células intestinais, resultando em reidratação. A glicose ou o NaCl isoladamente não seriam efetivos.

AS CÉLULAS TRANSPORTAM DETERMINADAS MACROMOLÉCULAS ATRAVÉS DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR ENDOCITOSE E EXOCITOSE

O processo pelo qual as células captam moléculas grandes é conhecido como **endocitose**. Algumas dessas moléculas (p. ex., polissacarídeos, proteínas e polinucleotídeos), quando hidrolisadas dentro da célula, **produzem nutrientes**. A endocitose também representa um mecanismo para **regular** o teor de determinados componentes da membrana, sendo os receptores de hormônios um exemplo típico. A endocitose pode ser utilizada para entender melhor como as células funcionam. O DNA de um tipo celular pode ser utilizado para transfectar uma célula diferente e alterar a função ou fenótipo dessa última. Com frequência, utiliza-se um gene específico nesses experimentos, fornecendo uma maneira singular de estudar e analisar a regulação desse gene. A **transfecção de DNA** depende da endocitose, que é responsável pela entrada do DNA no interior da célula. Em geral, esses experimentos empregam fosfato de cálcio, visto que o

Ca^{2+} estimula a endocitose e precipita o DNA, tornando-o mais apropriado para o processo de endocitose (ver Capítulo 39). As células também **liberam macromoléculas por exocitose**. Tanto a endocitose quanto a exocitose envolvem a formação de vesículas com ou a partir da membrana plasmática.

A endocitose envolve a ingestão de partes da membrana plasmática

Quase todas as células eucarióticas estão reciclando continuamente partes de suas membranas plasmáticas. As vesículas endocíticas são geradas quando segmentos da membrana plasmática se invaginam, englobando um pequeno volume de líquido extracelular e seu conteúdo. Em seguida, a vesícula desprende-se, à medida que a fusão das membranas plasmáticas veda o colo da vesícula no local original da invaginação (**Figura 40-20**). Em seguida, a bicamada lipídica da membrana, ou a **vesícula** assim gerada, funde-se com outras estruturas da membrana e, então, possibilita o transporte de seu conteúdo para outros compartimentos celulares ou até mesmo de volta para o exterior da célula. A maioria das vesículas endocíticas se funde com **lisossomos primários** para formar **lisossomos secundários**, que contêm enzimas hidrolíticas e representam, portanto, organelas especializadas para distribuição intracelular. As macromoléculas contidas nessas vesículas são digeridas, produzindo aminoácidos, açúcares simples ou nucleotídeos, que são transportados para fora das vesículas e reutilizados pela célula. A endocitose requer (1) energia, em geral proveniente da hidrólise do ATP; (2) Ca^{2+} ; e (3) elementos contráteis na célula (provavelmente o sistema de microfilamentos) (ver Capítulo 50).

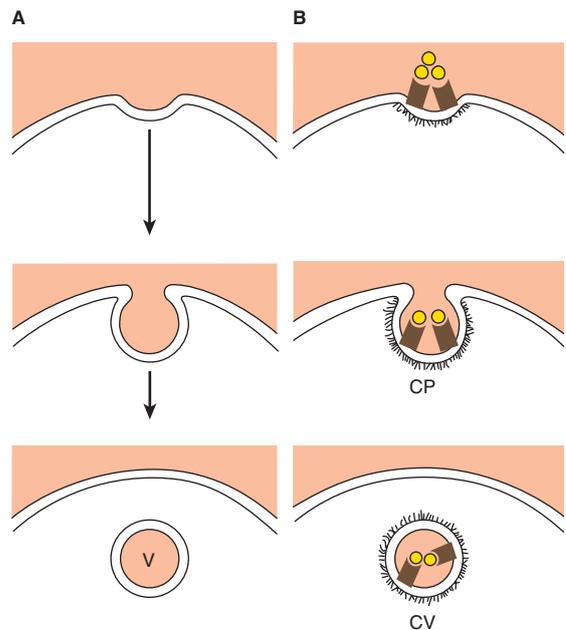


FIGURA 40-20 Dois tipos de pinocitose. Uma vesícula endocítica (V) forma-se em consequência da invaginação de uma parte da membrana plasmática. A pinocitose de fase fluida (A) é rara e não direcionada. A endocitose absorptiva (mediada por receptor) (B) é seletiva e ocorre em cavidades revestidas (CR) pela proteína clatrina (o material difuso). A especificidade do alvo é assegurada pelos receptores (símbolos marrons), que são específicos para uma variedade de moléculas. Isso leva à formação de uma vesícula revestida (VR) por clatrina internalizada.

Existem **dois** tipos gerais de endocitose. A **fagocitose** ocorre apenas em células especializadas, como os macrófagos e os granulócitos. A fagocitose envolve a ingestão de grandes partículas, como vírus, bactérias, células ou restos celulares. Os macrófagos são extremamente ativos nesse aspecto e podem ingerir 25% de seu volume por hora. Nesse processo, um macrófago pode internalizar 3% de sua membrana plasmática por minuto ou toda a membrana a cada 30 minutos.

A **pinocitose** (“célula que bebe”) constitui uma propriedade de todas as células e possibilita a captação celular de líquidos e de conteúdos líquidos. Existem dois tipos de pinocitose. A **pinocitose de fase líquida** é um processo não seletivo em que a captação de um soluto pela formação de pequenas vesículas é simplesmente proporcional à sua concentração no líquido extracelular circundante. A formação dessas vesículas é um processo extremamente ativo. Por exemplo, os fibroblastos internalizam a sua membrana plasmática em uma taxa de cerca de um terço da taxa dos macrófagos. Esse processo ocorre mais rapidamente do que a geração das membranas. A área de superfície e o volume de uma célula não se alteram muito, de modo que as membranas precisam ser repostas por exocitose ou por reciclagem tão rapidamente quanto são removidas por endocitose.

O outro tipo de pinocitose, a **pinocitose absorptiva** ou **endocitose mediada por receptor**, é principalmente responsável pela captação de macromoléculas específicas para as quais existem sítios de ligação na membrana plasmática. Esses receptores de alta afinidade permitem a concentração seletiva de ligantes provenientes do meio, minimizam a captação de líquido ou de macromoléculas livres solúveis e aumentam acentuadamente a taxa de entrada de moléculas específicas na célula. As vesículas formadas durante a pinocitose absorptiva derivam de invaginações (cavidades) recobertas, no lado citoplasmático, por um material filamentoso, apropriadamente designadas como **cavidades revestidas**. Em muitos sistemas, a proteína **clatrina** é o material filamentoso. Possui uma estrutura constituída de três pernas (chamada de **trisqueúlio**), em que cada uma das pernas é formada por uma cadeia leve e uma cadeia pesada de clatrina. A polimerização da clatrina dentro de uma vesícula é controlada por **partículas de montagem**, compostas por quatro **proteínas adaptadoras**. Essas proteínas interagem com determinadas sequências de aminoácidos dos receptores que se tornam carregados, assegurando a seletividade da captação. O lipídeo **fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂)** (ver Capítulo 21) também desempenha um papel importante na montagem das vesículas. Além disso, a proteína **dinamina**, que se liga ao GTP e o hidrolisa, é necessária para o desprendimento das vesículas revestidas por clatrina da superfície celular. As cavidades revestidas podem constituir até 2% da superfície de algumas células. Outros aspectos das vesículas serão discutidos no Capítulo 49.

Como exemplo, a molécula de **lipoproteína de baixa densidade (LDL)** e seu receptor (Capítulo 25) são internalizados por meio de cavidades revestidas contendo o receptor de LDL. Vesículas endocitóticas contendo o complexo do receptor da LDL ligado ao LDL se fundem aos lisossomos na célula. O receptor é liberado e reciclado retornando à membrana da superfície celular, ao passo que a apoproteína da LDL é degradada e os ésteres de colesterol são metabolizados. A síntese do receptor de LDL é regulada pelas consequências secundárias ou terciárias da pinocitose, por exemplo, pelos produtos metabólicos – como o colesterol – liberados durante a degradação de LDL. Os distúrbios do receptor de LDL e de sua internalização são clinicamente importantes e foram discutidos nos Capítulos 25 e 26.

A pinocitose absorptiva das **glicoproteínas extracelulares** exige que essas glicoproteínas transportem sinais de reconhecimento específicos de carboidratos. Esses sinais de reconhecimento são ligados por moléculas receptoras da membrana que desempenham um papel análogo ao do receptor de LDL. Um **receptor de galactosil** na superfície dos hepatócitos é fundamental na pinocitose absorptiva de **assialoglicoproteínas** a partir da circulação (ver Capítulo 46). As **hidrolases ácidas** captadas por pinocitose absorptiva nos fibroblastos são reconhecidas pelas suas frações de **manose-6-fosfato**. É interessante assinalar que a fração de manose-6-fosfato também parece desempenhar um papel importante no direcionamento intracelular das hidrolases ácidas para os lisossomos das células nas quais são sintetizadas (ver Capítulo 46).

Existe uma consequência desvantajosa no processo de endocitose mediada por receptor, visto que os **vírus** que causam doenças como a hepatite (que acomete as células hepáticas), a poliomielite (que afeta os neurônios motores) e a Aids (que afeta as células T) iniciam seus ciclos infecciosos pela entrada nas células por esse mecanismo. A **toxicidade do ferro** também começa com a captação excessiva de ferro por endocitose.

A exocitose libera determinadas macromoléculas das células

A maioria das células libera macromoléculas no exterior por **exocitose**. Esse processo também está envolvido na remodelação da membrana, quando os componentes sintetizados no RE e no aparelho de Golgi são transportados em vesículas, que se fundem com a membrana plasmática. O sinal para essa “exocitose clássica” (ver a seguir) é, com frequência, um hormônio que, quando se liga a um receptor de superfície celular, induz uma alteração local e transitória na concentração de Ca²⁺. O Ca²⁺ desencadeia o processo de exocitose. A **Figura 40-21** fornece uma comparação entre os mecanismos de exocitose e endocitose.

As moléculas liberadas por essa forma de exocitose têm, pelo menos, três destinos: (1) elas serão proteínas de membrana

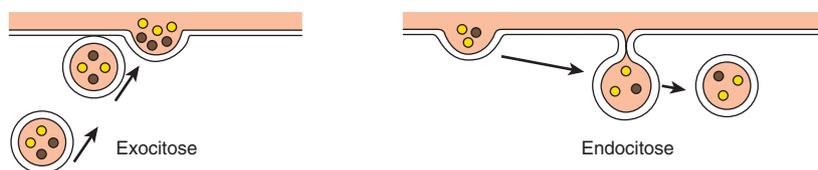


FIGURA 40-21 Uma comparação entre os mecanismos de endocitose e exocitose. A exocitose envolve o contato de duas monocamadas da superfície interna (lado citoplasmático), ao passo que a endocitose resulta do contato de duas monocamadas da superfície externa.

e permanecerão associadas à superfície celular; (2) elas poderão se tornar parte da matriz extracelular, como o colágeno e os glicosaminoglicanos; (3) elas poderão penetrar no líquido extracelular e transmitir sinais para outras células. A insulina, o paratormônio e as catecolaminas são acondicionados em grânulos e processados no interior das células, sendo liberados com estimulação apropriada.

VÁRIOS SINAIS PODEM SER TRANSMITIDOS ATRAVÉS DAS MEMBRANAS

Sinais bioquímicos específicos, como os neurotransmissores, hormônios e imunoglobulinas, ligam-se a proteínas receptoras integrais de membrana via seus domínios extracelulares expostos, transmitindo informações através dessas membranas ao citoplasma. Esse processo, denominado **sinalização transmembrana** ou **transdução de sinal**, envolve a formação de diversas moléculas de sinalização como segundos mensageiros, incluindo nucleotídeos cíclicos, cálcio, fosfoinositídeos e diacilglicerol (ver Capítulo 42). Muitas dessas etapas envolvem a fosforilação dos receptores e proteínas a jusante.

AS JUNÇÕES COMUNICANTES POSSIBILITAM O FLUXO DIRETO DE MOLÉCULAS DE UMA CÉLULA PARA OUTRA

As **junções comunicantes** são estruturas que permitem a transferência direta de moléculas pequenas (até cerca de 1.200 Da) de uma célula para outra adjacente. Elas são compostas por

uma família de proteínas, denominadas **conexinas**, que formam uma estrutura bi-hexagonal, que consiste em 12 dessas proteínas. Seis conexinas formam um hemicanal de conexina e ligam-se a uma estrutura semelhante da célula adjacente, produzindo um **canal conéxon** completo (**Figura 40-22**). Uma junção comunicante contém vários conéxons. Diferentes conexinas são encontradas em diferentes tecidos. Constatou-se que as mutações dos genes que codificam as conexinas estão associadas a diversos distúrbios, incluindo anormalidades cardiovasculares, um tipo de surdez e a forma ligada ao X da doença de Charcot-Marie-Tooth (um distúrbio neurológico desmielinizante).

AS VESÍCULAS EXTRACELULARES (EXOSSOMOS) REPRESENTAM UM MECANISMO NOVO E ANTERIORMENTE DESCONHECIDO DE COMUNICAÇÃO CÉLULA A CÉLULA

Na última década, uma classe de vesículas secretadas pequenas e heterogêneas, denominadas **vesículas extracelulares**, foi identificada e caracterizada. As vesículas extracelulares têm sido implicadas como um novo e importante mediador da comunicação célula a célula que provavelmente contribuem de forma importante para a fisiologia normal e patológica. Essas vesículas, circundadas por uma bicamada lipídica, são, de certa forma, heterogêneas em tamanho (30 a 2.000 nm de diâmetro) e são geradas por pelo menos dois mecanismos distintos (**Figura 40-23**): as **microvesículas** são geradas pelo brotamento da membrana plasmática de uma **célula original**, ao passo que os **exossomos** são gerados a partir do corpo multivesicular

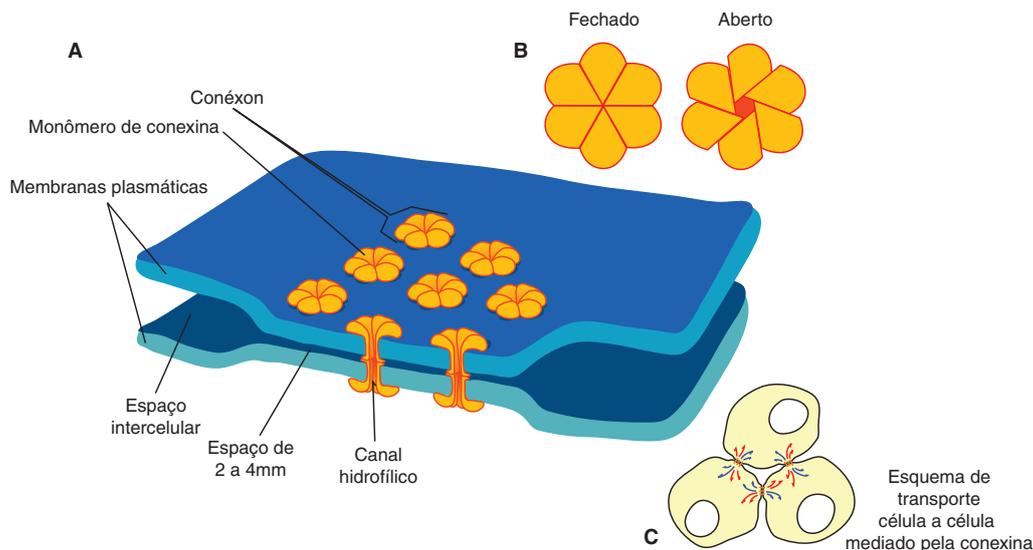


FIGURA 40-22 Ilustração esquemática de uma junção comunicante. Estão representados esquematicamente (A) as relações entre as células que contêm conexina; (B) os canais de conexina completos abertos e fechados; e (C) o fluxo de moléculas (setas azuis e vermelhas) entre um grupo de três células. Um conéxon é formado por dois hemiconéxons. Cada hemiconéxon é constituído de seis moléculas de conexina. Os solutos pequenos podem difundir-se pelo canal central quando abertos, representando, assim, um mecanismo direto de comunicação célula a célula. As conexinas ligam as células que se encontram entre 2 a 4 nm uma da outra. Fonte da imagem: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b7/Gap_cell_junction-en.svg.

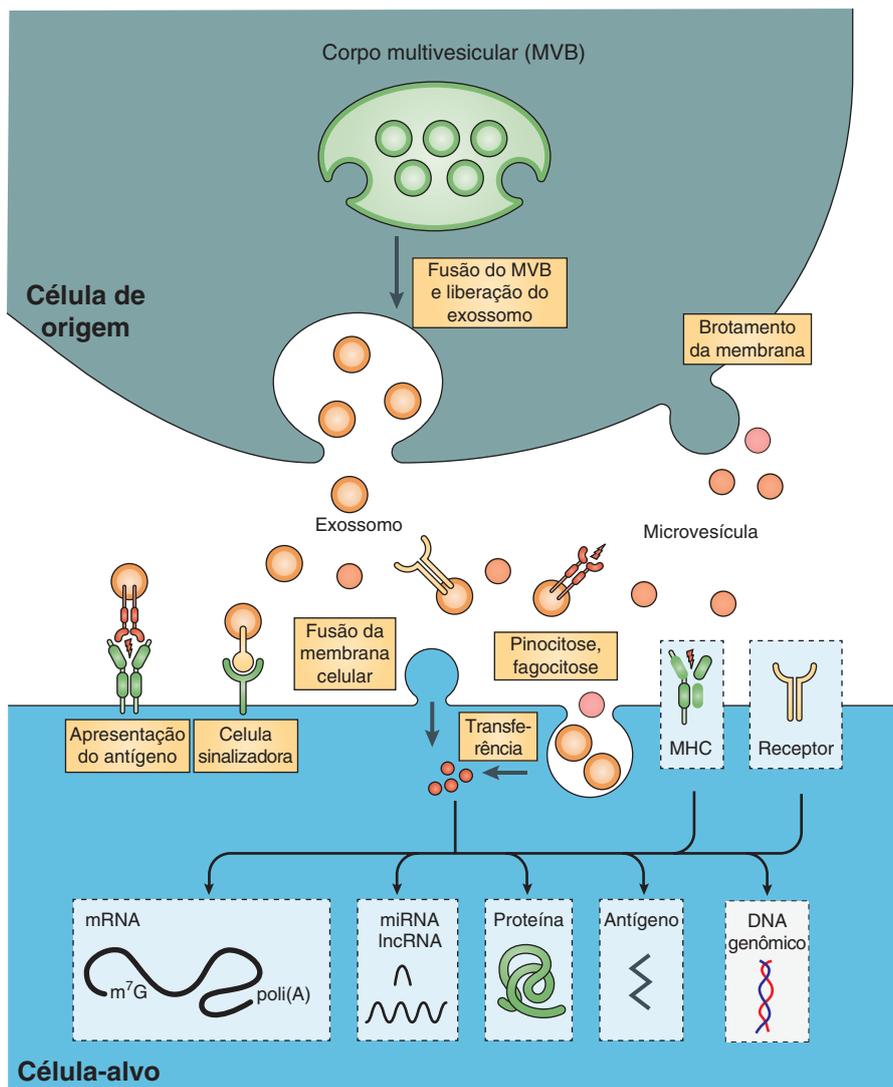


FIGURA 40-23 Comunicação célula a célula via vesículas extracelulares. São mostrados os mecanismos propostos para a formação e a produção de exossomos e microvesículas via endocitose (exossomo) e brotamento da membrana (microvesícula) a partir de uma célula de origem. As vesículas produzidas no corpo multivesicular (MVB) podem ser excitadas após a fusão com a membrana plasmática, como evidenciado, ou brotadas para o espaço extracelular. Todos esses processos envolvem o conjunto de proteínas, lipídeos e moléculas sinalizadoras previamente implicadas na exocitose e no brotamento (não mostrado). Uma vez liberados a partir da célula de origem, os exossomos e/ou microvesículas resultantes localizam suas células-alvo e, de acordo com os tipos de interações vesícula-célula-alvo mostradas, liberam seus conteúdos (ver setas pretas no interior da célula-alvo). Demonstrou-se que diferentes vesículas contêm RNA (mRNA, miRNA, lncRNA; ver Capítulo 36) e DNA, proteínas e lipídeos bioativos específicos; antígenos; e pequenas moléculas biologicamente ativas. É importante mencionar que vesículas extracelulares apresentam efeitos biológicos positivos ou negativos sobre células-alvo tanto no estado normal quanto no patológico.

(MVB), um componente do sistema de tráfego da membrana endocítica descrito anteriormente (ver Figura 40-12). Os exossomos são secretados a partir da célula original por fusão do MVB com a membrana plasmática. Em ambos os casos, as vesículas extracelulares (exossomos e microvesículas) fundem-se, por fim, às suas células-alvo para entregar uma determinada “encomenda”. Infelizmente, devido à recente descoberta de vesículas extracelulares, as denominações e termos exatos usados para descrever essas vesículas, suas cargas e suas células-alvo e de origem relevantes variam. Além disso, os termos “microvesícula” e “exossomo”, em geral, são reunidos como simplesmente “exossomos”.

O conteúdo da vesícula varia de uma célula de origem para outra e, inclusive, tem sido mostrado como pode ser diferente a partir da mesma célula de origem desenvolvida sob diferentes condições. Os conteúdos da vesícula podem incluir uma variedade de proteínas nucleares e citoplasmáticas, proteínas ligadas à membrana abrangendo desde canais até receptores, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*), proteínas de interação com a balsa lipídica, DNA, mRNA, ncRNAs grandes e pequenos, assim como pequenas proteínas e pequenas moléculas bioativas (Figura 40-23). Devido à rica e ampla diversidade dos conteúdos das vesículas/exossomos, não é surpreendente que

essas estruturas tenham sido implicadas em um âmbito bastante amplo da biologia. Além disso, considerando seu conteúdo de proteínas de membrana e o fato de que vesículas extracelulares parecem ser dirigidas às células receptoras específicas, o valor potencial dos exossomos como sistemas de liberação terapêutica está recebendo interesse e atenção significativos nas indústrias farmacêutica e de biotecnologia. Futuros trabalhos determinarão se essa nova e interessante área da pesquisa biomédica sobre vesículas extracelulares progredirá de acordo com essa promessa.

MUTAÇÕES QUE AFETAM AS PROTEÍNAS DE MEMBRANA CAUSAM DOENÇAS

Como as membranas são encontradas em muitas organelas e estão envolvidas em numerosos processos, não é surpreendente constatar que as mutações que afetam seus constituintes proteicos resultem em muitas doenças ou distúrbios. Enquanto algumas mutações afetam diretamente a função das proteínas de membrana, a maioria provoca dobramento defeituoso que compromete o tráfego da membrana em qualquer uma das diversas etapas (ver Capítulo 49) a partir do seu local de síntese no RE até a membrana plasmática ou outros sítios/organelas intracelulares. A **Tabela 40-7** fornece exemplos de doenças ou distúrbios decorrentes de anormalidades nas proteínas de membrana. Essas anormalidades refletem principalmente mutações em proteínas da membrana plasmática, e uma afeta a função dos lisossomos (doença da célula I).

As proteínas das membranas plasmáticas podem ser classificadas em receptores, transportadores, canais iônicos, enzimas e componentes estruturais. Os membros de todas essas classes são frequentemente glicosilados, de modo que as mutações que afetam esse processo (ver Capítulo 46) podem alterar a sua função. As mutações que ocorrem nos receptores podem causar defeitos na sinalização transmembrana, um evento comum no câncer (ver Capítulo 56). Muitas doenças ou distúrbios genéticos foram atribuídos a mutações que afetam várias proteínas que atuam no transporte de aminoácidos, açúcares, lipídeos, urato, ânions, cátions, água e vitaminas através da membrana plasmática.

As mutações nos genes que codificam proteínas em compartimentos ligados à membrana também podem ter consequências deletérias. Por exemplo, a ocorrência de mutações em genes que codificam as proteínas das membranas mitocondriais envolvidas na fosforilação oxidativa pode causar distúrbios neurológicos e outros problemas (p. ex., **neuropatia óptica hereditária de Leber [NOHL]**, uma condição na qual foi relatado algum sucesso na terapia gênica).

As proteínas das membranas também podem ser afetadas por outras anormalidades além das mutações. A produção de autoanticorpos contra o receptor de acetilcolina no músculo esquelético provoca miastenia grave. A isquemia pode comprometer rapidamente a integridade de vários canais iônicos nas membranas. A superexpressão da P-glicoproteína (MDR-1), uma bomba de fármacos, resulta em resistência a múltiplos fármacos (RMF) em células cancerosas. As anormalidades observadas em outros constituintes da membrana, além das proteínas, também podem ser prejudiciais. Quanto aos lipídeos, o

excesso de colesterol (p. ex., na hipercolesterolemia familiar), de lisofosfolipídeos (p. ex., após picadas de determinadas serpentes, cujos venenos contêm fosfolipases) ou de glicosfolipídeos (p. ex., na esfingolipidose) pode afetar a estrutura e, portanto, a função da membrana.

A fibrose cística é devida às mutações no gene que codifica a CFTR, um transportador de cloreto

A **fibrose cística (FC)** é um distúrbio genético recessivo, prevalente entre indivíduos brancos na América do Norte e em certas regiões da Europa Setentrional. A FC é caracterizada por infecções bacterianas crônicas das vias respiratórias e dos seios da face, má digestão de gordura devida à insuficiência do pâncreas exócrino, infertilidade masculina em consequência do desenvolvimento anormal do ducto deferente e níveis elevados de cloreto no suor (> 60 mmol/L). Sabe-se que mutações no gene que codifica uma proteína denominada **proteína reguladora transmembrana da fibrose cística (CFTR)**, do inglês, *cystic fibrosis transmembrane regulator protein* são responsáveis pela FC. A proteína CFTR é um transportador de Cl^- regulado pelo AMP cíclico. As principais manifestações clínicas da FC e outras informações sobre o gene responsável pela doença e sobre a CFTR serão apresentadas no Caso 5, no Capítulo 57.

TABELA 40-7 Algumas doenças ou estados patológicos resultantes ou atribuídos a anormalidades das membranas^a

Doença	Anormalidade
Acondroplasia (OMIM 100800)	Mutações no gene que codifica o receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
Hipercolesterolemia familiar (OMIM 143890)	Mutações no gene que codifica o receptor de LDL
Fibrose cística (OMIM 219700)	Mutações no gene que codifica a proteína CFTR, um transportador de Cl^-
Síndrome congênita do QT longo (OMIM 192500)	Mutações nos genes que codificam os canais iônicos do coração
Doença de Wilson (OMIM 277900)	Mutações no gene que codifica uma ATPase dependente de cobre
Doença da célula I (OMIM 252500)	Mutações no gene que codifica a GlcNAc-fosfotransferase, levando à ausência do sinal Man-6-P para a localização lisossomal de determinadas hidrolases
Esfereocitose hereditária (OMIM 182900)	Mutações nos genes que codificam a espectrina ou outras proteínas estruturais da membrana da hemácia
Metástase de células cancerosas	Acredita-se que as anormalidades das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas e dos glicolipídeos das membranas sejam importantes
Hemoglobinúria paroxística noturna (OMIM 311770)	Mutação que resulta em fixação deficiente da âncora de GPI (ver Capítulo 46) a determinadas proteínas da membrana da hemácia

^aOs distúrbios relacionados aqui são discutidos de modo detalhado em outros capítulos. A tabela fornece exemplos de mutações que afetam dois receptores, um transportador, vários canais iônicos (síndrome congênita do QT longo), duas enzimas e uma proteína estrutural. São também apresentados exemplos de alterações ou anormalidades da glicosilação das glicoproteínas. A maioria dos distúrbios listados afeta a membrana plasmática.

RESUMO

- As membranas são estruturas dinâmicas complexas constituídas de lipídeos, proteínas e moléculas contendo carboidratos.
- A estrutura básica de todas as membranas consiste na bicamada lipídica. Essa bicamada é formada por duas lâminas de fosfolipídeos, nas quais os grupos de cabeça polares hidrofílicos estão dirigidos em sentido contrário e ficam expostos ao meio aquoso nas superfícies externa e interna da membrana. As caudas apolares hidrofóbicas dessas moléculas estão orientadas na mesma direção, isto é, para o centro da membrana.
- As membranas são estruturas muito dinâmicas. Os lipídeos e algumas proteínas sofrem difusão lateral rápida. O *flip-flop* é muito lento para os lipídeos e quase inexistente para as proteínas.
- O modelo de mosaico fluido proporciona uma base útil para a compreensão da estrutura das membranas.
- As proteínas de membrana são classificadas em proteínas integrais, quando estão firmemente inseridas na bicamada, e periféricas, quando estão fixadas à superfície externa ou interna da membrana.
- As 20 ou mais membranas existentes em uma célula de mamífero apresentam composições e funções diferentes e definem compartimentos essenciais ou ambientes especializados dentro da célula, os quais desempenham funções específicas (p. ex., lisossomos).
- Algumas moléculas hidrofóbicas se difundem livremente através das membranas, porém o movimento de outras é limitado por seu tamanho e/ou carga.
- Diversos mecanismos passivos e ativos (em geral, dependentes de ATP) são empregados para manter os gradientes de muitas moléculas distintas através de diferentes membranas.
- Determinados solutos, como a glicose, entram nas células por difusão facilitada, ao longo de um gradiente de concentração, de uma concentração alta para uma concentração baixa, utilizando proteínas carreadoras (transportadoras) específicas.
- As principais bombas impulsionadas por ATP são classificadas em transportadores P (fosforilados), F (fatores de energia), V (vacuolares) e ABC. Os membros dessas classes incluem a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ do retículo sarcoplasmático; a ATP-sintase mt; a ATPase que acidifica os lisossomos; e as proteínas CFTR e MDR-1.
- Os canais iônicos dependentes de ligantes ou de voltagem são frequentemente utilizados para a transferência de moléculas de car-

ga elétrica (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.) através das membranas, ao longo de seus gradientes eletroquímicos.

- As moléculas grandes podem entrar ou sair das células por mecanismos como a endocitose ou a exocitose. Esses processos frequentemente necessitam da ligação da molécula a um receptor, conferindo especificidade ao processo.
- Vesículas extracelulares (exossomos) permitem o movimento direto de macromoléculas de célula a célula via pequenas vesículas. Os conteúdos do exossomo podem incluir lipídeos específicos, proteínas (receptores, canais, proteínas sinalizadoras), DNA, RNAs e pequenas moléculas bioativas. Essa nova área de tráfego da membrana e de comunicação célula a célula possui imenso potencial de impacto sobre as ideias e a prática sobre a biologia normal e anormal.
- As mutações que afetam a estrutura das proteínas de membrana (receptores, transportadores, canais iônicos, enzimas e proteínas estruturais) podem causar doenças; entre os exemplos, destacam-se a fibrose cística e a hipercolesterolemia familiar.

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, 2008.
- Cooper GM, Hausman RE: *The Cell, A Molecular Approach*. Sinauer Assoc Inc., 2013.
- Doherty GJ, McMahon HT: Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009;78:857.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology*, 7th ed. WH Freeman & Co, 2012.
- Longo N: Inherited defects of membrane transport. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS, et al (editors). Chapter 359. McGraw-Hill, 2008.
- Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology*, 2nd ed. Saunders Elsevier, 2008.
- Raposo G, Stoorvogel W: Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373-383.
- Singer SJ: Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol* 2004;66:1.
- Vance DE, Vance J (editors): *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th ed. Elsevier, 2008.
- Voelker DR: Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic. *Annu Rev Biochem* 2009;78:827.

A diversidade do sistema endócrino

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os princípios básicos da ação dos hormônios endócrinos, incluindo os determinantes da resposta das células-alvo dos hormônios e os determinantes da concentração de hormônio nas células-alvo.
- Compreender a ampla diversidade e os mecanismos de ação dos hormônios endócrinos.
- Reconhecer as etapas complexas envolvidas na produção, no transporte e no armazenamento dos hormônios.

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico	IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
ANF	Fator natriurético atrial	LH	Hormônio luteotrófico
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico	LPH	Lipotrofina
CBG	Globulina de ligação dos corticosteroides	MIT	Monoiodotirosina
CG	Gonadotrofina coriônica	MSH	Hormônio estimulante de melanócitos
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico	OHSD	Hidroxiesteroide-desidrogenase
CLIP	Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina	PNMT	Feniletanolamina-N-metiltransferase
DBH	Dopamina β-hidroxilase	POMC	Pró-opiomelanocortina
DHEA	Desidroepiandrosterona	SHBG	Globulina de ligação dos hormônios sexuais
DHT	Di-hidrotestosterona	StAR	(Proteína) reguladora aguda da esteroidogênese
DIT	Di-iodotirosina	TBG	Globulina de ligação da tireoxina
DOC	Desoxicorticosterona	TEBG	Globulina de ligação da testosterona-estrogênio
EGF	Fator de crescimento epidérmico	TRH	Hormônio de liberação da tireotrofina
FSH	Hormônio foliculo-estimulante	TSH	Hormônio estimulador da tireotrofina
GH	Hormônio do crescimento		

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A sobrevivência dos organismos multicelulares depende de sua capacidade de adaptação a um ambiente em constante mudança. Para essa adaptação, são necessários mecanismos de comunicação intercelular. O sistema nervoso e o sistema endócrino proporcionam essa ampla comunicação intercelular nos organismos. A princípio, o sistema nervoso era considerado um sistema de comunicação fixo, ao passo que o sistema endócrino produzia hormônios, que consistiam em mensageiros móveis. De fato, existe uma notável convergência desses sistemas reguladores. Por exemplo, a regulação neural do sistema endócrino é importante na produção e na secreção de alguns hormônios; muitos neurotransmissores se assemelham a hormônios quanto à sua síntese, transporte e mecanismo de ação; e muitos hormônios são sintetizados no sistema nervoso. O termo “hormônio” origina-se de um termo grego e significa “despertar para a atividade”. De acordo com a sua definição clássica, o hormônio é uma substância sintetizada em

um órgão e transportada pelo sistema circulatório para atuar em outro tecido. Entretanto, essa descrição original é muito restritiva, visto que os hormônios podem atuar em células adjacentes (ação parácrina) e na célula onde foram sintetizados (ação autócrina) sem a necessidade de entrar na circulação sistêmica. Uma gama diversificada de hormônios – cada um com mecanismos de ação e propriedades de biossíntese, armazenamento, secreção, transporte e metabolismo distintos – evoluiu para assegurar respostas homeostáticas. Essa diversidade bioquímica constitui o tema deste capítulo.

O CONCEITO DE CÉLULA-ALVO

Existem mais de 200 tipos de células diferenciadas nos seres humanos. Apenas algumas produzem hormônios, porém praticamente todos os 75 trilhões de células do corpo humano são alvos de um ou mais dos 50+ hormônios conhecidos. O conceito de célula-alvo proporciona uma maneira útil de

TABELA 41-1 Determinantes da concentração de um hormônio na célula-alvo

A taxa de síntese e secreção dos hormônios
A proximidade da célula-alvo em relação à fonte do hormônio (efeito de diluição)
A afinidade (constante de dissociação; K_d) do hormônio com proteínas transportadoras plasmáticas específicas (se houver)
A conversão de formas inativas ou parcialmente ativas do hormônio na forma totalmente ativa
A taxa de depuração do hormônio a partir do plasma por outros tecidos ou por digestão, metabolismo ou excreção

compreender a ação dos hormônios. No passado, acreditava-se que os hormônios afetavam um único tipo celular – ou apenas alguns tipos de células – e que o hormônio desempenhava uma única ação bioquímica ou fisiológica. Atualmente, sabe-se que um determinado hormônio pode afetar vários tipos celulares diferentes, que mais de um hormônio pode atuar em um determinado tipo de célula e que os hormônios podem exercer muitos efeitos diferentes em uma determinada célula ou em células distintas. Com a descoberta dos receptores de hormônios específicos intracelulares e de superfície celular, a definição de alvo foi ampliada para incluir qualquer célula na qual o hormônio (ligante) liga-se a seu receptor, independentemente da existência comprovada ou não de uma resposta bioquímica ou fisiológica.

Vários fatores determinam a resposta de uma célula-alvo a um hormônio. Eles podem ser considerados em duas maneiras gerais: (1) como fatores que afetam a concentração do hormônio na célula-alvo (Tabela 41-1) e (2) como fatores que afetam a resposta efetiva da célula-alvo ao hormônio (Tabela 41-2).

OS RECEPTORES DE HORMÔNIOS SÃO DE IMPORTÂNCIA FUNDAMENTAL

Os receptores discriminam com precisão

A Figura 41-1 ilustra um dos principais desafios enfrentados para que o sistema de comunicação hormonal possa funcionar. Os hormônios estão presentes em concentrações muito baixas no líquido extracelular, geralmente na faixa de atomolar a nanomolar (10^{-15} a 10^{-9} mol/L). Essa concentração é muito menor que a das numerosas moléculas estruturalmente semelhantes (esteróis, aminoácidos, peptídeos e proteínas) e outras moléculas que circulam em concentrações na faixa de micromolares

TABELA 41-2 Determinantes da resposta da célula-alvo

O número, atividade relativa e estado de ocupação dos receptores específicos na membrana plasmática, no citoplasma ou no núcleo
Metabolismo (ativação ou inativação) do hormônio na célula-alvo
Presença de outros fatores no interior da célula que são necessários para a resposta hormonal
<i>Upregulation</i> ou <i>downregulation</i> do receptor em virtude da interação com seu ligante
Dessensibilização pós-receptor da célula, incluindo <i>downregulation</i> do receptor

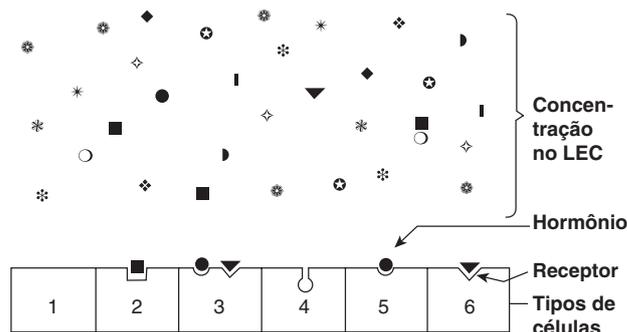


FIGURA 41-1 Especificidade e seletividade dos receptores de hormônios. Várias moléculas diferentes circulam no líquido extracelular (LEC), porém apenas algumas delas são reconhecidas pelos receptores de hormônios. Os receptores devem selecionar essas moléculas a partir de altas concentrações das outras moléculas. Esta ilustração simplificada mostra que uma célula pode não ter receptores de hormônios (tipo celular 1), pode apresentar um tipo de receptor (tipos celulares 2, 5 e 6), ter receptores de vários hormônios (tipo celular 3) ou ter um receptor, porém sem hormônio nas proximidades (tipo celular 4).

a milimolares (10^{-6} a 10^{-3} mol/L). Por conseguinte, as células-alvo precisam distinguir não apenas entre os diferentes hormônios presentes em pequenas quantidades, como também entre determinado hormônio e as outras moléculas semelhantes em concentrações 10^6 a 10^9 vezes maiores. Esse alto grau de discriminação é assegurado por moléculas de reconhecimento associadas às células, denominadas receptores. Os hormônios iniciam seus efeitos biológicos por meio de sua ligação a receptores específicos, e como qualquer sistema de controle efetivo também deve assegurar uma maneira de interromper determinada resposta. As ações induzidas pelos hormônios geralmente, mas nem sempre, terminam quando o efetor se dissocia do receptor (ver Figura 38-1; resposta Tipo A).

A célula-alvo é definida pela sua capacidade de ligar seletivamente determinado hormônio a seu receptor correspondente. Para que as interações entre o hormônio e o receptor sejam fisiologicamente relevantes, vários aspectos bioquímicos dessa interação são importantes: (1) a ligação deve ser específica, isto é, passível de ser desfeita por um agonista ou antagonista; (2) a ligação deve ser saturável; e (3) a ligação deve ocorrer dentro da faixa de concentrações da resposta biológica esperada.

Os receptores possuem domínios de reconhecimento e de acoplamento

Todos os receptores apresentam pelo menos dois domínios funcionais. Um domínio de reconhecimento liga-se ao ligante hormonal, e uma segunda região gera um sinal que acopla o reconhecimento do hormônio a alguma função intracelular. Esse acoplamento, ou transdução de sinal, ocorre de duas maneiras gerais. Os hormônios polipeptídicos e proteicos, bem como as catecolaminas, ligam-se a receptores localizados na membrana plasmática e, portanto, geram um sinal que regula várias funções intracelulares, muitas vezes ao modificar a atividade de uma enzima. Por outro lado, os esteróides, os retinóides e os hormônios tireoidianos interagem com receptores intracelulares, e esse complexo ligante-receptor fornece diretamente o sinal, em geral, para genes específicos cujas taxas de transcrição são consequentemente afetadas.

Os domínios responsáveis pelo reconhecimento do hormônio e pela geração de sinais foram identificados nos receptores de hormônios polipeptídicos proteicos e das catecolaminas. Os receptores de esteroides, dos hormônios tireoidianos e de retinoides apresentam vários domínios funcionais: um sítio liga-se ao hormônio; outro sítio liga-se a regiões específicas do DNA; um terceiro está envolvido na interação com outras proteínas correguladoras, resultando na ativação (ou na repressão) da transcrição gênica; e, por fim, um quarto sítio pode ligar-se especificamente a uma ou mais proteínas adicionais que influenciam o tráfego do receptor (ver Figura 38-19).

A dupla função de ligação e acoplamento define, em última análise, um receptor, sendo que o acoplamento da ligação do hormônio à transdução do sinal – o denominado **acoplamento receptor-efetor** – assegura a primeira etapa na amplificação da resposta hormonal. Essa dupla função também diferencia o receptor da célula-alvo das proteínas carreadoras plasmáticas que se ligam ao hormônio, mas que não geram um sinal (ver Tabela 41-6).

Os receptores são proteínas

Foram definidas várias classes de receptores de hormônios peptídicos. Por exemplo, o receptor da insulina é um heterotetrâmero composto por duas cópias de duas subunidades proteicas diferentes ($\alpha_2\beta_2$), ligadas por múltiplas ligações dissulfeto, nas quais a subunidade α extracelular se liga à insulina, ao passo que a subunidade β que atravessa a membrana de um lado ao outro é responsável pela transdução do sinal por meio do domínio tirosina-cinase localizado na porção citoplasmática desse polipeptídeo. Em geral, os receptores do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e do fator de crescimento epidérmico (EGF) assemelham-se, na sua estrutura, ao receptor da insulina. Os receptores do hormônio do crescimento e da prolactina também atravessam a membrana plasmática das células-alvo de um lado ao outro, porém não contêm atividade intrínseca de proteína-cinase. Todavia, a ligação do ligante a esses receptores resulta na associação e na ativação de uma via de sinalização completamente diferente da proteína-cinase, a via JakStat. Os receptores de hormônios polipeptídicos e das catecolaminas, que transduzem sinais ao alterar a taxa de produção do cAMP pelas proteínas G, caracterizam-se pela presença de 7 domínios que atravessam a membrana plasmática de um lado ao outro. A ativação da proteína-cinase e a geração de AMP cíclico (cAMP, ácido 3'5'-adenílico; ver Figura 18-5) constituem uma ação a jusante dessa classe de receptores (ver Capítulo 42 para mais detalhes).

Uma comparação de vários receptores diferentes de esteroides com os receptores dos hormônios tireoidianos revelou uma notável conservação da sequência de aminoácidos em determinadas regiões, particularmente nos domínios de ligação do DNA. Isso levou ao reconhecimento de que os receptores dos esteroides ou dos hormônios tireoidianos são membros de uma grande superfamília de receptores nucleares. Na atualidade, muitos membros relacionados dessa família não possuem ligantes conhecidos e, por esse motivo, são denominados receptores órfãos. A superfamília dos receptores nucleares desempenha um papel fundamental na regulação da transcrição gênica pelos hormônios, conforme descrito no Capítulo 42.

OS HORMÔNIOS PODEM SER CLASSIFICADOS DE DIVERSAS MANEIRAS

Os hormônios podem ser classificados de acordo com a composição química, as propriedades de solubilidade, a localização dos receptores e a natureza do sinal utilizado para mediar a ação hormonal dentro da célula. A Tabela 41-3 fornece uma classificação com base nessas últimas duas propriedades, ao passo que a Tabela 41-4 descreve as características gerais de cada grupo.

Os hormônios do grupo I são lipofílicos. Após a sua secreção, esses hormônios se associam a proteínas plasmáticas transportadoras ou carreadoras, em um processo que evita o problema da solubilidade e, ao mesmo tempo, prolonga a meia-vida plasmática do hormônio. As porcentagens relativas do hormônio ligado e do hormônio livre são determinadas pela quantidade, pela afinidade de ligação e pela capacidade de ligação da proteína de transporte. O hormônio livre, que constitui a forma biologicamente ativa, atravessa prontamente a membrana plasmática lipofílica de todas as células e alcança os receptores situados no citosol ou no núcleo das células-alvo. O complexo ligante-receptor é o mensageiro intracelular nesse grupo.

O segundo grupo principal consiste nos hormônios hidrossolúveis, os quais se ligam a receptores específicos que atravessam a membrana plasmática da célula-alvo de um lado ao outro. Os hormônios que se ligam a esses receptores de superfície das células se comunicam com os processos metabólicos intracelulares por meio de moléculas intermediárias, denominadas **segundos mensageiros** (o próprio hormônio é o primeiro mensageiro), que são geradas em consequência da interação ligante-receptor. O conceito de segundo mensageiro originou-se da observação de que a epinefrina se liga à membrana plasmática de determinadas células e aumenta o cAMP intracelular. Em seguida, foram realizados diversos experimentos, nos quais foi constatado que o cAMP modula os efeitos de muitos hormônios. Os hormônios que empregam esse mecanismo são mostrados no grupo II.A da Tabela 41-3. O fator natriurético atrial (ANF) utiliza o cGMP como segundo mensageiro (grupo II.B). Vários hormônios – anteriormente, acreditava-se que muitos deles tivessem influência sobre o cAMP – parecem utilizar o cálcio iônico (Ca^{2+}) ou os metabólitos de fosfoinosítídeos complexos (ou ambos) como sinal intracelular do segundo mensageiro. Esses hormônios estão incluídos no grupo II.C da tabela. O mensageiro intracelular para o grupo II.D consiste em cascatas de proteínas-cinase-fosfatase; várias delas foram identificadas, e um determinado hormônio pode utilizar mais de uma cascata de cinase. Alguns hormônios são classificados em mais de uma categoria, e as atribuições mudam à medida que novas informações são obtidas.

A DIVERSIDADE DO SISTEMA ENDÓCRINO

Os hormônios são sintetizados em uma variedade de arranjos celulares

Os hormônios são sintetizados em órgãos distintos, desenvolvidos exclusivamente para esse propósito específico, como a

TABELA 41-3 Classificação dos hormônios de acordo com o mecanismo de ação

I. Hormônios que se ligam a receptores intracelulares	
Androgênios	
Calcitriol (1,25(OH) ₂ -D ₃)	
Estrogênios	
Glicocorticoides	
Mineralocorticoides	
Progestinas	
Ácido retinoico	
Hormônios tireoidianos (T ₃ e T ₄)	
II. Hormônios que se ligam a receptores de superfície celular	
A. O segundo mensageiro é o cAMP	
Catecolaminas α ₂ -adrenérgicas	
Catecolaminas β-adrenérgicas	
Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)	
Hormônio antidiurético (vasopressina)	
Calcitonina	
Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	
Hormônio de liberação da corticotrofina	
Hormônio folículo-estimulante (FSH)	
Glucagon	
Lipotrofina (LPH)	
Hormônio luteinizante (LH)	
Hormônio estimulador de melanócitos (MSH)	
Paratormônio (PTH)	
Somatostatina	
Hormônio estimulador da tireoide (TSH)	
B. O segundo mensageiro é o cGMP	
Fator natriurético atrial	
Óxido nítrico	
C. O segundo mensageiro é o cálcio ou o fosfatidilinositol (ou ambos)	
Acetilcolina (muscarínico)	
Catecolaminas α ₁ -adrenérgicas	
Angiotensina II	
Hormônio antidiurético (vasopressina)	
Colecistocinina	
Gastrina	
Hormônio de liberação das gonadotrofinas	
Ocitocina	
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	
Substância P	
Hormônio de liberação da tireotrofina (TRH)	
D. O segundo mensageiro é uma cascata de cinases ou fosfatases	
Adiponectina	
Somatomamotrofina coriônica	
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	
Eritropoietina (EPO)	
Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	
Hormônio do crescimento (GH)	
Insulina	
Fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II	
Leptina	
Fator de crescimento neural (NGF)	
PDGF	
Prolactina	

glândula tireoide (tri-iodotironina), as glândulas suprarrenais (glicocorticoides e mineralocorticoides) e a hipófise (TSH, FSH, LH, GH, prolactina e ACTH). Alguns órgãos estão destinados a desempenhar duas funções distintas, porém estreitamente relacionadas. Por exemplo, os ovários produzem ovócitos maduros, bem como os hormônios reprodutores – o estradiol e a progesterona. Os testículos produzem espermatozoides maduros e sintetizam a testosterona. Os hormônios também são produzidos em células especializadas dentro de

TABELA 41-4 Características gerais das classes de hormônios

	Grupo I	Grupo II
Tipos	Esteroides, iodotironinas, calcitriol, retinoides	Polipeptídeos, proteínas, glicoproteínas, catecolaminas
Solubilidade	Lipofílicos	Hidrofílicos
Proteínas transportadoras	Sim	Não
Meia-vida plasmática	Longa (horas a dias)	Curta (minutos)
Receptores	Intracelular	Membrana plasmática
Mediador	Complexo receptor-hormônio	cAMP, cGMP, Ca ²⁺ , metabólitos de fosfinitóis complexos, cascatas de cinases

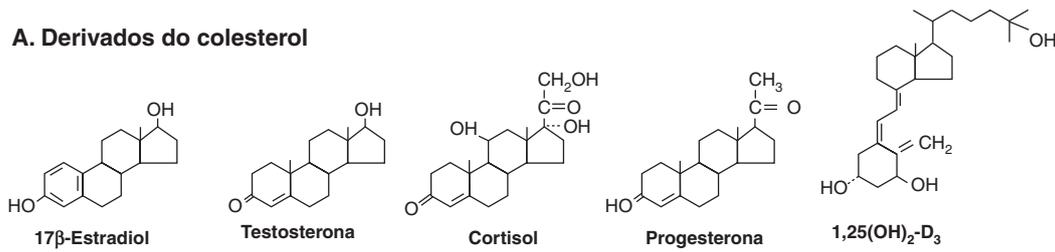
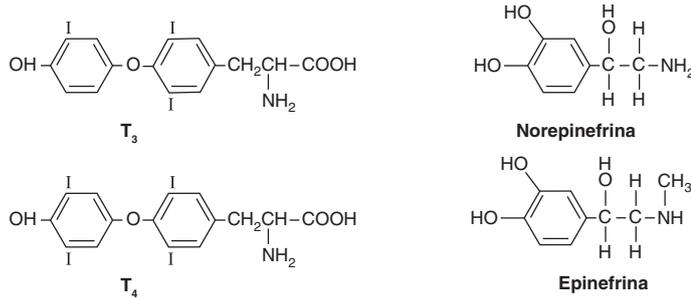
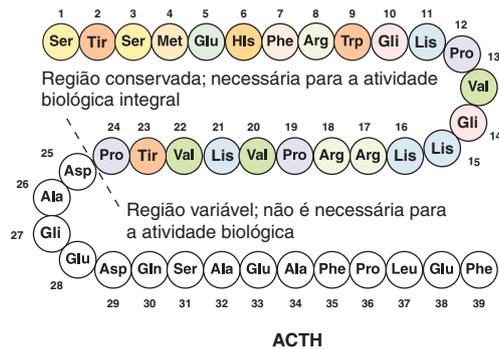
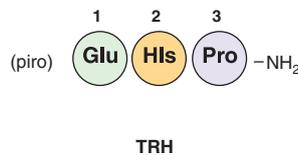
outros órgãos, como o intestino delgado (peptídeo semelhante ao glucagon), a glândula tireoide (calcitonina) e os rins (angiotensina II). Por fim, a síntese de alguns hormônios depende das células parenquimatosas de mais de um órgão – por exemplo, a pele, o fígado e o rim são necessários para a produção de 1,25(OH)₂-D₃ (calcitriol). A seguir, são discutidos alguns exemplos dessa diversidade nos processos de síntese hormonal, tendo cada um deles evoluído para cumprir um propósito específico.

Os hormônios são quimicamente distintos

Os hormônios são sintetizados a partir de uma ampla variedade de blocos químicos de construção. Um amplo conjunto é derivado do colesterol, no qual estão incluídos os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os estrogênios, as progestinas e o 1,25(OH)₂-D₃ (Figura 41-2). Em alguns casos, um hormônio esteroide atua como molécula precursora para outro hormônio. Por exemplo, a progesterona é um hormônio propriamente dito, mas também atua como precursor na síntese dos glicocorticoides, dos mineralocorticoides, da testosterona e dos estrogênios. A testosterona é um intermediário obrigatório na biossíntese do estradiol e na formação da di-hidrotestosterona (DHT). Nesses exemplos, descritos adiante em detalhes, o produto final é determinado pelo tipo celular e pelo conjunto associado de enzimas nos quais se encontra o precursor.

O aminoácido tirosina é o ponto de partida na síntese das catecolaminas e dos hormônios tireoidianos tetraiodotironina (tiroxina; T₄) e tri-iodotironina (T₃) (Figura 41-2). As T₃ e T₄ são singulares, visto que necessitam da adição de iodo (na forma de I⁻) para a sua bioatividade. Como o iodo da dieta é muito escasso em muitas regiões do mundo, o organismo desenvolveu um mecanismo complexo para o acúmulo e a conservação do I⁻.

Numerosos hormônios são polipeptídeos ou glicoproteínas. As dimensões desses hormônios variam desde um tripeptídeo, como o hormônio de liberação da tireotrofina (TRH), até polipeptídeos de cadeias simples, como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH; 39 aminoácidos), o paratormônio (PTH; 84 aminoácidos) e o hormônio do crescimento (GH; 191 aminoácidos) (Figura 41-2). A insulina é um heterodímero de cadeias AB de 21 e 30 aminoácidos, respectivamente.

A. Derivados do colesterol**B. Derivados da tirosina****C. Peptídeos de vários tamanhos****D. Glicoproteínas (TSH, FSH e LH)**

subunidades α comuns

subunidades β distintas

FIGURA 41-2 Diversidade química dos hormônios. (A) Derivados do colesterol; (B) derivados da tirosina; (C) peptídeos de vários tamanhos (nota: o ácido piroglutâmico [piro] é uma variante cíclica do ácido glutâmico na qual a cadeia lateral carboxil e os grupos amino livres assumem a forma de anel para constituir um lactâmico). (D) Glicoproteínas (TSH, FSH e LH) com subunidades α comuns e subunidades β distintas.

O hormônio folículo-estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), o hormônio estimulante da tireoide (TSH) e a gonadotrofina coriônica (CG) são hormônios glicoproteicos com estrutura heterodimérica αβ. A cadeia α é idêntica em todos esses hormônios, e as cadeias β distintas conferem aos hormônios a sua singularidade. Esses hormônios apresentam massa molecular na faixa de 25 a 30 kDa, dependendo do grau de glicosilação e do comprimento da cadeia β.

Os hormônios são sintetizados e modificados de várias maneiras para exercer a sua atividade completa

Alguns hormônios são sintetizados em sua forma final e secretados imediatamente. Nessa classe, estão incluídos os hormônios que se originam do colesterol. Outros, como as catecolaminas, são sintetizados em suas formas finais e armazenados nas

células que os produzem, enquanto alguns, como a insulina, são sintetizados a partir de moléculas precursoras nas células produtoras e, em seguida, são processados e secretados na presença de um estímulo fisiológico (concentrações plasmáticas de glicose). Por fim, outros hormônios são convertidos nas formas ativas a partir de moléculas precursoras na periferia (T₃ e DHT). Todos esses exemplos serão discutidos em detalhes adiante.

MUITOS HORMÔNIOS SÃO SINTETIZADOS A PARTIR DO COLESTEROL

Esteroidogênese suprarrenal

Os hormônios esteroides suprarrenais são sintetizados a partir do colesterol, que provém, em sua maior parte, do plasma, ao

passo que uma pequena parcela é sintetizada *in situ* a partir da acetil-CoA via mevalonato e esqualeno. O colesterol presente nas glândulas suprarrenais é, em grande parte, esterificado e armazenado nas gotículas lipídicas do citoplasma. Com a estimulação da glândula suprarrenal pelo ACTH, ocorre ativação de uma esterase, e o colesterol livre formado é transportado para dentro da mitocôndria, onde uma **enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450_{scc})** converte o colesterol em pregnenolona. A clivagem da cadeia lateral envolve hidroxilações sequenciais, em primeiro lugar no C₂₂ e, então, no C₂₀, seguidas da clivagem da cadeia lateral (remoção do fragmento de 6 carbonos isocaproaldeído) para produzir o esteroide de 21 carbonos (**Figura 41-3**, parte superior). Uma **proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR)** dependente de ACTH é essencial para o transporte do colesterol até a P450_{scc} na membrana mitocondrial interna.

Todos os hormônios esteroides dos mamíferos são formados a partir do colesterol pela pregnenolona, por meio de uma série de reações que ocorrem nas mitocôndrias ou no retículo endoplasmático da célula reprodutora. As hidroxilases que necessitam de oxigênio molecular e NADPH são essenciais, mas as desidrogenases, uma isomerase e uma liase também são necessárias em determinadas etapas. Existe especificidade celular na esteroidogênese suprarrenal. Por exemplo, a 18-hidroxilase e a 19-hidroxiesteroide-desidrogenase, necessárias para a síntese de aldosterona, são encontradas apenas nas células da zona glomerulosa (a região mais externa do córtex da glândula suprarrenal), de modo que a biossíntese desse mineralocorticoide se limita a essa região. A **Figura 41-4** fornece uma representação esquemática das vias envolvidas na síntese

das três principais classes de esteroides suprarrenais. As enzimas são mostradas nos retângulos, e as modificações em cada etapa estão sombreadadas.

Síntese dos mineralocorticoides

A síntese da aldosterona segue a via dos mineralocorticoides e ocorre na zona glomerulosa. A pregnenolona é convertida em progesterona pela ação de duas enzimas do retículo endoplasmático liso, a **3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -OHDSD)** e a **$\Delta^{5,4}$ -isomerase**. A progesterona é hidroxilada na posição C₂₁ para formar a 11-desoxicorticosterona (DOC), um mineralocorticoide ativo (na retenção de Na⁺). A hidroxilação seguinte, que ocorre em C₁₁, produz a corticosterona, que possui atividade glicocorticoide e é um mineralocorticoide fraco (apresenta < 5% da potência da aldosterona). Em algumas espécies (p. ex., roedores), trata-se do glicocorticoide mais potente. A hidroxilação do C₂₁ é necessária para as atividades mineralocorticoide e glicocorticoide, porém a maioria dos esteroides com um grupo hidroxil em C₁₇ exibe mais ação glicocorticoide e menos atividade mineralocorticoide. Na zona glomerulosa, que não apresenta a enzima 17 α -hidroxilase do retículo endoplasmático liso, existe uma 18-hidroxilase mitocondrial. A **18-hidroxilase (aldosterona-sintase)** atua sobre a corticosterona para formar a 18-hidroxycorticosterona, que é transformada em aldosterona por conversão de 18-álcool em um aldeído. Essa distribuição singular das enzimas e a regulação especial da zona glomerulosa pelo K⁺ e pela angiotensina II levaram alguns pesquisadores a sugerirem que, além de a glândula suprarrenal consistir em duas glândulas, o córtex da glândula suprarrenal representa, na verdade, dois órgãos separados.

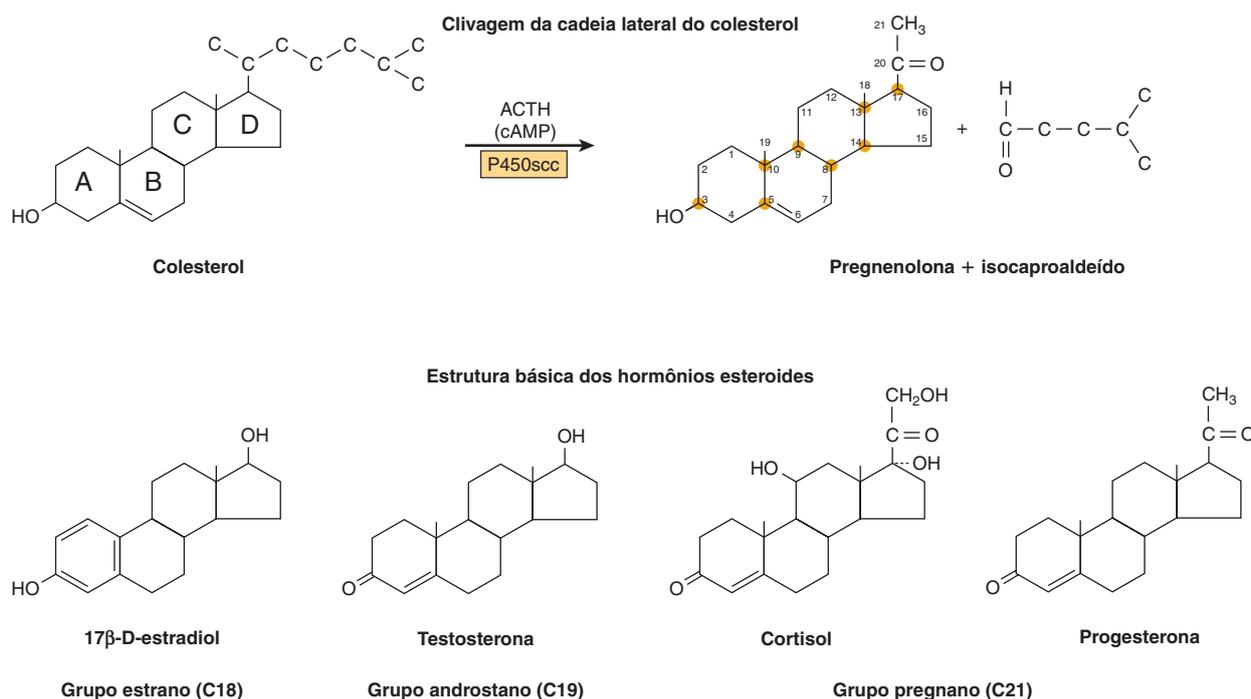


FIGURA 41-3 Clivagem da cadeia lateral do colesterol e estruturas básicas dos hormônios esteroides. Os anéis esteróis básicos são identificados pelas letras A a D. Os átomos de carbono são numerados de 1 a 21, começando pelo anel A (ver Figura 26-3).

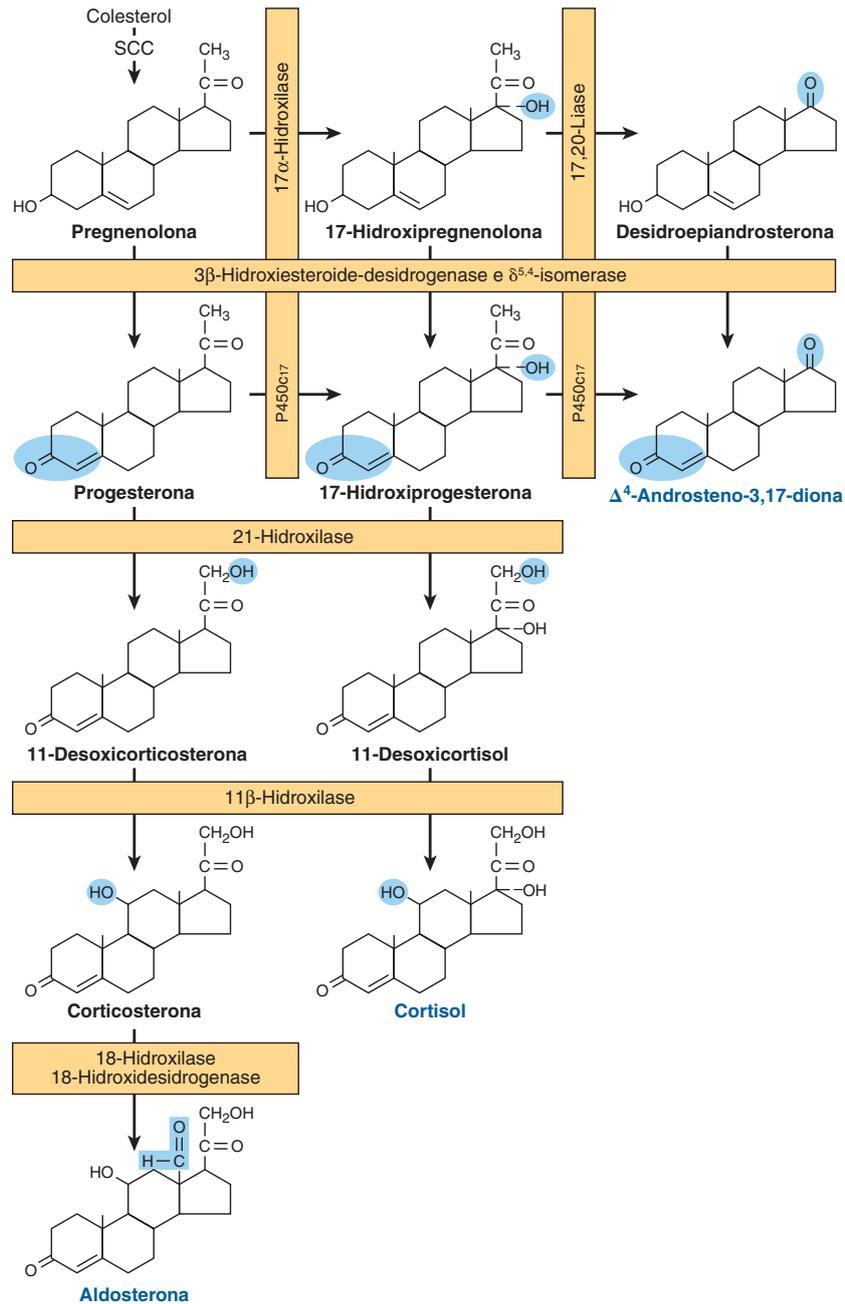


FIGURA 41-4 Vias envolvidas na síntese das três principais classes de esteroides suprarrenais (mineralocorticoides, glicocorticoides e androgênicos). As enzimas são apresentadas nos retângulos, ao passo que as modificações em cada etapa estão sombreadas. Observe que as atividades da 17 α -hidroxilase e da 17,20-liase fazem parte de uma enzima, designada P450c17. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com permissão, de Harding BW: In: *Endocrinology*, vol 2. DeGroot LJ [editor]. Grune & Stratton, 1979. Copyright © 1979 Elsevier Inc. Reimpressa, com permissão, da Elsevier.)

Síntese dos glicocorticoides

A síntese do cortisol requer 3 hidroxilases localizadas nas zonas fasciculada e reticulada do córtex da glândula suprarrenal, que atuam de modo sequencial nas posições C₁₇, C₂₁ e C₁₁. As primeiras duas reações são rápidas, ao passo que a hidroxilação do C₁₁ é relativamente lenta. Se a posição C₁₁ for hidroxilada em primeiro lugar, a ação da **17 α -hidroxilase** é impedida, e as reações seguem a via dos mineralocorticoides (com formação de corticosterona ou de aldosterona, dependendo do tipo de célula). A 17 α -hidroxilase é uma

enzima do retículo endoplasmático liso que atua sobre a progesterona ou, o que é mais comum, sobre a pregnenolona. A 17 α -hidroxiprogesterona é hidroxilada no C₂₁ para formar o 11-desoxicortisol, que, em seguida, é hidroxilado no C₁₁ para produzir o cortisol, que é o hormônio glicocorticoide natural mais potente nos seres humanos. A 21-hidroxilase é uma enzima do retículo endoplasmático liso, ao passo que a 11 β -hidroxilase é uma enzima mitocondrial. Portanto, a esteroidogênese envolve o movimento bidirecional de substratos para dentro e para fora das mitocôndrias.

Síntese dos androgênios

O principal androgênio, ou precursor androgênico, produzido pelo córtex da glândula suprarrenal é a desidroepiandrosterona (DHEA). A maior parte da 17-hidroxipregnenolona segue a via dos glicocorticoides, porém uma pequena fração sofre cisão oxidativa, com remoção da cadeia lateral de 2 carbonos pela ação da 17,20-liase. Na verdade, a atividade de liase faz parte da mesma enzima (P450c17) que catalisa a 17 α -hidroxilação. Assim, trata-se de uma **proteína de função dupla**. A atividade de liase é importante tanto nas glândulas suprarrenais quanto nas gônadas e atua exclusivamente nas moléculas que contêm 17 α -hidroxi. A produção de androgênios suprarrenais aumenta acentuadamente se a biossíntese de glicocorticoides for impedida pela ausência de uma das hidroxilases (**síndrome adrenogenital**). Na verdade, a DHEA é um pró-hormônio, visto que as ações da 3 β -OHSD e da $\Delta^{5,4}$ -isomerase convertem o androgênio fraco DHEA em **androstenediona**, que é mais potente. Pequenas quantidades de androstenediona também são produzidas nas glândulas suprarrenais pela ação da liase sobre a 17 α -hidroxiprogesterona. A redução da androstenediona na posição C₁₇ leva à formação da **testosterona**, o androgênio suprarrenal mais potente. Pequenas quantidades de testosterona são produzidas nas glândulas suprarrenais por esse mecanismo, porém a maior parte dessa conversão ocorre nos testículos.

Esteroidogênese testicular

Os androgênios testiculares são sintetizados no tecido intersticial das células de Leydig. O precursor imediato dos esteroides gonadais é, à semelhança dos esteroides suprarrenais, o colesterol. Conforme observado também nas glândulas suprarrenais, a etapa limitante consiste no transporte do colesterol até a membrana interna das mitocôndrias pela proteína transportadora StAR. Quando se encontra no local apropriado, o colesterol é submetido à ação da enzima de clivagem da cadeia lateral, P450scc. A conversão do colesterol em pregnenolona é idêntica nas glândulas suprarrenais, nos ovários e nos testículos. Entretanto, nesses dois últimos tecidos, a reação é promovida pelo LH, e não pelo ACTH.

A conversão da pregnenolona em testosterona exige a ação de cinco atividades enzimáticas contidas em três proteínas: (1) 3 β -hidroxiesteroide-desidrogenase (3 β -OHSD) e $\Delta^{5,4}$ -isomerase; (2) 17 α -hidroxilase e 17,20-liase; e (3) 17 β -hidroxiesteroide-desidrogenase (17 β -OHSD). Essa sequência, conhecida como via da **progesterona** (ou Δ^4) está ilustrada no lado direito da **Figura 41-5**. A pregnenolona também pode ser convertida em testosterona pela via da **desidroepiandrosterona** (ou Δ^5) que está ilustrada no lado esquerdo da **Figura 41-5**. A via Δ^5 parece ser mais utilizada nos testículos humanos.

As cinco atividades enzimáticas estão localizadas na fração microsomal nos testículos de ratos, e existe uma estreita associação funcional entre as atividades da 3 β -OHSD e da $\Delta^{5,4}$ -isomerase e entre as atividades da 17 α -hidroxilase e da 17,20-liase. A **Figura 41-5** mostra esses pares enzimáticos na sequência da reação geral, ambos contidos em uma única proteína.

A DHT é formada a partir da testosterona nos tecidos periféricos

A testosterona é metabolizada por duas vias. Uma delas envolve a oxidação na posição 17, ao passo que a outra envolve a redução da ligação dupla do anel A e da 3-cetona. O metabolismo pela primeira via ocorre em muitos tecidos, incluindo o fígado, e produz 17-cetosteroides que geralmente são inativos ou menos ativos do que o composto original. O metabolismo pela segunda via, que é menos eficiente, ocorre principalmente nos tecidos-avulsos e produz o potente metabólito DHT.

O produto metabólico mais significativo da testosterona é a DHT, visto que, em muitos tecidos, incluindo a próstata, os órgãos genitais externos e algumas áreas da pele, ela é a forma ativa do hormônio. No homem adulto, a concentração plasmática de DHT é cerca de um décimo da concentração da testosterona, e, diariamente, são produzidos cerca de 400 mg de DHT, em comparação com cerca de 5 mg de testosterona. Cerca de 50 a 100 mg de DHT são secretados pelos testículos. O restante é produzido periféricamente a partir da testosterona, em uma reação catalisada pela **5 α -redutase** dependente de NADPH (**Figura 41-6**). Desse modo, a testosterona pode ser considerada um pró-hormônio, visto que é convertida em um composto muito mais potente (DHT) e que a maior parte dessa conversão ocorre fora dos testículos. Parte do estradiol é formada a partir da aromatização periférica da testosterona, particularmente nos homens.

Esteroidogênese ovariana

Os estrogênios constituem uma família de hormônios sintetizados em uma variedade de tecidos. O 17 β -estradiol é o principal estrogênio de origem ovariana. Em algumas espécies, a estrona, sintetizada em numerosos tecidos, é mais abundante. Na gestação, ocorre produção de uma quantidade relativamente maior de estriol, proveniente da placenta. A via geral e a localização subcelular das enzimas envolvidas nas etapas iniciais da síntese do estradiol são as mesmas que as envolvidas na biossíntese dos androgênios. A **Figura 41-7** ilustra as características próprias dos ovários.

Os estrogênios são formados pela aromatização dos androgênios em um processo complexo que envolve três etapas de hidroxilação, exigindo, cada uma delas, a presença de O₂ e de NADPH. Acredita-se que o **complexo enzimático aromatase** inclua uma monoxigenase P450. O estradiol será formado se o substrato desse complexo enzimático for a testosterona, ao passo que a estrona resulta da aromatização da androstenediona.

Tem sido difícil desvendar a fonte celular dos vários esteroides ovarianos, porém a transferência de substratos entre dois tipos de células está envolvida. As células da teca constituem a fonte de androstenediona e de testosterona. Ambas são convertidas pela enzima aromatase nas células da granulosa em estrona e estradiol, respectivamente. A progesterona, um precursor de todos os hormônios esteroides, é sintetizada e secretada pelo corpo lúteo como produto final hormonal, visto que essas células não contêm as enzimas necessárias para converter a progesterona em outros hormônios esteroides (**Figura 41-8**).

A aromatização periférica dos androgênios produz quantidades significativas de estrogênio. Nos homens, a aromatização

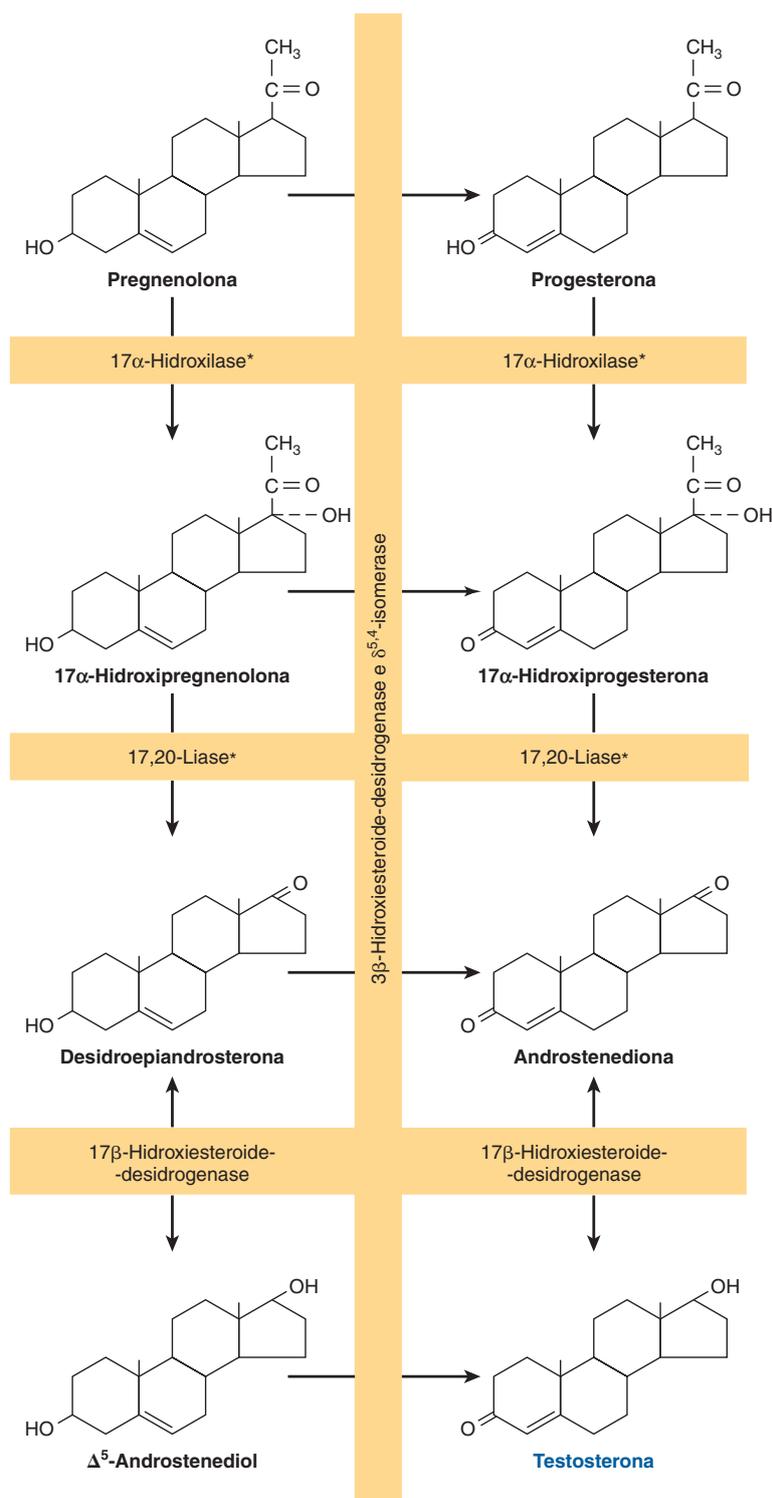


FIGURA 41-5 Vias da biossíntese da testosterona. A via no lado esquerdo da figura é denominada via Δ^5 ou da desidroepiandrosterona; a via no lado direito é denominada via Δ^4 ou da progesterona. O asterisco indica que as atividades da 17 α -hidroxilase e da 17,20-liase residem em uma única proteína, a P450c17.

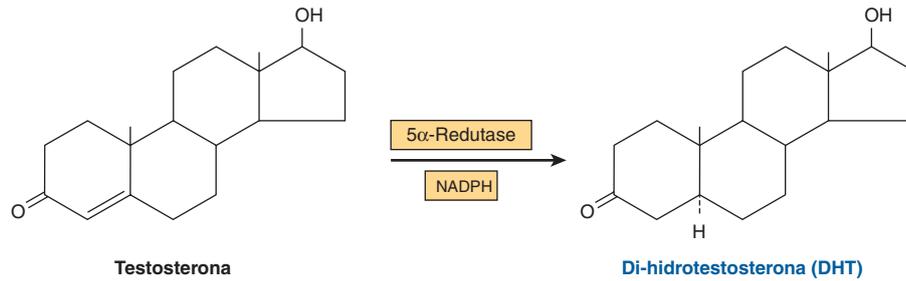


FIGURA 41-6 A di-hidrotestosterona é formada a partir da testosterona pela ação da enzima 5α-redutase.

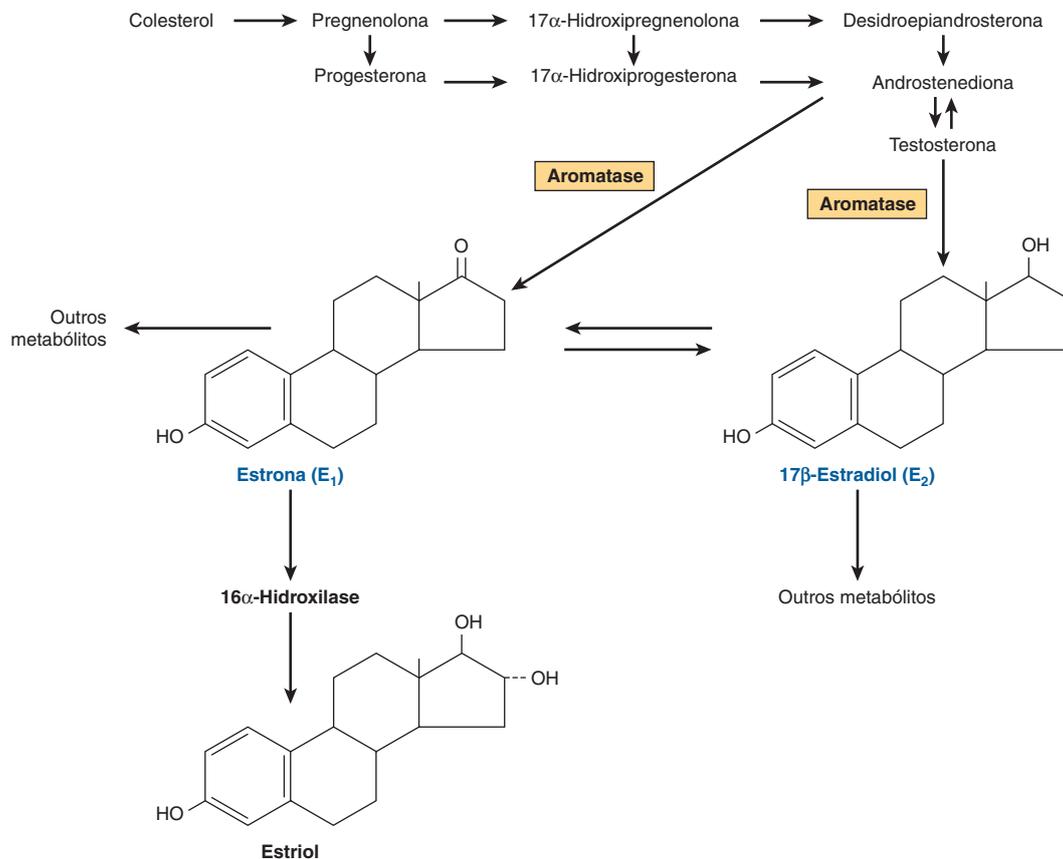


FIGURA 41-7 Biossíntese dos estrogênios. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com permissão, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology*, 21st ed. McGraw-Hill, 2005.)

periférica da testosterona em estradiol (E₂) responde por 80% da produção deste último hormônio. Nas mulheres, os androgênios suprarrenais são substratos importantes, visto que até 50% do E₂ formado durante a gestação provém da aromatização dos androgênios. Por fim, a conversão da androstenediona em estrona constitui a principal fonte de estrogênios em mulheres na pós-menopausa. A atividade da aromatase está presente nas células adiposas, bem como no fígado, na pele e em outros tecidos. A atividade aumentada dessa enzima pode contribuir para a “estrogenização” que caracteriza certas doenças, como a cirrose hepática, o hipertireoidismo, o envelhecimento e a obesidade. Os inibidores da aromatase constituem agentes tera-

pêuticos promissores no câncer de mama e, possivelmente, em outras neoplasias malignas do aparelho reprodutor feminino.

A 1,25(OH)₂-D₃ (calcitriol) é sintetizada a partir de um derivado do colesterol

A 1,25(OH)₂-D₃ é sintetizada por uma série complexa de reações enzimáticas que envolvem o transporte plasmático de moléculas precursoras a vários tecidos diferentes (Figura 41-9). Um desses precursores é a vitamina D – na verdade, não se trata de uma vitamina, porém esse termo comum permanece. A molécula ativa, 1,25(OH)₂-D₃, é transportada para outros

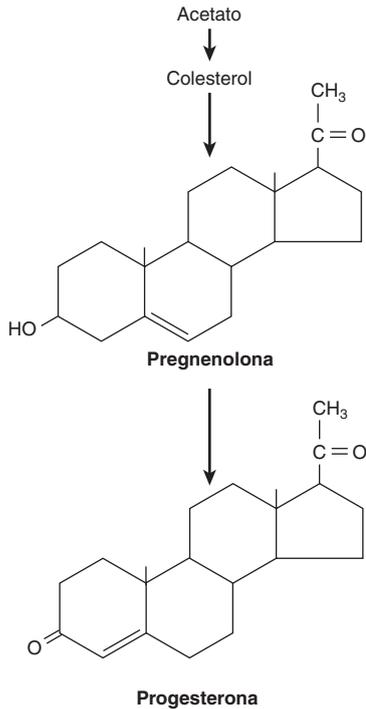


FIGURA 41-8 Biossíntese da progesterona no corpo lúteo.

órgãos, onde ativa processos biológicos de modo semelhante ao utilizado pelos hormônios esteroides.

Pele

Pequenas quantidades do precursor para a síntese da 1,25(OH)₂-D₃ estão presentes nos alimentos (óleo de fígado de peixe e gema do ovo); no entanto, a maior parte desse precursor é produzida no estrato de Malpighi da epiderme a partir do 7-desidrocolesterol, em uma reação de **fotólise** não enzimática. A amplitude dessa conversão está diretamente relacionada à intensidade da exposição e inversamente relacionada ao grau de pigmentação da pele. Devido ao envelhecimento, ocorre redução do 7-desidrocolesterol na epiderme, que pode estar relacionada ao equilíbrio negativo de cálcio associado à idade avançada.

Fígado

Uma proteína de transporte específica, denominada **proteína de ligação da vitamina D**, liga-se à vitamina D₃ e a seus metabólitos, transferindo a vitamina D₃ da pele ou do intestino para o fígado, onde sofre 25-hidroilação, a primeira reação obrigatória na síntese da 1,25(OH)₂-D₃. A 25-hidroilação ocorre no retículo endoplasmático, em uma reação que requer a presença de magnésio, NADPH, oxigênio molecular e de um fator

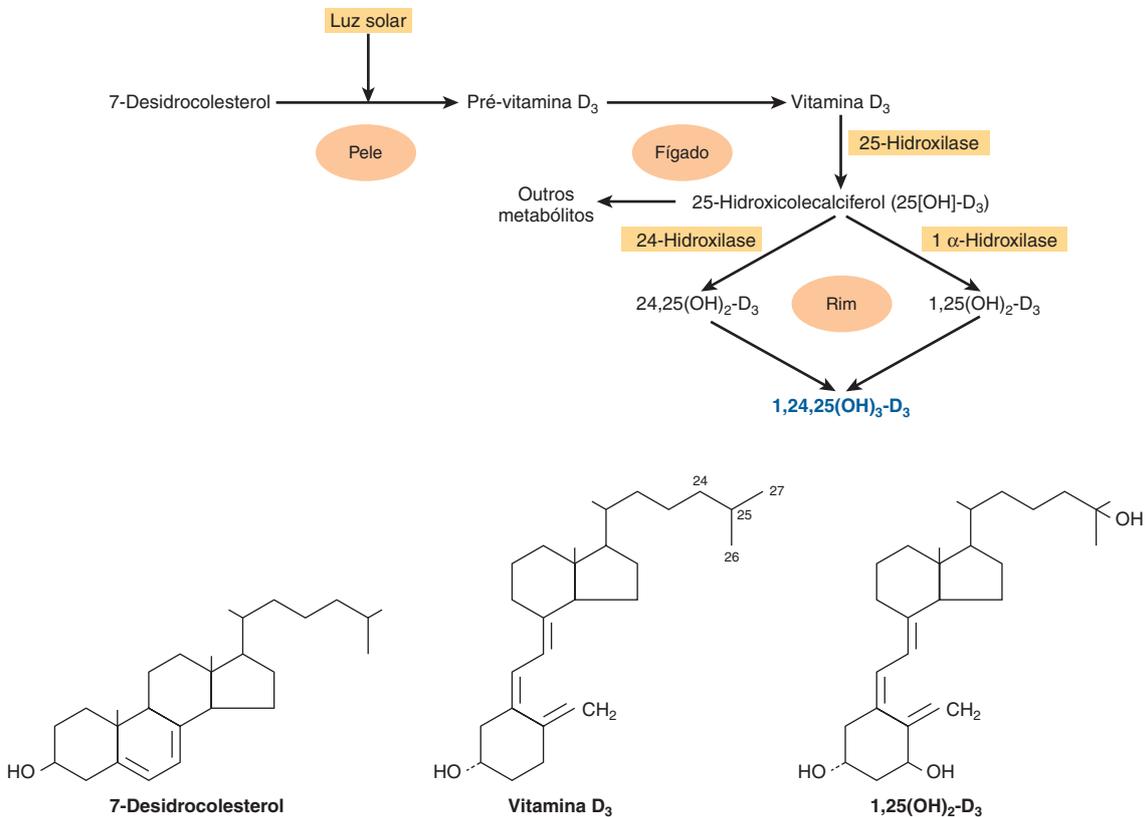


FIGURA 41-9 Formação e hidroilação da vitamina D₃. A 25-hidroilação ocorre no fígado, ao passo que as outras hidroilações ocorrem nos rins. É provável que também haja formação de 25,26(OH)₂-D₃ e de 1,25,26(OH)₃-D₃. As estruturas do 7-desidrocolesterol, da vitamina D₃ e da 1,25(OH)₂-D₃ também estão evidenciadas. (Modificada e reproduzida, com permissão, de Ganong WF: *Review of Medical Physiology*, 21st ed. McGraw-Hill, 2005.)

citoplasmático que ainda não foi caracterizado. Duas enzimas estão envolvidas: um citocromo P450-reductase dependente de NADPH e um citocromo P450. Essa reação não é regulada e também ocorre com baixa eficiência nos rins e no intestino. A $25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ entra na circulação, onde constitui a principal forma da vitamina D encontrada no plasma, e é, então, transportada aos rins pela proteína de ligação da vitamina D.

Rins

A $25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ é um agonista fraco que precisa ser modificado por hidroxilação na posição C_1 para exercer a sua atividade biológica integral. Essa reação ocorre nas mitocôndrias dos túbulos contornados proximais dos rins por uma reação de monoxigenase de três componentes que exige a presença de NADPH, Mg^{2+} , oxigênio molecular e de pelo menos três enzimas: (1) uma flavoproteína, a ferredoxina-reductase renal; (2) uma proteína de ferro e enxofre, a ferredoxina renal; e (3) o citocromo P450. Esse sistema produz a $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$, que constitui o metabólito de ocorrência natural mais potente da vitamina D.

AS CATECOLAMINAS E OS HORMÔNIOS DA TIREOIDE SÃO FORMADOS A PARTIR DA TIROSINA

As catecolaminas são sintetizadas em sua forma final e armazenadas em grânulos de secreção

Três aminas – dopamina, norepinefrina e epinefrina – são sintetizadas a partir da tirosina nas células cromafins da medula da glândula suprarrenal. O principal produto da medula da glândula suprarrenal é a epinefrina. Esse composto constitui aproximadamente 80% das catecolaminas na medula e não é sintetizado no tecido extramedular. Em contrapartida, a maior parte da norepinefrina encontrada em órgãos inervados pelos nervos simpáticos é sintetizada *in situ* (cerca de 80% do total), e a maior parte do restante é produzida em outras terminações nervosas, alcançando os locais de ação pela circulação. A epinefrina e a norepinefrina podem ser sintetizadas e armazenadas em diferentes células da medula da glândula suprarrenal e de outros tecidos cromafins.

A conversão da tirosina em epinefrina ocorre em quatro etapas sequenciais: (1) hidroxilação do anel; (2) descarboxilação; (3) hidroxilação da cadeia lateral para formar norepinefrina; e (4) *N*-metilação para gerar epinefrina. A **Figura 41-10** ilustra a via da biossíntese e as enzimas envolvidas.

A tirosina-hidroxilase constitui a etapa limitante de velocidade da biossíntese das catecolaminas

A **tirosina** é o precursor imediato das catecolaminas, e a **tirosina-hidroxilase** é a enzima limitante da velocidade da biossíntese das catecolaminas. A tirosina-hidroxilase é encontrada nas formas solúvel e ligada a partículas somente nos tecidos que sintetizam as catecolaminas; ela atua como oxidorreductase, com tetra-hidropteridina como cofator, para converter a L-tirosina em L-di-hidroxfenilalanina (**L-dopa**). Por ser a

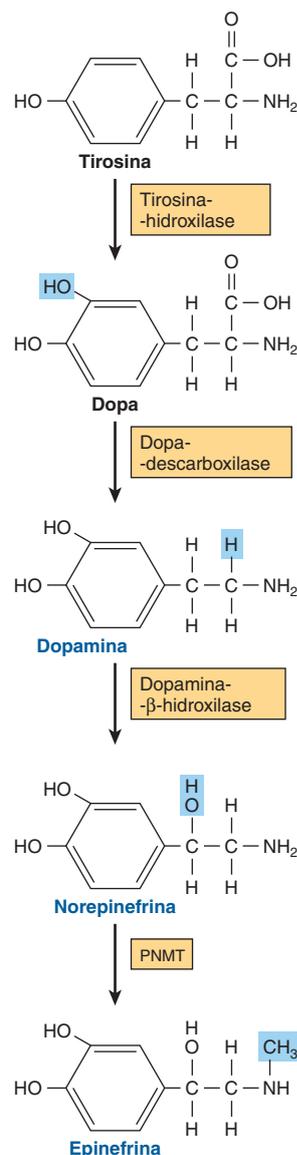


FIGURA 41-10 Biossíntese das catecolaminas. (PNMT, feniletanolamina-*N*-metiltransferase.)

enzima que limita a velocidade de síntese, a tirosina-hidroxilase é regulada de várias formas. O mecanismo mais importante envolve a inibição por retroalimentação das catecolaminas, que competem com a enzima pelo cofator pteridina. As catecolaminas não podem atravessar a barreira hematoencefálica; por conseguinte, elas precisam ser sintetizadas localmente no encéfalo. Em determinadas doenças do sistema nervoso central (p. ex., doença de Parkinson), ocorre uma deficiência local de síntese da dopamina. A L-dopa, o precursor da dopamina, atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica e, portanto, é um importante agente no tratamento da doença de Parkinson.

A dopa-descarboxilase está presente em todos os tecidos

Essa enzima solúvel requer a presença de piridoxal-fosfato para a conversão da L-dopa em 3,4-di-hidroxfeniletilamina (**dopamina**). Os compostos que se assemelham à L-dopa,

como a α -metildopa, são inibidores competitivos dessa reação. A α -metildopa mostra-se efetiva no tratamento de alguns tipos de hipertensão.

A dopamina β -hidroxilase (DBH) catalisa a conversão de dopamina em norepinefrina

A DBH é uma monooxigenase que utiliza o ascorbato como doador de elétrons, o cobre no sítio ativo e o fumarato como modulador. A DBH encontra-se na fração particulada das células medulares, provavelmente nos grânulos secretores; dessa maneira, a conversão da dopamina em **norepinefrina** ocorre nessa organela.

A feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT) catalisa a produção da epinefrina

A PNMT catalisa a *N*-metilação da norepinefrina para formar a **epinefrina** nas células produtoras de epinefrina da medula da glândula suprarrenal. Como a PNMT é solúvel, supõe-se que a conversão da norepinefrina em epinefrina ocorra no citoplasma. A síntese da PNMT é induzida pelos hormônios glicocorticoides que alcançam a medula da glândula suprarrenal pelo sistema portal intrassuprarrenal. Esse sistema especial assegura um gradiente de concentração de esteroides cem vezes maior do que o do sangue arterial sistêmico, e essa alta concentração intrassuprarrenal parece ser necessária para a indução da PNMT.

A T_3 e T_4 ilustram a diversidade da síntese de hormônios

A formação de **tri-iodotironina** (T_3) e de **tetraiodotironina** (**tireoxina**; T_4) (ver Figura 41-2) ilustra muitos dos princípios de diversidade discutidos neste capítulo. Esses hormônios exigem a presença de um elemento raro (iodo) para a sua bioatividade; são sintetizados como parte de uma molécula precursora muito grande (tireoglobulina); são armazenados em um reservatório intracelular (coloide); e ocorre conversão periférica da T_4 em T_3 , que é um hormônio muito mais ativo.

Os hormônios tireoidianos T_3 e T_4 são singulares, visto que o iodo (na forma de iodeto) constitui um componente essencial de ambos. Em quase todas as partes do mundo, o iodo é um componente escasso do solo e, por essa razão, encontra-se em quantidades muito pequenas nos alimentos. Os organismos desenvolveram um mecanismo complexo para adquirir e reter esse elemento crucial a fim de convertê-lo em uma forma apropriada para incorporação em compostos orgânicos. Ao mesmo tempo, a glândula tireoide precisa sintetizar tironina a partir da tirosina, e essa síntese ocorre na tireoglobulina (**Figura 41-11**).

A **tireoglobulina** é o precursor de T_4 e T_3 . Trata-se de uma grande proteína glicosilada e iodada, com massa molecular de 660 kDa. O carboidrato constitui 8 a 10% do peso da tireoglobulina, ao passo que o iodeto representa aproximadamente 0,2 a 1%, dependendo do teor de iodo da dieta. A tireoglobulina é composta por duas grandes subunidades. Ela contém 115 resíduos de tirosina, e cada um desses resíduos constitui um sítio potencial de iodinação. Cerca de 70% do iodeto na tireoglobulina estão presentes nos precursores inativos, **moniodotirosina** (MIT) e **di-iodotirosina** (DIT), ao passo que 30% se encontram sob a forma de **resíduos de iodotironil**, T_4 e T_3 . Quando o suprimento de iodo é suficiente, a razão $T_4:T_3$ é de aproximadamente 7:1. Na **deficiência de iodo**, essa razão diminui, assim como a

razão DIT:MIT. A tireoglobulina, uma molécula grande com cerca de 5 mil aminoácidos, assegura a conformação necessária para o acoplamento de tirosil e a organificação do iodeto necessários à formação dos hormônios tireoidianos com diaminoácidos. A tireoglobulina é sintetizada na porção basal da célula e se desloca até o lúmen, onde constitui uma forma de armazenamento de T_3 e T_4 no coloide; na glândula tireoide normal, existe um suprimento desses hormônios por várias semanas. Poucos minutos após a estimulação da tireoide pelo TSH, o coloide entra novamente na célula e observa-se aumento acentuado na atividade dos fagolisossomos. Várias proteases ácidas e peptidases hidrolisam a tireoglobulina em seus aminoácidos constituintes, incluindo T_4 e T_3 , que são descarregadas no espaço extracelular (ver Figura 41-11). Por conseguinte, a tireoglobulina é um pró-hormônio muito grande.

O metabolismo do iodeto envolve várias etapas distintas

A glândula tireoide tem a capacidade de concentrar o I^- contra um forte gradiente eletroquímico. Trata-se de um processo dependente de energia, que está ligado ao transportador de I^- tireoidiano dependente da Na^+K^+ -ATPase. A razão entre o iodeto da tireoide e o iodeto do soro (razão T:S) reflete a atividade desse transportador. Essa atividade é controlada principalmente pelo TSH e varia desde 500:1, em animais cronicamente estimulados com TSH, até 5:1 ou menos, em animais submetidos à hipofisectomia (sem TSH). Nos seres humanos submetidos a uma dieta contendo teor normal de iodo, a razão T:S é de aproximadamente 25:1.

A glândula tireoide é o único tecido capaz de oxidar o I^- em um estado de valência mais alta, uma etapa obrigatória na organificação do I^- e na biossíntese dos hormônios tireoidianos. Essa etapa envolve uma peroxidase contendo heme e ocorre na superfície luminal da célula folicular. A tireoperoxidase, uma proteína tetramérica com massa molecular de 60 kDa, requer a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente oxidante. O H_2O_2 é produzida por uma enzima dependente de NADPH que se assemelha à citocromo *c*-redutase. Diversos compostos inibem a oxidação do I^- e, portanto, a sua incorporação subsequente à MIT e à DIT. Os mais importantes desses compostos são os fármacos da tioureia. Esses compostos são usados como fármacos antitireoidianos, em virtude de sua capacidade de inibir a biossíntese dos hormônios tireoidianos nessa etapa. Quando ocorre iodinação, o iodo não deixa a tireoide prontamente. A tirosina livre pode ser iodada, porém não é incorporada às proteínas, uma vez que não existe nenhum tRNA para reconhecer a tirosina iodada.

O acoplamento de duas moléculas de DIT para formar T_4 – ou de uma molécula de MIT e uma molécula de DIT para formar T_3 – ocorre no interior da molécula de tireoglobulina. Não foi identificada uma enzima de acoplamento separada, e, como se trata de um processo oxidativo, supõe-se que a mesma tireoperoxidase catalise essa reação ao estimular a formação de radicais livres da iodotirosina. Essa hipótese é sustentada pela observação de que os mesmos fármacos que inibem a oxidação de I^- também inibem o acoplamento. Os hormônios tireoidianos sintetizados continuam como partes integrais da tireoglobulina até que ela sofra degradação, conforme descrito anteriormente.

A deiodinase remove o I^- das moléculas inativas de moniodotironina e di-iodotironina na glândula tireoide. Esse

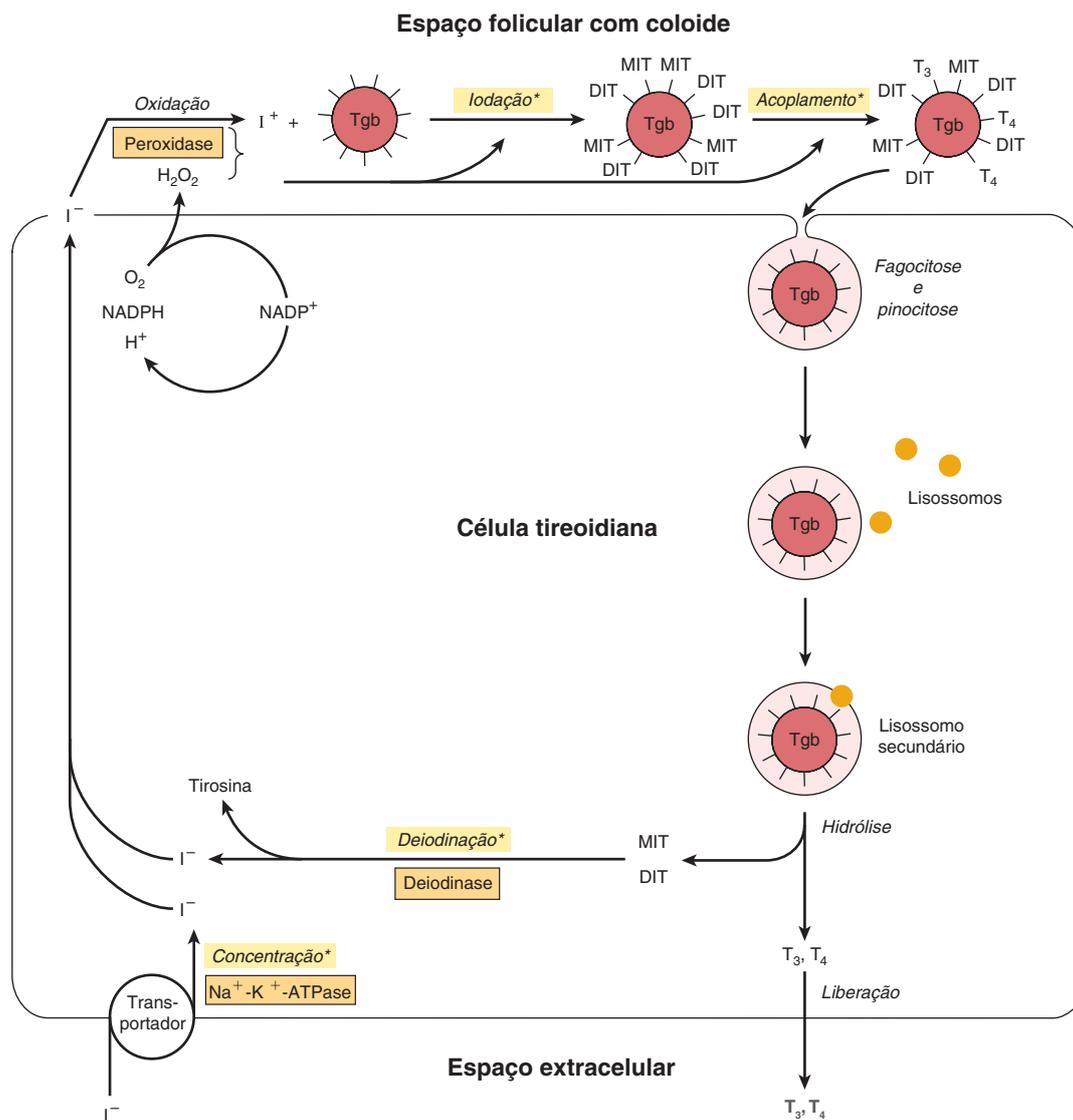


FIGURA 41-11 Modelo do metabolismo do iodo no foliculo da tireoide. Uma célula folicular está ilustrada de frente para o lúmen folicular (parte superior) e o espaço extracelular (parte inferior). O iodeto penetra na tireoide principalmente através de um transportador (lado esquerdo inferior). A síntese de hormônio tireoidiano ocorre no espaço folicular por uma série de reações, muitas das quais são mediadas por peroxidases. Os hormônios tireoidianos, que são armazenados no coloide do espaço folicular, são liberados da tireoglobulina por hidrólise dentro da célula tireoidiana. (DIT, di-iodotirosina; MIT, monoiodotirosina; Tgb, tireoglobulina; T₃, tri-iodotironina; T₄, tetraiodotironina; as estruturas de T₃ e T₄ estão evidenciadas na Figura 41-2B.) Os asteriscos indicam as etapas ou processos onde a ocorrência de deficiências enzimáticas hereditárias provoca bócio congênito e, com frequência, resulta em hipotireoidismo.

mecanismo assegura uma quantidade substancial do I⁻ utilizado na biossíntese de T₃ e T₄. Uma deiodinase periférica nos tecidos-alvo, como a hipófise, os rins e o fígado, remove seletivamente o I⁻ da posição 5' de T₄ para formar T₃ (ver Figura 41-2), que é uma molécula muito mais ativa. Nesse sentido, pode-se considerar T₄ como um pró-hormônio, embora exiba alguma atividade intrínseca.

Vários hormônios são formados a partir de precursores peptídicos maiores

A formação das ligações dissulfeto essenciais na insulina exige que esse hormônio seja primeiro sintetizado como parte de uma

molécula precursora maior, denominada proinsulina. Do ponto de vista conceitual, esse processo assemelha-se ao exemplo dos hormônios tireoidianos, que só podem ser sintetizados na presença de uma molécula muito maior. Vários outros hormônios são sintetizados como parte de moléculas precursoras maiores, não em virtude de alguma exigência estrutural especial, mas sim como mecanismo para controlar a quantidade disponível do hormônio ativo. O PTH e a angiotensina II representam exemplos desse tipo de regulação. Outro exemplo interessante é a proteína POMC, que pode ser processada em muitos hormônios diferentes de acordo com o tecido específico. Esses exemplos serão discutidos em detalhes adiante.

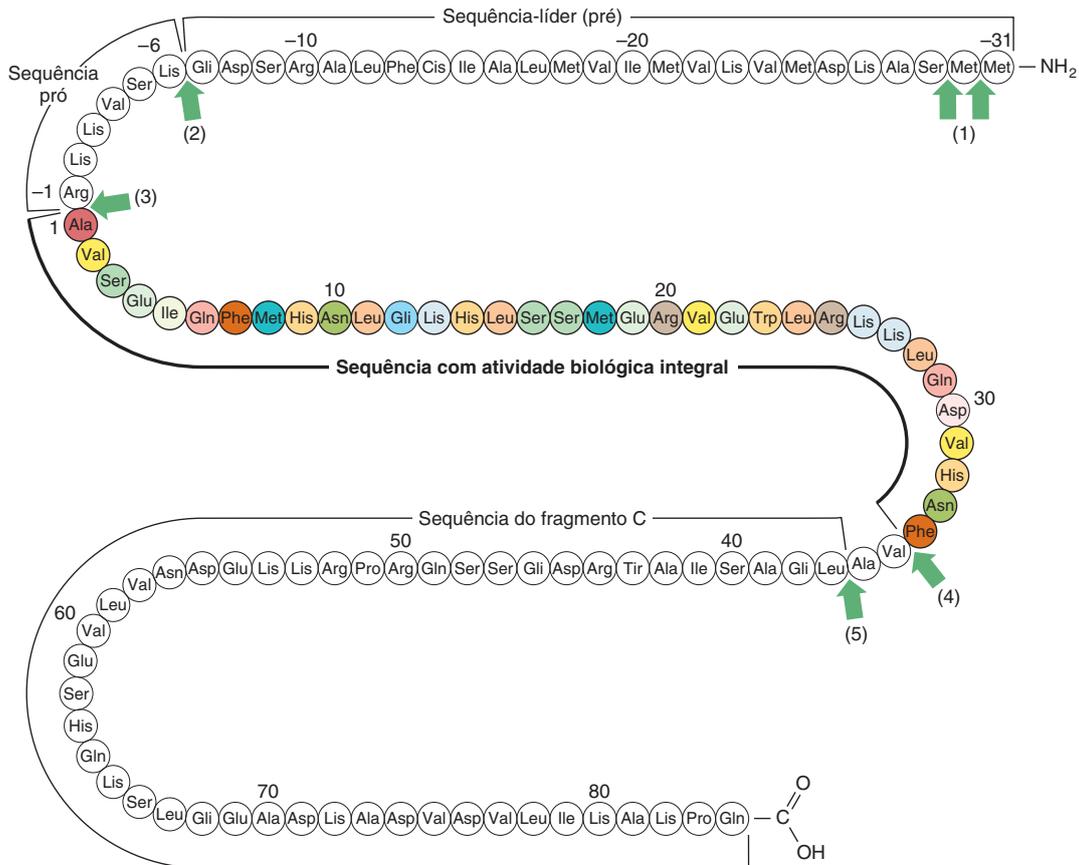


FIGURA 41-13 Estrutura do pré-pró-paratormônio bovino. As setas verdes indicam os sítios clivados pelas enzimas de processamento na glândula paratireoide e no fígado após a secreção do hormônio (1-5). A região biologicamente ativa da molécula (colorida) é flanqueada pela sequência que não é necessária para atividade nos receptores-alvo. (Ligeiramente modificada e reproduzida, com permissão, de Habener JF: *Recent advances in parathyroid hormone research*. Clin Biochem 1981;14:223. Copyright ©1981. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.)

concentrações de Ca^{2+} estão baixas e aumenta quando as concentrações de Ca^{2+} estão elevadas. Esses efeitos são mediados por um receptor de Ca^{2+} localizado na superfície da célula da paratireoide. São produzidos fragmentos muito específicos do PTH durante a sua digestão proteolítica (Figura 41-13). Diversas enzimas proteolíticas, incluindo as catepsinas B e D, foram identificadas no tecido da paratireoide. A catepsina B cliva o PTH em dois fragmentos: PTH_{1-36} e PTH_{37-84} . O PTH_{37-84} não é degradado subsequentemente; entretanto, o PTH_{1-36} sofre clivagem rápida e progressiva em dipeptídeos e tripeptídeos. A maior parte da proteólise do PTH ocorre dentro da glândula, porém vários estudos confirmaram que, uma vez secretado, o PTH é degradado por proteólise em outros tecidos, particularmente o fígado, por mecanismos semelhantes.

A angiotensina II também é sintetizada a partir de um grande precursor

O sistema renina-angiotensina está envolvido na regulação da pressão arterial e do metabolismo eletrolítico (pela síntese de aldosterona). O principal hormônio envolvido nesses processos é a angiotensina II, um octapeptídeo formado a partir do angiotensinogênio (Figura 41-14). O angiotensinogênio, uma grande α_2 -globulina produzida no fígado, é o substrato da renina,

uma enzima sintetizada nas células justaglomerulares da artéria aferente renal. Em virtude de sua localização, essas células são particularmente sensíveis a alterações da pressão arterial, e muitos dos reguladores fisiológicos da liberação de renina atuam por meio de barorreceptores renais. As células justaglomerulares também são sensíveis a mudanças nas concentrações de Na^+ e Cl^- do líquido tubular renal; por conseguinte, qualquer combinação de fatores que diminua o volume de líquido (desidratação, queda da pressão arterial ou perda de líquido ou de sangue) ou reduza a concentração de NaCl estimula a liberação de renina. Os nervos simpáticos renais que terminam nas células justaglomerulares medeiam os efeitos posturais e do sistema nervoso central sobre a liberação de renina, independentemente dos efeitos dos barorreceptores e da concentração de sal, um mecanismo que envolve o receptor β -adrenérgico. A renina atua no substrato angiotensinogênio e produz a angiotensina I, um decapeptídeo.

A enzima conversora da angiotensina, uma glicoproteína encontrada nos pulmões, nas células endoteliais e no plasma, remove 2 aminoácidos carboxiterminais do decapeptídeo angiotensina I para formar a angiotensina II, em uma etapa que não é considerada limitante de velocidade. Vários análogos nonapeptídicos da angiotensina I e outros compostos atuam como inibidores competitivos da enzima conversora e são

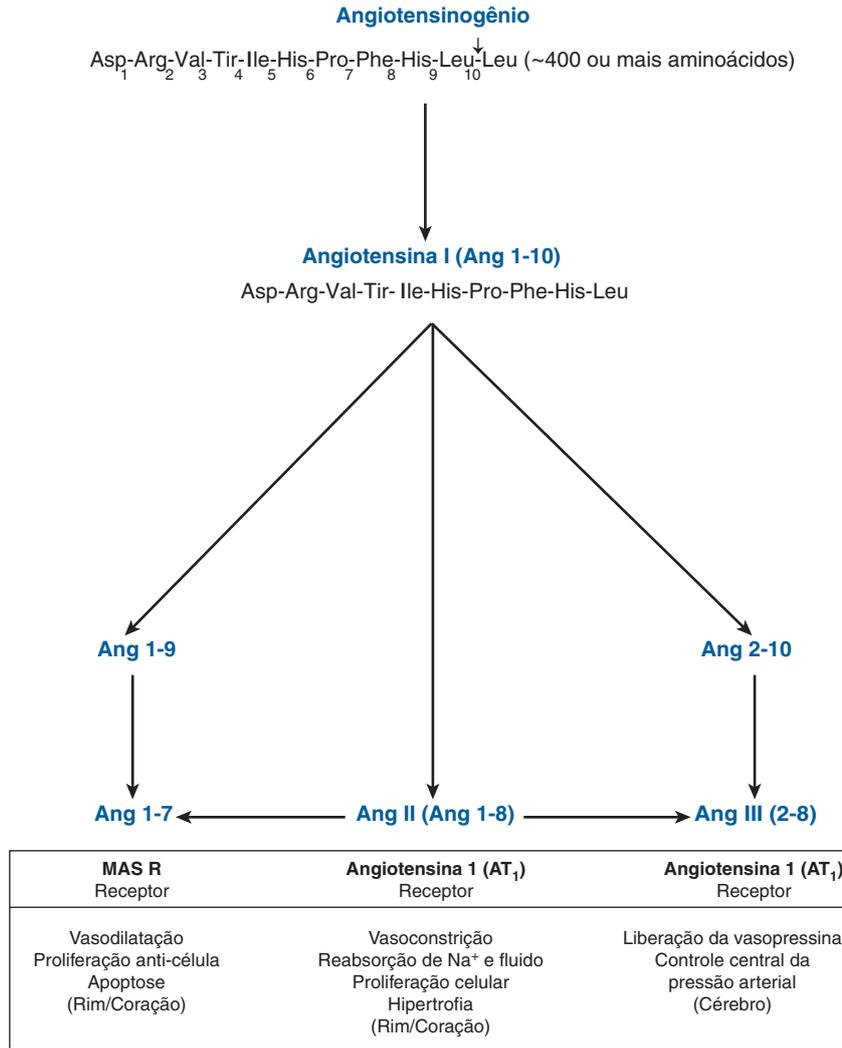


FIGURA 41-14 Formação, metabolismo e atividades fisiológicas selecionadas de angiotensinas. As três formas de maior atividade biológica da angiotensina (Ang), Ang 1-7, Ang 1-8 (Ang II) e Ang 2-8 (Ang III) são evidenciadas. Os números que representam os aminoácidos presentes em cada Ang são numerados em relação à sequência de Ang 1-10 (Ang I). Todas as formas de angiotensina são derivadas por proteólise catalisada por várias proteases distintas. O processamento inicial do precursor de 400⁺ aminoácidos de comprimento, o angiotensinogênio, é catalisado pela renina, ao passo que alguns dos outros eventos proteolíticos são catalisados pela enzima conversora da angiotensina 1 (ECA1), ou ECA2. São mostrados os receptores ligados às diferentes formas de Ang, assim como as consequências fisiológicas da ligação ao receptor (**parte inferior**).

utilizados no tratamento da hipertensão dependente de renina. Esses agentes são denominados **inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA)**. A angiotensina II aumenta a pressão arterial por meio de vasoconstrição da artériola e é uma substância vasoativa muito potente. Ela inibe a liberação de renina das células justaglomerulares e atua como potente estimulador da síntese de aldosterona. Essas ações resultam em retenção de Na⁺, expansão do volume e elevação da pressão arterial.

Em algumas espécies, a angiotensina II é convertida no heptapeptídeo angiotensina III (Figura 41-14), um estimulador igualmente potente da síntese de aldosterona. Nos seres humanos, o nível plasmático de angiotensina II é quatro vezes maior que o da angiotensina III, de modo que a maior parte dos efeitos é exercida pelo octapeptídeo. As angiotensinas II e III são rapidamente inativadas pelas angiotensinases.

A angiotensina II liga-se a receptores específicos existentes nas células da zona glomerulosa do córtex da glândula suprarrenal. A interação entre hormônio e receptor não ativa a adenilato-ciclase, e o cAMP não parece mediar a ação desse hormônio. As ações da angiotensina II, que consistem em estimular a conversão do colesterol em pregnenolona e a conversão da corticosterona em 18-hidroxicorticosterona e aldosterona, podem envolver alterações da concentração de cálcio intracelular e dos metabólitos fosfolipídicos por mecanismos semelhantes aos descritos no Capítulo 42.

O processamento complexo gera a família de peptídeos da pró-opiomelanocortina (POMC)

A família da POMC consiste em peptídeos que atuam como hormônios (ACTH, LPH, MSH) e outros que podem atuar

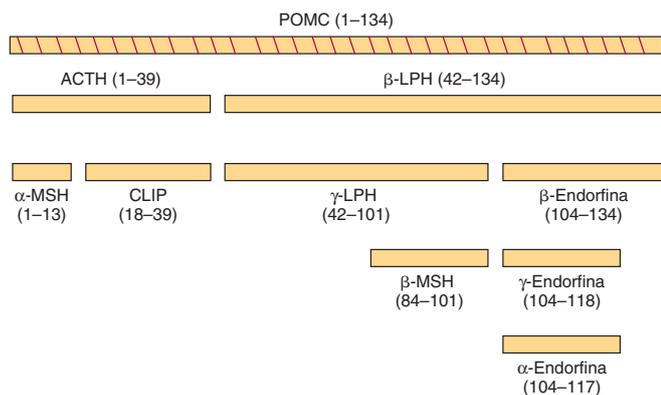


FIGURA 41-15 Produtos da clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC). (CLIP, peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina; LPH, lipotrofina; MSH, hormônio estimulador de melanócitos.)

como neurotransmissores ou neuromoduladores (endorfinas) (Figura 41-15). A POMC é sintetizada na forma de uma molécula precursora de 285 aminoácidos e é processada de modo diferente em várias regiões da hipófise.

O gene da POMC é expresso nos lobos anterior e intermediário da hipófise. As sequências mais conservadas entre as espécies situam-se no fragmento aminoterminal, nas regiões do ACTH e da β -endorfina. A POMC ou produtos relacionados são encontrados em vários outros tecidos de vertebrados, como o encéfalo, a placenta, o trato gastrointestinal, o aparelho reprodutor, os pulmões e os linfócitos.

A proteína POMC é processada de modo diferente no lobo anterior e no lobo intermediário da hipófise. O lobo intermediário da hipófise é rudimentar nos seres humanos adultos, porém é ativo nos fetos humanos e em mulheres grávidas no fim da gestação; também é ativo em muitas espécies animais. O processamento da proteína POMC nos tecidos periféricos (intestino, placenta e sistema reprodutor masculino) assemelha-se àquele observado no lobo intermediário. Existem três grupos de peptídeos básicos: (1) o ACTH, que pode dar origem ao α -MSH e ao peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina (CLIP); (2) a β -lipotrofina (β -LPH), que pode gerar a γ -LPH, o β -MSH e a β -endorfina (e, portanto, as α e γ -endorfinas); e (3) um peptídeo aminoterminal grande, que gera o γ -MSH (não ilustrado). A diversidade desses produtos deve-se aos numerosos grupos de aminoácidos dibásicos que constituem locais potenciais de clivagem para enzimas semelhantes à tripsina. Cada um dos peptídeos mencionados é precedido por resíduos Lis-Arg, Arg-Lis, Arg-Arg ou Lis-Lis. Após a clivagem do segmento do pré-hormônio, a próxima clivagem, tanto no lobo anterior quanto no intermediário, ocorre entre o ACTH e a β -LPH, resultando em um peptídeo aminoterminal com ACTH e um segmento de β -LPH (Figura 41-15). Subsequentemente, o ACTH₁₋₃₉ é clivado do peptídeo aminoterminal, e, no lobo anterior não ocorre praticamente nenhuma clivagem adicional. No lobo intermediário, o ACTH₁₋₃₉ é clivado em α -MSH (resíduos 1-13) e no CLIP (18-39); a β -LPH (42-134) é convertido em γ -LPH (42-101) e em β -endorfina (104-134). O β -MSH (84-101) é derivado da γ -LPH, ao passo que o γ -MSH (50-74) se origina de um fragmento N-terminal (1-74) da POMC.

Esses peptídeos sofrem modificações adicionais extensas, específicas do tecido, que afetam a sua atividade. Essas modificações incluem fosforilação, acetilação, glicosilação e amidação.

As mutações do receptor do α -MSH estão associadas a uma forma comum de obesidade de início precoce. Essa observação redirecionou a atenção para os hormônios peptídicos da POMC.

EXISTEM VARIAÇÕES NO ARMAZENAMENTO E NA SECREÇÃO DE HORMÔNIOS

Conforme assinalado anteriormente, os hormônios esteroides e a $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ são sintetizados em sua forma ativa final. Também são secretados à medida que são produzidos, de modo que não existe nenhum reservatório intracelular desses hormônios. As catecolaminas, também sintetizadas na forma ativa, são armazenadas em grânulos das células cromafins da medula da glândula suprarrenal. Em resposta a uma estimulação neural apropriada, esses grânulos são liberados da célula por exocitose, e as catecolaminas são liberadas na circulação. Nas células cromafins, existe um suprimento de reserva de catecolaminas para muitas horas.

O PTH também ocorre em vesículas de armazenamento. Quase 80 a 90% do pró-PTH sintetizado são degradados antes de alcançar esse compartimento final de armazenamento, particularmente quando os níveis de Ca^{2+} estão elevados na célula paratireoide (ver anteriormente). O PTH é secretado quando o nível de Ca^{2+} está baixo nas células paratireoides, as quais contêm um suprimento do hormônio para várias horas.

O pâncreas humano secreta cerca de 40 a 50 unidades de insulina por dia; isso representa aproximadamente 15 a 20% do hormônio armazenado nas células β . A insulina e o peptídeo C (ver Figura 41-12) são normalmente secretados em quantidades equimolares. Assim, estímulos como a glicose, que provoca a secreção de insulina, desencadeiam o processamento da proinsulina à insulina como parte essencial da resposta secretora.

Existe um suprimento de T_3 e T_4 para várias semanas na tireoglobulina que está armazenado no coloide no lúmen dos folículos tireoidianos. Esses hormônios podem ser liberados com a estimulação do TSH. Trata-se do exemplo mais evidente de um pró-hormônio, visto que uma molécula contendo cerca de 5 mil aminoácidos precisa ser, em primeiro lugar, sintetizada e, em seguida, decomposta para fornecer algumas moléculas dos hormônios ativos, T_4 e T_3 .

A Tabela 41-5 ilustra a diversidade no armazenamento e na secreção dos hormônios.

TABELA 41-5 Diversidade no armazenamento dos hormônios

Hormônio	Reserva armazenada na célula
Esteroides e $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$	Nenhuma
Catecolaminas e PTH	Horas
Insulina	Dias
T_3 e T_4	Semanas

ALGUNS HORMÔNIOS POSSUEM PROTEÍNAS DE TRANSPORTE PLASMÁTICAS

Os hormônios da classe I são hidrofóbicos na sua natureza química e, portanto, não são muito solúveis no plasma. Esses hormônios, principalmente os esteroides e os hormônios tireoidianos, possuem proteínas de transporte plasmáticas especializadas que atendem a vários propósitos. Em primeiro lugar, essas proteínas superam o problema da solubilidade e, assim, liberam o hormônio na célula-alvo. Além disso, asseguram um reservatório circulante do hormônio, que pode ser substancial, como no caso dos hormônios tireoidianos. Os hormônios, quando ligados às proteínas de transporte, não podem ser metabolizados, o que prolonga a sua meia-vida plasmática ($t_{1/2}$). A afinidade de ligação de determinado hormônio pelo seu transportador determina a razão entre frações ligada e livre do hormônio. Isso é importante, uma vez que apenas a forma livre de um hormônio é biologicamente ativa. Em geral, a concentração plasmática do hormônio livre é muito baixa, da ordem de 10^{-15} a 10^{-9} mol/L. É importante distinguir entre proteínas plasmáticas de transporte e receptores hormonais. Ambos ligam-se aos hormônios, porém com características muito diferentes (Tabela 41-6).

Os hormônios hidrofílicos – geralmente da classe II e de estrutura peptídica – estão livremente solúveis no plasma e não necessitam proteínas de transporte. Hormônios como a insulina, o hormônio do crescimento, o ACTH e o TSH circulam na forma ativa livre e apresentam meias-vidas plasmáticas muito curtas. Uma notável exceção é o IGF-I, que é transportado ligado a membros de uma família de proteínas de ligação.

Os hormônios tireoidianos são transportados pela globulina de ligação à tireoide

Muitos dos princípios discutidos anteriormente podem ser ilustrados na descrição das proteínas de ligação à tireoide. Metade a dois terços da T_4 e da T_3 no organismo se encontram em um reservatório fora da glândula tireoide. A maior parte circula na forma ligada, isto é, fixada a uma proteína de ligação específica, a **globulina de ligação da tireoxina (TBG)**. A TBG, uma glicoproteína com massa molecular de 50 kDa, liga-se à T_4 e à T_3 e tem a capacidade de ligar-se a 20 $\mu\text{g/dL}$ de plasma.

TABELA 41-6 Comparação dos receptores com as proteínas de transporte

Característica	Receptores	Proteínas de transporte
Concentração	Muito baixa (milhares/célula)	Muito alta (bilhões/ μL)
Afinidade de ligação (K_d)	Alta (faixa de pmol/L a nmol/L)	Baixa (faixa de mmol/L)
Especificidade de ligação	Muito alta	Baixa
Saturabilidade	Sim	Não
Reversibilidade	Sim	Sim
Transdução de sinais	Sim	Não

TABELA 41-7 Comparação de T_4 e T_3 no plasma

Hormônio livre					
Hormônio total ($\mu\text{g/dL}$)	Porcentagem do total	ng/dL	Molaridade	$t_{1/2}$ no sangue (dias)	
T_4	8	0,03	~2,24	$3,0 \times 10^{-11}$	6,5
T_3	0,15	0,3	~0,4	$0,6 \times 10^{-11}$	1,5

Em condições normais, a TBG liga-se – de forma não covalente – a quase toda a T_4 e a T_3 presente no plasma, porém com afinidade maior pela T_4 do que pela T_3 (Tabela 41-7). A meia-vida plasmática da T_4 é quatro a cinco vezes maior que a da T_3 . A pequena fração não ligada (livre) é responsável pela atividade biológica. Por conseguinte, apesar da grande diferença na quantidade total, a fração livre da T_3 aproxima-se daquela de T_4 , e, tendo em vista que T_3 é intrinsecamente mais ativa do que T_4 , a maior parte da atividade biológica é atribuída à T_3 . A TBG não se liga a nenhum outro hormônio.

Os glicocorticoides são transportados pela globulina de ligação dos corticosteroides

A hidrocortisona (cortisol) também circula no plasma na forma livre e na forma ligada às proteínas. A principal proteína de ligação no plasma é uma α -globulina, denominada **transcortina**, ou **globulina de ligação dos corticosteroides (CBG)**. A CBG é sintetizada no fígado, e, à semelhança da TBG, a sua síntese é aumentada pelos estrogênios. A CBG liga-se à maior parte do hormônio quando os níveis plasmáticos de cortisol estão dentro da faixa normal; quantidades muito menores de cortisol se ligam a albumina. A afinidade de ligação ajuda a determinar as meias-vidas biológicas de vários glicocorticoides. O cortisol liga-se firmemente à CBG e apresenta uma $t_{1/2}$ de 1,5 a 2 horas, ao passo que a corticosterona, que se liga menos firmemente, tem uma $t_{1/2}$ de < 1 hora (Tabela 41-8). O cortisol livre (não ligado) constitui cerca de 8% do total e representa a fração biologicamente ativa. A ligação à CBG não se limita aos glicocorticoides. A desoxicorticosterona e a progesterona interagem com a CBG com afinidade suficiente para competir com a ligação do cortisol. A aldosterona, o mineralocorticoide natural mais potente, não apresenta uma proteína de transporte específica no plasma. Os esteroides gonadais ligam-se muito fracamente à CBG (Tabela 41-8).

TABELA 41-8 Afinidades aproximadas dos esteroides pelas proteínas de ligação séricas

	SHBG ^a	CBG ^a
Di-hidrotestosterona	1	> 100
Testosterona	2	> 100
Estradiol	5	> 10
Estrona	> 10	> 100
Progesterona	> 100	~2
Cortisol	> 100	~3
Corticosterona	> 100	~5

^aAfinidade expressa como K_d (nmol/L).

Os esteroides gonadais são transportados pela globulina de ligação dos hormônios sexuais

A maioria dos mamíferos, inclusive os seres humanos, possui uma β -globulina plasmática que se liga à testosterona com especificidade, afinidade relativamente alta e capacidade limitada (Tabela 41-8). Essa proteína, habitualmente denominada **globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG)** ou globulina de ligação da testosterona-estrogênio (TEBG), é sintetizada no fígado. Sua produção é aumentada pelos estrogênios (as mulheres apresentam concentrações séricas de SHBG duas vezes maiores do que os homens), por determinados tipos de doença hepática e pelo hipertireoidismo; ela é diminuída pelos androgênios, pelo envelhecimento e pelo hipotireoidismo. Muitas dessas condições também afetam a síntese da CBG e da TBG. Como a SHBG e a albumina ligam-se a 97 a 99% da testosterona circulante, apenas uma pequena fração do hormônio na circulação encontra-se na forma livre (biologicamente ativa). A principal função da SHBG pode ser a de limitar a concentração sérica da testosterona livre. A testosterona liga-se à SHBG com mais afinidade do que o estradiol (Tabela 41-8). Portanto, uma alteração do nível de SHBG provoca uma maior variação nos níveis de testosterona livre do que nos níveis de estradiol livre.

Os estrogênios ligam-se à SHBG, e as progestinas, à CBG. A SHBG liga-se ao estradiol cerca de cinco vezes menos avidamente do que à testosterona ou à DHT, ao passo que a progesterona e o cortisol têm pouca afinidade por essa proteína (Tabela 41-8). Por outro lado, a progesterona e o cortisol ligam-se com afinidade quase igual à CBG, que, por sua vez, tem pouca avidade pelo estradiol e ainda menos pela testosterona, pela DHT ou pela estrona.

Essas proteínas de ligação também asseguram um reservatório circulante de hormônio, e, devido à sua capacidade de ligação relativamente grande, elas provavelmente tampenam alterações súbitas do nível plasmático. Como as taxas de depuração metabólica desses esteroides estão inversamente relacionadas com a afinidade de sua ligação à SHBG, a estrona é depurada mais rapidamente do que o estradiol, que, por sua vez, sofre depuração mais rápida que a testosterona ou a DHT.

RESUMO

- A presença de um receptor específico define as células-alvo de determinado hormônio.
- Os receptores são proteínas que se ligam a hormônios específicos e que geram um sinal intracelular (acoplamento receptor-efetor).
- Alguns hormônios possuem receptores intracelulares, enquanto outros se ligam a receptores presentes na membrana plasmática.

- Os hormônios são sintetizados a partir de várias moléculas precursoras, incluindo colesterol, a própria tirosina e todos os aminoácidos constituintes dos peptídeos e das proteínas.
- Vários processos de modificação alteram a atividade dos hormônios. Por exemplo, muitos hormônios são sintetizados a partir de moléculas precursoras maiores.
- O complemento de enzimas em um determinado tipo celular possibilita a síntese de uma classe específica de hormônios esteroides.
- Os hormônios lipossolúveis ligam-se, em sua maioria, a proteínas transportadoras plasmáticas bastante específicas.

REFERÊNCIAS

- Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, et al: Nuclear receptor structure: implications for function. *Ann Rev Physiol* 2007;69:201.
- Bartalina L: Thyroid hormone-binding proteins: update 1994. *Endocr Rev* 1994;13:140.
- Cheung E, Kraus WL: Genomic analyses of hormone signaling and gene regulation. *Annu Rev Physiol* 2010;72:191–218.
- Cho YM, Fujita Y, Kieffer TJ: Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol* 2014;76:535–559.
- Cristina Casals-Casas C, Desvergne B: Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 2011;73:23.135–162.
- Dai G, Carrasco L, Carrasco N: Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458.
- DeLuca HR: The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 1988;2:224.
- Douglass J, Civelli O, Herbert E: Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu Rev Biochem* 1984;53:665.
- Fan W, Atkins AR, Yu RT, et al: Road to exercise mimetics: targeting nuclear receptor in skeletal muscle. *J Mol Endocrinol* 2013;51:T87–T100.
- Farooqi IS, O'Rahilly S: Monogenic obesity in humans. *Ann Rev Med* 2005;56:443.
- Mazziotti G, Giustina A: Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:265–276.
- Miller WL: Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295.
- Nagatsu T: Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. *Neurosci Res* 1991;12:315.
- Russell DW, Wilson JD: Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994;63:25.
- Russell J, Bar A, Sherwood LM, et al: Interaction between calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of preproparathyroid hormone and vitamin D₃ receptor mRNA in avian parathyroids. *Endocrinology* 1993;132:2639.
- Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, et al: The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem* 1992;267:23435.
- Taguchi A, White M: Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Ann Rev Physiol* 2008;70:191.

Ação dos hormônios e transdução de sinais

P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar os papéis do estímulo, da liberação de hormônios, da geração de sinal e da resposta efetora em uma variedade de processos fisiológicos regulados por hormônios.
- Explicar o papel dos receptores e das proteínas G de ligação ao GTP na transdução de sinal hormonal, particularmente no que se refere à geração de segundos mensageiros.
- Reconhecer os padrões complexos de comunicação cruzada da via de transdução de sinais em relação à mediação de processos fisiológicos complicados.
- Compreender os papéis essenciais que a modificação pós-traducional da proteína (p. ex., fosforilação e acetilação), da proteína-ligante, da proteína-proteína e as interações proteína-DNA desempenham na mediação dos processos fisiológicos controlados por hormônios.
- Reconhecer que os receptores modulados por hormônios, os segundos mensageiros e as moléculas de sinalização associadas representam uma fonte rica para o desenvolvimento de potenciais fármacos, tendo em vista seus papéis fundamentais na regulação da fisiologia.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As adaptações homeostáticas produzidas por um organismo em um ambiente em constante mudança são realizadas, em grande parte, por meio de alterações na atividade e na quantidade das proteínas. Os hormônios representam um importante mecanismo para facilitar essas mudanças. Uma interação hormônio-receptor leva à geração de um sinal intracelular que pode regular a atividade de determinado conjunto de genes, alterando, assim, a quantidade de certas proteínas na célula-alvo, ou afetar a atividade de proteínas específicas, incluindo enzimas e proteínas transportadoras ou de canais. O sinal pode influenciar a localização das proteínas na célula e pode afetar processos gerais, como a síntese proteica, o crescimento celular e a replicação, frequentemente por meio de efeitos sobre a expressão gênica. Outras moléculas de sinalização – incluindo citocinas, interleucinas, fatores de crescimento e metabólitos – utilizam alguns dos mesmos mecanismos gerais e vias de transdução de sinais. A produção e a liberação excessivas, deficientes ou inapropriadas de hormônios e moléculas reguladoras constituem importantes causas de doença. Muitos agentes farmacoterapêuticos são desenvolvidos com o propósito de corrigir ou influenciar de algum modo as vias discutidas neste capítulo.

OS HORMÔNIOS TRANSDUZEM SINAIS PARA AFETAR MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS

A **Figura 42-1** ilustra as etapas gerais envolvidas na produção de uma resposta coordenada a determinado estímulo. O estímulo pode ser um desafio ou uma ameaça ao organismo, a um determinado órgão ou à integridade de uma única célula daquele organismo. O reconhecimento do estímulo constitui a primeira etapa da resposta adaptativa. Em um organismo, o reconhecimento geralmente envolve o sistema nervoso e os sentidos especiais (visão, audição, sensibilidade à dor, olfação e sensibilidade tátil). Em nível orgânico, tecidual ou celular, o reconhecimento envolve fatores físico-químicos, como o pH, a pressão de O₂, a temperatura, o suprimento de nutrientes, os metabólitos deletérios e a osmolaridade. O reconhecimento apropriado resulta na liberação de um ou mais hormônios que controlam a geração da resposta adaptativa necessária. Para o propósito desta discussão, os hormônios são classificados conforme descrito na Tabela 41-4, ou seja, com base na localização de seus receptores celulares específicos e no tipo de sinais gerados. Os hormônios do grupo I interagem com receptores intracelulares, enquanto os hormônios do grupo II atuam em

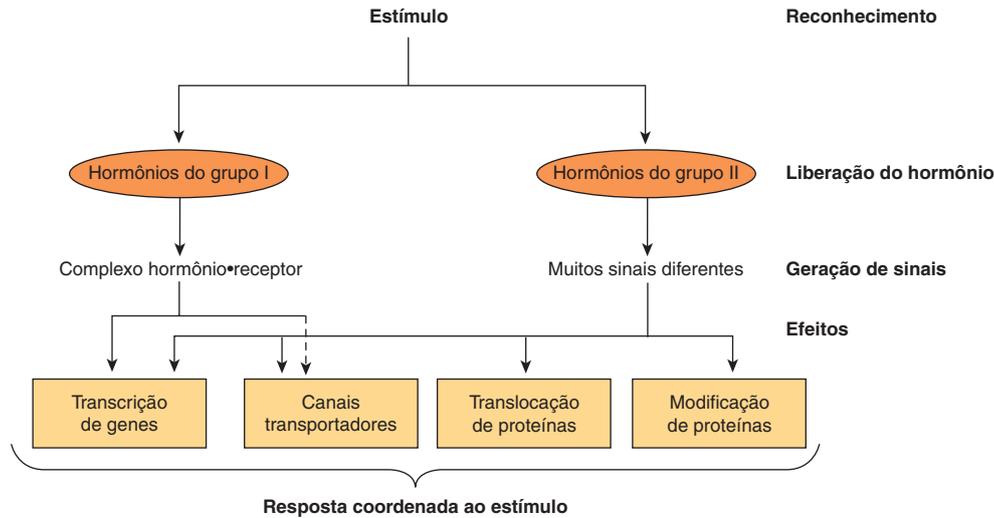


FIGURA 42-1 Participação hormonal nas respostas a um estímulo. Um desafio à integridade do organismo desencadeia uma resposta, que inclui a liberação de um ou mais hormônios. Esses hormônios geram sinais nas células-alvo ou em seu interior, e esses sinais regulam uma variedade de processos biológicos que asseguram uma resposta coordenada ao estímulo ou desafio. Ver Figura 42-8 para um exemplo específico.

loais de reconhecimento de receptores localizados na superfície extracelular da membrana plasmática das células-alvo. As citocinas, as interleucinas e os fatores de crescimento também devem ser incluídos nessa última categoria. Essas moléculas, de importância fundamental na adaptação homeostática, são hormônios no sentido de que são sintetizados em células específicas, exercem o equivalente às ações autócrinas, parácrinas e endócrinas, ligam-se a receptores de superfície celular e ativam muitas das mesmas vias de transdução de sinais utilizadas pelos hormônios mais tradicionais do grupo II.

GERAÇÃO DO SINAL

O complexo ligante-receptor constitui o sinal para os hormônios do grupo I

Os hormônios lipofílicos do grupo I difundem-se através da membrana plasmática de todas as células, porém encontram seus receptores intracelulares específicos de alta afinidade apenas nas células-alvo. Esses receptores podem estar localizados no citoplasma ou no núcleo dessas células. Inicialmente, o complexo hormônio-receptor sofre uma **reação de ativação**. Conforme ilustrado na **Figura 42-2**, a ativação do receptor ocorre por meio de pelo menos dois mecanismos. Por exemplo, os glicocorticoides sofrem difusão através da membrana plasmática e encontram seus respectivos receptores no citoplasma das células-alvo. A ligação do ligante ao receptor produz uma mudança conformacional do receptor, levando à dissociação da proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Esse passo é necessário para a localização nuclear subsequente do receptor de glicocorticoide. Esse receptor também contém uma sequência de localização nuclear que estará, nesse momento, livre para auxiliar na sua translocação do citoplasma para o núcleo. O receptor ativado é transferido para o núcleo (Figura 42-2) e se liga com alta afinidade a uma sequência específica do DNA, denominada

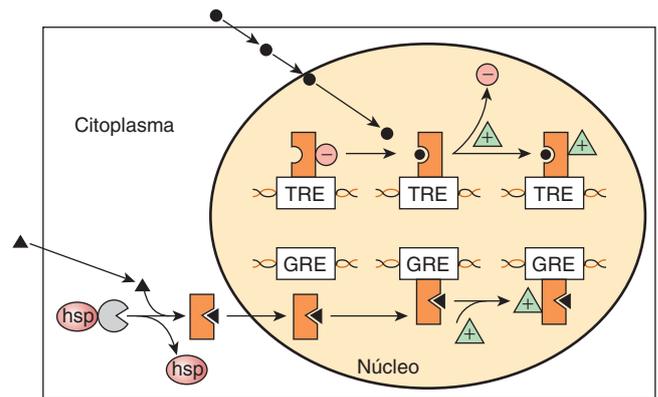


FIGURA 42-2 Regulação da expressão gênica por dois hormônios diferentes do grupo I, o hormônio tireoideano e os glicocorticoides. Os hormônios esteroides hidrofóbicos têm fácil acesso ao compartimento citoplasmático das células-alvo por difusão através da membrana plasmática. Os hormônios glicocorticoides (triângulos sólidos) encontram seus respectivos receptores (GR) no citoplasma, onde o GR existe sob a forma de um complexo com uma proteína chaperona, a proteína de choque térmico 90 (Hsp90). A ligação do ligante provoca dissociação da Hsp90 e uma mudança conformacional do receptor. Em seguida, o complexo receptor-ligante atravessa a membrana nuclear e liga-se ao DNA com especificidade e alta afinidade em um elemento de resposta aos glicocorticoides (GRE). Esse evento afeta a arquitetura de diversos correguladores da transcrição (triângulos verdes), dando início a uma transcrição aumentada. Por outro lado, os hormônios tireoideanos e o ácido retinoico (círculo preto) penetram diretamente no núcleo, onde seus respectivos receptores heterodiméricos (TR-RXR; ver Figura 42-12) já estão ligados aos elementos de resposta apropriados com um complexo repressor de transcrição associado (círculos vermelhos). Ocorre ligação do complexo hormônio-receptor, que, mais uma vez, induz mudanças conformacionais no receptor, resultando em uma reorganização das interações receptor (TR)-corregulador (i.e., moléculas como N-CoR ou SMRT [ver Tabela 42-6]). A ligação do ligante provoca dissociação do complexo corressor do receptor, possibilitando a formação de um complexo ativador, que consiste em TR-TRE e coativador. Em seguida, o gene é ativamente transcrito.

TABELA 42-1 As sequências de DNA de vários elementos de resposta hormonal (HREs)^a

Hormônio ou efector	HRE	Sequência do DNA
Glicocorticoides	GRE	
Progestinas	PRE	GGTACA NNN TGTCT ←————→
Mineralocorticoides	MRE	
Androgênios	ARE	
Estrogênios	ERE	AGGTCA — TGACCT ←————→
Hormônio tireoidiano	TRE	
Ácido retinoico	RARE	AGGTCA N1-5 AGGTCA ————→ —————→
Vitamina D	VDRE	
cAMP	CRE	TGACGTCA

^aAs letras referem-se aos nucleotídeos; N significa qualquer um dos quatro que possa ser utilizado nessa posição. As setas que apontam para direções contrárias ilustram os palíndromos invertidos ligeiramente imperfeitos, presentes em muitos HREs; em alguns casos, essas áreas são denominadas “meios-sítios de ligação”, ou meios-sítios, visto que cada uma se liga a um monômero do receptor. O GRE, o PRE, o MRE e o ARE consistem na mesma sequência de DNA. A especificidade pode ser conferida pela concentração intracelular do ligante ou do receptor hormonal, pelo flaqueamento das sequências de DNA não incluídas no consenso ou por outros elementos acessórios. Um segundo grupo de HREs inclui aqueles dos hormônios tireoidianos, dos estrogênios, do ácido retinoico e da vitamina D. Esses HREs são semelhantes, exceto no que se refere à orientação e ao espaçamento entre os meios palíndromos. O espaçamento determina a especificidade do hormônio. O VDRE ($N = 3$), o TRE ($N = 4$) e o RARE ($N = 5$) ligam-se a repetições diretas, e não a repetições invertidas. Outro membro da superfamília dos receptores de esteroides, o receptor de retinoide X (RXR), forma heterodímeros com o VDR, o TR e o RARE, constituindo as formas funcionais desses fatores de transcrição. O cAMP afeta a transcrição gênica por meio do CRE.

elemento de resposta hormonal (HRE). No caso ilustrado, trata-se de um elemento de resposta aos glicocorticoides (GRE). A Tabela 42-1 apresenta as sequências de consenso para os HREs. O complexo ligante-receptor ligado ao DNA funciona como um sítio de ligação de alta afinidade para uma ou mais proteínas coativadoras, e, quando isso ocorre, inicia-se a transcrição gênica acelerada. Por outro lado, determinados hormônios, como os hormônios tireoidianos e os retinoides, difundem-se a partir do líquido extracelular através da membrana plasmática e dirigem-se diretamente ao núcleo. Neste caso, o respectivo receptor já está ligado ao HRE (neste exemplo, ao elemento de resposta ao hormônio tireoidiano [TRE]). Todavia, esse receptor ligado ao DNA não consegue ativar a transcrição pelo fato de formar um complexo com um correpessor. Na verdade, esse complexo receptor-correpessor atua como repressor ativo da transcrição gênica. A associação do ligante a esses receptores resulta na dissociação do(s) correpessor(es). Nessa etapa, o complexo ligante-receptor é capaz de ligar-se com alta afinidade a um ou mais coativadores, levando ao recrutamento da RNA-polimerase II e GTFs e à ativação da transcrição gênica. A relação dos receptores de hormônios com outros receptores nucleares e com correguladores será discutida em detalhes adiante.

Ao afetar seletivamente a transcrição gênica e a consequente produção dos mRNAs-alvo apropriados, as quantidades de proteínas específicas são alteradas, e os processos metabólicos são influenciados. A influência de cada um desses hormônios é muito específica; em geral, um determinado hormônio afeta diretamente < 1% dos genes, do mRNA ou das proteínas de

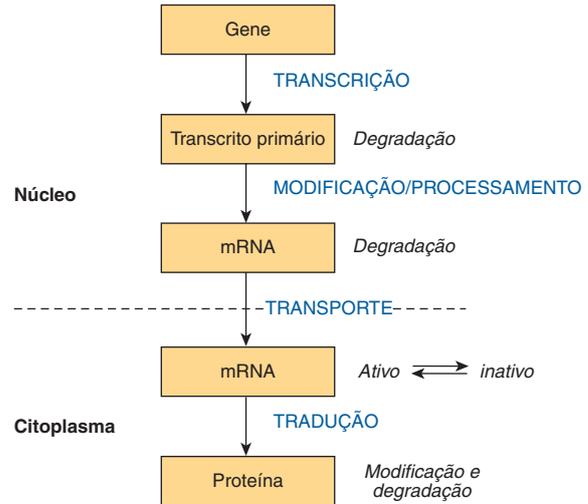


FIGURA 42-3 A “via de informação”. A informação flui do gene para o transcrito primário, para o mRNA e para a proteína. Os hormônios podem influenciar qualquer uma das etapas envolvidas e são capazes de afetar as taxas de processamento, degradação ou modificação dos vários produtos.

uma célula-alvo; ocasionalmente, apenas alguns são afetados. As ações nucleares dos hormônios esteroides, tireoidianos e retinoides estão bem definidas. As evidências sugerem, em sua maioria, que esses hormônios exercem seu efeito predominante ao modular a transcrição dos genes, porém eles – e muitos dos hormônios incluídos nas outras classes descritas adiante – podem atuar em qualquer etapa da “via de informação”, conforme ilustrado na Figura 42-3, para controlar a expressão de genes específicos e, por fim, uma resposta biológica. Foram também descritas ações diretas dos esteroides no citoplasma e em várias organelas e membranas. Recentemente, foram implicados microRNAs na modulação de algumas das diversas ações de hormônios.

OS HORMÔNIOS DO GRUPO II (PEPTÍDEOS E CATECOLAMINAS) POSSUEM RECEPTORES DE MEMBRANA E UTILIZAM MENSAGEIROS INTRACELULARES

Muitos hormônios são hidrossolúveis, não possuem proteínas de transporte (e, portanto, apresentam uma meia-vida plasmática curta) e desencadeiam uma resposta ao se ligar a um receptor localizado na membrana plasmática (ver Tabelas 41-3 e 41-4). O mecanismo de ação desse grupo de hormônios pode ser descrito de modo mais apropriado em termos dos **sinais intracelulares** que eles geram. Esses sinais incluem **cAMP** (AMP cíclico; ácido 3', 5'-adenílico; ver Figura 18-5), um nucleotídeo derivado do ATP pela ação da adenilato-ciclase; **cGMP**, um nucleotídeo formado pela guanilato-ciclase; **Ca²⁺**; e **fosfatidilinositídeos**; essas pequenas moléculas são denominadas **segundos mensageiros**, já que sua síntese é desencadeada pela presença do hormônio (molécula) primário

TABELA 42-2 Subclassificação dos hormônios do grupo II.A

Hormônios que estimulam a adenilato-ciclase (H_e)	Hormônios que inibem a adenilato-ciclase (H_i)
ACTH	Acetilcolina
ADH	α_2 -Adrenérgicos
β -Adrenérgicos	Angiotensina II
Calcitonina	Somatostatina
CRH	
FSH	
Glucagon	
hCG	
LH	
LPH	
MSH	
PTH	
TSH	

se ligando a seu receptor. Muitos desses segundos mensageiros afetam a transcrição gênica, conforme descrito no parágrafo anterior; todavia eles também influenciam uma variedade de outros processos biológicos, conforme ilustrado na Figura 42-3; ver também as Figuras 42-6 e 42-8.

Receptores acoplados à proteína G

Muitos dos hormônios do grupo II ligam-se a receptores que se acoplam aos efetores por meio de uma **proteína de ligação ao GTP (proteínas G)** intermediária. Com frequência, esses receptores apresentam domínios hidrofóbicos que atravessam sete vezes a membrana de um lado ao outro. Isso está ilustrado

pelos sete hélices interconectadas que se estendem através da bicamada lipídica na **Figura 42-4**. Os receptores dessa classe, que transduzem o sinal por meio de intermediários de proteína ligada ao nucleotídeo de guanina, são conhecidos como **receptores acoplados à proteína G (GPCRs)**. Até hoje, foram identificados centenas de genes que codificam os receptores ligados à proteína G. Os GPCRs representam a mais ampla família de receptores da superfície celular em seres humanos. Uma ampla variedade de respostas é mediada pelos GPCRs.

O cAMP representa o sinal intracelular para muitas respostas

O AMP cíclico foi o primeiro sinal intracelular de segundo mensageiro identificado nas células dos mamíferos. Existem vários componentes que constituem um sistema para a geração, a degradação e a ação do cAMP (**Tabela 42-2**).

Adenilato-ciclase

Diferentes hormônios peptídicos podem estimular (e) ou inibir (i) a produção do cAMP pela adenilato-ciclase por meio da ação das proteínas G. As proteínas G são codificadas por pelo menos 10 genes diferentes (**Tabela 42-3**). Dois sistemas paralelos, um estimulador (e) e um inibidor (i), convergem para uma molécula catalítica (C). Cada um consiste em um receptor, R_e ou R_i , e um complexo regulador, G_e e G_i . G_e e G_i consistem, cada uma, em uma **proteína G heterotrimérica composta por subunidades α , β e γ** . Como a subunidade α na G_e difere daquela da G_i , as proteínas, que são produtos de genes distintos, são designadas como α_e e α_i . As subunidades α ligam-se aos nucleotídeos de guanina. As subunidades β e γ estão sempre associadas ($\beta\gamma$) e parecem funcionar como um heterodímero. A ligação de um hormônio ao R_e ou ao R_i resulta em uma ativação da proteína G mediada pelo receptor, que leva à troca do GDP pelo GTP em α e à dissociação concomitante de $\beta\gamma$ de α .

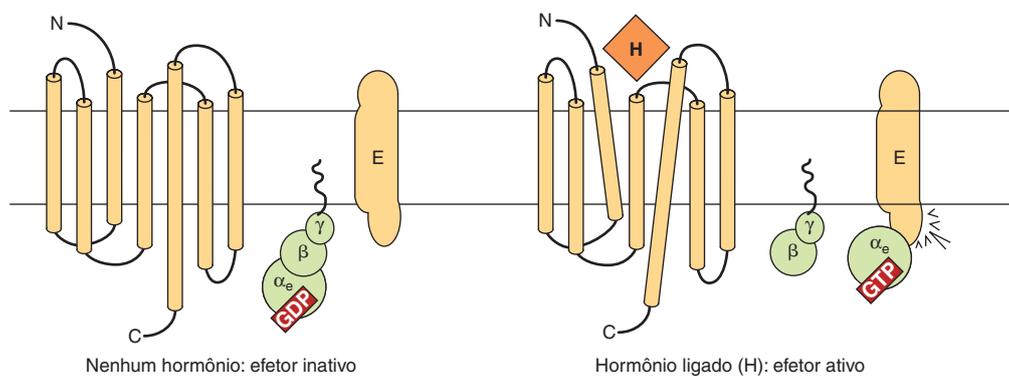


FIGURA 42-4 Componentes do sistema efetor receptor hormonal-proteína G. Os receptores que se ligam aos efetores por meio das proteínas G, receptores acoplados à proteína G (GPCRs), apresentam, em geral, sete domínios de α -hélice que atravessam a membrana (mostrados aqui como longos cilindros). Na ausência do hormônio (**à esquerda**), o complexo heterotrimérico (α , β , γ) com a proteína G encontra-se sob a forma inativa ligada ao difosfato de guanina (GDP) e, provavelmente, não está associado ao receptor. Esse complexo está ancorado na membrana plasmática por meio de grupos preniliados presentes nas subunidades $\beta\gamma$ (**linhas onduladas**) e, talvez, por grupos miristoilados nas subunidades α (não ilustrados). Quando há a ligação do hormônio (H) ao receptor, ocorrem alterações conformacionais no interior do receptor – conforme indicado pelos domínios que abrangem a membrana inclinada – e ativação do complexo da proteína G. Esse fato resulta da substituição de GDP por trifosfato de guanina (GTP) na subunidade α , após a qual se dissociam as subunidades α e $\beta\gamma$. A subunidade α liga-se ao efetor (E) e o ativa. O E pode ser a adenilato-ciclase, os canais de Ca^{2+} , Na^+ ou Cl^- (α_c), ou pode ser um canal de K^+ (α_i), fosfolipase $C\beta$ (α_q) ou cGMP fosfodiesterase (α_i); ver Tabela 42-3. A subunidade $\beta\gamma$ também pode exercer ações diretas sobre o E. (Modificada e reproduzida, com permissão, de Granner DK. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd ed. Becker KL (editor). Lippincott, 1995.)

TABELA 42-3 Classes e funções de proteínas G selecionadas^a

Classe ou tipo	Estímulo	Efector	Efeito	
G _e	α _e	Glucagon, β-adrenérgicos	↑ Adenilato-ciclase ↑ Canais de Ca ²⁺ , Cl ⁻ e Na ⁺ cardíacos	Gliconeogênese, lipólise, glicogenólise Olfato
		α _{olf}	Odorífero	↑ Adenilato-ciclase
	G _i	α _{i-1,2,3}	Acetilcolina, α ₂ -adrenérgicos	↓ Adenilato-ciclase ↑ Canais de potássio
M ₂ colinérgicos			↓ Canais de cálcio	
α _o		Opioides, endorfinas	↑ Canais de potássio	Atividade elétrica neuronal
α _t		Luz	↑ cGMP fosfodiesterase	Visão
G _q	α _q	M ₁ colinérgicos	↑ Fosfolipase C-β1	↓ Contração muscular
		α ₁ -Adrenérgicos		↓ Pressão arterial
	α ₁₁	α ₁ -Adrenérgicos	↑ Fosfolipase C-β2	
G ₁₂	α ₁₂	Trombina	Rho	Alteração do formato da célula

^aAs quatro classes ou famílias principais de proteínas G dos mamíferos (G_e, G_i, G_q e G₁₂) baseiam-se na homologia das sequências das proteínas. Os membros representativos de cada classe estão ilustrados, juntamente com os estímulos conhecidos, os efetores e os efeitos biológicos bem definidos. Foram identificadas 9 isoformas de adenilato-ciclase (isoformas I a IX). Todas as isoformas são estimuladas por α_e; as isoformas α_i inibem os tipos V e VI, e a isoforma α_o inibe os tipos I e V. Foram identificadas pelo menos 16 subunidades α diferentes.

Fonte: modificada e reproduzida, com permissão, de Granner DK. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd ed. Becker KL (editor). Lippincott, 1995.

A proteína α_e possui atividade intrínseca de GTPase. A forma ativa, α_e × GTP, é inativada pela hidrólise do GTP em GDP; em seguida, o complexo trimérico G_e (αβγ) é novamente formado e está pronto para outro ciclo de ativação. As toxinas do cólera e da coqueluche catalisam a ADP-ribosilação de α_e e α_{i-2} (Tabela 42-3), respectivamente. No caso de α_e, essa modificação suprime a atividade intrínseca da GTPase; por conseguinte, a α_e não pode se reassociar com βγ e, assim, é ativada de modo irreversível. A ADP-ribosilação de α_{i-2} impede a dissociação de α_{i-2} de βγ e, portanto, não pode haver formação de α_{i-2} livre. Então, a atividade de α_e nessas células ocorre sem oposição.

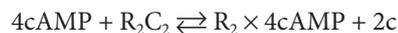
Existe uma grande família de proteínas G, e estas fazem parte da superfamília das GTPases. A família das proteínas G é classificada de acordo com a homologia das sequências em quatro subfamílias, conforme ilustrado na Tabela 42-3. Existem 21 genes que codificam a subunidade α, 5 para a subunidade β e 8 para a subunidade γ. Várias combinações dessas subunidades representam um grande número de possíveis complexos de αβγ e ciclases.

As subunidades α e o complexo βγ exercem ações independentes daquelas da adenilato ciclase (ver Figura 42-4 e Tabela 42-3). Algumas formas de α_i estimulam os canais de K⁺ e inibem os canais de Ca²⁺, ao passo que algumas moléculas de α_e produzem efeitos opostos. Membros da família G_q ativam o grupo de enzimas da fosfolipase C. Os complexos βγ têm sido associados ao estímulo do canal de K⁺ e à ativação da fosfolipase C. As proteínas G estão envolvidas em diversos processos biológicos importantes além da ação hormonal. Exemplos

notáveis incluem o olfato (α_{OLF}) e a visão (α_t). Alguns exemplos estão listados na Tabela 42-3. Os GPCRs estão implicados em algumas doenças e constituem alvos importantes para agentes farmacêuticos.

Proteína-cinase

Conforme discutido no Capítulo 38, nas células procarióticas, o cAMP liga-se a uma proteína específica, denominada proteína reguladora de catabólitos (CRP), que se liga diretamente ao DNA e influencia a expressão dos genes. Em contrapartida, nas células eucarióticas, o cAMP liga-se a uma proteína-cinase denominada **proteína-cinase A (PKA)**, uma molécula heterotetramérica que consiste em duas subunidades reguladoras (R) que inibem a atividade de duas subunidades catalíticas (C) quando ligadas como um complexo tetramérico. A ligação do cAMP ao tetrâmero R₂C₂ resulta na seguinte reação:



O complexo R₂C₂ carece de atividade enzimática, porém a ligação do cAMP pela subunidade R induz a dissociação do complexo R-C, ativando, portanto, esse último (Figura 42-5). A subunidade C ativa catalisa a transferência do fosfato γ do ATP para um resíduo de serina ou de treonina em uma variedade de proteínas. Os sítios consenso de fosforilação de PKA são -ArgArg/Lis-X-Ser/Tre- e -Arg-Lis-X-X-Ser-, onde X pode ser qualquer aminoácido.

Historicamente, as atividades das proteínas-cinase foram descritas como “dependentes de cAMP” ou “independentes de

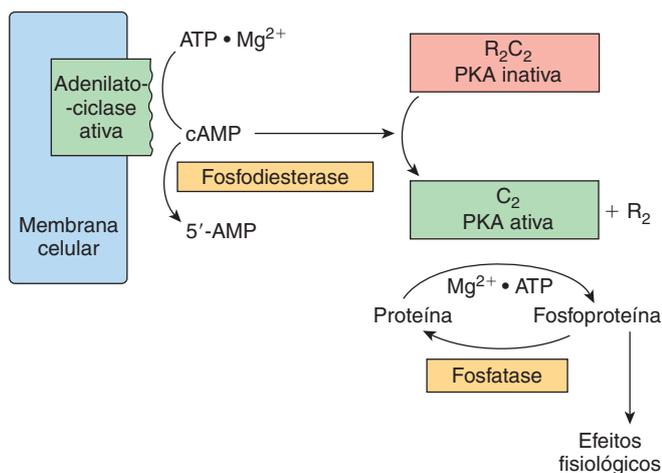


FIGURA 42-5 Regulação hormonal dos processos celulares por meio da proteína-quinase dependente de cAMP (PKA). A PKA existe em uma forma inativa, como um heterotetrâmero R_2C_2 , constituído de duas subunidades reguladoras (R) e duas subunidades catalíticas (C). O cAMP gerado pela ação da adenilato-ciclase (ativada conforme ilustrado na Figura 42-4) liga-se à subunidade reguladora da PKA. Isso resulta em dissociação das subunidades reguladoras e catalíticas e em ativação dessas últimas. As subunidades catalíticas ativas fosforilam diversas proteínas-alvo nos resíduos de serina e treonina. As fosfatases removem o fosfato desses resíduos e, portanto, interrompem a resposta fisiológica. Uma fosfodiesterase também pode interromper a resposta ao converter o cAMP em 5'-cAMP.

cAMP”. Essa classificação foi modificada, já que, atualmente, a fosforilação proteica é reconhecida como um mecanismo de regulação importante e universal. Até a presente data, foram descritas várias centenas de proteínas-quinase. Essas cinases estão relacionadas na sua sequência e estrutura dentro do domínio catalítico, porém cada uma delas é uma molécula singular que exibe considerável variabilidade no que se refere à composição das subunidades, ao peso molecular, à autofosforilação, à K_m para o ATP e à especificidade de substrato. As atividades de cinase e de proteína-fosfatase podem ser marcadas pela interação com proteínas específicas de ligação às cinases. No caso de PKA, as proteínas-alvo são denominadas proteínas de ancoragem à cinase A (AKAPs). As AKAPs atuam como estruturas que localizam a PKA próxima a substratos, focalizando, assim, a atividade da PKA para substratos fisiológicos e facilitando a regulação biológica espaçotemporal, enquanto permitem também que proteínas compartilhadas comuns induzam respostas fisiológicas específicas. Múltiplas AKAPs têm sido descritas e é importante mencionar que podem se ligar à PKA e a outras cinases, bem como a fosfatases, fosfodiesterases (que hidrolisam o cAMP) e substratos de proteínas-quinase. A multifuncionalidade das AKAPs facilita a localização, a taxa (produção e destruição de sinais), a especificidade e a dinâmica da sinalização.

Fosfoproteínas

Acredita-se que todos os efeitos do cAMP nas células eucarióticas sejam mediados pela fosforilação-desfosforilação das proteínas, principalmente nos resíduos de serina e de treonina. O controle de qualquer um dos efeitos do cAMP, inclusive processos distintos como a esteroidogênese, a secreção,

o transporte iônico, o metabolismo dos carboidratos e das gorduras, a indução enzimática, a regulação gênica, a transmissão sináptica e o crescimento e a replicação celulares, pode ser conferido por uma proteína-quinase específica, por uma fosfatase específica ou por substratos específicos para fosforilação. O arranjo de substratos específicos define um tecido-alvo e está envolvido na definição da extensão de determinada resposta no interior de uma célula específica. Por exemplo, os efeitos do cAMP sobre a transcrição gênica são mediados por **CREB**, a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico. A CREB liga-se a um elemento estimulador do DNA em resposta ao cAMP (CRE) (ver Tabela 42-1) no seu estado não fosforilado e atua como ativador fraco da transcrição. Quando fosforilada pela PKA, CREB liga-se ao coativador **proteína de ligação de CREB CBP/p300** (ver a seguir) e, por isso, atua como um ativador muito mais potente da transcrição. A CBP e a p300 relacionada contêm atividades de histona acetiltransferase e, portanto, atuam como corretores transcricionais ativos na cromatina (ver Capítulos 36 e 38). É interessante assinalar que a CBP/p300 também pode acetilar determinados fatores de transcrição, estimulando, assim, a sua capacidade de ligar-se ao DNA e modular a transcrição.

Fosfodiesterases

As ações produzidas pelos hormônios que aumentam a concentração de cAMP podem ser interrompidas de diversas maneiras, inclusive a hidrólise do cAMP em 5'-AMP por fosfodiesterases (ver Figura 42-5). A presença dessas enzimas hidrolíticas assegura uma rápida renovação do sinal (cAMP) e, portanto, uma rápida interrupção do processo biológico após a remoção do estímulo hormonal. Existem pelo menos 11 membros conhecidos da família de enzimas das fosfodiesterases. Essas enzimas estão sujeitas à regulação pelos seus substratos, o cAMP e o cGMP; por hormônios; e por mensageiros intracelulares, como o cálcio, que provavelmente atua por meio da calmodulina. Os inibidores da fosfodiesterase, mais notavelmente os derivados da xantina metilados, como a cafeína, aumentam o cAMP intracelular e simulam ou prolongam as ações dos hormônios por meio desse sinal.

Fosfoproteínas-fosfatases

Tendo em vista a importância da fosforilação proteica, não surpreende que a regulação da reação de desfosforilação proteica constitua outro mecanismo importante de controle (ver Figura 42-5). As próprias fosfoproteínas fosfatases estão sujeitas à regulação por reações de fosforilação-desfosforilação e por uma variedade de outros mecanismos, como interações proteína-proteína. De fato, a especificidade de substrato das fosfoserina-fosfotreoninas-fosfatases pode ser determinada por subunidades reguladoras distintas, cuja ligação é regulada por ação hormonal. Um dos papéis mais bem estudados da regulação pela desfosforilação de proteínas é o metabolismo do glicogênio no músculo (ver Figuras 18-6 a 18-8). Foram descritos dois tipos principais de fosfoserina-fosfotreoninas-fosfatases. O tipo I desfosforila preferencialmente a subunidade β da fosforilase-cinase, ao passo que o tipo II desfosforila a subunidade α . A fosfatase tipo I está implicada na regulação da glicogênio-sintase, da fosforilase e da fosforilase-cinase. Essa fosfatase é regulada pela fosforilação de algumas de suas

subunidades, e essas reações são revertidas pela ação de uma das fosfatases tipo II. Além disso, dois inibidores proteicos termoestáveis regulam a atividade da fosfatase tipo I. O inibidor 1 é fosforilado e ativado por proteínas-cinase dependentes de cAMP, ao passo que o inibidor 2, que pode ser uma subunidade da fosfatase inativa, também é fosforilado, possivelmente pela glicogênio-sintase-cinase 3. As fosfatases que atacam a fosfotirosina também são importantes na transdução de sinais (ver Figura 42-8).

O cGMP também é um sinal intracelular

O GMP cíclico é gerado a partir do GTP pela enzima guanilato-ciclase, que ocorre nas formas solúvel e ligada à membrana. Cada uma dessas formas de enzimas apresenta propriedades fisiológicas singulares. As atriopeptinas, uma família de peptídeos produzidos nos tecidos atriais cardíacos, causam natriurese, diurese, vasodilatação e inibição da secreção de aldosterona. Esses peptídeos (p. ex., fator natriurético atrial) se ligam e ativam a forma da guanilato ciclase ligada à membrana. Isso leva a um aumento de cGMP de até 50 vezes em alguns casos, e acredita-se que esse aumento module os efeitos mencionados anteriormente. Outras evidências relacionam o cGMP com a vasodilatação. Diversos compostos, como o nitroprussiato, a nitroglicerina, o óxido nítrico, o nitrito de sódio e a azida sódica, provocam relaxamento da musculatura lisa e são potentes vasodilatadores. Esses agentes aumentam o cGMP pela ativação da forma solúvel da guanilato-ciclase, e os inibidores da cGMP fosfodiesterase (p. ex., o fármaco sildenafil [Viagra]) aumentam e prolongam essas respostas. Os níveis aumentados de cGMP ativam a proteína-cinase dependente de cGMP (PKG), a qual, por sua vez, fosforila diversas proteínas do músculo liso. Presumivelmente, esse mecanismo está envolvido no relaxamento da musculatura lisa e na vasodilatação.

Vários hormônios atuam por meio do cálcio ou dos fosfatidilinosítóis

O cálcio ionizado, Ca^{2+} , é um importante regulador de uma variedade de processos celulares, como a contração muscular, o acoplamento estímulo-secreção, a cascata da coagulação sanguínea, a atividade enzimática e a excitabilidade da membrana. O Ca^{2+} também é um mensageiro intracelular da ação hormonal.

Metabolismo do cálcio

A concentração extracelular de Ca^{2+} é de cerca de 5 mmol/L e está sujeita a um controle muito rígido. Embora quantidades substanciais de cálcio estejam associadas às organelas intracelulares, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, a concentração intracelular de cálcio livre ou ionizado (Ca^{2+}) é muito baixa: 0,05 a 10 mmol/L. Apesar desse gradiente de concentração significativo e de um gradiente elétrico transmembrana favorável, a entrada do Ca^{2+} na célula é restrita. Uma quantidade significativa de energia é consumida para assegurar o controle do Ca^{2+} intracelular, visto que a elevação prolongada do Ca^{2+} dentro da célula é muito tóxica. Um mecanismo de troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que possui alta capacidade, porém baixa afinidade, bombeia o Ca^{2+} para fora das células. Existe também uma bomba de Ca^{2+} /prótons dependente de ATPase,

que expulsa o Ca^{2+} em troca de H^+ . Esse sistema exibe alta afinidade pelo Ca^{2+} , porém baixa capacidade e, provavelmente, é responsável pelo ajuste fino do Ca^{2+} no citosol. Além disso, as Ca^{2+} -ATPases bombeiam o Ca^{2+} do citosol para o lúmen do retículo endoplasmático. Existem três maneiras de alterar os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} : (1) determinados hormônios (da classe II.C, Tabela 41-3), por meio de sua ligação a receptores que são, eles próprios, canais de Ca^{2+} , aumentam a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} e, por conseguinte, aumentam o seu influxo. (2) Os hormônios também promovem, indiretamente, o influxo do Ca^{2+} ao modular o potencial de membrana na membrana plasmática. A despolarização da membrana abre os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e possibilita o influxo do Ca^{2+} . (3) O Ca^{2+} pode ser mobilizado do retículo endoplasmático e, possivelmente, das reservas mitocondriais.

Uma observação importante que relaciona o Ca^{2+} com a ação hormonal envolveu a definição dos alvos intracelulares de ação do Ca^{2+} . A descoberta de um regulador da atividade das fosfodiesterases dependente de Ca^{2+} forneceu a base para uma ampla compreensão do processo de interação do Ca^{2+} e do cAMP dentro das células.

Calmodulina

A proteína reguladora dependente de cálcio é a calmodulina, uma proteína de 17 kDa de estrutura e função homólogas à proteína muscular troponina C. A calmodulina possui quatro sítios de ligação ao Ca^{2+} , e a ocupação completa desses sítios leva a uma importante alteração conformacional, que permite que a calmodulina ative enzimas e canais iônicos. A interação do Ca^{2+} com a calmodulina (com consequente alteração da atividade dessa última) assemelha-se, do ponto de vista conceitual, à ligação do cAMP à PKA e à ativação subsequente dessa molécula. A calmodulina pode ser uma das várias subunidades de proteínas complexas e está particularmente envolvida na regulação de várias cinases e enzimas da geração e degradação de nucleotídeos cíclicos. A Tabela 42-4 fornece uma lista parcial das enzimas reguladas direta ou indiretamente pelo Ca^{2+} , provavelmente por meio da calmodulina.

Além de seus efeitos sobre as enzimas e o transporte de íons, o Ca^{2+} /calmodulina regula a atividade de muitos elementos estruturais das células. Isso inclui o complexo de actina-miosina do músculo liso, que está sob controle β -adrenérgico, bem como vários processos mediados por microfilamentos

TABELA 42-4 Algumas enzimas e proteínas reguladas pelo cálcio ou pela calmodulina

- Adenilato-ciclase
- Proteínas-cinase dependentes de Ca^{2+}
- Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase
- Proteína-cinase dependente de Ca^{2+} -fosfolípídeo
- Nucleotídeo cíclico fosfodiesterase
- Algumas proteínas do citoesqueleto
- Alguns canais iônicos (p. ex., canais de cálcio tipo L)
- Óxido nítrico-sintase
- Fosforilase-cinase
- Fosfoproteína fosfatase 2B
- Alguns receptores (p. ex., receptor de glutamato tipo NMDA)

nas células não contráteis, incluindo motilidade celular, alterações da conformação da célula, mitose, liberação de grânulos e endocitose.

O cálcio é um mediador da ação hormonal

O papel do Ca^{2+} na ação hormonal é sugerido pelas observações de que o efeito de muitos hormônios é (1) atenuado por meios desprovidos de Ca^{2+} ou quando há depleção do cálcio intracelular; (2) simulado por agentes que aumentam o Ca^{2+} citosólico, como o ionóforo de Ca^{2+} A23187; e (3) influenciado pelo fluxo de cálcio celular. Mais uma vez, a regulação do metabolismo do glicogênio no fígado fornece um bom exemplo (pela vasopressina e pelas catecolaminas β -adrenérgicas; Figuras 18-6 e 18-7).

Várias enzimas metabólicas importantes são reguladas pelo Ca^{2+} , pela fosforilação ou por ambos. As enzimas incluem a glicogênio-sintase, a piruvato-cinase, a piruvato-carboxilase, a glicerol-3-fosfato-desidrogenase e a piruvato-desidrogenase, entre outras (ver Figura 19-1).

O metabolismo dos fosfatidilinosítídeos afeta a ação hormonal dependente de Ca^{2+}

Algum sinal precisa estabelecer uma comunicação entre o receptor hormonal na membrana plasmática e os reservatórios

intracelulares de Ca^{2+} . Essa função é desempenhada pelos produtos do metabolismo dos fosfatidilinosítídeos. Quando ocupados pelos seus respectivos ligantes, os receptores de superfície celular, como os receptores de acetilcolina, do hormônio antidiurético e das catecolaminas tipo α_1 , atuam como potentes ativadores da fosfolipase C. A ligação do receptor e a ativação da fosfolipase C são acopladas pelas isoformas da G_q (Tabela 42-3 e Figura 42-6). A fosfolipase C catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato em inositol-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (Figura 42-7). O próprio **diacilglicerol (DAG)** é capaz de ativar a **proteína-cinase C (PKC)**, cuja atividade também depende do Ca^{2+} (ver Figuras 21-10, 24-1, 24-2 e 55-7). Ao interagir com um receptor intracelular específico, o IP_3 atua como liberador efetivo do Ca^{2+} a partir dos locais de reserva intracelulares no retículo endoplasmático. Desse modo, a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato leva à ativação da PKC e promove aumento do Ca^{2+} citoplasmático. Conforme ilustrado na Figura 42-4, a ativação das proteínas G também pode exercer uma ação direta sobre os canais de Ca^{2+} . A consequente elevação do Ca^{2+} citosólico ativa cinases dependentes de Ca^{2+} -calmodulina e muitas outras enzimas também dependentes de Ca^{2+} -calmodulina.

Os agentes esteroidogênicos – incluindo ACTH e cAMP no córtex da glândula suprarrenal; a angiotensina II, o K^+ , a

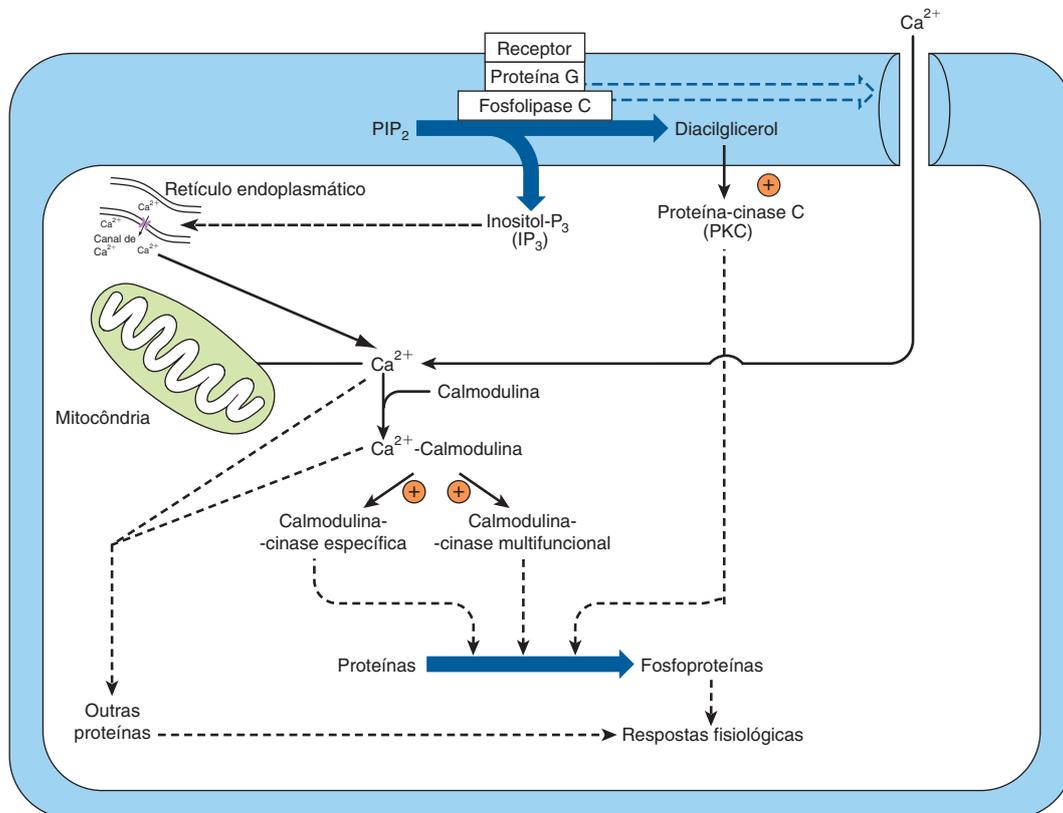


FIGURA 42-6 Algumas interações entre hormônio e receptor resultam na ativação da fosfolipase C (PLC). A ativação da PLC parece envolver uma proteína G específica, que também pode ativar um canal de cálcio. A fosfolipase C gera inositol-trifosfato (IP_3), que libera o Ca^{2+} intracelular armazenado, e diacilglicerol (DAG), um potente ativador da proteína-cinase C (PKC). Nesse esquema, a PKC ativada fosforila substratos específicos que, em seguida, alteram processos fisiológicos. De modo semelhante, o complexo calmodulina pode ativar cinases específicas, das quais duas estão ilustradas aqui. Essas ações resultam na fosforilação dos substratos, levando a uma alteração das respostas fisiológicas. Esta figura também mostra que o Ca^{2+} pode entrar nas células pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ou de ligantes. O Ca^{2+} intracelular também é regulado pelo armazenamento e liberação desse íon das mitocôndrias e do retículo endoplasmático. (Reimpressa, com permissão, de JH Exton.)

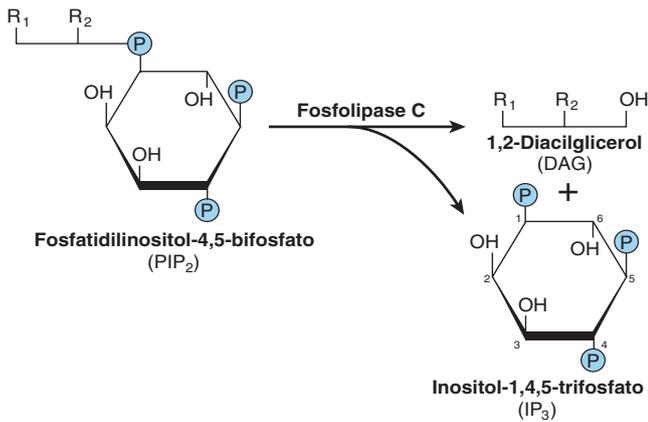


FIGURA 42-7 A fosfolipase C cliva o PIP₂ em diacilglicerol e inositol trifosfato. Em geral, R₁ é estearato e R₂ é araquidonato. O IP₃ pode ser desfosforilado (em I-1,4-P₂ inativo) ou fosforilado (em I-1,3,4,5-P₄ potencialmente ativo).

serotonina, o ACTH e o cAMP na zona glomerulosa da glândula suprarrenal; o LH no ovário; e o LH e o cAMP nas células de Leydig dos testículos – têm sido associados a níveis aumentados de ácido fosfatídico, fosfatidilinositol e polifosfoinosítídeos (ver Capítulo 21) nos respectivos tecidos-alvo. Vários outros exemplos poderiam ser citados.

A Figura 42-6 mostra os papéis que o Ca²⁺ e os produtos de degradação dos polifosfoinosítídeos podem desempenhar na ação hormonal. Nesse esquema, a proteína-quinase C ativada pode fosforilar substratos específicos que, em seguida, alteram os processos fisiológicos. De modo semelhante, o complexo Ca²⁺-calmodulina pode ativar cinases específicas. Em seguida, essas cinases modificam os substratos e, conseqüentemente, alteram as respostas fisiológicas.

Alguns hormônios atuam por meio de uma cascata de proteínas-quinase

As proteínas-quinase independentes, como a PKA, a PKC e as Ca²⁺-calmodulina (CaM)-cinases, que levam à fosforilação dos resíduos de serina e de treonina nas proteínas-alvo, desempenham um papel muito importante na ação hormonal. A descoberta de que o receptor do EGF contém atividade intrínseca de tirosina-quinase, a qual é ativada pela ligação do ligante EGF, representou um importante avanço. Os receptores de insulina e do IGF-I também exibem atividade intrínseca de tirosina-quinase ativada por ligantes. Vários receptores – em geral, aqueles envolvidos na ligação de ligantes relacionados com o controle do crescimento, a diferenciação e a resposta inflamatória – apresentam atividade intrínseca de tirosina-quinase ou estão associados a proteínas que são tirosinas-quinase. Outro aspecto de diferenciação dessa classe de ação hormonal consiste no fato de essas cinases fosforilarem preferencialmente os resíduos de tirosina, e a fosforilação da tirosina não é frequente (< 0,03% da fosforilação total dos aminoácidos) nas células dos mamíferos. Uma terceira característica diferenciadora é que a interação ligante-receptor, que resulta em fosforilação da tirosina, desencadeia uma cascata que pode envolver várias proteínas-quinase, fosfatases e outras proteínas reguladoras.

A insulina transmite sinais por várias cascatas de cinases

Os receptores de insulina, do fator de crescimento epidérmico (EGF) e IGF-I apresentam atividades intrínsecas de proteína tirosina quinase localizadas em seus domínios citoplasmáticos. Essas atividades são estimuladas quando os ligantes se ligam a seus respectivos receptores. Em seguida, os receptores são autofosforilados nos resíduos de tirosina, o que desencadeia uma complexa série de eventos (resumidos, de modo simplificado, na Figura 42-8). A seguir, o receptor fosforilado de insulina fosforila os **substratos do receptor de insulina** (existem pelo menos quatro dessas moléculas, denominadas **IRSs 1 a 4**) nos resíduos de tirosina. O IRS fosforilado liga-se aos domínios de **homologia ao Src 2 (SH2)** de uma variedade de proteínas que estão diretamente envolvidas na mediação dos diferentes efeitos da insulina. Uma dessas proteínas, a PI-3-quinase, acopla a ativação do receptor de insulina com a ação do hormônio por meio da ativação de várias moléculas, incluindo a cinase **PKB** (cinase 1 dependente de fosfoinosítídeo). Essa enzima propaga o sinal por meio de várias outras cinases, incluindo **PKB** (também conhecida como **AKT**), **SKG** e **aPKC** (ver legenda da Figura 42-8 para definições e abreviaturas ampliadas). Uma via alternativa a jusante de PKB1 envolve **p70S6K** e, talvez, outras cinases ainda não identificadas. Uma segunda via importante inclui **mTOR**. Essa enzima é regulada diretamente pelos níveis de aminoácidos e pela insulina e é essencial para a atividade da p70S6K. Essa via assegura uma distinção entre os ramos de PKB e p70S6K distais à PKD1. Essas vias estão envolvidas na translocação das proteínas, na atividade enzimática e na regulação, pela insulina, dos genes envolvidos no metabolismo (Figura 42-8). Outra proteína que contém o domínio SH2 é a **GRB2**, que se liga ao IRS-1 e acopla a fosforilação da tirosina com várias proteínas, resultando na ativação de uma cascata de treonina e serina cinases. A Figura 42-8 ilustra uma via pela qual essa interação insulina-receptor ativa a via da proteína-quinase ativada por mitógeno (**MAPK**) e os efeitos anabólicos da insulina. Os papéis exatos desempenhados por muitas dessas proteínas de ancoragem, cinases e fosfatases ainda não foram estabelecidos.

A via Jak/STAT é utilizada por hormônios e citocinas

A ativação da tirosina-quinase também pode iniciar uma cascata de fosforilação e desfosforilação, que envolve a ação de várias outras proteínas-quinase e ações compensatórias de fosfatases. Dois mecanismos são utilizados para iniciar essa cascata. Alguns hormônios, como o hormônio do crescimento, a prolactina, a eritropoietina e as citocinas, iniciam a sua ação com a ativação de uma tirosina-quinase, porém essa atividade não constitui parte integral do receptor hormonal. A interação hormônio-receptor promove a ligação e a ativação das **proteínas citoplasmáticas tirosinas-quinase**, como **Tyk-2**, **Jak1** ou **Jak2**.

Essas cinases fosforilam uma ou mais proteínas citoplasmáticas, que, em seguida, associam-se a outras proteínas de ancoragem por meio da ligação aos domínios SH2. Esse tipo de interação resulta na ativação de uma família de proteínas citosólicas, denominadas **STATs**, ou transdutores de sinais e

Resposta à hiperglicemia:

Geração de sinal:

Transdução de sinal:

Efeitos biológicos:

Moléculas/alvos:

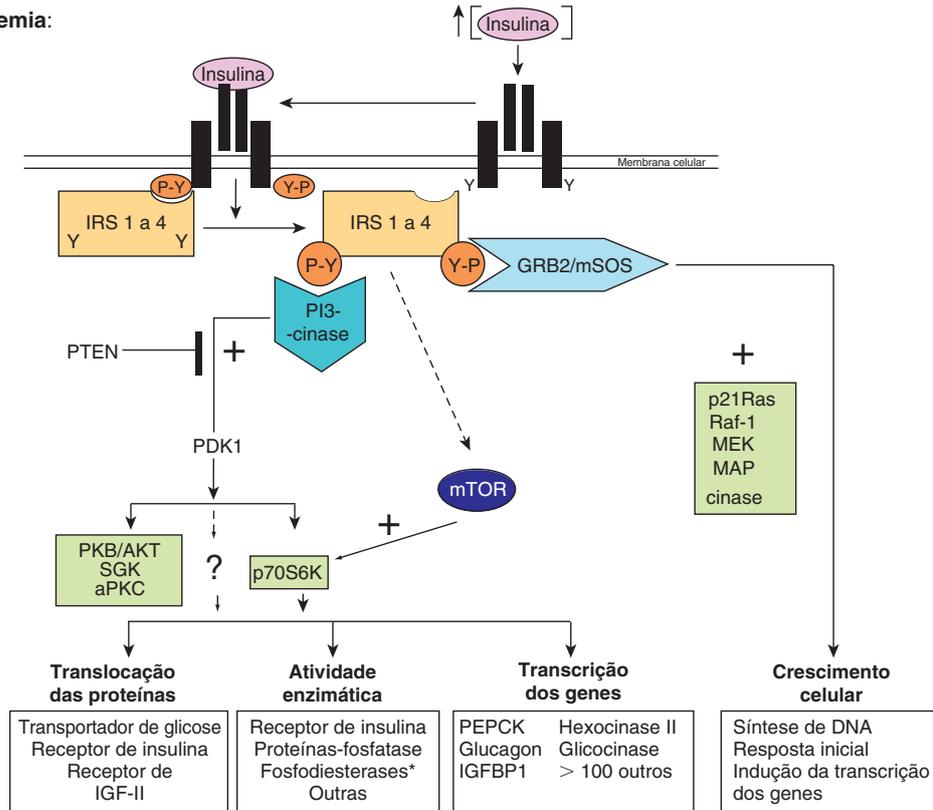


FIGURA 42-8 Vias de sinalização da insulina. As vias de sinalização da insulina fornecem um excelente exemplo do paradigma “reconhecimento → liberação de hormônio → geração de sinal → efeitos”, esquematizado na Figura 42-1. A insulina é liberada na corrente sanguínea pelas células β do pâncreas em resposta à hiperglicemia. A ligação da insulina ao seu receptor (IR) heterotetramérico da membrana plasmática, específico da célula-alvo, resulta em uma cascata de eventos intracelulares. Primeiro, a atividade intrínseca de tirosina-quinase do receptor de insulina é ativada e assinala o evento inicial. A ativação do receptor resulta em aumento da fosforilação da tirosina (conversão de resíduos Y específicos → Y-P) no interior do receptor. Em seguida, uma ou mais moléculas do substrato do receptor de insulina (IRS) (IRS 1-4) ligam-se ao receptor fosforilado em tirosina, e elas próprias são especificamente fosforiladas na tirosina. As proteínas IRS interagem com o IR ativado por meio dos domínios N-terminal de PH (homologia da plecstrina) e de PTB (ligação fosfotirosina). As proteínas IRS ancoradas ao IR são fosforiladas na tirosina, e os resíduos Y-P resultantes formam o sítio de ancoragem para várias outras proteínas de sinalização (i.e., cinase PI-3, GRB2 e mTOR). GRB2 e PI3K ligam-se aos resíduos Y-P de IRS por meio de seus domínios SH (homologia *Src*). A ligação aos resíduos IRS-Y-P leva à ativação da atividade de muitas moléculas de sinalização intracelulares, como GTPases, proteínas-quinase e lipídeo-quinase, que desempenham papéis essenciais em determinadas ações metabólicas da insulina. A figura mostra as duas vias mais bem descritas. De forma detalhada, a fosforilação de uma molécula de IRS (provavelmente IRS-2) resulta em ancoragem e ativação da lipídeo-quinase, a PI-3 cinase; a PI-3K gera novos lipídeos de inositol, que atuam como moléculas de “segundo mensageiro”. Por sua vez, essas moléculas ativam a PDK1 e, em seguida, uma variedade de moléculas de sinalização distais, incluindo a proteína-quinase B (PKB/AKT), SGK e PKCa. Uma via alternativa envolve a ativação da p70S6K e, talvez, de outras cinases ainda não identificadas. Em seguida, a fosforilação da molécula de IRS (provavelmente IRS-1) resulta em ancoragem de GRB2/mSOS e ativação da pequena GTPase, a p21Ras, que inicia uma cascata de proteínas-quinase que ativa Raf-1, MEK e as isoformas p42/p44 da MAP-quinase. Essas proteínas-quinase são importantes na regulação da proliferação e diferenciação de muitos tipos celulares. A via da mTOR representa um caminho alternativo de ativação da p70S6K e parece estar envolvida na sinalização de nutrientes, bem como na ação da insulina. Cada uma dessas cascatas pode influenciar diferentes processos biológicos, como mostrado (translocação de proteínas, atividade proteica/enzimática, transcrição gênica, crescimento celular). Todos os eventos de fosforilação são reversíveis por meio da ação de fosfatases específicas. Por exemplo, a lipídeo fosfatase PTEN desfosforila o produto da reação da PI-3-quinase, antagonizando a via e interrompendo o sinal. Os efeitos representativos das principais ações da insulina estão apresentados em cada um dos retângulos. O asterisco depois da fosfodiesterase indica que a insulina afeta indiretamente a afinidade de muitas enzimas por ativação das fosfodiesterases e redução dos níveis intracelulares de cAMP. (PKCa, proteína-quinase C atípica; GRB2, proteína de ligação do fator de crescimento 2; IGFBP, proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina; IRS 1-4, isoformas do substrato do receptor de insulina 1 a 4; MAP-quinase, proteína-quinase ativada por mitógeno; MEK, MAP-quinase e ERK-quinase; mSOS, *mammalian son of sevenless*; mTOR, alvo da rapamicina dos mamíferos; p70S6K, proteína-quinase S6 do ribossomo p70; PDK1, cinase dependente de fosfoinositídeo; PI-3-quinase, fosfatidilinositol-3-quinase; PKB, proteína-quinase B; PTEN, fosfatase e homólogo da tensina deletada no cromossomo 10; SGK, cinase sérica e regulada por glicocorticoides.)

ativadores da transcrição. A proteína STAT fosforilada forma dímeros e é transferida para o núcleo, liga-se a um elemento específico do DNA, como o elemento de resposta ao interferon (IRE), e ativa a transcrição. Esse processo está ilustrado na **Figura 42-9**. Outros eventos de ancoragem ao SH2 podem levar à ativação da PI-3-cinase, da via da MAP-cinase (por meio de SHC ou GRB2), ou à ativação mediada pela proteína G da fosfolipase C (PLC γ) com consequente produção de diacilglicerol e ativação da proteína-cinase C. É evidente que existe a possibilidade de “comunicação cruzada” quando diferentes hormônios ativam essas várias vias de transdução de sinais.

A via do NF- κ B é regulada por glicocorticoides

O fator de transcrição NF- κ B é um complexo heterodimérico, em geral composto por duas subunidades, denominadas **p50** e **p65** (**Figura 42-10**). Normalmente, o NF- κ B é mantido sequestrado no citoplasma em uma forma transcricionalmente inativa por membros da família de proteínas **I κ B** (inibidores do NF- κ B). Estímulos extracelulares, como as citocinas pró-inflamatórias, as espécies reativas de oxigênio e os mitógenos, levam à ativação do **complexo IKK** (I κ B-cinase), que é uma estrutura hétero-hexamérica, constituída de subunidades α , β e γ . O IKK fosforila o I κ B em dois resíduos de serina, o que direciona o I κ B para poli-ubiquitinação e degradação subsequente pelo proteossomo. Após a degradação do I κ B, o NF- κ B livre desloca-se ao núcleo, onde se liga a vários promotores de genes e ativa a transcrição, sobretudo de genes envolvidos na **resposta inflamatória**. A regulação transcricional do NF- κ B é mediada por uma variedade de coativadores, como a proteína de ligação da CREB (CBP), conforme descrito adiante (**Figura 42-13**).

Os **hormônios glicocorticoides** são agentes terapêuticamente úteis no tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e imunes. As suas ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras são explicadas, em parte, pela inibição do NF- κ B e suas ações subsequentes. Foram apresentadas evidências de três mecanismos para a inibição do NF- κ B pelos glicocorticoides:

(1) os glicocorticoides aumentam o mRNA do I κ B, resultando em aumento da proteína I κ B e sequestro mais eficiente do NF- κ B no citoplasma; (2) o receptor de glicocorticoides compete com o NF- κ B pela ligação a coativadores; (3) o receptor de glicocorticoides liga-se diretamente à subunidade p65 do NF- κ B e inibe a sua ativação (**Figura 42-10**).

OS HORMÔNIOS PODEM INFLUENCIAR EFEITOS BIOLÓGICOS ESPECÍFICOS PELA MODULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Os sinais gerados, conforme descrito anteriormente, precisam ser traduzidos em uma ação que permita à célula se adaptar de modo efetivo a um estímulo (**Figura 42-1**). Grande parte dessa adaptação é obtida por meio de alterações nas taxas de transcrição de genes específicos. Muitas observações diferentes levaram ao atual conceito para explicar como os hormônios afetam a transcrição. Algumas dessas observações são as que seguem. (1) Os genes transcritos ativamente encontram-se em regiões de cromatina “aberta” (experimentalmente definida como suscetibilidade relativa à enzima DNase I), que possibilita o acesso dos fatores de transcrição ao DNA. (2) Os genes apresentam regiões reguladoras, e os fatores de transcrição ligam-se a essas regiões para modular a frequência da iniciação da transcrição. (3) O complexo hormônio-receptor pode constituir um desses fatores de transcrição. A sequência do DNA à qual o complexo se liga é denominada HRE (ver exemplos na Tabela 42-1). (4) Como alternativa, outros sinais gerados por hormônios podem modificar a localização, a quantidade ou a atividade dos fatores de transcrição e, assim, influenciar a ligação ao elemento regulador ou de resposta. (5) Os membros de uma grande superfamília de receptores nucleares atuam com os receptores hormonais descritos anteriormente – ou de modo análogo. (6) Esses receptores nucleares interagem com outro grande

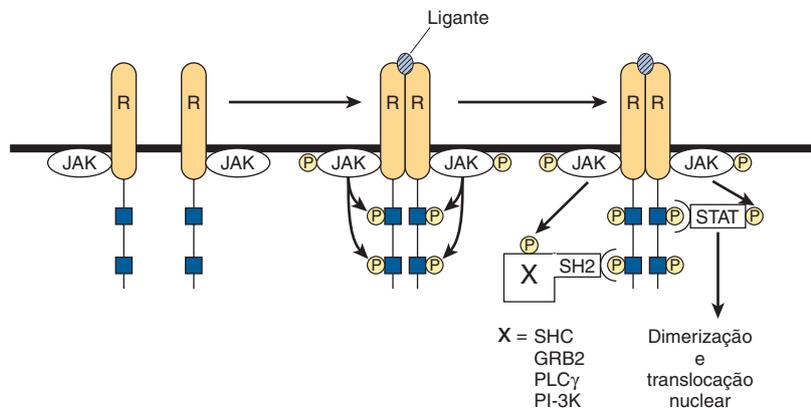


FIGURA 42-9 Iniciação da transdução de sinais por receptores ligados às Jak-cinases. Os receptores (R) que se ligam à prolactina, ao hormônio do crescimento, aos interferons e às citocinas carecem de tirosina-cinase endógena. Com a ligação dos ligantes, esses receptores sofrem dimerização, e uma proteína associada (Jak1, Jak2 ou TYK) é fosforilada. A Jak-P, uma cinase ativa, fosforila o receptor nos resíduos de tirosina. As proteínas STAT associam-se ao receptor fosforilado e, em seguida, elas próprias são fosforiladas pela Jak-P. A proteína STAT fosforilada, STAT (P), dimeriza, é transferida para o núcleo, liga-se a elementos específicos do DNA e regula a transcrição. Os resíduos de fosfotirosina do receptor ligam-se também a várias proteínas contendo o domínio SH2 (X-SH2). Isso resulta em ativação da via da MAP-cinase (por meio de SHC ou GRB2), da PLC γ ou da PI-3-cinase.

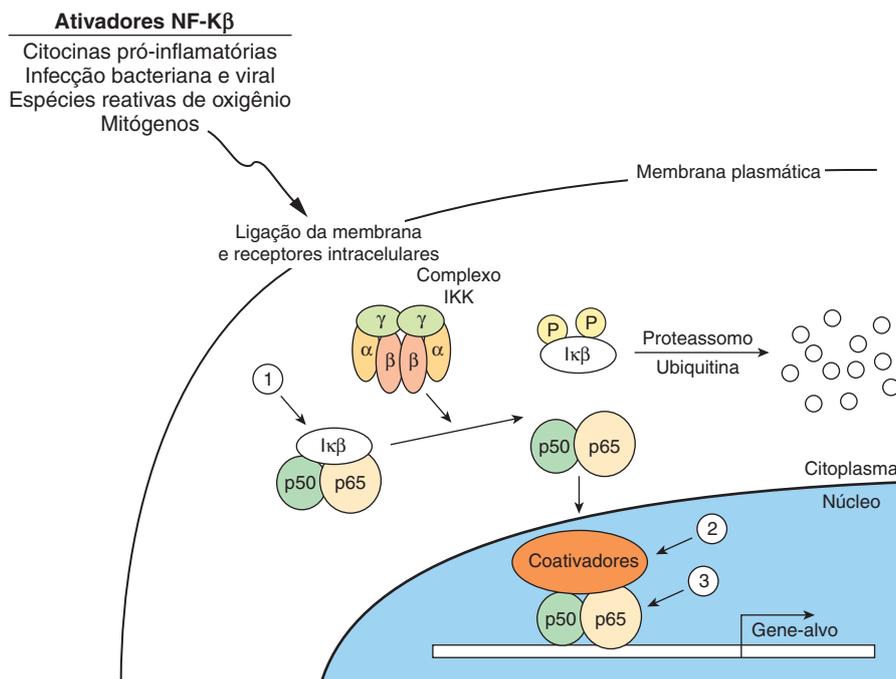


FIGURA 42-10 Regulação da via do NF- κ B. O NF- κ B consiste em duas subunidades, p50 e p65, que, quando presentes no núcleo, regulam a transcrição de grande quantidade de genes importantes para a resposta inflamatória. O NF- κ B é impedido de entrar no núcleo pelo I κ B, um inibidor do NF- κ B. O I κ B liga-se ao sinal de localização nuclear do NF- κ B e o mascara. Essa proteína citoplasmática é fosforilada por um complexo IKK, que é ativado por citocinas, espécies reativas de oxigênio e mitógenos. O I κ B fosforilado pode ser ubiquitinilado e degradado, com consequente liberação do NF- κ B, permitindo a translocação nuclear. Acredita-se que os glicocorticoides, que são agentes anti-inflamatórios potentes, afetem pelo menos três etapas nesse processo (1, 2, 3), conforme descrito no texto.

grupo de moléculas correguladoras para produzir alterações na transcrição de genes específicos.

Vários HREs foram definidos

Os HREs assemelham-se a elementos estimuladores, uma vez que não são estritamente dependentes da posição ou da localização ou orientação. Em geral, esses elementos são encontrados a uma distância de algumas centenas de nucleotídeos a montante (5') ao sítio de iniciação da transcrição; entretanto, podem estar localizados dentro da região de codificação do gene, em íntrons. Os HREs foram definidos pela estratégia ilustrada na Figura 38-11. As sequências consenso ilustradas na Tabela 42-1 foram deduzidas por meio da análise de numerosos genes regulados por determinado hormônio, utilizando sistemas simples de repórteres heterólogos (ver Figura 38-10). Embora esses HREs simples liguem-se ao complexo hormônio-receptor com mais avides do que ao DNA circundante – ou ao DNA de uma fonte não relacionada – e confirmam uma responsividade hormonal ao gene repórter, logo ficou evidente que o circuito regulador dos genes naturais deve ser muito mais complicado. Os glicocorticoides, as progestinas, os mineralocorticoides e os androgênios exercem ações fisiológicas amplamente diferentes. Como a especificidade exigida para esses efeitos poderia ser conseguida pela regulação da expressão dos genes pelo mesmo HRE (Tabela 42-1)? Perguntas como essa levaram a experimentos que possibilitaram a elaboração de um modelo muito complexo da regulação da transcrição. Por exemplo, o HRE precisa estar associado a outros elementos do DNA (e a

proteínas de ligação associadas) para a sua função ótima. A extensa semelhança de sequência observada entre os receptores dos hormônios esteroides, particularmente em seus domínios de ligação ao DNA (DBDs), levou à descoberta da **superfamília de receptores nucleares** de proteínas. Essas proteínas – bem como um grande número de **proteínas correguladoras** – possibilitam uma ampla variedade de interações entre o DNA-proteína e proteína-proteína, bem como a especificidade necessária para o controle fisiológico altamente regulado. A **Figura 42-11** ilustra um esquema desse tipo de montagem.

Existe uma grande família de proteínas de receptores nucleares

A superfamília de receptores nucleares consiste em um conjunto diverso de fatores de transcrição, que foram descobertos em virtude de uma semelhança de sequência em seus DBDs. Essa família, atualmente com > 50 membros, inclui os receptores hormonais nucleares discutidos anteriormente, vários outros receptores cujos ligantes foram descobertos após a identificação dos receptores e muitos receptores supostos ou órfãos, para os quais ainda não foi descoberto um ligante.

Esses receptores nucleares apresentam várias características estruturais comuns (**Figura 42-12**). Todos possuem um DBD de localização central, que possibilita a ligação do receptor com alta afinidade ao elemento de resposta. O DBD contém dois motivos de ligação dedos de zinco (ver Figura 38-14), que determinam a ligação sob a forma de homodímeros, heterodímeros (em geral, com um parceiro do receptor de retinoide X [RXR])

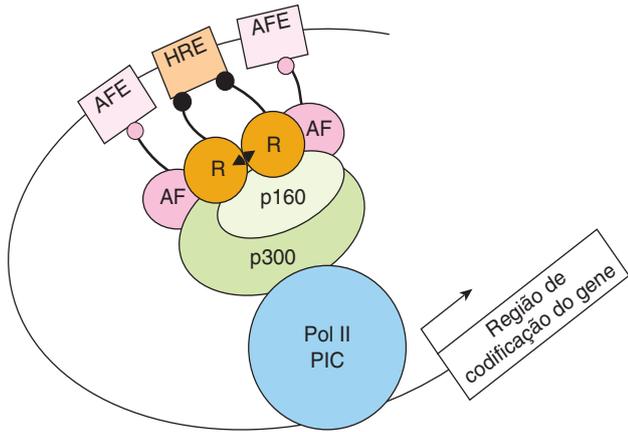


FIGURA 42-11 A unidade de transcrição da resposta hormonal. A unidade de transcrição da resposta hormonal é uma montagem de elementos do DNA e de proteínas cognatas complementares ligadas ao DNA que interagem, por meio de interações proteína-proteína, com diversas moléculas coativadoras ou correpressoras. Um componente essencial é o elemento de resposta hormonal que se liga ao receptor (R) associado ao ligante (▲). Os elementos de fatores acessórios (AFs) com os fatores de transcrição ligados também são importantes. Mais de 20 desses fatores acessórios (AFs), que são, em geral, membros da superfamília dos receptores nucleares, foram associados aos efeitos dos hormônios sobre a transcrição. Os AFs podem interagir entre si, com os receptores nucleares ocupados por ligantes ou com correpressores. Esses componentes se comunicam com o mecanismo de transcrição basal, formando a polimerase-II PIC (i.e., RNAP II e GTFs; Figura 36-10) por meio de um complexo correpressor, que pode consistir em um ou mais membros das famílias de p160, correpressora, relacionada com mediadores ou das famílias CBP/p300 (ver Tabela 42-6). Convém lembrar (Capítulos 36 e 38) que muitos correpressores da transcrição transportam atividades enzimáticas intrínsecas que modificam de modo covalente o DNA, as proteínas de transcrição e as histonas presentes nos nucleossomos (não ilustrados aqui) dentro ou ao redor do estimulador (HRE, AFE) e promotor. Coletivamente, o hormônio, o receptor hormonal, a cromatina, o DNA e o mecanismo de transcrição integram e processam os sinais hormonais para regular fisiologicamente a transcrição.

ou monômeros. O elemento de resposta-alvo consiste em uma ou duas sequências-consenso de meio-sítio do DNA, dispostas como repetição invertida ou direta. O espaçamento entre elas ajuda a determinar a especificidade de ligação. Nessas condições, em geral, uma repetição direta com três, quatro ou cinco regiões espaçadoras de nucleotídeos especifica a ligação dos receptores de vitamina D, dos hormônios tireoidianos e do ácido retinoico, respectivamente, ao mesmo elemento de resposta de consenso (Tabela 42-1). Um **domínio de ligação ao ligante (LBD) multifuncional** localiza-se na metade carboxiterminal do receptor. O LBD liga-se aos hormônios ou aos metabólitos com seletividade e, portanto, especifica uma determinada resposta biológica. O LBD também contém domínios que modulam a ligação das proteínas do choque térmico, a dimerização, a localização nuclear e a transativação. Essa última função é facilitada pela função de ativação da transcrição carboxiterminal (**domínio AF-2**), que forma uma superfície necessária para a interação dos coativadores. Uma **região de dobradiça** altamente variável separa o DBD do LBD. Essa região confere flexibilidade ao receptor, de modo que possa assumir diferentes

conformações de ligação ao DNA. Por fim, existe uma região aminoterminal altamente variável, que contém outro domínio de transativação, denominado **AF-1**. O domínio AF-1 provavelmente desempenha funções fisiológicas distintas por meio da ligação de diferentes proteínas correpressoras. Essa região do receptor, por meio do uso de promotores diferentes, sítios de *splicing* alternativo e múltiplos sítios de iniciação da tradução, fornece isoformas de receptores que compartilham uma identidade de DBD e LBD, mas que exercem respostas fisiológicas diferentes, devido à associação de vários correpressores com esse domínio AF-1 aminoterminal variável.

É possível classificar de várias maneiras esse grande número de receptores em grupos. Neste capítulo, esses receptores são discutidos de acordo com o modo pelo qual se ligam a seus respectivos elementos de DNA (Figura 42-12). Os receptores hormonais clássicos de glicocorticoides (GR), de mineralocorticoides (MR), de estrogênios (ER), de androgênios (AR) e de progestinas (PR) ligam-se na forma de homodímeros a sequências repetidas invertidas. Outros receptores hormonais, como os receptores dos hormônios tireoidianos (TR), do ácido retinoico (RAR) e da vitamina D (VDR), bem como os receptores que se ligam a vários ligantes metabólitos, como PPAR α , β e γ , FXR, LXR, PXR/SXR e CAR, ligam-se sob a forma de heterodímeros, com o receptor de retinoide X (RXR) como parceiro, para dirigir as sequências repetidas (ver Figura 42-12 e Tabela 42-5). Outro grupo de receptores órfãos que ainda não apresentam nenhum ligante conhecido se liga na forma de homodímeros ou monômeros às sequências repetidas diretas.

Conforme ilustrado na Tabela 42-5, a descoberta da superfamília de receptores nucleares levou a uma compreensão essencial de como uma variedade de metabólitos e xenobióticos regula a expressão dos genes e, por fim, o metabolismo, a desintoxicação e a eliminação dos produtos corporais normais e agentes exógenos, como os fármacos. Não surpreende que essa área constitua um campo fértil de pesquisa de novas intervenções terapêuticas.

Muitos correpressores dos receptores nucleares também participam da regulação da transcrição

O remodelamento da cromatina (modificação das histonas, metilação do DNA), a modificação do fator de transcrição por várias atividades enzimáticas e a comunicação entre os receptores nucleares e o mecanismo de transcrição basal são realizadas por interações entre as proteínas, com uma ou mais de uma classe de moléculas correpressoras. Atualmente, essas moléculas correpressoras ultrapassam o número de 100, sem incluir as variações de espécies e as variantes de *splicing*. A primeira dessas moléculas a ser descrita foi a **proteína de ligação da CREB (CBP)**. A CBP, por meio de um domínio aminoterminal, liga-se à serina fosforilada 137 da CREB e medeia a transativação em resposta ao cAMP. Por conseguinte, é descrita como um coativador. A CBP e seu parente próximo, a p300, interagem, direta ou indiretamente, com diversas moléculas sinalizadoras, incluindo a proteína ativadora 1 (AP-1), os STATs, os receptores nucleares e a CREB (Figura 42-13). A **CBP/p300** liga-se também à família p160

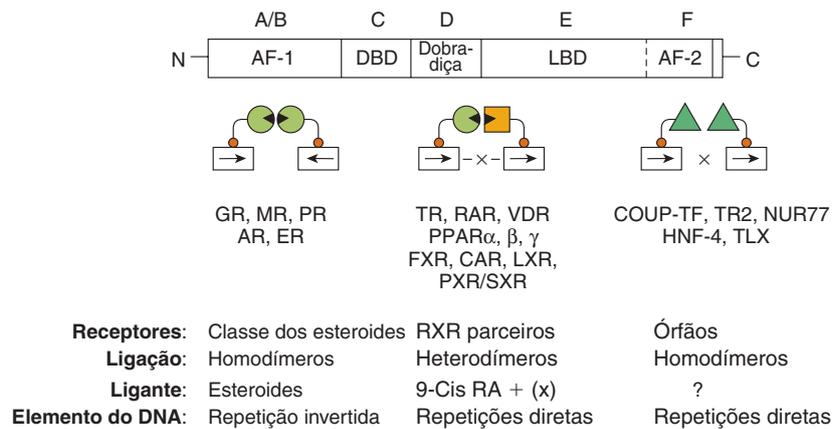


FIGURA 42-12 A superfamília de receptores nucleares. Os membros dessa família são divididos em seis domínios estruturais (A a F). O domínio A/B também é denominado AF-1, ou região moduladora, visto que está envolvido na ativação da transcrição. O domínio C consiste no domínio de ligação ao DNA (DBD). A região D contém a dobradiça, que confere flexibilidade entre o DBD e o domínio de ligação ao ligante (LBD, região E). A parte C-terminal da região E contém o AF-2, outro domínio importante para a ativação da transcrição. A região F não está bem definida. As funções desses domínios são discutidas de modo mais detalhado no texto. Os receptores com ligantes conhecidos, como hormônios esteroides, ligam-se na forma de homodímeros em meios-sítios repetidos invertidos. Outros receptores formam heterodímeros com o RXR correspondente nos elementos repetidos diretos. Pode haver espaçadores nucleotídicos de uma a cinco bases entre essas repetições diretas (DR1 a 5). Outra classe de receptores para os quais não foram determinados ligantes definitivos (receptores órfãos) se liga na forma de homodímeros para repetições diretas e, em certas ocasiões, na forma de monômeros a um meio-sítio único.

TABELA 42-5 Receptores nucleares com ligantes especiais^a

Receptor	Parceiro	Ligante	Processo afetado	
Peroxissomo	PPAR _α	RXR (DR1)	Ácidos graxos	Proliferação dos peroxissomos
Ativado por proliferador	PPAR _β		Ácidos graxos	Metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos
	PPAR _γ		Ácidos graxos Eicosanoides, tiazolidinedionas	
Farnesoide X	FXR	RXR (DR4)	Farnesol, ácidos biliares	Metabolismo dos ácidos biliares
Fígado X	LXR	RXR (DR4)	Oxisteróis	Metabolismo do colesterol
Xenobiótico X	CAR	RXR (DR5)	Xenobióticos androstanos Fenobarbital	Proteção contra determinados fármacos, metabólitos tóxicos e xenobióticos
	PXR	RXR (DR3)	Pregnanos Xenobióticos	

^aMuitos membros da superfamília dos receptores nucleares foram descobertos por clonagem, e os ligantes correspondentes foram subsequentemente identificados. Esses ligantes não são hormônios no sentido clássico, porém desempenham uma função semelhante, visto que ativam membros específicos da superfamília dos receptores nucleares. Os receptores descritos aqui formam heterodímeros com o RXR, apresentam sequências nucleotídicas variáveis separando os elementos de ligação repetidos diretos (DR1 a 5). Esses receptores regulam uma variedade de genes que codificam o citocromo p450s (CYP), as proteínas de ligação citosólicas e os transportadores cassette de ligação ao ATP (ABC) para influenciar o metabolismo e proteger as células contra fármacos e agentes nocivos.

de coativadores descritos adiante, bem como a várias outras proteínas, incluindo o fator de transcrição viral Ela, a proteína-cinase p90^{rsk} e a RNA-helicase A. Conforme assinalado anteriormente, é importante ressaltar que a **CBP/p300 também possui atividade intrínseca de histona-acetiltransferase (HAT)**. Algumas das numerosas ações da CBP/p300, que parecem depender das atividades enzimáticas intrínsecas e da capacidade de atuar como suporte para a ligação de outras proteínas, estão ilustradas na Figura 42-11. Outros corretores desempenham funções semelhantes.

Foram descritas várias outras famílias de moléculas coativadoras. Os membros da **família p160 de proteínas coativadoras**, todos com cerca de 160 kDa, incluem: (1) SRC-1 e NCoA-1; (2) GRIP 1, TIF2 e NCoA-2; e (3) p/CIP, ACTR,

AIB1, RAC3 e TRAM-1 (**Tabela 42-6**). Os diferentes nomes dos membros dentro de uma determinada subfamília frequentemente representam variações entre espécies ou pequenas variantes de *splicing*. Existe uma identidade de aminoácidos de cerca de 35% entre os membros das diferentes subfamílias. Os coativadores p160 compartilham várias atividades. Eles (1) ligam-se aos receptores nucleares de maneira dependente do agonista e do domínio de transativação do AF-2, (2) apresentam um motivo hélice-alça-hélice básico (bHLH) aminoterminal conservado (ver Capítulo 38), (3) exibem um domínio de transativação carboxiterminal fraco e um domínio de transativação aminoterminal mais forte em uma região que é necessária para a interação CBP/p160, (4) contêm, no mínimo, três dos **motivos LXXLL** necessários

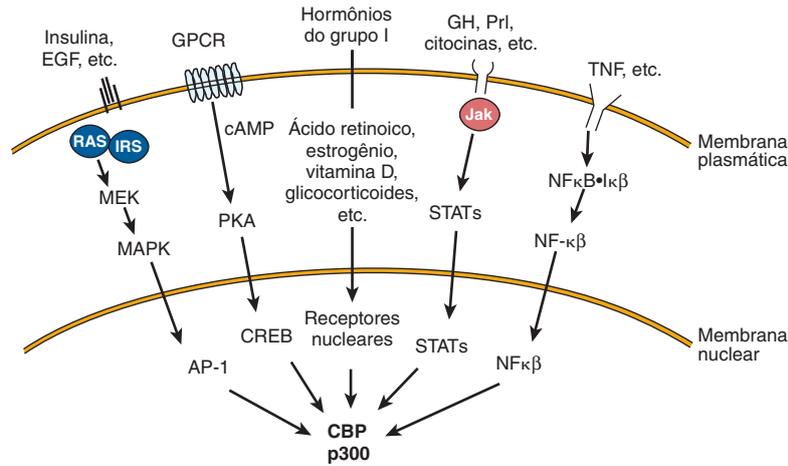


FIGURA 42-13 Diversas vias de transdução de sinais convergem para a CBP/p300. Muitos ligantes que se associam aos receptores de membrana ou nucleares acabam convergindo para a CBP/p300. São utilizadas diversas vias diferentes de transdução de sinais. (EGF, fator de crescimento epidérmico; GH, hormônio do crescimento; Prl, prolactina; TNF, fator de necrose tumoral; outras abreviações são apresentadas no texto.)

para a interação proteína-proteína com outros coativadores, e (5) com frequência, possuem atividade de HAT. O papel da HAT é particularmente interessante, já que as mutações do domínio da HAT desativam muitos desses fatores de transcrição. O conceito atual sustenta que essas atividades HAT acetilam as histonas, o que facilita a remodelagem da cromatina em um ambiente eficiente para a transcrição. Portanto, a acetilação/desacetilação das histonas desempenha um papel crítico na expressão dos genes. Por fim, é importante assinalar que foram descritos outros substratos proteicos para a acetilação mediada pela HAT, como ativadores da transcrição de ligação ao DNA e outros correguladores. Esses eventos de modificações pós-tradução (PTMs) sem histonas provavelmente constituem um fator importante na resposta reguladora geral.

Um pequeno número de proteínas, incluindo NCoR e SMRT, constitui a **família dos correpressores**. Esses correpressores atuam, pelo menos em parte, conforme mostra a Figura 42-2. Outra família inclui TRAPs, DRIPs e ARC (Tabela 42-6). Essas proteínas representam subunidades do mediador (ver Capítulo 36), e seu tamanho varia de 80 a 240 kDa. Acredita-se que atuam na ligação do complexo nuclear receptor-coativador à RNA-polimerase II e de outros componentes do mecanismo de transcrição basal.

Atualmente, o papel exato desses coativadores está sendo objeto de investigação intensa. Muitas dessas proteínas possuem atividades enzimáticas intrínsecas. Isso é particularmente interessante, tendo em vista o fato de que foi proposto que a acetilação, a fosforilação, a metilação, a sumoilação e a ubiquitinação – bem como a proteólise e a translocação celular – alteram a atividade de alguns desses correguladores e seus alvos.

Determinadas combinações de correguladores – e, portanto, diferentes combinações de ativadores e inibidores – parecem ser responsáveis por ações específicas induzidas por ligantes por meio de vários receptores. Além disso, essas interações em determinado promotor são dinâmicas. Em alguns casos, foram observados complexos constituídos de mais de 45 fatores de transcrição em um único gene.

TABELA 42-6 Algumas proteínas correguladoras dos mamíferos

I. Família de coativadores de 300 kDa	
A. CBP	Proteína de ligação da CREB
B. p300	Proteína de 300 kDa
II. Família de coativadores de 160 kDa	
A. SRC-1,2,3	Coativadores do receptor de esteroides 1, 2 e 3
NCoA-1	Coativador do receptor nuclear 1
B. TIF2	Fator intermediário transcrional 2
GRIP1	Proteína de interação com o receptor de glicocorticoides
NCoA-2	Coativador do receptor nuclear 2
C. p/CIP	Proteína 1 associada ao cointegrador p300/CBP
ACTR	Ativador dos receptores de hormônios tireoidianos e do ácido retinoico
AIB	Amplificado no câncer de mama
RAC3	Coativador 3 associado ao receptor
TRAM-1	Molécula 1 ativadora do TR
III. Correpressores	
A. NCoR	Correpressor do receptor nuclear
B. SMRT	Mediador silenciador do RXR e do TR
IV. Subunidades mediadoras	
A. TRAPs	Proteínas associadas ao receptor dos hormônios tireoidianos
B. DRIPs	Proteínas de interação com o receptor de vitamina D
C. ARC	Cofator recrutado por ativador

RESUMO

- Os hormônios, as citocinas, as interleucinas e os fatores de crescimento utilizam uma variedade de mecanismos de sinalização para facilitar as respostas adaptativas das células.
- O complexo ligante-receptor atua como sinal inicial para os membros da família dos receptores nucleares.
- Os hormônios peptídicos/proteicos e catecolaminas da classe II, que se ligam aos receptores de superfície celular, geram uma variedade de sinais intracelulares. Estes incluem o cAMP, o cGMP, o Ca²⁺, os fosfatidilinosídeos e as cascatas de proteínas-quinasas.
- Muitas respostas hormonais são obtidas por meio de alterações na taxa de transcrição de genes específicos.
- A superfamília de proteínas de receptores nucleares desempenha um papel central na regulação da transcrição gênica.
- Os receptores nucleares, cujos ligantes podem consistir em hormônios, metabólitos ou fármacos, ligam-se a elementos específicos do DNA na forma de homodímeros ou heterodímeros com RXR. Alguns deles – conhecidos como receptores órfãos – não têm nenhum ligante conhecido, porém ligam-se ao DNA e influenciam a transcrição.
- Outra grande família de proteínas correguladoras remodela a cromatina, modifica outros fatores de transcrição e liga os receptores nucleares ao aparato de transcrição basal.

REFERÊNCIAS

- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al: PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 2013;19:557–566.
- Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Gershengorn MC: Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. *Trends Endocrinol Metab* 1998;9:27.
- Beene DL, Scott JD: A-kinase anchoring proteins take shape. *Current Opinion in Cell Biol* 2007;19:192.
- Brummer T, Schmitz-Perffer C, Daly RJ: Docking proteins. *FEBS Journal* 2010; 277:4356–4369.
- Cheung E, Kraus WL: Genomic analyses of hormone signaling and gene regulation. *Annu Rev Physiol* 2010;72:191–218.
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415.
- Dasgupta S, Lonard DM, O'Malley BW: Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu Rev Med* 2014;65:279–292.
- Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT: Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1993;62:453.
- Hanoune J, Defer N: Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:145.
- Jaken S: Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:168.
- Kobilka BK: Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32: 213–218.
- Lee C-H, Olson P, Evans RM: Mini-review: lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferators-activated receptor. *Endocrinology* 2003;144:2201.
- Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, et al: Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008;452:45.
- Métivier R, Reid G, Gannon F: Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Journal* 2006;7:161.
- Montminy M: Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1997;66:807.
- Morris AJ, Malbon CC: Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999;79:1373.
- O'Malley B: Coregulators: from whence came these “master genes.” *Mol Endocrinology* 2007;21:1009.
- Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager, L et al: How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;380: 41–54.
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK: Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:179–197.
- Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK: Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes and Dev* 2006;20:1405.
- Sonoda J, Pei L, Evans RM: Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *Fed of European Biochem Soc* 2007;582:2.
- Spiegelman BM: Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 2013;62:1774–1782.
- Tang X, Tang G, Ozcan S: Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779:697.
- Telese F, Gamliel A, Skowronska-Krawczyk D: “Seq-ing” insights into the epigenetics of neuronal gene regulation. *Neuron* 2013;77:606–623.
- Walton KM, Dixon JE: Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1993;62:101.

Questões para estudo

Seção VIII – Bioquímica da comunicação extracelular e intracelular

- Considerando os lipídeos da membrana, assinale a única resposta FALSA.
 - O principal fosfolípido por massa nas membranas dos seus humanos é geralmente a fosfatidilcolina.
 - Os glicolípídeos estão localizados nas camadas interna e externa da membrana plasmática.
 - O ácido fosfatídico é um precursor da fosfatidilserina, mas não da esfingomielina.
 - A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão localizadas primariamente na camada externa da membrana plasmática.
 - O movimento de *flip-flop* dos fosfolípídeos nas membranas é muito lento.
- Considerando as proteínas de membrana, assinale a única resposta FALSA.
 - Devido às considerações estéricas, as α -hélices não podem existir nas membranas.
 - Um gráfico de hidropatia auxilia a estimar se um segmento de uma proteína é predominantemente hidrofóbico ou hidrofílico.
 - Determinadas proteínas estão ancoradas na cama da externa das membranas plasmáticas via estruturas de glicofosfatidilinositol (GPI).
 - A adenilato-ciclase é uma enzima marcadora para a membrana plasmática.
 - A mielina possui um conteúdo bastante elevado de lipídeos em comparação com as proteínas.
- Considerando o transporte de membrana, assinale a única afirmação FALSA.
 - O potássio possui uma densidade de carga inferior ao sódio e tende a se movimentar mais rapidamente através das membranas do que o sódio.
 - O fluxo de íons através dos canais iônicos é um exemplo de transporte passivo.
 - A difusão facilitada requer um transportador proteico.
 - A inibição da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ inibirá a captação dependente de sódio da glicose nas células intestinais.
 - A insulina, por meio do recrutamento de transportadores de glicose para a membrana plasmática, aumenta a captação de glicose nas células de gordura, mas não no músculo.
- Considerando a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, assinale a única afirmação FALSA.
 - A sua ação mantém a alta concentração intracelular de sódio em relação ao potássio.
 - Ela pode utilizar até 30% do gasto total de ATP de uma célula.
 - Ela é inibida por digitálicos, um fármaco útil em certas condições cardíacas.
 - Está localizada na membrana plasmática das células.
 - A fosforilação está envolvida no seu mecanismo de ação como um transporte ativo dirigido por ATP do tipo P.
- Quais moléculas possibilitam que as células respondam a uma molécula sinalizadora extracelular específica?
 - Carboidratos receptores específicos localizados na superfície interna da membrana plasmática.
 - Bicamada lipídica da membrana.
 - Canais iônicos.
 - Receptores que reconhecem e se ligam especificamente àquela molécula mensageira específica.
 - Membranas nucleares intactas.
- Indique o termo geralmente aplicado às moléculas mensageiras extracelulares que se ligam às proteínas receptoras transmembrana:
 - Inibidor competitivo.
 - Ligante.
 - Curva de Scatchard.
 - Substrato.
 - Chave.
- Na sinalização autócrina:
 - As moléculas mensageiras alcançam suas células-alvo através da passagem pela corrente sanguínea.
 - As moléculas mensageiras percorrem apenas curtas distâncias através do espaço extracelular até as células que se encontram bem próximas à célula que está gerando a mensagem.
 - A célula que produz a mensagem expressa receptores em sua superfície que podem responder àquele mensageiro.
 - As moléculas mensageiras, em geral, são degradadas rapidamente e, portanto, podem apenas atuar em distâncias curtas.
- Independentemente de como um sinal é iniciado, o evento de ligação do ligante é propagado por segundos mensageiros ou por recrutamento proteico. Qual é o evento bioquímico final que advém desses eventos de ligação?
 - Uma proteína do meio de uma via de sinalização intracelular é ativada.
 - Uma proteína do início de uma via de sinalização intracelular é ativada.
 - Uma proteína do topo de uma via de sinalização extracelular é ativada.
 - Uma proteína do topo de uma via de sinalização intracelular é desativada.
 - Uma proteína do topo de uma via de sinalização intracelular é ativada.
- Que características da superfamília de receptores nucleares sugerem que essas proteínas evoluíram de um ancestral comum?
 - Todas se ligam ao mesmo ligante com alta afinidade.
 - Todas atuam no interior do núcleo.
 - Todas são reguladas por fosforilação.
 - Todas possuem regiões de alta similaridade/identidade na sequência de aminoácidos.
 - Todas se ligam ao DNA.

10. Que efeito possui a degradação de complexos a receptor ligante após internalização sobre a capacidade de uma célula responder quando reexposta imediatamente ao mesmo hormônio?
- A resposta celular é atenuada devido a uma redução no número de receptores celulares.
 - A resposta celular é aumentada devido à competição reduzida do receptor ligante.
 - A resposta celular não é alterada aos estímulos subsequentes.
 - A resposta hormonal da célula é agora bimodal; aumentada durante um curto período e, em seguida, inativada.
11. Normalmente, qual é a primeira reação após a ligação da maioria das proteínas tirosinas-cinase receptoras (RTKs) ao seu ligante?
- Trimerização do receptor.
 - Degradação do receptor.
 - Desnaturação do receptor.
 - Dissociação do receptor.
 - Dimerização do receptor.
12. Onde se localiza o domínio catalítico cinase das proteínas tirosinas-cinase receptoras?
- Na superfície extracelular do receptor, imediatamente adjacente ao domínio de ligação do ligante.
 - No domínio citoplasmático do receptor.
 - Em uma proteína independente que se liga rapidamente ao receptor após a ligação do ligante.
 - No interior da porção transmembrana do receptor.
13. As subunidades das proteínas G heterotriméricas são chamadas de subunidades _____, _____ e _____.
- α , β e χ
 - α , β e δ
 - α , γ e δ
 - α , β e γ
 - γ , δ e η
14. Dos receptores listados a seguir, qual deles pode conduzir um fluxo de íons através da membrana plasmática quando ligado a seu ligante cognato?
- Tirosinas-cinase receptoras (RTKs).
 - Receptores acoplados à proteína G (GPCRs).
 - Receptores acoplados à proteína G.
 - Receptores de hormônios esteroides.
 - Canais ativados por ligantes.
15. Qual dos seguintes NÃO é um ligante natural dos receptores acoplados à proteína G?
- Hormônios.
 - Hormônios esteroides.
 - Quimiotrativo.
 - Derivados do ópio.
 - Neurotransmissores.
16. Coloque os eventos de sinalização listados a seguir em sua ordem CORRETA.
- A proteína G liga-se ao receptor ativado, formando um complexo receptor-proteína G.
 - Liberção de GDP pela proteína G.
 - Alteração na conformação das alças citoplasmáticas do receptor.
 - Ligação de GTP pela proteína G.
 - Aumento na afinidade do receptor por uma proteína G no lado citoplasmático da membrana.
 - Ligação de um hormônio ou neurotransmissor a um receptor acoplado à proteína G.
 - Alteração conformacional na subunidade α da proteína G.
 - 6-3-5-1-2-4-7
 - 6-5-4-1-7-2-3
 - 6-3-5-1-7-2-4
 - 6-7-3-5-1-2-4
 - 6-3-5-4-7-2-1
17. Quais proteínas G heterotriméricas unem os receptores à adenilato-ciclase via ativação de subunidades G_α ligadas ao GTP?
- Família G_s .
 - Família G_q .
 - Família G_i .
 - Família $G_{12/13}$.
 - Família G_o .
18. O que é necessário acontecer para impedir a superestimulação por um hormônio?
- Os hormônios devem ser degradados.
 - As proteínas G devem ser recicladas e, em seguida, degradadas.
 - Os receptores devem ser bloqueados para que não continuem a ativar as proteínas G.
 - Os receptores devem sofrer dimerização.
19. Qual dos seguintes hormônios conhecido como hormônio de “luta ou fuga” é secretado pela medula da glândula suprarrenal?
- Epinefrina.
 - Ocitocina.
 - Insulina.
 - Glucagon.
 - Somatostatinal.
20. Qual hormônio é secretado pelas células α do pâncreas em resposta a baixos níveis sanguíneos de glicose?
- Insulina.
 - Glucagon.
 - Estradiol.
 - Epinefrina.
 - Somatostatina.
21. Nas células hepáticas, a expressão de genes que codificam enzimas gliconeogênicas como a fosfoenolpiruvato-carboxicinas é induzida em resposta à qual das seguintes moléculas?
- cGMP.
 - Insulina.
 - ATP.
 - cAMP.
 - Colesterol.
22. O que ocorre à proteína-cinase A (PKA) após a sua ligação ao cAMP?
- As subunidades reguladoras da PKA se dissociam, ativando, assim, as subunidades catalíticas.
 - As subunidades catalíticas de PKA se ligam, em seguida, a duas subunidades reguladoras, ativando, assim, as subunidades catalíticas.
 - As subunidades reguladoras inibidoras se dissociam das subunidades catalíticas, inativando completamente a enzima.
 - As subunidades reguladoras estimuladoras se dissociam das subunidades catalíticas, inibindo a enzima.
 - A fosfodiesterase se liga às subunidades catalíticas, o que leva à inativação da enzima.

Nutrição, digestão e absorção

David A. Bender, Ph.D. e Peter A. Mayes, Ph.D., D.Sc.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever a digestão e a absorção dos carboidratos, dos lipídeos, das proteínas, das vitaminas e dos minerais.
- Explicar como as necessidades energéticas podem ser medidas e estimadas e como o cálculo do quociente respiratório possibilita a estimativa da mistura de combustíveis metabólicos oxidados.
- Descrever as consequências da desnutrição: marasmo, caquexia e kwashiorkor.
- Explicar como as necessidades proteicas são determinadas e por que há necessidade de maiores quantidades de determinadas proteínas do que outras para manter o equilíbrio do nitrogênio.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Além da água, a dieta precisa fornecer combustíveis metabólicos (principalmente carboidratos e lipídeos), proteínas (para o crescimento e a renovação das proteínas teciduais, e também como fonte de combustível metabólico), fibras (para a formação de volume no lúmen intestinal), minerais (que contêm elementos com funções metabólicas específicas), e vitaminas e ácidos graxos essenciais (compostos orgânicos necessários em quantidades menores para outras funções metabólicas e fisiológicas). Os polissacarídeos, os triacilgliceróis e as proteínas, que constituem a maior parte da dieta, devem ser hidrolisados em seus monossacarídeos, ácidos graxos e aminoácidos constituintes, respectivamente, antes de serem absorvidos e utilizados. Os minerais e as vitaminas devem ser liberados da complexa matriz do alimento antes que possam ser absorvidos e utilizados.

A **desnutrição** é disseminada globalmente, causando retardo do crescimento, comprometimento do sistema imune e redução da capacidade de trabalho. Por outro lado, nos países desenvolvidos e cada vez mais nos países em desenvolvimento, há consumo excessivo de alimentos (sobretudo gorduras), levando à obesidade e ao desenvolvimento de diabetes, doença

cardiovascular e alguns tipos de câncer. No mundo todo, existem mais indivíduos com sobrepeso e obesos do que desnutridos. As deficiências de vitamina A, de ferro e de iodo representam um importante problema de saúde em muitos países, e as deficiências de outras vitaminas e sais minerais constituem uma importante causa de comprometimento da saúde. Nos países desenvolvidos, a deficiência nutricional é rara, embora existam grupos vulneráveis da população que correm maior risco. O consumo de minerais e vitaminas em quantidades adequadas para evitar a sua deficiência pode ser inadequado para promover condições ideais de saúde e longevidade.

A secreção excessiva de ácido gástrico, associada à infecção por *Helicobacter pylori*, pode levar ao desenvolvimento de **úlceras** gástricas e duodenais; pequenas alterações na composição da bile podem levar à cristalização do colesterol como **cálculos biliares**; o comprometimento da secreção do pâncreas exócrino (como na **fibrose cística**) leva à desnutrição e à esteatorreia. A **intolerância à lactose** resulta da deficiência de lactase, causando diarreia e desconforto intestinal quando o indivíduo consome lactose. A absorção de peptídeos intactos que estimulam as respostas humorais provoca **reações alérgicas**; a **doença celíaca** é uma reação alérgica ao glúten do trigo.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE CARBOIDRATOS

A digestão dos carboidratos ocorre por hidrólise, com liberação de oligossacarídeos e, em seguida, de dissacarídeos e monossacarídeos livres. O aumento do nível de glicemia após a ingestão de uma dose-teste de um carboidrato, em comparação com aquele que ocorre após uma quantidade equivalente de glicose (na forma de glicose ou de um alimento de referência rico em amido) é conhecido como **índice glicêmico**. A glicose e a galactose apresentam um índice glicêmico de 1 (ou 100%), assim como a lactose, a maltose, a isomaltose e a trealose, que dão origem a esses dois primeiros monossacarídeos após a sua hidrólise. A frutose e os alcoóis de açúcar são absorvidos menos rapidamente e apresentam índice glicêmico mais baixo, assim como a sacarose. O índice glicêmico do amido varia entre quase 1 (ou 100%) e quase 0, em virtude das taxas variáveis de hidrólise, ao passo que o índice dos polissacarídeos que não contêm amido (ver Figura 15-13) é 0. Os alimentos com baixos índices glicêmicos são considerados mais benéficos, visto que causam menos flutuações na secreção de insulina. Os polissacarídeos de amido e sem amido resistentes fornecem substratos para a fermentação bacteriana no intestino grosso, e a formação resultante de butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta asseguram uma fonte significativa de combustível para os enterócitos intestinais. Existem evidências de que o butirato também apresenta atividade antiproliferativa, proporcionando proteção contra o câncer colorretal.

As amilases catalisam a hidrólise do amido

A hidrólise do amido é catalisada pelas amilases salivar e pancreática, que catalisam a hidrólise aleatória das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), liberando dextrinas e, em seguida, uma mistura de glicose, maltose e maltotriose, bem como pequenas dextrinas ramificadas (a partir dos pontos de ramificação da amilopectina; Figura 15-12).

As dissacaridases são enzimas da borda em escova

As dissacaridases, a maltase, a sacarase-isomaltase (enzima bifuncional que catalisa a hidrólise da sacarose e da isomaltose), a lactase e a trealase, estão localizadas na borda em escova das células da mucosa intestinal, onde os monossacarídeos resultantes e aqueles provenientes da dieta são absorvidos. A deficiência congênita de lactase ocorre raramente em lactentes, resultando em intolerância à lactose e retardo do crescimento quando amamentados ou alimentados com fórmulas para lactentes. A deficiência congênita de sacarase-maltase ocorre entre os inuítes, levando a uma intolerância à sacarose, com diarreia persistente e retardo do crescimento quando a dieta contém sacarose.

Na maioria dos mamíferos e dos seres humanos, a atividade da lactase começa a declinar depois do desmame e desaparece quase por completo no fim da adolescência, levando a uma **intolerância à lactose**. A lactose permanece no lúmen intestinal, onde atua como substrato para a fermentação bacteriana em lactato, resultando em desconforto abdominal e diarreia após o consumo de quantidades relativamente grandes. Em dois grupos de populações, pessoas de ascendência da Europa

Setentrional e tribos nômades da África Subsaariana e da Arábia, a lactase persiste depois do desmame e durante a vida adulta. Os mamíferos marinhos secretam um leite rico em gordura que não contém carboidratos, e seus filhotes carecem de lactase.

Existem dois mecanismos distintos para a absorção de monossacarídeos no intestino delgado

A glicose e a galactose são absorvidas por um processo dependente de sódio. Ambas são transportadas pela mesma proteína transportadora (SGLT 1) e competem entre si pela absorção intestinal (**Figura 43-1**). Outros monossacarídeos são absorvidos por difusão mediada por carreadores. Como não são ativamente transportados, a frutose e os alcoóis de açúcar são absorvidos apenas a favor de seu gradiente de concentração, e, após o seu consumo moderadamente alto, uma parte pode permanecer no lúmen intestinal, atuando como substrato para a fermentação bacteriana. O consumo significativo de frutose e de alcoóis de açúcar pode resultar em diarreia osmótica.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE LIPÍDEOS

Os principais lipídeos da dieta são os triacilgliceróis e, em menor grau, os fosfolipídeos. Eles são moléculas hidrofóbicas, que precisam ser hidrolisadas e emulsificadas em gotículas muito pequenas (micelas com diâmetro de 4 a 6 nm) para que possam ser absorvidas. As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, bem

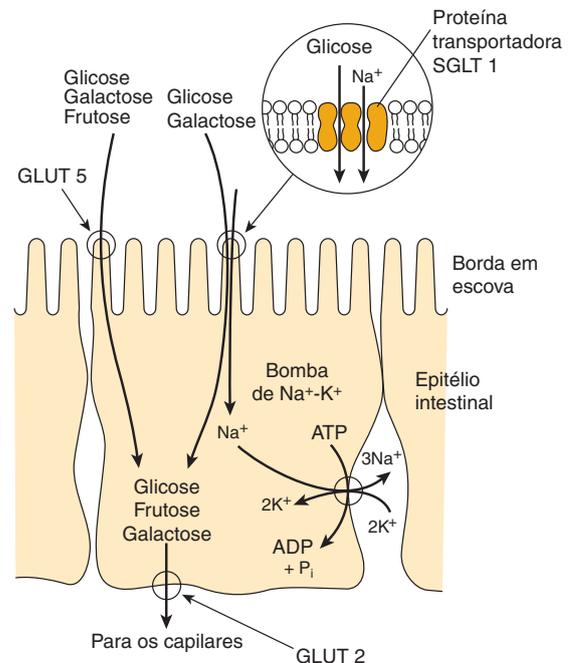


FIGURA 43-1 Transporte da glicose, da frutose e da galactose através do epitélio intestinal. O transportador SGLT 1 é acoplado à bomba de Na⁺-K⁺, possibilitando o transporte da glicose e da galactose contra seus gradientes de concentração. O transportador facilitador independente de Na⁺, GLUT 5, permite que a frutose, a glicose e a galactose sejam transportadas a favor de seus gradientes de concentração. A saída de todos os açúcares da célula ocorre por meio do transportador facilitador GLUT 2.

como uma variedade de outros lipídeos (incluindo colesterol e carotenos), são absorvidas em sua forma dissolvida nas micelas lipídicas. A absorção de carotenos e vitaminas lipossolúveis é comprometida por uma dieta muito pobre em gordura.

A hidrólise dos triacilgliceróis é iniciada pelas lipases lingual e gástrica, que atacam a ligação éster *sn*-3 para gerar 1,2-diacilgliceróis e ácidos graxos livres, os quais atuam como agentes emulsificadores. A lipase pancreática é secretada no intestino delgado e requer a presença de outra proteína pancreática, a colipase, para a sua atividade. Essa enzima é específica para as ligações ésteres primárias – isto é, as posições 1 e 3 nos triacilgliceróis – e resulta na liberação de 2-monoacilgliceróis e ácidos graxos livres como principais produtos finais da digestão luminal dos triacilgliceróis. Inibidores da lipase pancreática são utilizados para inibir a hidrólise do triacilglicerol no tratamento da obesidade grave. A esterase pancreática no lúmen intestinal hidrolisa os monoacilgliceróis; entretanto eles não são substratos apropriados, de modo que apenas cerca de 25% dos triacilgliceróis ingeridos são totalmente hidrolisados a glicerol e ácidos graxos antes de sua absorção (Figura 43-2). Os sais biliares, produzidos no fígado e secretados na bile, possibilitam a emulsificação dos produtos da digestão dos lipídeos em micelas, juntamente com os fosfolipídeos da dieta e o colesterol secretado na bile (cerca de 2 g/dia), bem como o colesterol da dieta (cerca de 0,5 g/dia). As micelas possuem menos de 1 mm de diâmetro e são solúveis, de modo que permitem que os produtos da digestão, incluindo as vitaminas lipossolúveis, sejam transportados no ambiente aquoso do lúmen intestinal para entrar em contato direto com a borda em escova das células da mucosa intestinal, possibilitando a sua captação pelo epitélio. Os sais biliares permanecem no lúmen intestinal, onde a maior parte é absorvida a partir do íleo para a **circulação êntero-hepática** (ver Capítulo 26).

No interior do epitélio intestinal, os 1-monoacilgliceróis são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol, enquanto os 2-monoacilgliceróis são reacidados em triacilgliceróis por meio da **via dos monoacilgliceróis**. O glicerol liberado no lúmen intestinal é absorvido na veia porta do fígado; o glicerol liberado dentro do epitélio é reutilizado para a síntese de triacilgliceróis por meio da via normal do ácido fosfatídico (ver Capítulo 24). Os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados para produzir triacilglicerol nas células da mucosa e, juntamente com os outros produtos da digestão dos lipídeos, são secretados como quilomícrons nos linfáticos, alcançando a circulação sanguínea através do ducto torácico (ver Capítulo 25). Os ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média são principalmente absorvidos para a veia porta do fígado sob a forma de ácidos graxos livres.

O colesterol é absorvido dissolvido em micelas lipídicas e é esterificado principalmente na mucosa intestinal, antes de ser incorporado aos quilomícrons. Os esteróis e os estanois vegetais (nos quais o anel B é saturado) competem com o colesterol pela sua esterificação, porém não são substratos apropriados, de modo que existe quantidade aumentada de colesterol não esterificado nas células da mucosa. O colesterol não esterificado e outros esteróis são ativamente transportados das células da mucosa para o lúmen intestinal. Isso significa que os esteróis e os estanois vegetais inibem efetivamente a absorção não apenas do colesterol da dieta, mas também da maior quantidade secretada na bile, reduzindo, assim, o conteúdo corporal total de colesterol e, conseqüentemente, a sua concentração plasmática.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas nativas são resistentes à digestão, visto que poucas ligações peptídicas são acessíveis às enzimas proteolíticas sem antes ocorrer a desnaturação das proteínas da dieta (pelo calor da cocção e pela ação do ácido gástrico).

Vários grupos de enzimas catalisam a digestão de proteínas

Existem duas classes principais de enzimas digestórias proteolíticas (**proteases**), que exibem diferentes especificidades pelos aminoácidos que formam a ligação peptídica a ser hidrolisada. As **endopeptidases** hidrolisam as ligações peptídicas entre aminoácidos específicos em toda a extensão da molécula. Elas são as primeiras enzimas que atuam, produzindo maior quantidade de fragmentos menores. A pepsina no suco gástrico catalisa a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos com cadeias laterais volumosas (aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada e metionina). A tripsina, a quimiotripsina e a elastase são secretadas no intestino delgado pelo pâncreas. A tripsina catalisa a hidrólise de ésteres de lisina e arginina, a quimiotripsina atua nos ésteres de aminoácidos aromáticos, e a elastase, em ésteres de pequenos aminoácidos alifáticos neutros. As **exopeptidases** catalisam a hidrólise das ligações peptídicas, uma por vez, a partir das extremidades dos peptídeos. As **carboxipeptidases**, secretadas no suco pancreático, liberam aminoácidos da extremidade carboxiterminal livre; as **aminopeptidases**, secretadas pelas células da mucosa intestinal, liberam aminoácidos da extremidade aminoterminal. As **dipeptidases** e as **tripeptidases** localizadas na borda em escova das células da mucosa intestinal catalisam a hidrólise dos dipeptídeos e tripeptídeos, que não são substratos para as aminopeptidases e carboxipeptidases.

As proteases são secretadas como **zimogênios** inativos; o sítio ativo da enzima é mascarado por uma pequena região da cadeia peptídica, removida por hidrólise de uma ligação peptídica específica. O pepsinogênio é ativado a pepsina pelo ácido gástrico e pela pepsina ativada. No intestino delgado, o tripsinogênio, precursor da tripsina, é ativado pela enteropeptidase, que é secretada pelas células epiteliais do duodeno; em seguida, a tripsina pode ativar o quimiotripsinogênio em quimiotripsina, a proelastase em elastase, a procarboxipeptidase em carboxipeptidase e a proaminopeptidase em aminopeptidase.

Os aminoácidos livres e os pequenos peptídeos são absorvidos por mecanismos diferentes

O produto final da ação das endopeptidases e exopeptidases consiste em uma mistura de aminoácidos livres, dipeptídeos, tripeptídeos e oligopeptídeos, e todos são absorvidos. Os aminoácidos livres são absorvidos através da mucosa intestinal por transporte ativo dependente de sódio. Existem vários transportadores diferentes de aminoácidos, com especificidade para a natureza da cadeia lateral do aminoácido (grande ou pequena, neutra, ácida ou básica). Os diversos aminoácidos transportados por qualquer transportador competem entre si pela sua absorção e captação tecidual. Os dipeptídeos e os tripeptídeos entram na borda em escova das células da mucosa intestinal, onde são hidrolisados em aminoácidos livres, que

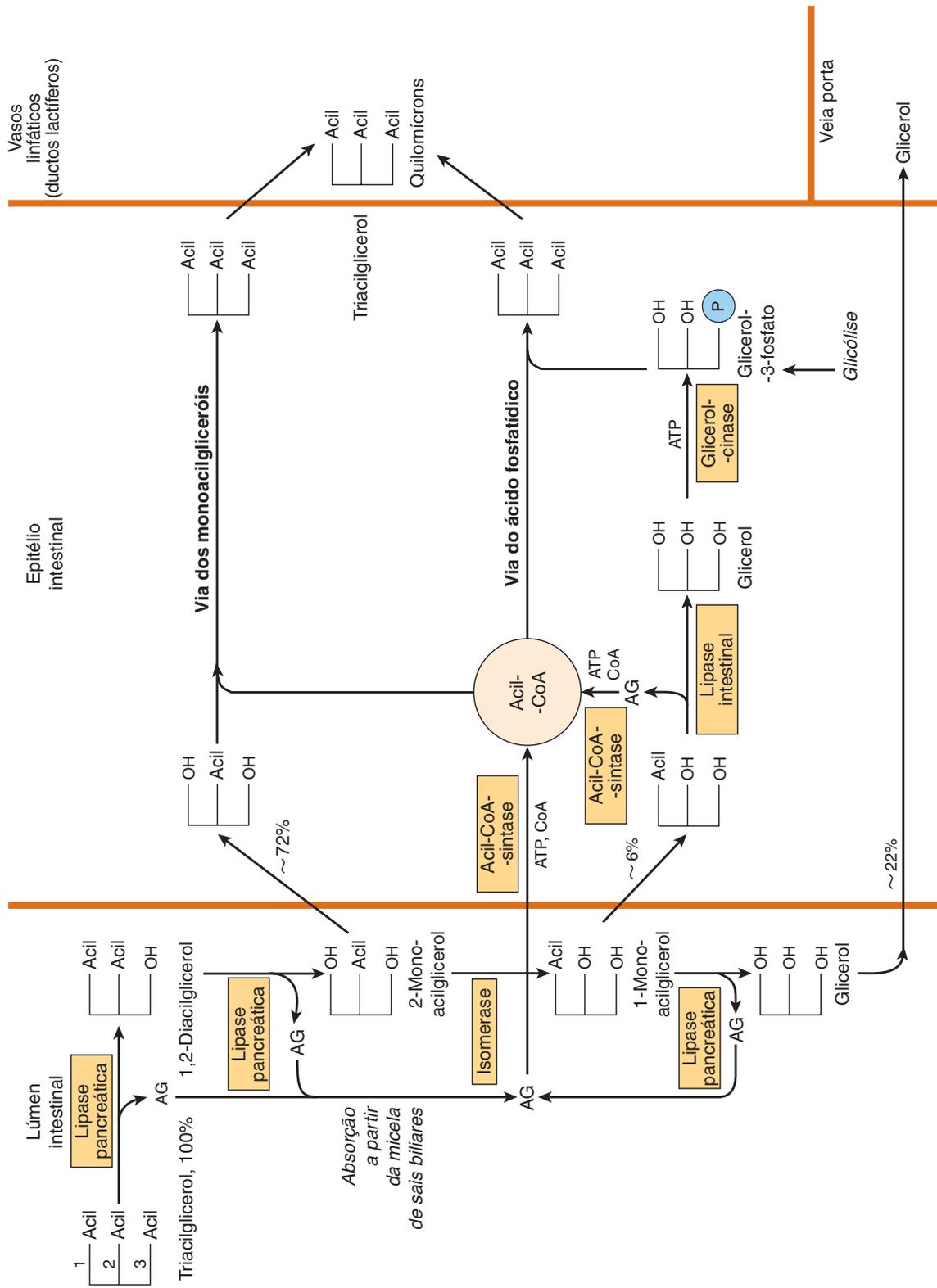


FIGURA 43-2 Digestão e absorção de triacilgliceróis. Os valores fornecidos para a porcentagem de captação podem variar amplamente, porém indicam a importância relativa das três vias ilustradas.

são, então, transportados para a veia porta do fígado. Os peptídeos relativamente grandes podem ser absorvidos em sua forma intacta, seja por captação pelas células epiteliais da mucosa (transcelular) ou pela sua passagem entre as células epiteliais (paracelular). Muitos desses peptídeos são grandes o suficiente para estimular a formação de anticorpos – constituindo a base das **reações alérgicas** aos alimentos.

DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS

As vitaminas e os minerais são liberados dos alimentos durante a digestão, embora esse processo não seja completo, e a disponibilidade de vitaminas e minerais dependa do tipo de alimento e, particularmente, no caso dos minerais, da presença de compostos quelantes. As vitaminas lipossolúveis são absorvidas nas micelas lipídicas, que resultam na digestão das gorduras; as vitaminas hidrossolúveis e a maioria dos sais minerais são absorvidas pelo intestino delgado por transporte ativo ou por difusão mediada por carreador, seguida de ligação às proteínas intracelulares para permitir uma captação concentrada. A absorção da vitamina B₁₂ depende de uma proteína transportadora específica, o fator intrínseco (ver Capítulo 44); a absorção de cálcio é dependente da vitamina D; a absorção de zinco provavelmente requer um ligante de ligação do zinco secretado pelo pâncreas exócrino; e a absorção de ferro é limitada (ver adiante).

A absorção do cálcio é dependente da vitamina D

Além de seu papel na regulação da homeostasia do cálcio, a vitamina D é necessária para a absorção intestinal de cálcio. A síntese da proteína intracelular de ligação do cálcio, a **calbindina**, necessária para a absorção do cálcio, é induzida pela vitamina D. A vitamina D também atua para recrutar transportadores de cálcio até a superfície celular, aumentando rapidamente a absorção de cálcio – processo que é independente da síntese de novas proteínas.

O ácido fítico (inositol-hexafosfato) nos cereais liga-se ao cálcio no lúmen intestinal, impedindo a sua absorção. Outros minerais, incluindo o zinco, também são quelados pelo fitato. Isso representa um problema principalmente entre os indivíduos que consomem grandes quantidades de produtos à base de trigo integral não fermentado; a levedura contém uma enzima, a **fitase**, que desfosforila o fitato, tornando-o inativo. As altas concentrações de ácidos graxos no lúmen intestinal, que ocorrem em consequência do comprometimento da absorção de gorduras, também podem reduzir a absorção do cálcio, formando sais de cálcio insolúveis; algumas vezes, a ingestão elevada de oxalato pode causar deficiência, visto que o oxalato de cálcio é insolúvel.

A absorção de ferro é limitada e rigorosamente controlada, mas aumentada pela vitamina C e pelo álcool

Embora a deficiência de ferro constitua um problema comum tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, cerca de 10% dos indivíduos são geneticamente vulneráveis à

sobrecarga de ferro (**hemocromatose**), e, para reduzir o risco de efeitos adversos da formação não enzimática de radicais livres por sais de ferro, a absorção é rigorosamente regulada. O ferro inorgânico é transportado para a célula da mucosa por um transportador de íons metálicos divalentes ligado a prótons e se acumula intracelularmente pela sua ligação à **ferritina**. O ferro deixa a célula da mucosa por meio de uma proteína transportadora, a ferroportina, mas apenas na presença de **transferrina** livre no plasma para a sua ligação. Quando a transferrina está saturada com ferro, qualquer ferro que tenha se acumulado nas células da mucosa é perdido com a descamação celular. A expressão do gene da ferroportina (e, possivelmente, também, do transportador de íons metálicos divalentes) é modulada negativamente pela hepcidina, um peptídeo secretado pelo fígado quando as reservas corporais de ferro estão adequadas. Em resposta à hipoxia, à anemia ou à hemorragia, ocorre redução na síntese de hepcidina, resultando em aumento da síntese de ferroportina e absorção aumentada de ferro (**Figura 43-3**). Em consequência dessa barreira mucosa, somente em torno de 10% do ferro da dieta é absorvido, e apenas 1 a 5% a partir de muitos alimentos vegetais.

O ferro inorgânico é absorvido em seu estado Fe²⁺ (reduzido), de modo que a presença de agentes redutores aumenta a sua absorção. O composto mais efetivo é a **vitamina C**, e, embora a ingestão de 40 a 80 mg/dia de vitamina C seja suficiente para atender às demandas, uma ingestão de 25 a 50 mg por refeição aumenta a absorção do ferro, particularmente quando são utilizados sais de ferro no tratamento da anemia ferropriva. O álcool e a frutose também aumentam a absorção do ferro. O ferro do heme proveniente das carnes é absorvido separadamente e é consideravelmente mais disponível do que o ferro inorgânico. Entretanto, a absorção tanto do ferro inorgânico quanto do ferro do heme é afetada pelo cálcio – um copo de leite ingerido com uma refeição reduz significativamente a disponibilidade de ferro.

BALANÇO ENERGÉTICO: NUTRIÇÃO EXCESSIVA E DESNUTRIÇÃO

Depois da ingestão de água, a primeira necessidade corporal é de combustíveis metabólicos – gordura, carboidratos e aminoácidos das proteínas (ver Tabela 16-1). A ingestão alimentar acima do gasto energético leva à **obesidade**, ao passo que uma ingestão abaixo do gasto calórico provoca emagrecimento e perdas, **marasmo** e **kwashiorkor**. Tanto a obesidade quanto a desnutrição graves estão associadas a um aumento da mortalidade. O índice de massa corporal = peso (em kg)/altura² (em m) é normalmente utilizado para expressar a obesidade relativa; a faixa desejável situa-se entre 20 e 25.

As necessidades energéticas são estimadas pela determinação do gasto energético

O gasto energético pode ser calculado diretamente pela determinação do calor gerado pelo corpo, entretanto é estimado, em geral, por meios indiretos a partir do consumo de oxigênio. Existe um gasto energético de cerca de 20 kJ/L de oxigênio consumido, independentemente de o combustível metabolizado ser carboidrato, gordura ou proteína (ver Tabela 14-1).

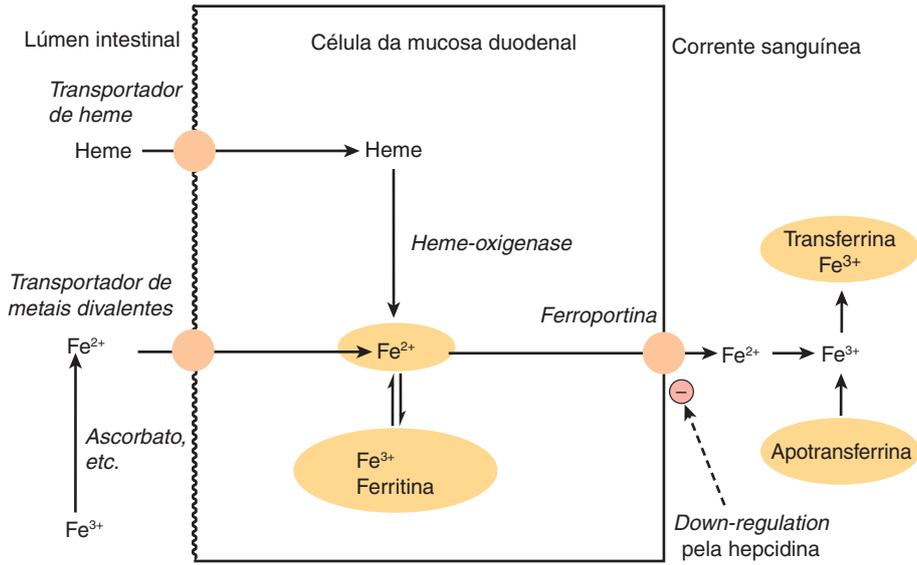


FIGURA 43-3 Absorção do ferro. A hepcidina secretada pelo fígado modula negativamente a síntese de ferroportina e limita a absorção de ferro.

O cálculo da razão entre o volume de dióxido de carbono produzido e o volume de oxigênio consumido (**quociente respiratório, QR**) fornece uma indicação da mistura de combustíveis metabólicos oxidados (ver Tabela 14-1).

Uma técnica mais recente permite a estimativa do gasto energético total no decorrer de um período de 1 a 2 semanas com o uso da água duplamente marcada com isótopos, $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$. O ^2H é eliminado do corpo somente na água, ao passo que o ^{18}O deixa o corpo na água e no dióxido de carbono; a diferença na taxa de perda dos dois marcadores possibilita a estimativa da produção total de dióxido de carbono e, portanto, do consumo de oxigênio e do gasto energético (**Figura 43-4**).

A **taxa metabólica basal (TMB)** é o gasto energético do corpo em repouso, mas não durante o sono, em condições controladas de neutralidade térmica, medido durante cerca de 12 horas após a última refeição, e depende do peso, da idade e do sexo do indivíduo. O **gasto de energia total** depende da TMB, da energia necessária para a atividade física e do custo

energético na síntese de reservas no estado alimentado. Portanto, é possível estimar as necessidades energéticas de um indivíduo com base no seu peso corporal, na idade, no sexo e no nível de atividade física. O peso corporal afeta a TMB, visto que existe maior quantidade de tecido ativo em um corpo mais volumoso. A redução da TMB com a idade, mesmo quando o peso corporal permanece constante, resulta da substituição do tecido muscular por tecido adiposo, que é metabolicamente menos ativo. De forma semelhante, as mulheres apresentam uma TMB significativamente mais baixa do que os homens com o mesmo peso corporal e idade, visto que os corpos das mulheres contêm uma quantidade proporcionalmente maior de tecido adiposo.

As necessidades energéticas aumentam com a atividade

A maneira mais útil de expressar o custo energético da atividade física é na forma de múltiplo de TMB. Este é conhecido como **taxa de atividade física (TAF)** ou **equivalente metabólico da tarefa (MET)**. As atividades sedentárias consomem apenas cerca de 1,1 a $1,2 \times$ TMB. Em contrapartida, o esforço vigoroso, como subir escadas, caminhar em trilhas e escalar montanhas, etc., pode consumir 6 a $8 \times$ TMB. O **nível de atividade física (NAF)** total é a soma da TAF de diferentes atividades, multiplicada pelo tempo consumido por aquela atividade, dividido por 24 horas.

Dez por cento da energia fornecida por uma refeição podem ser consumidos na formação das reservas

Ocorre aumento considerável da taxa metabólica depois de uma refeição (**termogênese induzida pela dieta**). Uma pequena parte desta é representada pelo custo energético da secreção das enzimas digestórias e do transporte ativo dos produtos da digestão; a maior parte resulta da síntese das reservas de glicogênio, triacilgliceróis e proteínas.

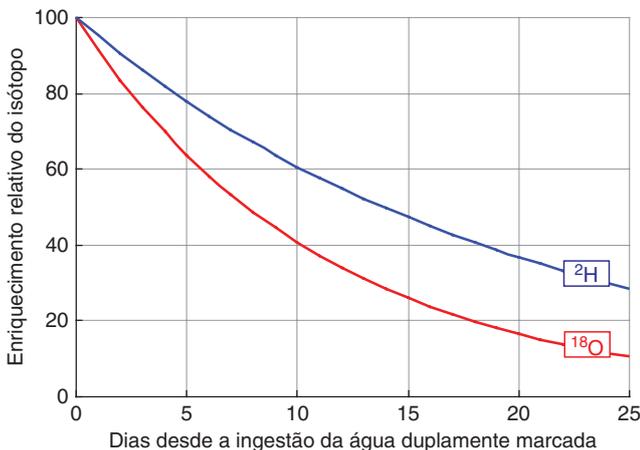


FIGURA 43-4 Água duplamente marcada com isótopos para avaliação do gasto energético.

Existem duas formas extremas de desnutrição

O **marasmo** pode ocorrer tanto em adultos quanto em crianças e é observado em grupos vulneráveis de todas as populações. O **kwashiorkor** acomete apenas crianças e só tem sido relatado nos países em desenvolvimento. A característica que distingue o kwashiorkor consiste na retenção de líquidos, resultando em edema, e na infiltração gordurosa do fígado. O marasmo é um estado de emagrecimento extremo; ele é resultado de um balanço energético negativo prolongado. Além do esgotamento das reservas de gordura corporal, há também perda da massa muscular e, à medida que a doença evolui, perda das proteínas do coração, do fígado e dos rins. Os aminoácidos liberados pelo catabolismo das proteínas teciduais são utilizados como fonte de combustível metabólico e como substratos para a gliconeogênese, visando manter o suprimento de glicose para o cérebro e para as hemácias (ver Capítulo 20). Em consequência da síntese reduzida de proteínas, ocorre comprometimento da resposta imune e maior risco de infecções. Observa-se comprometimento da proliferação celular na mucosa intestinal, resultando em diminuição da área de superfície da mucosa intestinal e redução na absorção desses nutrientes, quando disponíveis.

Os pacientes com câncer avançado e Aids apresentam desnutrição

Os pacientes com câncer avançado, com infecção pelo HIV e Aids e com várias outras doenças crônicas frequentemente apresentam desnutrição, uma condição denominada **caquexia**. Fisicamente, esses pacientes exibem todos os sinais de marasmo, porém há perda consideravelmente maior de proteínas corporais do que a que ocorre no jejum prolongado. A secreção de citocinas em resposta à infecção e ao câncer aumenta o catabolismo das proteínas teciduais pela via da ubiquitina-proteossomo dependente de ATP, com consequente aumento do gasto energético. Essa situação difere do marasmo, no qual a síntese de proteínas está reduzida, enquanto o catabolismo não é afetado. Os pacientes são **hipermetabólicos**, isto é, apresentam aumento considerável da TMB. Além da ativação da via da ubiquitina-proteossomo do catabolismo proteico, outros três fatores estão envolvidos. Muitos tumores metabolizam a glicose de modo anaeróbico, liberando lactato. Em seguida, o lactato é utilizado para a gliconeogênese hepática, um processo que consome energia, com custo efetivo de 6 ATPs para cada mol de glicose que entra no ciclo (ver Figura 19-4). Ocorre aumento da estimulação das **proteínas desacopladoras** mitocondriais pelas **citocinas**, resultando em termogênese e oxidação aumentada dos combustíveis metabólicos. Estabelece-se um **ciclo fútil de lipídeos**, visto que a lipase sensível ao hormônio é ativada por um proteoglicano secretado pelos tumores, resultando na liberação de ácidos graxos do tecido adiposo e reesterificação, com gasto de ATP, em triacilgliceróis no fígado, que são exportados sob a forma de VLDL.

O kwashiorkor acomete crianças subnutridas

Além da perda da massa muscular, da perda da mucosa intestinal e do comprometimento das respostas imunes observados

no marasmo, as crianças com **kwashiorkor** apresentam várias manifestações. A característica que o define é o **edema**, associado a uma concentração diminuída de proteínas plasmáticas. Além disso, ocorre hepatomegalia em consequência do acúmulo de gordura. No passado, acreditava-se que a causa do kwashiorkor fosse uma carência de proteínas, com ingestão mais ou menos apropriada de combustíveis; entretanto a análise das dietas das crianças acometidas mostra que não é esse o caso. A deficiência de proteínas leva a um atraso do crescimento, e as crianças com kwashiorkor apresentam menor ocorrência de retardo do crescimento do que aquelas com marasmo. Além disso, o edema começa a regredir no início do tratamento, quando a criança ainda está recebendo uma dieta hipoproteica.

Com muita frequência, o kwashiorkor é precipitado por infecção. Superposta à deficiência alimentar generalizada, existe provavelmente uma deficiência de nutrientes antioxidantes, como o zinco, o cobre, o caroteno e as vitaminas C e E. A **explosão respiratória** em resposta à infecção resulta na produção de **radicais livres** de oxigênio e halogênio como parte da ação citotóxica dos macrófagos estimulados. Esse estresse oxidativo adicional desencadeia o desenvolvimento do kwashiorkor.

NECESSIDADES DE PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

As necessidades de proteínas podem ser determinadas pela avaliação do balanço nitrogenado

O estado de nutrição proteica pode ser avaliado pela avaliação da ingestão da dieta e eliminação de compostos nitrogenados do corpo. Embora os ácidos nucleicos também contenham nitrogênio, as proteínas constituem a principal fonte dietética de nitrogênio, e a determinação da captação total de nitrogênio fornece uma boa estimativa da ingestão de proteínas ($\text{mg de N} \times 6,25 = \text{mg de proteína}$, visto que o N constitui 16% da maioria das proteínas). A eliminação do N do corpo ocorre principalmente sob a forma de ureia e de quantidades menores de outros compostos na urina, bem como nas proteínas não digeridas nas fezes; quantidades significativas também podem ser perdidas no suor e com a descamação da pele. A diferença entre o aporte e a eliminação de compostos nitrogenados é conhecida como **balanço nitrogenado**. Três estados podem ser definidos. No adulto saudável, o balanço nitrogenado está em **equilíbrio** quando a ingestão é igual à perda e não ocorre nenhuma mudança no conteúdo corporal total de proteínas. Nas crianças em idade de crescimento, nas mulheres grávidas ou nos indivíduos em recuperação de perda proteica, a excreção de compostos nitrogenados é menor do que a ingestão alimentar, e ocorre retenção efetiva de nitrogênio no corpo sob a forma de proteínas – **balanço nitrogenado positivo**. Em resposta a traumatismos ou infecções, ou se a ingestão de proteínas for inadequada para suprir as necessidades, ocorre perda efetiva do nitrogênio proteico do corpo – **balanço nitrogenado negativo**. Exceto durante a reposição das perdas proteicas, o equilíbrio do nitrogênio pode ser mantido em qualquer nível de ingestão proteica acima da

necessária. Uma elevada ingestão de proteína não leva a um balanço nitrogenado positivo; embora aumente a taxa de síntese proteica, ela também aumenta a taxa de catabolismo das proteínas, de modo que o equilíbrio do nitrogênio é mantido, apesar de uma maior taxa de renovação proteica. Tanto a síntese quanto o catabolismo das proteínas consomem ATP, e essa taxa aumentada de renovação proteica explica o aumento da termogênese induzida pela dieta observado em indivíduos que consomem uma dieta hiperproteica.

O catabolismo contínuo das proteínas teciduais cria a necessidade de proteínas da dieta, mesmo no adulto que não está em crescimento; embora alguns dos aminoácidos liberados possam ser reutilizados, grande parte é utilizada na gliconeogênese durante o jejum. Os estudos de balanço nitrogenado mostram que a necessidade diária média é de 0,66 g de proteína por kg de peso corporal (considerando uma ingestão de referência de 0,825 g de proteína/kg de peso corporal, permitindo as variações individuais); cerca de 55 g/dia ou 0,825% de aporte energético. Nos países desenvolvidos, a ingestão média de proteínas é da ordem de 80 a 100 g/dia, isto é, 14 a 15% do aporte energético. Como as crianças em crescimento estão aumentando o conteúdo de proteínas do corpo, elas têm uma necessidade proporcionalmente maior do que os adultos e devem estar em balanço nitrogenado positivo. Mesmo assim, a necessidade é relativamente pequena em comparação com a necessidade para a renovação proteica. Em alguns países, a ingestão de proteínas é insuficiente para suprir essas necessidades, resultando em atraso do crescimento. Há poucas evidências ou nenhuma de que atletas e fisiculturistas necessitem de grandes quantidades de proteína; o simples consumo de mais de uma dieta normal, fornecendo cerca de 14% da energia a partir das proteínas, assegurará uma quantidade de proteína além da suficiente para a síntese aumentada das proteínas musculares – a principal necessidade consiste em aumento do aporte energético para possibilitar a síntese aumentada de proteínas.

Ocorre perda de proteínas do corpo em resposta ao traumatismo e à infecção

Uma das reações metabólicas a traumatismos significativos, como queimadura, fratura de membro ou cirurgia, consiste em aumento do catabolismo efetivo das proteínas teciduais, em resposta às citocinas e aos hormônios glicocorticoides, bem como em decorrência da utilização excessiva de treonina e de cisteína na síntese de **proteínas de fase aguda**. Pode haver perda de até 6 a 7% das proteínas corporais totais no decorrer de 10 dias. O repouso prolongado ao leito resulta em perda considerável de proteínas, devido à atrofia dos músculos. Pode ocorrer aumento do catabolismo das proteínas em resposta às citocinas, e, sem o estímulo do exercício físico, essa proteína não é totalmente substituída. A proteína perdida é repostada durante a **convalescença**, quando se observa um balanço nitrogenado positivo. Também nessa situação, assim como no caso dos atletas, uma dieta normal é adequada para possibilitar essa síntese proteica de reposição.

A necessidade não é apenas de proteínas, mas também de aminoácidos específicos

Nem todas as proteínas são nutricionalmente equivalentes. Algumas são necessárias em maiores quantidades do que

outras para que o balanço nitrogenado se mantenha, visto que as diferentes proteínas contêm quantidades distintas dos vários aminoácidos. O organismo necessita de aminoácidos em proporções corretas para repor as proteínas teciduais. Os aminoácidos podem ser divididos em dois grupos: **essenciais** e **não essenciais**. Existem 9 aminoácidos essenciais ou indispensáveis, que não podem ser sintetizados pelo organismo: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Se um desses aminoácidos estiver ausente ou presente em quantidades inadequadas, independentemente da ingestão total de proteínas, não será possível manter o balanço nitrogenado, visto que não haverá quantidades suficientes do aminoácido específico para a síntese de proteínas.

Dois aminoácidos, a cisteína e a tirosina, podem ser sintetizados pelo organismo, porém apenas a partir de aminoácidos essenciais precursores – a cisteína a partir da metionina, e a tirosina a partir da fenilalanina. Desse modo, a ingestão dietética de cisteína e tirosina afeta as necessidades de metionina e fenilalanina. Os 11 aminoácidos restantes encontrados nas proteínas são classificados como não essenciais ou dispensáveis, visto que podem ser sintetizados, contanto que haja uma quantidade total suficiente de proteína na dieta. Se um desses aminoácidos for omitido da dieta, o balanço nitrogenado ainda poderá ser mantido. Entretanto, apenas 3 aminoácidos, a alanina, o aspartato e o glutamato, podem ser considerados verdadeiramente dispensáveis; eles são sintetizados por transaminação de intermediários metabólicos comuns (piruvato, oxalacetato e cetoglutarato, respectivamente). Os aminoácidos restantes são classificados como não essenciais; todavia, em algumas circunstâncias, a demanda pode superar a capacidade de síntese.

RESUMO

- A digestão envolve a hidrólise das moléculas dos alimentos em moléculas menores para absorção pelo epitélio gastrintestinal. Os polissacarídeos são absorvidos como monossacarídeos; os triacilgliceróis, como 2-monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol; e as proteínas, como aminoácidos e peptídeos pequenos.
- Os distúrbios da digestão surgem em consequência de: (1) deficiência de enzimas, como lactase e sacarase; (2) má absorção, por exemplo, de glicose e galactose, em decorrência de defeitos do cotransportador de Na⁺-glicose (SGLT 1); (3) absorção de polipeptídeos não hidrolisados, desencadeando respostas imunes, como na doença celíaca; e (4) precipitação do colesterol da bile na forma de cálculos biliares.
- Além da água, a dieta deve fornecer combustíveis metabólicos (carboidratos e gorduras) para o crescimento e para a atividade do organismo; proteínas para a síntese das proteínas teciduais; fibras para a formação de volume no conteúdo intestinal; minerais para o desempenho de funções metabólicas específicas (Capítulo 44); ácidos graxos poli-insaturados das famílias *n-3* e *n-6*; e vitaminas – compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades para outras funções essenciais (ver Capítulo 44).
- A desnutrição ocorre em duas formas extremas: o marasmo, observado em adultos e em crianças, e o kwashiorkor, que ocorre em crianças. Doença crônica também pode levar a uma subnutrição (caquexia) em consequência do hipermetabolismo.

- A nutrição excessiva leva a um aporte energético excessivo e está associada a doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, diabetes tipo 2, aterosclerose, câncer e hipertensão.
- A síntese de proteínas requer 20 aminoácidos diferentes, dos quais 9 são essenciais na dieta humana. A quantidade de proteína necessária pode ser determinada por estudos do balanço nitrogenado e é afetada pela quantidade de proteína – as quantidades de aminoácidos essenciais presentes nas proteínas da dieta em comparação com as quantidades necessárias para a síntese das proteínas teciduais.

REFERÊNCIAS

- Bender DA: *Introduction to Nutrition and Metabolism*, 5th ed. CRC Press, 2014.
- Bender DA, Bender AE: *Nutrition: A Reference Handbook*. Oxford University Press, 1997.
- Fuller MF, Garlick PJ: Human amino acid requirements: can the controversy be resolved? *Ann Rev Nutr* 1994;14:217.
- Geissler C, Powers HJ (editors): *Human Nutrition*, 12th ed. Elsevier, 2010.
- Gibney MJ, Lanham-New S, Cassidy A, et al: *Introduction to Human Nutrition, The Nutrition Society Textbook Series*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2009.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)*. National Academies Press, 2002.
- Pencharz PB, Ball RO: Different approaches to define individual amino acid requirements. *Ann Rev Nutr* 2003;23:101.
- Royal College of Physicians: *Nutrition and Patients – A Doctor's Responsibility*. Royal College of Physicians, 2002.
- Swallow DM: Genetic influences on carbohydrate digestion. *Nutr Res Rev* 2003;16:37.
- World Health Organization Technical Report Series 894: *Obesity – Preventing and Managing the Global Epidemic*. WHO, 2000.
- World Health Organization Technical Report Series 916: *Diet and the Prevention of Chronic Diseases*. WHO, 2003.
- World Health Organization Technical report Series 935: *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition*. WHO, 2007.

Micronutrientes: vitaminas e minerais

David A. Bender, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever como os valores de referência para ingestão de vitaminas e minerais são determinados e explicar por que os valores de referência publicados por diferentes autoridades nacionais e internacionais diferem entre si.
- Definir uma vitamina e descrever o metabolismo, as principais funções, as doenças por deficiência associadas a um aporte inadequado e a toxicidade causada pelo consumo excessivo de vitaminas.
- Explicar por que os sais minerais são necessários na dieta.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As vitaminas constituem um grupo de nutrientes orgânicos necessários em quantidades pequenas para uma variedade de funções bioquímicas, que geralmente não podem ser sintetizadas pelo organismo e que, portanto, devem ser fornecidas pela dieta.

As vitaminas lipossolúveis são compostos hidrofóbicos que podem ser absorvidos de modo eficiente apenas quando há absorção normal de gorduras. À semelhança de outros lipídeos, essas vitaminas são transportadas no sangue em lipoproteínas ou fixadas a proteínas de ligação específicas. As vitaminas lipossolúveis desempenham diversas funções – por exemplo, a vitamina A, visão e diferenciação celular; a vitamina D, metabolismo do cálcio e do fosfato, bem como diferenciação celular; a vitamina E, antioxidante; e a vitamina K, coagulação sanguínea. Assim como a insuficiência nutricional, os distúrbios que afetam a digestão e a absorção das vitaminas lipossolúveis, como dieta muito pobre em gordura, esteatorreia e distúrbios do sistema biliar, podem levar a síndromes de deficiência, incluindo cegueira noturna e xerofalmia (vitamina A); ao raquitismo em crianças pequenas e à osteomalacia nos adultos (vitamina D); a distúrbios neurológicos e à anemia hemolítica no recém-nascido (vitamina E); e à doença hemorrágica no recém-nascido (vitamina K). A ingestão excessiva das vitaminas A e D pode resultar em toxicidade. A vitamina A e os carotenos (muitos dos quais são precursores da vitamina A), bem como a vitamina E, são antioxidantes (ver Capítulo 45) e possivelmente desempenham um papel na prevenção da aterosclerose e do câncer, embora em excesso também possam atuar como pró-oxidantes nocivos.

As vitaminas hidrossolúveis são as vitaminas B e C, o ácido fólico, a biotina e o ácido pantotênico; eles funcionam principalmente como cofatores enzimáticos. O ácido fólico atua como carreador de unidades de 1 carbono. A deficiência de uma única vitamina do complexo B é rara, visto que as dietas

pobres estão mais frequentemente associadas a **estados de deficiência múltipla**. Todavia, existem síndromes específicas características da deficiência de cada vitamina, por exemplo, o beri beri (tiamina); a queilose, a glossite e a seborreia (riboflavina); a pelagra (niacina); a anemia megaloblástica, a acidúria metilmalônica e a anemia perniciosa (vitamina B₁₂); a anemia megaloblástica (ácido fólico); e o escorbuto (vitamina C).

Os elementos minerais inorgânicos que desempenham uma função no organismo precisam ser fornecidos pela dieta. Quando a ingestão é insuficiente, podem surgir sinais de deficiência, como anemia (ferro) e cretinismo e bócio (iodo). O consumo excessivo pode ser tóxico.

A determinação das necessidades de micronutrientes depende dos critérios de normalidade escolhidos

Para cada nutriente, existe uma faixa de consumo entre o que é claramente inadequado, resultando em **doença clínica por deficiência**, e aquilo que está muito acima da capacidade metabólica do organismo, podendo resultar em sinais de **toxicidade**. Entre esses dois extremos, existe um nível de consumo adequado para a saúde normal e para a manutenção da integridade metabólica. As necessidades são determinadas em estudos de depleção/repleção, nos quais os indivíduos são privados do nutriente até que ocorra uma alteração metabólica e, em seguida, recebem novamente o nutriente até que a alteração se normalize. Nem todos os indivíduos têm as mesmas necessidades de nutrientes, mesmo quando elas são calculadas com base nas dimensões corporais e no gasto energético. Existe uma faixa de necessidades individuais de até 25% em torno do valor médio. Por conseguinte, para avaliar a suficiência das dietas, é necessário estabelecer um nível de referência de ingestão alta o suficiente para assegurar que nenhum indivíduo desenvolva deficiência ou corra risco de toxicidade. Supondo que as

necessidades individuais estejam distribuídas em um padrão estatisticamente normal em torno da necessidade média observada, a faixa de $\pm 2 \times$ o desvio padrão (DP) em torno da média inclui, então, as necessidades de 95% da população. Portanto, os valores de referência ou recomendados são estabelecidos como a necessidade média + $2 \times$ DP e, desse modo, atendem ou ultrapassam as necessidades de 97,5% da população.

Os valores de referência e recomendados de ingestão de vitaminas e minerais publicados por diferentes autoridades nacionais e internacionais (Tabelas 44-1 a 44-4) diferem em virtude das diferentes interpretações dos dados disponíveis e da disponibilidade de novos dados experimentais em publicações mais recentes.

AS VITAMINAS REPRESENTAM UM GRUPO DISTINTO DE COMPOSTOS COM UMA VARIEDADE DE FUNÇÕES METABÓLICAS

Uma vitamina é definida como um composto orgânico necessário na dieta em quantidades pequenas para a manutenção da integridade metabólica normal. A deficiência provoca uma doença específica, que é curada ou evitada apenas pela reposição da vitamina na dieta (Tabela 44-5). Entretanto, a **vitamina D**, que é sintetizada na pele a partir do 7-desidrocolesterol sob exposição à luz solar, e a **niacina**, que pode ser produzida a partir do aminoácido essencial triptofano, não obedecem estritamente a essa definição.

VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS DOIS GRUPOS DE COMPOSTOS APRESENTAM ATIVIDADE DE VITAMINA A

Os retinoides compreendem o **retinol**, o **retinaldeído** e o **ácido retinoico** (vitamina A pré-formada, encontrada apenas em alimentos de origem animal); os carotenoides, encontrados nos vegetais, são constituídos de carotenos e compostos relacionados; muitos são precursores da vitamina A, já que podem ser clivados para produzir retinaldeído e, em seguida, retinol e ácido retinoico (Figura 44-1). Do ponto de vista quantitativo, os α , β e γ -carotenos e a criptoxantina constituem os carotenoides da provitamina A mais importantes. O β -caroteno e outros carotenoides da provitamina A são clivados na mucosa intestinal pela caroteno-dioxigenase, produzindo retinaldeído, que é reduzido a retinol, esterificado e secretado em quilomícrons, juntamente com ésteres formados a partir do retinol da dieta. A atividade intestinal da caroteno-dioxigenase é baixa, de modo que uma proporção relativamente grande do β -caroteno ingerido pode aparecer na circulação em sua forma inalterada. Existem duas isoenzimas da caroteno-dioxigenase. Uma catalisa a clivagem da ligação central do β -caroteno; a outra catalisa a clivagem assimétrica levando à formação de 8', 10' e 12'-apocarotenais, que são oxidados em ácido retinoico, mas que não podem ser utilizados como fontes de retinol ou retinaldeído.

Embora possa parecer que uma molécula de β -caroteno deva produzir duas moléculas de retinol, isso não ocorre na prática; 6 μg de β -caroteno equivalem a 1 μg de retinol pré-formado. A quantidade total de vitamina A nos alimentos é, portanto, expressa em microgramas de equivalentes de retinol = μg de vitamina A pré-formada + $1/6 \times \mu\text{g}$ β -caroteno + $1/12 \times \mu\text{g}$ de outros carotenoides de provitamina A. Antes que a vitamina A pura estivesse disponível para análise química, o conteúdo de vitamina A dos alimentos era determinado por ensaio biológico, e os resultados, expressos em unidades internacionais (UI). Uma UI = 0,3 μg de retinol; 1 μg de retinol = 3,33 UI. Apesar de obsoleta, a UI ainda é utilizada algumas vezes em rótulos de alimentos. Em 2001, o relatório dos Valores de Referência Alimentar dos Estados Unidos/Canadá introduziu o termo *equivalente de atividade de retinol* (RAE) para levar em consideração a absorção incompleta e o metabolismo dos carotenoides; 1 RAE = 1 μg de todo-*trans*-retinol, 12 μg de β -caroteno, 24 μg de α -caroteno ou β -criptoxantina. Nessa base, uma UI de atividade de vitamina A é igual a 3,6 μg de β -caroteno ou a 7,2 μg de outros carotenoides da provitamina A.

A vitamina A desempenha uma função na visão

Na retina, o retinaldeído atua como grupo prostético das proteínas opsinas fotossensíveis, formando a **rodopsina** (nos bastonetes) e a **iodopsina** (nos cones). Qualquer célula cone contém apenas um tipo de opsinas e é sensível a apenas uma cor. No epitélio pigmentar da retina, o todo-*trans*-retinol é isomerizado a 11-*cis*-retinol e oxidado a 11-*cis*-retinaldeído. Este reage com um resíduo de lisina da opsinas, formando a holoproteína rodopsina. Conforme mostrado na Figura 44-2, a absorção da luz pela rodopsina provoca isomerização do retinaldeído da forma 11-*cis* para todo-*trans*, bem como uma mudança conformacional da opsinas. Isso leva à liberação do retinaldeído da proteína e à geração de um impulso nervoso. A produção da forma inicial excitada da rodopsina, a batorrodopsina, ocorre em picossegundos de iluminação. Em seguida, há uma série de mudanças de conformação que levam à formação da metarrodopsina II, a qual desencadeia uma cascata de amplificação de nucleotídeo guanina e, em seguida, um impulso nervoso. A etapa final consiste na hidrólise para liberar o todo-*trans*-retinaldeído e a opsinas. O elemento essencial para iniciar o ciclo visual é a disponibilidade de 11-*cis*-retinaldeído, e, portanto, de vitamina A. Quando há deficiência, ocorre comprometimento do tempo necessário para a adaptação à escuridão, bem como da capacidade de enxergar em condições de pouca iluminação.

O ácido retinoico desempenha um papel na regulação da expressão gênica e na diferenciação tecidual

Uma importante função da vitamina A consiste no controle da diferenciação e da renovação celulares. Os ácidos todo-*trans*-retinoico e 9-*cis*-retinoico (Figura 44-1) regulam o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação tecidual, porém exercem distintas ações em tecidos diferentes. À semelhança dos hormônios tireoidianos e esteroides e da vitamina D, o ácido retinoico liga-se a receptores nucleares, que se ligam aos elementos de resposta do DNA e regulam a transcrição de genes específicos. Existem duas famílias de receptores retinoides nucleares: os receptores do ácido retinoico (RARs) ligam-se ao ácido todo-*trans*-retinoico

TABELA 44-1 Valores de referência de ingestão nutricional de vitaminas e minerais, Reino Unido, 1991

Idade	Vit. B ₁ (mg)	Vit. B ₂ (mg)	Niacina (mg)	Vit. B ₆ (mg)	Vit. B ₁₂ (µg)	Folato (µg)	Vit. C (mg)	Vit. A (µg)	Vit. D (µg)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (µg)	I (µg)
0-3 meses	0,2	0,4	3	0,2	0,3	50	25	350	8,5	525	400	55	1,7	4,0	0,2	10	50
4-6 meses	0,2	0,4	3	0,2	0,3	50	25	350	8,5	525	400	60	4,3	4,0	0,3	13	60
7-9 meses	0,2	0,4	4	0,3	0,4	50	25	350	7	525	400	75	7,8	5,0	0,3	10	60
10-12 meses	0,3	0,4	5	0,4	0,4	50	25	350	7	525	400	80	7,8	5,0	0,3	10	60
1-3 anos	0,5	0,6	8	0,7	0,5	70	30	400	7	350	270	85	6,9	5,0	0,4	15	70
4-6 anos	0,7	0,8	11	0,9	0,8	100	30	500	–	450	350	120	6,1	6,5	0,6	20	100
7-10 anos	0,7	1,0	12	1,0	1,0	150	30	500	–	550	450	200	8,7	7,0	0,7	30	110
Homens									–								
11-14 anos	0,9	1,2	15	1,2	1,2	200	35	600	–	1.000	775	280	11,3	9,0	0,8	45	130
15-18 anos	1,1	1,3	18	1,5	1,5	200	40	700	–	1.000	775	300	11,3	9,5	1,0	70	140
19-50 anos	1,0	1,3	17	1,4	1,5	200	40	700	–	700	550	300	8,7	9,5	1,2	75	140
+ de 50 anos	0,9	1,3	16	1,4	1,5	200	40	700	10	700	550	300	8,7	9,5	1,2	75	140
Mulheres																	
11-14 anos	0,7	1,1	12	1,0	1,2	200	35	600	–	800	625	280	14,8	9,0	0,8	45	130
15-18 anos	0,8	1,1	14	1,2	1,5	200	40	600	–	800	6.254	300	14,8	7,0	1,0	60	140
19-50 anos	0,8	1,1	13	1,2	1,5	200	40	600	–	700	550	270	14,8	7,0	1,2	60	140
+ de 50 anos	0,8	1,1	12	1,2	1,5	200	40	600	10	700	550	270	8,7	7,0	1,2	60	140
Gestantes	+ 0,1	+ 0,3	–	–	–	+ 100	+ 10	+ 100	10	–	–	–					
Em fase de lactação	+ 0,1	+ 0,5	+ 2	–	+ 0,5	+ 60	+ 30	+ 350	10	+ 550	+ 440	+ 50		+ 6,0	+ 0,3	+ 15	

Fonte: department of Health. *Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom*. HMSO, Londres, 1991.

TABELA 44-2 Valores de referência da ingestão de vitaminas e minerais na população, União Europeia, 1993

Idade	Vit. A (µg)	Vit. B ₁ (mg)	Vit. B ₂ (mg)	Niacina (mg)	Vit. B ₆ (mg)	Folato (µg)	Vit. B ₁₂ (µg)	Vit. C (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (µg)	I (µg)
6-12 meses	350	0,3	0,4	5	0,4	50	0,5	20	400	300	6	4	0,3	8	50
1-3 anos	400	0,5	0,8	9	0,7	100	0,7	25	400	300	4	4	0,4	10	70
4-6 anos	400	0,7	1,0	11	0,9	130	0,9	25	450	350	4	6	0,6	15	90
7-10 anos	500	0,8	1,2	13	1,1	150	1,0	30	550	450	6	7	0,7	25	100
Homens															
11-14 anos	600	1,0	1,4	15	1,3	180	1,3	35	1.000	775	10	9	0,8	35	120
15-17 anos	700	1,2	1,6	18	1,5	200	1,4	40	1.000	775	13	9	1,0	45	130
+ de 18 anos	700	1,1	1,6	18	1,5	200	1,4	45	700	550	9	9,5	1,1	55	130
Mulheres															
11-14 anos	600	0,9	1,2	14	1,1	180	1,3	35	800	625	18	9	0,8	35	120
15-17 anos	600	0,9	1,3	14	1,1	200	1,4	40	800	625	17	7	1,0	45	130
+ de 18 anos	600	0,9	1,3	14	1,1	200	1,4	45	700	550	16 ¹	7	1,1	55	130
Gestantes	700	1,0	1,6	14	1,3	400	1,6	55	700	550	¹	7	1,1	55	130
Em fase de lactação	950	1,1	1,7	16	1,4	350	1,9	70	1.200	950	16	12	1,4	70	160

Fonte: Scientific Committee for Food, *Nutrient and energy intakes for the European Community*, Commission of the European Communities, Luxemburgo, 1993.

¹Nenhuma informação fornecida sobre o ferro durante a gestação.

TABELA 44-3 Ingestão alimentar recomendada e ingestão aceitável de vitaminas e minerais, Estados Unidos e Canadá, 1997-2001

Idade	Vit. A (µg)	Vit. D (µg)	Vit. E (mg)	Vit. K (µg)	Vit. B ₁ (mg)	Vit. B ₂ (mg)	Niacina (mg)	Vit. B ₆ (mg)	Folato (µg)	Vit. B ₁₂ (µg)	Vit. C (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (µg)	I (µg)
0-6 meses	400	5	4	2,0	0,2	0,3	2	0,1	65	0,4	40	210	100	-	2,0	200	15	110
7-12 meses	500	5	5	2,5	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	50	270	275	11	3	220	20	130
1-3 anos	300	5	6	30	0,5	0,5	6	0,5	150	0,9	15	500	460	7	3	340	20	90
4-8 anos	400	5	7	55	0,5	0,6	8	0,6	200	1,2	25	800	500	10	5	440	30	90
Homens																		
9-13 anos	600	5	11	60	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	45	1.300	1.250	8	8	700	40	120
14-18 anos	900	5	15	75	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	75	1.300	1.250	11	11	890	55	150
19-30 anos	900	5	15	120	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	90	1.000	700	8	11	900	55	150
31-50 anos	900	5	15	120	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	90	1.000	700	8	11	900	55	150
51-70 anos	900	10	15	120	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	90	1.200	700	8	11	900	55	150
> 70 anos	900	15	15	120	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	90	1.200	700	8	11	900	55	150
Mulheres																		
9-13 anos	600	5	11	60	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	45	1.300	1.250	8	8	700	40	120
14-18 anos	700	5	15	75	1,0	1,0	14	1,2	400	2,4	65	1.300	1.250	15	9	890	55	150
19-30 anos	700	5	15	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	75	1.000	700	18	8	900	55	150
31-50 anos	700	5	15	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	75	1.000	700	18	8	900	55	150
51-70 anos	700	10	15	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	75	1.200	700	8	8	900	55	150
> 70 anos	700	15	15	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	75	1.200	700	8	8	900	55	150
Gestantes	770	5	15	90	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	85	1.000	700	27	11	1.000	60	220
Em fase de lactação	900	5	16	90	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	120	1.000	700	9	12	1.300	70	290

Os valores para lactentes com menos de 12 meses de idade representam ingestões adequadas, com base na ingestão média observada de lactentes alimentados principalmente com leite materno; para outros nutrientes além da vitamina K, os valores são RDA, com base na necessidade média estimada + 2 DP; os valores para a vitamina K representam ingestões adequadas, com base na ingestão média observada.

Fonte: Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride, 1997; dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folic acid, pantothenic acid, biotin and choline, 1998; dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids, 2000; dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc, 2001, National Academy Press, Washington DC.

TABELA 44-4 Ingestão recomendada de nutrientes para vitaminas, FAO, 2001

Idade	Vit. A (µg)	Vit. D (µg)	Vit. K (µg)	Vit. B ₁ (mg)	Vit. B ₂ (mg)	Niacina (mg)	Vit. B ₆ (mg)	Folato (µg)	Vit. B ₁₂ (µg)	Vit. C (mg)	Panto (mg)	Biotina (µg)
0-6 meses	375	5	5	0,2	0,3	2	0,1	80	0,4	25	1,7	5
7-12 meses	400	5	10	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	30	1,8	6
1-3 anos	400	5	15	0,5	0,5	6	0,5	160	0,9	30	2,0	8
4-6 anos	450	5	20	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2	30	3,0	12
7-9 anos	500	5	25	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	35	4,0	20
Homens												
10-18 anos	600	5	35-55	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	40	5,0	30
19-50 anos	600	5	65	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	45	5,0	30
50-65 anos	600	10	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30
> 65 anos	600	15	65	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	45	5,0	30
Mulheres												
10-18 anos	600	5	35-55	1,1	1,0	16	1,2	400	2,4	40	5,0	25
19-50 anos	600	5	55	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	45	5,0	30
50-65 anos	600	10	55	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30
> 65 anos	600	15	55	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	45	5,0	30
Gestantes	800	5	55	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	55	6,0	30
Em fase de lactação	850	5	55	1,5	1,6	17	2,0	500	2,8	70	7,0	35

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, *Human Vitamin and Mineral Requirements*, FAO, 2001.

TABELA 44-5 As vitaminas

Vitaminas		Funções	Doença por deficiência
Lipossolúveis			
A	Retinol, β-caroteno	Pigmentos visuais da retina; regulação da expressão dos genes e diferenciação celular (o β-caroteno é um antioxidante)	Cegueira noturna; xerofalmia; queratinização da pele
D	Calciferol	Manutenção do equilíbrio do cálcio; aumenta a absorção intestinal do Ca ²⁺ e mobiliza o mineral ósseo; regulação da expressão gênica e da diferenciação celular	Raquitismo, mineralização deficiente do osso; osteomalacia, desmineralização do osso
E	Tocoferóis, tocotrienóis	Antioxidante, particularmente nas membranas celulares; funções na sinalização celular	Extremamente rara – disfunção neurológica grave
K	Filoquinona: menaquinonas	Coenzima na formação do γ-carboxiglutamato em enzimas da coagulação sanguínea e da matriz óssea	Comprometimento da coagulação sanguínea, doença hemorrágica
Hidrossolúveis			
B ₁	Tiamina	Coenzima das piruvato e α-cetoglutarato desidrogenases e transcetolase; regula o canal de Cl ⁻ na condução nervosa	Lesão dos nervos periféricos (beri beri) ou lesão do sistema nervoso central (síndrome de Wernicke-Korsakoff)
B ₂	Riboflavina	Coenzima nas reações de oxidação e redução (FAD e FMN); grupamento prostético das flavoproteínas	Lesões das extremidades da boca, dos lábios e da língua, dermatite seborreica
Niacina	Ácido nicotínico, nicotinamida	Coenzima das reações de oxidação e redução; parte funcional do NAD e do NADP; desempenha um papel na regulação do cálcio intracelular e na sinalização celular	Pelagra – dermatite fotossensível, psicose depressiva
B ₆	Piridoxina, piridoxal, piridoxamina	Coenzima na transaminação e na descarboxilação dos aminoácidos e da glicogênio fosforilase; modula a ação dos hormônios esteroides	Distúrbios do metabolismo dos aminoácidos; convulsões
	Ácido fólico	Coenzima na transferência de fragmentos de 1 carbono	Anemia megaloblástica
B ₁₂	Cobalamina	Coenzima na transferência de 1 carbono e no metabolismo do ácido fólico	Anemia perniciosa, anemia megaloblástica com degeneração da medula espinal
	Ácido pantotênico	Parte funcional da CoA e da proteína carreadora de acila: síntese e metabolismo dos ácidos graxos	Lesão dos nervos periféricos (melalgia nutricional ou "síndrome de ardor nos pés")
H	Biotina	Coenzima nas reações de carboxilação da gliconeogênese e síntese dos ácidos graxos; desempenha um papel na regulação do ciclo celular	Comprometimento do metabolismo das gorduras e dos carboidratos; dermatite
C	Ácido ascórbico	Coenzima na hidroxilação da prolina e da lisina na síntese do colágeno; antioxidante; aumenta a absorção do ferro	Escorbuto – cicatrização deficiente de feridas, perda do cemento dentário, hemorragia subcutânea

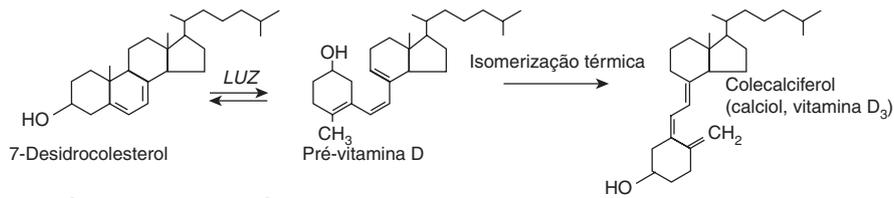


FIGURA 44-3 A síntese de vitamina D na pele.

é inadequada. A principal função da vitamina D consiste na regulação da absorção e da homeostasia do cálcio; a maior parte de suas ações é mediada por receptores nucleares, que regulam a expressão gênica. Além disso, desempenha um papel na regulação da proliferação e da diferenciação celulares. Há evidências de que uma ingestão consideravelmente acima dos valores necessários para manter a homeostasia do cálcio reduz o risco de resistência à insulina, obesidade e síndrome metabólica, bem como o risco de vários tipos de câncer. A deficiência, que provoca raquitismo em crianças e osteomalacia em adultos, continua sendo um problema nas latitudes setentrionais, onde a exposição à luz solar é inadequada.

A vitamina D é sintetizada na pele

O 7-desidrocolesterol (um intermediário na síntese do colesterol que se acumula na pele) sofre uma reação não enzimática com a exposição à luz ultravioleta, produzindo a pré-vitamina D (Figura 44-3). No decorrer de um período de várias horas, esse último composto sofre uma reação adicional para formar o colecalciferol, sendo absorvido para a corrente sanguínea. Nos climas temperados, a concentração plasmática de vitamina D apresenta-se mais elevada no fim do verão e mais baixa no fim do inverno. Acima de latitudes em torno de 40° ao norte ou ao sul, existe, no inverno, pouquíssima radiação ultravioleta com comprimento de onda apropriado.

A vitamina D é metabolizada em seu metabólito ativo, o calcitriol, no fígado e nos rins

O colecalciferol, que é sintetizado na pele ou obtido a partir dos alimentos, sofre duas hidroxilações para produzir o metabólito

ativo 1,25-di-hidroxivitamina D ou calcitriol (Figura 44-4). O ergocalciferol, proveniente de alimentos enriquecidos, sofre uma hidroxilação semelhante para produzir o ercalcitriol. No fígado, o colecalciferol é hidroxilado para formar o derivado 25-hidroxi, o calcidiol. Esse composto é liberado na circulação ligado a uma globulina de ligação da vitamina D, que constitui a principal forma de armazenamento da vitamina. Nos rins, o calcidiol sofre uma 1-hidroxilação, produzindo o metabólito ativo 1,25-di-hidroxivitamina D (calcitriol), ou uma 24-hidroxilação, gerando um metabólito provavelmente inativo, a 24,25-di-hidroxivitamina D (24-hidroxicalcidiol). Alguns tecidos, além daqueles envolvidos na homeostasia do cálcio, captam calcidiol da circulação e sintetizam calcitriol que atua no interior da célula na qual foi sintetizado.

O metabolismo da vitamina D é regulado pela homeostasia do cálcio e também a regula

A principal função da vitamina D consiste em controlar a homeostasia do cálcio e, por sua vez, o metabolismo dessa vitamina é regulado por fatores que respondem às concentrações plasmáticas de cálcio e de fosfato. O calcitriol atua para reduzir a sua própria síntese ao induzir a 24-hidroxilase e ao reprimir a 1-hidroxilase nos rins. A principal função da vitamina D consiste em manter a concentração plasmática de cálcio. O calcitriol exerce esse efeito de três maneiras: aumentando a absorção intestinal de cálcio; reduzindo a excreção de cálcio (por meio da estimulação de sua reabsorção nos túbulos renais distais); e mobilizando o mineral ósseo. Além disso, o calcitriol está envolvido na secreção de insulina, na síntese e na secreção do

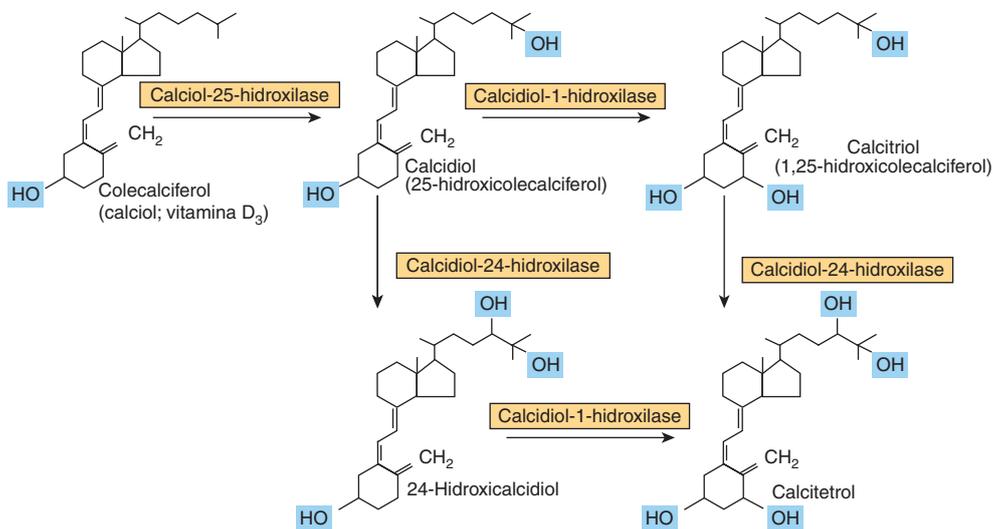


FIGURA 44-4 Metabolismo da vitamina D.

paratormônio e dos hormônios tireoidianos, na inibição da síntese de interleucinas pelos linfócitos T ativados e das imunoglobulinas pelos linfócitos B ativados, na diferenciação das células precursoras dos monócitos e na modulação da proliferação celular. Na maioria dessas ações, o calcitriol age como um hormônio esteroide, ligando-se aos receptores nucleares e aumentando a expressão de genes, embora também exerça efeitos rápidos sobre os transportadores de cálcio na mucosa intestinal.

Ingestões mais elevadas de vitamina D podem ser benéficas

Há evidências crescentes de que um nível maior de vitamina D confere proteção contra vários tipos de câncer, incluindo câncer de próstata e câncer colorretal, bem como contra o pré-diabetes e a síndrome metabólica. Os níveis desejáveis de ingestão podem ser consideravelmente mais altos do que os valores atuais de referência e certamente não poderão ser obtidos a partir de alimentos não enriquecidos. Embora a exposição aumentada à luz solar satisfaça a necessidade, ela está associada ao risco de desenvolvimento de câncer de pele.

A deficiência de vitamina D acomete crianças e adultos

Na deficiência causada pela deficiência de vitamina D, o **raquitismo**, os ossos de crianças apresentam mineralização deficiente devido à pouca absorção de cálcio. Ocorrem problemas semelhantes em consequência da deficiência observada durante o crescimento na puberdade. Nos adultos, a **osteomalacia** resulta da desmineralização do osso, particularmente em mulheres com pouca exposição à luz solar, sobretudo depois de várias gestações. Embora a vitamina D seja essencial para o tratamento e a prevenção da osteomalacia no idoso, há poucas evidências de que seja benéfica no tratamento da **osteoporose**.

A vitamina D em excesso é tóxica

Alguns lactentes são sensíveis a uma ingestão de vitamina D de apenas 50 µg/dia, resultando em concentrações plasmáticas elevadas de cálcio. Isso pode levar à contração dos vasos sanguíneos, hipertensão arterial e **calcínose** – a calcificação dos tecidos moles. Em pelo menos alguns casos, a hipercalemia resultante de baixa ingestão de vitamina D é devida a distúrbios genéticos da 24-hidroxilase, a enzima que leva à inativação da vitamina. Embora a vitamina D obtida em excesso a partir da dieta seja tóxica, a exposição excessiva à luz solar não leva à intoxicação por essa vitamina, devido à capacidade limitada de sintetizar o precursor, o 7-desidrocolesterol, e pelo fato de a exposição prolongada da pré-vitamina D à luz solar levar à formação de compostos inativos.

A VITAMINA E NÃO DESEMPENHA UMA FUNÇÃO METABÓLICA PRECISAMENTE DEFINIDA

Não foi definida uma função singular inequívoca para a vitamina E. Ela atua como **antioxidante** lipossolúvel nas membranas celulares, onde muitas de suas funções podem ser desempenhadas por antioxidantes sintéticos, e é importante na manutenção

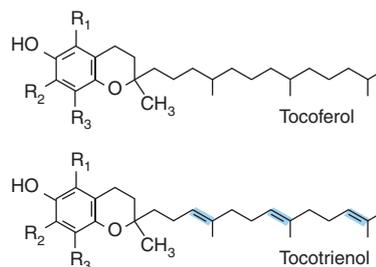


FIGURA 44-5 Vitâmeros de vitamina E. No α -tocoferol e no tocotrienol, o R_1 , o R_2 e o R_3 são grupos $-\text{CH}_3$. Nos β -vitâmeros, R_2 é H; nos γ -vitâmeros, R_1 é H; e nos δ -vitâmeros, tanto R_1 quanto R_2 são H.

da fluidez das membranas celulares. Além disso, desempenha um papel (relativamente pouco definido) na sinalização celular. A vitamina E é o descritor genérico para duas famílias de compostos: os **tocoferóis** e os **tocotrienóis** (Figura 44-5). Os diferentes vitâmeros têm potências biológicas distintas; o mais ativo é o D- α -tocoferol, e a ingestão de vitamina E é, muitas vezes, expressa em termos de miligramas de equivalentes de D- α -tocoferol. O DL- α -tocoferol sintético não apresenta a mesma potência biológica do composto natural.

A vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas

A principal função da vitamina E consiste em atuar como antioxidante que termina com reações em cadeia e sequestra os radicais livres nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas, reagindo com os radicais de peróxidos lipídicos formados pela peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (ver Capítulo 45). O radical tocoferoxila é relativamente não reativo e acaba formando compostos sem radicais. Em geral, o radical tocoferoxila é novamente reduzido a tocoferol por meio de sua reação com a vitamina C do plasma (Figura 44-6). Em seguida, o radical monodesidroascorbato estável resultante sofre reação enzimática ou não enzimática para produzir ascorbato e desidroascorbato, os quais não são radicais.

Deficiência de vitamina E

Nos animais de laboratório, a deficiência de vitamina E resulta em reabsorção dos fetos e em atrofia testicular. Nos seres humanos, a deficiência na dieta de vitamina E é desconhecida, embora pacientes com má absorção grave de gordura, fibrose cística e alguns tipos de doença hepática crônica tenham deficiência, uma vez que são incapazes de absorver a vitamina ou de transportá-la, apresentando lesão das membranas neurais e musculares. Os lactentes prematuros nascem com reservas inadequadas da vitamina. As membranas de hemácias são anormalmente frágeis devido à peroxidação dos lipídeos, resultando em anemia hemolítica.

A VITAMINA K É NECESSÁRIA PARA A SÍNTESE DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A vitamina K foi descoberta em consequência de pesquisas sobre a causa de um distúrbio hemorrágico, conhecido como

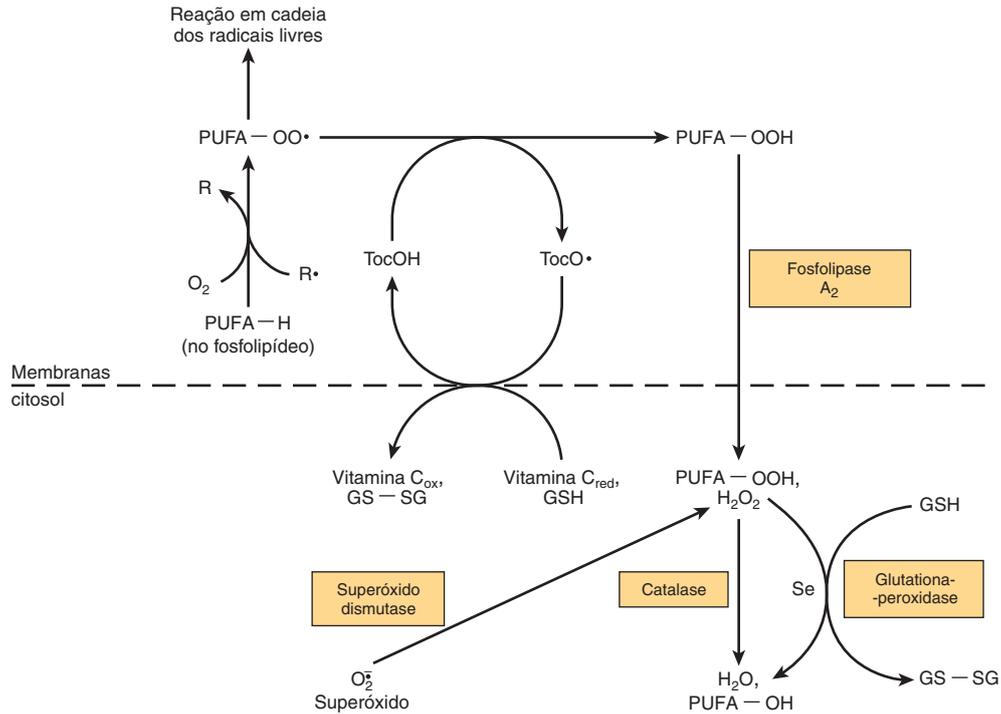


FIGURA 44-6 Interação entre antioxidantes na fase lipídica (membranas celulares) e na fase aquosa (citosol). (R•, radical livre; PUFA-OO•, radical peroxila do ácido graxo poli-insaturado no fosfolípido da membrana; PUFA-OOH, ácido graxo hidroxiperoxi poli-insaturado no fosfolípido da membrana, liberado no citosol como ácido graxo hidroxiperoxi poli-insaturado pela ação da fosfolipase A₂; PUFA-OH, ácido graxo hidroxi poli-insaturado; Toc-OH vitamina E [α -tocoferol]; TocO•, radical tocoferoxila; Se, selênio; GSH, glutatona reduzida; GS-SG, glutatona oxidada, que é reduzida a GSH após reação com o NADPH, catalisada pela glutatona-reductase; PUFA-H, ácido graxo poli-insaturado.)

doença hemorrágica (do trevo-doce) do gado e de aves alimentadas com dieta sem gorduras. O fator ausente da dieta das galinhas era a vitamina K, ao passo que a ração do gado continha **dicumarol**, um antagonista da vitamina. Os antagonistas da vitamina K são utilizados para reduzir a coagulação sanguínea em pacientes com risco de trombose; o mais amplamente usado é a **varfarina**.

Três compostos possuem a atividade biológica da vitamina K (Figura 44-7): a **filoquinona**, a fonte alimentar normal encontrada nos vegetais folhosos verdes; as **menaquinonas**, sintetizadas pelas bactérias intestinais, com cadeias laterais de comprimentos diferentes; e a **menadiona** e o diacetato de menadiol, compostos sintéticos que podem ser metabolizados em filoquinona. As menaquinonas são absorvidas em certo grau, porém ainda não foi esclarecido até que ponto elas são biologicamente ativas, visto que é possível induzir sinais de deficiência da vitamina K simplesmente pela ingestão de uma dieta deficiente em filoquinona, sem inibir a ação das bactérias intestinais.

A vitamina K é a coenzima necessária à carboxilação do glutamato na modificação pós-sintética das proteínas que se ligam ao cálcio

A vitamina K é o cofator para a carboxilação dos resíduos de glutamato na modificação pós-sintética das proteínas para formar o aminoácido incomum γ -carboxiglutamato (Gla) (Figura 44-8). Inicialmente, a hidroquinona da vitamina K

é oxidada a epóxido, que ativa um resíduo de glutamato no substrato proteico para formar um carbânion, o qual reage de modo não enzimático com o dióxido de carbono para formar

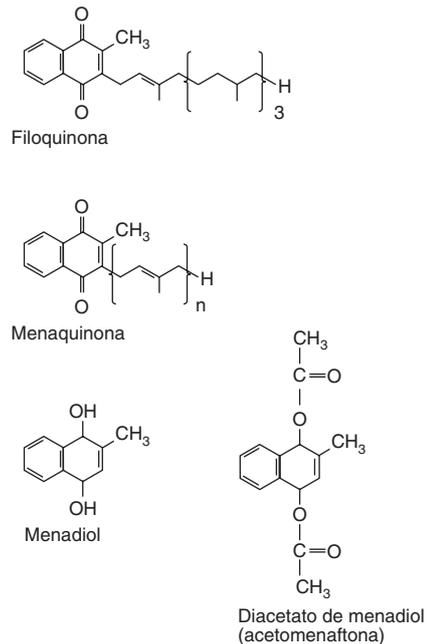


FIGURA 44-7 Vitâmeros da vitamina K. O menadiol (ou menadiona) e o diacetato de menadiol são compostos sintéticos que são convertidos em menaquinona no fígado.

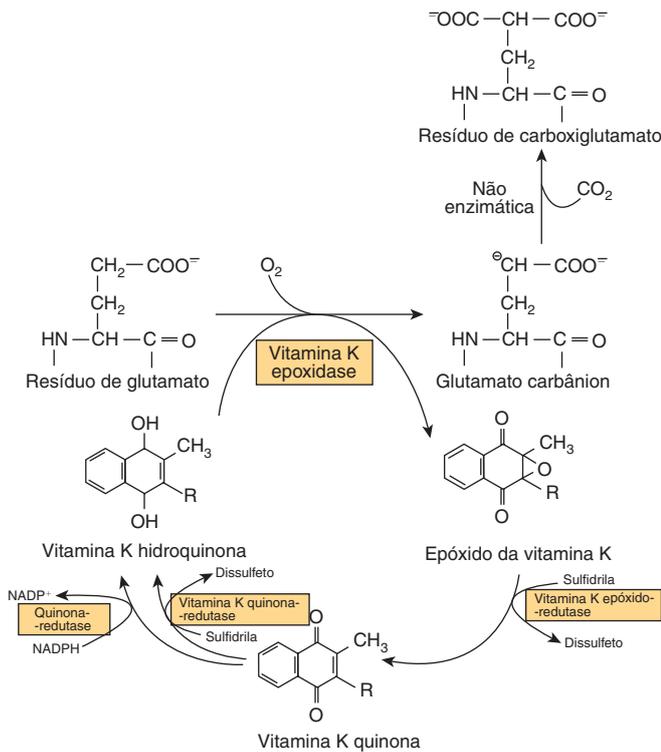


FIGURA 44-8 O papel da vitamina K na síntese do γ -carboxiglutamato.

o γ -carboxiglutamato. O epóxido da vitamina K é reduzido à quinona por uma redutase sensível à varfarina, e a quinona é reduzida à hidroquinona ativa pela mesma redutase sensível à varfarina ou por uma quinona-redutase insensível à varfarina. Na presença de varfarina, o epóxido da vitamina K não pode ser reduzido, mas se acumula e é excretado. Se a dieta fornecer uma quantidade suficiente de vitamina K (sob a forma de quinona), ela poderá ser reduzida à hidroquinona ativa pela enzima insensível à varfarina, e a carboxilação poderá prosseguir com a utilização estequiométrica da vitamina K e a excreção do epóxido. Uma alta dose de vitamina K funciona como antídoto para uma superdosagem de varfarina.

A protrombina e várias outras proteínas do sistema de coagulação sanguínea (fatores VII, IX e X, bem como proteínas C e S, Capítulo 52) contêm de 4 a 6 resíduos de γ -carboxiglutamato. O γ -carboxiglutamato quelos íons cálcio e, desse modo, possibilita a ligação das proteínas da coagulação sanguínea às membranas. Na deficiência de vitamina K ou na presença de varfarina, um precursor anormal da protrombina (pré-protrombina), que contém pouco ou nenhum γ -carboxiglutamato e é incapaz de quelar o cálcio, é liberado na circulação.

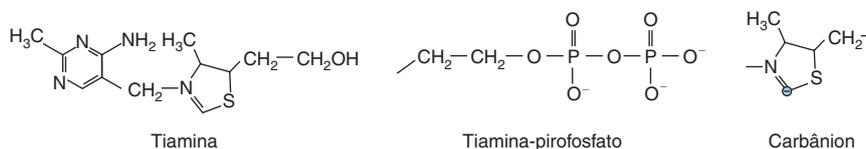


FIGURA 44-9 A tiamina, a tiamina-bifosfato e a forma carbânion.

A vitamina K também é importante na síntese das proteínas do osso e de outras proteínas que se ligam ao cálcio

Várias outras proteínas sofrem a mesma carboxilação dependente de vitamina K do glutamato a γ -carboxiglutamato, incluindo a osteocalcina e a proteína Gla da matriz do osso, a nefrocalcina nos rins e o produto do gene específico da parada de crescimento Gas6, que está envolvido tanto na regulação da diferenciação e do desenvolvimento do sistema nervoso quanto no controle da apoptose em outros tecidos. Todas essas proteínas que contêm γ -carboxiglutamato se ligam ao cálcio, o que provoca uma mudança de conformação, de modo que passam a integrar com fosfolípídeos da membrana. A liberação de osteocalcina na circulação fornece um indício do estado da vitamina D.

VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS

A VITAMINA B₁ (TIAMINA) DESEMPENHA UM PAPEL ESSENCIAL NO METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS

A **tiamina** desempenha um papel central no metabolismo energético e, em particular, no metabolismo dos carboidratos (Figura 44-9). A **tiamina-bifosfato** atua como coenzima para três complexos multienzimáticos que catalisam as reações de descarboxilação oxidativa: a piruvato-desidrogenase no metabolismo dos carboidratos (ver Capítulo 17); a α -cetoglutarato desidrogenase no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16); e a desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, envolvida no metabolismo da leucina, da isoleucina e da valina (ver Capítulo 29). Em todos os casos, a tiamina-bifosfato fornece um carbono reativo na porção tiazol que forma um carbânion que, em seguida, contribui para o grupo carbonil, como o piruvato. Em seguida, o composto de adição é descarboxilado, eliminando CO_2 . A tiamina bifosfato também é a coenzima da transcetolase na via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20).

A tiamina-trifosfato desempenha um papel na condução nervosa, visto que fosforila e, portanto, ativa um canal de cloreto na membrana das células nervosas.

A deficiência de tiamina afeta o sistema nervoso e o coração

A deficiência de tiamina pode resultar em três síndromes distintas: uma neurite periférica crônica, o **beribéri**, que pode ou não estar associado à **insuficiência cardíaca** e ao **edema**; o beribéri pernicioso agudo (fulminante) (beribéri *shoshin*), no qual predominam insuficiência cardíaca e anormalidades

metabólicas, sem neurite periférica; e a **encefalopatia de Wernicke** com **psicose de Korsakoff**, associada particularmente ao uso abusivo de álcool e de narcóticos. O papel da tiamina-bifosfato na piruvato-desidrogenase significa que, na deficiência, ocorre comprometimento da conversão do piruvato em acetil-CoA. Nos indivíduos que consomem uma dieta relativamente rica em carboidratos, isso resulta em aumento das concentrações plasmáticas de lactato e piruvato, podendo causar **acidose láctica** potencialmente fatal.

A referência de tiamina na dieta pode ser avaliada pela ativação da transcetolase eritrocitária

A ativação da apo-transcetolase (proteína enzimática) em lisados de hemácias pela adição de tiamina-bifosfato *in vitro* se tornou o índice aceito para a referência da tiamina na dieta.

A VITAMINA B₂ (RIBOFLAVINA) DESEMPENHA UM PAPEL CENTRAL NO METABOLISMO ENERGÉTICO

A riboflavina fornece as frações reativas das coenzimas **flavina mononucleotídeo (FMN)** e **flavina adenina dinucleotídeo (FAD)** (Figura 44-10). A FMN é formada pela fosforilação dependente de ATP da riboflavina; a FAD é sintetizada pela reação subsequente com ATP na qual a fração AMP é transferida para a FMN. As principais fontes alimentares de riboflavina são o leite e os laticínios. Além disso, em virtude de sua intensa cor amarela, a riboflavina é amplamente utilizada como aditivo alimentar.

As coenzimas de flavina são carreadoras de elétrons nas reações de oxirredução

As reações incluem a cadeia respiratória mitocondrial, enzimas essenciais na oxidação dos ácidos graxos e dos aminoácidos e o ciclo do ácido cítrico. A reoxidação da flavina reduzida em oxigenases e oxidases de função mista prossegue por meio da formação do radical flavina e da flavina hidroperóxido, com geração intermediária dos radicais superóxido e peridroxila e do peróxido de hidrogênio. Por esse motivo, as flavinas oxidases contribuem de modo significativo para o estresse oxidativo total do organismo (ver Capítulo 45).

A deficiência de riboflavina é amplamente disseminada, mas não é fatal

Embora a riboflavina esteja envolvida essencialmente no metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos, e a sua deficiência ocorra em muitos países, o distúrbio não é fatal, devido à sua conservação muito eficiente nos tecidos. A riboflavina liberada pelo catabolismo das enzimas é rapidamente incorporada em enzimas recém-sintetizadas. A deficiência de riboflavina caracteriza-se por queilose, descamação e inflamação da língua, bem como por dermatite seborreica. O estado nutricional da riboflavina é avaliado pela determinação da ativação da glutatona-redutase eritrocitária pela adição de FAD *in vitro*.

A NIACINA NÃO É ESTRITAMENTE UMA VITAMINA

A niacina foi descoberta como um nutriente durante estudos sobre a **pelagra**. Não se trata estritamente de uma vitamina, uma vez que ela pode ser sintetizada no organismo a partir do aminoácido essencial triptofano. Dois compostos, o **ácido nicotínico** e a **nicotinamida**, apresentam a atividade biológica da niacina; sua função metabólica é semelhante ao anel de nicotinamida das coenzimas **NAD** e **NADP** nas reações de oxidação/redução (Figura 44-11). Cerca de 60 mg de triptofano equivalem a 1 mg de niacina alimentar. O teor de niacina dos alimentos é expresso como

$$\text{mg de equivalentes de niacina} = \text{mg de niacina pré-formada} + 1/60 \times \text{mg de triptofano}$$

Como a parte da niacina nos cereais não está biologicamente disponível, esse valor deve ser descontado.

A NAD constitui a fonte de ADP-ribose

Além de sua função como coenzima, a NAD constitui a fonte de ADP-ribose para a **ribosilação-ADP** das proteínas e poli-ADP-ribosilação das nucleoproteínas envolvidas no **mecanismo de reparo do DNA**. A ADP-ribose cíclica e o ácido nicotínico adenina dinucleotídeo, formado a partir da NAD, atuam para aumentar o cálcio intracelular em resposta a neurotransmissores e hormônios.

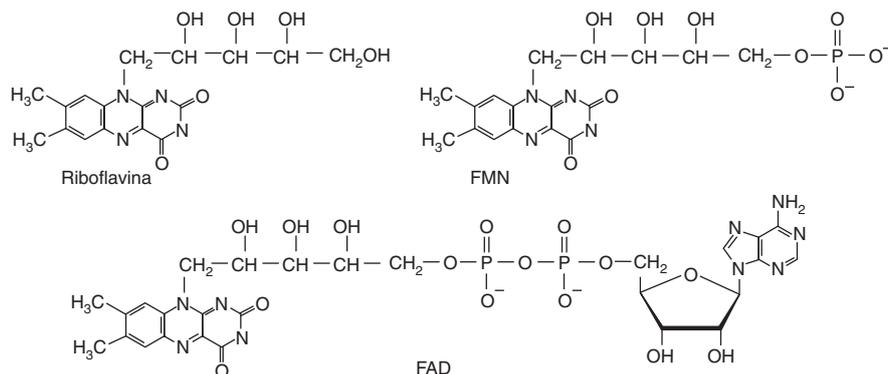


FIGURA 44-10 A riboflavina e as coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD).

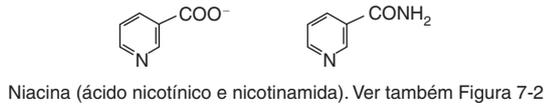


FIGURA 44-11 Niacina (ácido nicotínico e nicotinamida).

A pelagra é causada pela deficiência de triptofano e niacina

A pelagra caracteriza-se por dermatite fotossensível. À medida que a doença evolui, ocorre demência e, possivelmente, diarreia. A pelagra não tratada é fatal. Embora a etiologia nutricional da pelagra esteja bem estabelecida, e o triptofano ou a niacina evitem ou curem a doença, outros fatores podem ser importantes, incluindo a deficiência de riboflavina ou de vitamina B₆, sendo ambas necessárias para a síntese de nicotinamida a partir do triptofano. Na maioria dos surtos de pelagra, as mulheres são acometidas duas vezes mais do que os homens, provavelmente devido à inibição do metabolismo do triptofano pelos metabólitos dos estrogênios.

A pelagra pode ocorrer em consequência de doença, apesar de uma ingestão adequada de triptofano e niacina

Diversas doenças genéticas que resultam em distúrbios do metabolismo do triptofano estão associadas ao desenvolvimento da pelagra, a despeito de uma ingestão aparentemente adequada de triptofano e niacina. A **doença de Hartnup** é um distúrbio genético raro, caracterizado por um defeito no mecanismo de transporte do triptofano na membrana, resultando em perdas pronunciadas em consequência de má absorção intestinal e falha do mecanismo de reabsorção renal. Na **síndrome carcinóide**, ocorrem metástases de um tumor hepático primário de células enterocromafins, que sintetizam a 5-hidroxitriptamina. A produção excessiva de 5-hidroxitriptamina pode ser responsável por até 60% do metabolismo corporal do triptofano, causando pelagra devido ao desvio desse composto da síntese do NAD.

A niacina em excesso é tóxica

O ácido nicotínico tem sido utilizado no tratamento da hiperlipidemia, quando há necessidade de uma quantidade da ordem de 1 a 6 g/dia, causando dilatação dos vasos sanguíneos e rubor, juntamente com irritação cutânea. A ingestão de ácido nicotínico e de nicotinamida acima de 500 mg/dia também provoca lesão hepática.

A VITAMINA B₆ É IMPORTANTE NO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS E DO GLICOGÊNIO, BEM COMO NA AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES

Seis compostos apresentam atividade de vitamina B₆ (Figura 44-12): **piridoxina**, **piridoxal**, **piridoxamina** e seus fosfatos 5'. A coenzima ativa é o piridoxal-5'-fosfato. Cerca de 80% da vitamina B₆ total no organismo consistem em piridoxal-fosfato

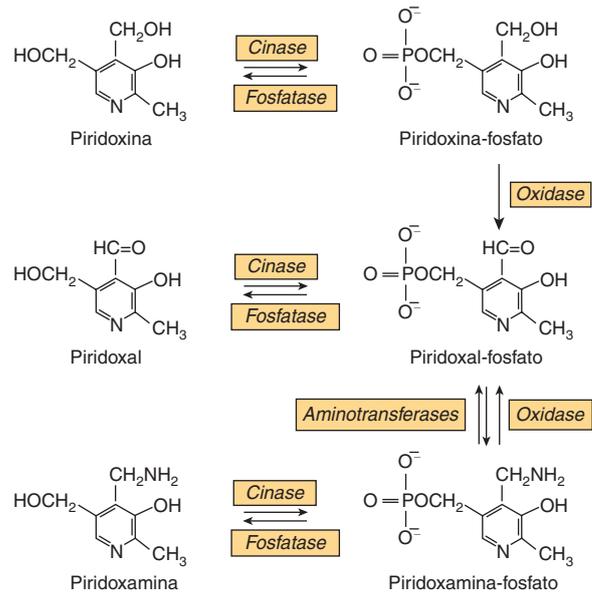


FIGURA 44-12 Interconversão dos vitâmeros da vitamina B₆.

nos músculos, principalmente em associação com a glicogênio fosforilase. Esse composto não está disponível em situações de deficiência, porém é liberado em estado de inanição, quando ocorre depleção das reservas de glicogênio, e torna-se disponível, particularmente para o fígado e os rins, a fim de atender às necessidades aumentadas para a gliconeogênese a partir dos aminoácidos.

A vitamina B₆ desempenha vários papéis no metabolismo

O piridoxal-fosfato é uma coenzima para muitas enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, particularmente na transaminação e na descarboxilação. Atua também como cofator da glicogênio-fosforilase, onde o grupo fosfato é cataliticamente importante. Além disso, a vitamina B₆ é importante na ação dos hormônios esteroides. O piridoxal-fosfato remove o complexo hormônio-receptor de sua ligação ao DNA, interrompendo a ação dos hormônios. Na deficiência de vitamina B₆, ocorre aumento da sensibilidade às ações de baixas concentrações de estrogênios, androgênios, cortisol e vitamina D.

A deficiência de vitamina B₆ é rara

Embora a doença clínica por deficiência seja rara, há evidências de que uma porcentagem significativa da população apresenta um estado limítrofe de vitamina B₆. A deficiência moderada resulta em anormalidades do metabolismo do triptofano e da metionina. O aumento da sensibilidade à ação dos hormônios esteroides pode ser importante no desenvolvimento do **câncer dependente de hormônio** de mama, útero e próstata, e o estado da vitamina B₆ pode influenciar o prognóstico.

A condição da vitamina B₆ é avaliada pelo ensaio das transaminases eritrocitárias

O método mais amplamente utilizado para avaliar a condição da vitamina B₆ consiste na ativação da transaminase

eritrocitária pela adição de piridoxal-fosfato *in vitro*, expresso como coeficiente de ativação. A avaliação de concentrações plasmáticas da vitamina também é utilizada.

A vitamina B₆ em excesso provoca neuropatia sensorial

O desenvolvimento de neuropatia sensorial foi descrito em pacientes em uso de 2 a 7 g de piridoxina por dia por uma variedade de motivos (há algumas evidências de que a piridoxina seja efetiva no tratamento da **síndrome pré-menstrual**). Foi observada alguma lesão residual após a retirada dessas altas doses; outros relatos sugerem que o consumo excessivo de 100 a 200 mg/dia esteja associado à lesão neurológica.

A VITAMINA B₁₂ É ENCONTRADA APENAS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

O termo “vitamina B₁₂” é utilizado como descritor genérico das **cobalaminas – corrinoídes** (compostos contendo cobalto que possuem o anel corrina) que apresentam atividade biológica da vitamina (**Figura 44-13**). Alguns corrinoídes que atuam como fatores de crescimento para microrganismos não apenas carecem da atividade de vitamina B₁₂, como também podem atuar como antimetabólitos da vitamina. Embora seja sintetizada exclusivamente pelos microrganismos, para fins práticos, a vitamina B₁₂ só é encontrada em alimentos de origem animal, visto que não existem fontes vegetais dessa vitamina. Isso significa que os vegetarianos estritos (veganos) correm risco de desenvolver deficiência de vitamina B₁₂.

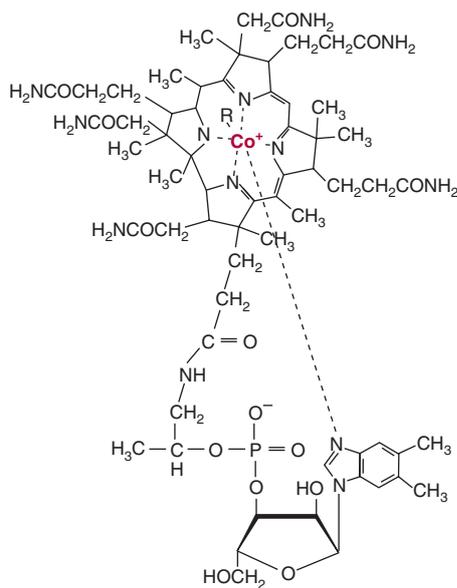


FIGURA 44-13 Vitamina B₁₂. Os quatro sítios de coordenação do átomo de cobalto central são quelados pelos átomos de nitrogênio do anel corrina e um pelo nitrogênio do dimetilbenzimidazol nucleotídeo. O sexto sítio de coordenação pode ser ocupado por: CN⁻ (cianocobalamina), OH⁻ (hidroxocobalamina), H₂O (aquocobalamina), —CH₃ (metilcobalamina) ou 5'-deoadenosina (adenosilcobalamina).

As pequenas quantidades da vitamina produzidas pelas bactérias na superfície das frutas podem ser adequadas para atender às necessidades, mas estão disponíveis preparações de vitamina B₁₂ produzidas por fermentação bacteriana.

A absorção de vitamina B₁₂ requer duas proteínas de ligação

A vitamina B₁₂ é absorvida ligada ao **fator intrínseco**, uma glicoproteína pequena secretada pelas células parietais da mucosa gástrica. O ácido gástrico e a pepsina liberam a vitamina de sua ligação à proteína no alimento e a tornam disponível para se ligar à **cobalofilina**, uma proteína de ligação secretada na saliva. No duodeno, a cobalofilina é hidrolisada, liberando a vitamina para a sua ligação ao fator intrínseco. Por esse motivo, a **insuficiência pancreática** pode constituir um fator no desenvolvimento da deficiência da vitamina B₁₂, resultando na excreção dessa vitamina ligada à cobalofilina. O fator intrínseco liga-se apenas aos vitâmeros ativos da vitamina B₁₂, e não a outros corrinoídes. A vitamina B₁₂ é absorvida no terço distal do íleo por meio de receptores que se ligam ao complexo fator intrínseco-vitamina B₁₂, mas não ao fator intrínseco livre ou à vitamina livre. Existe uma considerável circulação êntero-hepática da vitamina B₁₂, com excreção na bile, seguida pela reabsorção após ligação ao fator intrínseco no íleo.

Existem duas enzimas dependentes de vitamina B₁₂

A **metilmalonil-CoA-mutase** e a **metionina-sintase** (**Figura 44-14**) são enzimas dependentes da vitamina B₁₂. A metilmalonil-CoA é formada como intermediário no catabolismo da valina e por carboxilação do propionil-CoA que surge no catabolismo da isoleucina, do colesterol e, raramente, dos ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono, ou diretamente do propionato, um produto importante da fermentação microbiana no rúmen. A metilmalonil-CoA sofre um rearranjo dependente da vitamina B₁₂ e forma succinil-CoA, em uma reação catalisada pela metilmalonil-CoA-mutase (ver Figura 19-2). A atividade dessa enzima é acentuadamente reduzida na deficiência de vitamina B₁₂, levando ao acúmulo de metilmalonil-CoA e à excreção urinária de ácido metilmalônico, que proporciona um meio de avaliar o estado nutricional da vitamina B₁₂.

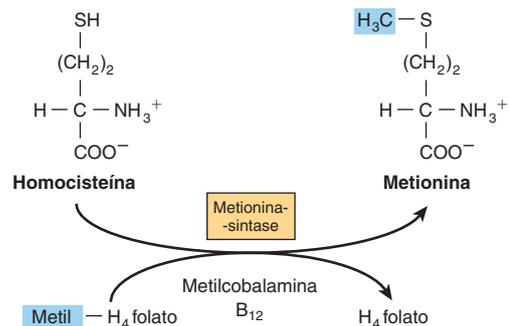


FIGURA 44-14 Homocisteína e o “sequestro do folato”. A deficiência de vitamina B₁₂ leva ao comprometimento da metionina-sintase, resultando em acúmulo de homocisteína e sequestro de folato na forma de metiltetra-hidrofolato.

A deficiência de vitamina B₁₂ causa anemia perniciosa

Ocorre anemia perniciosa quando a deficiência de vitamina B₁₂ afeta o metabolismo do ácido fólico, levando a uma deficiência funcional de folato que compromete a eritropoiese, produzindo precursores imaturos das hemácias que são liberadas na circulação (anemia megaloblástica). A causa mais comum da anemia perniciosa consiste na incapacidade de absorção da vitamina B₁₂, mais do que na sua deficiência dietética. Isso pode resultar da falha de secreção do fator intrínseco causada por doença autoimune, que acomete as células parietais, ou da produção de anticorpos contra o fator intrínseco. Na anemia perniciosa, ocorre degeneração irreversível da medula espinal, em consequência da falha de metilação de um resíduo de arginina na proteína básica da mielina. Esse fato resulta da deficiência de metionina no sistema nervoso central, e não da deficiência secundária de folato.

EXISTEM MÚLTIPLAS FORMAS DE FOLATO NA DIETA

A forma ativa de ácido fólico (pteroilglutamato) é o tetra-hidrofolato (Figura 44-15). Os folatos presentes nos alimentos podem ter até sete resíduos adicionais de glutamato unidos por ligações γ -peptídicas. Além disso, todos os folatos com substituintes de um carbono na Figura 44-15 também podem ser encontrados nos alimentos. O grau em que as diferentes formas de folato podem ser absorvidas varia, e a ingestão de folato é calculada na forma de equivalentes de folato da dieta – a soma dos folatos alimentares em $\mu\text{g} + 1,7 \times \mu\text{g}$ de ácido fólico (utilizado nos alimentos enriquecidos).

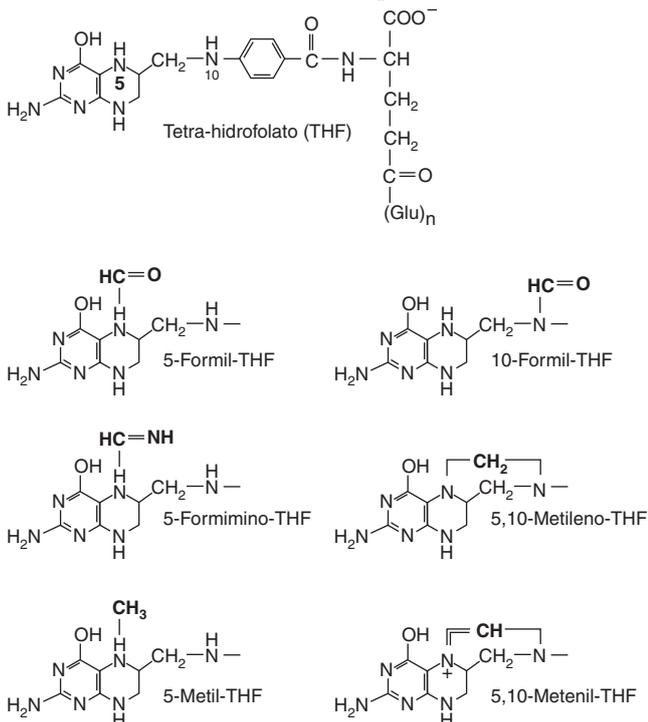


FIGURA 44-15 Ácido tetra-hidrofólico e os folatos com substituição de 1 carbono.

O tetra-hidrofolato é um carreador de unidades de um carbono

O tetra-hidrofolato pode transportar fragmentos de um carbono ligados ao N-5 (grupos formil, formimino ou metil), ao N-10 (formil) ou ao complexo N-5-N-10 (grupos metileno ou metenil). O 5-formil-tetra-hidrofolato é mais estável do que o folato e, portanto, é utilizado em fármacos (conhecido como **ácido folínico**), e o composto sintético (racêmico) (**leucovorina**). O principal ponto de entrada dos fragmentos de um carbono dentro dos folatos substituídos é o metileno-tetra-hidrofolato (Figura 44-16), que é formado pela reação da glicina, da serina e da colina com o tetra-hidrofolato. A serina constitui a fonte mais importante de folatos substituídos para as reações de biossíntese, e a atividade da serina hidroximetil-transferase é regulada pelo estado de substituição do folato e pela disponibilidade desse composto. A reação é reversível e, no fígado, pode formar serina a partir da glicina como substrato para a gliconeogênese. O metileno-tetra-hidrofolato, o metenil-tetra-hidrofolato e o 10-formil-tetra-hidrofolato são interconversíveis. Quando não há necessidade de folatos de um carbono, a oxidação do formil-tetra-hidrofolato para produzir dióxido de carbono fornece um mecanismo para a manutenção do reservatório de folato livre.

Os inibidores do metabolismo do folato fornecem fármacos para quimioterapia do câncer e agentes antibacterianos e antimaláricos

A metilação do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em monofosfato de timidina (TMP), que é catalisada pela timidilato-sintase, é essencial para a síntese do DNA. O fragmento de um carbono do metileno-tetra-hidrofolato é reduzido a um grupo metil com liberação do di-hidrofolato, o qual é, então, reduzido novamente a tetra-hidrofolato pela **di-hidrofolato-redutase**. A timidilato-sintase e a di-hidrofolato-redutase são particularmente ativas nos tecidos que apresentam uma elevada taxa de divisão celular. O **metotrexato**, um análogo do 10-metil-tetra-hidrofolato, inibe a di-hidrofolato-redutase e tem sido utilizado como agente antineoplásico. As di-hidrofolato-redutases de algumas bactérias e parasitos diferem da enzima humana; os inibidores dessas enzimas podem ser usados como fármacos antibacterianos (p. ex., **trimetoprima**) e antimaláricos (p. ex., **pirimetamina**).

A deficiência de vitamina B₁₂ causa deficiência funcional de folato – o “sequestro do folato”

Quando atua como doador de metil, a S-adenosilmetionina forma a homocisteína, que pode ser novamente metilada pelo metil-tetra-hidrofolato em uma reação catalisada pela metionina-sintase, uma enzima dependente de vitamina B₁₂ (Figura 44-14). Como a redução do metileno-tetra-hidrofolato em metil-tetra-hidrofolato é irreversível, e a principal fonte de tetra-hidrofolato para os tecidos é o metil-tetra-hidrofolato, o papel da metionina-sintase é vital e proporciona uma ligação entre as funções do folato e da vitamina B₁₂. O comprometimento da metionina-sintase na deficiência da vitamina B₁₂

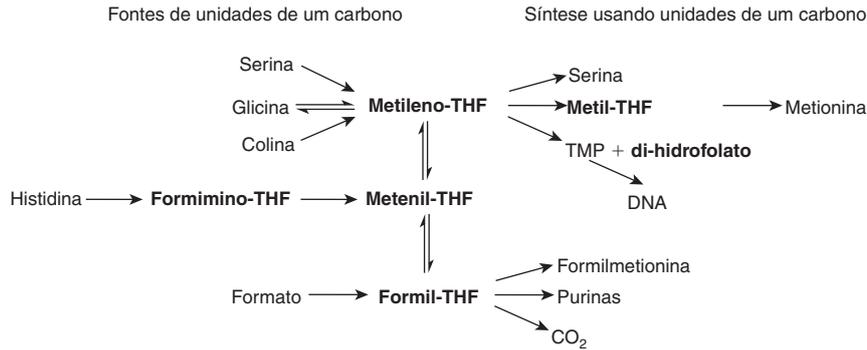


FIGURA 44-16 Fontes e utilização dos folatos com substituição de um carbono.

leva ao acúmulo do metil-tetra-hidrofolato que não pode ser usado – o “sequestro do folato”. Portanto, existe uma deficiência funcional de folato, secundária à deficiência de vitamina B₁₂.

A deficiência de folato provoca anemia megaloblástica

A deficiência do próprio ácido fólico ou a deficiência de vitamina B₁₂, que leva a uma deficiência funcional de ácido fólico, afeta as células em rápida divisão, visto que elas necessitam de grande quantidade de timidina para a síntese do DNA. Clinicamente, isso prejudica a medula óssea, levando ao desenvolvimento de anemia megaloblástica.

Os suplementos de ácido fólico reduzem o risco de defeitos do tubo neural e de hiper-homocisteinemia e podem reduzir a incidência de doença cardiovascular e de alguns cânceres

O uso de suplementos de 400 µg/dia de folato, quando iniciado antes da concepção, resulta em redução significativa na incidência de **espinha bífida** e de outros **defeitos do tubo neural**. Devido a esse fato, muitos países exigem que a farinha seja enriquecida com ácido fólico. O nível sanguíneo elevado de homocisteína constitui um fator de risco significativo para a **aterosclerose**, a **trombose** e a **hipertensão**. A condição resulta de um comprometimento na capacidade de sintetizar o metil-tetra-hidrofolato pela ação da metileno-tetra-hidrofolato-redutase, causando deficiência funcional de folato, com consequente incapacidade de metilar novamente a homocisteína em metionina. Os indivíduos com uma variante anormal da metileno-tetra-hidrofolato-redutase, que é observada em 5 a 10% da população, não desenvolvem hiper-homocisteinemia se realizarem uma ingestão relativamente alta de folato. Vários estudos clínicos de suplementos de folato (geralmente com vitaminas B₆ e B₁₂) controlados por placebo mostraram a redução esperada nos níveis plasmáticos de homocisteína, porém, à exceção da redução da incidência de acidente vascular encefálico, não foi observado nenhum efeito sobre a morte por doença cardiovascular.

Também há evidências de que a baixa ingestão de folato comprometa a metilação das ilhas de CpG no DNA, um fator envolvido no desenvolvimento do câncer colorretal e

de outros tipos de câncer. Vários estudos sugerem que a suplementação com ácido fólico ou o consumo de alimentos enriquecidos podem reduzir o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Entretanto, há algumas evidências de que os suplementos de folato aumentam a taxa de transformação dos pólipos colorretais pré-neoplásicos em câncer, de modo que os indivíduos portadores desses pólipos podem correr o risco de desenvolver câncer colorretal se realizarem uma alta ingestão de folato.

O enriquecimento dos alimentos com ácido fólico pode representar um risco para algumas pessoas

Os suplementos de ácido fólico corrigem a anemia megaloblástica da deficiência de vitamina B₁₂, mas não a lesão neural irreversível observada na deficiência de vitamina B₁₂. Uma alta ingestão de ácido fólico poderá, portanto, mascarar a deficiência de vitamina B₁₂. Esse fato representa um problema em especial nos indivíduos idosos, já que a gastrite atrófica que se desenvolve com o aumento da idade leva à perda da secreção de ácido gástrico e, portanto, à incapacidade de liberar vitamina B₁₂ das proteínas contidas na dieta. Portanto, embora muitos países tenham adotado o enriquecimento obrigatório da farinha com ácido fólico para prevenir defeitos no tubo neural, outros não o fizeram. Existe também um antagonismo entre o ácido fólico e alguns anticonvulsivantes utilizados no tratamento da epilepsia, e, conforme assinalado anteriormente, existem algumas evidências de que os suplementos de folato podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal entre indivíduos portadores de pólipos colorretais pré-neoplásicos.

A DEFICIÊNCIA ALIMENTAR DE BIOTINA NÃO É CONHECIDA

A **Figura 44-17** ilustra as estruturas da biotina, da biocitina e da carboxibiotina (o intermediário metabólico ativo). A biotina está amplamente distribuída em muitos alimentos sob a forma de biocitina (ε-aminobiotinil-lisina), que é liberada por proteólise. Ela é sintetizada pela microbiota intestinal em quantidades além das necessárias. A deficiência não é conhecida, exceto em pacientes mantidos por muitos meses com

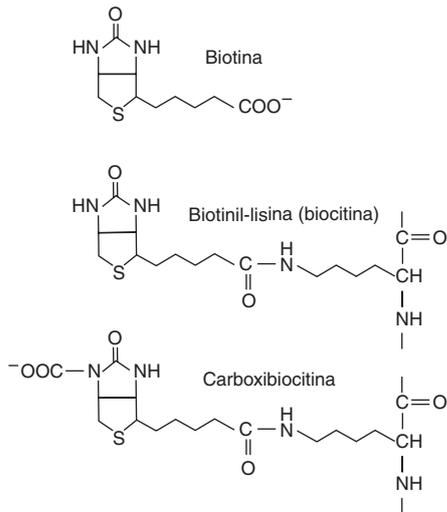


FIGURA 44-17 Biotina, biocitina e carboxibiotina.

nutrição parenteral total e em uma porcentagem muito pequena de indivíduos que ingerem quantidades anormalmente grandes de clara de ovo crua, que contém avidina, uma proteína que se liga à biotina, impossibilitando a sua absorção.

A biotina é uma coenzima das enzimas carboxilases

A biotina atua na transferência do dióxido de carbono em um pequeno número de reações: acetil-CoA-carboxilase (ver Figura 23-1), piruvato-carboxilase (Figura 19-1), propionil-CoA-carboxilase (ver Figura 19-2) e metilcrotonil-CoA-carboxilase. Uma holocarboxilase-sintase catalisa a transferência da biotina para um resíduo de lisina da apoenzima para formar o resíduo de biocitina da holoenzima. O intermediário reativo é a 1-*N*-carboxibiotina, formada a partir do bicarbonato em uma reação dependente de ATP. Em seguida, o grupo carboxi é transferido ao substrato para carboxilação.

A biotina também desempenha um papel na regulação do ciclo celular, atuando na biotilação das proteínas nucleares essenciais.

COMO PARTE DA CoA E DA ACP, O ÁCIDO PANTOTÊNICO ATUA COMO CARREADOR DE GRUPOS ACIL

O ácido pantotênico desempenha um papel central no metabolismo dos grupos acil, pois atua como porção funcional de pantoteína da coenzima A ou da proteína carreadora de acil (ACP) (Figura 44-18). A porção pantoteína é formada após a combinação do pantotenato com cisteína, que fornece o grupo prostético —SH da CoA e da ACP. A CoA participa nas reações do ciclo do ácido cítrico (ver Capítulo 16), na oxidação dos ácidos graxos (ver Capítulo 22), nas acetilações e na síntese do colesterol (ver Capítulo 26). A ACP participa da síntese dos ácidos graxos (ver Capítulo 23). A vitamina está amplamente distribuída em todos os tipos de alimentos, e a

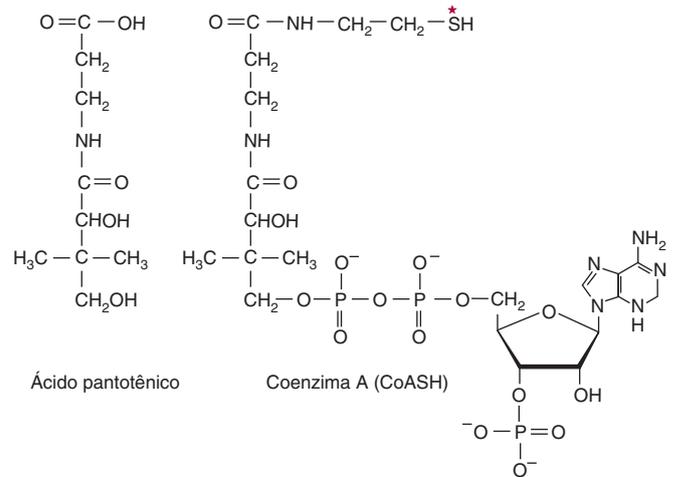


FIGURA 44-18 Ácido pantotênico e coenzima A. O asterisco mostra o sítio de acilação pelos ácidos graxos.

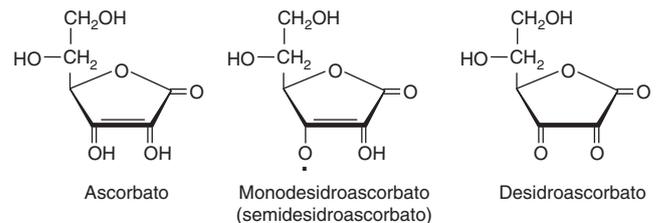


FIGURA 44-19 Vitamina C.

sua deficiência não foi definitivamente demonstrada nos seres humanos, exceto em estudos de depleção específica.

O ÁCIDO ASCÓRBICO É UMA VITAMINA APENAS PARA ALGUMAS ESPÉCIES

A vitamina C (Figura 44-19) é uma vitamina para os seres humanos e outros primatas, porquinhos-da-índia, morcegos, aves passeriformes e a maioria dos peixes e invertebrados; outros animais sintetizam-na como intermediário na via do ácido urônico do metabolismo da glicose (ver Figura 20-4). Nas espécies em que atua como vitamina, ocorre um bloqueio da via metabólica devido à ausência da gulonolactona-oxidase. Tanto o ácido ascórbico quanto o ácido desidroascórbico apresentam atividade de vitamina.

A vitamina C é a coenzima para dois grupos de hidroxilases

O ácido ascórbico desempenha funções específicas nas hidroxilases que contêm cobre e nas hidroxilases ligadas ao α -cetoglutarato que contêm ferro. O ácido ascórbico também aumenta a atividade de outras enzimas *in vitro*, embora seja uma ação redutora inespecífica. Além disso, ele exerce vários efeitos não enzimáticos em decorrência de sua ação como

agente redutor e sequestrador de radicais de oxigênio (ver Capítulo 45).

A **dopamina β-hidroxilase** é uma enzima que contém cobre e que está envolvida na síntese das catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) a partir da tirosina na medula da glândula suprarrenal e no sistema nervoso central. Durante a hidroxilação, o Cu^+ é oxidado a Cu^{2+} ; a redução de volta ao Cu^+ exige especificamente a presença de ascorbato, que é oxidado em monodesidroascorbato.

Diversos hormônios peptídicos apresentam uma amida carboxiterminal que deriva de um resíduo de glicina terminal. Essa glicina é hidroxilada no carbono α por uma enzima que contém cobre, a **peptidilglicina-hidroxilase**, que também exige a presença de ascorbato para a redução do Cu^{2+} .

Várias hidroxilases que contêm ferro e dependem da presença de ascorbato compartilham um mecanismo de reação comum, em que a hidroxilação do substrato está ligada à descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato. Muitas dessas enzimas estão envolvidas na modificação de proteínas precursoras. A **prolina** e a **lisina hidroxilases** são necessárias para a modificação pós-sintética do **pró-colágeno** a **colágeno**, e a prolina-hidroxilase também é necessária na formação da **osteocalcina** e do componente C1q do **complemento**. A aspartato β -hidroxilase é necessária para a modificação pós-sintética do precursor da proteína C, a protease dependente de vitamina K que hidrolisa o fator V ativado na cascata da coagulação sanguínea (ver Capítulo 52). A trimetil-lisina-hidroxilase e a γ -butiro-betaína-hidroxilase são necessárias para a síntese da carnitina.

A deficiência de vitamina C provoca escorbuto

Os sinais de deficiência de vitamina C consistem em alterações cutâneas, fragilidade dos capilares sanguíneos, deterioração das gengivas, queda dos dentes e fraturas ósseas, muitos dos quais podem ser atribuídos à síntese deficiente de colágeno.

A ingestão de quantidades maiores de vitamina C pode ser benéfica

Com uma ingestão acima de 100 mg/dia, a capacidade do organismo de metabolizar a vitamina C fica saturada, e qualquer quantidade adicional ingerida é excretada na urina. Todavia, além de suas outras funções, a vitamina C aumenta a absorção do ferro inorgânico, e essa propriedade depende de sua presença no intestino. Por esse motivo, a ingestão aumentada dessa vitamina pode ser benéfica. Há poucas evidências de que a vitamina C em altas doses possa evitar o resfriado comum, embora possa reduzir a duração e a gravidade dos sintomas.

OS MINERAIS SÃO NECESSÁRIOS TANTO PARA FUNÇÕES FISIOLÓGICAS QUANTO BIOQUÍMICAS

Muitos dos minerais essenciais (Tabela 44-6) estão amplamente distribuídos nos alimentos, e os indivíduos que consomem dietas balanceadas tendem, em sua maioria, a ingerir quantidades adequadas. As quantidades necessárias variam

TABELA 44-6 Classificação dos minerais de acordo com a sua função

Função	Mineral
Função estrutural	Cálcio, magnésio, fosfato
Envolvidos na função das membranas	Sódio, potássio
Atuam como grupamentos prostéticos em enzimas	Cobalto, cobre, ferro, molibdênio, selênio, zinco
Papel regulador ou papel na ação hormonal	Cálcio, cromo, iodo, magnésio, manganês, sódio, potássio
Sabidamente essenciais, porém com função desconhecida	Silício, vanádio, níquel, estanho
Exercem efeitos no organismo, porém a sua natureza essencial não está estabelecida	Fluoreto, lítio
Podem estar presentes em alimentos, e o seu excesso é reconhecidamente tóxico	Alumínio, arsênico, antimônio, boro, bromo, cádmio, cério, germânio, chumbo, mercúrio, prata, estrôncio

desde alguns gramas por dia, no caso do sódio e do cálcio, até miligramas por dia (p. ex., ferro e zinco), e microgramas por dia, no caso dos oligoelementos. Em geral, as deficiências de minerais ocorrem quando os alimentos provêm de uma região onde o solo pode estar deficiente em alguns minerais (p. ex., iodo e selênio, cujas deficiências ocorrem em muitas áreas do mundo). Quando os alimentos provêm de várias regiões, é menos provável que ocorra deficiência de minerais. A deficiência de ferro constitui um problema geral, visto que, se as perdas de ferro do organismo forem relativamente grandes (p. ex., em consequência da perda maciça de sangue menstrual ou de parasitos intestinais), será difícil assegurar uma ingestão adequada para repor as perdas. Entretanto, 10% da população (e mais em algumas áreas) encontram-se geneticamente em risco de sobrecarga de ferro, levando à formação de radicais livres como resultado de reações não enzimáticas de íons ferro em solução livre quando a capacidade de proteínas de ligação ao ferro foi excedida. Os alimentos cultivados em solos que contêm altos níveis de selênio causam efeitos tóxicos, e a ingestão excessiva de sódio provoca hipertensão em indivíduos suscetíveis.

RESUMO

- As vitaminas são nutrientes orgânicos que desempenham funções metabólicas essenciais, geralmente necessárias em pequenas quantidades na dieta, visto que elas não podem ser sintetizadas pelo organismo. As vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) são moléculas hidrofóbicas que exigem absorção normal das gorduras para a sua absorção e prevenção de deficiência.
- A vitamina A (retinol), presente nas carnes, e a provitamina (β -caroteno), encontrada nos vegetais, formam o retinaldeído, utilizado na visão, e o ácido retinoico, que atua na expressão gênica.
- A vitamina D é um pró-hormônio esteroide que produz o hormônio ativo calcitriol, que regula o metabolismo do cálcio e do fosfato; sua deficiência leva ao raquitismo e à osteomalacia. A vitamina D desempenha um papel no controle da diferenciação celular e na secreção de insulina.

- A vitamina E (tocoferol) é o antioxidante lipossolúvel mais importante do organismo, que atua na fase lipídica das membranas e protege contra os efeitos dos radicais livres.
- A vitamina K age como o cofator de uma carboxilase que atua sobre os resíduos de glutamato de proteínas precursoras dos fatores da coagulação, do osso e de outras proteínas, possibilitando-as quelar o cálcio.
- As vitaminas hidrossolúveis atuam como cofatores enzimáticos. A tiamina é um cofator na descarboxilação oxidativa dos α -cetoácidos e da transcetolase na via das pentoses-fosfato. A riboflavina e a niacina são cofatores importantes em reações de oxirredução, presentes nas enzimas flavoproteínas e no NAD e NADP, respectivamente.
- O ácido pantotênico está presente na coenzima A e na proteína carreadora de acila, que atuam como transportadores de grupos acila nas reações metabólicas.
- A vitamina B₆, sob a forma de piridoxal-fosfato, é a coenzima de várias enzimas do metabolismo dos aminoácidos, incluindo as transaminases, e da glicogênio fosforilase. A biotina é a coenzima de várias carboxilases.
- A vitamina B₁₂ e o folato fornecem resíduos de um carbono para a síntese do DNA e outras reações; a sua deficiência resulta em anemia megaloblástica.
- A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que mantém a vitamina E e outros cofatores metálicos no estado reduzido.
- Os elementos minerais inorgânicos que desempenham uma função no organismo precisam ser fornecidos pela dieta. Quando a ingestão é insuficiente, pode ocorrer deficiência, e a sua ingestão excessiva pode ser tóxica.

REFERÊNCIAS

- Bender DA: *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, 2nd ed. Cambridge University Press, 2003.
- Bender DA, Bender AE: *Nutrition: A Reference Handbook*. Oxford University Press, 1997.
- Department of Health: *Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom*. Her Majesty's Stationery Office, 1991.
- FAO/WHO: *Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation: Bangkok, Thailand*. Food and Nutrition Division of the United Nations Food and Agriculture Organization, 2000.
- Geissler C, Powers HJ: *Human Nutrition*, 12th ed. Elsevier, 2010.
- Gibney MJ, Lanham-New S, Cassidy A, et al: *Introduction to Human Nutrition, The Nutrition Society Textbook Series*, 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2009.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride*. National Academy Press, 1997.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Values for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline*. National Academy Press, 2000.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Values for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. National Academy Press, 2000.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. National Academy Press, 2001.
- Scientific Advisory Committee on Nutrition of the Food Standards Agency: *Folate and Disease Prevention*. The Stationery Office, 2006.

Radicais livres e nutrientes antioxidantes

David A. Bender, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever os danos causados pelos radicais livres ao DNA, aos lipídeos e às proteínas, bem como as doenças associadas aos danos por radicais livres.
- Descrever as principais fontes de radicais de oxigênio no organismo.
- Descrever os mecanismos e os fatores da dieta que protegem o organismo contra danos por radicais livres.
- Explicar como os antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes e o motivo por que os estudos clínicos de intervenção com nutrientes antioxidantes geralmente têm produzido resultados decepcionantes.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os radicais livres são produzidos no organismo em condições normais. Esses radicais livres provocam dano aos ácidos nucleicos, às proteínas, aos lipídeos da membrana celular e às lipoproteínas plasmáticas. A sua ação pode causar câncer, aterosclerose, doença arterial coronariana e doenças autoimunes. Os estudos epidemiológicos e laboratoriais realizados identificaram vários nutrientes antioxidantes protetores, como o selênio, as vitaminas C e E, o β -caroteno e outros carotenoides e uma variedade de compostos polifenólicos derivados de alimentos de origem vegetal. Muitas pessoas ingerem suplementos de um ou mais nutrientes antioxidantes. Entretanto, os estudos clínicos de intervenção demonstraram que os suplementos de antioxidantes têm pouco benefício, exceto entre indivíduos que inicialmente estavam deficientes, e muitos estudos clínicos sobre o β -caroteno e a vitamina E mostraram taxa aumentada de mortalidade entre indivíduos que fazem uso de suplementos.

As reações dos radicais livres consistem em reações em cadeia autoperpetuantes

Os radicais livres são espécies moleculares altamente reativas com um ou mais elétrons não pareados; eles persistem apenas por um período de tempo muito curto (da ordem de 10^{-9} a 10^{-12} segundos) antes de colidirem com outra molécula e subtrair ou doar um elétron para alcançar estabilidade. Desse modo, os radicais livres geram um novo radical a partir da molécula com a qual colidiram. A principal maneira como um radical livre pode ser sequestrado, interrompendo, assim, essa reação em cadeia, consiste na reação entre dois radicais, quando os elétrons não pareados podem ser emparelhados em uma das

moléculas originais. Entretanto, isso ocorre raramente, em virtude da meia-vida muito curta do radical e das concentrações muito baixas de radicais nos tecidos.

Os radicais que provocam maior dano nos sistemas biológicos são os radicais de oxigênio (algumas vezes denominados espécies reativas de oxigênio) – particularmente o superóxido, O_2^- , a hidroxil, OH , e a peridroxila, O_2H . O dano tecidual causado por radicais de oxigênio é frequentemente denominado dano oxidativo, e os fatores que protegem contra dano por radicais de oxigênio são conhecidos como antioxidantes.

Os radicais podem danificar o DNA, os lipídeos e as proteínas

As interações dos radicais com bases do DNA podem levar a alterações químicas que, se não forem corrigidas por reparo (ver Capítulo 35), poderão ser herdadas pelas células-filhas. O dano causado pelos radicais aos ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e nas lipoproteínas plasmáticas leva à formação de peróxidos lipídicos e, em seguida, de dialdeídos altamente reativos, que são capazes de modificar quimicamente as proteínas e as bases dos ácidos nucleicos. As proteínas também estão sujeitas a sofrer modificação química direta pela sua reação com radicais. O dano oxidativo dos resíduos de tirosina nas proteínas pode levar à formação de di-hidro-xifenilalanina, que pode sofrer reações não enzimáticas, com consequente formação de radicais de oxigênio (**Figura 45-1**).

A carga corporal total de radicais pode ser estimada pela medição dos produtos da peroxidação lipídica. Os peróxidos de lipídeos podem ser medidos pelo ensaio da oxidação do ferro em alaranjado de xilenol (FOX). Em condições ácidas, eles oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} , que forma um cromóforo com o alaranjado de xilenol. Os dialdeídos formados a partir dos peróxidos

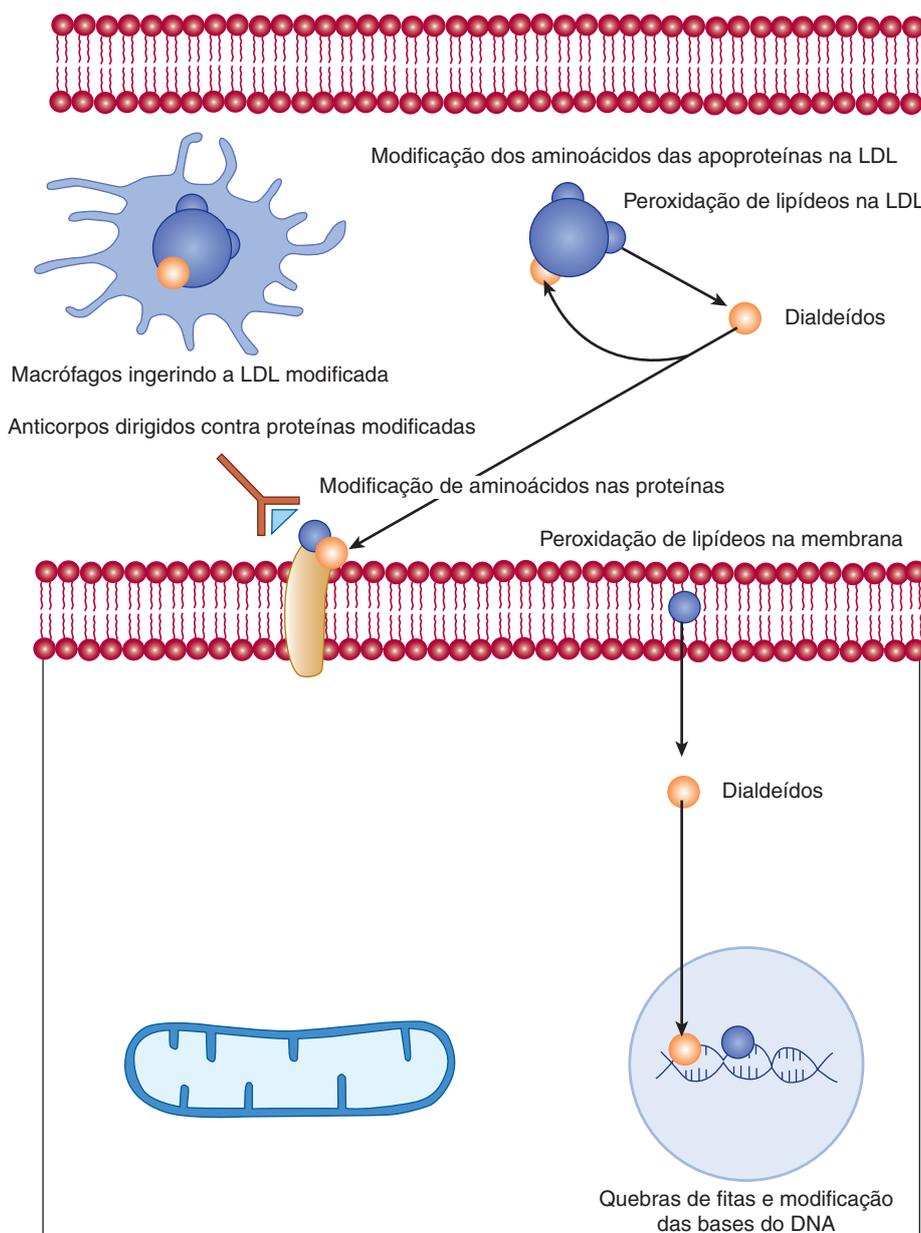


FIGURA 45-1 Lesão tecidual por radicais.

de lipídeos podem ser medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico, quando formam um aduto fluorescente vermelho – os resultados desse ensaio são geralmente expressos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARSs) totais. A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados n-6 leva à formação de pentano, ao passo que a dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 leva à produção de etano, e ambos podem ser medidos no ar expirado.

O dano por radicais pode causar mutações, câncer, doença autoimune e aterosclerose

O dano por radicais ao DNA nas células germinativas dos ovários e dos testículos pode levar à herança de mutações; nas células somáticas, pode levar ao desenvolvimento de câncer. Os dialdeídos formados em decorrência da peroxidação de

lipídeos induzida por radicais nas membranas celulares também podem modificar as bases do DNA.

A modificação química de aminoácidos em proteínas, seja pela ação direta dos radicais ou como resultado da reação com os produtos da peroxidação lipídica induzida por radicais, leva ao reconhecimento das proteínas como não próprias pelo sistema imune. Os anticorpos produzidos também apresentarão uma reação cruzada com as proteínas teciduais normais, desencadeando, assim, uma doença autoimune.

A modificação química das proteínas ou dos lipídeos nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do plasma leva à formação de LDLs anormais, que não são reconhecidas pelos receptores hepáticos de LDL, não sendo, portanto, depuradas pelo fígado. As LDLs modificadas são captadas por receptores *scavenger* dos macrófagos. Os macrófagos saturados de

lipídeos infiltram o endotélio dos vasos sanguíneos (particularmente quando já existe algum dano no endotélio) e são mortos pelo alto conteúdo de colesterol não esterificado que acumularam. Esse processo é observado no desenvolvimento das placas ateroscleróticas, que, em casos extremos, podem causar oclusão mais ou menos completa de um vaso sanguíneo.

Existem múltiplas fontes de radicais de oxigênio no corpo

A radiação ionizante (raios X e UV) pode causar hidrólise, levando à formação de radicais hidroxil. Os íons metálicos de transição, incluindo Cu^+ , Co^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{2+} , podem reagir de modo não enzimático com o oxigênio ou com o peróxido de hidrogênio, levando, mais uma vez, à formação de radicais hidroxil. O próprio óxido nítrico (um importante composto na sinalização celular, originalmente descrito como fator de relaxamento derivado do endotélio) é um radical e, mais importante que isso, pode reagir com superóxido para produzir

o peroxinitrito, que se decompõe para formar radicais hidroxil (**Figura 45-2**).

A explosão respiratória dos macrófagos ativados (ver Capítulo 53) consiste na utilização aumentada de glicose pela via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20) para reduzir o NADP^+ a NADPH , e na utilização aumentada de oxigênio para oxidar o NADPH , produzindo radicais de oxigênio (e halogênio) como agentes citotóxicos para destruir os microrganismos fagocitados. A oxidase da explosão respiratória (NADPH -oxidase) é uma flavoproteína que reduz o oxigênio a superóxido:



Os marcadores plasmáticos de dano dos lipídeos por radicais aumentam de modo considerável mesmo em resposta a uma infecção leve.

A oxidação das coenzimas de flavina reduzidas nas cadeias de transporte de elétrons mitocondrial (ver Capítulo 13) e microsomal prossegue por meio de uma série de etapas nas

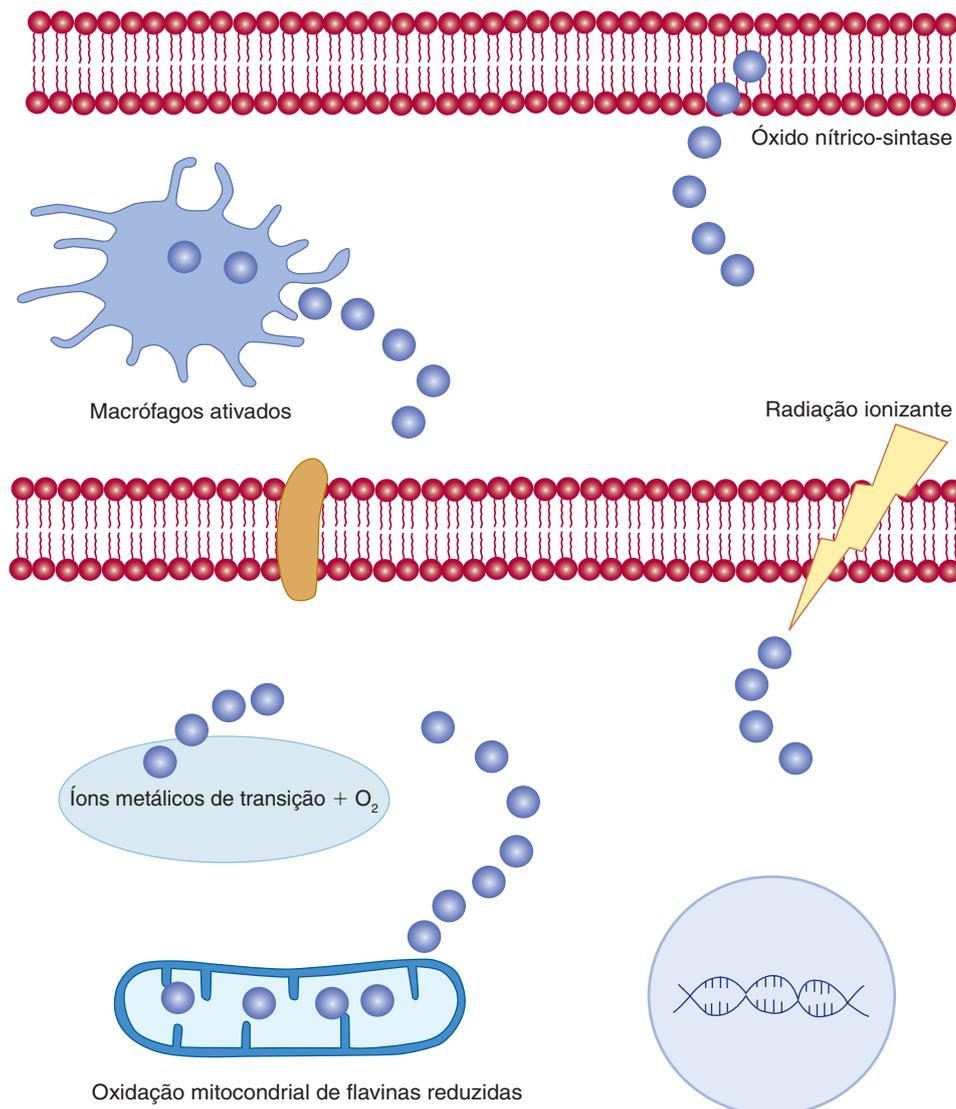


FIGURA 45-2 Fontes de radicais.

quais o radical de semiquinona da flavina é estabilizado pela proteína à qual está ligado, formando radicais de oxigênio como intermediários transitórios. Embora os produtos finais não sejam radicais, ocorre um considerável “vazamento” de radicais em virtude da natureza imprevisível dos radicais, e cerca de 3 a 5% do consumo diário de 30 moles de oxigênio por ser humano adulto são convertidos em oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, superóxido, peridroxila e radicais hidroxil, em vez de sofrer redução completa à água. Isso resulta na produção diária de cerca de 1,5 mol de espécies reativas de oxigênio.

Existem vários mecanismos de proteção contra o dano causado por radicais

Os íons metálicos que sofrem reação não enzimática para formar radicais de oxigênio não estão normalmente livres em solução, porém ligados às proteínas para as quais fornecem o grupamento prostético, ou a proteínas específicas de transporte e de armazenamento, de modo que não são reativos. O ferro está ligado à transferrina, à ferritina e à hemossiderina, o cobre, à ceruloplasmina, ao passo que outros íons metálicos estão ligados à metalotioneína. Essa ligação às proteínas de transporte que são muito grandes para serem filtradas nos rins também impede a perda dos íons metálicos na urina.

O superóxido é produzido acidentalmente e também como uma espécie reativa de oxigênio necessária para diversas reações catalisadas por enzimas. Uma família de superóxidos dismutases catalisa a reação entre o superóxido e os prótons, produzindo oxigênio e peróxido de hidrogênio:



Em seguida, o peróxido de hidrogênio é removido pela catalase e por várias peroxidases: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. As enzimas que produzem e que necessitam de superóxido estão, em sua maioria, contidas nos peroxissomos, juntamente com superóxido dismutase, catalase e peroxidases.

Os peróxidos que são formados devido a danos por radicais aos lipídeos das membranas e das lipoproteínas plasmáticas são reduzidos a hidroxi ácidos graxos pela glutatona-peroxidase, uma enzima dependente de selênio (o que explica a importância de um aporte adequado de selênio para maximizar a atividade antioxidante), e a glutatona oxidada é reduzida pela glutatona-redutase dependente de NADPH (ver Figura 20-3). Os peróxidos de lipídeos também são reduzidos a ácidos graxos por reação com a vitamina E, formando o radical tocoferoxil, que é relativamente estável, uma vez que o elétron não emparelhado pode se localizar em qualquer uma das três posições na molécula (Figura 45-3). O radical tocoferoxil persiste tempo suficiente

para sofrer redução novamente a tocoferol pela reação com a vitamina C na superfície da célula ou da lipoproteína (ver Figura 44-6). Então, o radical monodesidroascorbato resultante sofre uma redução enzimática de volta a ascorbato ou uma reação não enzimática de 2 moles de monodesidroascorbato para produzir 1 mol de ascorbato e 1 mol de desidroascorbato.

O ascorbato, o ácido úrico e uma variedade de polifenóis derivados de alimentos vegetais atuam como antioxidantes hidrossolúveis de sequestro de radicais, os quais formam radicais relativamente estáveis que persistem por período de tempo suficiente para sofrer reação em produtos não radicais. A ubiquinona e os carotenos atuam de modo semelhante como antioxidantes lipossolúveis de sequestro de radicais nas membranas e nas lipoproteínas plasmáticas.

O paradoxo do antioxidante – os antioxidantes também podem ser pró-oxidantes

Embora o ascorbato seja um antioxidante, reagindo com superóxido e hidroxil para produzir monodesidroascorbato e peróxido de hidrogênio ou água, ele também pode constituir uma fonte de radicais superóxido pela sua reação com oxigênio, assim como de radicais hidroxil pela sua reação com íons Cu^{2+} (Tabela 45-1). Todavia, essas ações pró-oxidantes necessitam de concentrações relativamente altas de ascorbato que não tendem a ser alcançadas nos tecidos, visto que, quando a concentração plasmática de ascorbato atinge cerca de 30 mmol/L, o limiar renal é alcançado, e, com uma ingestão de cerca de 100 a 120 mg/dia, a vitamina é excretada quantitativamente na urina de acordo com a sua ingestão.

Evidências epidemiológicas consideráveis sugerem que o caroteno possui a função de proteção contra o câncer de pulmão e outros tipos de câncer. Entretanto, dois estudos clínicos de intervenção de grande porte, realizados na década de 1990, demonstraram aumento da taxa de mortalidade por câncer de pulmão (e outros tipos de câncer) entre pessoas que tomavam suplementos de β -caroteno. O problema é que, apesar de o β -caroteno ser, com efeito, um antioxidante que sequestra radicais em condições de baixa pressão parcial de oxigênio, conforme observado na maioria dos tecidos, na presença de alta pressão parcial de oxigênio (como aquela encontrada nos pulmões) e, particularmente, em altas concentrações, o β -caroteno é um pró-oxidante autocatalítico, podendo, assim, causar dano por radicais a lipídeos e proteínas.

As evidências epidemiológicas também sugerem que a vitamina E protege contra a aterosclerose e a doença cardiovascular. Entretanto, uma metanálise de estudos clínicos de intervenção com vitamina E mostrou taxa aumentada de mortalidade entre pessoas que ingerem suplementos (em altas

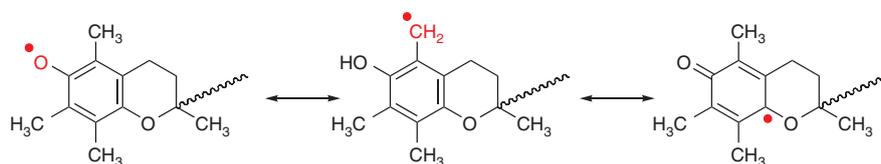


FIGURA 45-3 Deslocalização do elétron não emparelhado no radical tocoferoxil.

TABELA 45-1 Papéis antioxidantes e pró-oxidantes da vitamina C

Funções antioxidantes:
Ascorbato + $\cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{monodesidroascorbato}$; catalase e peroxidases catalisam a reação: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Ascorbato + $\cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{monodesidroascorbato}$
Funções pró-oxidantes:
Ascorbato + $\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{O}_2^- + \text{monodesidroascorbato}$
Ascorbato + $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+ + \text{monodesidroascorbato}$
$\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

doses). Todos esses estudos clínicos utilizaram o α -tocoferol, e é possível que os outros vitâmeros da vitamina E que estão presentes nos alimentos, mas não nos suplementos, sejam importantes. Quando a vitamina E é removida, as lipoproteínas plasmáticas formam menos hidroperóxidos de ésteres de colesterol em incubação *in vitro* com fontes de radicais peróxido em baixas concentrações do que quando a vitamina E está presente. O problema parece residir na ação da vitamina E como antioxidante, formando um radical estável que persiste por período de tempo suficiente para ser metabolizado em produtos não radicais. Isso significa que o radical também persiste por período de tempo suficiente para penetrar mais profundamente nas lipoproteínas, causando mais lesão por radicais, em vez de interagir com um antioxidante hidrossolúvel na superfície da lipoproteína.

O óxido nítrico e outros radicais são importantes na sinalização celular e, principalmente, na sinalização da morte celular programada (apoptose) de células que sofreram lesão do DNA ou outros tipos de danos. É provável que altas concentrações de antioxidantes, em vez de protegerem contra lesão tecidual, possam anular os radicais sinalizadores, permitindo, assim, a sobrevivência continuada de células danificadas, aumentando, e não reduzindo, o risco de desenvolvimento de câncer.

RESUMO

- Radicais livres são espécies moleculares altamente reativas com um elétron não emparelhado. Eles podem reagir e modificar proteínas, ácidos nucleicos e ácidos graxos das membranas celulares e das lipoproteínas plasmáticas.
- O dano causado por radicais nos lipídeos e nas proteínas das lipoproteínas plasmáticas constitui um fator no desenvolvimento da aterosclerose e da doença arterial coronariana; o dano dos ácidos nucleicos por radicais pode induzir mutações herdadas e câncer; o dano das proteínas por radicais pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes.
- Os radicais de oxigênio surgem em decorrência da exposição à radiação ionizante, de reações não enzimáticas de íons metálicos de transição, da explosão respiratória dos macrófagos ativados e da oxidação normal de coenzimas de flavina reduzida.
- A proteção contra o dano por radicais é proporcionada por enzimas que removem íons superóxido e peróxido de hidrogênio, pela redução enzimática de peróxidos de lipídeos ligados à oxidação da glutatona, pela reação não enzimática de peróxidos de lipídeos com vitamina E, e pela reação de radicais com de-

terminados compostos, como as vitaminas C e E, o caroteno, a ubiquinona, o ácido úrico e os polifenóis da dieta, que formam radicais relativamente estáveis que persistem por um período de tempo longo o suficiente para sofrer reação, formando produtos não radicais.

- Com exceção dos indivíduos que inicialmente são deficientes, os estudos clínicos de intervenção com vitamina E e β -caroteno mostraram, de modo geral, aumento da taxa de mortalidade entre os que tomam suplementos. O β -caroteno é antioxidante apenas em baixas concentrações de oxigênio; em concentrações mais altas de oxigênio, ele atua como pró-oxidante autocatalítico. A vitamina E forma um radical estável capaz de sofrer reação com antioxidantes hidrossolúveis ou penetrar mais profundamente nas lipoproteínas e nos tecidos, aumentando, assim, o dano por radicais.
- Os radicais são importantes na sinalização celular e, principalmente, na sinalização da apoptose de células que sofreram lesão do DNA. É provável que altas concentrações de antioxidantes, em vez de protegerem contra lesão tecidual, possam anular os radicais sinalizadores, permitindo, assim, a sobrevivência continuada de células danificadas, aumentando, e não reduzindo, o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

- Asplund K: Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Intern Med* 2002;251:372.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al: Mortality in randomised trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. *JAMA* 2007;297:842.
- Burton G, Ingold K: β -Carotene, an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984;224:569.
- Carr A, Frei B: Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999;13:1007.
- Cordero Z, Drogan D, Weikert C, et al: Vitamin E and risk of cardiovascular diseases: a review of epidemiologic and clinical trial studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010;50:420.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I: No evidence supports vitamin E indiscriminate supplementation. *Biofactors* 2009;35:469.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE: Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598.
- Imlay JA: Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Ann Rev Biochem* 2008;77:755.
- Imlay JA: Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol* 2003;57:395.
- Klaunig JE, Kamendulis LM: The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharm Tox* 2004;44:239.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, et al: Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:37.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al: Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150.
- Various authors: Symposium: antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention. *Amer J Clin Nutr* 1995;62(suppl 6):1299S.
- Various authors: Symposium proceedings: molecular mechanisms of protective effects of vitamin E in atherosclerosis. *J Nutr* 2001;131:366.
- Zeisel SH: Antioxidants suppress apoptosis. *J Nutr* 2004;134:3179S.

Glicoproteínas

David A. Bender, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar a importância das glicoproteínas na saúde e na doença.
- Descrever os principais açúcares encontrados nas glicoproteínas.
- Descrever as principais classes de glicoproteínas (*N*-ligadas, *O*-ligadas e GPI-ligadas).
- Descrever as principais características das vias de biossíntese e degradação de glicoproteínas.
- Explicar a importância dos produtos finais de glicação avançada como causa de lesão tecidual no diabetes melito.
- Explicar como muitos microrganismos, como o vírus *influenza*, fixam-se às superfícies das células por meio de cadeias de açúcar.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As **glicoproteínas** são proteínas que contêm cadeias de oligossacarídeos (glicanos) ligadas de forma covalente aos aminoácidos. Pelo menos metade de todas as proteínas eucarióticas apresentam açúcares ligados, de modo que a **glicosilação** (a ligação enzimática de açúcares) constitui a modificação pós-traducional mais frequente das proteínas. Muitas proteínas também sofrem glicosilação reversível com um único açúcar (*N*-acetilglicosamina) ligado a um resíduo de serina ou treonina que também representa um sítio para fosforilação reversível. Esse é um importante mecanismo de regulação metabólica. Também pode ocorrer a ligação não enzimática dos açúcares às proteínas, processo conhecido como **glicação**. Esse processo pode ter consequências patológicas graves (p. ex., no diabetes melito inadequadamente controlado).

As glicoproteínas constituem uma classe de **glicoconjugados** ou **carboidratos complexos** – termos equivalentes empregados para descrever moléculas que contêm uma ou mais cadeias de carboidratos ligadas de modo covalente às proteínas (para formar glicoproteínas ou proteoglicanos) ou aos lipídeos (para formar glicolipídeos). (Os **proteoglicanos** são discutidas no Capítulo 50, e os **glicolipídeos**, no Capítulo 21.) Quase todas as **proteínas plasmáticas humanas**, com a notável exceção da albumina, são glicoproteínas. Muitas **proteínas de membranas celulares** (ver Capítulo 40) apresentam quantidades substanciais de carboidratos, e muitas proteínas de membrana estão ancoradas à bicamada lipídica por uma cadeia de glicano. Algumas das **substâncias dos grupos sanguíneos** são glicoproteínas, ao passo que outras são glicosfingolipídeos. Muitos **hormônios** peptídicos são glicoproteínas. Um problema importante no câncer é a **metástase** (ver Capítulo 56),

e aumentam as evidências de que alterações nas estruturas de glicoproteínas e de outros glicoconjugados na superfície de células neoplásicas são importantes para a metástase.

AS GLICOPROTEÍNAS SÃO AMPLAMENTE DISTRIBUÍDAS E DESEMPENHAM VÁRIAS FUNÇÕES

As glicoproteínas ocorrem na maioria dos organismos, de bactérias a seres humanos. Muitos vírus também contêm glicoproteínas, algumas das quais desempenham papéis essenciais na fixação dos vírus às células hospedeiras (p. ex., HIV-1 e vírus *influenza* A). As glicoproteínas desempenham uma ampla faixa de funções (**Tabela 46-1**); o seu teor de carboidratos varia de 1 a mais de 85% do seu peso. As estruturas glicano das glicoproteínas modificam-se em resposta aos sinais envolvidos na diferenciação, na fisiologia normal e na transformação neoplásica das células. Isso resulta de diferentes padrões de expressão das glicosiltransferases sob diferentes condições. A **Tabela 46-2** enumera algumas das principais funções das cadeias de glicano das glicoproteínas.

AS CADEIAS OLIGOSSACARÍDICAS CODIFICAM INFORMAÇÕES BIOLÓGICAS

A informação biológica na sequência e nas ligações de açúcares em glicanos difere daquela do DNA, do RNA e das proteínas em um aspecto importante; ela representa uma informação

TABELA 46-1 Algumas funções desempenhadas pelas glicoproteínas

Funções	Glicoproteínas
Moléculas estruturais	Colágenos
Agentes lubrificantes e protetores	Mucinas
Moléculas de transporte	Transferrina, ceruloplasmina
Moléculas imunológicas	Imunoglobulinas, antígenos de histocompatibilidade
Hormônios	Gonadotrofina coriônica, hormônio estimulador da tireoide (TSH)
Enzimas	Várias (p. ex., fosfatase alcalina)
Sítios de reconhecimento-fixação celular	Diversas proteínas envolvidas em interações célula a célula (p. ex., espermatozoide-oócito), vírus-célula, bactéria-célula e hormônio-célula
Anticongelantes	Proteínas plasmáticas dos peixes de águas frias
Interações com carboidratos específicos	Lectinas, selectinas (lectinas de adesão celular), anticorpos
Receptores	Proteínas da superfície celular envolvidas na ação dos hormônios e dos fármacos
Regulação do dobramento de proteínas que são exportadas da célula	Calnexina, calreticulina
Regulação da diferenciação e do desenvolvimento	<i>Notch</i> e seus análogos, proteínas essenciais no desenvolvimento
Homeostasia (e trombose)	Glicoproteínas específicas na superfície das membranas das plaquetas

secundária, e não primária. O padrão de glicosilação de uma determinada proteína depende menos da sua sequência de aminoácidos do que do padrão de expressão de diversas **glicosiltransferases** da célula que estão envolvidas na síntese de glicoproteínas, da afinidade de diferentes glicosiltransferases pelos seus substratos glicídicos e da disponibilidade relativa

TABELA 46-2 Algumas funções das cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas

<ul style="list-style-type: none"> Alterar propriedades físico-químicas da proteína, como solubilidade, viscosidade, carga, conformação, desnaturação
<ul style="list-style-type: none"> Fornecer sítios de ligação para diversas moléculas, assim como bactérias, vírus e alguns parasitos
<ul style="list-style-type: none"> Fornecer sinais de reconhecimento na superfície celular
<ul style="list-style-type: none"> Proteger contra proteólise
<ul style="list-style-type: none"> Garantir o dobramento correto de proteínas que são exportadas da célula e marcar proteínas com dobramento inadequado para o transporte a partir do retículo endoplasmático de volta ao citoplasma para catabolismo
<ul style="list-style-type: none"> Proteger hormônios peptídicos e outras proteínas plasmáticas contra a depuração hepática
<ul style="list-style-type: none"> Permitir a ancoragem de proteínas extracelulares à membrana celular e de proteínas intracelulares ao interior de organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi
<ul style="list-style-type: none"> Direcionar a migração intracelular, a seleção e a secreção de proteínas
<ul style="list-style-type: none"> Influenciar o desenvolvimento embrionário e a diferenciação celular e tecidual
<ul style="list-style-type: none"> Podem afetar sítios de metástases selecionados por células neoplásicas

dos diferentes substratos glicídicos. Por esse motivo, existe uma **micro-heterogeneidade** de glicoproteínas. Nem todas as cadeias de glicanos de uma determinada glicoproteína são completas; algumas são truncadas.

A informação a partir dos açúcares é expressa por meio de interações entre os glicanos e as proteínas como as **lectinas** (ver a seguir) ou outras moléculas. Essas interações levam a alterações da atividade celular. Portanto, decifrar o chamado **código dos açúcares da vida** (um dos principais objetivos da **glicômica**) implica elucidar todas as interações nas quais participam os açúcares e as moléculas que contêm açúcares e as consequências dessas interações no comportamento celular.

DIVERSAS TÉCNICAS ESTÃO DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO, PURIFICAÇÃO, ANÁLISE ESTRUTURAL E SÍNTESE DE GLICOPROTEÍNAS

A **Tabela 46-3** fornece uma lista dos principais métodos empregados na detecção, na purificação e na análise estrutural das glicoproteínas. Os métodos convencionais utilizados para purificar as proteínas e as enzimas também são aplicáveis à purificação das glicoproteínas. Após a purificação de uma glicoproteína, o uso da **espectrometria de massas** e da **espectroscopia de alta resolução por ressonância magnética nuclear (RMN)** e dos **microensaios de glicanos** pode, muitas vezes, identificar as estruturas de suas cadeias de glicanos. A análise das glicoproteínas pode ser complicada pelo fato de

TABELA 46-3 Alguns métodos importantes utilizados para o estudo das glicoproteínas

Método	Uso
Reagente ácido periódico de Schiff	Detecta as glicoproteínas como bandas rosadas após a separação eletroforética
Incubação de células em cultura com um açúcar radioativo	Possibilita a detecção de glicoproteínas na forma de bandas radioativas após separação por eletroforese
Tratamento com endoglicosidase ou exoglicosidase ou fosfolipases apropriadas	As mudanças resultantes na migração eletroforética ajudam a diferenciar as proteínas com ligações de <i>N</i> -glicano, <i>O</i> -glicano ou GPI, bem como os <i>N</i> -glicanos complexos e ricos em manose
Cromatografia em coluna de sefarose-lectina	Purifica as glicoproteínas ou os glicopeptídeos que se ligam à lectina utilizada
Análise da composição após hidrólise ácida	Identifica os açúcares contidos na glicoproteína e sua estequiometria
Espectrometria de massas	Fornecer informações, como massa molecular, composição, sequência e, algumas vezes, ramificação de uma cadeia de glicano
Espectroscopia por RMN	Identifica açúcares específicos, suas sequências, ligações e a natureza anomérica das ligações glicosídicas
Análise da metilação (ligação)	Determina as ligações entre os açúcares
Microarranjos para detectar sequências de glicanos	Permitem a detecção de sequências específicas de glicanos com alto rendimento

elas frequentemente ocorrerem como **glicofornas** – proteínas com seqüências de aminoácidos idênticas, porém apresentando micro-heterogeneidade das cadeias de glicanos. A natureza precisa das ligações entre os açúcares das glicoproteínas é importante para a determinação de suas estruturas e funções.

Avanços na química sintética permitiram a síntese de glicanos complexos que podem ser testados quanto às suas atividades biológica e farmacológica. Além disso, foram desenvolvidos métodos que utilizam microrganismos como as leveduras para sintetizar e secretar glicoproteínas humanas de valor terapêutico (p. ex., eritropoietina) no meio circundante.

Diversas **glicosidases** são úteis na determinação da estrutura e da função de glicoproteínas. As **exoglicosidases**, como as **neuraminidases** e as **galactosidases**, catalisam a hidrólise do ácido *N*-acetilneuramínico terminal e da galactose. A sua função seguinte remove o ácido *N*-acetilneuramínico terminal e os penúltimos resíduos de galactose da maior parte das glicoproteínas. As **endoglicosidases** clivam as cadeias de oligossacarídeos internamente em resíduos específicos de *N*-acetilglicosamina próximos à cadeia polipeptídica. Elas são úteis na liberação de cadeias oligossacarídicas longas para análise estrutural.

OITO AÇÚCARES PREDOMINAM NAS GLICOPROTEÍNAS HUMANAS

Na natureza, são encontrados cerca de 200 monossacarídeos; entretanto apenas 8 têm ocorrência comum nas cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas (**Tabela 46-4** e Capítulo 15). O ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAc) é geralmente encontrado nas terminações das cadeias oligossacarídicas, ligado à galactose (Gal) subterminal ou a resíduos de *N*-acetilgalactosamina

(GalNAc). Os outros açúcares citados são geralmente encontrados em posições mais internas. O **sulfato** está frequentemente presente nas glicoproteínas, geralmente ligado à Gal, à GalNAc ou à GlcNAc.

OS AÇÚCARES NUCLEOTÍDEOS ATUAM COMO DOADORES DE AÇÚCAR EM MUITAS REAÇÕES DE BIOSÍNTESE

Na maioria das reações de biosíntese, não é o açúcar livre ou fosforilado que está envolvido, e sim o correspondente ligado ao **açúcar nucleotídico** (ver Figura 18-2). A Tabela 46-4 mostra os açúcares nucleotídicos envolvidos na biosíntese de glicoproteínas; alguns contêm UDP e outros contêm difosfato de guanosina (GDP) ou monofosfato de citidina (CMP).

Os açúcares nucleotídicos são sintetizados, em sua maioria, no citosol, geralmente a partir de reações que envolvem o nucleosídeo trifosfato correspondente. Os CMP-ácidos siálicos são formados no núcleo. A formação de uridina-difosfato-galactose (UDP-Gal) requer duas reações nos tecidos de mamíferos, catalisadas pela UDP-glicose-pirofosforilase e pela UDP-glicose-epimerase:

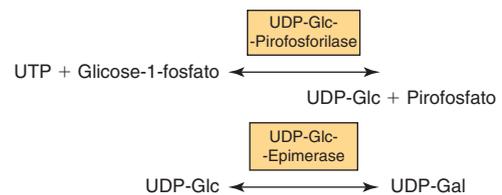
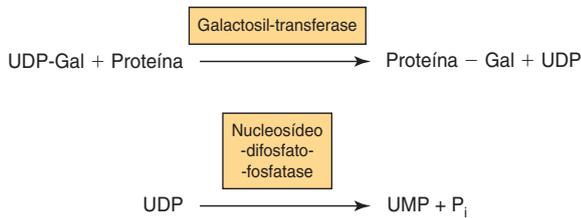


TABELA 46-4 Os principais açúcares encontrados nas glicoproteínas humanas^a

Açúcar	Tipo	Abreviatura	Açúcar nucleotídico	Comentários
Galactose	Hexose	Gal	UDP-Gal	Frequentemente encontrada em posição subterminal ao NeuAc nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas; também está presente no trissacarídeo central dos proteoglicanos
Glicose	Hexose	Glc	UDP-Glc	Presente durante a biosíntese das glicoproteínas <i>N</i> -ligadas, porém não é habitualmente encontrada nas glicoproteínas maduras; presente em alguns fatores da coagulação
Manose	Hexose	Man	GDP-Man	Açúcar comum nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas
Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	Ácido siálico (9 átomos de C)	NeuAc	CMP-NeuAc	É, frequentemente, o açúcar terminal nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas e <i>O</i> -ligadas; outros tipos de ácido siálico também são encontrados, porém o NeuAc é a principal espécie existente nos seres humanos; os grupos acetil também podem ocorrer em espécies como <i>O</i> -acetil e <i>N</i> -acetil
Fucose	Desoxi-hexose	Fuc	GDP-Fuc	Pode ter localização externa nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas e <i>O</i> -ligadas, ou uma localização interna, ligada ao resíduo de GlcNAc fixado a Asn na espécie <i>N</i> -ligada; pode ocorrer também internamente, ligada ao grupo OH da Ser (p. ex., no t-PA e em alguns fatores da coagulação)
<i>N</i> -Acetilgalactosamina	Amino-hexose	GalNAc	UDP-GalNAc	Presente nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas e <i>O</i> -ligadas
<i>N</i> -Acetilglicosamina	Amino-hexose	GlcNAc	UDP-GlcNAc	O açúcar fixado à cadeia polipeptídica por meio da Asn nas glicoproteínas <i>N</i> -ligadas; encontrada também em outros sítios nos oligossacarídeos dessas proteínas; muitas proteínas nucleares apresentam a GlcNAc fixada ao grupo OH da Ser ou da Tre como único açúcar
Xilose	Pentose	Xil	UDP-Xil	A Xil está ligada à OH da Ser em muitos proteoglicanos; a Xil, por sua vez, está ligada a dois resíduos Gal, formando uma ligação trissacarídica; a Xil ainda é encontrada no t-PA e em alguns fatores da coagulação

^aAs estruturas dos açúcares estão ilustradas no Capítulo 15.

Como muitas reações de glicosilação ocorrem dentro do lúmen do aparelho de Golgi, **sistemas carreadores** (permeases e transportadores) são necessários para o transporte dos açúcares nucleotídicos através da membrana de Golgi. Existem sistemas para o transporte de UDP-Gal, GDP-Man e CMP-NeuAc. Existem sistemas **antiporte**; o influxo de uma molécula de açúcar nucleotídico é equilibrado pelo efluxo de uma molécula do nucleotídeo correspondente (UMP, GMP ou CMP) formado a partir dos açúcares nucleotídicos. Esse mecanismo assegura uma concentração adequada de cada açúcar nucleotídeo dentro do aparelho de Golgi. O UMP é formado a partir de UDP-Gal em reações catalisadas pela galactosil-transferase e pela nucleosídeo difosfato-fosfatase:



O RECEPTOR DE ASSIALOGLICOPROTEÍNAS DOS MAMÍFEROS ESTÁ ENVOLVIDO NA DEPURAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DO PLASMA PELOS HEPATÓCITOS

Muitos hormônios peptídicos e a maioria das proteínas plasmáticas são glicoproteínas. O tratamento da proteína com neuraminidase remove a porção terminal do ácido *N*-acetilneuramínico, expondo o resíduo subterminal de galactose. Essa assialoglicoproteína é retirada da circulação muito mais rapidamente do que a glicoproteína intacta. As células hepáticas contêm um **receptor de assialoglicoproteína** que reconhece a fração galactose de muitas proteínas plasmáticas desialiladas, resultando em sua endocitose e catabolismo.

AS LECTINAS PODEM SER UTILIZADAS PARA PURIFICAR GLICOPROTEÍNAS E INVESTIGAR SUAS FUNÇÕES

As lectinas são **proteínas de ligação dos carboidratos** que aglutinam as células ou precipitam glicoconjugados; algumas dessas lectinas são glicoproteínas. As imunoglobulinas que reagem com açúcares não são consideradas lectinas. As lectinas contêm pelo menos dois sítios de ligação de açúcar; as proteínas com apenas um único sítio de ligação de açúcar não aglutinam as células nem precipitam glicoconjugados. A especificidade de uma lectina é, com frequência, definida pelos açúcares que são mais capazes de inibir a sua capacidade de provocar aglutinação ou precipitação. As lectinas foram descobertas pela primeira

TABELA 46-5 Algumas lectinas importantes

Lectinas	Exemplos ou comentários
Lectinas de legumes	Concanavalina A, lectina da ervilha
Aglutinina do germe de trigo	Amplamente utilizada em estudo de superfícies de células normais e células neoplásicas
Ricina	Glicoproteína citotóxica derivada das sementes da mamona
Toxinas bacterianas	Enterotoxina termolábil de <i>E. coli</i> e da toxina do cólera
Hemaglutinina do vírus <i>influenza</i>	Responsável pela fixação do vírus à célula hospedeira e pela fusão da membrana
Lectinas tipo C	Caracterizadas por um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) dependente de Ca^{2+} ; incluem o receptor de assialoglicoproteínas dos mamíferos, as selectinas e a proteína de ligação da manose
Lectinas tipo S	Lectinas animais de ligação ao β -galactosídeo com funções nas interações célula a célula e célula-matriz
Lectinas tipo P	Receptoras de manose-6-P
Lectinas tipo I	Membros da superfamília das imunoglobulinas; por exemplo, a sialoadesina mediando a adesão dos macrófagos a várias células

vez em vegetais e microrganismos, porém, hoje, são conhecidas muitas lectinas de origem animal. O receptor de assialoglicoproteínas dos mamíferos, descrito anteriormente, representa a lectina animal. As lectinas de origem vegetal foram chamadas anteriormente de **fito-hemaglutininas**, devido à sua capacidade de aglutinar hemácias por reagirem com as glicoproteínas da superfície celular. As lectinas não desnaturadas nos legumes malcozidos podem levar à descamação grave da mucosa intestinal por aglutinar as células da mucosa. A **Tabela 46-5** lista algumas lectinas importantes.

Numerosas lectinas foram purificadas e estão disponíveis comercialmente; a **Tabela 46-6** relaciona três lectinas vegetais que têm sido amplamente utilizadas em experimentos. Elas são usadas para purificar glicoproteínas, como ferramentas para investigar os perfis glicoproteicos das superfícies celulares e como reagentes para gerar células mutantes com deficiência de determinadas enzimas envolvidas na biossíntese das cadeias oligossacarídicas.

TABELA 46-6 Três lectinas vegetais e os açúcares com os quais elas interagem

Lectina	Abreviatura	Açúcares
Concanavalina A	ConA	Man e Glc
Lectina da soja		Gal e GalNAc
Aglutinina do germe de trigo	WGA	Glc e NeuAc

EXISTEM TRÊS CLASSES PRINCIPAIS DE GLICOPROTEÍNAS

As glicoproteínas podem ser divididas em três grupos principais, com base na natureza da ligação entre o polipeptídeo e as cadeias oligossacarídicas (Figura 46-1); existem outras classes menores de glicoproteínas:

1. Aquelas contendo uma **ligação O-glicosídica** (O-ligadas), envolvendo a cadeia lateral hidroxil de serina ou treonina (e, às vezes, também tirosina) e um açúcar como a *N*-acetilgalactosamina (GalNAc-Ser[Tre]).
2. Aquelas contendo uma **ligação N-glicosídica** (N-ligadas), envolvendo o nitrogênio amida da asparagina e a *N*-acetilglicosamina (GlcNAc-Asn).
3. Aquelas ligadas ao aminoácido carboxiterminal de uma proteína por meio de uma porção fosforil-etanolamina a um oligossacarídeo (glicano), que, por sua vez, está ligado via glicosamina ao fosfatidilinositol (PI). Essas são as glicoproteínas **ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (ancoradas ao GPI)**. Entre outras funções, elas estão envolvidas no direcionamento de glicoproteínas para as áreas apicais ou basolaterais da membrana plasmática (MP) de células epiteliais polarizadas (ver Capítulo 40 e adiante).

O número de cadeias oligossacarídicas ligadas a uma proteína pode variar de 1 a 30 ou mais, e as cadeias de açúcares variam de um ou dois resíduos de comprimento até estruturas muito maiores. A cadeia glicano pode ser linear ou ramificada.

Muitas proteínas contêm mais de um tipo de cadeia de açúcar; por exemplo, a **glicoforina**, uma importante glicoproteína da membrana eritrocitária (ver Capítulo 53), contém os oligossacarídeos O-ligados e N-ligados.

AS GLICOPROTEÍNAS CONTÊM DIVERSOS TIPOS DE LIGAÇÕES O-GLICOSÍDICAS

Pelo menos quatro subclasses de ligações O-glicosídicas são encontradas nas glicoproteínas humanas:

1. A ligação **GalNAc-Ser(Tre)** mostrada na Figura 46-1 é a ligação predominante. Em geral, um resíduo de galactose ou de ácido *N*-acetilneuramínico está ligado à *N*-acetilgalactosamina, porém são encontradas muitas variações nas composições dos açúcares e nos comprimentos dessas cadeias oligossacarídicas. Esse tipo de ligação ocorre nas **mucinas** (ver a seguir).
2. Os **proteoglicanos** contêm um trissacarídeo **Gal-Gal-Xil-Ser** (o chamado trissacarídeo de ligação).
3. Os **colágenos** (ver Capítulo 50) contêm uma ligação **Gal-hidroxisilina (Hil)**.
4. Muitas **proteínas nucleares e citosólicas** possuem cadeias laterais que consistem em uma única *N*-acetilglicosamina ligada a um resíduo de serina ou de treonina (**GlcNAc-Ser[Tre]**).

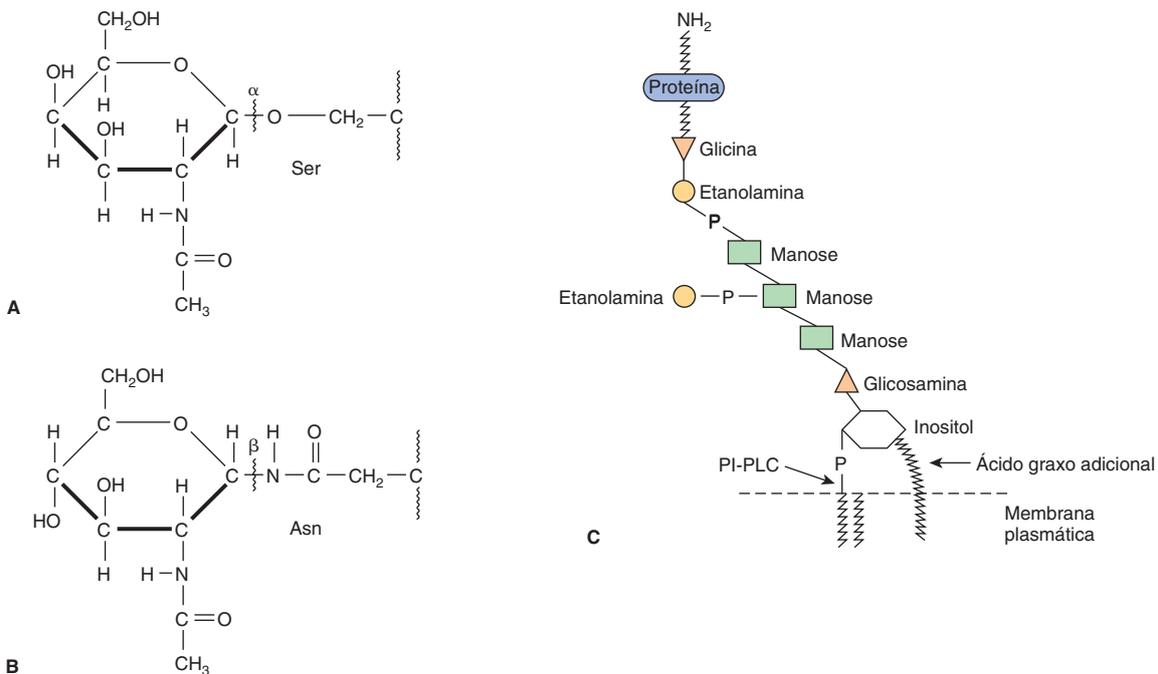


FIGURA 46-1 Os três principais tipos de glicoproteínas. (A) Uma O-ligação (*N*-acetilgalactosamina à serina), (B) uma N-ligação (*N*-acetilglicosamina à asparagina) e (C) uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI). A estrutura do GPI mostrada é aquela que liga a acetilcolinesterase à membrana plasmática das hemácias humanas. O sítio de ação da fosfolipase C-PI (PLC-PI), que libera a enzima da ligação à membrana, está indicado. Esse GPI particular contém um ácido graxo extra ligado a inositol e também uma porção fosforiletanolamina extra ligada ao resíduo central de manose. As variações observadas entre as diferentes estruturas de GPI incluem a identidade do aminoácido carboxiterminal, as moléculas ligadas aos resíduos de manose e a natureza precisa da porção lipídica.

As mucinas apresentam um elevado teor de oligossacarídeos O-ligados e exibem seqüências de aminoácidos repetidas

As mucinas são glicoproteínas com duas características distintas: um elevado conteúdo de **oligossacarídeos O-ligados** (o teor de carboidratos das mucinas é geralmente superior a 50%); e a presença de **números variáveis de repetições em tandem (VNTRs)** de seqüência peptídica no centro de suas estruturas polipeptídicas, às quais estão ligadas as cadeias de O-glicano associadas em grupos. Essas repetições em série são ricas em serina, treonina e prolina; na verdade, até 60% da necessidade alimentar de treonina pode ser conseguida pela síntese de mucinas. Apesar do predomínio dos O-glicanos, as mucinas frequentemente também contêm várias cadeias de N-glicano. A **Tabela 46-7** fornece um resumo de algumas propriedades importantes das mucinas.

Existem mucinas **secretoras** ou **ligadas à membrana**. O **muco** secretado pelos tratos gastrointestinal, respiratório e reprodutor é uma solução que contém aproximadamente 5% de mucinas. Em geral, as mucinas secretoras apresentam uma estrutura oligomérica, com monômeros ligados por ligações dissulfeto e, por isso, uma massa molecular muito elevada. O muco possui uma elevada **viscosidade** e geralmente forma um **gel** devido ao seu conteúdo de mucinas. O alto teor de O-glicanos confere uma estrutura extensa. Isso é explicado, em parte, por interações estéricas entre as porções de GalNAc e os aminoácidos adjacentes, resultando em um efeito de enrijecimento da cadeia, de modo que a conformação das mucinas muitas vezes se transforma em bastonetes rígidos. As interações não covalentes intermoleculares entre açúcares nas cadeias adjacentes de glicanos contribuem para a formação do gel. O elevado conteúdo de **NeuAc** e de resíduos de **sulfato** encontrado em muitas mucinas lhes confere uma carga negativa.

As mucinas auxiliam na **lubrificação** e formam uma **barreira física protetora** sobre as superfícies epiteliais. Elas são altamente resistentes à proteólise, uma vez que a densidade das cadeias de oligossacarídeos dificulta o acesso das **proteases** às suas estruturas polipeptídicas.

As mucinas ligadas à membrana participam das **interações célula a célula**. Elas também podem mascarar os antígenos da superfície da célula. Muitas células neoplásicas formam grandes quantidades de mucinas que ocultam os antígenos de superfície e protegem as células cancerosas da vigilância imunológica.

TABELA 46-7 Algumas propriedades das mucinas

Encontradas nas secreções dos tratos gastrointestinal, respiratório e reprodutivo, bem como nas membranas de várias células
Exibem um elevado conteúdo de cadeias de O-glicanos, geralmente contendo NeuAc
Possuem seqüências repetidas de aminoácidos ricas em serina, treonina e prolina
A estrutura extensa contribui para a sua alta viscoelasticidade.
São muito resistentes à proteólise
Formam uma barreira física protetora nas superfícies epiteliais, estão envolvidas em interações intercelulares e podem conter ou ocultar determinados antígenos de superfície

As mucinas também apresentam epítomos peptídicos e glicídicos específicos de câncer. Alguns destes têm sido utilizados para estimular uma resposta imune contra as células neoplásicas.

As glicoproteínas O-ligadas são sintetizadas pela adição seqüencial de açúcares a partir de açúcar nucleotídico

Como a maioria das glicoproteínas são ligadas à membrana ou secretadas, o seu mRNA é geralmente traduzido em polirribossomos ligados à membrana (ver Capítulo 37). As cadeias de glicano são construídas pela **doação seqüencial de açúcares a partir de açúcares nucleotídicos**, catalisada pelas **glicosiltransferases de glicoproteínas**. Existem 41 tipos diferentes de glicosiltransferases de glicoproteínas. As famílias de glicosiltransferases são denominadas a partir do açúcar nucleotídico doador, e as subfamílias, com base na ligação formada entre o açúcar e o substrato aceptor; a transferência poderá ocorrer com retenção ou inversão da conformação no C-1 do açúcar. A ligação do açúcar nucleotídico na enzima leva a uma alteração conformacional na enzima que permite a ligação do substrato aceptor. As glicosiltransferases apresentam elevado grau de especificidade para o substrato aceptor, atuando, em geral, apenas no produto da reação precedente. Os diferentes estágios da formação do glicano, e, portanto, as diferentes glicosiltransferases, estão localizados em diferentes regiões do aparelho de Golgi, de modo que existe uma separação espacial das diferentes etapas do processo. Nem todas as cadeias de glicanos de uma determinada glicoproteína são completas; algumas são truncadas, levando à micro-heterogeneidade. Não se conhece uma seqüência-consenso para determinar quais resíduos de serina e treonina estão glicosilados, porém a primeira porção de açúcar incorporada é geralmente a *N*-acetilgalactosamina. A **Tabela 46-8** fornece um resumo das principais características da biossíntese das glicoproteínas O-ligadas.

AS GLICOPROTEÍNAS N-LIGADAS CONTÊM UMA LIGAÇÃO Asn-GLcNAc

As glicoproteínas *N*-ligadas constituem a principal classe de glicoproteínas, incluindo tanto as glicoproteínas **ligadas à membrana** quanto as **circulantes**. Elas distinguem-se pela presença da ligação asparagina – *N*-acetilglicosamina (Figura 46-1).

TABELA 46-8 Resumo das principais características da O-glicosilação

<ul style="list-style-type: none"> Envolve um conjunto de glicosiltransferases de glicoproteínas ligadas à membrana, que atuam de modo seqüencial; em geral, cada transferase é específica para determinado tipo de ligação
<ul style="list-style-type: none"> As enzimas envolvidas estão localizadas em vários subcompartimentos do aparelho de Golgi
<ul style="list-style-type: none"> Cada reação de glicosilação envolve o açúcar nucleotídico apropriado.
<ul style="list-style-type: none"> O dolicol-P-P-oligossacarídeo não está envolvido, nem as glicosidases; e as reações não são inibidas pela tunicamicina
<ul style="list-style-type: none"> A O-glicosilação ocorre após a tradução em determinados resíduos de Ser e Tre

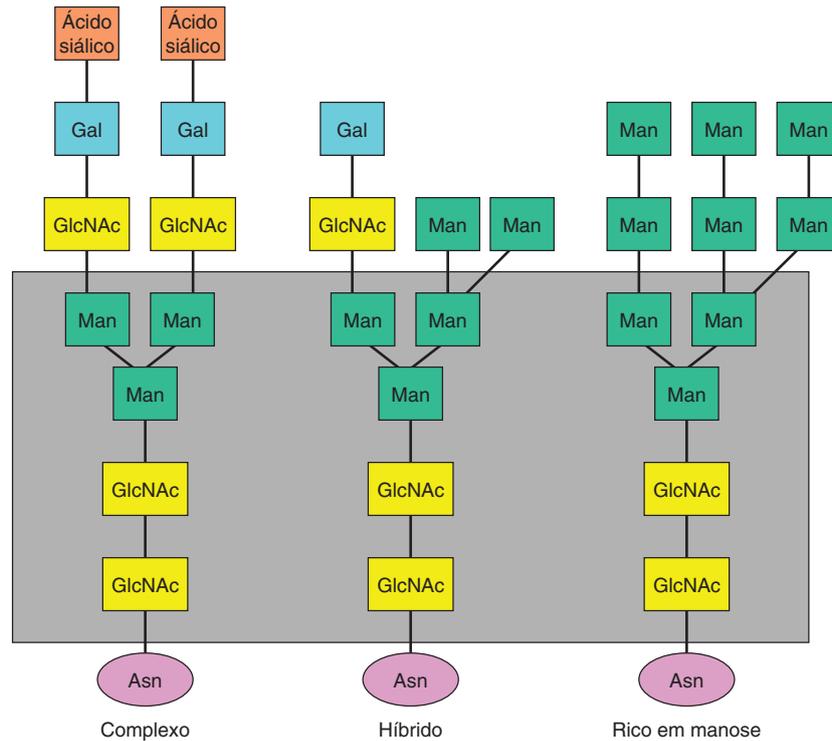


FIGURA 46-2 Estruturas dos principais tipos de oligossacarídeos ligados à asparagina. A área dentro do retângulo engloba o núcleo pentassacarídico comum a todas as glicoproteínas *N*-ligadas.

Existem três classes principais de oligossacarídeos *N*-ligados: **complexos**, **ricos em manose** e **híbridos**. As três classes possuem o mesmo pentassacarídeo ramificado, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, ligado à asparagina, mas diferem em suas ramificações externas (Figura 46-2).

Os oligossacarídeos complexos contêm duas, três, quatro ou cinco ramificações externas. Com frequência, os ramos oligossacarídicos são designados como **antenas**, de modo que podem ser encontradas estruturas bi, tri, tetra e penta-antenas. Em geral, eles contêm resíduos de ácido *N*-acetilneuramínico terminais e galactose subjacente e resíduos de *N*-acetilglicosamina, e, na maioria das vezes, os últimos são constituídos do dissacarídeo *N*-acetil-lactosamina. As **unidades de *N*-acetil-lactosamina** repetidas – $[\text{Gal}\beta 1-3/4\text{GlcNAc}\beta 1-3]_n$ (poli-*N*-acetil-lactosaminoglicanos) – são frequentemente encontradas nas cadeias de glicanos *N*-ligados. As moléculas do grupo sanguíneo I/i pertencem a essa classe. Existe um número extraordinário de cadeias do tipo complexo, e aquela indicada na Figura 46-2 é apenas um de muitos exemplos. Outras cadeias complexas podem terminar em galactose ou fucose.

Em geral, os oligossacarídeos ricos em manose apresentam de 2 a 6 resíduos de manose adicionais, ligados ao núcleo de pentassacarídeo. As moléculas híbridas apresentam características das outras duas classes.

A biossíntese de glicoproteínas *N*-ligadas envolve o dolicol-P-P-oligossacarídeo

A presença do **pentassacarídeo comum** nas glicoproteínas *N*-ligadas é explicada pelo fato de elas compartilharem um mecanismo inicial comum de biossíntese, no qual um oligossa-

carídeo ramificado é sintetizado preso ao **dolicol-pirofosfato** (Figura 46-3) no lado citosólico da membrana do retículo endoplasmático e, em seguida, translocado para o lúmen do retículo endoplasmático, onde sofre posterior glicosilação, antes que a cadeia do oligossacarídeo seja transferida por uma oligossacariltransferase para um resíduo de asparagina da apoglicoproteína aceptora, quando ele entra no retículo endoplasmático durante a síntese nos polirribossomos ligados à membrana. Essa é, portanto, uma modificação cotraducional. Em muitas glicoproteínas *N*-ligadas, existe uma sequência-consenso de Asn-X-Ser/Tre (em que X = qualquer aminoácido diferente de prolina) para determinar o sítio de glicosilação; em outras, não existe uma sequência-consenso definida para glicosilação.

Como mostrada na Figura 46-4, o primeiro passo é uma reação entre UDP-*N*-acetilglicosamina e dolicol-fosfato, formando *N*-acetilglicosamina-dolicol-pirofosfato. Uma segunda *N*-acetilglicosamina é adicionada a partir da UDP-*N*-acetilglicosamina, seguida pela adição de 5 moléculas de manose da GDP-manose. O oligossacarídeo dolicol pirofosfato é, em seguida, translocado para o lúmen do retículo endoplasmático, e, posteriormente, são adicionadas moléculas de manose e

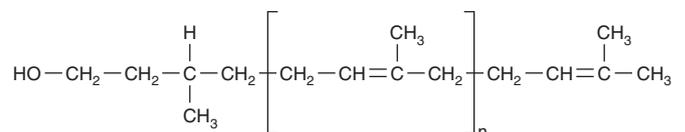


FIGURA 46-3 A estrutura do dolicol-fosfato. O grupo entre colchetes é uma unidade de isopreno ($n = 17$ a 20 unidades isoprenoides).

catabolismo. A glicosiltransferase percebe o dobramento da glicoproteína e volta a glicosilar apenas as proteínas mal dobradas. A proteína solúvel do retículo endoplasmático **calreticulina** realiza uma função semelhante à da calnexina.

Vários fatores regulam a glicosilação das glicoproteínas

A glicosilação de glicoproteínas é um processo complexo envolvendo um grande número de enzimas; aproximadamente 1% do genoma humano codifica genes que estão envolvidos com a glicosilação de proteínas. Existem pelo menos 10 GlcNAc-transferases distintas. Além disso, existem múltiplas espécies das outras glicosiltransferases (p. ex., sialiltransferases). O controle de fatores no primeiro estágio da biossíntese de glicoproteínas *N*-ligadas (formação e transferência do oligossacarídeo dolicol-pirofosfato) inclui não apenas a disponibilidade dos açúcares nucleotídicos, mas também a presença de sítios aceptores adequados em proteínas, a concentração tecidual de dolicol-fosfato e a atividade do oligossacarídeo:proteína-transferase.

A **Tabela 46-10** fornece uma lista de alguns fatores que estão comprovadamente envolvidos na regulação do **processamento de oligossacarídeos**. As **variações entre espécies** entre enzimas de processamento assumiram importância em relação à produção de glicoproteínas de uso terapêutico por meio da tecnologia do DNA recombinante. Por exemplo, a **eritropoietina recombinante** (EPO) é administrada a pacientes com alguns tipos de anemia crônica, com o objetivo de estimular a eritropoiese. A meia-vida da eritropoietina no plasma é influenciada pelo seu padrão de glicosilação; alguns

TABELA 46-10 Alguns fatores que afetam as atividades das enzimas processadoras de glicoproteínas

Fator	Comentário
Tipo celular	Os diferentes tipos de células contêm perfis diferentes de enzimas de processamento
Enzima anterior	Determinadas glicosiltransferases só atuam em uma cadeia oligossacarídica se ela já tiver sido processada por outra enzima de processamento ^a
Desenvolvimento	O perfil celular de enzimas de processamento pode se modificar durante o desenvolvimento se os seus genes forem ativados ou suprimidos
Localização intracelular	Por exemplo, se uma enzima estiver destinada a ser inserida na membrana do RE (p. ex., HMG-CoA-redutase), ela pode nunca encontrar as enzimas de processamento localizadas no aparelho de Golgi
Conformação da proteína	As diferenças na conformação de diferentes proteínas podem facilitar ou dificultar o acesso das enzimas de processamento em cadeias oligossacarídicas idênticas
Espécie	As mesmas células (p. ex., fibroblastos) de diferentes espécies podem exibir padrões distintos de enzimas de processamento
Câncer	As células neoplásicas podem exibir enzimas de processamento diferentes daquelas das células normais correspondentes

^aPor exemplo, a ação prévia da GlcNAc-transferase I é necessária para a ação do α -manosidase II de Golgi.

padrões estão associados a uma meia-vida curta, limitando a sua efetividade terapêutica. Assim, é importante obter a EPO de células hospedeiras que conferem um padrão de glicosilação compatível com a meia-vida normal no plasma.

Também existe grande interesse na análise das atividades de enzimas processadoras de glicoproteínas em vários tipos de **células neoplásicas**. Tem sido demonstrado que essas células sintetizam cadeias de oligossacarídeos diferentes das produzidas nas células normais (p. ex., elas geralmente apresentam ramificações maiores). Esse fato pode ser devido às células neoplásicas expressarem padrões de glicosiltransferases distintos daqueles das células normais, como resultado de ativação ou da repressão gênica específica. As diferenças nas cadeias oligossacarídicas poderiam influenciar as interações de adesão entre as células neoplásicas e as células teciduais normais originais, contribuindo para a ocorrência de metástases.

ALGUMAS PROTEÍNAS ESTÃO ANCORADAS À MEMBRANA PLASMÁTICA POR MOLÉCULAS DE GLICOFOSFATIDILINOSITOL

A terceira principal classe de glicoproteínas é a das glicoproteínas ligadas à membrana que são ancoradas à bicamada lipídica por uma cauda de glicofosfatidilinositol (GPI) (Figura 46-1). A ligação GPI é a forma mais comum por meio da qual várias proteínas são ancoradas às membranas celulares.

As proteínas são ancoradas à face externa da membrana plasmática ou à camada interna (luminal) da membrana em vesículas secretoras pelos ácidos graxos de fosfatidilinositol. O fosfatidilinositol é ligado via *N*-acetilglicosamina a uma cadeia de glicano contendo uma variedade de açúcares, incluindo manose e glicosamina. Por sua vez, a cadeia oligossacarídica está ligada pela fosforiletanolamina em uma ligação amida ao aminoácido carboxiterminal da proteína fixada. Constituintes adicionais são encontrados em muitas estruturas de GPI; por exemplo, a estrutura ilustrada na Figura 46-1 contém uma fosforiletanolamina adicional fixada no meio dos três resíduos de manose do glicano e um ácido graxo extra fixado à glicosamina. A **Tabela 46-11** fornece exemplos de algumas proteínas que estão ancoradas pela ligação GPI.

Existem três possíveis funções da ligação ao GPI:

1. A âncora GPI permite o aumento da **mobilidade** de uma proteína na membrana plasmática, comparada à de uma proteína que contenha seqüências transmembrana. A âncora GPI é presa apenas à face externa da bicamada lipídica,

TABELA 46-11 Algumas proteínas ligadas ao GPI

• Acetilcolinesterase (membrana eritrocitária)
• Fosfatase alcalina (intestinal, placentária)
• Fator acelerador da decomposição (membrana eritrocitária)
• 5'-Nucleotidase (linfócitos T, outras células)
• Antígeno Thi-1 (encéfalo, linfócitos T)
• Glicoproteína de superfície variável (<i>Trypanosoma brucei</i>)

de modo que fica mais livre para se difundir do que uma proteína ancorada em ambas as camadas da membrana. A mobilidade aumentada pode ser importante para facilitar respostas rápidas aos estímulos.

2. Algumas âncoras GPI podem se conectar por vias de **transdução de sinal**, de modo que as proteínas que não possuem um domínio transmembrana possam, apesar disso, ser receptores para hormônios e outros sinais da superfície celular.
3. As estruturas GPI podem **direcionar** proteínas para domínios apical ou basolateral da membrana plasmática de células epiteliais polarizadas.

A âncora GPI é pré-formada no retículo endoplasmático e, em seguida, presa à proteína após a síntese ribossomal ter sido completada. Os produtos de tradução primária de proteínas ancoradas ao GPI possuem não somente uma sequência sinalizadora aminoterminal que as direciona para o retículo endoplasmático durante a síntese, mas também um domínio hidrofóbico carboxiterminal que atua como sinal para a ligação à âncora GPI. O primeiro estágio na síntese da âncora GPI é a inserção de ácidos graxos de fosfatidilinositol na face luminal da membrana do retículo endoplasmático, seguida pela glicosilação, iniciada com a esterificação da *N*-acetilglicosamina ao grupo fosfato do fosfatidilinositol. Uma porção fosfoetanolamina terminal é adicionada à cadeia de glicano completa. O domínio hidrofóbico carboxiterminal da proteína é deslocado pelo grupo amino de etanolamina na reação de transaminação que forma a ligação amida entre a âncora GPI e um resíduo aspartato na proteína.

ALGUMAS PROTEÍNAS SOFREM GLICOSILAÇÃO IMEDIATAMENTE REVERSÍVEL

Muitas proteínas, incluindo proteínas do poro nuclear, proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição e proteínas associadas à cromatina, assim como proteínas codificadas por oncogenes nucleares e proteínas supressoras de tumores, sofrem *O*-glicosilação com uma única porção glicídica, a *N*-acetilglicosamina. Essa é uma glicosilação imediatamente reversível. Os sítios de glicosilação da serina e da treonina são os mesmos daqueles que sofrem fosforilação nessas proteínas, e a glicosilação e a fosforilação ocorrem reciprocamente em resposta à sinalização celular.

A *N*-acetilglicosamina transferase *O*-ligada que catalisa essa glicosilação utiliza UDP-*N*-acetilglicosamina como açúcar doador e apresenta atividade fosfatase, de modo que pode substituir diretamente uma serina ou treonina fosfato por uma *N*-acetilglicosamina. Não existe uma sequência consenso absoluta para essa reação, porém aproximadamente metade dos sítios que estão sujeitos à glicosilação e à fosforilação recíprocas é Pro-Val-Ser. A enzima é ativada por fosforilação em resposta à ação da insulina, e a *N*-acetilglicosamina é removida (deixando o sítio disponível para fosforilação) pela *N*-acetilglicosaminidase.

Tanto a atividade quanto a especificidade ao peptídeo da *N*-acetilglicosamina-transferase *O*-ligada dependem da concentração de UDP-*N*-acetilglicosamina. Dependendo do tipo

celular, até 2 a 5% do metabolismo da glicose ocorrem por meio da via da hexosamina, levando à formação da *N*-acetilglicosamina e emprestando à *N*-acetilglicosamina-transferase *O*-ligada um papel de detecção de nutrientes na célula. A *O*-glicosilação excessiva com *N*-acetilglicosamina (e, portanto, fosforilação reduzida) de proteínas-alvo está implicada na **resistência à insulina** e na toxicidade da glicose no **diabetes melito**, bem como em doenças neurodegenerativas.

OS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) SÃO IMPORTANTES NA ETIOLOGIA DA LESÃO TECIDUAL NO DIABETES MELITO

A **glicação** é a fixação não enzimática de açúcares (principalmente glicose) a grupos amino das proteínas (e também a outras moléculas, incluindo DNA e lipídeos). A glicação distingue-se da **glicosilação** que representa a ligação de açúcares catalisada por enzimas. Inicialmente, a glicose forma uma **base de Schiff** no grupo amino da proteína, que, em seguida, sofre o **rearranjo de Amadori** para gerar **cetoaminas** (ver Figura 46-5), e reações posteriores para gerar **produtos finais de glicação avançada (AGEs)**. A série completa de reações é conhecida como **reação de Maillard**, que está envolvida no **escurecimento** de certos tipos de alimentos durante armazenamento ou aquecimento e representa parte do sabor de alguns alimentos.

Os produtos finais de glicação avançada baseiam a **lesão tecidual** no **diabetes melito** fracamente controlado. Quando a concentração de glicose sanguínea se encontra consistentemente elevada, ocorre aumento na glicação de proteínas. A glicação do colágeno e de outras proteínas na matriz extracelular altera suas propriedades (p. ex., aumentando a **ligação cruzada do colágeno**). A ligação cruzada pode levar ao acúmulo de várias proteínas plasmáticas nas paredes dos vasos sanguíneos; em particular, o acúmulo de **LDL** pode contribuir para a **aterogênese**. Os AGEs parecem estar envolvidos

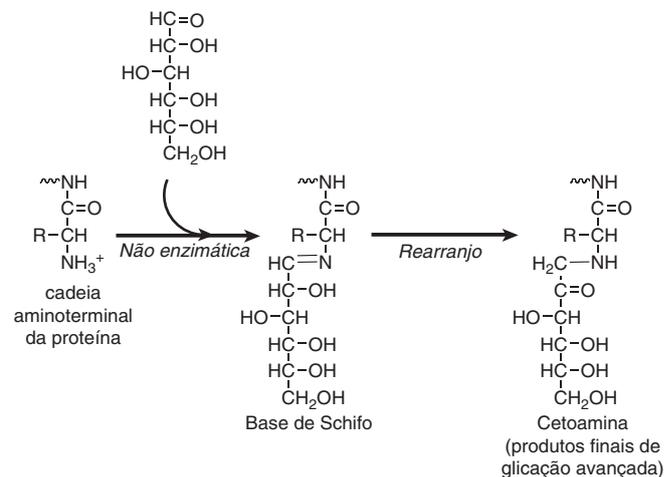


FIGURA 46-5 Formação de produtos finais de glicação avançada a partir da glicose.

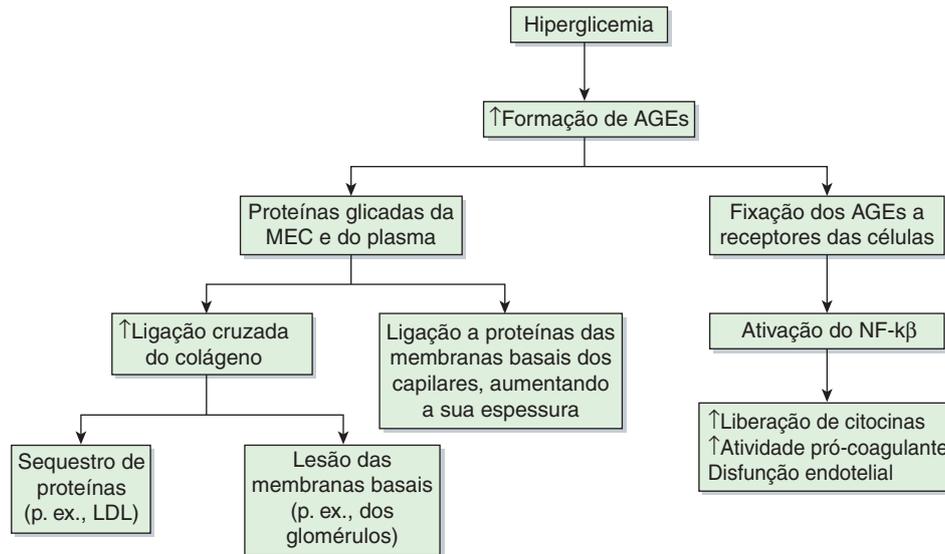


FIGURA 46-6 Algumas consequências da formação de produtos finais de glicação avançada.

nas lesões **microvascular** e **macrovascular** no diabetes melito (Figura 46-6). As células endoteliais e os macrófagos apresentam receptores de AGEs em suas superfícies. A captação de proteínas glicadas por esses receptores pode ativar o fator de transcrição **NF-κβ** (ver Capítulo 52), gerando uma variedade de **citocinas** e de **moléculas pró-inflamatórias**. Desse modo, acredita-se que os AGEs contribuam de forma significativa para algumas das patologias do diabetes.

A glicação não enzimática da **hemoglobina A** presente nas hemácias leva à formação de **HbA_{1c}**. Ela ocorre normalmente de forma modesta e é aumentada em pacientes com diabetes melito com fraco controle glicêmico, cuja concentração sanguínea de glicose se encontra consistentemente elevada. Conforme discutido no Capítulo 6, a determinação da HbA_{1c} passou a ser uma parte muito importante do **controle de pacientes com diabetes melito**.

AS GLICOPROTEÍNAS ESTÃO ENVOLVIDAS EM MUITOS PROCESSOS BIOLÓGICOS E EM MUITAS DOENÇAS

Conforme listado na Tabela 46-1, as glicoproteínas desempenham várias funções diferentes; algumas já foram discutidas neste capítulo, ao passo que outras são descritas em outras partes deste texto (p. ex., moléculas de transporte, moléculas imunológicas e hormônios). Elas também são importantes na fertilização e na inflamação, e diversas doenças são devido aos defeitos na síntese e no catabolismo de glicoproteínas.

As glicoproteínas são importantes na fertilização

Para alcançar a membrana plasmática de um oócito, um espermatozoide precisa atravessar a **zona pelúcida (ZP)**, um envoltório acelular transparente e espesso que circunda o oócito.

A glicoproteína ZP3 é uma glicoproteína *O*-ligada que atua como receptor do espermatozoide. Uma proteína da superfície do espermatozoide interage com as cadeias oligossacarídicas de ZP3. Por meio da sinalização transmembrana, essa interação induz a **reação acrossomal**, na qual enzimas como proteases e hialuronidase e outros conteúdos do acrossomo do espermatozoide são liberados. A liberação dessas enzimas permite que o espermatozoide atravesse a zona pelúcida e alcance a membrana plasmática do oócito. Outra glicoproteína, a PH-30, é importante tanto na ligação da membrana plasmática do espermatozoide à do oócito, como também na fusão subsequente das duas membranas. Essas interações possibilitam a entrada do espermatozoide no oócito e a sua fertilização. Poderá ser possível **inibir a fertilização** pelo desenvolvimento de fármacos que interfiram nas funções normais da ZP3 e da PH-30 e que, desse modo, atuem como agentes contraceptivos.

As selectinas desempenham papéis essenciais na inflamação e no endereçamento dos linfócitos

Os **leucócitos** desempenham papéis importantes em muitos fenômenos inflamatórios e imunológicos. As primeiras etapas em muitos desses fenômenos consistem em interações entre os leucócitos circulantes e as **células endoteliais** antes da saída dos leucócitos da circulação. Os leucócitos e as células endoteliais contêm lectinas na superfície celular, denominadas **selectinas**, que participam da adesão intercelular. As selectinas são proteínas transmembranas de cadeia única que se ligam ao Ca²⁺; os terminais amino apresentam o domínio lectina, que está envolvido na ligação aos ligantes específicos de carboidratos.

As interações entre as selectinas da superfície da célula do neutrófilo e as glicoproteínas da célula endotelial prendem os neutrófilos temporariamente, de modo que eles passam a rolar sobre a superfície endotelial. Durante esse processo, os neutrófilos são ativados, sofrem uma alteração em seu formato

e, então, aderem firmemente ao endotélio. Essa adesão é o resultado de interações entre as **integrinas** (ver Capítulo 53) dos neutrófilos e as proteínas relacionadas com as imunoglobulinas presentes nas células endoteliais. Após a adesão, os neutrófilos introduzem pseudópodes dentro das junções entre as células endoteliais, espremendo-se por essas junções, atravessam a membrana basal e, em seguida, ficam livres para migrar no espaço extravascular.

As selectinas ligam-se aos **oligossacarídeos sialilados e fucosilados**. Os lipídeos sulfatados (ver Capítulo 21) também podem ser ligantes. A síntese de compostos como anticorpos monoclonais que bloqueiam interações que se ligam à selectina pode ser terapêuticamente útil para inibir respostas inflamatórias. Em geral, as **células neoplásicas** apresentam ligantes de selectina em suas superfícies, que podem desempenhar um papel na invasão e na metástase de células malignas.

As anormalidades na síntese das glicoproteínas estão na base de determinadas doenças

A Tabela 46-12 fornece uma lista de diversas condições nas quais as anormalidades na síntese das glicoproteínas são importantes. Conforme mencionado anteriormente, muitas **células neoplásicas** exibem diferentes perfis de cadeias oligossacarídicas em suas superfícies, algumas das quais podem contribuir para as metástases.

As principais características dos **distúrbios congênitos de glicosilação** estão resumidas na Tabela 46-13.

TABELA 46-12 Algumas doenças que envolvem anormalidades na biossíntese das glicoproteínas

Doença	Anormalidade
Câncer	O aumento na ramificação dos glicanos de superfície celular ou a apresentação de ligantes de selectinas podem ser importantes nas metástases
Distúrbios congênitos de glicosilação ^a	Ver Tabela 46-13
HEMPAS ^b (OMIM 224100)	Anormalidades de determinadas enzimas (p. ex., manosidase II e outras) envolvidas na biossíntese dos <i>N</i> -glicanos, afetando particularmente a membrana eritrocitária
Deficiência de adesão dos leucócitos, tipo II (OMIM 266265)	Prováveis mutações que afetam um transportador de GDP-fucose localizado no aparelho de Golgi, resultando em fucosilação deficiente
Hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) (OMIM 311770)	Defeito adquirido na biossíntese das estruturas do GPI ^c do fator acelerador de degradação (DAF) e CD59
Doença da célula I (OMIM 252500)	Deficiência de GlcNAc-fosfotransferase, resultando em direcionamento anormal de determinadas enzimas lisossomais

^aO número OMIM do distúrbio congênito de glicosilação tipo Ia é 212065.

^bMultinuclearidade eritroblástica hereditária com teste positivo de lise com soro acidificado (anemia diseritropoética congênita tipo II). É uma forma relativamente branda de anemia. Reflete, pelo menos em parte, a presença, nas membranas das hemácias, de várias glicoproteínas com cadeias anormais de *N*-glicanos, contribuindo para a suscetibilidade à lise.

^cGlicosilfosfatidilinositol.

TABELA 46-13 Principais características dos distúrbios congênitos de glicosilação

• Distúrbios autossômicos recessivos
• Distúrbios multissistêmicos que provavelmente não eram reconhecidos no passado
• Em geral, acometem o sistema nervoso central, resultando em retardo psicomotor e outras manifestações
• Os distúrbios tipo I são causados por mutações de genes que codificam enzimas (p. ex., fosfomanomutase 2 [PMM-2], que provoca o DCG Ia) envolvidas na síntese do dolicol-P-P-oligossacarídeo
• Os distúrbios tipo II são causados por mutações de genes que codificam enzimas (p. ex., GlcNAc-transferase 2, que causa DCG IIa) envolvidas no processamento das cadeias de <i>N</i> -glicanos
• Foram identificados pelo menos 15 distúrbios distintos
• A focalização isoeletrica da transferrina constitui um teste bioquímico útil para ajudar no diagnóstico desses distúrbios; o truncamento das cadeias oligossacarídicas dessa proteína altera o seu padrão de focalização isoeletrica
• A manose oral demonstrou ser benéfica no tratamento do DCG Ia

Abreviatura: DCG, distúrbio congênito da glicosilação.

A **deficiência de adesão dos leucócitos II** é um distúrbio raro provavelmente causado por mutações que afetam a atividade de um transportador de GDP-fucose localizado no aparelho de Golgi. A ausência de ligantes fucosilados para as selectinas leva a uma acentuada diminuição no rolamento dos neutrófilos. Os pacientes apresentam infecções bacterianas recorrentes e potencialmente fatais, bem como retardo psicomotor e mental. Essa doença parece responder à administração oral de fucose.

A **hemoglobinúria paroxística noturna** é uma anemia branda adquirida caracterizada pela presença de hemoglobina na urina causada pela hemólise de hemácias, particularmente durante o sono, o que poderá refletir uma leve queda no pH plasmático durante o sono, que aumenta a suscetibilidade à lise pelo sistema do complemento (ver Capítulo 52). A condição é devida à aquisição, pelas células hematopoiéticas, de mutações somáticas no gene que codifica a enzima que liga a glicosamina ao fosfatidilinositol na estrutura GPI. Isso leva a uma deficiência de proteínas que estão ancoradas à membrana da hemácia via ligação ao GPI. Duas proteínas, **o fator acelerador de degradação** e a **CD59**, normalmente interagem com componentes do sistema do complemento para prevenir a hemólise. Quando deficientes, o sistema do complemento atua na membrana da hemácia, causando hemólise.

Algumas das **distrofias musculares congênitas (DMCs)** resultam de distúrbios na síntese de glicanos na proteína α -dístroglicano. Essa proteína se projeta a partir da membrana plasmática das células musculares e interage com a laminina 2 (merosina) na lâmina basal. Se os glicanos do α -dístroglicano não forem formados corretamente (como resultado de mutações nos genes que codificam algumas glicosiltransferases), esse fato leva à interação deficiente de α -DG com a laminina.

A **artrite reumatoide** está associada a uma alteração na glicosilação das moléculas circulantes de imunoglobulina G (IgG) (ver Capítulo 52), de modo que elas carecem de galactose em suas regiões Fc e terminam com GlcNAc. A **proteína de**

TABELA 46-14 Principais características de algumas doenças^a causadas por deficiências de hidrolases de glicoproteínas^b

<ul style="list-style-type: none"> Em geral, caracterizam-se por deficiência intelectual ou outras anormalidades neurológicas e, em alguns distúrbios, por traços grosseiros ou visceromegalia (ou ambos)
<ul style="list-style-type: none"> A gravidade varia de leve a rapidamente progressiva
<ul style="list-style-type: none"> Herança autossômica recessiva
<ul style="list-style-type: none"> Podem exibir distribuição étnica (p. ex., a aspartilglicosaminúria é comum na Finlândia)
<ul style="list-style-type: none"> Vacuolização das células observadas à microscopia em alguns distúrbios
<ul style="list-style-type: none"> Presença de produtos de degradação anormais (p. ex., oligossacarídeos que se acumulam, devido à deficiência enzimática) na urina, detectáveis por TLC e passíveis de caracterização por GLC-MS
<ul style="list-style-type: none"> O diagnóstico definitivo é estabelecido por ensaio da enzima apropriada, geralmente utilizando leucócitos
<ul style="list-style-type: none"> Possibilidade de diagnóstico pré-natal por ensaios enzimáticos apropriados
<ul style="list-style-type: none"> No momento atual, não existe nenhum tratamento definitivo

^a α -Manosidose, β -manosidose, fucosidose, sialidose, aspartilglicosaminúria e doença de Schindler.

^bNúmeros OMIM: α -manosidose, 248500; β -manosidose, 248510; fucosidose, 230000; sialidose, 256550; aspartilglicosaminúria, 208400; doença de Schindler, 609241.

ligação à manose, uma lectina sintetizada pelas células hepáticas e secretada na circulação, liga-se à manose, à *N*-acetilglicosamina e a alguns outros açúcares. Ela pode, portanto, ligar-se às moléculas IgG agalactosil que, em seguida, ativam o sistema do complemento, contribuindo para a inflamação crônica nas membranas sinoviais das articulações.

A **proteína de ligação à manose** também pode se ligar a açúcares quando eles estão presentes nas superfícies de bactérias, fungos e vírus, preparando esses patógenos para a opsonização ou para a destruição pelo sistema do complemento. Esse é um exemplo de **imunidade inata**, que não envolve imunoglobulinas ou linfócitos T. A deficiência dessa proteína em bebês jovens como resultado de mutação os torna suscetíveis às **infecções recorrentes**.

A doença da célula de inclusão (célula I) resulta de um direcionamento incorreto das enzimas lisossomais

A manose-6-fosfato serve para direcionar enzimas para o interior do lisossomo. A doença da célula I é uma condição rara caracterizada por retardo psicomotor progressivo grave e uma variedade de sinais físicos; na maioria das vezes, o óbito ocorre na primeira década de vida. As células em cultura de pacientes com doença da célula I carecem de quase todas as enzimas lisossomais normais; portanto os lisossomos acumulam muitos tipos diferentes de moléculas não degradadas, com consequente formação de corpúsculos de inclusão. O plasma desses pacientes contém atividades muito elevadas de enzimas lisossomais, sugerindo que as enzimas são sintetizadas, mas não chegam ao seu destino intracelular adequado e, em vez disso, são secretadas. As células cultivadas de pacientes captam enzimas lisossomais acrescentadas exogenamente de indivíduos normais,

indicando que as células apresentam um receptor normal em suas superfícies para a captação das enzimas lisossomais por endocitose. Enzimas lisossomais de indivíduos normais apresentam o marcador de reconhecimento manose-6-fosfato; as células de pacientes com a doença da célula I não possuem a *N*-acetilglicosamina-fosfotransferase localizada no aparelho de Golgi. Duas lectinas atuam como **proteínas receptoras de manose-6-fosfato**. Ambas atuam na separação intracelular de enzimas lisossomais para o interior de vesículas cobertas por clatrina no aparelho de Golgi. Em seguida, essas vesículas deixam o aparelho de Golgi e se fundem com um compartimento pré-lisossomal.

As deficiências genéticas das hidrolases lisossomais das glicoproteínas provocam doenças como a α -manosidose

O **turnover** de glicoproteínas envolve o catabolismo das cadeias oligossacarídicas catalisado por um conjunto de hidrolases lisossomais, como a α -neuraminidase, a β -galactosidase, a β -hexosaminidase, as α - e β -manosidases, a α -*N*-acetilgalactosaminidase, a α -fucosidase, a endo- β -*N*-acetilglicosaminidase e a aspartilglicosaminidase. Distúrbios genéticos dessas enzimas levam à degradação anormal de glicoproteínas. O acúmulo nos tecidos de glicoproteínas parcialmente degradadas leva a diversas doenças. Entre as mais conhecidas estão a manosidose, a fucosidose, a sialidose, a aspartilglicosaminúria e a doença de Schindler, causadas, respectivamente, pelas deficiências de α -manosidase, α -fucosidase, α -neuraminidase, aspartilglicosaminidase e α -*N*-acetilgalactosaminidase. A **Tabela 46-14** relaciona as principais características dessas doenças.

OS GLICANOS ESTÃO ENVOLVIDOS NA LIGAÇÃO DE VÍRUS, DE BACTÉRIAS E DE ALGUNS PARASITOS ÀS CÉLULAS HUMANAS

Uma característica dos glicanos, que explica muitas de suas ações biológicas, consiste na sua ligação específica às proteínas e a outros glicanos. Um reflexo desse fato é a sua capacidade de se ligar a determinados vírus, bactérias e parasitos.

O **vírus influenza A** liga-se a moléculas receptoras de glicoproteína da superfície celular contendo ácido *N*-acetilneuramínico por meio uma proteína denominada **hemaglutinina**. O vírus também possui uma **neuraminidase** que desempenha um papel essencial ao possibilitar a eluição da progênie recém-sintetizada das células infectadas. Se esse processo for inibido, a disseminação do vírus diminui muito. Atualmente, existem inibidores dessa enzima (p. ex., zanamivir, oseltamivir) para uso no tratamento de pacientes com *influenza*. Os vírus *influenza* são classificados de acordo com o tipo de hemaglutinina (H) e de neuraminidase (N) que possuem. Existem pelo menos 16 tipos de hemaglutininas e 9 tipos de neuraminidases. Assim, o **vírus da influenza aviária** é classificado como **H5N1**.

O **vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)**, a causa da Aids, liga-se às células por uma de suas glicoproteínas

de superfície (gp 120) e utiliza outra glicoproteína de superfície (gp 41) para se fundir à membrana da célula hospedeira. Os **anticorpos** dirigidos contra a gp 120 desenvolvem-se durante a infecção pelo HIV-1, e tem havido interesse no uso dessa proteína como vacina. Um dos principais problemas com essa abordagem é o fato de que a estrutura da gp 120 pode ser alterada de modo relativamente rápido devido a mutações, permitindo que o vírus escape da atividade neutralizante dos anticorpos dirigidos contra ele.

O *Helicobacter pylori* é a principal causa de **úlceras pépticas**. Ele liga-se a, pelo menos, dois diferentes glicanos presentes na superfície das células epiteliais do estômago, permitindo que se estabeleça um sítio de ligação estável ao revestimento do estômago. Da mesma forma, muitas bactérias que causam **diarreia** fixam-se às células superficiais do intestino por meio de glicanos presentes nas glicoproteínas ou nos glicolipídeos. A fixação do parasito da malária, *Plasmodium falciparum*, às células humanas é mediada por um GPI presente na superfície do parasito.

RESUMO

- As glicoproteínas são proteínas de ampla distribuição com diversas funções que contêm uma ou mais cadeias de carboidratos ligadas de forma covalente.
- O conteúdo de carboidrato de uma glicoproteína varia de 1 a mais de 85% de seu peso, e pode ser simples ou muito complexo na sua estrutura. São encontrados principalmente 8 açúcares nas cadeias glicídicas das glicoproteínas humanas: a xilose, a fucose, a galactose, a glicose, a manose, a *N*-acetilgalactosamina, a *N*-acetilglicosamina e o ácido *N*-acetilneuramínico.
- Pelo menos algumas das cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas codificam informações biológicas; elas também são importantes na modulação da solubilidade e da viscosidade de glicoproteínas, protegendo-as contra a proteólise, bem como em suas ações biológicas.
- As glicosidases hidrolisam ligações específicas dos oligossacarídeos e são usadas para explorar as estruturas e as funções das glicoproteínas.
- As lectinas são proteínas de ligação de carboidratos envolvidas na adesão celular e em muitos outros processos.
- As principais classes de glicoproteínas são *O*-ligadas (envolvendo serina ou treonina), *N*-ligadas (envolvendo o grupo amida da asparagina) e GPI-ligadas.
- As mucinas constituem uma classe de glicoproteínas *O*-ligadas que estão distribuídas pelas superfícies das células epiteliais dos tratos respiratório, gastrointestinal e reprodutor.
- O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi desempenham um importante papel nas reações de glicosilação envolvidas na biossíntese das glicoproteínas.

- As cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas *O*-ligadas são sintetizadas pelo acréscimo sequencial de açúcares doados por açúcares nucleotídeos em reações catalisadas por glicosiltransferases de glicoproteínas.
- A síntese das glicoproteínas *N*-ligadas envolve um dolicol-P-P-oligossacarídeo específico e várias glicosiltransferases e glicosidasas. Dependendo das enzimas e das proteínas precursoras existentes em determinado tecido, ele pode sintetizar oligossacarídeos *N*-ligados complexos, híbridos ou ricos em manose.
- As glicoproteínas estão implicadas em diversos processos biológicos, incluindo fertilização e inflamação.
- Existem diversas doenças que envolvem anormalidades na síntese e na degradação das glicoproteínas. As glicoproteínas também estão envolvidas em muitas outras doenças, incluindo *influenza*, *Aids*, artrite reumatoide, fibrose cística e úlcera péptica.

REFERÊNCIAS

- Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al: Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat Biotechnology* 2008;26:107.
- Freeze HH: Congenital disorders of glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. *Curr Mol Med* 2007;7:389.
- Haltiwanger RS, Lowe JB: Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 2004;73:491–537.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross-talk between *O*-Glc *N*-acylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 2011;80:825–858.
- Kiessling LL, Splain RA: Chemical approaches to glycobiology. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:619.
- Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985;54:631.
- Lowe JB, Marth JB: A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 2003;72:643–691.
- Ohtsubo K, Marth JD: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;126:855.
- Pilobelli KT, Mahal LK: Deciphering the glycode: the complexity and analytical challenge of glycomics. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11:300.
- Sansom C, Markman O: *Glycobiology*. Scion Publishing, 2007.
- Spiro RG: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002;12:43R–53R.
- Taylor ME, Drickamer K: *Introduction to Glycobiology*. 3rd edition, Oxford University Press, 2011.
- Udenfriend S, Kodukula K: How glycosylphosphatidyl anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 1995;64:563–591.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al: *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.
- Werz DB, Seeberger PH: Carbohydrates are the next frontier in pharmaceutical research. *Chemistry* 2005;11:3194.

Metabolismo de xenobióticos

David A. Bender, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Discutir sobre como os fármacos e outros xenobióticos são metabolizados no corpo.
- Descrever as duas fases gerais do metabolismo dos xenobióticos, a primeira envolvendo principalmente reações de hidroxilação catalisadas por espécies do citocromo P450 e a segunda consistindo em reações de conjugação catalisadas por diversas enzimas.
- Descrever a importância metabólica da glutatona.
- Reconhecer que os xenobióticos podem causar efeitos farmacológicos, tóxicos, imunológicos e carcinogênicos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Estamos expostos a uma grande variedade de substâncias químicas estranhas (os **xenobióticos**), tanto a compostos que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal quanto a compostos sintéticos presentes em fármacos, aditivos alimentares e poluentes ambientais. O conhecimento do metabolismo de xenobióticos é essencial para a compreensão de farmacologia, terapêutica, toxicologia e tratamento da doença. Todas essas áreas envolvem a administração ou a exposição a xenobióticos. Muitos xenobióticos presentes em alimentos de origem vegetal apresentam efeitos potencialmente benéficos (p. ex., atuando como antioxidantes; Capítulo 45), e o conhecimento de seu metabolismo permitirá extrapolar a avaliação de atividade antioxidante *in vitro* para uma ação protetora *in vivo*.

A compreensão dos mecanismos envolvidos no metabolismo xenobiótico permitirá o desenvolvimento de microrganismos e vegetais transgênicos contendo genes que codificam enzimas para o metabolismo de compostos específicos que possam ser utilizados para converter poluentes potencialmente prejudiciais em compostos inócuos. De forma semelhante, organismos transgênicos podem ser usados para a biossíntese de fármacos e de outras substâncias químicas.

OS SERES HUMANOS ENTRAM EM CONTATO COM MUITOS XENOBIÓTICOS QUE PRECISAM SER METABOLIZADOS ANTES DE SEREM EXCRETADOS

Um **xenobiótico** (do grego, *xenos*, “estranho”) é um composto químico estranho ao corpo. As principais classes de xeno-

bióticos de relevância médica são **os fármacos**, **os carcinógenos químicos**, os compostos que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal e vários compostos que são liberados no ambiente de uma forma ou de outra, como bifenilas policloradas (PCBs, do inglês, *polychlorinated biphenyls*), inseticidas e outros pesticidas. Existem mais de 200 mil substâncias químicas ambientais produzidas. A maior parte desses compostos está sujeita ao metabolismo, sobretudo hepático. Enquanto o metabolismo de xenobióticos é geralmente considerado um processo de detoxificação, algumas vezes os próprios metabólitos de compostos inertes ou inócuos são biologicamente ativos. Isso pode ser desejável, como na ativação de um profármaco ao composto ativo, ou pode ser indesejável, como na formação de um agente carcinogênico ou mutagênico a partir de um precursor inerte.

O metabolismo de xenobióticos é geralmente considerado em duas fases. Na **fase 1**, a principal reação envolvida é a **hidroxilação**, catalisada principalmente por membros de uma classe de enzimas conhecidas como **monoxigenases** ou **citocromos P450**. A hidroxilação pode interromper a ação de um fármaco, embora nem sempre isso ocorra. Além da hidroxilação, essas enzimas catalisam ampla variedade de reações, inclusive as que envolvem desaminação, desalogenação, dessulfatação, epoxidação, peroxigenação e redução. As reações que envolvem a hidrólise (p. ex., catalisadas por esterases) e várias outras reações não catalisadas pelo citocromo P450 também ocorrem na fase 1.

O metabolismo de fase 1 origina compostos mais reativos, introduzindo grupos que podem ser conjugados com ácido glicurônico, sulfato, acetato, glutatona ou aminoácidos no metabolismo de fase 2. Este produz **compostos polares** que são hidrossolúveis e que podem, portanto, ser prontamente excretados na urina ou na bile. Os xenobióticos muito

hidrofóbicos permaneceriam quase indefinidamente no tecido adiposo se não fossem convertidos em formas mais polares.

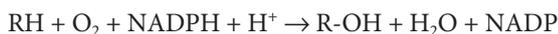
Em alguns casos, as reações metabólicas da fase 1 convertem xenobióticos de compostos **inativos** em **biologicamente ativos**. Nesses casos, os xenobióticos originais são conhecidos como **pró-fármacos** ou **pró-carcinógenos**. Algumas vezes, reações adicionais da fase 1 (p. ex., reações adicionais de hidroxilação) convertem esses compostos ativos em formas menos ativas ou inativas antes da conjugação. Ainda, em outros casos, as próprias reações de conjugação convertem os produtos ativos das reações da fase 1 em compostos menos ativos ou inativos, que são excretados. Em pouquíssimos casos, a conjugação pode aumentar a atividade biológica de um xenobiótico.

AS ISOFORMAS DO CITOCROMO P450 HIDROXILAM INÚMEROS XENOBIÓTICOS NA FASE 1 DE SEU METABOLISMO

A principal reação envolvida no metabolismo de fase 1 é a **hidroxilação**, catalisada por uma família de enzimas conhecidas como **monoxigenases** ou **citocromos P450**. Existem pelo menos 57 genes que codificam citocromos P450 no genoma humano.

O citocromo P450 é uma enzima do tipo heme. Ele é assim designado porque foi originalmente descoberto quando se observou que preparações de microsomas (fragmentos do retículo endoplasmático) que tinham sido reduzidas quimicamente e, em seguida, expostas ao monóxido de carbono exibiam pico de absorção em 450 nm. Aproximadamente 50% dos fármacos comuns que os seres humanos ingerem são metabolizados por isoformas do citocromo P450. Elas também atuam sobre hormônios esteroides, carcinógenos e poluentes. Os principais citocromos P450 envolvidos no metabolismo dos fármacos são membros das famílias CYP1, CYP2 e CYP3 (ver adiante). Além do seu papel no metabolismo de xenobióticos, os citocromos P450 são importantes no metabolismo de diversos compostos fisiológicos – por exemplo, na síntese de hormônios esteroides (ver Capítulo 26) e na conversão da vitamina D em seu metabólito ativo, o calcitriol (ver Capítulo 44).

A reação completa catalisada por um citocromo P450 é:



O papel do NADPH é reduzir o citocromo P450; o citocromo reduzido em seguida reduz o oxigênio à água e ao grupo hidroxil que é introduzido no substrato. O mecanismo da reação é complexo (ver Figura 12-6). Utilizando $^{18}O_2$, mostrou-se que um átomo de oxigênio forma o grupamento hidroxil do R-OH e o outro forma a água. Esse duplo destino do oxigênio explica a antiga designação das monoxigenases como “**oxidases de função mista**”.

As isoformas do citocromo P450 constituem uma superfamília de enzimas que contêm heme

Devido ao **grande número de isoformas** de citocromo P450 que foram descobertas (cerca de 150, em uma ampla faixa de organismos, incluindo bactérias), é importante ter uma

nomenclatura sistemática para as enzimas e seus genes. Ela baseia-se na homologia da sequência de aminoácidos das enzimas. O símbolo-raiz abreviado CYP representa um citocromo P450. Essa abreviatura é seguida por um algarismo arábico que designa a **família**; os citocromos P450 são incluídos na mesma família se exibirem identidade de 40% ou mais na sequência de aminoácidos. O algarismo arábico é seguido de uma letra maiúscula que indica a **subfamília**; os P450s são reunidos na mesma subfamília se exibirem identidade de sequência maior que 55%. Em seguida, os P450s **individuais** recebem algarismos arábicos na sua subfamília. Assim, CYP1A1 indica um citocromo P450 que é membro da família 1 e da subfamília A, tendo sido o primeiro membro identificado dessa subfamília. A nomenclatura para os **genes** que codificam os citocromos P450 é a mesma, exceto pelo fato de que os algarismos são utilizados em itálico; por conseguinte, o gene que codifica CYP1A1 é o *CYP1A1*. As famílias de citocromos P450 nos tecidos humanos e suas principais funções estão mostradas na Tabela 47-1.

Em mamíferos, os citocromos P450 estão presentes em quantidades maiores nos **hepatócitos** e nas hemácias, porém são encontrados provavelmente em todos os tecidos. No fígado e na maioria dos outros tecidos, estão localizados principalmente nas **membranas do retículo endoplasmático liso**, que constituem parte da **fração microsomal** quando o tecido é

TABELA 47-1 Famílias de citocromos P450 nos tecidos humanos

Família	Função	Membros
CYP1	Metabolismo de fármacos e esteroides (sobretudo estrogênio)	3 subfamílias
CYP2	Metabolismo de fármacos e esteroides	13 subfamílias
CYP3	Metabolismo de fármacos e esteroides (incluindo testosterona)	1 subfamília
CYP4	Metabolismo do ácido araquidônico e de ácidos graxos	6 subfamílias
CYP5	Tromboxano A ₂ -sintase	1 subfamília
CYP7	Biossíntese de ácidos biliares e esteroide 7 α -hidroxilase	2 subfamílias
CYP8	Diversas, incluindo prostaciclina-sintase e síntese de ácidos biliares	2 subfamílias
CYP11	Biossíntese de esteroides	2 subfamílias
CYP17	Biossíntese de esteroides, 17 α -hidroxilase	1 subfamília
CYP19	Biossíntese de esteroides, aromatase	1 subfamília
CYP20	Função desconhecida	1 subfamília
CYP21	Biossíntese de esteroides	2 subfamílias
CYP24	Catabolismo da vitamina D	1 subfamília
CYP26	Ácido retinoico hidroxilase	3 subfamílias
CYP27	Diversas, incluindo síntese de ácidos biliares e calcidiol 1 α -hidroxilase	3 subfamílias
CYP39	7 α -hidroxilação do 24-hidroxicolesterol	1 subfamília
CYP46	Colesterol-24-hidroxilase	1 subfamília
CYP51	Biossíntese de colesterol	1 subfamília

submetido a fracionamento subcelular. Nos microsossomos hepáticos, os citocromos P450 podem constituir até 20% das proteínas totais. Os P450s são encontrados na maioria dos tecidos, embora frequentemente em quantidades pequenas em comparação com as quantidades encontradas no fígado. Na **glândula suprarrenal**, são encontrados na **mitocôndria**, bem como no retículo endoplasmático; as diversas hidroxilases presentes na glândula estão envolvidas na biossíntese do colesterol e dos hormônios esteroides. O sistema do citocromo P450 mitocondrial difere do sistema microsossomal, visto que ele utiliza uma flavoproteína ligada ao NADPH, a **adrenodoxina-redutase**, e uma proteína não heme contendo ferro-enxofre, a **adrenodoxina**. Além disso, as isoformas P450 envolvidas na biossíntese dos esteroides são, em geral, muito mais restritas na sua especificidade pelos substratos.

Não apenas existe grande variedade de citocromos P450, como também essas enzimas apresentam especificidades redundantes relacionadas ao substrato, de modo que uma faixa muito ampla de xenobióticos pode ser metabolizada por um ou por outro dos citocromos P450.

O NADPH, e não o NADH, está envolvido no mecanismo de reação do citocromo P450, em uma reação catalisada pela **NADPH-citocromo P450-redutase**. Os elétrons são transferidos do NADPH para a NADPH-citocromo P450-redutase e, em seguida, para o citocromo P450. Isso leva à **ativação redutora do oxigênio molecular**, e, posteriormente, um átomo de oxigênio é inserido no substrato. O **citocromo b₅**, outra hemoproteína encontrada nas membranas do retículo endoplasmático liso (ver Capítulo 12), pode estar envolvido como doador de elétrons em alguns casos.

As isoformas do citocromo P450 são, em sua maioria, **induzíveis**. Por exemplo, a administração de fenobarbital ou de outros fármacos provoca hipertrofia do retículo endoplasmático liso e aumento de 3 a 4 vezes na quantidade de citocromo P450 em 4 a 5 dias. Na maioria dos casos, esse fato envolve transcrição aumentada de mRNA. Entretanto, em alguns casos, a indução envolve a estabilização do mRNA ou da própria enzima, ou aumento na tradução do mRNA.

A indução do citocromo P450 representa **interações farmacológicas**, quando os efeitos de determinado fármaco são alterados pela administração prévia, simultânea ou subsequente de outro. Por exemplo, o anticoagulante **varfarina** é metabolizado pela **CYP2C9**, que é induzida pelo fenobarbital. A indução de CYP2C0 pelo fenobarbital aumentará o metabolismo da varfarina, reduzindo sua eficácia, e a dose deverá ser aumentada. Outro exemplo envolve **CYP2E1**, que é induzido pelo consumo de **etanol**. Esse P450 metaboliza alguns solventes amplamente utilizados e compostos encontrados na fumaça do tabaco, e muitos deles são **pró-carcinógenos** estabelecidos. Se a atividade de CYP2E1 for induzida pelo etanol, esse fato poderá aumentar o risco de carcinogenicidade.

Compostos que ocorrem naturalmente em alimentos também podem afetar o citocromo P450. A toranja (*grapefruit*) contém uma variedade de furanocumarinas, que inibem o citocromo P450 e, portanto, afetam o metabolismo de muitos fármacos. Alguns fármacos são ativados pelo citocromo P450, de modo que a toranja reduzirá sua atividade; outros são inativados pelo citocromo P450, de modo que a toranja aumenta sua atividade. Os fármacos que são afetados incluem

as estatinas, o omeprazol, os anti-histamínicos e os antidepressivos benzodiazepínicos.

O **polimorfismo** dos citocromos P450 pode explicar muitas das variações nas respostas aos fármacos observadas entre os pacientes – variantes com baixa atividade catalítica que levam ao metabolismo mais lento do substrato e, portanto, à ação prolongada do fármaco e ao seu acúmulo no organismo. Outro polimorfismo interessante é o do **CYP2A6**, que está envolvido no metabolismo da **nicotina** à conitina. Foram identificados três alelos **CYP2A6**: um tipo selvagem e dois alelos nulos ou inativos. Relatou-se que os indivíduos com alelos nulos, que apresentam comprometimento do metabolismo da nicotina, são aparentemente protegidos de se tornarem fumantes dependentes de tabaco. Esses indivíduos fumam menos, presumivelmente porque as concentrações sanguíneas e cerebrais permanecem elevadas por mais tempo do que as dos indivíduos com alelo tipo selvagem. Sugeriu-se que a inibição de CYP2A6 pode representar uma nova abordagem para auxiliar no abandono do tabagismo.

A Tabela 47-2 fornece um resumo de algumas características principais do citocromo P450.

TABELA 47-2 Algumas propriedades dos citocromos P450 humanos

<ul style="list-style-type: none"> Estão envolvidos na fase 1 do metabolismo de um grande número de xenobióticos, incluindo talvez 50% dos fármacos utilizados clinicamente; eles podem aumentar, diminuir ou não afetar as atividades de vários fármacos
<ul style="list-style-type: none"> Estão envolvidos no metabolismo de muitos compostos endógenos (p. ex., esteroides)
<ul style="list-style-type: none"> Todos são hemoproteínas
<ul style="list-style-type: none"> Com frequência, exibem ampla especificidade de substrato, atuando em numerosos compostos; conseqüentemente, diferentes citocromos P450 podem catalisar a formação do mesmo produto
<ul style="list-style-type: none"> São catalisadores extremamente versáteis, catalisando, talvez, cerca de 60 tipos de reações. Entretanto, eles catalisam basicamente reações que envolvem a introdução de um átomo de oxigênio no substrato e outro na água
<ul style="list-style-type: none"> Seus produtos hidroxilados são mais hidrossolúveis do que seus substratos geralmente lipofílicos, facilitando a excreção
<ul style="list-style-type: none"> O fígado contém as maiores quantidades, embora sejam encontrados na maioria dos tecidos, incluindo o intestino delgado, o encéfalo e os pulmões
<ul style="list-style-type: none"> Estão localizados no retículo endoplasmático liso ou nas mitocôndrias (hormônios esteroideogênicos)
<ul style="list-style-type: none"> Em alguns casos, seus produtos são mutagênicos ou carcinogênicos.
<ul style="list-style-type: none"> Muitos apresentam massa molecular de cerca de 55 kDa
<ul style="list-style-type: none"> Muitos são induzíveis, resultando em uma causa das interações farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> Muitos são inibidos por vários fármacos ou por seus produtos metabólicos, constituindo outra causa de interações farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> Alguns exibem polimorfismos genéticos, que podem resultar em metabolismo farmacológico atípico
<ul style="list-style-type: none"> Suas atividades podem estar alteradas em tecidos doentes (p. ex., cirrose), afetando o metabolismo dos fármacos
<ul style="list-style-type: none"> No futuro, a genotipagem do perfil de citocromos P450 dos pacientes (p. ex., para detectar polimorfismos) poderá permitir a individualização do tratamento farmacológico

AS REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO PREPARAM OS XENOBIÓTICOS PARA A SUA EXCREÇÃO NA FASE 2 DE SEU METABOLISMO

Nas reações da fase 1, os xenobióticos são geralmente convertidos em derivados hidroxilados mais polares. Nas reações da fase 2, esses derivados são conjugados com moléculas, como o ácido glicurônico, o sulfato e a glutatona. Isso os torna ainda mais hidrossolúveis, sendo, por fim, excretados na urina ou na bile.

A seguir, são descritos cinco tipos de reações de fase 2

Glicuronidação

A glicuronidação da bilirrubina foi discutida no Capítulo 31; os xenobióticos são glicuronidados de forma semelhante, utilizando o ácido UDP-glicurônico, catalisado por uma variedade de glicuronosiltransferases, presentes tanto no retículo endoplasmático quanto no citosol. Moléculas como o 2-acetilaminofluoreno (um carcinógeno), a anilina, o ácido benzoico, o meprobamato (um tranquilizante), o fenol e muitos esteroides são excretadas na forma de glicuronídeos. O glicuronídeo pode estar ligado ao oxigênio, ao nitrogênio ou a grupos com enxofre dos substratos. A glicuronidação constitui, provavelmente, a reação de conjugação mais frequente.

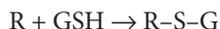
Sulfatação

Alguns alcoóis, as arilaminas e os fenóis são sulfatados. O **doador de sulfato** nessas reações e em outras reações de sulfatação biológica (p. ex., sulfatação dos esteroides, dos glicosaminoglicanos, dos glicolípídeos e das glicoproteínas) é a **3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS)** (ver Capítulo 24) – denominado “sulfato ativo”.

Conjugação com glutatona

Glutatona-S-transferases

O tripeptídeo glutatona (γ -glutamilsteínilglicina) é importante no metabolismo de fase II de compostos eletrofílicos, formando glutatona S-conjugados que são excretados na urina e na bile. A reação catalisada pelas glutatona-S-transferases é:



em que R é um composto eletrofílico.

Existem quatro classes de glutatona-S-transferases citosólicas e duas classes de enzima ligada à membrana microsomal, assim como uma classe kappa, que é estruturalmente distinta e encontrada na mitocôndria e nos peroxissomos. As glutatona-S-transferases são homodímeros ou heterodímeros de pelo menos sete tipos diferentes de subunidades, e diferentes subunidades são induzidas por xenobióticos distintos.

Como as glutatona-S-transferases também se ligam a diversos ligantes que não são substratos, incluindo a bilirrubina, os hormônios esteroides e alguns carcinógenos e seus metabólitos, elas são, às vezes, conhecidas como **ligandinas**. A glutatona-S-transferase liga-se à bilirrubina em um sítio distinto

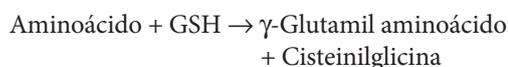
do sítio catalítico, transportando-a da corrente sanguínea ao fígado e, em seguida, para o retículo endoplasmático para conjugação com o ácido glicurônico e excreção na bile (ver Capítulo 31). A ligação de carcinógenos captura-os, prevenindo suas ações sobre o DNA.

O fígado apresenta atividade muito alta de glutatona-S-transferase; *in vitro*, todo o reservatório de glutatona pode ser depletado em minutos pela exposição aos substratos xenobióticos. A atividade da glutatona-S-transferase encontra-se positivamente regulada em muitos tumores, levando à resistência à quimioterapia.

Os conjugados de glutatona podem ser transportados para fora do fígado, onde são substratos para γ -glutamiltansferases e dipeptidases extracelulares. Os S-conjugados de cisteína resultantes são capturados por outros tecidos (sobretudo os rins) e N-acetilados para dar origem aos ácidos mercaptúricos (N-acetil cisteína S-conjugados), que são excretados na urina. Alguns S-conjugados de glutatona hepáticos penetram nos capilares biliares, onde são degradados a S-conjugados de cisteína, que são, em seguida, capturados pelo fígado para sofrer N-acetilação e serem novamente excretados na bile.

Além do seu papel no metabolismo de fase 2, a glutatona possui diversos outros papéis no metabolismo:

1. Realiza a redução do potencialmente tóxico **peróxido de hidrogênio** à água na reação catalisada pela glutatona peroxidase.
2. É um importante **redutor intracelular e antioxidante**, ajudando a manter os grupos -SH essenciais das enzimas em seu estado reduzido. Sua participação na anemia hemolítica causada pela deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase é discutida nos Capítulos 20 e 53.
3. Um ciclo metabólico que envolve GSH como carreador foi implicado no **transporte de alguns aminoácidos** através das membranas nos rins. A primeira reação do ciclo é apresentada a seguir.

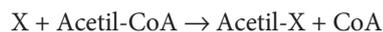


Essa reação transfere aminoácidos através da membrana plasmática, e o aminoácido é subsequentemente hidrolisado de seu complexo com glutamato, com nova síntese de GSH a partir da cisteínilglicina. A enzima que catalisa a reação anteriormente descrita é a **γ -glutamiltansferase (GGT)**. Essa enzima está presente na membrana plasmática das células tubulares renais e nas células dos ductos biliares, bem como no retículo endoplasmático dos hepatócitos. A enzima possui algum valor diagnóstico, visto que é liberada no sangue pelos hepatócitos em várias doenças hepatobiliares (ver Capítulo 48).

Outras reações

As duas reações mais importantes além da conjugação são a acetilação e a metilação.

Acetilação – é representada por



em que X representa um xenobiótico. Como ocorre em outras reações de acetilação, **acetil-CoA** é doador de acetil.

Essas reações são catalisadas por **acetiltransferases** presentes no citosol de vários tecidos, particularmente do fígado. O fármaco **isoniazida**, utilizado no tratamento da tuberculose, é submetido à acetilação. Existe o polimorfismo das acetiltransferases, gerando indivíduos que são classificados como **acetiladores lentos ou rápidos**. Os acetiladores lentos estão mais sujeitos aos efeitos tóxicos da isoniazida, pois esse fármaco persiste por mais tempo nesses indivíduos.

Metilação – poucos xenobióticos sofrem metilação por metiltransferases, utilizando a S-adenosilmetionina (ver Figura 29-18) como doador de metil.

AS ATIVIDADES DE ENZIMAS QUE METABOLIZAM XENOBIÓTICOS SÃO AFETADAS POR IDADE, SEXO E OUTROS FATORES

Vários fatores podem afetar as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos. As atividades dessas enzimas podem diferir de modo substancial entre as **espécies**. Assim, por exemplo, a possível **toxicidade** ou **carcinogenicidade** de um xenobiótico não pode ser extrapolada livremente de um animal experimental para os seres humanos ou para outras espécies animais. Existem diferenças significativas nas atividades enzimáticas entre os indivíduos, e muitas delas parecem ser devido aos **fatores genéticos**. As atividades de algumas dessas enzimas variam de acordo com a **idade** e o **sexo**.

A ingestão de alguns xenobióticos pode causar **indução enzimática**. Por isso, é importante saber se um indivíduo foi exposto ou não a esses agentes indutores quando ele é avaliado em respostas bioquímicas aos xenobióticos. Os metabólitos de alguns xenobióticos podem **inibir** ou **estimular** as atividades das enzimas que metabolizam esses compostos. Também nesse caso, isso pode afetar as doses de alguns fármacos administrados a pacientes. Várias **doenças** (p. ex., cirrose hepática) podem afetar as atividades das enzimas envolvidas no

metabolismo dos fármacos, exigindo, algumas vezes, o ajuste das doses de vários fármacos utilizados por pacientes com esses distúrbios.

AS RESPOSTAS AOS XENOBIÓTICOS INCLUEM EFEITOS FARMACOLÓGICOS, TÓXICOS, IMUNOLÓGICOS E CARCINOGÊNICOS

Existem muito poucos xenobióticos, incluindo fármacos, que não apresentam pelo menos alguns efeitos tóxicos se a dose for suficientemente elevada. Os **efeitos tóxicos dos xenobióticos** cobrem amplo espectro, porém os efeitos principais podem ser classificados em três categorias gerais (**Figura 47-1**).

1. A ligação covalente de metabólitos xenobióticos às macromoléculas, incluindo **DNA**, **RNA** e **proteína**, pode levar ao dano celular (**citotoxicidade**), que poderá ser grave o suficiente para levar à morte celular. Por exemplo, em resposta à lesão do DNA, os **mecanismos de reparo do DNA** da célula são ativados. Parte dessa resposta envolve a transferência de múltiplas unidades de ADP-ribose para as proteínas que se ligam ao DNA, catalisada pela poli(ADP-ribose-polimerase). A fonte de ADP-ribose é o NAD, e, em resposta ao dano grave do DNA, ocorre considerável depleção de NAD. Esse fato, por sua vez, leva ao comprometimento grave da geração de ATP e à morte celular.
2. O metabólito reativo de um xenobiótico pode se ligar a uma proteína, atuando como hapteno e alterando sua **antigenicidade**. Por conta própria, ele não estimulará a produção de anticorpo, mas faz isso quando ligado a uma proteína. Os anticorpos resultantes reagem não apenas com a proteína modificada, mas também com a proteína não modificada, potencialmente imitando uma **doença autoimune**.
3. Acredita-se que as reações das espécies ativadas dos carcinógenos químicos com o **DNA** sejam de grande importância na **carcinogênese química**. Alguns compostos químicos

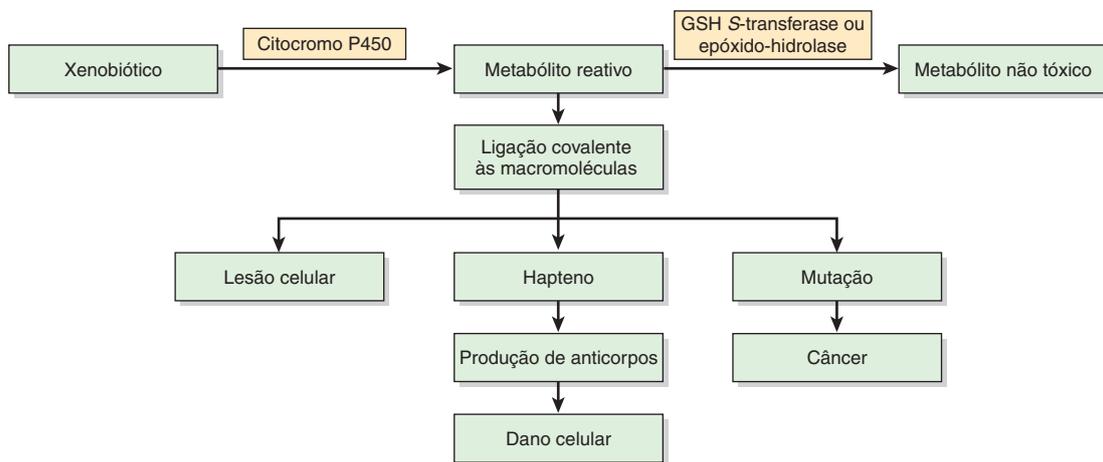


FIGURA 47-1 Esquema simplificado que demonstra como o metabolismo de um xenobiótico pode resultar em lesão celular, dano imunológico ou câncer. Neste caso, a conversão do xenobiótico em metabólito ativo é catalisada por um citocromo P450, ao passo que a conversão do metabólito reativo (p. ex., um epóxido) em metabólito atóxico é catalisada pela GSH S-transferase ou pela epóxido-hidrolase.

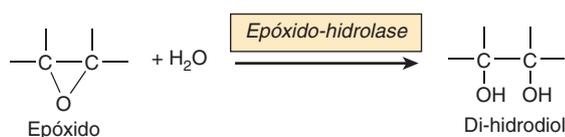


FIGURA 47-2 A reação da epóxido-hidrolase.

(p. ex., benzo[α]pireno) exigem a sua ativação pelo citocromo P450 do retículo endoplasmático para se transformar em agentes carcinogênicos (razão pela qual são denominados **carcinógenos indiretos**). As atividades das enzimas que metabolizam os xenobióticos e que estão presentes no retículo endoplasmático ajudam a determinar se esses compostos se transformarão em agentes carcinogênicos ou serão “destoxificados”.

A enzima **epóxido-hidrolase** é de interesse, pois pode exercer efeito protetor contra determinados carcinógenos. Os produtos da ação do citocromo P450 sobre alguns substratos pró-carcinogênicos são **epóxidos**. Os epóxidos são altamente reativos e mutagênicos ou carcinogênicos. A epóxido-hidrolase está presente nas membranas do retículo endoplasmático como citocromo P450. Ela atua nesses compostos, convertendo-os em di-hidrodióis muito menos reativos. A reação catalisada pela epóxido-hidrolase está mostrada na **Figura 47-2**.

RESUMO

- Os xenobióticos são compostos químicos estranhos ao corpo, incluindo fármacos, aditivos nutricionais e poluentes ambientais, bem como compostos que ocorrem naturalmente em alimentos de origem vegetal.
- Os xenobióticos são metabolizados em duas fases. A principal reação de fase 1 consiste na hidroxilação catalisada por uma variedade de monooxigenases, conhecidas como citocromos P450. Na fase 2, as espécies hidroxiladas são conjugadas com uma variedade de compostos hidrofílicos, como o ácido glicurônico, o sulfato ou a glutatona. A ação combinada dessas duas fases converte os compostos hidrofílicos em moléculas hidrossolúveis que podem ser excretadas na urina ou na bile.
- Os citocromos P450 catalisam reações que introduzem um átomo de oxigênio derivado do oxigênio molecular no substrato, gerando um produto hidroxilado e o outro na água. O NADPH e a NADPH-citocromo P450-redutase estão envolvidos no mecanismo de reação.

- Os citocromos P450 são hemoproteínas que, em geral, exibem ampla especificidade de substrato, atuando em numerosos substratos endógenos e exógenos. Nos tecidos humanos, são encontrados pelo menos 57 genes que codificam os citocromos P450.
- Os citocromos P450 estão geralmente localizados no retículo endoplasmático das células, sobretudo no fígado.
- Muitos citocromos P450 são induzíveis. Esse fato possui implicações importantes para interações entre fármacos.
- Existem também citocromos P450 mitocondriais que estão envolvidos na biossíntese do colesterol e dos esteroides. Eles utilizam uma proteína de enxofre contendo ferro, a adrenodoxina, que não é necessária para as isoformas microsossomais.
- As reações de conjugação da fase 2 são catalisadas por enzimas, como as glicuroniltransferases, as sulfotransferases e as glutatona S-transferases, que utilizam como doadores, respectivamente, o UDP-ácido glicurônico, o PAPS (sulfato ativo) e a glutatona.
- A glutatona não apenas desempenha importante papel nas reações de fase 2 como também é um agente redutor intracelular.
- Os xenobióticos podem produzir uma variedade de efeitos biológicos, incluindo respostas farmacológicas, toxicidade, reações imunológicas e câncer.

REFERÊNCIAS

- caskey CT: Using genetic diagnosis to determine individual therapeutic utility. *Annu Rev Med* 2010;61:1.
- Cupp MJ, Tracy TS: Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications. *Am Fam Physician* 1998;57(1):107–116.
- Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>
- Ingelman-Sundberg M: Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. *N Engl J Med* 2008;358:637.
- Kalant H, Grant DM, Mitchell J (editors): *Principles of Medical Pharmacology*, 7th ed. Saunders Elsevier, 2007. (Chapters 4 [Drug Biotransformation by Riddick DS] and 10 [Pharmacogenetics and Pharmacogenomics by Grant DM and Kalow W] are particularly relevant to this chapter).
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (editors): *Basic & Clinical Pharmacology*, 12th ed. McGraw-Hill, 2011.
- Lee C, Morton CC: Structural genomic variation and personalized medicine. *N Engl J Med* 2008;358:740.
- Pharmacogenomics. Human Genome Project Information. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine.pharma.shtml
- Rang HP, Dale MM, James M, Ritter JM, Rod J, Flower RJ: *Rang & Dale's Pharmacology*, 7th ed. Churchill Livingstone, 2011.

Bioquímica clínica

David A. Bender, Ph.D., Joe Varghese, M.B.B.S., M.D., Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Explicar a importância dos testes laboratoriais nas medecinas clínica e veterinária.
- Explicar o que significa a faixa de referência dos resultados de um teste.
- Explicar a diferença entre a precisão e a exatidão de um método de ensaio, e explicar a sensibilidade e a especificidade de um método de ensaio.
- Explicar o que significam a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo de um teste laboratorial.
- Listar as técnicas normalmente utilizadas em laboratório diagnóstico que realiza testes bioquímicos e explicar o princípio de cada método.
- Listar as causas que levam às anormalidades nos níveis sanguíneos de analitos.
- Explicar por que as altas concentrações plasmáticas de enzimas são consideradas indicadoras de lesão tecidual.
- Descrever, em termos gerais, as diferentes exigências para a medição de uma enzima em amostra de plasma e para a utilização de uma enzima para medir um elemento.
- Descrever os principais testes que podem ser utilizados para avaliar a função dos rins, do fígado e da tireoide; descrever marcadores de risco cardiovascular e de função gastrointestinal.

IMPORTÂNCIA DOS TESTES LABORATORIAIS NA MEDICINA

Os testes laboratoriais de um ou outro tipo representam uma parte essencial da medicina. Testes bioquímicos podem ser utilizados para pesquisar uma doença, para confirmar (ou descartar) um diagnóstico estabelecido no exame clínico, para monitorar a progressão de uma doença e o resultado do tratamento (**Tabela 48-1**). As amostras de sangue e urina são normalmente utilizadas; algumas vezes, podem ser usadas fezes, saliva ou líquido cerebrospinal. Em raras ocasiões, podem ser utilizadas amostras da biópsia de tecidos. A maior parte do conhecimento e da compreensão sobre as causas básicas das doenças metabólicas e dos efeitos da doença no metabolismo veio da análise de metabólitos no sangue e na urina e da medição de enzimas no sangue. Por sua vez, esse conhecimento permitiu avanços no tratamento das doenças e no desenvolvimento de melhores fármacos.

Os avanços na tecnologia significam que muitos testes que foram anteriormente realizados apenas em laboratórios especializados podem agora ser realizados junto ao leito, no consultório médico ou na prática veterinária, algumas vezes até em casa pelos próprios pacientes, com máquinas automatizadas

de utilização simples e que necessitem apenas de quantidade limitada de treinamento para fornecer resultados confiáveis. Outros testes ainda são conduzidos nos laboratórios de hospitais ou por laboratórios particulares de química clínica, com as amostras sendo enviadas pelo médico responsável. Alguns testes que são requisitados com menor frequência e que podem ser tecnicamente mais exigentes são realizados apenas em centros especializados. Estes envolvem, em geral, técnicas especializadas para estudar doenças metabólicas raras (e algumas vezes recém-descobertas). Além disso, os testes de amostras de atletas (e de cavalos de corrida) para fármacos que aumentam o desempenho e de outras substâncias proibidas são realizados normalmente apenas em um número limitado de laboratórios especialmente licenciados.

CAUSAS DE ANORMALIDADES NOS NÍVEIS DE ANALITOS MEDIDOS EM LABORATÓRIO

Um grande número de diferentes condições pode levar a anormalidades nos resultados dos testes laboratoriais; algumas

TABELA 48-1 Principais usos dos exames bioquímicos com exemplos selecionados

Diagnóstico precoce da doença Uso da concentração plasmática de troponina cardíaca I no diagnóstico precoce de infarto do miocárdio
Sugestão de tratamento racional da doença O nível elevado do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) fornece indicação para tratamento com fármacos que reduzem o colesterol (p. ex., estatinas) em indivíduos com risco de doença cardiovascular
Como testes de triagem para o diagnóstico precoce da doença Medição do hormônio estimulador da tireoide (TSH) no diagnóstico de hipotireoidismo congênito
Monitoramento da progressão da doença Medição da alanina-aminotransferase (ALT) sérica para monitorar o progresso da hepatite viral
Avaliação da resposta da doença à terapia Medição de TSH em pacientes que estão sendo tratados por hipotireoidismo ou hipertireoidismo
Investigação de causas e mecanismos da doença Demonstração da natureza do distúrbio genético na fibrose cística

delas estão listadas na Tabela 48-2. A lesão tecidual que leva ao comprometimento das membranas celulares e ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática leva ao extravasamento de material intracelular para a corrente sanguínea (p. ex., a liberação de creatina-cinase MB para a corrente sanguínea após infarto do miocárdio). Em outros casos, a síntese de proteínas e hormônios encontra-se aumentada ou diminuída (p. ex., proteína C-reativa) nos estados inflamatórios ou hormônios nos distúrbios endócrinos). A insuficiência renal e a insuficiência hepática levam ao acúmulo de diversos compostos (p. ex., creatinina e amônia, respectivamente) no sangue, devido a uma incapacidade do órgão em questão de excretar ou metabolizar o composto específico.

FAIXA DE REFERÊNCIA

Para qualquer composto avaliado (um **analito**), existe uma faixa de valores em torno da média que pode ser considerada normal. Ela é o resultado de variações biológicas entre indivíduos. Além disso, variações diárias ou semanais podem ocorrer nos resultados de um mesmo indivíduo. Portanto, o primeiro passo no estabelecimento de qualquer teste laboratorial para pesquisa ou diagnóstico de uma doença ou para monitorar o tratamento é a determinação da faixa de resultados em uma população de indivíduos saudáveis. No caso de alguns testes, isso também significará determinar as faixas normais de analitos em indivíduos de diferentes faixas etárias. A faixa normal de alguns analitos será diferente entre homens e mulheres, e poderão ser observadas diferenças entre grupos étnicos distintos que também deverão ser consideradas.

Se os resultados obtidos para um grupo populacional alvo saudável (dependendo da idade, do sexo e, talvez, da etnicidade) forem distribuídos de forma estatisticamente normal (i.e., os resultados apresentem distribuição gaussiana simétrica em torno da média), então a faixa normal ou aceitável será considerada como $\pm 2 \times$ o desvio-padrão em torno da média. Essa faixa inclui 95% da população-alvo e é conhecida como faixa de referência. Os valores fora dessa faixa são considerados

TABELA 48-2 Causas comuns para as anormalidades nos analitos sanguíneos com exemplos selecionados

Diversas condições fisiológicas Níveis séricos e urinários elevados de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na gravidez; lactato sanguíneo elevado após exercício extenuante
Alterações no equilíbrio de fluido Hipernatremia (elevada concentração de sódio sérico) em pacientes que estejam desidratados devido à sudorese excessiva ou a vômitos
Alterações no pH sanguíneo O bicarbonato sérico encontra-se baixo na acidose metabólica (p. ex., cetoacidose diabética) e elevado na alcalose metabólica (p. ex., vômitos intensos devidos à estenose pilórica)
Alterações da função endócrina Os níveis séricos de TSH estão baixos no hipertireoidismo primário e elevados no hipotireoidismo primário
Alterações no estado nutricional A albumina sérica e a proteína de ligação ao retinol encontram-se reduzidas na desnutrição proteico-energética
Lesão ou morte celular (necrose) A creatina-cinase MB sérica encontra-se elevada no infarto do miocárdio; a amilase pancreática sérica está elevada na pancreatite
Inflamação aguda ou crônica (incluindo infecção) A proteína C-reativa está elevada na inflamação
Doenças genéticas A fenilalanina plasmática está elevada na fenilcetonúria; a amônia sérica está elevada em distúrbios do ciclo da ureia
Falência de órgãos A creatinina sérica e a ureia estão elevadas na insuficiência renal; a amônia e a bilirrubina séricas estão elevadas na insuficiência hepática
Traumatismo A mioglobina sérica pode estar elevada após lesão muscular
Câncer Vários marcadores de tumores (ver Capítulo 56) encontram-se elevados em cânceres específicos (p. ex., α -fetoproteína no câncer hepatocelular, antígeno prostático específico no câncer de próstata)
Fármacos Os fármacos utilizados na quimioterapia do câncer aumentam o ácido úrico sérico
Venenos Os venenos organofosforados diminuem a atividade da butirilcolinesterase no sangue
Outros O estresse aumenta o cortisol e as catecolaminas séricas

anormais, mercedores de posterior investigação. Se os resultados da população saudável não estiverem distribuídos de forma estatisticamente normal e estiverem distorcidos, então será necessária uma etapa posterior de manipulação estatística antes que uma faixa de referência de 95% possa ser estabelecida.

Para alguns testes, os resultados de diferentes laboratórios irão diferir, visto que, em geral, utilizam diferentes métodos de avaliação. Cada laboratório estabelece o seu próprio conjunto de faixas de referência para a análise que realiza. Alguns laboratórios apresentam os resultados como o valor a ser comparado com a faixa de referência. Outros informam os resultados como o número de desvios-padrão fora da média – o chamado escore Z; este permite que o médico veja o quanto o resultado se encontra afastado da média – em outras palavras, o quanto é anormal. Algumas vezes, os resultados serão apresentados como 5 ou 10 (ou mais) vezes acima do limite superior ao normal.

O uso da faixa de 95% como faixa de referência apresenta uma consequência infeliz. Ao acaso, 5% dos resultados “normais” estarão fora da faixa de referência. Isso se tornou aparente pela primeira vez na década de 1970, quando foram desenvolvidos os analisadores de múltiplos canais capazes de determinar 20 ou mais analitos em cada amostra. Quase todas as amostras forneceram um resultado que se encontrava fora da faixa de referência; no entanto, se o mesmo indivíduo fornecesse uma amostra alguns dias mais tarde, o resultado aparentemente anormal estaria, então, dentro da faixa de referência, embora, ao acaso, o resultado de outro analito pudesse agora estar fora da faixa de referência. Portanto, é incumbência do médico requisitar apenas os testes que sejam relevantes para o suposto diagnóstico, e não pedir análise bioquímica completa.

VALIDADE DOS RESULTADOS LABORATORIAIS

Laboratórios de diagnóstico estão sujeitos à inspeção e a procedimentos reguladores para avaliar a validade de seus resultados e garantir o **controle de qualidade** de seus registros. Essas medidas assegurarão que o valor da concentração, da atividade ou da quantidade de uma substância em uma amostra fornecida represente o melhor valor passível de ser obtido com o método, os reagentes e os instrumentos utilizados e os técnicos envolvidos na obtenção e no processamento da amostra. Além disso, é importante para a equipe médica compreender a validade dos resultados laboratoriais e sua interpretação.

No estabelecimento de um novo teste ou de um novo método, quatro questões devem ser respondidas:

1. **Quão preciso é o método?** Essa é uma medida da reprodutibilidade do método. Se a mesma amostra for analisada várias vezes, quanta variação será observada nos resultados obtidos? A **Figura 48-1** ilustra essa questão. Nesse



FIGURA 48-1 Precisão de um método analítico. O gráfico mostra os resultados de um analito medido diversas vezes na mesma amostra, por dois diferentes métodos analíticos ou pelo mesmo método em dois diferentes laboratórios. Em ambos os casos, o resultado médio é o mesmo. Entretanto, um método ou laboratório, mostrado em azul, apresenta distribuição pequena de resultados e, portanto, baixo desvio-padrão e alta precisão; o outro, mostrado em vermelho, apresenta distribuição elevada de resultados, alto desvio-padrão e baixa precisão.

exemplo, um conjunto de resultados é muito mais preciso do que o outro (existe diferença entre os dois na distribuição dos resultados em torno da média), embora apresentem o mesmo resultado médio. A precisão não é absoluta, mas está sujeita às variações inerentes à complexidade do método utilizado, à estabilidade dos reagentes, à sofisticação do equipamento utilizado para o ensaio e à habilidade dos técnicos envolvidos.

2. **Quão exato é o resultado?** Essa é uma medida de quão próximo o resultado se encontra do valor verdadeiro. A **Figura 48-2** mostra os resultados de ensaios por dois métodos diferentes ou pelo mesmo método, porém realizados em dois laboratórios diferentes. Ambos apresentam precisão semelhante, mas os valores médios são muito diferentes. A partir dessa informação, não é possível dizer qual laboratório está correto (e essa é parte da razão pela qual os laboratórios estabelecem suas próprias faixas de referência). Existem diversos esquemas de controle de qualidade nos quais todos os laboratórios participantes recebem a mesma (mista) amostra de sangue ou urina. Cada laboratório mede os diversos analitos na amostra mista. Os resultados obtidos em todos os laboratórios são colocados em uma curva de distribuição. A média desses valores é calculada e considerada o “valor verdadeiro”. Esse esquema de controle de qualidade permite que cada laboratório participante determine o quão próximo seus resultados se encontram do “valor verdadeiro”.

3. **Quão sensível é o método?** Em outras palavras, qual é a menor concentração do analito que pode ser determinada de forma confiável? Qual é o menor limite de detecção confiável? Esse fato é obviamente importante quando os resultados abaixo da faixa de referência são clinicamente significativos ou quando as amostras que estão sendo analisadas se referem a narcóticos ou substâncias que aumentam o desempenho e são proibidas em um esporte competitivo.

4. **Quão específico é o método?** Esse fato lida com a questão da confiança de que o ensaio esteja, de fato, medindo o

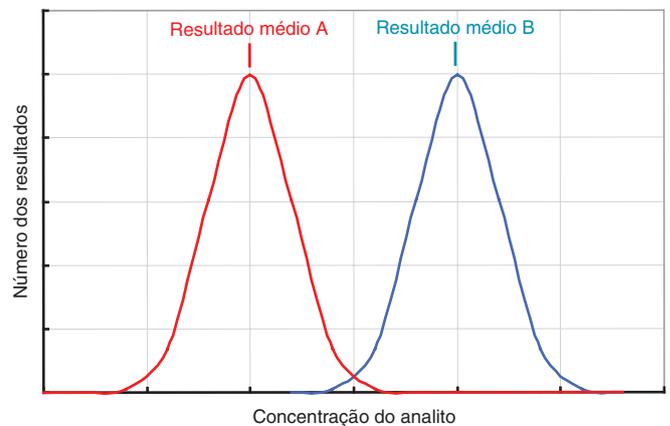


FIGURA 48-2 Exatidão de um método analítico. Dois diferentes métodos analíticos, realizados em múltiplas amostras, ou o mesmo método realizado em dois diferentes laboratórios, com a mesma distribuição de resultados e, portanto, com o mesmo desvio-padrão e a mesma precisão. Entretanto, os valores médios dos analitos obtidos para os dois métodos ou laboratórios são muito diferentes; não é possível dizer qual resultado está mais próximo do valor verdadeiro.

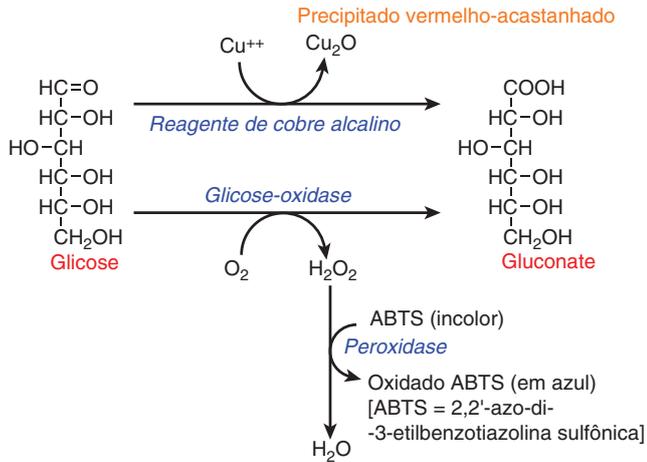


FIGURA 48-3 Especificidade de um método analítico. Medição da glicose sanguínea por dois métodos. A redução química do Cu²⁺ em solução alcalina detectará não apenas a glicose, mas também qualquer outro açúcar redutor e outras substâncias, como a vitamina C. A oxidação enzimática da glicose por meio da glicose-oxidase é uma reação específica; nenhum outro composto será oxidado e nem contribuirá para o valor obtido.

analito de interesse. Por exemplo, o método atualmente obsoleto para avaliar a glicose no sangue e na urina usava uma solução alcalina de cobre (Cu²⁺), que era reduzida a Cu⁺ pela glicose. Entretanto, outros compostos redutores presentes na urina ou no sangue, como a xilose ou a vitamina C, também reduzem a glicose, fornecendo resultado falsamente positivo. Os métodos modernos para avaliação da glicose dependem da enzima glicose-oxidase, que reage apenas com a glicose e, portanto, é altamente específica. Entretanto, um dos produtos da ação da glicose-oxidase sobre a glicose é o peróxido de hidrogênio; o segundo passo no ensaio é a redução do peróxido de hidrogênio produzido a água e oxigênio, usando peroxidase. Um composto incolor que se torna azul quando oxidado pelo oxigênio produzido também está presente no ensaio. Concentrações elevadas de vitamina C, como seria observado quando o paciente está tomando suplementos vitamínicos, reduzem o corante de volta à sua forma incolor, fornecendo resultado falso-negativo (Figura 48-3).

AVALIAÇÃO DA VALIDADE CLÍNICA DE UM TESTE LABORATORIAL

Os quatro critérios apresentados devem ser estabelecidos para cada método analítico. Além disso, o **valor clínico** do teste deve ser estabelecido levando em consideração a sua sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo (Tabela 48-3). Aqui, infelizmente, os mesmos dois termos – sensibilidade e especificidade – são usados, mas com diferentes significados dos utilizados no estabelecimento do método analítico.

A **sensibilidade** de um teste refere-se à **porcentagem de resultados de testes positivos em pacientes com a doença** (“verdadeiro-positivo”). O teste para fenilcetonúria é altamente sensível; um teste positivo é obtido em todos que apresentam a doença (sensibilidade de 100%). O teste para o antígeno carcinoembrionário (CEA) apresenta sensibilidade mais baixa; apenas 72% dos que possuem carcinoma de colo apresentam resultados positivos quando a doença é extensa, e apenas 20% na doença precoce.

A **especificidade** de um teste refere-se à **porcentagem de resultados de testes negativos entre indivíduos que não apresentam a doença**. O teste para fenilcetonúria é altamente específico; 99,9% dos indivíduos normais apresentam resultado negativo. Apenas 0,1% apresenta resultado falso-positivo. Por outro lado, o teste do CEA para o carcinoma de colo tem especificidade variável; cerca de 3% dos indivíduos não fumantes apresentam resultado falso-positivo (especificidade de 97%), ao passo que 20% dos fumantes apresentam resultado falso-positivo (especificidade de 80%).

A sensibilidade e a especificidade de um teste estão inversamente relacionadas uma com a outra. Se o ponto de corte for estabelecido em um valor muito elevado, pouquíssimos indivíduos saudáveis irão apresentar resultado falso-positivo, no entanto muitos indivíduos com a doença poderão apresentar resultado falso-negativo. Portanto, a sensibilidade será baixa, mas a especificidade será alta. Em contrapartida, se o ponto de corte for muito baixo, a maioria ou todos os indivíduos com a doença serão detectados (o teste apresentará alta sensibilidade). Entretanto, mais indivíduos livres de doença apresentarão resultado falso-positivo (o teste apresentará baixa

TABELA 48-3 Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo de um teste laboratorial

		O paciente apresenta alguma doença?	
		Sim	Não
Qual é o resultado do teste?	Positivo	Verdadeiro-positivo (a)	Falso-positivo (b)
	Negativo	Falso-negativo (c)	Verdadeiro-negativo (d)
Sensibilidade	=	$\frac{\text{Verdadeiro-positivo (a)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam a doença (a + c)}}$	
Especificidade	=	$\frac{\text{Verdadeiro-negativo (d)} \times 100}{\text{Número de pacientes que não apresentam a doença (b + d)}}$	
Valor preditivo positivo	=	$\frac{\text{Verdadeiro-positivo (a)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam um teste positivo (a + b)}}$	
Valor preditivo negativo	=	$\frac{\text{Verdadeiro-negativo (d)} \times 100}{\text{Número de pacientes que apresentam um teste negativo (c + d)}}$	

sensibilidade). Portanto, em geral, existe uma troca entre a sensibilidade e a especificidade de um teste.

O **valor preditivo de um teste positivo** (valor preditivo positivo) define a porcentagem de resultados positivos que são verdadeiro-positivos. De modo semelhante, o **valor preditivo de um teste negativo** (valor preditivo negativo) define a porcentagem de resultados negativos que são verdadeiro-negativos. Esse valor está relacionado com a prevalência da doença. Por exemplo, em um grupo de pacientes em uma enfermaria de urologia, a prevalência de doença renal é maior do que na população geral. Nesse grupo, a concentração de creatinina mostrará maior valor preditivo do que na população geral. As fórmulas para o cálculo da sensibilidade, da especificidade e dos valores preditivos de um teste para diagnóstico são apresentadas na Tabela 48-3.

Um teste ideal para diagnóstico é o que apresenta sensibilidade de 100%, especificidade de 100% e valor preditivo de 100%. Entretanto, isso não ocorre na maioria dos testes atualmente disponíveis, se não em todos eles. Portanto, antes de solicitar exame, é importante procurar determinar se a sensibilidade, a especificidade e o valor preditivo do teste são adequados para fornecer informações úteis. O resultado obtido deverá **influenciar o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico ou levar à melhor compreensão do processo da doença, beneficiando o paciente.**

AMOSTRAS PARA ANÁLISE

As amostras comuns para análise são o sangue e a urina. O sangue é coletado em tubos com ou sem anticoagulante, dependendo de a porção necessária para a avaliação ser o plasma ou o soro. Embora seja menos comum, também podem ser utilizadas amostras de saliva, líquido cefalorraquidiano ou fezes.

Existe uma diferença entre a medição de um analito na amostra sanguínea ou na urina. A concentração de um analito no sangue reflete os níveis presentes no momento em que a amostra foi coletada, ao passo que uma amostra de urina representa a excreção acumulada de um analito durante um período de tempo. Uma diferença adicional é que normalmente os resultados dos testes sanguíneos são expressos em quantidades do analito (ou atividade enzimática) por mililitro ou litro de sangue (ou plasma ou soro). O registro da concentração de um analito na urina da mesma forma não é útil, pois o volume de urina depende muito da ingestão de líquido. Em alguns casos, pede-se ao paciente que forneça amostra completa de urina de 24 horas; esse é um procedimento cansativo e é difícil saber se realmente houve coleta completa de 24 horas. Alternativamente, a concentração do analito é fornecida por mol de creatinina. A excreção diária de creatinina é razoavelmente constante para qualquer indivíduo, mas varia entre indivíduos, uma vez que depende principalmente da massa muscular, já que a creatinina é sintetizada de forma não enzimática a partir da creatina e da creatina-fosfato, e a maior parte encontra-se no músculo esquelético.

Com exceção da avaliação dos gases sanguíneos, para a qual são necessárias amostras arteriais, as amostras sanguíneas são geralmente de sangue venoso. Na maioria dos casos, a glicose sanguínea é medida no sangue capilar a partir de um furo no dedo. Algumas análises utilizam sangue total; outras

requerem soro ou plasma. Para uma amostra de soro, permite-se que o sangue coagule e, em seguida, as hemácias e o coágulo de fibrina são removidos por centrifugação. No caso de amostra de plasma, o sangue é coletado em um tubo contendo anticoagulante e as hemácias são removidas por centrifugação. A diferença entre o soro e o plasma é que o plasma contém protrombina e os outros fatores de coagulação, incluindo fibrinogênio, ao passo que o soro não contém. Diferentes anticoagulantes são utilizados para a coleta de amostras de plasma, dependendo do ensaio a ser realizado: citrato, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ou oxalato; todos eles quelam cálcio e, portanto, inibem a coagulação. A heparina, que atua ativando a antitrombina III, é outro anticoagulante regularmente utilizado. Para a medição da glicose sanguínea, é adicionado fluoreto de potássio como inibidor da glicólise nas hemácias.

TÉCNICAS UTILIZADAS EM QUÍMICA CLÍNICA

A maior parte das reações químicas da rotina clínica envolve o desenvolvimento de um produto colorido a partir de uma reação química ou enzimática que será avaliada por **espectrofotometria de absorção**. Diferentes compostos absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda; a energia da luz absorvida excita elétrons a um orbital instável (**Figura 48-4**). A absorvância da luz em um comprimento de onda específico da faixa visível ou ultravioleta é diretamente proporcional à concentração do produto final colorido e, portanto, à concentração do analito na amostra. Embora, em algum momento, essas análises tenham sido realizadas manualmente, hoje a maioria dos ensaios é automatizada e um único instrumento pode realizar múltiplos ensaios em uma única amostra.

Na espectrofotometria de absorção, os elétrons excitados voltam ao seu estado basal em uma série de pequenos saltos quânticos, emitindo a energia absorvida sob a forma de calor. No caso de alguns compostos, os elétrons retornam a um estado de energia inferior em um único salto quântico, emitindo luz de comprimento de onda maior (energia inferior) do que a luz excitante. Essa é a fluorescência, e a técnica é conhecida como **espectrofotometria de fluorescência** ou **espectrofluorimetria**. A amostra é iluminada com luz de comprimento de onda específico, e a luz emitida é medida em ângulos à direita da direção do comprimento de onda que ilumina (ver **Figura 48-4**). Mais uma vez, a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo e, portanto, à concentração do analito. A fluorimetria permite tanto maior especificidade quanto sensibilidade da análise. A especificidade é maior do que na espectrofotometria de absorção, uma vez que tanto o comprimento de onda excitante quanto o comprimento de onda emitido são específicos para o fluoróforo, ao passo que, na espectrofotometria de absorção, existe apenas um comprimento de onda a ser operado, o da luz que é absorvida. A fluorimetria é mais sensível porque é mais fácil detectar a emissão de pequena quantidade de luz do que a absorção.

Cada vez mais, principalmente em centros de pesquisa e especializados, múltiplas análises são medidas na mesma amostra usando-se **cromatografia líquida de alta pressão**

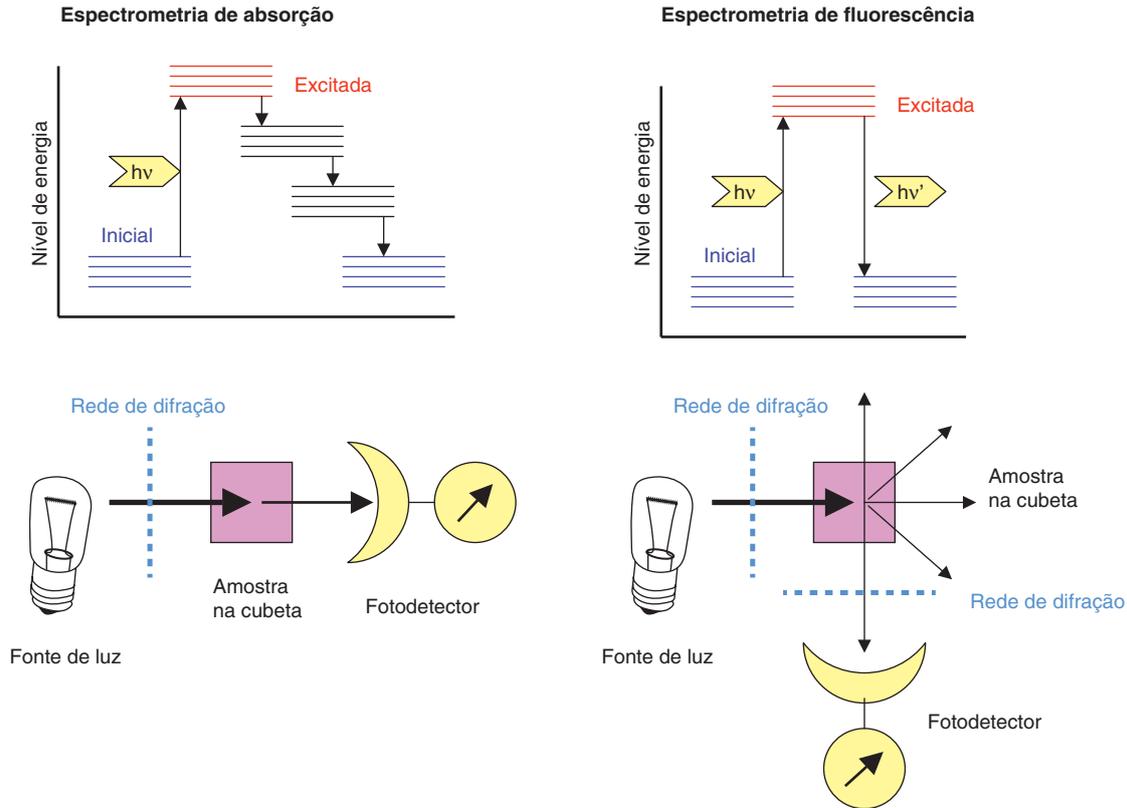


FIGURA 48-4 Espectrometria de absorção e de fluorescência. Na espectrometria de absorção, mostrada à esquerda, os elétrons são excitados a um nível instável de energia mais elevada pela absorção da luz e, em seguida, voltam ao nível de energia basal por meio de uma série de pequenos saltos quânticos. A energia é liberada sob a forma de calor. A diferença entre a intensidade da luz excitante e aquela transmitida através da amostra, a absorbância, é proporcional à concentração de material absorvente na cubeta (e ao comprimento do percurso da cubeta). Na espectrometria de fluorescência, mostrada à direita, os elétrons excitados retornam ao nível de energia basal em um único salto quântico. A energia é liberada sob a forma de luz de energia menor (comprimento de onda mais elevado) da luz excitante. A intensidade da luz emitida, medida em ângulo reto à luz excitante, é proporcional à concentração de material absorvente na cubeta (e ao comprimento do percurso da cubeta).

para separar analitos, seguida pela detecção colorimétrica, fluorimétrica ou eletroquímica, ou ligada à espectrometria de massas para identificar compostos. Esses métodos formam a base da **metabolômica**, o estudo de um conjunto completo de metabólitos em uma única amostra, e da **metabonômica**, o estudo de alterações nos analitos em resposta a um fármaco ou a um tratamento experimental de algum tipo.

Historicamente, os **eletrólitos**, como o sódio e o potássio, eram medidos por **fotometria de chama**, medindo a luz emitida quando o íon era introduzido em uma chama clara. O sódio fornece chama amarela, e o potássio, chama roxa. Atualmente, esses e outros íons são medidos com o uso de **eletrodos íon-específicos**. Em alguns casos, os íons metálicos são medidos por **espectrometria de absorção atômica**. Aqui, a amostra é introduzida em uma chama e iluminada em um comprimento de onda específico. A energia da luz absorvida excita elétrons a um orbital instável e a absorção da luz é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra, como é o caso da espectrofotometria de absorção.

Enzimas em química clínica

As enzimas são importantes na química clínica de três formas diferentes: para medir analitos em uma amostra, para medir a

atividade das próprias enzimas em uma amostra e como teste de avaliação nutricional de vitamina.

O uso de uma enzima para medir a concentração de um analito confere alto grau de especificidade ao ensaio, visto que, em geral, uma enzima atuará sobre apenas um único substrato ou uma pequena faixa de substratos intimamente relacionados, enquanto uma única reação química poderá responder muito bem a uma variedade de analitos (possivelmente não relacionados). Por exemplo, como mostrado na Figura 48-3, uma variedade de compostos redutores reagirá com um reagente de cobre alcalino para fornecer resultado falso-positivo para glicose, ao passo que o ensaio enzimático utilizando a glicose-oxidase indicará resultado positivo apenas com a glicose, e nenhum outro composto redutor.

Quando uma enzima é utilizada para detectar um analito, o fator limitante no ensaio deverá ser o próprio analito; a enzima e os demais reagentes deverão estar presentes em excesso. E, mais importante, a concentração do analito na amostra deverá ser ajustada para um valor inferior ao K_m da enzima, de modo que ocorra ampla variação na taxa de reação com pequena mudança na concentração do analito (região A na Figura 48-5).

Quando as células são lesadas ou morrem, seus conteúdos são liberados na corrente sanguínea. Portanto, a avaliação de

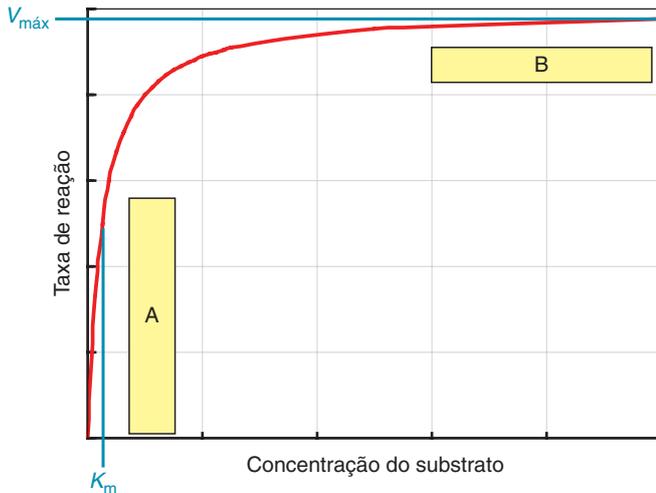


FIGURA 48-5 Uso de enzimas para medir analitos e avaliação da atividade enzimática em amostras biológicas. Em concentrações de substrato (analito) iguais ou inferiores ao K_m da enzima (região A no gráfico), ocorre aumento muito agudo na taxa de reação com pequena alteração na concentração do analito, de modo que o ensaio ligado à enzima apresenta maior sensibilidade nessa faixa de concentração. Em concentrações de substrato consideravelmente superiores ao K_m da enzima, quando a enzima se aproxima da $V_{máx}$ (região B no gráfico), é a quantidade de enzima na amostra que limita a taxa de formação do produto, de modo que essa é a faixa adequada de concentração de substrato para utilização na avaliação da atividade enzimática em uma amostra biológica.

enzimas no plasma pode ser utilizada para detectar lesão tecidual; a informação é obtida a partir do padrão de enzimas (e de isoenzimas tecido-específicas) liberadas. Em geral, o aumento na atividade enzimática do plasma acima da faixa normal indica o grau de gravidade da lesão tecidual. Quando um ensaio pretende determinar a atividade de uma enzima no plasma, o fator limitante deverá ser a própria enzima. A concentração de substrato adicionado deverá estar em excesso considerável em relação ao K_m da enzima, de modo que a enzima esteja atuando em sua $V_{máx}$ ou próximo a ela, e mesmo uma alteração relativamente ampla na concentração do substrato não apresentará efeito significativo na taxa de reação (região B na Figura 48-5). Na prática, isso significa que a concentração de substrato adicionado será cerca de 20 vezes superior ao K_m da enzima.

Se uma enzima possui uma coenzima derivada de vitamina que seja essencial para sua atividade, então a avaliação da atividade da enzima em hemácias com e sem a adição da coenzima poderá ser utilizada como índice do estado nutricional da vitamina. Isso fornece uma indicação do estado nutricional funcional, ao passo que a avaliação da vitamina e de seus derivados normalmente reflete ingestão recente, em vez de adequação fisiológica. O princípio básico é que as hemácias precisam competir com outros tecidos do corpo pelo que seria um suprimento limitado da coenzima. Portanto, a extensão de saturação da enzima da hemácia pela sua coenzima refletirá a disponibilidade da coenzima durante período de tempo correspondente à meia-vida das hemácias. Esse ensaio consiste em incubar duas amostras de lisado de hemácias: uma pré-incubada na ausência, e outra, na presença da coenzima;

em seguida, o substrato é adicionado a ambas e a atividade da enzima é medida. Na amostra pré-incubada sem adição da coenzima, apenas a enzima que possuía coenzima ligada (a holoenzima) será ativa. Na amostra que foi pré-incubada com a coenzima, qualquer apoenzima (enzima inativa sem coenzima ligada) será ativada para a holoenzima. Portanto, sempre existirá ausência de alteração na atividade enzimática sob a adição da coenzima, indicando saturação completa da enzima pela coenzima ou aumento na atividade, refletindo a ativação da apoenzima pela coenzima adicionada. Os resultados são registrados como um **coeficiente de ativação** da enzima (a proporção de atividade nas amostras pré-incubadas com coenzima:sem coenzima). As faixas de referência para o coeficiente de ativação são estabelecidas da mesma forma que para quaisquer outros testes. Os ensaios de ativação enzimática estão disponíveis para tiamina (vitamina B_1 , usando transcetolase da hemácia), riboflavina (vitamina B_2 , usando glutatona-redutase da hemácia) e vitamina B_6 (usando uma ou outra transaminase da hemácia).

Ensaio de ligação a ligantes competitivos e imunoensaios

Se existe uma proteína que se ligará a um analito, e o analito (ligante) ligado e livre pode ser separado e medido, então será possível elaborar um ensaio para o analito. Talvez o mais simples desses ensaios de ligação seja o ensaio para o hormônio cortisol, que é transportado na corrente sanguínea ligado a uma globulina específica de ligação ao cortisol. É fácil preparar uma amostra de plasma contendo a globulina de ligação que foi separada de seu ligante (cortisol) por incubação com óxido de alumínio ou carvão. Isso é feito usando amostra de plasma relativamente grande e fornecendo globulina de ligação para um grande número de ensaios. O hormônio é extraído de cada amostra a ser analisada, usando solvente orgânico, que é evaporado até a dessecação e, em seguida, dissolvido em etanol e tampão adequado, com a adição de quantidade em traços de hormônio radioativo de atividade específica elevada. Então, cada amostra é incubada com a globulina de ligação a 37°C e, em seguida, refrigerada a 4°C . O carvão é adicionado para adsorver o ligante não ligado e rapidamente removido por centrifugação. A radioatividade é medida no sobrenadante. Esta representa a quantidade de ligante ligado e é expressa como uma porcentagem da radioatividade total adicionada a cada amostra. Uma curva-padrão é elaborada usando-se quantidades conhecidas de hormônio, de modo que a concentração do hormônio na amostra possa ser determinada.

Uma grande variedade de outros hormônios e analitos pode ser avaliada da mesma forma, gerando anticorpos monoclonais ou antissoros policlonais dirigidos contra o analito (p. ex., injetando em um animal o analito ligado de forma covalente a uma proteína). O antissoro contra um hormônio gerado em um único coelho pode ser utilizado para muitos milhares de ensaios. Cada lote de antissoro deverá, obviamente, ter sua especificidade testada para o hormônio (garantindo que ele não se ligue também a hormônios relacionados, um problema especial com hormônios esteroides) e sua sensibilidade. Quando a proteína de ligação é um anticorpo ou antissoro, o ensaio é normalmente chamado de **radioimensaio**.

Em uma variante do ensaio de ligação competitivo, o anticorpo é ligado de forma covalente à superfície de grânulos. Em seguida, é fácil separar os ligantes ligados e livre simplesmente por lavagem dos grânulos com tampão gelado, conservando-se o ligante ligado aos grânulos para medir a radioatividade ligada. Alternativamente, o anticorpo pode ser ligado de forma covalente à superfície do tubo de ensaio ou a cada poço de uma placa de cultura. Após incubação, é retirada uma amostra do meio de incubação para medir a radioatividade não ligada.

Com a intenção de minimizar a exposição aos materiais radioativos, cada vez mais se usa ligante ou anticorpo marcado por fluorescência. Um desenvolvimento posterior é o **ensaio-sanduíche**, no qual dois anticorpos diferentes dirigidos contra o ligante são utilizados, e cada um deles liga-se a uma diferente região do analito. O primeiro anticorpo é ligado de forma covalente à superfície de cada poço de uma placa de cultura, e a amostra é adicionada e incubada. Após remoção do meio de incubação e lavagem de cada poço, o segundo anticorpo é adicionado, prendendo o analito entre os dois anticorpos. O segundo anticorpo é marcado com um isótopo radioativo ou um fluoróforo, permitindo a medição do segundo anticorpo ligado e, portanto, do ligante ligado. Em alguns casos, o segundo anticorpo é marcado com uma enzima, e a medição desse segundo anticorpo ligado e, portanto, do ligante ligado é feita pela avaliação da atividade da enzima que está agora ligada à parede de cada poço da placa, após lavagem para remoção do segundo anticorpo não ligado e adição de excesso de substrato enzimático. Este é o **ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA)**.

Tiras de química seca

Para diversos ensaios, as enzimas ou anticorpos e reagentes podem ser combinados sobre uma tira plástica especialmente fabricada. Para avaliação da glicose sanguínea, uma amostra de sangue da ponta do dedo é colocada sobre a tira de teste, e a concentração da glicose é medida usando-se um dispositivo portátil, chamado de glicosímetro. Este representa um método simples e confiável para estimar a glicose no leito de hospital, em uma clínica médica ou até em casa. Para o teste de urina, diversos ensaios diferentes podem ser incluídos como amostras separadas sobre uma tira plástica (p. ex., para detectar ou estimar semiquantitativamente níveis de glicose, corpos cetônicos, proteínas e diversos outros analitos ao mesmo tempo). Lâminas similares estão disponíveis para detectar gonadotrofina coriônica humana (hCG) na urina, como teste de gravidez doméstico.

Testes de triagem em neonatos para erros inatos do metabolismo

Muitos erros inatos do metabolismo podem levar à deficiência intelectual bastante grave caso o tratamento não seja iniciado de forma suficientemente precoce. No caso de condições como fenilcetonúria e doença da urina do xarope de bordo, a restrição alimentar dos aminoácidos que não são metabolizados normalmente (fenilalanina na fenilcetonúria; os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina na doença da urina do xarope de bordo) é essencial para o tratamento

da condição. Portanto, é normal, na maioria dos países desenvolvidos, que os neonatos sejam testados em relação a essas condições. A concentração do(s) aminoácido(s) em questão é medida em uma amostra de sangue que é normalmente colhida 1 semana após o nascimento, quando as enzimas que são afetadas pela doença deveriam ter alcançado sua expressão máxima. O comum é que uma amostra de sangue capilar seja coletada por punção do calcanhar e colocada sobre um papel absorvente para ser enviada ao laboratório para análise.

O primeiro teste de seleção desse tipo para um erro inato do metabolismo foi o teste de inibição bacteriana de Guthrie. Um disco do papel contendo a amostra sanguínea é colocado sobre uma placa de ágar na qual foi semeada com uma cepa de *Bacillus subtilis* dependente de fenilalanina, juntamente com um inibidor competitivo da captação de fenilalanina pela bactéria (β -tienilalanina) em uma concentração que competirá com a fenilalanina em níveis normalmente encontrados no sangue, de modo que a bactéria não cresça. Se a concentração de fenilalanina for superior à encontrada normalmente no sangue, ela será mais captada pela bactéria do que o inibidor, e a bactéria formará colônias visíveis no ágar.

Na maioria dos centros, o teste de inibição bacteriana tem sido suplantado pelas técnicas de cromatografia que permitem a detecção de uma variedade de metabólitos anormais e, portanto, a detecção de uma variedade de diferentes erros inatos do metabolismo.

TESTES DE FUNÇÃO DE ÓRGÃOS

Os exames que fornecem informações sobre o funcionamento de determinados órgãos são frequentemente reunidos como testes de função de órgãos. Esses testes agrupados incluem testes de função renal, hepática e tireoidiana.

Testes de função renal

Os principais testes de função renal estão listados na **Tabela 48-4**. Uma **urinálise** inclui a avaliação das características físicas e químicas da urina. As características físicas a serem avaliadas incluem volume (isso requer amostra de urina programada, geralmente de 24 horas), odor, cor, aparência (límpida ou turva),

TABELA 48-4 Principais testes de função renal

Exame de urina
<ul style="list-style-type: none"> • Características físicas – avaliação de volume, cor, odor, aparência, densidade e pH • Características químicas – verificar a presença de proteínas, açúcares redutores, corpos cetônicos, sangue, sais biliares e pigmentos biliares • Microscopia – investigar a presença de leucócitos, hemácias e cilindros
Marcadores séricos da função renal
<ul style="list-style-type: none"> • Creatinina sérica • Ureia sérica (ou nitrogênio ureico sanguíneo [BUN])
Estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG)
<ul style="list-style-type: none"> • Depuração da creatinina • Depuração da inulina
Testes de função tubular renal
<ul style="list-style-type: none"> • Teste de privação de água • Teste de acidificação da urina

TABELA 48-5 Constituintes anormais da urina

Constituinte	Significado clínico	Exemplos de condições nas quais estão presentes
Proteína	A proteinúria glomerular refere-se à presença de albumina na urina devido a uma ruptura na integridade da membrana basal glomerular	Síndrome nefrótica, glomerulonefrite aguda, nefropatia diabética, etc.
	A proteinúria por transbordamento é causada pela presença de níveis anormalmente elevados de proteínas de baixo peso molecular no plasma, que são filtradas pelo glomérulo, aparecendo consequentemente na urina	Mieloma múltiplo (as cadeias leves de imunoglobulinas aparecem na urina, resultando em proteinúria de Bence-Jones)
	A proteinúria tubular refere-se à presença de proteínas de baixo peso molecular (como a β_2 -microglobulina) na urina devido ao comprometimento da reabsorção dessas proteínas pelo túbulo proximal	Síndrome de Fanconi, nefrotoxicidade devida a antibióticos aminoglicosídicos, metais pesados, etc.
	A proteinúria pós-renal refere-se à presença de proteínas na urina provenientes do trato urinário	Infecção do trato urinário (ITU), resultando em exsudatos inflamatórios na urina
Glicose	Glicosúria hiperglicêmica: presença de glicose na urina é geralmente observada quando o nível plasmático de glicose aumenta acima do limiar renal de cerca de 180 mg/dL	Diabetes melito não controlado
	Glicosúria renal: presença de glicose na urina, devido ao comprometimento da reabsorção de glicose no túbulo proximal	Síndrome de Fanconi e defeitos hereditários no transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2)
Corpos cetônicos	São observados níveis detectáveis na urina (cetônúria) em condições caracterizadas por aumento da cetogênese	Cetoacidose diabética e cetoacidose de jejum prolongado
Sangue	A hematúria refere-se à presença de hemácias na urina devido à ocorrência de sangramento no trato urinário	Cálculos renais ou infecções do trato urinário
	A hemoglobinúria refere-se à presença de hemoglobina na urina, que ocorre devido à hemólise intravascular	Transfusões de sangue incompatíveis, malária, etc.
Sais biliares e pigmentos biliares	A presença na urina está associada à obstrução do trato biliar	Cálculo biliar ou carcinoma da cabeça do pâncreas causando obstrução do ducto colédoco

densidade e pH. Proteínas, glicose, sangue, corpos cetônicos, sais biliares e pigmentos biliares são constituintes anormais da urina que aparecem em diferentes doenças (Tabela 48-5).

Ureia e creatinina são excretadas na urina; suas concentrações no soro podem ser utilizadas como marcadores da função renal, uma vez que a concentração sérica aumenta quando a função renal deteriora. A creatinina é um melhor marcador de função renal do que a ureia, pois sua concentração sanguínea não é significativamente afetada por fatores não renais, tornando-a, assim, um indicador específico da função renal. Diversos fatores “pré-renais” e “pós-renais” aumentam significativamente os níveis sanguíneos de ureia.

Normalmente, menos de 150 mg de proteína e menos de 30 mg de albumina são excretados na urina durante 24 horas. Essa concentração é inferior ao limite de detecção dos testes rotineiros. A presença de proteína em excesso superior a essa concentração é chamada de **proteinúria** e é um importante sinal de comprometimento renal. A causa mais comum de proteinúria consiste em perda da integridade da membrana basal glomerular (proteinúria glomerular), conforme observado na síndrome nefrótica e na nefropatia diabética. A principal proteína encontrada na proteinúria glomerular é a albumina. Outras causas importantes de proteinúria estão listadas na Tabela 48-5. A **microalbuminúria** é definida como a presença de 30 a 300 mg de albumina em uma amostra de urina de 24 horas. Ela representa um marcador precoce de comprometimento renal no diabetes melito.

Embora a creatinina sérica seja considerada um marcador específico de função renal, a ocorrência de aumento significativo na sua concentração sanguínea é observada apenas na presença de declínio de aproximadamente 50% na taxa de

filtração glomerular (TFG). A medição da creatinina sérica é, portanto, um teste de pouca sensibilidade. A medição da **depuração da creatinina** fornece uma estimativa da TFG e, portanto, pode ser utilizada para detectar os estágios iniciais da insuficiência renal. A **depuração** é o volume de plasma a partir do qual um composto é completamente depurado pelo rim em uma unidade de tempo. É calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Depuração (mL/min)} = (U \times V) / P$$

em que U é a concentração do analito medido em uma amostra programada de urina (geralmente 24 horas); P é a concentração plasmática do analito; e V é o volume de urina por minuto (calculado dividindo-se o valor do volume de urina coletada em 24 horas por 1.440 [24 × 60]).

Um composto que é útil para a avaliação da depuração renal possui concentração sanguínea bastante constante, é excretado apenas na urina, é livremente filtrado pelo glomérulo e não é nem reabsorvido e nem secretado pelos túbulos renais. Embora a depuração da creatinina seja normalmente medida, ela superestima a TFG porque ela é secretada em pequena extensão pelos túbulos renais. A depuração da inulina é o método de padrão-ouro para avaliar a TFG, pois satisfaz todos os critérios essenciais para que um composto seja utilizado nos testes de depuração. Entretanto, ao contrário da creatinina, a inulina é um composto exógeno que precisa ser infundido por via intravenosa em taxa constante.

Testes de função hepática

Os testes de função hepática (TFHs) representam um conjunto de testes que auxiliam o diagnóstico, avaliando o prognóstico e

TABELA 48-6 Testes importantes de função hepática

Teste	Aspecto da função hepática avaliado	Utilidade principal
Níveis séricos de bilirrubina (total e conjugada)	Indicador da capacidade do fígado de captar, conjugar e excretar a bilirrubina (conjugação e função excretora)	Auxílio no diagnóstico diferencial da icterícia (ver Tabela 31-3)
Proteína sérica total e albumina	Medição da função de biossíntese do fígado, visto que este constitui o principal local de síntese da maioria das proteínas plasmáticas	Indicador de insuficiência hepática crônica
Tempo de protrombina	Medição da função de biossíntese do fígado, visto que vários fatores da coagulação são sintetizados nesse órgão	Indicador de gravidade de insuficiência hepática aguda e crônica
Enzimas séricas:		
Aspartato-transaminase (AST)	Atua como marcador de lesão dos hepatócitos que contém AST em quantidades abundantes	As atividades da AST e da ALT séricas constituem indicadores precoces de lesão hepática; são também úteis na monitoração da resposta ao tratamento
Alanina-transaminase (ALT)	Atua como marcador de lesão dos hepatócitos que contém ALT em quantidades abundantes	
Fosfatase alcalina (ALP)	Atua como marcador de obstrução biliar	Auxílio no diagnóstico de obstrução do trato biliar
Amônia sanguínea	Indicador da capacidade do fígado de detoxificar a amônia	Os níveis estão elevados na cirrose hepática com hipertensão porta e em distúrbios do ciclo da ureia

monitorando o tratamento da doença hepática (Tabela 48-6). Cada exame avalia um aspecto específico da função hepática. O aumento na **bilirrubina sérica** é devido a muitas causas e leva à **icterícia**. Na obstrução do ducto biliar (icterícia obstrutiva), é principalmente a bilirrubina conjugada que aumenta. Na doença hepatocelular, as bilirrubinas conjugada e não conjugada em geral se encontram elevadas, refletindo a incapacidade do fígado de captar, conjugar e excretar a bilirrubina na bile (ver Capítulo 31). Os níveis séricos totais de proteína e albumina encontram-se baixos nas doenças hepáticas crônicas, como a cirrose. O tempo de protrombina (TP, ver Capítulo 55) poderá estar prolongado nos distúrbios agudos do fígado devido ao comprometimento da síntese de fatores de coagulação.

As atividades da alanina (ALT) e da aspartato (AST) aminotransferases séricas (ver Capítulo 28) estão significativamente elevadas vários dias antes do aparecimento de icterícia na hepatite viral aguda. A ALT é considerada mais específica do que a AST para a insuficiência hepática, pois a AST se encontra elevada em casos de lesão do músculo cardíaco ou esquelético, o que não ocorre com a ALT. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) sérica está elevada na icterícia obstrutiva. Pode-se observar também alta atividade da ALP sérica em doenças ósseas.

O fígado também constitui o principal local de detoxificação da amônia (no ciclo da ureia; Capítulo 28). A elevação dos níveis de amônia no sangue constitui um importante sinal de insuficiência hepática e desempenha importante papel na patogênese da encefalopatia hepática em pacientes com cirrose hepática e hipertensão porta. Os níveis sanguíneos de amônia também estão elevados em distúrbios do ciclo da ureia.

A razão albumina:globulina (razão A:G) muitas vezes fornece informações clínicas úteis. A razão normal varia entre 1,2:1 e 1,6:1. Pode-se observar inversão da razão A:G em condições nas quais os níveis de albumina estão baixos (hypoalbuminemia) ou quando as globulinas estão anormalmente altas; por exemplo, no mieloma múltiplo. A inversão da razão A:G frequentemente constitui a primeira investigação que levanta a suspeita de mieloma múltiplo.

Testes de função da tireoide

A glândula tireoide secreta os hormônios tireoidianos – a tireoxina ou tetraiodotironina (T₄) e a tri-iodotironina (T₃). É comum a ocorrência de doenças associadas ao aumento ou à diminuição na síntese dos hormônios tireoidianos (hipertireoidismo e hipotireoidismo, respectivamente). Um diagnóstico clínico de distúrbio de tireoide é confirmado pela medição dos níveis séricos do hormônio estimulante da tireoide e da tri-iodotironina e tireoxina livre.

A determinação do **hormônio estimulador da tireoide** (TSH, do inglês, *thyroid-stimulating hormone*) constitui, com frequência, o primeiro teste realizado na avaliação da função da tireoide. A concentração sérica de TSH apresenta-se elevada no hipotireoidismo primário e baixa ou indetectável no hipertireoidismo primário. A determinação dos níveis de tireoxina livre e tri-iodotironina ajuda a estabelecer o diagnóstico na maioria dos casos em que são obtidos valores anormais do TSH (Tabela 48-7).

A concentração de tireoxina sérica total pode ser afetada por alterações na concentração da globulina de ligação da tireoxina (TBG), na ausência de doença da tireoide. Atualmente, os níveis séricos de tireoxina total raramente são determinados, uma vez que os ensaios para medir a tireoxina livre já se encontram disponíveis. Testes adicionais, como a medição de autoanticorpos

TABELA 48-7 Diagnóstico laboratorial de distúrbios da tireoide

		Nível de TSH	
		Alto	Baixo
Nível de tireoxina livre	Alto	Hipertireoidismo secundário ^a	Hipertireoidismo primário
	Baixo	Hipotireoidismo primário	Hipotireoidismo secundário ^a

^aO hipertireoidismo e o hipotireoidismo secundários são muito mais raros do que o hipertireoidismo e o hipotireoidismo primários.

contra a tireoide, também estão disponíveis. Por exemplo, a doença de Graves está geralmente associada à presença de anticorpos contra o receptor de TSH, ao passo que a tireoidite autoimune (tireoidite de Hashimoto) está associada à presença de anticorpos contra a tireoide peroxidase.

Testes de função suprarrenal

Um diagnóstico clínico de hiperfunção suprarrenal (síndrome de Cushing) ou de hipofunção (doença de Addison) é confirmado por testes da função suprarrenal. A secreção de cortisol pela glândula suprarrenal mostra variação diurna; o cortisol sérico é máximo durante as primeiras horas da manhã e mínimo em torno da meia-noite. A perda dessa variação diurna constitui um dos primeiros sinais de hiperfunção da glândula suprarrenal. A medição do cortisol sérico em amostras sanguíneas feita à meia-noite e às 8 horas da manhã é, portanto, útil como teste de seleção. Um diagnóstico de hiperfunção suprarrenal é confirmado pela demonstração da incapacidade de supressão da concentração matinal de cortisol após a administração de 1 mg de dexametasona (um potente glicocorticoide sintético) à meia-noite; esse é o **teste de supressão da dexametasona**. A determinação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pode ajudar a diferenciar o hipercortisolismo devido à produção excessiva de ACTH (dependente de ACTH) das condições em que a produção de ACTH está normal ou suprimida (independente de ACTH). A ausência de elevação do cortisol sérico após dose única de *synacthen* (um análogo sintético do ACTH) estabelece o diagnóstico de hipofunção suprarrenal (**teste de estimulação com *synacthen***). Outros testes bioquímicos e exames de imagem (tomografia computadorizada [TC] ou ressonância magnética nuclear [RMN]) podem ser necessários para diagnosticar a causa da hiperfunção ou da hipofunção suprarrenal.

Marcadores de risco cardiovascular e infarto do miocárdio

Como discutido no Capítulo 25, o colesterol total plasmático e, especialmente, a razão entre os colesteróis LDL:HDL fornecem um índice do risco de desenvolver aterosclerose. As lipoproteínas plasmáticas foram originalmente separadas por centrifugação, portanto, são classificadas por densidade. Métodos posteriores envolveram a separação por eletroforese. Hoje, o colesterol plasmático total é medido, e, em seguida, as lipoproteínas contendo a apoproteína B (ver Tabela 25-1) são precipitadas usando-se um cátion divalente, permitindo a avaliação do colesterol associado à HDL.

Um eletrocardiograma poderá não mostrar sempre alterações típicas após infarto do miocárdio. Nesse caso, a elevação dos níveis séricos de troponina cardíaca ou da isoenzima creatina-cinase MB confirma a ocorrência de infarto do miocárdio, pois ambos os marcadores são específicos do músculo cardíaco.

Marcadores de função gastrointestinal

A infecção gástrica com *Helicobacter pylori*, a principal causa da maioria das **úlceras pépticas**, é confirmada principalmente pela detecção de anticorpos contra o organismo no plasma ou

nas fezes. Entretanto, o *H. pylori* possui uma urease ativa e hidrolisa a ureia formando amônia e dióxido de carbono; essa produção de amônia permite que o organismo sobreviva nas condições ácidas do estômago. Um teste diagnóstico precoce, e um que ainda é usado para confirmar a erradicação ou persistência da infecção após o tratamento com antibiótico, baseia-se na administração de uma dose de ureia [¹³C], medindo-se, em seguida, o isótopo no dióxido de carbono expirado. Úlceras pépticas atípicas devido à secreção excessiva de gastrina (em geral, resultado de tumor que secreta gastrina, um gastrinoma) podem ser testadas pela avaliação da concentração plasmática de gastrina no jejum por imunoensaio.

Na **pancreatite aguda**, a atividade plasmática da amilase é aumentada, embora, em casos brandos, possa estar normal, pois a amilase é pequena o suficiente para que uma parte dela seja filtrada pelo glomérulo e excretada na urina. Isso significa que a avaliação da amilase na urina também é útil no diagnóstico dessa condição. O nível sérico de lipase pancreática também se encontra elevado na pancreatite aguda e é considerado mais específico para pancreatite do que a amilase, que também é sintetizada nas glândulas salivares.

As **deficiências da dissacaridase** foram anteriormente testadas administrando-se uma dose relativamente grande do dissacarídeo suspeito em questão e avaliando-se o aumento da glicose sanguínea. Em geral, uma dose de 50 g de lactose foi utilizada para o teste da **alactasia**. No paciente alactásico, essa dose era grande o suficiente para causar dor abdominal intensa e diarreia aquosa explosiva devido ao metabolismo bacteriano intestinal da lactose não absorvida. Um teste mais recente envolve a administração de apenas uma pequena quantidade de dissacarídeo, seguida pela medição de hidrogênio expirado como resultado do metabolismo bacteriano intestinal.

RESUMO

- Testes laboratoriais podem fornecer informações úteis para o diagnóstico e o tratamento de doenças, assim como fornecer informações sobre o metabolismo normal e a patologia da doença.
- A faixa de referência de um analito é a faixa $\pm 2 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio para o grupo populacional em consideração. Valores fora dessa faixa de referência são sugestivos de alguma anormalidade que merece investigação adicional.
- A precisão de um método analítico é uma consequência da sua reprodutibilidade; a exatidão de um método é uma medida de quão próximo o resultado se encontra do valor verdadeiro.
- A sensibilidade de um método analítico é uma medida da quantidade mínima que pode ser detectada de um analito. A especificidade é o limite para que outros compostos presentes na amostra possam fornecer resultado falso-positivo.
- A sensibilidade de um teste refere-se à porcentagem de pacientes com a doença que irão fornecer resultado positivo. A especificidade de um teste representa a porcentagem de pacientes sem a doença que fornecerão resultado negativo.
- Em geral, as amostras para análise são de sangue e urina, embora a saliva, as fezes e o líquido cefalorraquiano também possam ser utilizados ocasionalmente. Amostras sanguíneas podem ser coletadas em tubos com anticoagulante (para amostras de plasma) ou sem anticoagulante (para amostras de soro).

- Muitos testes laboratoriais consistem na produção de um produto colorido que pode ser medido por espectrofotometria de absorção ou de fluorimetria.
- Muitos compostos podem ser medidos por cromatografia líquida de alta pressão, algumas vezes junto com espectrometria de massas. A avaliação de grande número de analitos em uma amostra é a base da metabolômica e também da metabonômica, que é o efeito de uma doença, fármaco ou outro tratamento no metabolismo.
- As enzimas podem ser utilizadas para fornecer métodos de ensaios específicos e sensíveis para os analitos. Nesse caso, deve haver excesso de enzima na amostra, de modo que o fator limitante seja a concentração do analito na amostra.
- Muitas enzimas são liberadas na corrente sanguínea a partir das células que estão morrendo na doença, e a sua avaliação poderá fornecer informações prognósticas e diagnósticas úteis. A fim de determinar a atividade de uma enzima em uma amostra, deverá haver excesso de substrato, de modo que o fator limitante seja a quantidade de enzima presente.
- Muitos analitos (especialmente hormônios) são medidos por ensaios de ligação competitivos, usando-se uma proteína de ligação de ocorrência natural ou um antissoro ou anticorpo monoclonal para se combinar ao ligante. São utilizadas quantidades vestigiais de ligantes radioativos de atividade específica elevada, ou ligantes ou proteínas de ligação marcados por fluorescência.

REFERÊNCIAS

- Beckett G, Walker S, Rae P, Ashby P: *Clinical Biochemistry*. 8th ed. Wiley-Blackwell, 2010.
- Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (editors): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Elsevier Saunders, 2006.
- Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, et al: *Clinical Biochemistry*. 4th ed. Churchill Livingstone, 2008.
- Kratz A, Pesce MA, Fink DJ: Appendix: Laboratory Values of Clinical Importance. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. Fauci AS et al (editors). McGraw-Hill, 2008.
- Krieg AF, Gambino R, Galen RS: Why are clinical laboratory tests performed? When are they valid? *JAMA* 1975;233:76.
- Lab Tests Online: www.labtestsonline.org (A comprehensive web site provided by the American Association of Clinical Chemists that provides accurate information on many laboratory tests).
- Laposaka M: *Laboratory Medicine*. McGraw-Hill Lange, 2010.
- Marshall WJ, Bangert SK, Lapsley M: *Clinical Chemistry*. 7th ed. Mosby, 2012.
- MedlinePlus: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html> (The A.D.A.M. Medical Encyclopedia includes over 4000 articles about diseases, lab tests and other matters)

Questões para estudo

Seção IX – Tópicos especiais (A)

- Qual dos itens seguintes estará elevado na corrente sanguínea aproximadamente 1 a 2 horas após a ingestão de uma refeição com alto índice de gordura?
 - Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.
- Qual dos itens seguintes estará elevado na corrente sanguínea aproximadamente 4 a 5 horas após a ingestão de uma refeição com alto índice de gordura?
 - Quilomícrons.
 - Lipoproteína de alta densidade.
 - Corpos cetônicos.
 - Ácidos graxos não esterificados.
 - Lipoproteína de densidade muito baixa.
- Qual das seguintes é a melhor definição de índice glicêmico?
 - O aumento na concentração sanguínea de glucagon após o consumo do alimento em comparação à concentração observada após o consumo de uma quantidade equivalente de pão branco.
 - O aumento na concentração sanguínea de glicose após o consumo do alimento.
 - O aumento na concentração sanguínea de glicose após o consumo do alimento em comparação à concentração observada após o consumo de uma quantidade equivalente de pão branco.
 - O aumento na concentração sanguínea de insulina após o consumo do alimento.
 - O aumento na concentração sanguínea de insulina após o consumo do alimento em comparação à concentração observada após o consumo de uma quantidade equivalente de pão branco.
- Qual dos seguintes levará ao mais baixo índice glicêmico?
 - Uma maçã cozida.
 - Uma batata cozida.
 - Uma maçã crua.
 - Uma batata crua.
 - Suco de maçã.
- Qual dos seguintes levará ao mais elevado índice glicêmico?
 - Uma maçã cozida.
 - Uma batata cozida.
 - Uma maçã crua.
 - Uma batata crua.
 - Suco de maçã.
- Qual das seguintes afirmações em relação aos quilomícrons está CORRETA?
 - Os quilomícrons são feitos no interior das células intestinais e secretados na linfa, onde adquirem apolipoproteínas B e C.
 - O centro dos quilomícrons contém triacilglicerol e fosfolípidos.
 - A enzima lipase sensível a hormônio atua nos quilomícrons para liberar ácidos graxos a partir do triacilglicerol quando estão ligados à superfície de células endoteliais nos capilares sanguíneos.
 - Os remanescentes do quilomícron diferem dos quilomícrons, uma vez que são menores e contêm uma proporção inferior de triacilglicerol.
 - Os quilomícrons são captados pelo fígado.
- Os esteróis e os estenóis vegetais inibem a absorção de colesterol a partir do trato gastrointestinal. Qual dos itens seguintes melhor descreve como eles atuam?
 - Eles são incorporados nos quilomícrons no lugar do colesterol.
 - Eles competem com o colesterol pela esterificação no lúmen intestinal, de modo que menos colesterol é esterificado.
 - Eles competem com o colesterol pela esterificação na célula mucosal, e o colesterol não esterificado é transportado ativamente para fora da célula e para o interior do lúmen intestinal.
 - Eles competem com o colesterol pela esterificação na célula mucosal, e o colesterol não esterificado não é incorporado pelos quilomícrons.
 - Eles deslocam o colesterol das micelas lipídicas, de modo que ele não esteja disponível para absorção.
- Qual das seguintes afirmações sobre metabolismo energético está CORRETA?
 - O tecido adiposo não contribui para a taxa metabólica basal (BMR).
 - O nível de atividade física (PAL) é a soma das proporções de atividade física para diferentes atividades ao longo do dia, multiplicada pelo tempo gasto em cada atividade, expresso como um múltiplo de BMR.
 - A taxa de atividade física (PAR) é o custo energético da atividade física ao longo do dia.
 - A taxa metabólica de repouso (RMR) é o gasto energético do corpo durante o sono.
 - O custo energético da atividade física pode ser determinado medindo-se a produção do quociente respiratório (QR) durante a atividade.
- Uma paciente com câncer colorretal metastático perdeu 6 kg de peso corporal durante o último mês. Qual das seguintes é a melhor explicação para a sua perda de peso?
 - Ela se encontra edematosa devido ao tumor.
 - A quimioterapia causou náuseas e perda de apetite.
 - A sua taxa metabólica basal caiu como resultado do catabolismo proteico causado pelo fator de necrose tumoral e outras citocinas.
 - A sua taxa metabólica basal aumentou como resultado de glicose anaeróbia no tumor e o custo energético da gliconeogênese a partir do lactato resultante no seu fígado.
 - O tumor possui um requerimento energético muito elevado para a proliferação celular.

10. Uma criança de 5 anos chegou ao centro de refúgio no leste da África apresentando atrofia de crescimento (apenas 89% da altura esperada para a sua idade), mas não estava edematosa. Você a consideraria como:
- Apresentando kwashiorkor.
 - Apresentando kwashiorkor marásmico.
 - Apresentando marasmo.
 - Apresentando subnutrição.
 - Mal alimentada, porém não considerado clinicamente desnutrido.
11. Uma criança de 5 anos chegou ao centro de refúgio no leste da África apresentando atrofia de crescimento (apenas 55% da altura esperada para a sua idade), mas não estava edematosa. Você a consideraria como:
- Apresentando kwashiorkor.
 - Apresentando kwashiorkor marásmico.
 - Apresentando marasmo.
 - Apresentando subnutrição.
 - Mal alimentada, porém não considerado clinicamente desnutrida.
12. Qual das seguintes é a definição de equilíbrio de nitrogênio?
- A ingestão de proteína como uma porcentagem da captação de energia total.
 - A diferença entre a ingestão e a excreção de compostos nitrogenados.
 - A taxa de excreção de compostos nitrogenados/ingestão proteica.
 - A taxa de ingestão proteica/excreção de compostos nitrogenados.
 - A soma da ingestão de proteínas e excreção de compostos nitrogenados.
13. Qual das seguintes afirmativas sobre equilíbrio do nitrogênio está CORRETA?
- Se a ingestão de proteínas for maior do que as necessidades, sempre haverá um equilíbrio do nitrogênio positivo.
 - No equilíbrio do nitrogênio, a excreção de metabólitos nitrogenados é maior do que a ingestão alimentar de compostos nitrogenados.
 - No equilíbrio do nitrogênio positivo, a excreção de metabólitos nitrogenados é menor do que a ingestão alimentar de compostos nitrogenados.
 - O equilíbrio do nitrogênio é a taxa de ingestão de compostos nitrogenados/eliminação de metabólitos nitrogenados do corpo.
 - O equilíbrio do nitrogênio positivo indica que existe uma perda total de proteína pelo corpo.
14. Em uma série de experimentos para determinar as necessidades de aminoácidos, voluntários adultos jovens e saudáveis foram alimentados com misturas de aminoácidos como sua única fonte de proteína. Qual das seguintes misturas levaria a um equilíbrio de nitrogênio negativo (assumindo-se que todos os outros aminoácidos são fornecidos em quantidades adequadas)?
- Uma que falte alanina, glicina e tirosina.
 - Uma que falte arginina, glicina e cisteína.
 - Uma que falte asparagina, glutamina e cisteína.
 - Uma que falte lisina, glicina e tirosina.
 - Uma que falte prolina, alanina e glutamato
15. Qual das seguintes vitaminas fornece o cofator para as reações de redução na síntese de ácidos graxos?
- Folato.
 - Niacina.
 - Riboflavina.
 - Tiamina.
 - Vitamina B₆.
16. A deficiência de qual destas vitaminas é a principal causa da cegueira em todo o mundo?
- Vitamina A.
 - Vitamina B₁₂.
 - Vitamina B₆.
 - Vitamina D.
 - Vitamina K.
17. A deficiência de qual destas vitaminas pode levar à anemia megaloblástica?
- Vitamina B₆.
 - Vitamina B₁₂.
 - Vitamina D.
 - Vitamina E.
 - Vitamina K.
18. Quais dos seguintes critérios de adequação de vitamina pode ser definido como “Não existem sinais de deficiência sob condições normais, porém qualquer trauma ou estresse revela o estado precário das reservas do corpo e poderá precipitar sinais clínicos”?
- Resposta anormal a uma carga metabólica.
 - Doença de deficiência clínica.
 - Deficiência secreta.
 - Saturação incompleta das reservas do corpo.
 - Deficiência subclínica.
19. Quais dos seguintes critérios de adequação de vitamina pode ser definido como anormalidades metabólicas sob condições normais?
- Resposta anormal a uma carga metabólica.
 - Doença de deficiência clínica.
 - Deficiência secreta.
 - Saturação incompleta das reservas do corpo.
 - Deficiência subclínica.
20. Qual das seguintes é a melhor definição dos valores de referência de ingestão de nutrientes (RNI) ou de quantidades diárias recomendadas (RDA) de uma vitamina ou mineral?
- Um desvio-padrão acima da necessidade média do grupo populacional em consideração.
 - Um desvio-padrão abaixo da necessidade média do grupo populacional em consideração.
 - A necessidade média do grupo populacional em consideração.
 - Dois desvios-padrão acima da necessidade média do grupo populacional em consideração.
 - Dois desvios-padrão abaixo da necessidade média do grupo populacional em consideração.
21. Qual porcentagem da população alcançará a sua necessidade de uma vitamina ou mineral se a sua ingestão for igual a RNI ou a RDA?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%

22. Qual porcentagem da população alcançará a sua necessidade de uma vitamina ou mineral se a sua ingestão for igual ao valor de referência de ingestão de nutrientes inferior (LRNI)?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%
23. Qual porcentagem da população alcançará a sua necessidade de uma vitamina ou mineral se a sua ingestão for igual à necessidade média?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%
24. Para um indivíduo cuja ingestão de vitamina ou mineral seja igual à necessidade média, qual é a probabilidade que esse nível de ingestão seja adequado para alcançar as suas necessidades individuais?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%
25. Para um indivíduo cuja ingestão de vitamina ou mineral seja igual ao LNRI, qual é a probabilidade que esse nível de ingestão seja adequado para alcançar suas as necessidades individuais?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%
26. Para um indivíduo cuja ingestão de vitamina ou mineral seja igual ao RNI, qual é a probabilidade que esse nível de ingestão seja adequado para alcançar suas as necessidades individuais?
- 2,5%
 - 5%
 - 50%
 - 95%
 - 97,5%
27. Qual das seguintes NÃO representa uma fonte de radicais de oxigênio?
- Ação da superóxido dismutase.
 - Ativação de macrófagos.
 - Reações não enzimáticas de íons metálicos de transição.
 - Reação de β -caroteno com oxigênio.
 - Radiação ultravioleta.
28. Qual das seguintes fornece proteção contra a lesão dos radicais de oxigênio aos tecidos?
- Ação da superóxido dismutase.
 - Ativação de macrófagos.
 - Reações não enzimáticas de íons metálicos de transição.
 - Reação de β -caroteno com oxigênio.
 - Radiação ultravioleta.
29. Qual das seguintes NÃO resulta da ação de radicais de oxigênio?
- Ativação de macrófagos.
 - Modificações de bases no DNA.
 - Oxidação de aminoácidos em apoproteínas de LDL.
 - Peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas.
 - Quebras na fita de DNA.
30. Qual dos seguintes tipos de lesão de radicais de oxigênio pode levar ao desenvolvimento de doença autoimune da tireoide?
- Modificações químicas das bases de DNA em células somáticas.
 - Modificações químicas do DNA em células germinativas.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas da membrana celular.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas mitocondriais.
 - Oxidação de ácidos graxos insaturados em lipoproteínas plasmáticas.
31. Qual dos seguintes tipos de lesão de radicais de oxigênio pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose e insuficiência cardíaca coronariana?
- Modificações químicas das bases de DNA em células somáticas.
 - Modificações químicas do DNA em células germinativas.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas da membrana celular.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas mitocondriais.
 - Oxidação de ácidos graxos insaturados em lipoproteínas plasmáticas.
32. Qual dos seguintes tipos de lesão de radicais de oxigênio pode levar ao desenvolvimento de câncer?
- Modificações químicas das bases de DNA em células somáticas.
 - Modificações químicas do DNA em células germinativas.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas da membrana celular.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas mitocondriais.
 - Oxidação de ácidos graxos insaturados em lipoproteínas plasmáticas.
33. Qual dos seguintes tipos de lesão de radicais de oxigênio pode levar ao desenvolvimento de mutações hereditárias?
- Modificações químicas das bases de DNA em células somáticas.
 - Modificações químicas do DNA em células germinativas.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas da membrana celular.
 - Oxidação de aminoácidos em proteínas mitocondriais.
 - Oxidação de ácidos graxos insaturados em lipoproteínas plasmáticas.
34. Qual das seguintes melhor explica a ação antioxidante da vitamina E?
- Ela forma um radical estável que pode ser reduzido de volta à vitamina E ativa pela reação com a vitamina C.
 - Ela é um radical, de modo que quando reage com outro radical, um produto não radical é formado.
 - Ela é convertida a um radical estável pela reação com a vitamina C.
 - Ela é lipossolúvel e pode reagir com radicais livres no plasma sanguíneo resultantes da formação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular.
 - A vitamina E oxidada pode ser reduzida de volta à vitamina E ativa pela reação com glutatona e glutatona-peroxidase.

35. Qual das seguintes melhor descreve o glicoma?
- O DNA codificante para glicosiltransferases.
 - O complemento total de todos os carboidratos do corpo.
 - O complemento total de açúcares livres nas células e tecidos.
 - O complemento total de glicoproteínas e glicolípideos do corpo.
 - O complemento total de glicosiltransferases do corpo.
36. Qual dos seguintes métodos NÃO PODE ser usado para determinar as estruturas de glicoproteínas?
- Microarranjos de carboidratos.
 - Degradação usando endo e exoglicosidases.
 - Análise genômica.
 - Espectrometria de massas.
 - Cromatografia Sepharose-lectina.
37. Qual das seguintes NÃO representa uma função das glicoproteínas?
- Ancoramento de proteínas na superfície celular.
 - Proteção de proteínas plasmáticas contra a depuração hepática.
 - Fornecimento de um sistema de transporte para a entrada de folato nas células.
 - Fornecimento de um sistema de transporte para a captação de lipoproteína de baixa densidade para o fígado.
 - Fornecimento de sinais de reconhecimento na superfície celular.
38. Qual dos seguintes NÃO é um constituinte de glicoproteínas?
- Fucose.
 - Galactose.
 - Glicose.
 - Manose.
 - Sacarose.
39. Qual dos seguintes é utilizado como doador de açúcar na síntese de pentassacarídeos comuns de glicoproteínas *N*-ligadas?
- Ácido CMP-*N*-acetilneuramínico
 - Dolicol-pirofosfato *N*-acetilglicosamina
 - Dolicol-pirofosfato-manose
 - GDP-fucose
 - UDP-*N*-acetilglicosamina
40. Qual dos seguintes NÃO é utilizado como doador de açúcar na síntese de glicoproteínas *N*-ligadas no retículo endoplasmático?
- Dolicol-pirofosfato-frutose
 - Dolicol-pirofosfato-galactose
 - Dolicol-pirofosfato-manose
 - Dolicol-pirofosfato *N*-acetilglicosamina
 - Dolicol-pirofosfato ácido *N*-acetilneuramínico
41. Qual dos seguintes melhor descreve a ligação do pentapeptídeo comum à apoproteína na síntese de uma glicoproteína *N*-ligada?
- Glicação direta do aminoácido aminoterminal do peptídeo.
 - Deslocamento da região aminoterminal do peptídeo em uma reação de transaminação.
 - Deslocamento da região aminoterminal do peptídeo em uma reação de transaminação.
 - Deslocamento da região carboxiterminal do peptídeo em uma reação de transaminação.
 - Deslocamento da região carboxiterminal do peptídeo em uma reação de transaminação.
42. Qual dos seguintes NÃO é uma glicoproteína?
- Colágeno.
 - Imunoglobulina G.
 - Albumina sérica.
 - Hormônio estimulador da tireoide.
 - Transferrina.
43. Qual das seguintes afirmações está INCORRETA?
- A calnexina garante o dobramento correto de glicoproteínas no retículo endoplasmático.
 - O oligossacarídeo dolicol-pirofosfato doa todos os açúcares encontrados em glicoproteínas *N*-ligadas.
 - As mucinas contêm predominantemente glicanos *O*-ligados.
 - O ácido *N*-acetilneuramínico é comumente encontrado nas extremidades de cadeias glicídicas *N*-ligadas de glicoproteínas.
 - As cadeias glicídicas *O*-ligadas de glicoproteínas são construídas pela adição gradual de açúcares a partir de nucleotídeos glicídicos.
44. Qual das seguintes NÃO representa uma atividade da citocromo P450?
- Ativação de vitamina D.
 - Hidroxilação de precursores de hormônios esteroides.
 - Hidroxilação de xenobióticos.
 - Hidroxilação de ácido retinoico.
 - Metilação de xenobióticos.
45. Qual das seguintes melhor descreve a reação de um citocromo P450?
- $RH + O_2 + NADP^+ \rightarrow R-OH + H_2O + NADPH$
 - $RH + O_2 + NAD^+ \rightarrow R-OH + H_2O + NADH$
 - $RH + O_2 + NADPH \rightarrow R-OH + H_2O + NADP^+$
 - $RH + O_2 + NADPH \rightarrow R-OH + H_2O_2 + NADP^+$
 - $RH + O_2 + NADH \rightarrow R-OH + H_2O + NAD^+$
46. Qual dos seguintes é o componente lipídico preferido do sistema citocromo P450?
- Dolicol-fosfato.
 - Fosfatidilcolina.
 - Fosfatidiletanolamina.
 - Fosfatidilinositol.
 - Fosfatidilserina.
47. Qual das seguintes melhor descreve as interações farmacológicas entre fenobarbital e warfarina?
- O fenobarbital induz CYP2C9, levando à redução do catabolismo da warfarina.
 - O fenobarbital induz CYP2C9, levando ao aumento do catabolismo da warfarina.
 - O fenobarbital reprime CYP2C9, levando ao aumento do catabolismo da warfarina.
 - A warfarina induz CYP2C9, levando à redução do catabolismo do fenobarbital.
 - A warfarina induz CYP2C9, levando ao aumento do catabolismo do fenobarbital.
48. Qual dos seguintes melhor descreve os efeitos dos polimorfismos de CYP2A6?
- Indivíduos com o alelo ativo são menos propensos a se tornarem fumantes dependentes do tabaco, uma vez que esse citocromo inativa a nicotina, transformando-a em cotinina.
 - Indivíduos com o alelo inativo (nulo) são menos propensos a se tornarem fumantes dependentes do tabaco, uma vez que esse citocromo inativa a nicotina, transformando-a em cotinina.

- C. Indivíduos com o alelo inativo (nulo) são menos propensos a se tornarem fumantes dependentes do tabaco, uma vez que esse citocromo ativa a nicotina, transformando-a em cotinina.
- D. Indivíduos com o alelo inativo (nulo) são mais propensos a se tornarem fumantes dependentes do tabaco, uma vez que esse citocromo inativa a nicotina, transformando-a em cotinina.
- E. Indivíduos com o alelo inativo (nulo) são mais propensos a se tornarem fumantes dependentes do tabaco, uma vez que esse citocromo ativa a nicotina, transformando-a em cotinina.
49. Qual das seguintes NÃO representa uma função da glutatona?
- A. Coenzima para a redução de peróxido de hidrogênio.
- B. Conjugação de bilirrubina.
- C. Conjugação de alguns produtos do metabolismo de fase I de xenobióticos.
- D. Transporte de aminoácidos através das membranas celulares.
- E. Transporte de bilirrubina na corrente sanguínea.
50. Qual das seguintes melhor descreve a faixa de referência de um teste de laboratório?
- A. Uma faixa $\pm 1 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio.
- B. Uma faixa $\pm 1,5 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio.
- C. Uma faixa $\pm 2 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio.
- D. Uma faixa $\pm 2,5 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio.
- E. Uma faixa $\pm 3 \times$ desvio-padrão em torno do valor médio.
51. Qual das seguintes afirmações sobre testes laboratoriais está INCORRETA?
- A. O valor preditivo de um teste é a extensão até onde ele prevenirá se um indivíduo apresenta ou não a doença.
- B. A sensibilidade e a especificidade de um teste são inversamente relacionadas.
- C. A sensibilidade de um teste é a avaliação de quantos indivíduos com a doença apresentarão um resultado positivo.
- D. A especificidade de um teste é a avaliação de quantos indivíduos com a doença apresentarão um resultado positivo.
- E. A especificidade de um teste é a avaliação de quantos indivíduos sem a doença apresentarão um resultado negativo.
52. Qual das seguintes está CORRETA quando uma enzima é utilizada para medir um analito em uma amostra sanguínea?
- A. A concentração de substrato deverá ser de aproximadamente 20 vezes a K_m da enzima.
- B. A concentração de substrato deverá ser igual à K_m da enzima.
- C. A concentração de substrato deverá ser igual ou inferior à K_m da enzima.
- D. A concentração de substrato no ensaio não é importante.
- E. A concentração de substrato deverá ser de aproximadamente $1/20$ da K_m da enzima.
53. Qual das seguintes está CORRETA quando uma enzima está sendo medida em uma amostra sanguínea?
- A. A concentração de substrato deverá ser de aproximadamente 20 vezes a K_m da enzima.
- B. A concentração de substrato deverá ser igual à K_m da enzima.
- C. A concentração de substrato deverá ser igual ou inferior à K_m da enzima.
- D. A concentração de substrato no ensaio não é importante.
- E. A concentração de substrato deverá ser de aproximadamente $1/20$ da K_m da enzima.
54. Qual dos seguintes melhor explica o uso de ensaios de ativação enzimática para avaliar o estado nutricional de uma vitamina?
- A. A adição do cofator derivado da vitamina à incubação converte a apoenzima previamente inativa na holoenzima ativa.
- B. A adição do cofator derivado da vitamina à incubação converte a holoenzima previamente inativa na apoenzima ativa.
- C. A adição do cofator derivado da vitamina à incubação converte a holoenzima previamente ativa na apoenzima inativa.
- D. A adição do cofator derivado da vitamina à incubação converte a apoenzima previamente ativa na holoenzima inativa.
- E. A adição do cofator derivado da vitamina à incubação converte a holoenzima previamente ativa na holoenzima ativa.
55. Qual dos seguintes poderia ser usado para preparar soro a partir de uma amostra sanguínea?
- A. Um tubo vazio.
- B. Um tubo contendo citrato.
- C. Um tubo contendo EDTA.
- D. Um tubo contendo oxalato.
- E. Um tubo com vácuo para excluir o oxigênio.
56. Qual dos seguintes poderia ser usado para coletar uma amostra sanguínea para uma análise de gases sanguíneos?
- A. Um tubo vazio.
- B. Um tubo contendo citrato.
- C. Um tubo contendo EDTA.
- D. Um tubo contendo oxalato.
- E. Um tubo com vácuo para excluir o oxigênio.
57. Qual das seguintes melhor explica a diferença entre a depuração da creatinina e da inulina como testes de função renal?
- A. A depuração da creatinina é maior do que a depuração da inulina, uma vez que a creatinina é secretada ativamente nos túbulos renais distais.
- B. A depuração da creatinina é maior do que a depuração da inulina, uma vez que a inulina é secretada ativamente nos túbulos renais proximais.
- C. A depuração da creatinina é maior do que a depuração da inulina, uma vez que a inulina é secretada ativamente nos túbulos renais distais.
- D. A depuração da creatinina é menor do que a depuração da inulina, uma vez que a creatinina é secretada ativamente nos túbulos renais distais.
- E. A depuração da creatinina é menor do que a depuração da inulina, uma vez que a inulina não é completamente filtrada no glomérulo.

Tráfego intracelular e seleção de proteínas

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Saber que muitas proteínas são direcionadas por sequências-sinal a seus destinos corretos, e que o aparelho de Golgi desempenha um importante papel na seleção de proteínas.
- Compreender que sinais especializados estão envolvidos na seleção de proteínas para as mitocôndrias, o núcleo e os peroxissomos.
- Reconhecer que peptídeos-sinal N-terminais desempenham um papel essencial no direcionamento das proteínas recém-sintetizadas para o lúmen do retículo endoplasmático (RE).
- Saber que as chaperonas impedem o dobramento defeituoso de outras proteínas, que existem mecanismos para a eliminação das proteínas dobradas de maneira imprópria e que o RE atua como compartimento de controle de qualidade.
- Explicar o papel da ubiquitina como molécula-chave na degradação das proteínas.
- Reconhecer o importante papel das vesículas transportadoras no transporte intracelular.
- Constatar que muitas doenças resultam de mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no transporte intracelular e se familiarizar com os termos doenças conformacionais e doenças de deficiência proteostáticas.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

No interior da célula, proteínas são sintetizadas nos polirribossomos, porém desempenham suas funções particulares em diversas localizações subcelulares. Algumas são destinadas a ser componentes de organelas específicas; outras, do citosol ou das diversas membranas celulares; e outras, ainda, são exportadas. Portanto, existe considerável **tráfego intracelular de proteínas**. Foi inicialmente reconhecido por Blobel, em 1970, que, para que as proteínas atinjam suas localizações adequadas, elas, em geral, possuem **informações** (um sinal ou sequência codificadora) que as **direcionam** apropriadamente. Esse fato leva à identificação de diversos sinais específicos (ver **Tabela 49-1**), e tornou-se aparente que **certas doenças** resultam de mutações que afetam esses sinais. Neste capítulo, são

analisados o tráfego intracelular das proteínas e a sua seleção, e são descritos, de modo sucinto, alguns dos distúrbios que ocorrem em consequência de anormalidades nesses processos.

MUITAS PROTEÍNAS SÃO DIRECIONADAS POR SEQUÊNCIAS-SINAL PARA SEUS DESTINOS CORRETOS

As vias de biossíntese de proteínas nas células podem ser consideradas como **um grande sistema de seleção**. Muitas proteínas transportam **sinais** (frequentemente, mas nem sempre, sequências específicas de aminoácidos) que as direcionam para seu destino, assegurando que sejam liberadas para a membrana ou ao compartimento celular apropriado; esses

TABELA 49-1 Sequências ou moléculas que direcionam as proteínas para organelas específicas

Sequência ou composto de direcionamento	Organela-alvo
Peptídeo-sinal N-terminal	RE
Sequência KDEL carboxiterminal (Lis-Asp-Glu-Leu) em proteínas residentes do RE em vesículas COPI	Lúmen do RE
Sequências diácidas (p. ex., Asp-X-Glu) em proteínas de membrana em vesículas COPII	Membranas de Golgi
Sequência aminoterminal (20 a 50 resíduos)	Matriz mitocondrial
NLS (p. ex., Pro ₂ -Lis ₃ -Arg-Lis-Val)	Núcleo
PTS (p. ex., Ser-Lis-Leu)	Peroxisomo
Manose-6-fosfato	Lisossomo

Abreviações: NLS, sinal de localização nuclear; PTS, sequência de direcionamento da matriz peroxissomal; RE, retículo endoplasmático.

sinais constituem um componente fundamental do sistema de seleção. Em geral, as sequências-sinal são reconhecidas e interagem com áreas complementares de outras proteínas, que atuam como receptores das proteínas que contêm esses sinais.

Uma importante decisão seletiva é tomada no início do processo de biossíntese proteica, quando proteínas específicas são sintetizadas nos **polirribossomos livres** ou nos **polirribossomos ligados à membrana**. A hipótese do sinal foi proposta por Blobel e Sabatini, em 1971, em parte para explicar a diferença entre os polirribossomos livres e os ligados à membrana. Eles propuseram que as proteínas sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana continham extensão peptídica N-terminal (**peptídeo-sinal N-terminal**) que garante a sua fixação às membranas do RE (**polirribossomos ligados à membrana**) e facilita a transferência da proteína para o lúmen do RE. Por outro lado, os polirribossomos que sintetizam proteínas e não possuem o peptídeo-sinal conservariam o movimento livre no citosol (**polirribossomos citosólicos**). Um aspecto importante da hipótese do sinal é que **todos os ribossomos apresentam a mesma estrutura**, e que a diferença entre ribossomos ligados à membrana e ribossomos livres depende unicamente das proteínas carreadoras dos primeiros, que apresentam peptídeo-sinal. Como muitas proteínas de membrana são sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana, a hipótese do sinal desempenha um importante papel nos **conceitos de montagem da membrana**. As regiões do RE que contém polirribossomos ligados são chamadas de **RE rugoso**, e a distinção entre os dois tipos de ribossomos leva a dois tipos de vias de seleção de proteínas, conhecidas como **ramo citosólico** e **ramo do RE rugoso (RER)** (Figura 49-1).

As proteínas sintetizadas pelos polirribossomos citosólicos são dirigidas às mitocôndrias, aos núcleos e aos peroxissomos por sinais específicos, ou permanecem no citosol caso careçam de sinal. Toda proteína que contém sequência de direcionamento que é posteriormente removida é designada como **pré-proteína**. Em alguns casos, um segundo peptídeo também é removido, e, assim, a proteína original é conhecida como **pré-pró-proteína** (p. ex., pré-pró-albumina; ver Capítulo 52).

As proteínas sintetizadas e selecionadas no **ramo do RER** (Figura 49-1) incluem muitas proteínas destinadas às várias membranas (p. ex., do RE, do aparelho de Golgi [AG], da

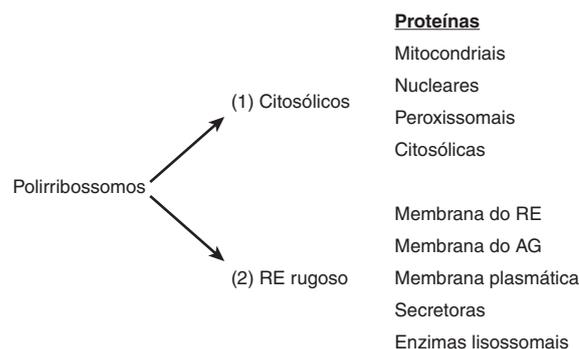


FIGURA 49-1 Os dois ramos da seleção de proteínas. As proteínas são sintetizadas nos polirribossomos citosólicos (livres) ou nos polirribossomos ligados à membrana no RE rugoso. Proteínas mitocondriais codificadas por genes nucleares são derivadas da via citosólica. (RE, retículo endoplasmático; AG, aparelho de Golgi.)

membrana plasmática [MP]), bem como enzimas lisossomais e também as destinadas à **exportação a partir da célula via exocitose** (secreção). Portanto, essas diversas proteínas podem residir na membrana ou no lúmen do RE, ou podem seguir a principal via de transporte das proteínas intracelulares para o AG. Na **via secretora** ou **exocítica**, as proteínas são transportadas a partir de RE → AG → MP e, em seguida, liberadas para o ambiente externo. As proteínas destinadas ao AG, à MP, a alguns outros locais ou à secreção são transportadas em **vesículas de transporte (Figura 49-2)**; a formação dessas partículas importantes é descrita de modo sucinto mais adiante. Outras proteínas destinadas à secreção são transportadas em **vesículas secretoras** (Figura 49-2). Essas vesículas são particularmente proeminentes no pâncreas e em algumas outras glândulas. A sua mobilização e secreção são ativadas ou desativadas quando necessário e, com frequência, são descritas como “**secreção regulada**”. Em contrapartida, o transporte de vesículas que ocorre continuamente pela via secretora é designado como “**transporte constitutivo**”. A passagem de enzimas para os lisossomos que utilizam o sinal de manose-6-fosfato é descrita no Capítulo 46.

O aparelho de Golgi está envolvido na glicosilação e na seleção de proteínas

O AG desempenha dois papéis importantes na síntese proteica. Em primeiro lugar, ele está envolvido no **processamento das cadeias oligossacarídicas** da membrana e de outras glicoproteínas N-ligadas e também contém enzimas envolvidas na O-glicosilação (ver Capítulo 46). Em segundo lugar, ele está envolvido na **seleção** de várias proteínas antes de seu transporte a seus destinos intracelulares apropriados. Todas as partes do AG participam da primeira função, ao passo que a **rede trans-Golgi (TGN)** está particularmente envolvida na segunda função e é muito rica em vesículas.

As chaperonas são proteínas que estabilizam proteínas desdobradas ou parcialmente dobradas

As **chaperonas moleculares** são proteínas que **estabilizam os intermediários desdobrados ou parcialmente dobrados**, proporcionando-lhes tempo suficiente para o seu dobramento

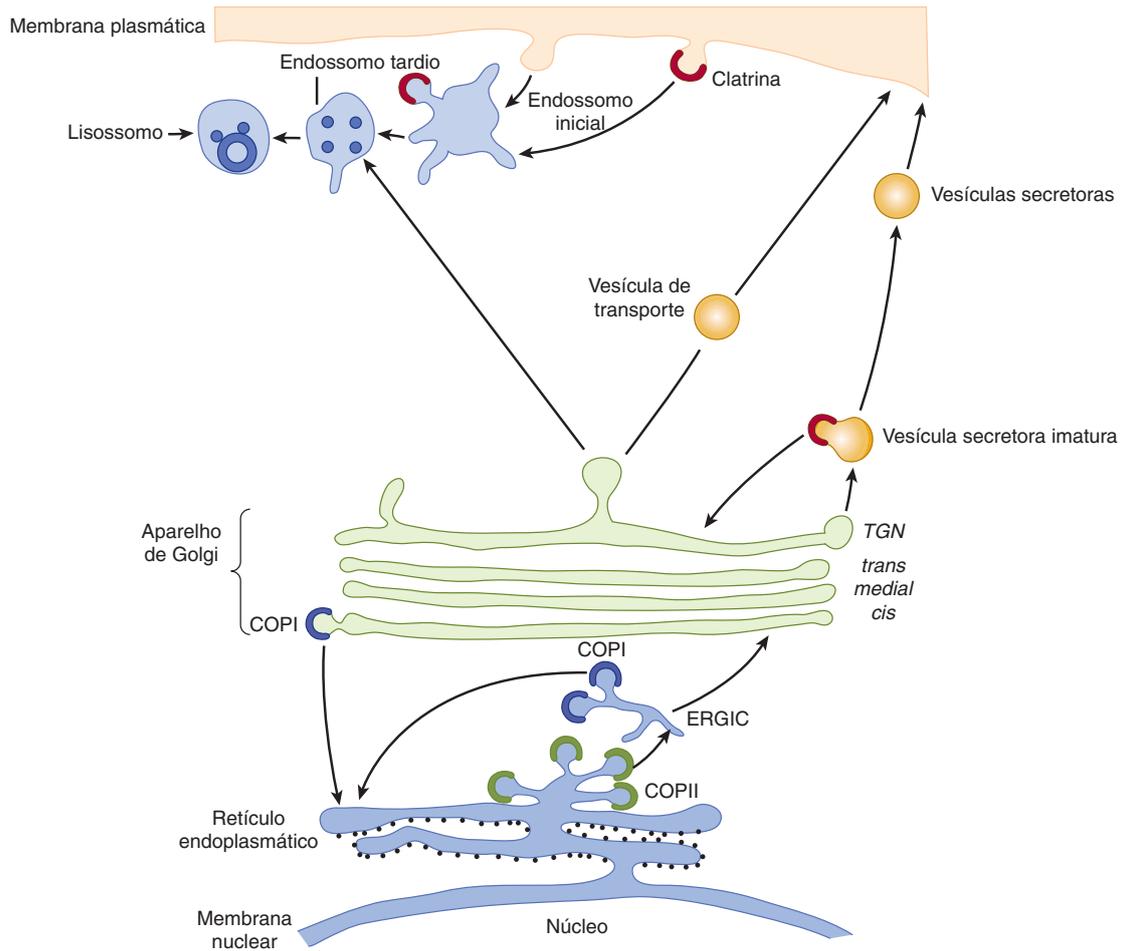


FIGURA 49-2 A via do RE rugoso da seleção de proteínas. As proteínas recém-sintetizadas são inseridas na membrana ou no lúmen do RE a partir dos polirribossomos ligados à membrana (pequenos círculos pretos recobrendo a superfície citosólica do RE). As proteínas que são transportadas para fora do RE são carregadas em vesículas COPII para o *cis*-Golgi (transporte anterógrado). As proteínas movimentam-se através do Golgi conforme as cisternas (estruturas semelhantes a sacos) se tornam maduras. Na rede *trans*-Golgi (TGN), o lado de exportação do Golgi, as proteínas são segregadas e selecionadas. Na secreção regulada, as proteínas acumulam-se nas vesículas secretoras, ao passo que as proteínas destinadas à inserção na membrana plasmática para secreção constitutiva são levadas para a superfície da célula em vesículas transportadoras. As vesículas revestidas de clatrina estão envolvidas na endocitose, transportando o seu carregamento até os endossomos tardios e os lisossomos. A manose-6-fosfato (não ilustrada; ver Capítulo 46) atua como sinal para transportar enzimas até os lisossomos. As vesículas COPI transportam proteínas do AG para o RE (transporte retrógrado) e podem estar envolvidas em algum transporte intra-Golgi. O carregamento normalmente passa pelo compartimento do complexo intermediário RE-Golgi (ERGIC) até o AG. (Cortesia de E. Degen.)

apropriado, e impedem a ocorrência de interações inadequadas, combatendo a formação de estruturas não funcionais. A maioria das chaperonas exibem **atividade ATPase** e se ligam ao ADP e ao ATP. Essa atividade é importante para o seu efeito no dobramento das proteínas. O complexo ADP-chaperona frequentemente exhibe alta afinidade pela proteína desdobrada que, quando ligada, estimula a liberação de ADP, com substituição pelo ATP. Por sua vez, o complexo ATP-chaperona libera os segmentos da proteína que foram dobrados de maneira apropriada, e o **ciclo** envolvendo a ligação de ADP e ATP é repetido até a liberação da proteína. As chaperonas são necessárias para o direcionamento correto de proteínas para suas localizações subcelulares. Várias propriedades importantes dessas proteínas estão listadas na **Tabela 49-2**.

As **chaperoninas** constituem a segunda classe importante de chaperonas. Elas formam complexas **estruturas semelhantes a um barril** em que uma proteína desdobrada é sequestrada

TABELA 49-2 Algumas propriedades das proteínas chaperonas

- Ocorrem em ampla gama de espécies, desde bactérias a seres humanos
- Muitas são denominadas proteínas de choque térmico (Hsp)
- Algumas são induzíveis por condições que causam o desdobramento das proteínas recém-sintetizadas (p. ex., temperatura elevada e várias substâncias químicas)
- Ligam-se predominantemente a regiões hidrofóbicas das proteínas desdobradas e impedem a sua agregação
- Atuam, em parte, como mecanismos de controle de qualidade ou de edição para a detecção de proteínas dobradas de maneira imprópria ou defeituosas
- As chaperonas exibem, em sua maioria, atividade de ATPase associada, estando o ATP ou o ADP envolvidos na interação proteína-chaperona
- São encontradas em vários compartimentos celulares, como o citosol, as mitocôndrias e o lúmen do retículo endoplasmático

de outras proteínas, fornecendo tempo suficiente e condições apropriadas para o seu dobramento correto. A estrutura da chaperonina bacteriana **GroEL** tem sido estudada em detalhes. Ela é polimérica, possui duas estruturas semelhantes a anéis, cada uma composta por sete subunidades idênticas, e, novamente, o ATP está envolvido em sua ação. A proteína de choque térmico **Hsp60** é a equivalente de GroEL nos eucariotos.

A VIA DE SELEÇÃO DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DIRECIONA AS PROTEÍNAS PARA ORGANELAS SUBCELULARES

As proteínas sintetizadas pela via de seleção citosólica contêm um sinal de captação, possibilitando que sejam captadas para o interior da organela subcelular correta, ou, quando estão destinadas ao citosol, não apresentam sinal direcionador. Sinais específicos de captação direcionam proteínas para mitocôndria, núcleo e peroxissomos (Tabela 49-1). Como a síntese de proteínas se completa antes que ocorra o transporte, esses processos são chamados de translocação pós-traducional. Os mecanismos envolvidos serão agora considerados um a um.

A maioria das proteínas mitocondriais é importada

A **mitocôndria** contém muitas proteínas. Treze polipeptídeos (principalmente componentes da cadeia de transporte de elétrons da membrana) são codificados pelo **genoma mitocondrial (mt)** sintetizados naquela organela, utilizando o seu próprio sistema de síntese proteica. Entretanto, a grande maioria (pelo menos várias centenas) é codificada por **genes nucleares**, é sintetizada fora das mitocôndrias nos **polirribossomos citosólicos** e precisa ser importada. As **levaduras** demonstraram ser um sistema particularmente útil para analisar os mecanismos de importação das proteínas mitocondriais, em parte devido à possibilidade de gerar uma variedade de **mutantes** que permitiram esclarecer os processos fundamentais envolvidos. Os maiores progressos foram efetuados no estudo das proteínas presentes na **matriz mitocondrial**, como as subunidades F_1 da ATPase. Apenas a via de importação das proteínas da matriz será discutida de modo detalhado a seguir.

As **proteínas da matriz** devem percorrer desde os polirribossomos citosólicos através das **membranas mitocondriais externa e interna** para alcançar o seu destino. A passagem através das duas membranas é denominada **translocação**. Essas proteínas apresentam sequência-líder aminoterminal (**pré-sequência**), com 20 a 50 aminoácidos de comprimento (ver Tabela 49-1), a qual não é altamente conservada, mas é anfipática e contém muitos aminoácidos hidrofóbicos e de carga positiva (p. ex., Lis ou Arg). A pré-sequência equivale ao peptídeo-sinal que medeia a fixação dos polirribossomos às membranas do RE (ver adiante), porém, nesse caso, **direcionando proteínas para a matriz**. Algumas características gerais da passagem da proteína do citosol para a matriz mt são mostradas na **Figura 49-3**.

A translocação é um processo **pós-traducional**, após a liberação das proteínas da matriz dos polirribossomos citosólicos. As interações com algumas das proteínas citosólicas que

atuam como **chaperonas** (ver a seguir) e como **fatores de direcionamento** ocorrem antes da translocação.

Dois distintos **complexos de translocação** estão localizados nas membranas mitocondriais externa e interna, designados (respectivamente) como TOM (translocase da membrana externa) e TIM (translocase da membrana interna). Cada complexo foi analisado, e foi constatado que são constituídos de diversas proteínas, das quais algumas atuam como **receptores** (p. ex., **Tom20/22**) para as proteínas que chegam, e outras, como **componentes** (p. ex., **Tom40**) dos **poros transmembranas** através dos quais essas proteínas devem passar. As proteínas devem estar no **estado desdobrado** para passar pelos complexos, e isso torna-se possível pela **ligação dependente de ATP a várias proteínas chaperonas**, incluindo **Hsp70** (Figura 49-3). Nas mitocôndrias, as chaperonas estão envolvidas na translocação, na seleção, no dobramento, na montagem e na degradação das proteínas importadas. É necessária uma **força próton-motora** através da membrana interna para importação; ela é resultante do **potencial elétrico** através da membrana (interior negativo) e do **gradiente de pH** (ver Capítulo 13). A passagem da sequência-líder de carga positiva através da membrana pode ser auxiliada pela carga negativa da matriz. A pré-sequência é clivada na matriz por uma **protease de processamento da matriz (MPP)**. O contato com **outras chaperonas** presentes na matriz é essencial para completar todo o processo de importação. A interação com Hsp70 mt (Hsp, proteína de choque térmico; mt, mitocondrial; 70, cerca de 70 kDa) assegura a importação correta para dentro da matriz e impede o dobramento incorreto ou a agregação, ao passo que a interação com o sistema Hsp60-mt-Hsp10 assegura dobramento apropriado. As interações das proteínas importadas com as chaperonas mencionadas anteriormente exigem **hidrólise de ATP** para impulsionar a sua ocorrência.

Os detalhes de como as pré-proteínas são translocadas ainda não foram elucidados por completo. É possível que o potencial elétrico associado à membrana mitocondrial interna produza mudança de conformação da pré-proteína desdobrada que está sendo translocada, auxiliando em sua passagem. Além disso, o fato de a matriz ser mais negativa do que o espaço intermembrana pode “atrair” a extremidade aminoterminal de carga positiva da pré-proteína, possibilitando a sua entrada na matriz. Para que ocorra translocação, é necessário haver estreita aposição nos **locais de contato** entre as membranas externa e interna.

O processo discutido anteriormente descreve a principal via das proteínas destinadas à matriz mitocondrial. Entretanto, algumas proteínas são inseridas na **membrana mitocondrial externa** facilitadas pelo complexo TOM; outras param no **espaço intermembrana**, e algumas se inserem na **membrana interna**; outras, ainda, seguem o seu trajeto até a matriz e, em seguida, retornam à membrana interna ou ao espaço intermembrana. Diversas proteínas contêm duas sequências de sinalização – uma para entrar na matriz mitocondrial e outra para mediar a relocação subsequente (p. ex., na membrana interna). Certas proteínas mitocondriais carecem de pré-sequências (p. ex., o citocromo *c*, que se localiza no espaço intermembrana), ao passo que outras contêm **pré-sequências internas**. Em geral, as proteínas utilizam vários mecanismos e vias para alcançar o seu destino final nas mitocôndrias.

A **Tabela 49-3** resume as características gerais que se aplicam à importação das proteínas dentro das organelas, incluindo as mitocôndrias e outras organelas, que são discutidas adiante.

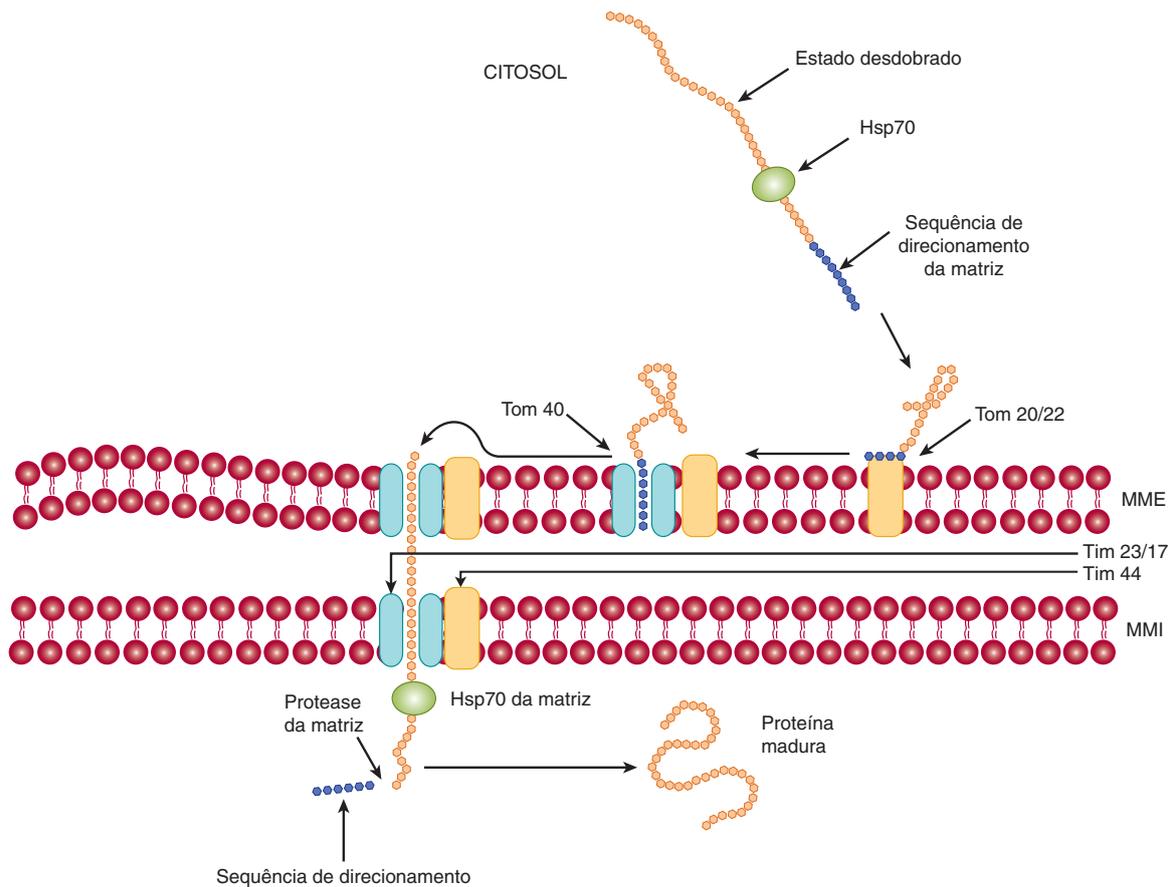


FIGURA 49-3 Entrada de uma proteína na matriz mitocondrial. A proteína desdobrada sintetizada nos polirribossomos citosólicos e contendo uma sequência de sinal para a matriz interage com a chaperona citosólica Hsp70 e, em seguida, interage com o receptor da membrana externa mt translocon da membrana externa (Tom) 20/22 e é transferida para o canal de importação Tom 40. A translocação através do canal é seguida pelo transporte através da membrana mt interna via complexo compreendendo as proteínas Tim (translocon da membrana interna) 23 e Tim 17. No interior da membrana mt interna, interage com a chaperona da matriz Hsp70, que, por sua vez, interage com a proteína de membrana Tim 44. A hidrólise do ATP pela Hsp70 mt provavelmente ajuda a impulsionar a translocação, assim como o interior eletronegativo da matriz. A sequência de direcionamento é, posteriormente, clivada pela protease da matriz, e a proteína importada assume o seu formato final ou pode interagir com uma chaperonina mt antes disso. No local de translocação, as membranas mt externa e interna estão em estreito contato. MME, membrana mitocondrial externa; MMI, membrana mitocondrial interna. (Modificada, com permissão, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W.H. Freeman & Co, 2008.)

TABELA 49-3 Algumas características gerais da importação de proteínas para as organelas

- A importação de uma proteína para uma organela ocorre geralmente em três etapas: reconhecimento, translocação e maturação
- As sequências de direcionamento presentes na proteína são reconhecidas no citoplasma ou na superfície da organela
- Em geral, a proteína é desdobrada para translocação, e esse estado é mantido no citoplasma por chaperonas
- A passagem da proteína através da membrana requer energia e chaperonas das organelas no lado *trans* da membrana
- Os ciclos de ligação e liberação da proteína à chaperona possibilitam que a cadeia polipeptídica seja arrastada através da membrana
- Outras proteínas existentes dentro da organela catalisam o dobramento da proteína, fixando, frequentemente, cofatores ou oligossacarídeos e efetuando a sua montagem em monômeros ou oligômeros ativos

Fonte: Dados de McNew JA, Goodman JM: The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci* 1998;21:54. Reimpressa, com permissão, de Elsevier.

O transporte de macromoléculas para dentro e para fora do núcleo envolve sinais de localização

Foi estimado que mais de 1 milhão de macromoléculas são transportadas por minuto entre o núcleo e o citoplasma em uma célula eucariótica ativa. Essas macromoléculas incluem histonas, proteínas e subunidades ribossomais, fatores de transcrição e moléculas de mRNA. O transporte é bidirecional e ocorre através dos **complexos dos poros nucleares (NPCs)**, os quais consistem em estruturas complexas que apresentam massa 15 vezes maior que a de um ribossomo e são constituídas de agregados de cerca de 30 proteínas diferentes. O diâmetro mínimo de um NPC é de aproximadamente 9 nm. As moléculas com menos de 40 kDa podem atravessar o canal do NPC por **difusão**, porém existem **mecanismos de translocação especiais** para moléculas maiores. Esses mecanismos estão sendo objeto de intensas pesquisas, no entanto algumas características importantes já foram identificadas.

Aqui, é descrita principalmente a **importação nuclear** de certas macromoléculas. O quadro geral que emergiu é o de que as proteínas a serem importadas (moléculas de carga) transportam um **sinal de localização nuclear (NLS)**. Um exemplo de NLS é a sequência de aminoácidos (Pro)₂-(Lis)₃-Arg-Lis-Val (Tabela 49-1), que é significativamente rica em resíduos básicos. Dependendo do NLS que ela possua, uma molécula de carga interage com um membro de uma família de proteínas solúveis, denominadas **importinas**, e o complexo **fixa-se** transitoriamente ao NPC. Outra família de proteínas, denominada **Ran**, desempenha papel regulador crítico na interação do complexo com o NPC, bem como na sua translocação através desse complexo. As proteínas Ran consistem em **GTPases** nucleares monoméricas pequenas e, à semelhança de outras GTPases, existem nos estados ligado ao GTP ou ligado ao GDP. Essas proteínas são reguladas por **fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs)**, que estão localizados no núcleo, e por **proteínas aceleradoras de GTPase (GAPs)** de Ran, que são predominantemente citoplasmáticas. O estado da Ran ligado ao GTP é favorecido no núcleo, ao passo que a forma ligada ao GDP predomina no citoplasma. As conformações e as atividades das moléculas de Ran variam, dependendo da ligação de GTP ou de GDP a essas proteínas (a forma ligada ao GTP é ativa;

ver discussão das proteínas G no Capítulo 42). Acredita-se que a **assimetria** entre o núcleo e o citoplasma – no que diz respeito a qual desses dois nucleotídeos está ligado às moléculas de Ran – seja crucial para compreender as funções da Ran na transferência unidirecional de complexos através do NPC. Quando as **moléculas de carga** são **liberadas no interior do núcleo**, as **importinas recirculam para o citoplasma** para serem utilizadas novamente. A **Figura 49-4** fornece um resumo de algumas das principais características do processo descrito acima.

Proteínas semelhantes às importinas, designadas como **exportinas**, estão envolvidas na exportação de muitas macromoléculas (várias proteínas, moléculas de tRNA, subunidades ribossomais e certas moléculas de mRNA) presentes no núcleo. As moléculas de carga para exportação apresentam **sinais de exportação nuclear (NESs)**. As proteínas Ran também estão envolvidas nesse processo, e, hoje, está bem estabelecido que os processos de importação e exportação compartilham certas características. A família das importinas e das exportinas é designada como **carioferinas**.

Outro sistema está envolvido na translocação da maior parte das **moléculas de mRNA**. Essas moléculas são exportadas do núcleo para o citoplasma na forma de complexos de ribonucleoproteína (RNP) fixados a uma proteína denominada

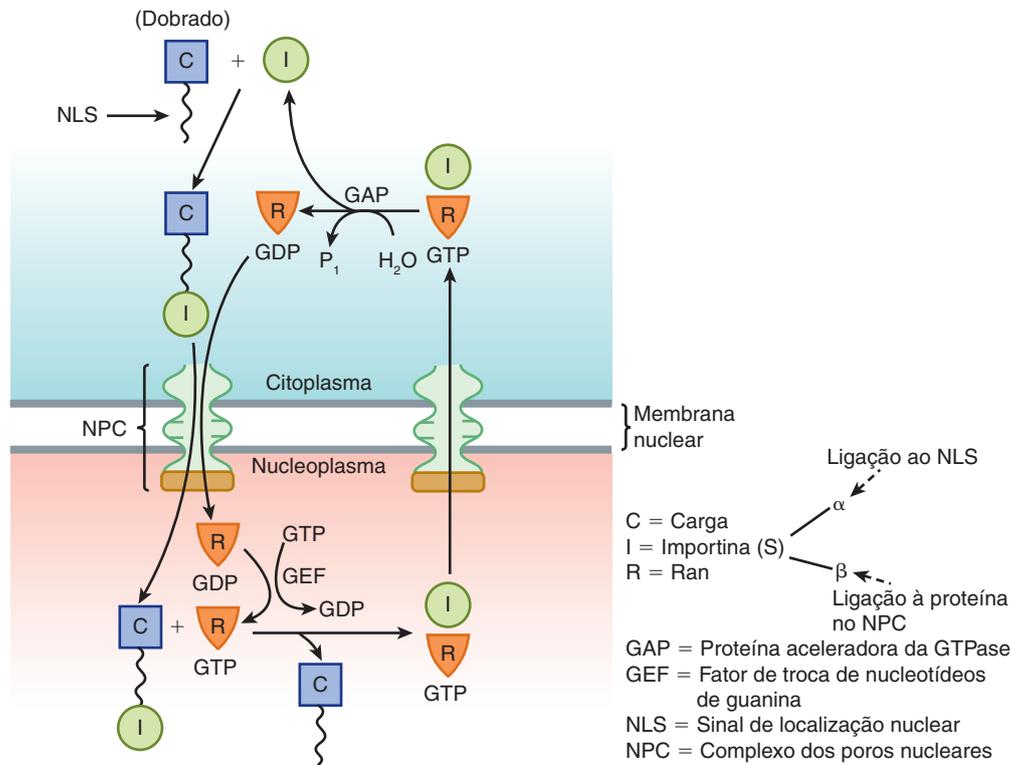


FIGURA 49-4 Representação simplificada da entrada de uma proteína no nucleoplasma. Uma molécula de carga (C) no citoplasma interage via sinal de localização nuclear (NLS) para formar um complexo com uma importina (I). (Pode ser uma importina α ou ambas as importinas, α e β.) Esse complexo interage com Ran (R)×GDP e atravessa o complexo dos poros nucleares (NPC) para o interior do nucleoplasma. No nucleoplasma, Ran×GDP é convertida em Ran×GTP pelo fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF), provocando mudança de conformação da Ran que libera a molécula de carga. Em seguida, o complexo I-Ran×GTP deixa o nucleoplasma pelo NPC para retornar ao citoplasma. Aqui, I é liberada para participar de outro ciclo de importação devido à ação da proteína aceleradora da GTPase (GAP), que converte Ran×GTP em GDP. A Ran×GTP é a forma ativa do complexo, ao passo que a forma de Ran×GDP é inativa. Acredita-se que a direcionalidade seja conferida ao processo global pela dissociação da Ran×GTP no citoplasma. (Modificada, com permissão, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W.H. Freeman & Co, 2008.)

exportador de mRNP. Trata-se de uma molécula heterodimérica (i.e., composta por duas subunidades diferentes, TAP [também chamada Nfx1] e Nxt-1), que transporta moléculas de RNP através do NPC. Ran não está envolvida. Esse sistema parece utilizar a hidrólise do ATP por uma RNA-helicase (Dbp5) para impulsionar a translocação.

Outras **GTPases monoméricas pequenas** (p. ex., ARF, Rab, Ras e Rho) são importantes em diversos processos celulares, como na formação e no transporte de vesículas (ARF e Rab; ver adiante), em determinados processos de crescimento e de diferenciação (Ras) e na formação do citoesqueleto de actina (Rho). Um processo envolvendo GTP e GDP também é crucial no transporte de proteínas através da membrana do RE (ver a seguir).

As proteínas importadas para os peroxissomos transportam sequências de direcionamento singulares

O **peroxissomo** é uma organela importante envolvida em certos aspectos do metabolismo de numerosas moléculas, incluindo ácidos graxos e outros lipídeos (p. ex., plasmalogênios, colesterol, ácidos biliares), purinas, aminoácidos e peróxido de hidrogênio. O peroxissomo é delimitado por uma única

membrana e contém mais de 50 enzimas; a catalase e a urato-oxidase são enzimas marcadoras dessa organela. As suas proteínas são **sintetizadas nos polirribossomos citosólicos** e sofrem dobramento antes de serem importadas. As vias de importação de algumas de suas proteínas e enzimas foram estudadas, algumas das quais são **componentes da matriz** (Figura 49-5), e outras, **componentes da membrana**. Foram descobertas pelo menos duas **sequências de direcionamento da matriz peroxissomal (PTSs)**. Uma delas, a **PTS1**, é um tripeptídeo (i.e., Ser-Lis-Leu [SKL], porém, foram detectadas variações dessa sequência) localizado na extremidade carboxiterminal de diversas proteínas da matriz, incluindo a catalase. Outra, a **PTS2**, é uma sequência de nove aminoácidos na extremidade N-terminal e foi detectada em pelo menos quatro proteínas da matriz (p. ex., tiolase). Nenhuma dessas duas sequências é clivada após a sua entrada na matriz. As proteínas que contêm sequências de PTS1 **formam complexos** com uma proteína receptora citosólica (**Pex5**) e as proteínas que contêm sequências de PTS2 formam complexos com outra proteína receptora (**Pex7**). Em seguida, os complexos resultantes interagem com um complexo receptor da membrana, **Pex2/10/12**, que os transloca para a matriz. Existem também proteínas envolvidas no transporte subsequente das proteínas para a matriz. O Pex5 é reciclado para o citosol. Foi constatado que a maioria das

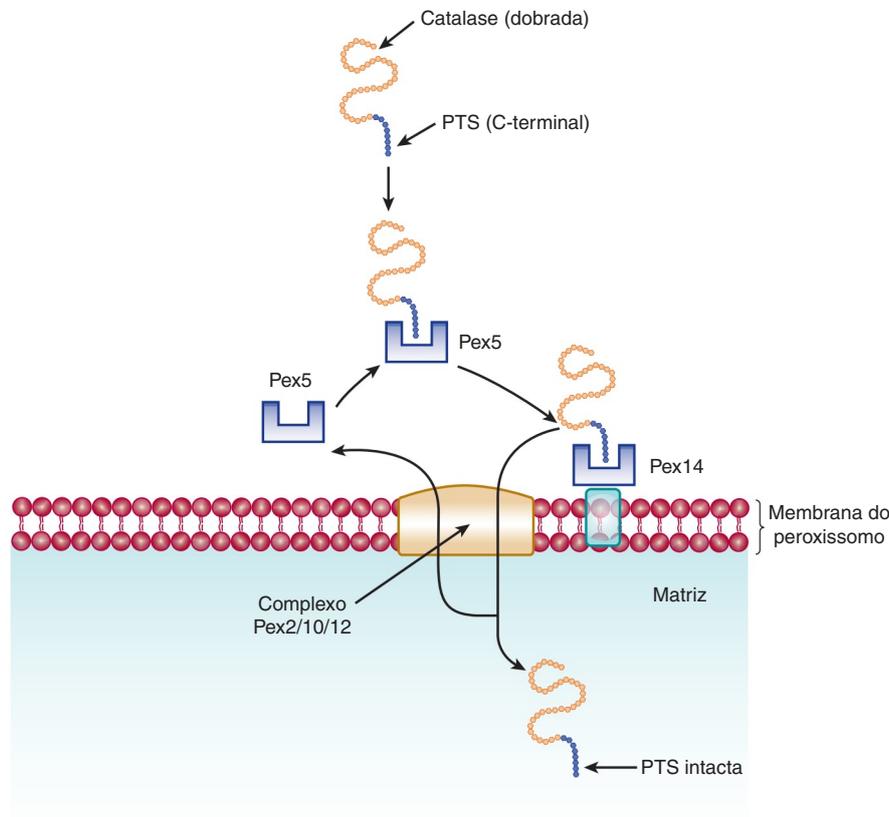


FIGURA 49-5 Entrada de uma proteína na matriz peroxissomal. A proteína a ser importada para a matriz é sintetizada nos polirribossomos citosólicos, assume seu formato dobrado antes da importação e contém uma sequência de direcionamento da matriz peroxissomal (PTS) C-terminal. Ela interage com a proteína receptora citosólica Pex5, e, em seguida, o complexo interage com um receptor existente na membrana peroxissomal, o Pex14. Por sua vez, o complexo proteína-Pex14 passa para o complexo Pex2/10/12 na membrana peroxissomal e é translocado. O receptor Pex5 retorna ao citosol. A proteína conserva a sua PTS na matriz. (Modificada, com permissão, de Lodish H, et al.: *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W.H. Freeman & Co, 2008.)

proteínas de membrana dos peroxissomos não contém nenhuma das duas sequências de direcionamento citadas anteriormente, mas, aparentemente, apresenta outras sequências. O sistema de importação pode processar **oligômeros intactos** (p. ex., catalase tetramérica). A importação de **proteínas da matriz** requer ATP, ao passo que a importação de **proteínas de membrana, não**.

A maioria dos casos de síndrome de Zellweger é causada por mutações dos genes envolvidos na biogênese dos peroxissomos

O interesse na importação de proteínas para dentro dos peroxissomos foi estimulado pelos estudos da **síndrome de Zellweger**. Essa doença se manifesta ao nascimento e se caracteriza por **profundo comprometimento neurológico**, com as vítimas muitas vezes chegando ao óbito no período de 1 ano. A quantidade de peroxissomos pode variar, desde um número quase normal até praticamente a sua ausência em alguns pacientes. Os achados bioquímicos consistem em acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa, anormalidades na síntese dos ácidos biliares e acentuada redução dos plasmalogênios. A condição é geralmente causada por **mutações** em genes que codificam determinadas proteínas – a família de genes PEX, também chamada de **peroxinas** – envolvidas em várias etapas da **biogênese do peroxissomo** (como a importação das proteínas anteriormente descritas) ou dos genes que codificam algumas enzimas peroxissomais. Duas doenças estreitamente relacionadas são a **adrenoleucodistrofia neonatal** e a **doença de Refsum infantil**. A síndrome de Zellweger e essas duas doenças representam um **espectro** de manifestações superpostas, entre as quais a síndrome de Zellweger é a **mais grave** (muitas proteínas afetadas) e a doença de Refsum infantil é a **menos grave** (apenas uma ou poucas proteínas afetadas). A **Tabela 49-4** fornece uma lista dessas doenças e de distúrbios relacionados.

TABELA 49-4 Distúrbios causados por anormalidades dos peroxissomos

	Número OMIM ^a
Síndrome de Zellweger	214100
Adrenoleucodistrofia neonatal	202370
Doença de Refsum infantil	266510
Acidemia hiperpipecólica	239400
Condrodisplasia puntiforme rizomélica	215100
Adrenoleucodistrofia	300100
Pseudoadrenoleucodistrofia neonatal	264470
Pseudossíndrome de Zellweger	261515
Hiperoxalúria tipo 1	259900
Acatalasemia	115500
Deficiência de glutaril-CoA-oxidase	231690

^aOMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*. Cada número especifica uma referência pela qual podem ser encontradas informações sobre cada um dos distúrbios citados. **Fonte:** reproduzida, com permissão, de Seashore MR, Wappner RS: *Genetics in Primary Care & Clinical Medicine*. Appleton & Lange, 1996.

AS PROTEÍNAS SELECIONADAS PELA VIA DO RE RUGOSO POSSUEM PEPTÍDEOS-SINAL N-TERMINAIS

Conforme indicado anteriormente, a **via do RE rugoso** é o segundo dos dois ramos envolvidos na síntese e na seleção das proteínas. Nesse ramo, as proteínas apresentam **peptídeos-sinal N-terminais** e são sintetizadas nos **polirribossomos ligados à membrana**. Em geral, eles são **translocados para o lúmen** do RE rugoso antes da seleção posterior (Figura 49-2). Entretanto, algumas proteínas de membrana são transferidas diretamente para o interior da membrana do RE, sem alcançar o lúmen.

Algumas características dos peptídeos-sinal N-terminais estão sintetizadas na **Tabela 49-5**.

Existem muitas **evidências que sustentam** a hipótese do sinal, confirmando que os peptídeos-sinal N-terminais estão envolvidos no processo de translocação da proteína através da membrana do RE. Por exemplo, as proteínas mutantes que contêm peptídeos-sinal alterados, nos quais os aminoácidos hidrofóbicos são substituídos por aminoácidos hidrofílicos, não são inseridas no lúmen do RE. Por outro lado, proteínas não membrânicas (p. ex., α -globina) às quais foram fixados peptídeos sinal por engenharia genética podem ser inseridas no lúmen do RE ou até mesmo secretadas.

A translocação de proteínas para o RE pode ser cotraducional ou pós-traducional

A maioria das proteínas nascentes é transferida através da membrana do RE para o interior do lúmen pela **via cotraducional**, assim denominada porque o processo ocorre durante a síntese proteica. O processo de alongamento da porção restante da proteína que está sendo sintetizada provavelmente facilita a passagem da proteína nascente através da bicamada lipídica. É importante que as proteínas sejam mantidas em **estado desdobrado** antes de entrar no canal de condutância – caso contrário, poderiam não ser capazes de ter acesso ao canal. A via envolve diversas proteínas especializadas e ocorre em cinco etapas, resumidas a seguir e na **Figura 49-6**.

Etapa 1: A sequência-sinal emerge do ribossomo e liga-se à **partícula de reconhecimento de sinal (SRP)**. A SRP contém **seis proteínas** associadas a uma molécula de RNA. Tanto a molécula de RNA quanto as suas proteínas desempenham vários papéis (como a ligação de outras moléculas) em sua

TABELA 49-5 Algumas propriedades dos peptídeos-sinal que direcionam as proteínas para o RE

• Localizados geralmente, mas nem sempre, na região aminoterminal
• Contêm 12-35 aminoácidos
• A metionina frequentemente é o aminoácido aminoterminal
• Contêm um grupo central (cerca de 6-12) de aminoácidos hidrofóbicos
• A região próxima ao N-terminal apresenta carga positiva efetiva
• O resíduo de aminoácido no local de clivagem é variável, porém os resíduos – 1 e – 3 relacionados ao local de clivagem devem ser pequenos e neutros

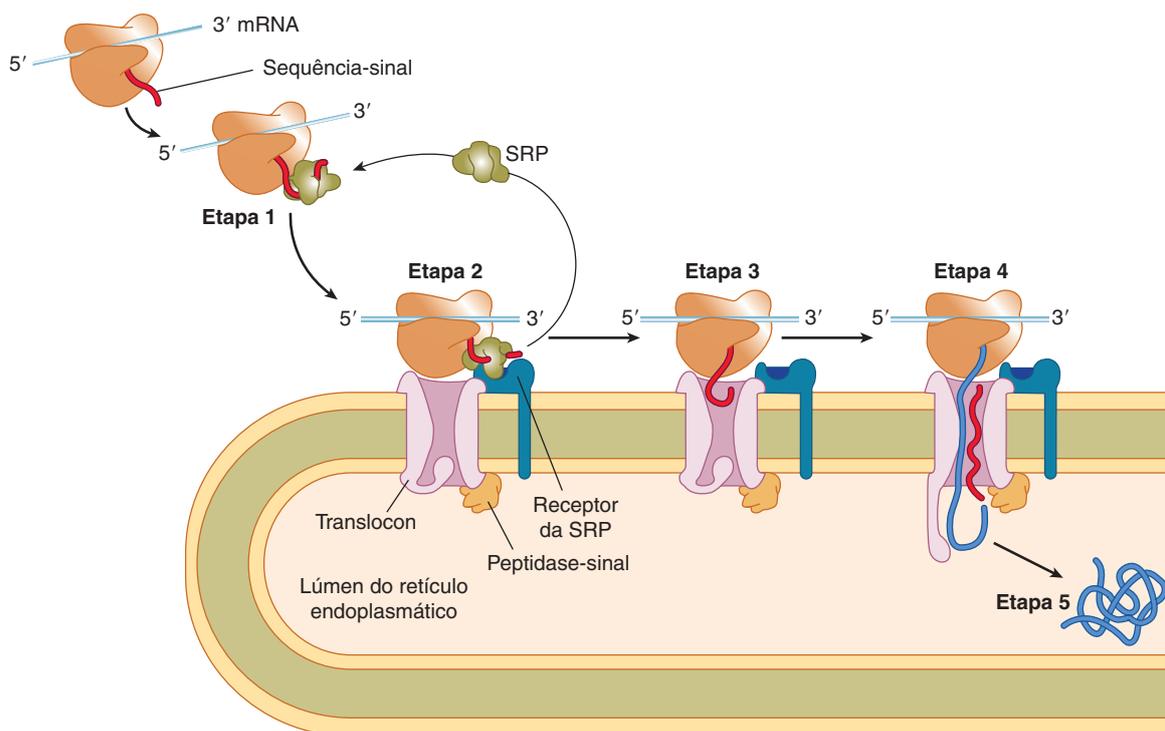


FIGURA 49-6 Endereçamento cotraducional das proteínas secretoras para o RE. **Etapa 1:** à medida que a sequência-sinal emerge do ribossomo, ela é reconhecida e ligada pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP). **Etapa 2:** a SRP escolta o complexo até a membrana do RE, onde se liga ao receptor da SRP (SR). **Etapa 3:** a SRP é liberada, o ribossomo liga-se ao translocon, e a sequência-sinal é inserida no canal da membrana. **Etapa 4:** a sequência-sinal abre o translocon. A tradução recomeça, e a cadeia polipeptídica em crescimento é translocada através da membrana. **Etapa 5:** a clivagem da sequência-sinal pela peptidase-sinal libera o polipeptídeo no lúmen do RE. (Reproduzida, com permissão, de Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc, 2009.)

função. Essa ligação interrompe temporariamente o alongamento posterior da cadeia polipeptídica (término do alongamento) após a polimerização de cerca de 70 aminoácidos.

Etapa 2: O complexo SRP-ribossomo-proteína nascente desloca-se para a membrana do RE, onde se liga ao **receptor de SRP (SRP-R)**, uma proteína de membrana do RE composta por **subunidades α e β** , a última abrangendo a membrana do RE. A SRP orienta o complexo para o SRP-R, que impede a expulsão prematura do polipeptídeo em crescimento no citosol.

Etapa 3: A SRP é liberada, a tradução recomeça, o ribossomo liga-se ao **translocon (complexo Sec61)**, e o peptídeo-sinal é inserido no canal no translocon. SRP e ambas as subunidades de SRP-R podem se ligar ao **GTP**, que deverá estar na forma GTP em ambos os complexos para possibilitar essa interação. Quando a interação ocorre, GTP é hidrolisado, SRP dissocia-se de SRP-R e é liberada, e o ribossomo liga-se ao translocon, possibilitando a entrada do peptídeo-sinal.

Etapa 4: O peptídeo-sinal induz a abertura do canal no translocon pela sua ligação a determinados resíduos hidrofóbicos, induzindo o movimento da tampa (mostrada na base do translocon, na Figura 49-6). Em seguida, o peptídeo em crescimento é totalmente translocado através da membrana, sendo o processo impulsionado pela sua síntese contínua. O **translocon** consiste em três proteínas de membrana (o complexo Sec61) que formam um **canal de condução de proteínas** na membrana do RE, através da qual a proteína recém-sintetizada pode passar. O canal **abre-se apenas quando o peptídeo-sinal**

está presente, preservando a condutância através da membrana do RE quando ela se fecha. O fechamento do canal quando não está havendo translocação de proteínas impede o vazamento de íons, como cálcio e outras moléculas, causando disfunção celular.

Etapa 5: Ocorre clivagem do peptídeo-sinal pela **peptidase-sinal** e o polipeptídeo/proteína totalmente translocado é liberado no lúmen do RE. O peptídeo-sinal é possivelmente degradado por proteases. Os ribossomos são liberados da membrana do RE e dissociam-se em seus dois tipos de subunidades.

As **proteínas secretoras e as proteínas solúveis destinadas às organelas distais ao RE** atravessam completamente a bicamada lipídica da membrana e são descarregadas no lúmen do RE. Muitas proteínas secretoras são N-glicosiladas. As **cadeias de N-glicanos**, quando presentes, são adicionadas pela enzima **oligossacarídeo: proteína-transferase** (ver Capítulo 46) à medida que essas proteínas atravessam a parte interna da membrana do RE – processo denominado **glicosilação cotraducional**. Em seguida, essas glicoproteínas são encontradas no **lúmen do aparelho de Golgi**, onde ocorrem alterações adicionais nas cadeias de glicano (Capítulo 46) antes da distribuição intracelular ou secreção.

Em contrapartida, as proteínas incorporadas nas **membranas do RE**, assim como nas **outras membranas** ao longo da via secretora, sofrem apenas **translocação parcial** através da membrana do RE (etapas 1 a 4, anteriormente). Elas são

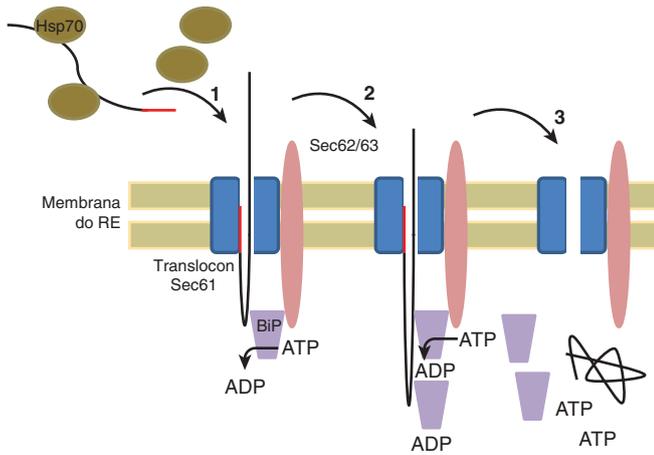


FIGURA 49-7 Translocação pós-traducional de proteínas para o interior do RE. 1. Proteínas sintetizadas no citosol têm seu dobramento impedido pelas proteínas chaperonas, como os membros da família da Hsp70. A sequência-sinal N-terminal insere-se no complexo translocon Sec61 e as chaperonas citosólicas são liberadas. A BiP interage com a proteína e o complexo Sec62/63, e seu ATP ligado é hidrolisado a ADP. 2. A proteína é impedida de retornar ao citosol pela BiP ligada e pela ligação sucessiva de BiP, e a hidrólise de ATP puxa a proteína para o interior do lúmen. 3. Quando a proteína completa está no interior, ADP é trocado por ATP, e BiP é liberada.

capazes de se inserir na membrana do RE por transferência lateral através da parede do translocon (ver a seguir).

A **translocação pós-traducional** de proteínas para o RE ocorre em eucariotos, embora seja menos comum do que a via cotraducional. O processo (Figura 49-7) envolve o complexo translocon Sec61, o **complexo Sec62/Sec63**, que é também ligado à membrana, e as proteínas chaperonas da família da Hsp70. Algumas dessas também impedem o dobramento da proteína no citosol, porém uma delas, a **proteína de ligação da imunoglobulina (BiP)**, encontra-se no interior do lúmen do RE. A proteína a ser translocada inicialmente se liga ao translocon, e as chaperonas citosólicas são liberadas. Em seguida, a extremidade-líder do peptídeo liga-se à BiP no lúmen. O ATP ligado à BiP interage com Sec62/63, o ATP é hidrolisado a ADP e fornece energia para o movimento da proteína adiante, ao passo que o BiP-ADP ligado impede o seu movimento de volta ao citosol. Ele pode, em seguida, ser encaminhado por ligação sequencial às moléculas BiP e por hidrólise de ATP. Quando o peptídeo completo tiver penetrado no lúmen, ADP é trocado por ATP, permitindo que a BiP seja liberada. Além de sua função na seleção de proteínas para o lúmen do RE, a BiP **promove o dobramento apropriado ao obstruir a agregação** e se ligará temporariamente às cadeias pesadas de imunoglobulina e a muitas outras proteínas anormalmente dobradas, impedindo que deixem o RE.

Há evidências de que a membrana do RE esteja envolvida no **transporte retrógrado** de várias moléculas do lúmen do RE para o citosol. Essas moléculas incluem glicoproteínas desdobradas ou dobradas de maneira imprópria, glicopeptídeos e oligossacarídeos. Pelo menos algumas moléculas são **degradadas em proteossomos** (ver a seguir). A participação do translocon na retrotranslocação não está bem esclarecida; um ou mais canais adicionais podem estar envolvidos. De qualquer forma, existe **tráfego bidirecional** através da membrana do RE.

AS PROTEÍNAS SEGUEM VÁRIAS ROTAS PARA A SUA INSERÇÃO OU FIXAÇÃO NAS MEMBRANAS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

As rotas que as proteínas seguem para serem inseridas nas membranas do RE incluem a inserção cotraducional, a inserção pós-traducional, a retenção no AG seguida pela recuperação para o RE, e o transporte retrógrado a partir do AG.

A inserção cotraducional requer sequências de término de transferência ou sequências de inserção interna

A Figura 49-8 ilustra diversas maneiras pelas quais as proteínas são distribuídas nas membranas. Em particular, as regiões **aminoterminais** de determinadas proteínas (p. ex., o receptor de LDL) podem ser encontradas na face extracitoplasmática, ao passo que, em outras proteínas (p. ex., o receptor de assialoglicoproteínas), as regiões **carboxiterminais** situam-se nessa face. Essas disposições são explicadas pelos eventos iniciais de biossíntese na membrana do RE. Proteínas, como o **receptor de LDL**, entram na membrana do RE por um processo análogo ao de uma proteína secretora (Figura 49-6); elas atravessam parcialmente a membrana do RE, o peptídeo-sinal é clivado, e a sua região aminoterminal faz protrusão no lúmen (ver também Figura 49-14). Entretanto, esse tipo de proteína contém um segmento altamente hidrofóbico que atua como **sinal de término de transferência** e leva à sua retenção na membrana (Figura 49-9). Essa sequência possui sua extremidade N-terminal no lúmen do RE e a C-terminal no citosol; o sinal de término de transferência forma o único segmento transmembrana da proteína e constitui o seu domínio de âncora na membrana. Acredita-se que a proteína deixe o translocon para o interior da membrana por um portão lateral que se abre e fecha continuamente, permitindo que as sequências hidrofóbicas penetrem na bicamada lipídica.

A pequena placa de membrana do RE na qual está localizado o receptor de LDL recém-sintetizado brota, em seguida, como componente de uma vesícula de transporte, que, por fim, se fundirá com a MP, de modo que as regiões C-terminais ficarão voltadas para o citosol e as N-terminais agora se voltarão para o exterior da célula (Figura 49-14). Em contrapartida, o **receptor das assialoglicoproteínas** carece de um peptídeo sinal N-terminal clivável, mas possui uma **sequência de inserção interna**, que se insere na membrana, porém não é clivável. Esta atua como uma âncora, e a sua região C-terminal é colocada através da membrana para o interior do lúmen do RE. O citocromo P450 é ancorado de forma semelhante, porém sua porção N-terminal, e não a C-terminal, é colocada para o interior do lúmen. A disposição mais complexa de um **transportador transmembrana** (p. ex., para a glicose) que possa ter atravessado a membrana até 12 vezes pode ser explicada pelo fato de as α -hélices transmembrana alternadas atuarem como sequências de inserção não clivadas e como sinais de término de transferência, respectivamente. Cada par de segmentos helicoidais é inserido como um grampo de cabelo. As sequências que determinam a estrutura

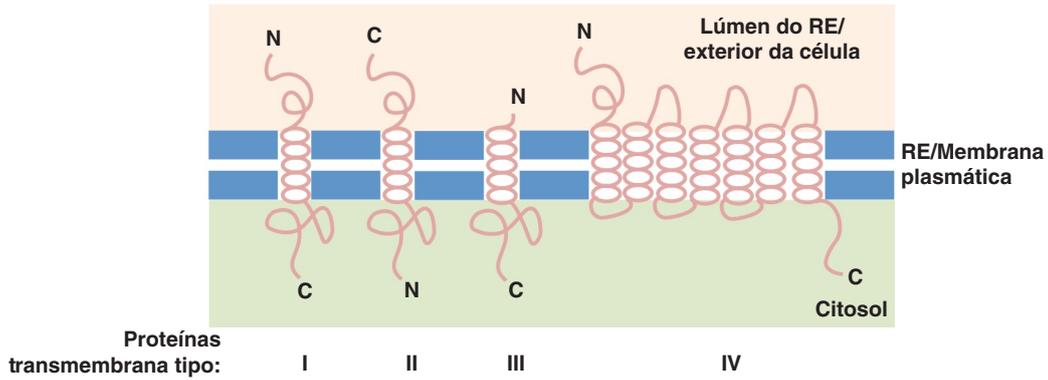


FIGURA 49-8 Variações nos mecanismos pelos quais as proteínas são inseridas nas membranas. Essa representação esquemática ilustra diversas orientações possíveis. As orientações formam-se inicialmente na membrana do RE, porém são retidas quando as vesículas brotam e se fundem com a membrana plasmática (ver Figura 46-14), de modo que o terminal inicialmente voltado para o lúmen do RE sempre se volta para fora da célula. As proteínas transmembranas tipo I (p. ex., o receptor de LDL e a hemaglutinina da *influenza*) atravessam a membrana uma vez e apresentam suas regiões aminoterminais no lúmen do RE/exterior da célula. As proteínas transmembranas tipo II (p. ex., as assialoglicoproteínas e os receptores de transferrina) também atravessam a membrana uma vez, porém apresentam suas regiões C-terminais no lúmen do RE/exterior da célula. As proteínas transmembranas tipo III (p. ex., o citocromo P450, uma proteína de membrana do RE) apresentam disposição semelhante às proteínas tipo I, porém não contêm um peptídeo-sinal clivável. As proteínas transmembranas tipo IV (p. ex., os receptores acoplados à proteína G e os transportadores de glicose) atravessam a membrana várias vezes (7 vezes o primeiro e 12 vezes o último); elas também são denominadas proteínas politópicas de membrana. (C, carboxiterminal; N, aminoterminal.)

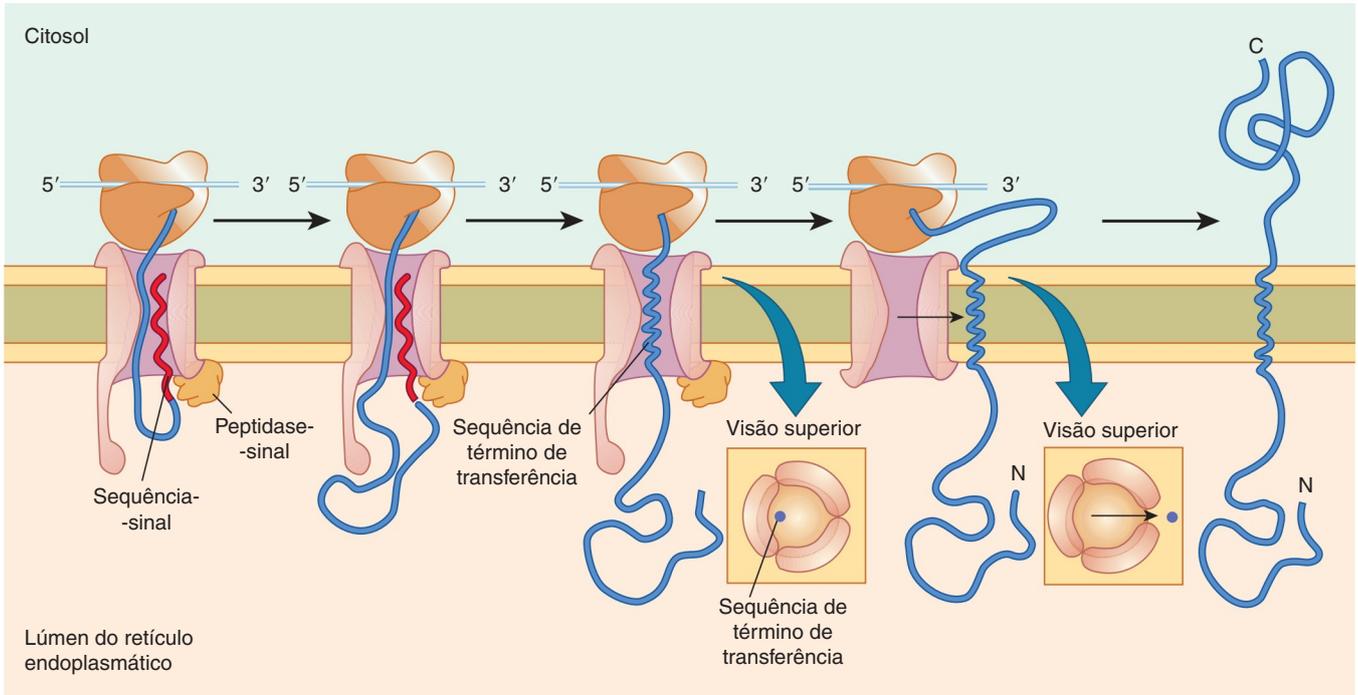


FIGURA 49-9 Inserção de uma proteína de membrana com uma sequência-sinal clivável e uma única sequência de término de transferência. A sequência-sinal é clivada à medida que a cadeia polipeptídica atravessa a membrana, de modo que a região aminoterminal da cadeia polipeptídica fica exposta no lúmen do RE. Entretanto, a translocação da cadeia polipeptídica através da membrana é interrompida quando o translocon reconhece uma sequência de término de transferência transmembrana. Isso permite que a proteína deixe o canal via portão lateral e se ancore na membrana do RE. A continuação da tradução resulta em uma proteína que atravessa a membrana, com a sua região carboxiterminal no lado citosólico. (Reproduzida, com permissão, de Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc, 2009.)

de uma proteína em uma membrana são denominadas **seqüências topogênicas**. O receptor de LDL, o receptor de assialoglicoproteínas e o transportador de glicose são exemplos de proteínas transmembrana tipos I, II e IV e são encontrados na MP, ao passo que o citocromo P450 é um exemplo de uma proteína tipo III que permanece na membrana do RE (Figura 49-8).

Algumas proteínas são sintetizadas nos polirribossomos livres ligados à membrana do retículo endoplasmático após a tradução

As proteínas podem penetrar na membrana do RE após a tradução através do portão lateral no translocon de forma semelhante às moléculas selecionadas cotraducionalmente. Um exemplo é o **citocromo b₅**, que parece penetrar diretamente na membrana do RE após a tradução, auxiliado por várias chaperonas.

Outros caminhos incluem a retenção no AG com recuperação para o RE e também o transporte retrógrado a partir do AG

Diversas proteínas apresentam a seqüência de aminoácidos **KDEL** (Lis-Asp-Glu-Leu) em sua região carboxiterminal (ver Tabela 49-1). As proteínas que contêm KDEL se deslocam inicialmente para o AG em **vesículas cobertas com a proteína de cobertura II (COPII)** (ver a seguir). Esse processo é conhecido como **transporte vesicular anterógrado**. No AG, elas interagem com uma proteína receptora específica de KDEL, que as retém temporariamente. Em seguida, elas **retornam ao RE em vesículas cobertas com COPI (transporte vesicular retrógrado)**, onde se dissociam do receptor e são, portanto, recuperadas. As seqüências HDEL (H, histidina) têm finalidade semelhante. Os processos recém-descritos levam à localização final de certas proteínas solúveis no lúmen do RE.

Outras **proteínas que não contêm KDEL** também passam para o AG e, em seguida, retornam por transporte vesicular retrógrado ao RE, onde são inseridas. Essas proteínas incluem componentes da vesícula que precisam ser reciclados, bem como algumas proteínas da membrana do RE. Com frequência, essas proteínas possuem um sinal C-terminal localizado no citosol, rico em resíduos básicos.

Portanto, uma **variedade de vias** está envolvida na formação de proteínas das membranas do RE, e uma situação semelhante ocorre provavelmente em relação a outras membranas (p. ex., membranas mitocondriais e membrana plasmática). Foram identificadas seqüências precisas de endereçamento em alguns casos (p. ex., as seqüências KDEL).

O tópico da biogênese das membranas é discutido de modo mais detalhado em seções subsequentes deste capítulo.

O RE FUNCIONA COMO COMPARTIMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE DA CÉLULA

Após entrarem no RE, as proteínas recém-sintetizadas procuram se dobrar com o auxílio das chaperonas e de enzimas de

TABELA 49-6 Algumas chaperonas e enzimas envolvidas no dobramento estão localizadas no retículo endoplasmático rugoso

• BIP (proteína de ligação da imunoglobulina de cadeia pesada)
• GRP94 (proteína regulada pela glicose)
• Calnexina
• Calreticulina
• PDI (proteína dissulfeto-isomerase)
• PPI (peptidil-prolil- <i>cis-trans</i> -isomerase)

dobramento, e seu estado de dobramento é monitorado por chaperonas e também por enzimas (**Tabela 49-6**).

A chaperona **calnexina** é uma proteína de ligação ao cálcio localizada na membrana do RE. Essa proteína se liga a uma ampla variedade de proteínas, inclusive aos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e a uma variedade de proteínas plasmáticas. Conforme descrito no Capítulo 46, a calnexina liga-se às espécies monoglicosiladas das glicoproteínas que ocorrem durante o processamento das glicoproteínas, conservando-as no RE até que haja dobramento apropriado da glicoproteína. A **calreticulina**, que também é uma proteína de ligação ao cálcio, exibe propriedades semelhantes às da calnexina, porém não está ligada à membrana. Além das chaperonas, duas enzimas do RE estão relacionadas com o dobramento apropriado das proteínas. A **proteína dissulfeto-isomerase (PDI)** promove **rápida formação** e rearranjo das ligações dissulfeto até que seja obtida a combinação correta. A **peptidil-prolil-isomerase (PPI)** acelera o dobramento das proteínas que contêm prolina, catalisando a isomerização *cis-trans* das ligações X-Pro, em que X representa qualquer resíduo de aminoácido.

As proteínas mal dobradas ou com dobramento incompleto interagem com as chaperonas, que as retêm no RE, impedindo que sejam exportadas a seus destinos finais. Se essa interação continuar por período prolongado de tempo, as proteínas dobradas de modo impróprio são geralmente eliminadas por **degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD)**. Isso impede o acúmulo prejudicial de proteínas com dobramento incorreto. Em várias doenças genéticas, como a fibrose cística, ocorre retenção de proteínas dobradas de modo incorreto no RE e, em alguns casos, as proteínas retidas ainda exibem alguma atividade funcional. Conforme discutido mais adiante neste capítulo, hoje existe grande interesse na descoberta de fármacos capazes de interagir com essas proteínas e promover o seu dobramento correto e exportação do RE.

AS PROTEÍNAS MAL DOBRADAS SOFREM DEGRADAÇÃO ASSOCIADA AO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A manutenção da **homeostasia do RE** é importante para a função celular normal. A perturbação do ambiente singular no interior do lúmen do RE (p. ex., por alterações do Ca²⁺ do RE, alterações do estado redox, exposição a várias toxinas ou a alguns vírus) pode levar à capacidade reduzida de dobramento das

TABELA 49-7 Algumas doenças conformacionais causadas por anormalidades no transporte intracelular de proteínas específicas e enzimas devido a mutações^a

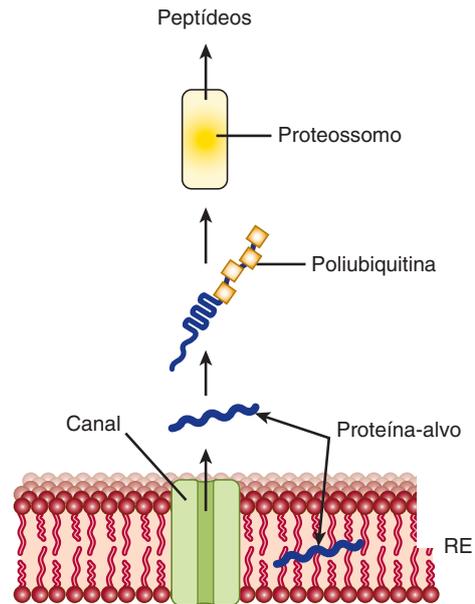
Doença	Proteína afetada
Deficiência de α_1 -antitripsina com doença hepática	α_1 -Antitripsina
Síndrome de Chediak-Higashi	Reguladora do tráfego lisossomal
Deficiência combinada dos fatores V e VIII	ERGIC53, uma lectina de ligação à manose
Fibrose cística	CFTR
Diabetes melito (alguns casos)	Receptor de insulina (subunidade α)
Hipercolesterolemia familiar, autossômica dominante	Receptor de LDL
Doença de Gaucher	β -Glicosidase
Hemofilia A e B	Fatores VIII e IX
Hemocromatose hereditária	HFE
Síndrome de Hermansky-Pudlak	Complexo adaptador AP-3, subunidade β 3A
Doença da célula I	N-acetilglicosamina-1-fosfortransferase
Síndrome oculocerebrorenal de Lowe	PIP ₂ 5-fosfatase
Doença de Tay-Sachs	β -Hexosaminidase
Doença de von Willebrand	Fator de von Willebrand

Abreviações: PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.

^aVer Schroder M, Kaufman RJ: The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739 e Olkonen V, Ikonen E: Genetic defects of intracellular membrane transport. *N Engl J Med* 2000;343:10095.

proteínas, com acúmulo de proteínas mal dobradas. Acúmulo de proteínas dobradas de maneira incorreta no RE é designado como **estresse do RE**. A célula desenvolveu um mecanismo, denominado **resposta a proteínas desdobradas (UPR)**, para perceber os níveis de proteínas com dobramento inapropriado e iniciar mecanismos de sinalização intracelular para compensar as condições de estresse e restaurar a homeostasia do RE. A UPR é iniciada por **sensores de estresse do RE**, que são proteínas transmembrana inseridas na membrana do RE. A ativação desses sensores de estresse produz três efeitos principais: (1) inibição transitória da tradução para reduzir a quantidade de proteínas recém-sintetizadas; (2) indução de transcrição, levando a um aumento na expressão das chaperonas do RE; e (3) síntese aumentada de proteínas envolvidas na degradação das proteínas do RE com dobramento inapropriado (discutidos adiante). Desse modo, a UPR aumenta a capacidade de dobramento do RE e impede o acúmulo de produtos proteicos improdutivos e potencialmente tóxicos, além de outras respostas para restaurar a homeostasia celular. Entretanto, se o dobramento inadequado persistir, são ativadas as vias de morte celular (apoptose). Uma compreensão mais profunda da UPR provavelmente fornecerá novas abordagens ao tratamento de doenças nas quais ocorrem estresse do RE e dobramento defeituoso de proteínas (ver Tabela 49-7).

Há proteínas que se dobram inadequadamente no RE degradadas pela via ERAD (**Figura 49-10**). Esse fato ocorre por transporte seletivo de proteínas tanto do lúmen quanto

**FIGURA 49-10 Esquema simplificado dos eventos na ERAD.**

Uma proteína-alvo mal dobrada sofre transporte retrógrado através da membrana do RE para o citosol, onde é submetida à poliubiquitinação. Após a poliubiquitinação, ela entra no proteossomo, no interior do qual é degradada em peptídeos pequenos, que saem e podem ter vários destinos. As moléculas de ubiquitina liberadas são recicladas. Várias proteínas, incluindo Sec61, Derlin1 e as ERAD E3 ligases, Hrd1 e Doa10, são possíveis candidatas ao canal de ERAD. Entretanto, não existem evidências claras para demonstrar a existência de um canal e também têm sido propostos mecanismos alternativos envolvendo a perturbação da membrana.

da membrana **de volta através do RE (retrotranslocação ou deslocamento)** para penetrar nos **proteossomos** presentes no citosol. A energia para a translocação parece ser pelo menos parcialmente fornecida pela **p97**, uma AAA-ATPase (um membro de uma família de ATPases Associadas a várias Atividades celulares). A via precisa pela qual as proteínas dobradas inadequadamente retornam através da membrana do RE ainda não foi estabelecida. Diversos candidatos têm sido sugeridos como possíveis canais transmembrana para ERAD. Estes incluem Sec61, o complexo responsável pela entrada de proteína no RE, **degradação na proteína 1 do RE (derlin1)** e as **ERAD E3 ligases, Hrd1 e Doa10**. Entretanto, embora pareça racional assumir que proteínas devem deixar o RE via poro da membrana, até agora não existem evidências definitivas da existência desse canal, e é possível que seja utilizado um mecanismo completamente diferente. Por exemplo, tem sido sugerido que possam estar envolvidos processos de perturbação da membrana semelhantes aos que levam à formação de gotículas lipídicas citosólicas ou causados pela ação de **proteínas romboides**, que regulam a proteólise intermembrana.

As **chaperonas** presentes no lúmen do RE (p. ex., BiP) e no citosol ajudam a direcionar as proteínas dobradas incorretamente para os proteossomos. Antes de sua entrada nos proteossomos, as proteínas são, em sua maioria, **ubiquitinadas** (ver parágrafo seguinte) e escoltadas até os proteossomos por **proteínas de ligação à poliubiquitina**. Existem **ubiquitinas-ligases** na membrana do RE.

A ubiquitina é uma molécula essencial na degradação das proteínas

Nos eucariotos, existem duas vias principais de degradação das proteínas. Uma delas envolve **proteases lisossomais** e não requer ATP, porém a via principal envolve **ubiquitina** e é dependente de ATP. A via da ubiquitina está particularmente associada à **eliminação de proteínas e enzimas reguladoras mal dobradas que apresentam meias-vidas curtas**. A ubiquitina é conhecida por estar envolvida em diversos processos fisiológicos importantes, incluindo **regulação do ciclo celular** (degradação de ciclinas), **reparo de DNA**, **inflamação** e **resposta imune** (ver Capítulo 52), **perda muscular**, **infecções virais** e **muitos outros**. A ubiquitina é uma **proteína pequena** (76 aminoácidos), **altamente conservada**, que desempenha um papel importante na **marcação** de várias proteínas para subsequente **degradação nos proteossomos**. O mecanismo de fixação da ubiquitina a uma proteína-alvo (p. ex., uma forma mal dobrada da proteína reguladora transmembrana da fibrose cística [CFTR], a proteína envolvida na etiologia da fibrose cística; ver Capítulo 40) está ilustrado na **Figura 49-12** e envolve **três enzimas**: uma **enzima de ativação (E1)**, uma **enzima de conjugação (E2)** e uma **ligase (E3)**. Existem vários tipos de enzimas de conjugação e, surpreendentemente, algumas centenas de ligases diferentes. Essas últimas enzimas são as que conferem especificidade de substrato. Quando a molécula de ubiquitina está ligada à proteína, várias outras também se ligam, resultando em **proteína-alvo poliubiquitinada**. Estima-se que sejam necessárias **no mínimo quatro moléculas de ubiquitina** ligadas para condicionar uma molécula-alvo à degradação em um proteossomo. A ubiquitina pode ser **clivada** a partir da proteína-alvo por **enzimas** de desubiquitinação, e a ubiquitina liberada pode ser reutilizada.

As proteínas ubiquitinadas são degradadas nos proteossomos

As proteínas-alvo poliubiquitinadas entram nos **proteossomos** localizados no citosol. Os proteossomos são complexos

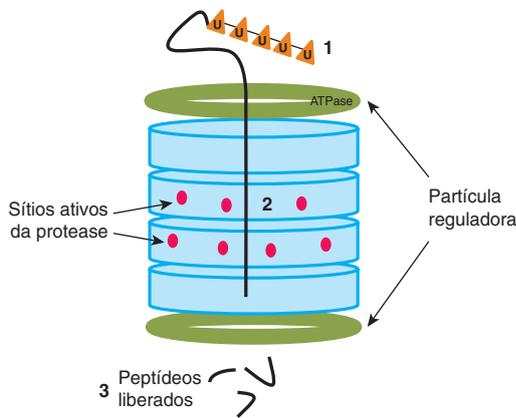


FIGURA 49-11 Degradação da proteína no proteossomo. 1. A partícula reguladora reconhece a proteína ubiquitinada que é desdobrada por ATPases presentes nas partículas ou cápsulas reguladoras. 2. Sítios ativos da protease no centro do proteossomo atacam as ligações peptídicas e degradam a proteína. 3. Os peptídeos são liberados no citosol para posterior degradação pelas peptidases citosólicas.

proteicos com uma **estrutura cilíndrica relativamente grande** e são compostos por quatro anéis com uma região **central vazada**, contendo os sítios ativos da protease e uma ou duas **cápsulas** ou **partículas reguladoras** que reconhecem os substratos poliubiquitinados e iniciam a degradação (**Figura 49-11**). As proteínas-alvo são desdobradas por ATPases presentes nas cápsulas do proteossomo. Os proteossomos podem hidrolisar uma variedade muito ampla de ligações peptídicas. As proteínas-alvo passam para o centro, onde são degradadas em pequenos peptídeos, que, em seguida, saem do proteossomo para serem posteriormente degradados por peptidases citosólicas. Proteínas com dobramento normal e anormal são substratos para o proteossomo. As moléculas de ubiquitina liberadas são recicladas. O proteossomo desempenha um importante papel na **apresentação de peptídeos pequenos** produzidos pela **degradação de vários vírus** e outras moléculas para **moléculas do MHC de classe I**, uma etapa fundamental na apresentação dos antígenos aos linfócitos T.

AS VESÍCULAS DE TRANSPORTE SÃO FUNDAMENTAIS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

As proteínas sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana e destinadas ao AG ou à MP alcançam esses sítios no interior de **vesículas de transporte**. Conforme indicado

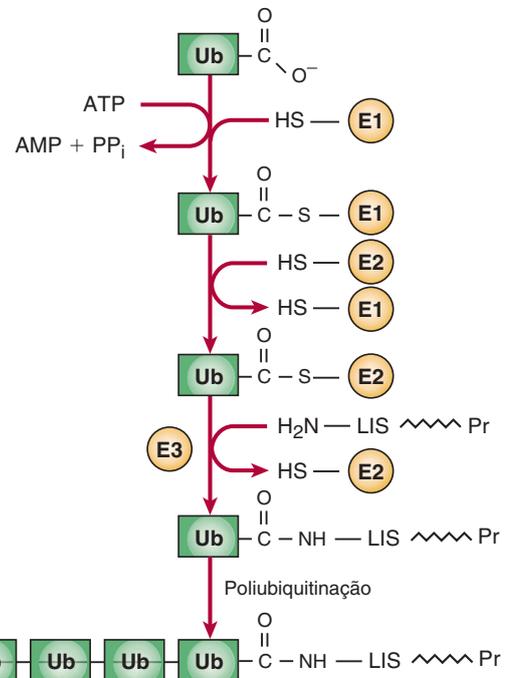


FIGURA 49-12 Sequência de reações na adição de ubiquitina a uma proteína-alvo. O grupo COO⁻ C-terminal da ubiquitina (Ub) é inicialmente ligado em uma ligação tioéster a um grupo SH da enzima ativadora (E1). A ubiquitina ativada é transferida a um grupo SH da enzima conjugada. A transferência de ubiquitina de E2 a um grupamento ε-amino em uma lisina da proteína-alvo é, em seguida, catalisada por uma enzima-ligase. Em seguida, ciclos adicionais de ubiquitinação produzem a cadeia de poliubiquitina. (LIS Pr, proteína-alvo.)

TABELA 49-8 Alguns tipos de vesículas e suas funções

Vesícula	Função
COPI	Envolvida no transporte intra-AG e no transporte retrógrado do AG para o RE
COPII	Envolvida na exportação a partir do RE para o ERGIC ou o AG
Clatrina	Envolvida no transporte em localizações pós-AG, incluindo a MP, a TGN e os endossomos
Vesículas secretoras	Envolvidas na secreção regulada de órgãos, como o pâncreas (p. ex., secreção de insulina)
Vesículas da TGN para a MP	Transportam proteínas até a MP e também estão envolvidas na secreção constitutiva

Abreviações: AG, aparelho de Golgi; ERGIC, complexo intermediário RE-AG; MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplasmático; TGN, rede *trans*-Golgi.

Nota: Cada vesícula tem seu próprio conjunto de proteínas de revestimento. A clatrina está associada a diversas proteínas adaptadoras, formando diferentes tipos de vesículas de clatrina que possuem diferentes alvos intracelulares.

na **Tabela 49-8**, existem vários tipos diferentes de vesículas. Outros tipos de vesículas ainda poderão ser descobertos.

Cada vesícula tem seu próprio conjunto de proteínas de revestimento. A **clatrina** é usada em vesículas destinadas à exocitose (ver discussões do receptor de LDL nos Capítulos 25 e 26) e, em algumas delas, transporta carga aos lisossomos. Essa proteína consiste em três espirais interligadas, que interagem para formar uma grade ao redor da vesícula. Entretanto, COPI e COPII – as vesículas envolvidas no **transporte retrógrado** (do AG para o RE) e no **transporte anterógrado** (do RE para o AG), respectivamente – são livres de clatrina. As vesículas de transporte e as vesículas secretoras que transportam carga do AG para a MP também são livres de clatrina. Nesta seção, a atenção é voltada principalmente às vesículas COPII, COPI e revestidas por clatrina. Cada tipo apresenta um complemento diferente de proteínas em seu revestimento. Para maior clareza, as vesículas não revestidas de clatrina são designadas, neste texto, como **vesículas de transporte**. Os princípios relacionados à agregação desses diferentes tipos são geralmente semelhantes, embora alguns detalhes de formação para COPI e vesículas cobertas por clatrina sejam diferentes dos para COPII (ver a seguir).

O modelo de vesículas de transporte envolve SNAREs e outros fatores

As **vesículas** ocupam posição central no transporte intracelular de muitas proteínas. O uso por Schekman e colaboradores de **estratégias genéticas para o estudo** de vesículas em leveduras e o desenvolvimento por Rothman e colaboradores de **sistemas acelulares** para estudar a formação das vesículas têm sido cruciais no entendimento dos eventos envolvidos na formação e no transporte de vesículas. Por exemplo, é possível observar por microscopia eletrônica o brotamento das vesículas a partir de preparações de Golgi incubadas com citosol, ATP e GTP- γ . O mecanismo global é complexo e envolve uma variedade de proteínas do citosol e da membrana, GTP, ATP e fatores acessórios. **Brotamento, fixação, ancoragem e fusão à membrana** constituem etapas fundamentais no ciclo de vida das vesículas, com as proteínas de ligação à GTP, **Sar1**,

ARF e **Rab**, atuando como **interruptores moleculares**. A Sar1 é a proteína envolvida na etapa 1 da formação das vesículas COPII, ao passo que a ARF está envolvida na formação das vesículas COPI e das vesículas revestidas por clatrina. As funções das várias proteínas envolvidas no processamento de vesículas e as abreviações utilizadas estão mostradas na **Tabela 49-9**.

Existem etapas gerais comuns na formação das vesículas de transporte, no direcionamento das vesículas e na fusão com membrana-alvo, independentemente da membrana a partir da qual a vesícula se forma ou de seu destino intracelular. As naturezas das proteínas de revestimento, das GTPases e dos fatores-alvo diferem, dependendo do local de formação da vesícula e de seu destino final. O transporte anterógrado a partir do RE para o Golgi envolvendo vesículas COPII é o exemplo mais bem estudado. Pode-se considerar que o processo ocorre em oito etapas (**Figura 49-13**). O conceito básico é o de que cada vesícula de transporte é carregada com uma carga específica, bem como com uma ou mais proteínas **v-SNARE** que dirigem o endereçamento. Cada membrana-alvo apresenta uma ou mais **proteínas t-SNARE complementares** com as quais as primeiras interagem, mediando a fusão vesícula-membrana dependente da proteína SNARE. Além disso, as **proteínas Rab** também ajudam a direcionar as vesículas para membranas específicas e sua fixação na membrana-alvo.

Etapa 1: O **brotamento** é iniciado quando **Sar1** é ativada quando GTP é ligado em troca pelo GDP por meio da ação de **Sec12p** (Tabela 49-9), transformando-a da forma solúvel à forma ligada à membrana induzindo uma alteração conformacional que expõe uma cauda hidrofóbica. Portanto, ela é inserida na membrana do RE para formar um ponto específico para a montagem da vesícula.

TABELA 49-9 Alguns fatores envolvidos na formação das vesículas não revestidas por clatrina e seu transporte

• ARF: fator de ribosilação de ADP, uma GTPase envolvida na formação de COPI e também das vesículas revestidas por clatrina
• Proteínas de revestimento: família de proteínas encontradas nas vesículas revestidas. As diferentes vesículas de transporte apresentam complementos diferentes de proteínas de revestimento
• NSF: fator sensível à <i>N</i> -etilmaleimida, uma ATPase
• Sar1: GTPase que desempenha papel essencial na montagem das vesículas COPII
• Sec12p: fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF) que efetua a interconversão de Sar1×GDP e Sar1×GTP
• α -SNAP: proteína de fixação de NSF solúvel. Juntamente com NSF, essa proteína está envolvida na dissociação de complexos SNARE
• SNARE: receptor de SNAP. As SNAREs são moléculas essenciais na fusão das vesículas com membranas aceptoras
• t-SNARE: SNARE-alvo
• v-SNARE: SNARE da vesícula
• Proteínas Rab: família de proteínas relacionadas à Ras (GTPases monoméricas) observadas pela primeira vez no cérebro do rato. Elas são ativas quando o GTP está ligado. Diferentes moléculas de Rab atacam vesículas diferentes às membranas aceptoras
• Proteínas efectoras de Rab: família de proteínas que interagem com moléculas de Rab; algumas atuam para fixar as vesículas às membranas aceptoras

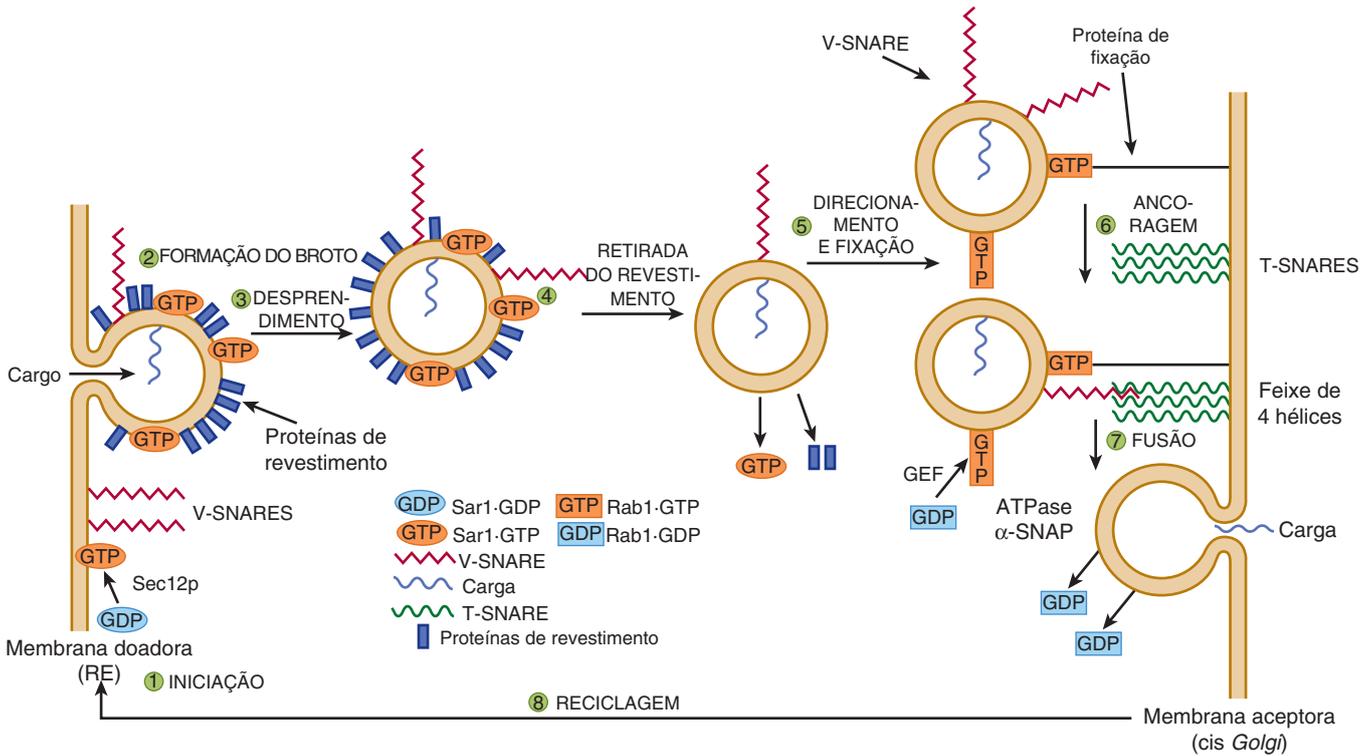


FIGURA 49-13 Modelo das etapas de um ciclo de transporte anterógrado envolvendo vesículas COPII. **Etapa 1:** Sar1 é ativada quando GDP se transforma em GTP e fica incorporado à membrana do RE para formar um ponto focal de formação de broto. **Etapa 2:** as proteínas de revestimento ligam-se a Sar1×GTP e as proteínas carregadas ficam encerradas no interior das vesículas. **Etapa 3:** o broto desprende-se, formando uma vesícula revestida completa. As vesículas movem-se pelas células ao longo de microtúbulos ou filamentos de actina. **Etapa 4:** a vesícula perde o revestimento quando o GTP ligado é hidrolisado a GDP por Sar1. **Etapa 5:** as moléculas Rab são presas a vesículas após a transformação de Rab×GDP em Rab×GTP, uma GEF específica (ver Tabela 49-9). As proteínas efetoras Rab sobre as membranas-alvo ligam-se a Rab×GTP, prendendo as vesículas à membrana-alvo. **Etapa 6:** as v-SNAREs emparelham com t-SNAREs cognatas na membrana-alvo para formar um feixe de quatro hélices que ancora as vesículas e inicia a fusão. **Etapa 7:** quando v-SNARE e t-SNARE estão intimamente alinhadas, a vesícula funde-se com a membrana e o conteúdo é liberado. Em seguida, GTP é hidrolisado a GDP, e as moléculas Rab×GDP são liberadas no citosol. Uma ATPase (NSF) e α-SNAP (ver Tabela 49-9) dissociam o feixe de quatro hélices entre v-SNARE e t-SNARE de modo que elas possam ser reutilizadas. **Etapa 8:** as proteínas Rab e SNARE são recicladas para ciclos subsequentes de fusão de vesículas. (Adaptada, com permissão, de Rothman JE: Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 1994;372:55.)

Etapa 2: Várias **proteínas de revestimento** ligam-se à Sar1×GTP. Por sua vez, as proteínas da carga da membrana ligam-se às proteínas de revestimento **diretamente** ou via **proteínas intermediárias** que se fixam às proteínas de revestimento e, em seguida, são encerradas em suas vesículas apropriadas. As proteínas da carga solúveis ligam-se a regiões receptoras no interior das vesículas. Foram identificadas várias **seqüências-sinal** nas moléculas da carga (Tabela 49-1). Por exemplo, as seqüências KDEL direcionam determinadas proteínas residentes do RE em fluxo retrógrado para o RE em vesículas COPI. As seqüências diácidas (p. ex., Asp-X-Glu; X, qualquer aminoácido) e as seqüências hidrofóbicas curtas nas proteínas de membrana estão envolvidas em interações com proteínas de revestimento das vesículas COPII. Nem todas as moléculas de carga possuem sinal de seleção. Algumas proteínas secretoras altamente abundantes são transportadas a vários destinos celulares em vesículas de transporte por **fluxo de massa**; isto é, entram nas vesículas de transporte nas mesmas concentrações em que ocorrem na organela. Entretanto, as proteínas parecem ser, em sua maioria, ativamente selecionadas (concentradas) no interior de vesículas de transporte, sendo o fluxo de massa usado por apenas um

grupo selecionado de proteínas da carga. Outras proteínas de revestimento são reunidas para a **formação completa de broto**. As proteínas de revestimento promovem o brotamento, contribuem para a curvatura dos brotos e também ajudam a selecionar as proteínas.

Etapa 3: O **broto desprende-se**, completando a formação da vesícula revestida. A curvatura da membrana do RE e as interações proteína-proteína e proteína-lípido no broto facilitam o desprendimento dos sítios de saída do RE. As vesículas movem-se pelas células ao longo de **microtúbulos** ou ao longo de **filamentos de actina**.

Etapa 4: A **desmontagem do revestimento** (envolvendo **dissociação de Sar1** e a **cobertura** das proteínas de revestimento) ocorre após a **hidrólise de GTP ligado a GDP** por Sar1, promovida por uma proteína de revestimento específica. Por conseguinte, Sar1 desempenha papel essencial tanto na montagem quanto na dissociação das proteínas de revestimento. **GTP-γ-S** (um análogo não hidrolisável do GTP, frequentemente empregado em pesquisas sobre a função do GTP nos processos bioquímicos) **bloqueia a desmontagem do revestimento** das vesículas revestidas, levando ao acúmulo de

vesículas revestidas e facilitando o seu estudo. A **retirada do revestimento** é necessária para que ocorra a fusão.

Etapa 5: O direcionamento da vesícula é alcançado pela ligação de moléculas de **Rab** às vesículas. As Rabs são uma família de proteínas semelhantes a Ras necessárias em várias etapas do transporte intracelular de proteínas, bem como na secreção e na endocitose reguladas. Existem **pequenas GTPases monoméricas** que se ligam às faces citosólicas de vesículas de brotamento no **estado ligado ao GTP** e também estão presentes nas membranas receptoras. As moléculas de Rab×GDP no citosol são transformadas em moléculas de Rab×GTP por um GEF específico (Tabela 49-9). As **proteínas efetoras Rab** sobre as membranas-alvo se ligam a Rab×GTP, mas não a Rab×GDP, **prendendo** as vesículas à membrana-alvo.

Etapa 6: v-SNAREs emparelham com t-SNAREs cognatas na membrana-alvo para **ancorar** as vesículas e iniciar a fusão. Em geral, uma v-SNARE na vesícula emparelha com três t-SNAREs na membrana receptora, formando um apertado **feixe de quatro hélices**. Nas **vesículas sinápticas**, uma v-SNARE é chamada de **sinaptobrevina**. A **toxina botulínica B** é uma das toxinas mais letais conhecidas, que constitui a causa mais grave de intoxicação alimentar. Um componente dessa toxina é uma **protease** que se liga à **sinaptobrevina**, **inibindo a liberação de acetilcolina** na junção neuromuscular e, possivelmente, mostrando-se fatal.

Etapa 7: Ocorre fusão da vesícula com a membrana receptora após o alinhamento estreito de v-SNAREs e t-SNAREs. Após a ocorrência da fusão da vesícula e liberação do conteúdo, o GTP é hidrolisado a GDP, e as moléculas de Rab×GDP são liberadas no citosol. Quando uma SNARE de uma membrana interage com uma SNARE de outra membrana, ligando as duas membranas, o complexo é designado como **complexo trans-SNARE** ou **pino SNARE**. As interações das SNAREs na mesma membrana formam um **complexo cis-SNARE**. Para dissociar o feixe de quatro hélices entre as v-SNAREs e t-SNAREs, de modo que possam ser reutilizadas, são necessárias duas proteínas adicionais. Estas são **ATPase (NSF)** e **α-SNAP** (ver Tabela 49-9). NSF hidrolisa ATP e a energia liberada dissocia o feixe de quatro hélices, tornando as proteínas SNARE disponíveis para outro ciclo de fusão da membrana.

Etapa 8: Determinados componentes, como as proteínas Rab e SNARE, são **reciclados** para ciclos subsequentes de fusão de vesículas.

Durante o ciclo anteriormente descrito, as SNAREs, as proteínas de fixação, a proteína Rab e outras proteínas **colaboram** para liberar uma vesícula e seu conteúdo no local apropriado.

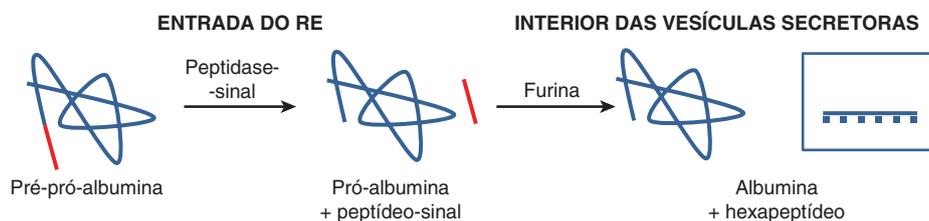


FIGURA 49-14 Processamento de pré-pró-albumina à albumina. O peptídeo-sinal é removido da pré-pró-albumina conforme se movimenta para o interior do RE. A furina cliva a pró-albumina na extremidade C-terminal de um dipeptídeo básico (ArgArg) enquanto a proteína se encontra no interior da vesícula secretora. A albumina madura é secretada no plasma.

Algumas vesículas de transporte se deslocam pela rede trans-Golgi

As proteínas nas regiões **apical** ou **basolateral** das membranas plasmáticas das células epiteliais polarizadas podem ser transportadas para esses locais em **vesículas de transporte** por brotamento a partir da **rede trans-Golgi**. Diferentes proteínas Rab provavelmente direcionam algumas vesículas para as regiões apicais e outras para as regiões basolaterais. Em algumas células, as proteínas são inicialmente direcionadas para a membrana basolateral e, em seguida, sofrem endocitose e são transportadas pela célula por **transcitose** para a região apical. Outro mecanismo de seleção de proteínas para a região apical (ou, em alguns casos, para a região basolateral) envolve a **âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI)**, descrita no Capítulo 46. Com frequência, essa estrutura está também presente nas **balsas lipídicas** (ver Capítulo 40).

Uma vez que as proteínas na via secretora alcançam o **cis-Golgi** a partir do RE em vesículas, elas podem ser transportadas pelo AG até o **trans-Golgi em vesículas** ou por um processo chamado de **maturação cisternal**, no qual as cisternas se movimentam e se transformam entre si, ou talvez em alguns casos por **difusão** por meio de conexões intracisternais que foram observadas em alguns tipos de células. Nesse modelo, os elementos vesiculares do RE fundem-se entre si para ajudar a formar **cis-Golgi**, que, por sua vez, pode mover-se para a frente para se transformar nas cisternas mediais de Golgi, etc. As vesículas COPI transportam enzimas de Golgi (p. ex., glicosiltransferases) de volta das cisternas distais do AG para cisternas mais proximais (p. ex., *cis*).

A formação de vesículas COPI é inibida pela brefeldina

O metabólito fúngico **brefeldina A impede a ligação do GTP ao ARF** e, portanto, inibe a formação das vesículas COPI. Na sua presença, o AG parece **colapsar para o interior do RE**. Isso pode ocorrer por inibição do GEF envolvido na formação das vesículas COPI. Por isso, a brefeldina A mostrou ser uma ferramenta útil para analisar alguns aspectos da estrutura e da função do AG.

Algumas proteínas sofrem processamento posterior enquanto estiverem no interior de vesículas

Algumas proteínas são submetidas a processamento adicional por **proteólise** enquanto estão no interior das vesículas

de transporte ou de secreção. Por exemplo, a **albumina** é sintetizada por hepatócitos como **pré-pró-albumina** (ver Capítulo 52). Seu peptídeo-sinal é removido, convertendo-a em **pró-albumina**. Por sua vez, a pró-albumina, enquanto está no interior das vesículas de transporte, é convertida em **albumina** pela ação da **furina** (Figura 49-14). Essa enzima cliva um hexapeptídeo da pró-albumina imediatamente C-terminal a um local de dois aminoácidos básicos (ArgArg). A albumina madura resultante é secretada no plasma. Hormônios, como a **insulina** (ver Capítulo 41), estão sujeitos a clivagens proteolíticas semelhantes enquanto estiverem no interior das vesículas secretoras.

A MONTAGEM DAS MEMBRANAS É COMPLEXA

Existem vários tipos diferentes de membranas celulares, oscilando desde a MP que separa o conteúdo celular do ambiente externo até as membranas internas de organelas subcelulares como a mitocôndria e o RE. Embora a estrutura geral da bicamada lipídica seja semelhante em todas as membranas, elas diferem em seus conteúdos específicos de proteínas e lipídeos e cada tipo possui suas características específicas (ver Capítulo 40). Atualmente, não está disponível nenhum esquema satisfatório para descrever a montagem de qualquer uma dessas membranas. O transporte vesicular e a maneira como várias proteínas são inicialmente inseridas na membrana do RE foram discutidos anteriormente. Alguns aspectos gerais relativos à montagem das membranas serão discutidos a seguir.

A assimetria entre as proteínas e os lipídeos é mantida durante a montagem da membrana

As vesículas formadas a partir das membranas do RE e do AG, seja naturalmente ou por desprendimento por homogeneização, exibem **assimetrias transversas** tanto de lipídeos quanto de proteínas. Essas **assimetrias são mantidas** durante a fusão das vesículas de transporte com a MP. Depois da fusão, o **interior** das vesículas transforma-se no **exterior da membrana plasmática**, ao passo que a superfície citoplasmática das vesículas continua sendo o lado citoplasmático da membrana (Figura 49-15). Os **fosfolipídeos** constituem a principal classe de lipídeos nas membranas. As enzimas responsáveis pela síntese dos fosfolipídeos residem na superfície citoplasmática das cisternas (estruturas semelhantes a sacos) do RE. À medida que os fosfolipídeos são sintetizados nesse local, eles provavelmente sofrem automontagem em camadas bimoleculares termodinamicamente estáveis, ampliando a membrana e talvez promovendo o desprendimento das denominadas **vesículas lipídicas** a partir dela. Foi sugerido que essas vesículas seguissem um trajeto para outros locais, doando seus lipídeos a outras membranas. As proteínas citosólicas que captam os fosfolipídeos de uma membrana e os liberam em outra (i.e., **proteínas de troca de fosfolipídeos**) foram descritas; elas provavelmente contribuem para a composição lipídica específica de várias membranas.

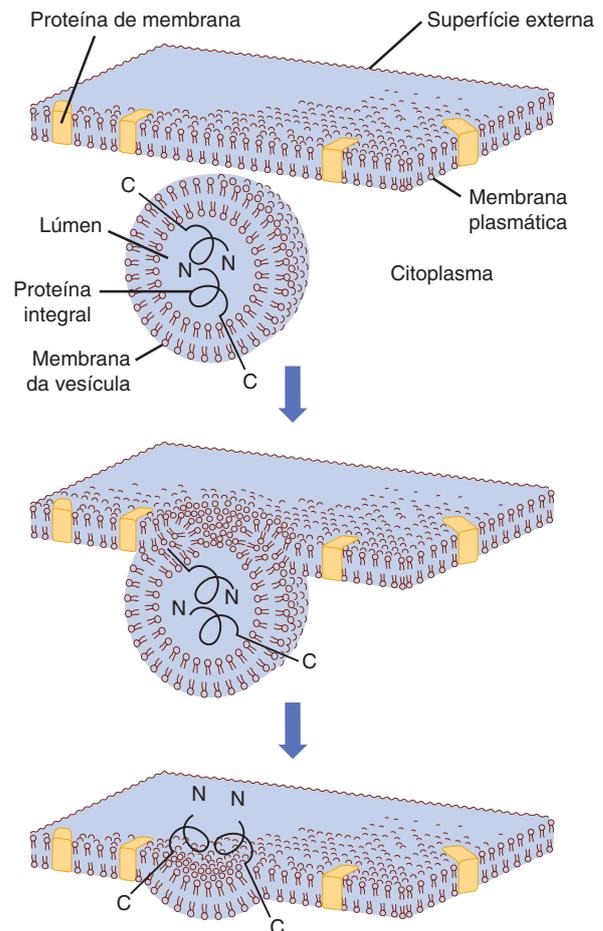


FIGURA 49-15 A fusão de uma vesícula com a membrana plasmática preserva a orientação das proteínas integrais inseridas na bicamada da vesícula. Inicialmente, a região aminoterminal da proteína está voltada para o lúmen, ou cavidade interna, dessa vesícula. Após a ocorrência da fusão, a região aminoterminal fica na superfície externa da membrana plasmática. O lúmen de uma vesícula e o exterior da célula são topologicamente equivalentes. (Redesenhada e modificada, com permissão, de Lodish HF, Rothman JE: The assembly of cell membranes. Sci Am [Jan] 1979;240:43.)

Convém assinalar que as **composições lipídicas** do RE, do AG e da MP diferem entre si, as últimas duas membranas contendo **quantidades mais elevadas de colesterol, esfingomielina e glicosfingolipídeos e menos fosfoglicerídeos** do que o RE. Os esfingolipídeos agrupam-se mais densamente nas membranas do que os fosfoglicerídeos. Essas diferenças afetam as estruturas e as funções das membranas. Por exemplo, a **espessura da bicamada** do AG e da MP é maior que a do RE, o que influencia os tipos de proteínas transmembrana específicas encontradas nessas organelas. Além disso, acredita-se que as **balsas lipídicas** (ver Capítulo 40) sejam formadas no AG.

Os lipídeos e as proteínas sofrem renovação em taxas distintas em diferentes membranas

Foi constatado que as meias-vidas dos lipídeos das membranas do RE do fígado de rato são, em geral, mais curtas que as de suas proteínas, de modo que as **taxas de renovação dos lipídeos e**

TABELA 49-10 Algumas principais características da montagem das membranas

<ul style="list-style-type: none"> Os lipídeos e as proteínas são inseridos independentemente nas membranas
<ul style="list-style-type: none"> Os lipídeos e as proteínas individuais das membranas sofrem renovação independente e em taxas diferentes
<ul style="list-style-type: none"> As sequências topogênicas (p. ex., sinal [aminoterminal ou interno] e término da transferência) são importantes na determinação da inserção e da disposição das proteínas nas membranas
<ul style="list-style-type: none"> As proteínas de membrana dentro das vesículas de transporte brotam a partir do retículo endoplasmático em seu trajeto até o aparelho de Golgi; a seleção final de muitas proteínas de membrana ocorre na rede <i>trans</i>-Golgi
<ul style="list-style-type: none"> Sequências específicas de seleção orientam as proteínas para determinadas organelas, como lisossomos, peroxissomos e mitocôndrias

das proteínas são independentes. De fato, observou-se que diferentes lipídeos apresentam meias-vidas diferentes. Além disso, as meias-vidas das proteínas dessas membranas variam amplamente, visto que algumas exibem meias-vidas curtas (horas) e outras, longas (dias). Portanto, os lipídeos e as proteínas individuais das membranas do RE parecem ser inseridos de modo relativamente independente e se acredita que esse seja o caso de muitas outras membranas.

Portanto, a biogênese das membranas é um processo complexo sobre o qual ainda há muito para se aprender. Uma indicação da complexidade envolvida consiste no número de **modificações pós-traducionais** que as proteínas de membrana podem sofrer antes de atingir o seu estado maduro. Essas modificações incluem formação de dissulfetos, proteólise, montagem em multímeros, glicosilação, acréscimo de uma âncora de GPI, sulfatação da tirosina ou de frações de carboidratos, fosforilação, acilação e prenilação – uma lista que não é completa. Entretanto, foram efetuados avanços significativos; na **Tabela 49-10**, há um resumo de algumas das principais características da montagem das membranas que foram elucidadas até a presente data.

Vários distúrbios resultam de mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no transporte intracelular

Alguns distúrbios que refletem anormalidades da função dos **peroxissomos** e anormalidades de síntese proteica no **RE** e da síntese de **proteínas lisossomais** foram relacionados anteriormente neste capítulo (ver Tabelas 49-4 e 49-7, respectivamente). Foram relatadas muitas outras mutações que afetam o dobramento das proteínas e o seu transporte intracelular para várias organelas, incluindo distúrbios degenerativos, como a doença de Alzheimer, a doença de Huntington e a doença de Parkinson. A elucidação das causas desses vários **distúrbios conformacionais** tem contribuído significativamente para a compreensão da **patologia molecular**. O termo “**doenças por deficiências na proteostase**” também tem sido aplicado a doenças causadas por dobramento incorreto das proteínas. A proteostase é uma palavra composta, derivada de homeostasia proteica. A proteostase normal resulta do equilíbrio de vários fatores, como síntese, dobramento, tráfego, agregação e

degradação normal. Se qualquer um desses processos for afetado (p. ex., por mutação, envelhecimento, estresse ou lesão celular), pode ocorrer uma variedade de distúrbios, dependendo das proteínas específicas envolvidas.

As possíveis terapias para as diversas doenças causadas por disfunção proteica devido ao dobramento inadequado têm como alvo a correção dos erros conformacionais. Uma estratégia promissora é o emprego de chaperonas, como a Hsp70, para promover o dobramento correto. Além disso, tem sido demonstrado que o antibiótico geldanamicina ativa as proteínas de choque térmico. Também foi demonstrado que fármacos de pequenas moléculas que atuam como chaperonas químicas impedem o mal dobramento e restauram a função proteica. Todavia, essas estratégias foram testadas até então apenas em experimentos com animais e em sistemas *in vitro*, e a sua eficácia em seres humanos ainda precisa ser estabelecida.

RESUMO

- Muitas proteínas são direcionadas a seus destinos por sequências-sinal. Uma decisão seletiva importante é feita quando as proteínas são distribuídas entre os polirribossomos citosólicos (ou livres) e os polirribossomos ligados à membrana, em virtude da ausência ou presença de um peptídeo-sinal N-terminal.
- As proteínas sintetizadas nos polirribossomos citosólicos são endereçadas por sequências-sinal específicas para mitocôndria, núcleo, peroxissomos e retículo endoplasmático. As proteínas que não possuem sinal permanecem no citosol.
- As proteínas sintetizadas nos polirribossomos ligados à membrana penetram inicialmente na membrana ou no lúmen do RE, e muitas são finalmente destinadas para outras membranas incluindo a MP e a do AG, para os lisossomos e para secreção via exocitose via transporte a partir de RE → AG → MP em vesículas de transporte.
- Ocorrem muitas reações de glicosilação nos compartimentos do aparelho de Golgi, e as proteínas são, ainda, selecionadas na rede *trans*-Golgi.
- As chaperonas moleculares estabilizam as proteínas desdobradas ou parcialmente dobradas. Elas são necessárias para o direcionamento correto de proteínas para suas localizações subcelulares.
- Na translocação pós-traducional, as proteínas são transportadas às suas organelas-alvo após a sua síntese estar completa. As proteínas destinadas à mitocôndria, ao núcleo e aos peroxissomos seguem essa via, assim como uma minoria de proteínas dirigidas ao RE.
- A maioria das proteínas penetra no lúmen do RE pela via cotraducional, onde a translocação corre durante a síntese de proteína em curso.
- As proteínas inseridas na membrana do RE podem fazê-lo cotraducionalmente, pós-traducionalmente ou após transporte para o AG (transporte anterógrado), retenção transitória e volta ao RE (transporte retrógrado).
- A fabricação nociva de proteínas mal dobradas desencadeia a resposta à proteína desdobrada, e elas são degradadas pela via ERAD. As proteínas são direcionadas para a degradação pela adição de um número de moléculas de ubiquitina e, em seguida, penetram no citosol, onde são quebradas em proteossomos.
- Diferentes tipos de vesículas de transporte são envolvidas por diferentes proteínas. As vesículas cobertas por clatrina são destinadas à exocitose e a lisossomos, ao passo que as proteínas de cobertura

I e II estão associadas às vesículas COPI e COPII, que são responsáveis pelo transporte retrógrado e anterógrado, respectivamente.

- O processamento da vesícula de transporte é complexo e requer muitos fatores proteicos. O brotamento a partir da membrana doadora é seguido por movimento através do citosol, ligação, ancoragem e fusão com a membrana-alvo.
- Algumas proteínas (p. ex., precursores da albumina e da insulina) são submetidas à proteólise dentro das vesículas de transporte, produzindo as proteínas maduras.
- As GTPases pequenas (p. ex., Ran, Rab) e os GEFs desempenham papéis essenciais em muitos aspectos do tráfego intracelular.
- As vesículas formadas a partir de membranas do RE e do AG são assimétricas nos conteúdos lipídico e proteico. A assimetria é mantida durante a fusão de vesículas de transporte com a membrana plasmática, de modo que o interior de vesículas após a fusão se torna o lado externo da membrana plasmática, e a face citoplasmática das vesículas permanece voltada para o citosol.
- A assimetria dos lipídeos e das proteínas é mantida durante a montagem da membrana. Os lipídeos e as proteínas são inseridos independentemente e são reciclados a taxas diferentes. Detalhes do processo de montagem do complexo ainda precisam ser estabelecidos.
- Demonstrou-se que muitos distúrbios são causados por mutações de genes ou por outros fatores que afetam o dobramento de várias proteínas. Essas condições foram denominadas doenças conformacionais ou, de modo alternativo, doenças por deficiências na proteostase. Estratégias terapêuticas promissoras incluem o uso de chaperonas, como a Hsp70, e de pequenas moléculas que possam impedir o dobramento inadequado e restaurar a função proteica.

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, 2008. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting.)
- Alder NN, Johnson AE: Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2004;279:22787.
- Bonifacino JS, Glick BS: The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 2004;116:153.
- Chaudhuri TK, Paul S: Protein misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* 2006;273:1331.
- Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. 2009. (An excellent textbook of cell biology, with comprehensive coverage of trafficking and sorting.)
- Hampton RY, Sommer T: Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol* 2012;24:460.
- Hebert DN, Molinari M: In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation and related human diseases. *Physiol Rev* 2007;87:1377.
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A: Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2007;22:193.
- Neupert W, Herrmann JM: Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007;76:723.
- Platta HW, Erdmann R: The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett* 2007;581:2811.
- Stewart M: Molecular mechanisms of the nuclear protein import cycle. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007;8:195.

Matriz extracelular

Kathleen M. Botham, Ph.D., D.Sc. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Reconhecer a importância da matriz extracelular (MEC) e seus componentes tanto na saúde quanto na doença.
- Descrever as propriedades estruturais e funcionais do colágeno e da elastina, as principais proteínas da MEC.
- Indicar as principais características da fibrilina, da fibronectina e da laminina, outras proteínas importantes da MEC.
- Descrever as propriedades e as características da síntese e da degradação dos glicosaminoglicanos e dos proteoglicanos, bem como suas contribuições para a MEC.
- Descrever de forma sucinta as principais características bioquímicas do osso e da cartilagem.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A maioria das células dos mamíferos está localizada em tecidos onde estão envolvidas por uma complexa MEC, geralmente referida como “**tecido conectivo**”, que protege os órgãos e também fornece elasticidade quando necessário (p. ex., nos vasos sanguíneos, nos pulmões e na pele). A MEC contém três classes principais de biomoléculas: **proteínas estruturais** (1), como, por exemplo, **colágeno**, **elastina** e **fibrilina**, determinadas **proteínas especializadas** (2), como **fibronectina** e **laminina**, que formam uma rede de fibras que são incorporadas em **proteoglicanos** (3). Foi constatado que a MEC está envolvida em muitos processos normais e patológicos – por exemplo, ela desempenha funções importantes no desenvolvimento, nos estados inflamatórios e na disseminação das células neoplásicas. Foi documentada a participação de certos componentes da MEC tanto na **artrite reumatoide** quanto na **osteoartrite**. Várias doenças (p. ex., osteogênese imperfeita e alguns tipos de síndrome de Ehlers-Danlos) são causadas por distúrbios genéticos da síntese do colágeno. Os componentes específicos dos proteoglicanos (os glicosaminoglicanos [GAGs]) são afetados no grupo de distúrbios genéticos conhecidos como **mucopolissacaridoses**. Ocorrem alterações na MEC durante o **processo de envelhecimento**. Este capítulo descreve a bioquímica básica das três principais classes de biomoléculas encontradas na MEC e ilustra a sua importância biomédica. Além disso, também são analisadas sucintamente as principais características bioquímicas de duas formas especializadas de MEC – o osso e a cartilagem –, bem como várias doenças que as acometem.

O COLÁGENO É A PROTEÍNA MAIS ABUNDANTE NO REINO ANIMAL

O **colágeno**, que constitui o principal componente da maioria dos tecidos conectivos, representa cerca de 25% da proteína dos mamíferos. Ele fornece estrutura extracelular para todos os animais metazoários e é encontrado em praticamente todos os tecidos animais. Nos tecidos humanos, foram identificados pelo menos 28 tipos distintos de colágeno, formados por mais de 30 cadeias polipeptídicas distintas (cada uma delas codificada por um gene distinto) (**Tabela 50-1**). Embora vários desses tipos de colágeno só estejam presentes em pequenas proporções, eles podem desempenhar um papel importante na determinação das propriedades físicas de tecidos específicos. Além disso, diversas proteínas (p. ex., o componente C1q do sistema do complemento, as proteínas surfactantes pulmonares SPA e SPD), que não são classificadas como colágeno, apresentam domínios semelhantes ao colágeno em suas estruturas; essas proteínas são algumas vezes designadas como “colágenos não colágenos”.

OS COLÁGENOS SÃO CONSTITUÍDOS POR UMA ESTRUTURA EM TRIPLA-HÉLICE

Todos os tipos de colágeno apresentam **estrutura em tripla-hélice**. Em alguns colágenos, toda a molécula forma uma

TABELA 50-1 Tipos de colágenos e sua distribuição tecidual

Tipo	Distribuição	Tipo	Distribuição
I	Tecidos conectivos não cartilaginosos, incluindo osso, tendão, pele	XV	Associados a colágenos próximos às membranas basais em diversos tecidos, incluindo olho, músculo, microvasos
II	Cartilagem, humor vítreo	XVI	Muitos tecidos
III	Tecidos conectivos extensíveis, incluindo pele, pulmões, sistema vascular	XVII	Epitélios, hemidesmossomos da pele
IV	Membranas basais	XVIII	Associadas a colágenos próximos às membranas basais, homólogo estrutural semelhante do XV
V	Componente menor em tecidos que contêm colágeno I	XIX	Raros, membranas basais, células de rabiomiossarcoma
VI	Músculo e o máximo de tecido conectivo	XX	Muitos tecidos, particularmente epitélio da córnea
VII	Junção dermoepidérmica	XXI	Muitos tecidos
VIII	Endotélio e outros tecidos	XXII	Junções teciduais, incluindo líquido cartilaginoso-sinovial, folículo piloso-derme
IX	Tecidos que contêm colágeno II	XXIII	Limitados em tecidos, principalmente formas transmembrana e liberadas
X	Cartilagem hipertrófica	XXIV	Córnea e osso em desenvolvimento
XI	Tecidos que contêm colágeno II	XXV	Encéfalo
XII	Tecidos que contêm colágeno I	XXVI	Testículos, ovários
XIII	Muitos tecidos, incluindo junções neuromusculares e pele	XXVII	Cartilagem embrionária e outros tecidos em desenvolvimento, cartilagem em adultos
XIV	Tecidos que contêm colágeno I	XXVIII	Membrana basal em torno das células de Schwann

tripla-hélice, ao passo que, em outros, a tripla-hélice pode constituir apenas uma parte da estrutura. O **colágeno tipo I** maduro, que contém cerca de mil aminoácidos, pertence ao primeiro tipo; nesse colágeno, cada subunidade polipeptídica, ou cadeia α , é torcida em uma hélice de poliprolina orientada à esquerda de três resíduos por volta. Em seguida, três dessas cadeias α são torcidas em uma **super-hélice orientada à direita**, formando uma molécula semelhante a um bastão com 1,4 nm de diâmetro e cerca de 300 nm de comprimento (**Figura 50-1**). Uma notável característica do colágeno é a presença de resíduos de **glicina** a cada terceira posição da porção helicoidal tripla da cadeia α . Essa glicina é necessária porque é o único aminoácido pequeno o suficiente para se acomodar no espaço limitado disponível dentro do cerne central da tripla-hélice. Essa **estrutura repetitiva**, representada como $(\text{Gli-X-Y})_n$, é um pré-requisito absoluto para a formação da tripla-hélice. Embora X e Y possam ser quaisquer outros aminoácidos, cerca de 100 das posições X consistem em prolina, e cerca de 100 das posições Y consistem em hidroxiprolina. A prolina e a hidroxiprolina conferem **rigidez** à molécula do colágeno. A **hidroxiprolina** é formada pela hidroxilação pós-tradução de resíduos de prolina ligados a peptídeos, em uma reação catalisada pela enzima **prolil-hidroxilase**, cujos cofatores são o **ácido ascórbico** (vitamina C) e o α -cetoglutarato. As moléculas de lisina na posição Y também podem ser modificadas após tradução em hidroxiprolina pela ação da **lisil-hidroxilase**, uma enzima que utiliza cofatores semelhantes. Algumas dessas moléculas de hidroxilina podem ser, ainda, modificadas pelo acréscimo de galactose ou de galactosil-glicose por uma **ligação O-glicosídica** (ver Capítulo 46), um sítio de glicosilação exclusivo do colágeno.

Os tipos de colágeno que formam fibras longas semelhantes a bastões nos tecidos são montados pela associação lateral

dessas unidades helicoidais triplas em **fibrilas** (10-300 nm de diâmetro) em **alinhamento “escalonado de um quarto”**, de modo que cada uma é deslocada de maneira longitudinal da fibra vizinha por uma distância de ligeiramente menos de um quarto de seu comprimento (Figura 50-1). As fibrilas, por sua vez, associam-se em fibras mais espessas (1-20 μm de diâmetro). Como o alinhamento escalonado em um quarto resulta em intervalos espaçados regularmente entre as moléculas de tripla-hélice no arranjo, as fibras apresentam aparência regular nos tecidos conectivos. Em alguns tecidos – por exemplo, nos tendões –, as fibras associam-se até em feixes maiores, que poderão apresentar diâmetro de até 500 μm . As fibras de colágeno também são estabilizadas pela formação de **ligações cruzadas covalentes**, tanto no interior quanto entre as unidades de tripla-hélice. Essas ligações cruzadas se formam pela ação da **lisil-oxidase**, uma enzima dependente de cobre que desamina os grupos ϵ -amino de certos resíduos de lisina e hidroxilina de maneira oxidativa, produzindo aldeídos reativos. Esses aldeídos podem formar produtos de condensação aldóis com outros aldeídos derivados da lisina ou da hidroxilina, ou podem formar bases de Schiff com os grupos ϵ -amino das lisinas ou hidroxilinas não oxidadas. Após rearranjos químicos adicionais, essas reações resultam nas ligações cruzadas covalentes estáveis, que são importantes para a força de tensão das fibras. A histidina também pode estar envolvida em determinadas ligações cruzadas.

As principais fibrilas que formam colágenos na pele e nos ossos, e na cartilagem, respectivamente, são os tipos **I** e **II**, embora outros colágenos também possam adotar essa estrutura. Além disso, entretanto, existem muitos colágenos que não são formadores de fibrilas e suas estruturas e funções serão descritas de maneira breve na seção a seguir.

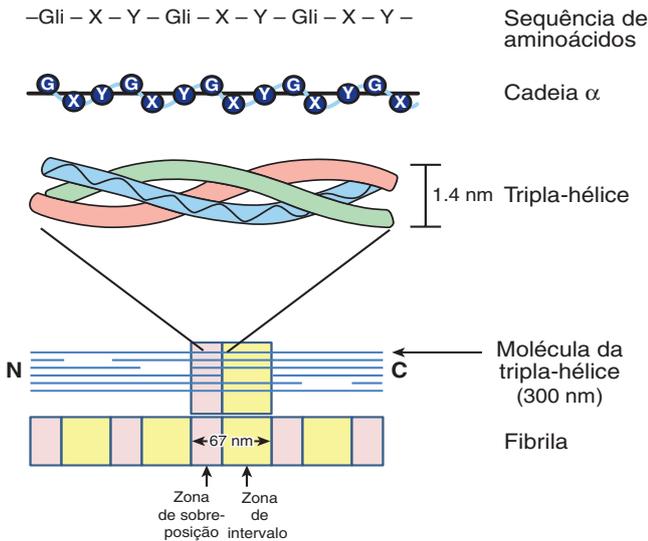


FIGURA 50-1 Características moleculares da estrutura do colágeno, desde a sequência primária até a fibrila. Cada cadeia polipeptídica individual é torcida em uma hélice orientada à esquerda de três resíduos (Gli-X-Y) por volta, e três dessas cadeias são entrelaçadas em uma super-hélice orientada à direita. As triplas-hélices são, em seguida, agrupadas em alinhamento disperso de um quarto para formar fibrilas. Esse arranjo forma áreas onde ocorre completa sobreposição das moléculas, alternando-se com áreas onde existe intervalo, dando aparência unida regular às fibrilas. (Levemente modificada e reproduzida, com permissão, de Eyre DR: Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 1980;207:1315. Reimpressa, com permissão, de AAAS.)

Alguns tipos de colágenos não formam fibrilas

Vários tipos de colágeno não formam fibrilas nos tecidos (Figura 50-2). Esses se caracterizam por interrupções da tripla-hélice, com extensões das proteínas que carecem de sequências repetitivas de Gli-X-Y. Essas sequências sem Gli-X-Y resultam em áreas de estrutura globular intercaladas na estrutura helicoidal tripla. **Colágenos semelhantes a redes**, como os do tipo IV, formam redes em membranas basais; **colágenos associados a fibrilas com triplas-hélices interrompidas** (FACITs, do inglês, *fibril-associated collagens with interrupted triple helices*) apresentam interrupções nos domínios

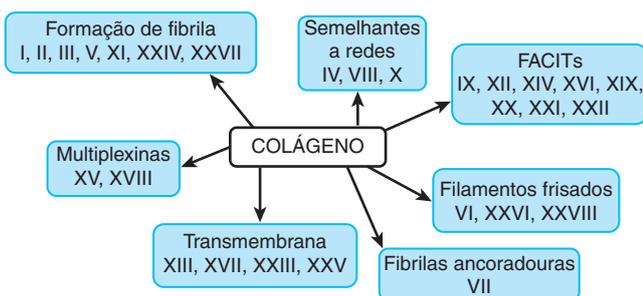


FIGURA 50-2 Classificação de colágenos de acordo com as estruturas que formam. FACITs, colágenos associados a fibrilas com triplas-hélices interrompidas; multiplexina, múltiplos domínios de tripla-hélice e interrupções.

da tripla-hélice, como indica sua denominação; filamentos frisados consistem em longas cadeias de moléculas de colágeno que apresentam aparência frisada regular; o colágeno VII constitui a principal parte das **fibrilas ancoradoras** nos tecidos epiteliais; os **colágenos transmembrana** apresentam curtos domínios intracelulares N-terminais e domínios extracelulares com longas triplas-hélices interrompidas; as **multiplexinas** são colágenos com múltiplos domínios de tripla-hélice e interrupções.

O colágeno sofre modificações pós-traducionais extensas

O colágeno recém-sintetizado sofre extensa **modificação pós-traducional** antes de fazer parte de uma fibra de colágeno extracelular madura (Tabela 50-2). À semelhança da maioria das proteínas secretadas, o colágeno é sintetizado nos ribossomos em uma forma precursora, o **pré-pró-colágeno**, que contém uma sequência-líder ou sinalizadora que direciona a cadeia polipeptídica para o lúmen do retículo endoplasmático. Quando entra no retículo endoplasmático, essa sequência-líder é removida enzimaticamente. A **hidroxilação** de resíduos de prolina e lisina e a **glicosilação** de hidroxilisininas na molécula de **pró-colágeno** também ocorrem nesse local. A molécula de pró-colágeno contém extensões polipeptídicas (**peptídeos de extensão**) de 20 a 35 kDa nas extremidades aminoterminal e carboxiterminal, e nenhuma delas está presente no colágeno maduro. Ambos os peptídeos de extensão contêm resíduos de cisteína. O pró-peptídeo aminoterminal forma apenas ligações dissulfeto dentro das cadeias, ao passo que os pró-peptídeos carboxiterminais estabelecem ligações dissulfeto dentro das cadeias, bem como entre elas. A formação dessas ligações dissulfeto ajuda no **registro** das três moléculas de colágeno para formar a tripla-hélice, cuja torção começa na extremidade carboxiterminal. Após a formação da tripla-hélice, não pode ocorrer nenhuma hidroxilação adicional da prolina ou da lisina, nem glicosilação das hidroxilisininas. A **automontagem** é um princípio fundamental na biossíntese do colágeno.

TABELA 50-2 Sequência e localização do processamento do precursor do colágeno fibrilar

Intracelular
1. Clivagem do peptídeo-sinal
2. Hidroxilação dos resíduos prolil e de alguns resíduos lisil; glicosilação de alguns resíduos hidroxililil
3. Formação de ligações S-S entre e dentro das cadeias dos peptídeos em extensão
4. Formação da tripla-hélice
Extracelular
1. Clivagem dos pró-peptídeos aminoterminal e carboxiterminal
2. Montagem das fibras de colágeno em alinhamento disperso de um quarto
3. Desaminação oxidativa dos grupos ϵ -amino dos resíduos lisil e hidroxililil em aldeídos
4. Formação de ligações cruzadas entre e dentro das cadeias por bases de Schiff e produtos de condensação aldóis

Após a **secreção** da célula pelo aparelho de Golgi, as enzimas extracelulares denominadas **pró-colágeno aminoproteinase** e **pró-colágeno carboxiproteinase**, removem os peptídeos de extensão nas extremidades aminoterminal e carboxiterminal, respectivamente, formando as unidades monoméricas de colágeno, denominadas **tropocolágenos**. A clivagem dos pró-peptídeos pode ocorrer dentro das criptas ou das dobras na membrana celular. Uma vez removidos os pró-peptídeos, as moléculas de tropocolágeno, contendo cerca de mil aminoácidos por cadeia, **sofrem montagem espontânea** em fibras de colágeno. Essas fibras também são estabilizadas pela formação de **ligações cruzadas intercadeias e intracadeias** por meio da ação da lisil-oxidase, conforme descrito.

As mesmas células que secretam colágeno também secretam a **fibronectina**, uma glicoproteína grande encontrada nas superfícies celulares, na MEC e no sangue (ver adiante). A fibronectina liga-se às fibras de colágeno durante a agregação e altera a cinética de formação das fibras na matriz pericelular. Nessa matriz, em associação à fibronectina e ao pró-colágeno, encontram-se os **proteoglicanos** heparan-sulfato e condroitina-sulfato (ver adiante). De fato, o **colágeno tipo IX**, um tipo de colágeno de menor importância da cartilagem, contém uma cadeia de glicosaminoglicano ligada. Essas interações podem servir para regular a formação das fibras de colágeno e determinar a sua orientação nos tecidos.

Uma vez formado, o colágeno apresenta relativa **estabilidade metabólica**. Entretanto, a sua decomposição é acelerada durante a inanição e em vários estados inflamatórios. Ocorre produção excessiva de colágeno em algumas condições, como a cirrose hepática.

Diversas doenças genéticas e de deficiência resultam de anormalidades na síntese do colágeno

Mais de 30 genes codificam o colágeno, sendo designados de acordo com o tipo de pró-colágeno e suas cadeias α constituintes, denominadas cadeias pró- α . Os colágenos podem ser homotriméricos, contendo três cadeias pró- α idênticas, ou heterotriméricos, em que as cadeias pró- α são diferentes. Por exemplo, o colágeno tipo I é heterotrimérico, contendo duas cadeias pró- α 1(I) e uma cadeia pró- α 2(I) (o número arábico refere-se à cadeia pró- α , e o número romano entre parênteses indica o tipo de colágeno), e o colágeno tipo II é homotrimérico, apresentando três cadeias pró- α 1(II). Os genes que codificam o colágeno apresentam o prefixo *COL*, seguido pelo tipo em números arábicos e, em seguida, um A e o número da cadeia pró- α que codificam. Portanto, *COL1A1* e *COL1A2* são os genes que codificam as cadeias pró- α 1 e 2 do colágeno tipo I, *COL2A1* é o gene que codifica a cadeia pró- α 1 do colágeno tipo II, e assim por diante.

A via da biossíntese de colágeno é complexa, envolvendo pelo menos oito etapas pós-traducionais catalisadas por enzimas. Assim, não é surpreendente que diversas doenças (**Tabela 50-3**) sejam causadas por **mutações dos genes do colágeno** ou em **genes que codificam algumas enzimas** envolvidas nessas modificações pós-traducionais. As doenças que acometem os ossos (p. ex., osteogênese imperfeita) e a cartilagem

TABELA 50-3 Doenças causadas por mutações dos genes do colágeno ou por deficiências das atividades de enzimas envolvidas na biossíntese pós-traducional do colágeno

Gene ou enzima afetado	Doença ^a
<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Osteogênese imperfeita tipo 1 ^b Osteoporose Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo artrocalasia
<i>COL2A1</i>	Condrodisplasia grave Osteoartrite
<i>COL3A1</i>	Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo vascular
<i>COL4A3</i> - <i>COL4A6</i>	Síndrome de Alport (autossômica e ligada ao X)
<i>COL7A1</i>	Epidermólise bolhosa, distrófica
<i>COL10A1</i>	Condrodisplasia metafisária de Schmid
<i>COL5A1</i> , <i>COL5A2</i> , <i>COL1A1</i>	Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo clássico
<i>COL3A1</i> , tenascina XB (<i>TNXB</i>)	Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo hiper mobilidade
Lisil-hidroxilase	Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo cifoescoliose
ADAM metaloproteinase com motivo trombospondina tipo 1 (<i>ADAMTS2</i>) (também chamada de pró-colágeno N-proteinase)	Síndrome de Ehlers-Danlos, subtipo dermatosparaxia
Lisil-hidroxilase	Doença de Menkes ^c

^aFoi demonstrada uma ligação genética com os genes do colágeno para outras condições que não estão listadas aqui.

^bSão reconhecidos oito diferentes tipos de osteogênese imperfeita, porém a maioria dos casos é causada por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*.

^cSecundária a uma deficiência de cobre (ver Capítulo 52).

(p. ex., condrodisplasias) serão discutidas posteriormente neste capítulo.

A **síndrome de Ehlers-Danlos** (antes chamada de **cútis hiperelástica**) compreende um grupo de distúrbios hereditários, cujas principais manifestações clínicas consistem em hiperextensibilidade da pele, fragilidade anormal dos tecidos e aumento da mobilidade das articulações. O quadro clínico é variável, refletindo a extensa heterogeneidade genética subjacente. Várias formas da doença causadas por distúrbios genéticos em proteínas envolvidas na síntese e na montagem de colágenos tipos I, III e V são conhecidas, e, desde 1997, a classificação Villefranche de seis subtipos com base em seus fenótipos e distúrbios moleculares tem sido utilizada (**Tabela 50-4**). Os subtipos **hiper mobilidade**, **vascular** e **clássico** são mais comuns, e os outros três, **cifoescoliose**, **artrocalasia** e **dermatosparaxia**, são extremamente raros. O subtipo vascular é o mais grave, em virtude de sua tendência à ruptura espontânea das artérias no intestino, refletindo anormalidades do colágeno tipo III. Pacientes com cifoescoliose exibem curvatura progressiva da coluna (escoliose) e tendência à ruptura ocular devido à deficiência de lisil-hidroxilase. Uma deficiência da pró-colágeno N-proteinase (ADAM metaloproteinase com

TABELA 50-4 Classificação de Villefranche^a dos subtipos da síndrome de Ehlers-Danlos

Nome do subtipo	Distúrbio em	Incidência	Sinais clínicos
Hipermobilidade	Colágeno tipo III, tenascina X ^b	1:10.000-15.000	Hipermobilidade articular, anormalidades cutâneas, osteoartrite, dor intensa
Clássico	Colágenos tipos I e V	1:20.000-30.000	Similar ao subtipo hipermobilidade, porém com anormalidades cutâneas mais graves e alterações articulares menos graves
Vascular	Colágeno tipo III	1:100.000	Vasos sanguíneos e órgãos frágeis, estatura pequena, pele translúcida e fina, contusões fáceis
Cifoescoliose	Lisil-hidroxilase	< 60 casos	Curvatura da coluna (escoliose), fraqueza muscular grave, olhos frágeis, hipersensibilidade e hiperextensibilidade cutânea
Artrocalasia	Colágeno tipo I	< 40 casos	Articulações muito frouxas e deslocamento dos quadris
Dermatosparaxia	ADAM metalopeptidase com motivo trombospondina tipo 1 (ADAMTS2) ^c	< 10 casos	Pele muito frágil e flácida

^aBeighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al.: Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 1998;64:31-37.

^bGlicoproteína expressa nos tecidos conectivos como pele, articulações e músculos.

^cTambém chamada de pró-colágeno N-proteinase.

motivo trombospondina tipo 1 [ADAMTS2]), levando à formação de fibrilas de colágeno anormais irregulares e finas, resulta em dermatosparaxia, manifestada por pele flácida e marcadamente frágil.

A **síndrome de Alport** (nefrite hereditária) é a designação aplicada a distúrbios genéticos (tanto ligados ao X quanto autossômicos) afetando o colágeno **tipo IV**, um colágeno semelhante à rede que forma parte da estrutura das membranas basais dos glomerúlos renais, da orelha interna e do olho (ver discussão sobre laminina, a seguir). Foram demonstradas mutações em vários genes que codificam as fibras de colágeno tipo IV. O principal sinal inicial consiste em hematúria, acompanhada por lesões oculares e perda de audição, e os pacientes eventualmente podem desenvolver doença renal terminal. A microscopia eletrônica revela anormalidades características da estrutura da membrana basal e da lâmina densa.

Na **epidermólise bolhosa**, a pele sofre ruptura e forma bolhas em consequência de trauma leve. A forma distrófica é causada por mutações do gene *COL7A1*, que afetam a estrutura do colágeno **tipo VII**. Esse colágeno forma delicadas fibrilas que ancoram a lâmina basal às fibrilas de colágeno na derme. Foi constatado que essas fibrilas de ancoragem estão acentuadamente reduzidas nessa forma da doença, levando à provável formação de bolhas. A epidermólise bolhosa simples, outra variante, é causada por mutações na queratina 5 (ver Capítulo 51).

O **escorbuto** afeta a estrutura do colágeno. Entretanto, ele é causado por uma **deficiência de ácido ascórbico** (vitamina C) (ver Capítulo 44), e não é uma doença genética. Os principais sinais consistem em hemorragias gengivais e subcutâneas e cicatrização deficiente de feridas. Esses sinais refletem a síntese deficiente de colágeno devida à atividade reduzida das enzimas **prolil e lisil hidroxilases**; ambas requerem ácido ascórbico como cofator e estão envolvidas nas modificações pós-traducionais que fornecem rigidez às moléculas do colágeno.

Na **doença de Menkes**, a deficiência de cobre resulta em ligação cruzada deficiente de colágeno e de elastina pela enzima dependente de cobre, a lisil-oxidase. (A doença de Menkes será discutida no Capítulo 52.)

A ELASTINA CONFERE EXTENSIBILIDADE E RETRATIBILIDADE AOS PULMÕES, AOS VASOS SANGUÍNEOS E AOS LIGAMENTOS

A **elastina** é uma proteína do tecido conectivo responsável pelas propriedades de extensibilidade e retração elástica dos tecidos. Embora não seja tão conhecida quanto o colágeno, a elastina está presente em grandes quantidades, sobretudo nos tecidos que necessitam dessas propriedades físicas, como os pulmões, as artérias de grande calibre e alguns ligamentos elásticos. Quantidades menores de elastina também são encontradas na pele, na cartilagem da orelha e em vários outros tecidos. Diferentemente do colágeno, parece haver apenas um tipo genético de elastina, embora surjam variantes por *splicing* alternativo (ver Capítulo 36) do hnRNA da elastina. A elastina é sintetizada sob a forma de um monômero solúvel de cerca de 70 kDa, denominado **tropoelastina**. Algumas das prolins da tropoelastina são hidroxiladas em **hidroxiprolina** pela prolil-hidroxilase, embora a hidroxilisina e a hidroxilisina glicosilada não estejam presentes. Ao contrário do colágeno, a tropoelastina não é sintetizada em uma pró-forma com peptídeos de extensão. Além disso, a elastina não contém sequências repetitivas de Gli-X-Y, nem estrutura helicoidal tripla ou frações de carboidrato.

Após a secreção da célula, certos resíduos lisil da tropoelastina sofrem desaminação oxidativa em aldeídos pela **lisil-oxidase**, a mesma enzima envolvida nesse processo com o colágeno. Entretanto, as principais ligações cruzadas formadas na elastina são as **desmosinas**, resultantes da condensação de três desses aldeídos derivados da lisina com uma lisina não modificada, formando uma ligação cruzada tetrafuncional característica da elastina. A elastina, em sua forma extracelular madura com ligações cruzadas, é altamente insolúvel, **extremamente estável** e apresenta *turnover* muito lento. A elastina exibe uma variedade de conformações helicoidais aleatórias que possibilitam o estiramento da proteína e a sua retração subsequente durante o desempenho de suas funções fisiológicas.

TABELA 50-5 Principais diferenças entre o colágeno e a elastina

Colágeno	Elastina
1. Muitos tipos genéticos diferentes	Um tipo genético
2. Tripla-hélice	Ausência de tripla-hélice; conformações helicoidais aleatórias que possibilitam seu estiramento
3. Estrutura repetitiva (Gli-X-Y) _n	Ausência de estrutura repetitiva (Gli-X-Y) _n
4. Presença de hidroxilisina	Ausência de hidroxilisina
5. Contém carboidratos	Não contém carboidratos
6. Ligações cruzadas intramoleculares de aldóis	Ligações cruzadas intramoleculares de desmosina
7. Presença de peptídeos de extensão durante a biossíntese	Ausência de peptídeos de extensão durante a biossíntese

A **Tabela 50-5** fornece um resumo das principais diferenças entre o colágeno e a elastina.

Foram encontradas deleções do gene da elastina (localizado em 7q11.23) em cerca de 90% dos indivíduos com a **síndrome de Williams-Beuren**, um distúrbio de desenvolvimento que acomete o tecido conectivo e o sistema nervoso central. As mutações, que afetam a síntese de elastina, provavelmente desempenham papel etiológico na **estenose aórtica supra-avalvular** que ocorre com frequência nessa doença. A fragmentação ou, alternativamente, a diminuição da elastina é observada em distúrbios como o **enfisema pulmonar**, a **cútis flácida** e o **envelhecimento da pele**.

AS FIBRILINAS SÃO COMPONENTES ESTRUTURAIS DAS MICROFIBRILAS

As **microfibrilas** são feixes finos semelhantes a fibras com 10 a 12 nm de diâmetro que fornecem um **arcabouço** para a deposição de elastina na MEC. As **fibrilinas** são glicoproteínas grandes (cerca de 350 kDa) que constituem o principal componente estrutural dessas fibras. Elas são secretadas (após clivagem proteolítica) no interior da MEC por fibroblastos e são incorporadas no interior das microfibrilas insolúveis. A **fibrilina 1** é a principal fibrilina presente, porém as fibrilinas 2 e 3 também foram identificadas, e acredita-se que a fibrilina 2 seja importante na deposição de microfibrilas no início do desenvolvimento. Outras proteínas, incluindo **proteínas associadas às microfibrilas (MAGPs)**, **fibulinas e membros da família ADAMTS**, também estão associadas às microfibrilas. As microfibrilas de fibrilina são encontradas em fibras elásticas e também em feixes sem elastina nos olhos, nos rins e nos tendões.

A síndrome de Marfan é causada por mutações no gene da fibrilina 1

A **síndrome de Marfan** é uma doença hereditária relativamente prevalente que acomete o tecido conectivo; ela é herdada como caráter autossômico dominante. Ela acomete os **olhos** (p. ex., causando luxação da lente, conhecida como ectopia lentis), o **sistema esquelético** (a maioria dos pacientes tem

estatura alta e apresenta dedos longos [aracnodactilia] e hiperextensibilidade das articulações) e o **sistema circulatório** (p. ex., causando enfraquecimento da túnica média da aorta, com consequente dilatação da aorta ascendente). É possível que Abraham Lincoln tenha tido essa doença. Os casos são devidos, em sua maioria, a mutações do gene (localizado no cromossomo 15) da fibrilina 1; foram detectadas mutações de troca de sentido em vários pacientes com síndrome de Marfan. Essas mutações resultam em fibrilina anormal e/ou quantidades menores depositadas na MEC. Como a citocina **TGF-β** normalmente se liga à fibrilina 1, a ligação reduzida na síndrome de Marfan causa distúrbios na sinalização de TGF-β que contribuem para a patologia encontrada na condição. Esse achado pode levar ao desenvolvimento de terapias para o distúrbio, utilizando fármacos que antagonizam TGF-β (p. ex., o antagonista do receptor de angiotensina II, losartana).

Mutações no gene da fibrilina 1 também foram identificadas recentemente como causa da **displasia acromicrica** e da **displasia geleofísica**, que são caracterizadas por pequena estatura, espessamento da pele e rigidez articular. A **aracnodactilia contratural congênita** está associada a uma mutação no gene que codifica a fibrilina 2. A **Figura 50-3** resume a provável sequência de eventos que levam à síndrome de Marfan.

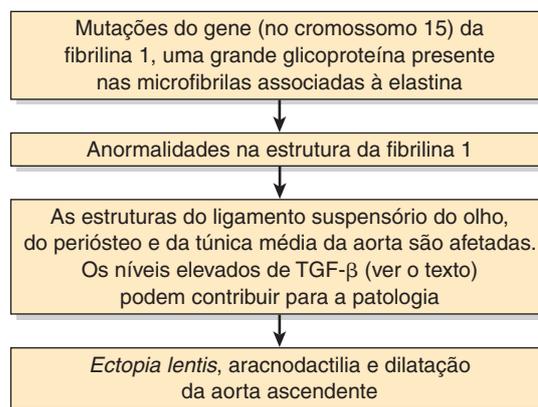


FIGURA 50-3 Provável sequência de eventos na etiologia dos principais sinais apresentados por pacientes com síndrome de Marfan.

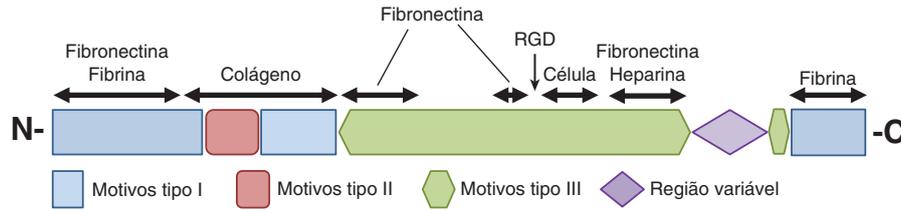


FIGURA 50-4 Estrutura do monômero da fibronectina. A fibronectina é um dímero ligado por ligações dissulfeto (não mostradas) situadas próximas às extremidades carboxiterminais dos monômeros. Cada monômero consiste principalmente em motivos repetitivos tipos I, II ou III e possui vários domínios de ligação à proteína. Quatro deles se ligam à fibronectina, e também existem domínios para colágeno, heparina, fibrina e ligação celular. A localização aproximada da sequência RGD da fibronectina, que interage com uma variedade de receptores de integrina e fibronectina nas superfícies celulares, está indicada pela seta.

A FIBRONECTINA É UMA IMPORTANTE GLICOPROTEÍNA ENVOLVIDA NA ADESÃO E NA MIGRAÇÃO CELULARES

A **fibronectina** é uma importante glicoproteína da MEC e também é encontrada, em forma solúvel, no plasma. Ela é constituída de duas subunidades idênticas, cada uma com cerca de 230 kDa, unidas por duas ligações dissulfeto, próximas às regiões carboxiterminais. O gene que codifica a fibronectina é muito grande, contendo cerca de 50 éxons; o RNA produzido pela sua transcrição está sujeito a *splicing* alternativo considerável, e foram detectados até 20 mRNAs diferentes em vários tecidos. A fibronectina contém três tipos de motivos repetitivos (I, II e III), que estão organizados em **domínios** (pelo menos sete); as funções desses domínios incluem a ligação à fibronectina, permitindo que as moléculas da proteína interajam com a **heparina** (ver adiante), a fibrina, o colágeno e superfícies celulares (**Figura 50-4**). A fibronectina liga-se às células via proteína receptora transmembrana que pertence à classe de proteínas da **integrina** (ver Capítulo 55). As integrinas são heterodímeros que contêm vários tipos de cadeias α e β polipeptídicas. A fibronectina possui uma **sequência Arg-Gli-Asp (RGD)** que se liga ao receptor. Essa sequência é comum a várias outras proteínas presentes na MEC que se ligam às integrinas presentes na membrana plasmática da célula, e a sua presença nos peptídeos sintéticos permite que eles inibam a ligação da fibronectina às células. A **Figura 50-5** ilustra a interação do colágeno, da fibronectina e da laminina, proteínas importantes da MEC, com uma célula típica (p. ex., fibroblasto) presente na matriz.

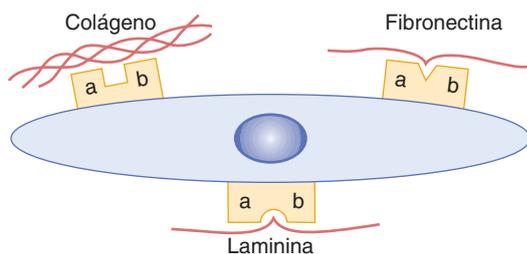


FIGURA 50-5 Representação esquemática de interações celulares com as principais proteínas da MEC. As letras a e b indicam cadeias polipeptídicas α e β das integrinas. (Redesenhada com base em Yamada KM: Adhesive recognition sequences. *J Biol Chem* 1991;266:12809.)

O receptor de fibronectina interage indiretamente com os microfilamentos de **actina** (ver Capítulo 51) presentes no citosol (**Figura 50-6**). Diversas proteínas, conhecidas coletivamente como **proteínas de fixação**, estão envolvidas; estas incluem **talina**, **vinculina**, **α -actinina** e **paxilina**. A talina liga a integrina à actina via vinculina, que se liga à α -actinina e à paxilina, assim como à actina. A α -actinina também se liga à actina, e a paxilina se liga à integrina. Esses grandes complexos proteicos formam **adesões focais** que não apenas ancoram as células à MEC, como também transmitem sinais do exterior que influenciam o comportamento celular. Portanto, a interação da fibronectina com o seu receptor assegura uma via pela qual o **exterior da célula pode se comunicar com o interior**. A fibronectina também está envolvida na **migração celular**, uma vez que fornece um local de ligação para as células, ajudando-as a percorrer o seu trajeto pela MEC. A quantidade de fibronectina ao redor de muitas **células transformadas** está acentuadamente reduzida, explicando, em parte, a sua interação defeituosa com a MEC.

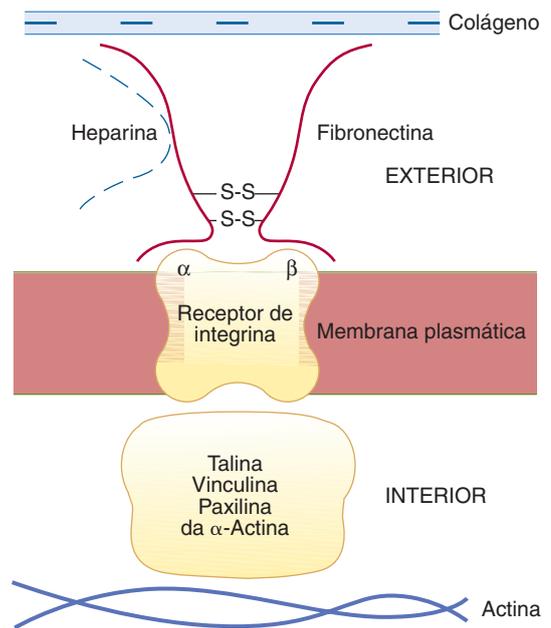


FIGURA 50-6 Representação esquemática da fibronectina interagindo com a actina no citosol via receptor de fibronectina integrina. Para simplificar, as proteínas de fixação estão representadas na forma de um complexo.

A LAMININA É UM IMPORTANTE COMPONENTE PROTEICO DAS LÂMINAS BASAIS

As **lâminas basais** são áreas especializadas da MEC que circundam as células epiteliais e algumas outras células (p. ex., células musculares). A **laminina** (uma glicoproteína de cerca de 850 kDa e 70 nm de comprimento) consiste em três cadeias polipeptídicas alongadas distintas (cadeias α , β e γ) ligadas entre si para formar uma estrutura alongada complexa (ver Figura 51-11, na qual a laminina é chamada de **merosina**). Existem diversas variantes genéticas da laminina, cujos detalhes não são apresentados aqui. Nas lâminas basais, a laminina forma redes que estão ligadas às redes de colágeno tipo IV pela **entactina** (também chamada de nidogênio), uma glicoproteína contendo uma sequência RGD e o proteoglicano heparan-sulfato, **perlecano**. O colágeno interage com a laminina (e não diretamente com a superfície celular), que, por sua vez, interage com integrinas ou outras proteínas, como os **distroglicanos** (ver Capítulo 51), ancorando a lâmina às células (Figura 50-7).

No **glomérulo renal**, a lâmina basal é formada por duas camadas distintas de células (uma endotelial e outra epitelial), cada uma disposta em lados opostos da lâmina; essas três camadas constituem a **membrana glomerular**. Essa lâmina basal relativamente espessa desempenha papel importante na **filtração glomerular**, regulando a passagem de grandes moléculas (em grande parte, proteínas plasmáticas) através do glomérulo para os túbulos renais. A membrana glomerular permite a passagem de pequenas moléculas, como a **inulina** (5,2 kDa), tão facilmente como a água. Por outro lado, apenas pequena quantidade da proteína **albumina** (69 kDa), a principal proteína plasmática, atravessa o glomérulo normal. Isso é explicado pelos dois conjuntos de fatos a seguir. (1) Os **poros** na membrana glomerular são grandes o suficiente para possibilitar a passagem de moléculas de até cerca de 8 nm. (2) A albumina é menor do que o diâmetro desse poro, porém é impedida de passar facilmente em virtude das **cargas negativas** do heparan-sulfato e de algumas glicoproteínas que contêm ácido siálico na lâmina. Essas cargas negativas repelem a albumina e a maioria das proteínas plasmáticas que apresentam cargas negativas no pH do sangue. A estrutura normal do glomérulo pode ser gravemente danificada em determinados tipos de **glomerulonefrite**

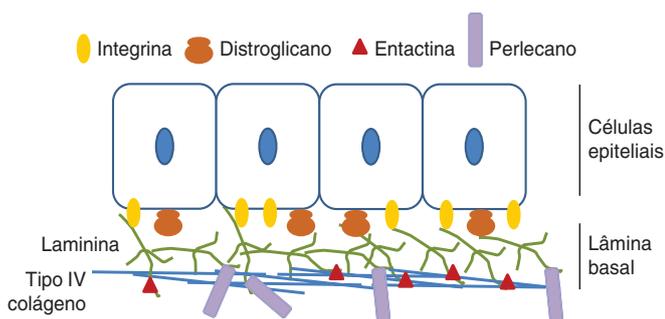


FIGURA 50-7 Estrutura da lâmina basal. A laminina é ligada ao colágeno tipo IV via entactina e perlecano (formando a lâmina basal) e à camada de células epiteliais via integrinas e distroglicanos.

(p. ex., causadas por anticorpos dirigidos contra vários componentes da membrana glomerular). Isso altera os poros e as quantidades e disposições das macromoléculas de carga negativa citadas, e quantidades relativamente maciças de albumina (e de algumas outras proteínas plasmáticas) podem ser eliminadas na urina, resultando em **albuminúria** grave.

PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos encontrados nos proteoglicanos são formados por dissacarídeos repetitivos

Os **proteoglicanos** são proteínas que contêm **glicosaminoglicanos** (GAGs) ligados de forma covalente (ver Capítulo 15). Pelo menos 30 proteoglicanos foram caracterizados e receberam nomes como sindecano, betaglicano, serglicina, perlecano, agrecano, versicano, decorina, biglicano e fibromodulina. As proteínas ligadas de forma covalente aos glicosaminoglicanos são chamadas de “**proteínas centrais**”. Os proteoglicanos variam em sua distribuição tecidual, natureza da proteína central, glicosaminoglicanos ligados e sua função; eles têm se mostrado de difícil isolamento e caracterização, porém o uso da tecnologia do DNA recombinante está começando a fornecer informações importantes sobre suas estruturas. A quantidade de **carboidrato** de um proteoglicano é geralmente muito maior do que a encontrada em uma glicoproteína e pode representar até 95% do seu peso. As Figuras 50-8 e 50-9 mostram a estrutura geral de um proteoglicano específico, o **agrecano**, o principal tipo encontrado na cartilagem. Ele é muito grande (cerca de 2×10^3 kDa), e a sua estrutura global assemelha-se a uma escova. Ele contém um longo filamento de ácido hialurônico (um tipo de GAG) (ver Capítulo 15), onde as proteínas estão fixadas por **ligações não covalentes**. Por sua vez, as proteínas de ligação interagem de modo não covalente com moléculas de proteínas centrais, a partir das quais se projetam cadeias de outros GAGs (queratan-sulfato e condroitina-sulfato, nesse caso). Adiante, na seção sobre cartilagem, serão fornecidos mais detalhes sobre essa macromolécula.

Existem pelo menos sete GAGs: **ácido hialurônico** (**hialuronano**), **condroitina-sulfato**, **queratan-sulfatos I e II**, **heparina**, **heparan-sulfato** e **dermatan-sulfato**. Os GAGs são polissacarídeos não ramificados formados por dissacarídeos repetitivos, dentre os quais um componente é sempre um **aminoaçúcar** (daí o nome GAG), seja D-glicosamina ou D-galactosamina. O outro componente do dissacarídeo repetitivo (exceto no caso do queratan-sulfato) é um **ácido urônico**, seja o ácido L-glicurônico (GlcUA) ou seu epímero 5', o ácido L-idurônico (IdUA). Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAGs contêm **grupos sulfato**, na forma de O-ésteres ou N-sulfato (na heparina e no heparan-sulfato). O ácido hialurônico também é excepcional, uma vez que parece existir como polissacarídeo na MEC, sem estabelecer ligação covalente com a proteína, conforme especificado pela definição de proteoglicano supradescrita. O estudo dos GAGs e dos proteoglicanos tem sido difícil, em parte devido à sua complexidade. Todavia, como constituem componentes importantes da MEC e

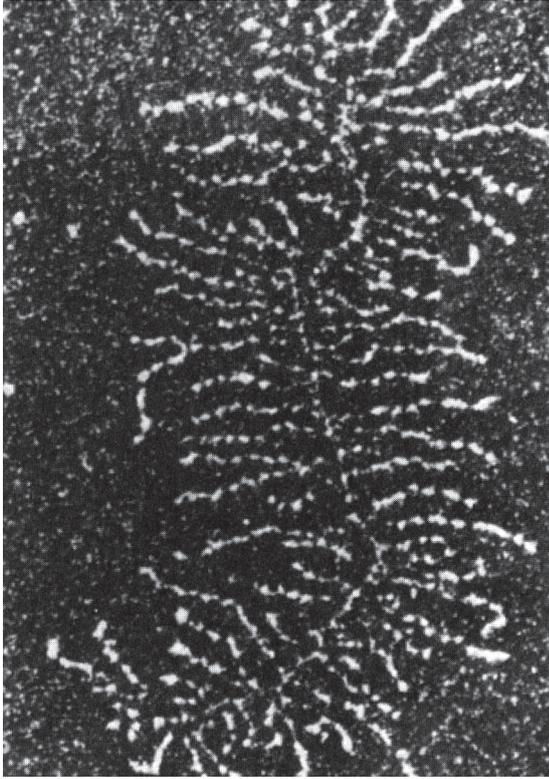


FIGURA 50-8 Micrografia eletrônica de campo escuro de um agregado proteoglicano. As subunidades do proteoglicano e o arcabouço filamentososo estão particularmente bem estendidos nesta imagem. (Reproduzida, com permissão, de Rosenberg L, Hellman W, Kleinschmidt AK: Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 1975;250:1877.)

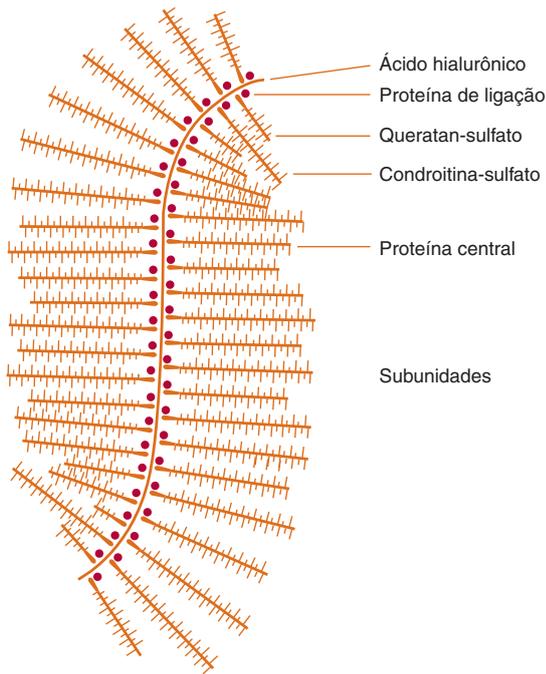


FIGURA 50-9 Representação esquemática do proteoglicano agregado. (Reproduzida, com permissão, de Lennarz WJ: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980. Reprodução autorizada por Springer Science e Business Media.)

desempenham vários papéis biológicos importantes, como seu envolvimento em diversos processos patológicos, o interesse por eles cresceu muito nos últimos anos.

A biossíntese dos glicosaminoglicanos envolve a fixação às proteínas centrais, o alongamento da cadeia e a terminação da cadeia

Fixação às proteínas centrais

Em geral, a ligação entre os GAGs e suas proteínas centrais pode ser de três tipos.

1. Uma **ligação O-glicosídica** entre a **xilose (Xil)** e a **Ser**, uma ligação exclusiva dos proteoglicanos. Essa ligação é formada pela transferência de um resíduo Xil para a Ser da UDP-xilose. Em seguida, são acrescentados dois resíduos de Gal ao resíduo de Xil, formando um **trissacarídeo de ligação**, Gal-Gal-Xil-Ser. O crescimento subsequente da cadeia do GAG ocorre na Gal terminal.
2. Uma **ligação O-glicosídica** é formada entre a **GalNAc** (*N*-acetilgalactosamina) e a **Ser (Tre)** (ver Figura 46-1A), presente no queratano-sulfato II. Essa ligação é formada pela doação de um resíduo de GalNAc à Ser (ou Tre), utilizando UDP-GalNAc como doador.
3. Uma **ligação N-glicosamina** entre a **GlcNAc** (*N*-acetilglicosamina) e o nitrogênio amida da **Asn**, conforme observado nas glicoproteínas *N*-ligadas (ver Figura 46-1B). Acredita-se que a sua síntese envolva dolicol-PP oligossacarídeo.

A síntese das proteínas centrais ocorre no **retículo endoplasmático**, onde também ocorre a formação de pelo menos algumas das ligações citadas. A maior parte das etapas mais avançadas na biossíntese das cadeias de GAGs e suas modificações subsequentes ocorrem no **aparelho de Golgi**.

Alongamento da cadeia

Açúcares nucleotídicos apropriados e **glicosiltransferases** altamente específicas localizadas no aparelho de Golgi são utilizados para a síntese das cadeias oligossacarídicas dos GAGs. Nesse caso, parece haver relação de “**uma enzima, uma ligação**”, conforme observado no caso de certos tipos de ligações encontradas nas glicoproteínas. Os sistemas enzimáticos envolvidos no alongamento das cadeias são capazes de reproduzir os GAGs complexos com alta finalidade.

Terminação da cadeia

Esse processo parece resultar da (1) **sulfatação**, particularmente em determinadas posições dos açúcares, e (2) da **progressão** da cadeia de GAG em crescimento para fora do local onde ocorre a catálise na membrana.

Modificações adicionais

Após a formação da cadeia de GAG, ocorrem **numerosas modificações químicas**, como a introdução de grupos sulfato na GalNAc e outras frações e a epimerização de GlcUA a resíduos de IdUA. As enzimas que catalisam a sulfatação são designadas

como **sulfotransferases** e utilizam **3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato** (PAPS; sulfato ativo) (ver Capítulo 32) como doador de sulfato. Essas enzimas localizadas no aparelho de Golgi são altamente específicas, e enzimas distintas catalisam a sulfatação em posições diferentes (p. ex., carbonos 2, 3, 4 e 6) nos açúcares aceptores. Uma **epimerase** catalisa as conversões dos resíduos glicuronil em iduronil.

Os proteoglicanos são importantes na organização estrutural da matriz extracelular

Os proteoglicanos são encontrados em **todos os tecidos** do corpo, principalmente na MEC ou “substância fundamental”. Os proteoglicanos estão associados entre si e também com os outros componentes estruturais principais da matriz, o colágeno e a elastina, em configurações específicas. Alguns proteoglicanos se ligam ao colágeno, e outros, à elastina. Essas interações são importantes para determinar a organização estrutural da matriz. Alguns proteoglicanos (p. ex., decorina) também podem se **ligar a fatores de crescimento**, como TGF- β , modulando seus efeitos nas células. Além disso, alguns deles interagem com determinadas **proteínas adesivas**, como a fibronectina e a laminina (ver anteriormente), que também estão localizadas na matriz. Os GAGs presentes nos proteoglicanos são **poliânions** e, portanto, ligam-se aos policátions e cátions, como Na^+ e K^+ . Esta última propriedade atrai a água por pressão osmótica para dentro da MEC, contribuindo para o seu turgor.

Os GAGs também formam um **gel** em concentrações relativamente baixas. Tendo em vista a natureza extensa e longa das cadeias polissacarídicas dos GAGs e a sua capacidade de formar gel, os proteoglicanos podem atuar como **penéiras**, restringindo a passagem de macromoléculas grandes para a MEC, porém, permitindo a difusão relativamente livre de pequenas moléculas. Também nesse caso, em virtude de suas estruturas extensas e dos enormes agregados macromoleculares que muitas vezes formam, os GAGs ocupam **grande volume** da matriz em relação às proteínas.

Vários glicosaminoglicanos apresentam diferenças na estrutura e possuem distribuições características e funções diversas

Os sete GAGs citados diferem entre si em relação a várias das seguintes propriedades: composição de aminoaçúcares, composição de ácido urônico, ligações entre esses componentes, comprimento das cadeias dos dissacarídeos, presença ou ausência de grupos sulfato e suas posições de fixação aos açúcares constituintes, natureza das proteínas centrais às quais estão fixados, natureza da ligação às proteínas centrais, distribuição tecidual e subcelular e funções biológicas.

A distribuição da estrutura (**Figura 50-10**) e as funções de cada um dos GAGs serão agora discutidas de maneira sucinta. A **Tabela 50-6** disponibiliza um resumo das principais características dos sete GAGs.

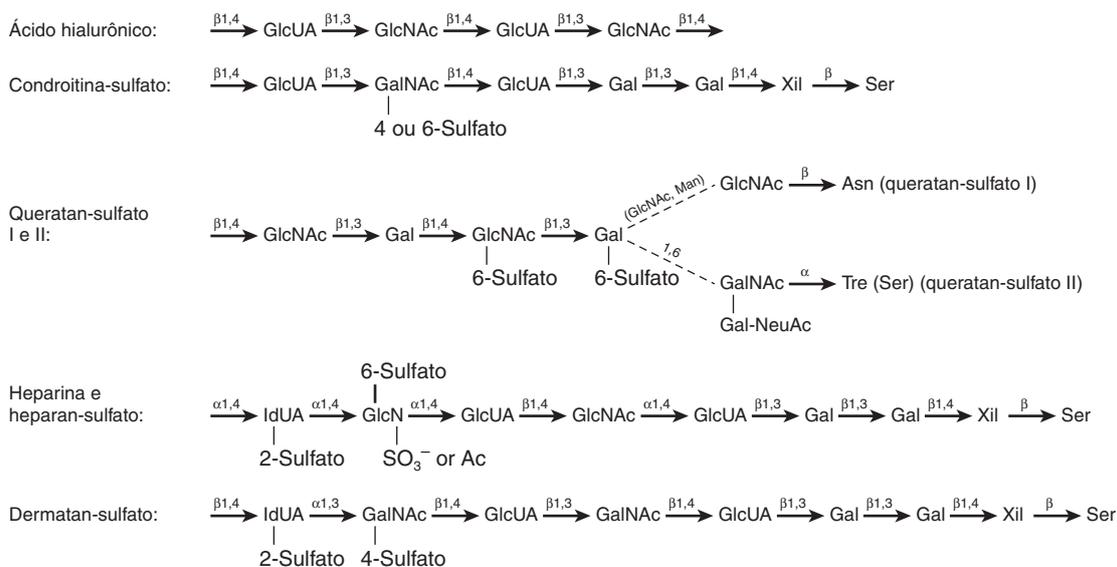


FIGURA 50-10 Estruturas dos glicosaminoglicanos e suas ligações às proteínas centrais. (Ac, acetil; Asn, L-asparagina; Gal, D-galactose; GalN, D-galactosamina; GlcN, D-glicosamina; GlcUA, ácido D-glicurônico; IdUA, ácido L-idurônico; Man, D-manose; NeuAc, ácido N-acetilneuramínico; Ser, L-serina; Tre, L-treonina; Xil, L-xilose.) As estruturas resumidas são apenas representações qualitativas e não refletem, por exemplo, a composição de ácido urônico dos glicosaminoglicanos híbridos, como a heparina e o dermatan-sulfato, que contêm os ácidos L-idurônico e D-glicurônico. Tampouco se deve supor que os substituintes indicados estejam sempre presentes, por exemplo, embora a maioria dos resíduos de ácido idurônico da heparina tenha um grupo 2'-sulfato, uma proporção muito menor desses resíduos é sulfatada no dermatan-sulfato. A presença de trissacarídeos de ligação (Gal-Gal-Xil) na condroitina-sulfato, na heparina e heparan-sulfato e no dermatan-sulfato está assinalada. (Modificada ligeiramente e reproduzida, com permissão, de Lennarz WJ: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980. Reprodução autorizada por Springer Science e Business Media.)

TABELA 50-6 Propriedades dos glicosaminoglicanos

GAG	Açúcares	Sulfato ^a	Ligação à proteína	Localização
Ácido hialurônico	GlcNAc, GlcUA	–	Nenhum	Pele, líquido sinovial, osso, cartilagem, humor vítreo, tecidos embrionários
Condroitina-sulfato	GalNAc, GlcUA	GalNAc	Xil-Ser; associado ao HA por proteínas de ligação	Cartilagem, osso, SNC
Queratan-sulfato I e II	GlcNAc, Gal	GlcNAc	GlcNAc-Asn (KS I) GalNAc-Tre (KS II)	Córnea, cartilagem, tecido conectivo frouxo
Heparina	Gln, IdUA	GlcN GlcN IdUA	Ser	Mastócitos, fígado, pulmão, pele
Heparan-sulfato	GlcN, GlcUA	GlcN	Xil-Ser	Pele, membrana basal do rim
Dermatan-sulfato	GalNAc, IdUA, (GlcUA)	GalNAc IdUA	Xil-Ser	Pele, distribuição ampla

^aO sulfato está ligado a várias posições dos açúcares indicados (ver Figura 50-10). Observe que todos os GAGs, exceto os queratan-sulfatos, contêm um ácido urônico que pode ser um ácido glicurônico ou idurônico.

SNC, sistema nervoso central; GAG, glicosaminoglicanos.

Ácido hialurônico

O **ácido hialurônico** consiste em uma cadeia não ramificada de unidades dissacarídicas repetitivas que contêm GlcUA e GlcNAc. Ele está presente nas bactérias e é encontrado na MEC de quase todos os tecidos animais, porém apresenta concentração especialmente elevada em tipos altamente hidratados, como a pele e o cordão umbilical, e no osso, na cartilagem, nas articulações (líquido sinovial) e no humor vítreo ocular, assim como em tecidos embrionários. Acredita-se que desempenhe importante papel em permitir a **migração celular** durante a morfogênese e o reparo de feridas. A sua habilidade em atrair água para a MEC leva ao afrouxamento da matriz, auxiliando nesse processo. As altas concentrações de ácido hialurônico junto com as condroitina-sulfatos presentes na **cartilagem** contribuem para a sua compressibilidade (ver adiante).

Condroitina sulfatos (condroitina 4-sulfato e condroitina 6-sulfato)

Os proteoglicanos ligados à **condroitina-sulfato** pela ligação Xil-Ser O-glicosídica são componentes importantes da **cartilagem** (ver adiante). O dissacarídeo repetitivo assemelha-se ao encontrado no ácido hialurônico e contém GlcUA, porém com **GalNAc** substituindo GlcNAc. A GalNAc é substituída por **sulfato** em sua posição 4' ou 6', com presença de cerca de um sulfato para cada unidade dissacarídica. A condroitina-sulfato desempenha papel importante na manutenção da estrutura da MEC. Elas estão localizadas nas regiões de calcificação no **osso** endocondral e representam o principal componente da **cartilagem**. Elas são encontradas em quantidades elevadas na MEC do SNC e, além de sua função estrutural, parecem atuar como moléculas sinalizadoras na prevenção do reparo de terminações nervosas após lesão.

Queratan-sulfatos I e II

Conforme mostrado na Figura 50-10, os queratan sulfatos consistem em unidades dissacarídicas de **Gal-GlcNAc** repetitivas contendo **sulfato** ligado à posição 6' da GlcNAc ou, ocasionalmente, da Gal. **Queratan-sulfato I** foi originalmente isolado da **córnea**, e o **queratan-sulfato II** foi obtido da cartilagem.

Entretanto, os dois GAGs diferem em suas ligações estruturais às proteínas centrais, e, como agora se sabe que a distribuição dos dois tipos não é tecido-específica, a classificação é baseada na diferença da ligação à proteína. No olho, localizam-se entre as fibrilas de colágeno e desempenham um papel crucial na transparência da córnea. As alterações na composição dos proteoglicanos observadas nas cicatrizes de córnea desaparecem quando a córnea cicatriza.

Heparina

O dissacarídeo repetitivo **heparina** contém **glicosamina** (GlcN) e um dos dois ácidos urônicos (**Figura 50-11**). Os grupos amino dos resíduos de GlcN são, em sua maioria, **N-sulfatados**, porém alguns são acetilados. GlcN também apresenta um sulfato ligado ao carbono 6.

A grande maioria dos resíduos de ácido urônico é **IdUA**. Inicialmente, todos os ácidos urônicos são GlcUA, porém, uma 5'-epimerase converte cerca de 90% dos resíduos de GlcUA em IdUA após a formação da cadeia polissacarídica. A molécula proteica do proteoglicano heparina é singular, visto que consiste exclusivamente em resíduos de serina e glicina. Cerca de dois terços dos resíduos de serina contêm cadeias de GAG, geralmente de 5 a 15 kDa, porém, algumas vezes muito maiores. A heparina é encontrada nos grânulos dos **mastócitos** e também no fígado, nos pulmões e na pele. É um importante **anticoagulante**. Ela se liga aos fatores IX e XI, porém a sua interação mais importante é com a **antitrombina plasmática** (discutida no Capítulo 55). A heparina também pode se ligar especificamente à **lipase lipoproteica** presente nas paredes capilares, causando a liberação dessa enzima na circulação.

Heparan-sulfato

Essa molécula está presente em muitas **superfícies celulares** na forma de proteoglicano e é extracelular. Contém **GlcN** com menos **N-sulfatos** do que a heparina e, diferentemente desta última, o seu ácido urônico predominante é o **GlcUA**. O **heparan-sulfato** está associado à membrana plasmática das células, e suas proteínas centrais atravessam a membrana de um lado ao outro. Nessa estrutura, eles podem atuar como **receptores** e

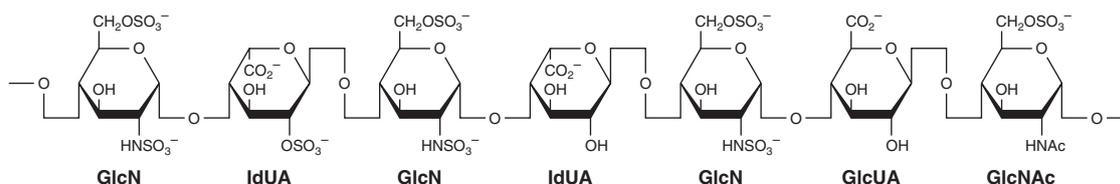


FIGURA 50-11 Estrutura da heparina. A porção do polímero ilustra as características estruturais típicas da heparina; todavia, a sequência das unidades dissacarídicas repetitivas e substituídas de maneira variada foram selecionadas de modo arbitrário. Além disso, podem ocorrer também resíduos de glicosamina não *O*-sulfatada ou 3-*O*-sulfatada. (Modificada, redesenhada e reproduzida, com permissão, de Lindahl U, et al.: Structure and biosynthesis of heparin-like polysaccharides. Fed Proc 1977;36:19.)

também podem participar como mediadores do **crecimento celular** e da **comunicação célula a célula**. A fixação das células a seu substrato em cultura é mediada, pelo menos em parte, pelo heparan-sulfato. Esse proteoglicano também é encontrado na **membrana basal do rim** junto com o colágeno tipo IV e a laminina (ver anteriormente), onde desempenham um importante papel na determinação da seletividade de cargas da filtração glomerular.

Dermatan-sulfato

Essa substância está amplamente distribuída nos tecidos animais. A sua estrutura se assemelha à da condroitina-sulfato, exceto pelo fato de que, no lugar de um GlcUA em ligação β -1,3 à GalNAc, ele contém um IdUA em uma ligação α -1,3 à GalNAc. Ocorre formação do IdUA, como na heparina e no heparan-sulfato, por 5'-epimerização do GlcUA. Como essa reação é regulada pelo grau de sulfatação, e tendo em vista que a sulfatação é incompleta, o dermatan-sulfato contém **ambos** os dissacarídeos IdUA-GalNAc e GlcUA-GalNAc. O **dermatan-sulfato** apresenta ampla distribuição nos tecidos e é o principal GAG na pele. Evidências sugerem que ele participe da coagulação sanguínea, do reparo de lesões e da resistência à infecção.

Os proteoglicanos também são encontrados em **localizações intracelulares**, como o núcleo; nessa organela, a sua função ainda não foi elucidada. Eles estão presentes em alguns grânulos de armazenamento ou de secreção, como os grânulos cromafins da medula suprarrenal. Foi postulado que os proteoglicanos contribuem para a liberação do conteúdo desses grânulos. A **Tabela 50-7** sintetiza as várias funções dos GAGs.

As deficiências das enzimas que degradam os glicosaminoglicanos levam ao desenvolvimento das mucopolissacaridoses

Tanto as **exoglicosidases** quanto as **endoglicosidases** degradam os GAGs. À semelhança da maioria das outras biomoléculas, os GAGs estão sujeitos ao **turnover**, sendo tanto sintetizados quanto degradados. Nos tecidos dos adultos, os GAGs geralmente exibem **turnover** relativamente **lento**, com meias-vidas de vários dias a semanas.

A compreensão das vias de degradação dos GAGs, como no caso das glicoproteínas (ver Capítulo 46) e dos glicosfingolípídeos (ver Capítulo 24), foi amplamente facilitada pela elucidação das deficiências enzimáticas específicas que ocorrem em determinados **erros inatos do metabolismo**. Quando os

GAGs estão envolvidos, esses erros inatos são denominados **mucopolissacaridoses (Tabela 50-8)**.

A **degradação** dos GAGs é realizada por uma série de **hidrolases lisossômicas**. Estas incluem **endoglicosidases, exoglicosidases e sulfatases**, que atuam geralmente em sequência para degradar os diversos GAGs. A Tabela 50-8 fornece uma lista de algumas delas.

As **mucopolissacaridoses (MPSs)** (Tabela 50-8) compartilham um mecanismo etiológico comum, conforme ilustrado na **Figura 50-12**. Em geral, essas doenças são transmitidas de forma **autossômica recessiva**, com as **síndromes de Hurler e Hunter** sendo talvez as mais amplamente estudadas. Nenhuma delas é comum. Em geral, essas condições são crônicas e progressivas e afetam múltiplos órgãos. Muitos pacientes apresentam organomegalia (p. ex., hepatomegalia e esplenomegalia); anomalias graves no desenvolvimento da cartilagem e do osso; aparência facial anormal; e deficiência

TABELA 50-7 Algumas funções dos glicosaminoglicanos e dos proteoglicanos

- Atuam como componentes estruturais da MEC
- Apresentam interações específicas com o colágeno, a elastina, a fibronectina, a laminina e outras proteínas, como os fatores de crescimento
- Como poliânions, ligam-se a policátions e cátions
- Contribuem para o turgor característico de vários tecidos
- Funcionam como peneiras na MEC
- Facilitam a migração celular (HA)
- Exercem um papel na compressibilidade da cartilagem na sustentação do peso (HA, CS)
- Desempenham um papel na transparência da córnea (KS I e DS)
- Têm função estrutural na esclera (DS)
- Atuam como anticoagulantes (heparina)
- São componentes das membranas plasmáticas, onde podem atuar como receptores e participar da adesão celular e das interações intercelulares (p. ex., HS)
- Determinam a seletividade de carga do glomérulo renal (HS)
- Constituem as vesículas sinápticas e outras vesículas (p. ex., HS)

Abreviações: CS, condroitina-sulfato; DS, dermatan-sulfato; MEC, matriz extracelular; HA, ácido hialurônico; HS, heparan-sulfato; KS I, queratan-sulfato I. As deficiências das enzimas que degradam os glicosaminoglicanos levam ao desenvolvimento das mucopolissacaridoses.

TABELA 50-8 Mucopolissacaridoses

Nome da doença	Abreviação ^a	Enzima deficiente	GAG(s) afetado(s)	Sintomas
Síndrome de Hurler, Scheie- Hurler-Scheie	MPS I	α -L-Iduronidase	Dermatan-sulfato, heparan-sulfato	Deficiência intelectual, características faciais grosseiras, hepatoesplenomegalia, córnea turva
Síndrome de Hunter	MPS II	Iduronato-sulfatase	Dermatan-sulfato, heparan-sulfato	Deficiência intelectual
Síndrome de Sanfilippo A	MPS IIIA	Heparan-sulfato-N-sulfatase ^b	Heparan-sulfato	Atraso no desenvolvimento, disfunção motora
Síndrome de Sanfilippo B	MPS IIIB	α -N-Acetilglicosaminidase	Heparan-sulfato	Igual à MPS IIIA
Síndrome de Sanfilippo C	MPS IIIC	α -Glicosaminidase-N-acetiltransferase	Heparan-sulfato	Igual à MPS IIIA
Síndrome de Sanfilippo D	MPS IIID	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	Heparan-sulfato	Igual à MPS IIIA
Síndrome de Morquio A	MPS IVA	Galactosamina-6-sulfatase	Queratan-sulfato, condroitina-6-sulfato	Displasia esquelética, estatura pequena
Síndrome de Morquio B	MPS IVB	β -Galactosidase	Queratan-sulfato	Igual à MPS IVA
Síndrome de Maroteaux-Lamy	MPS VI	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatase ^c	Dermatan-sulfato	Curvatura da coluna, estatura pequena, displasia esquelética, distúrbios cardíacos
Síndrome de Sly	MPS VII	β -Glicuronidase	Dermatan-sulfato, heparan-sulfato, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato	Displasia esquelética, pequena estatura, hepatomegalia, córnea turva
Síndrome de Natowicz	MPS IX	Hialuronidase	Ácido hialurônico	Dor articular, pequena estatura

^aOs termos MPS V e MPS VIII não são mais usados.

^bTambém chamada de sulfaminidase.

^cTambém chamada de arilsulfatase B.

intelectual. Além disso, podem estar presentes distúrbios na audição, na visão e no sistema circulatório. Testes diagnósticos incluem análise de GAGs na urina ou em amostras de biópsia tecidual; ensaio de enzimas supostamente deficientes nos leucócitos, nos fibroblastos ou no soro; e testes para genes específicos. Hoje, o diagnóstico pré-natal é possível usando-se células do líquido amniótico ou amostras de biópsia das vilosidades coriônicas. Em alguns casos, obtém-se **história familiar** de mucopolissacaridose.

O termo “**mucopolipidose**” foi introduzido para descrever doenças que combinavam características comuns das muco-

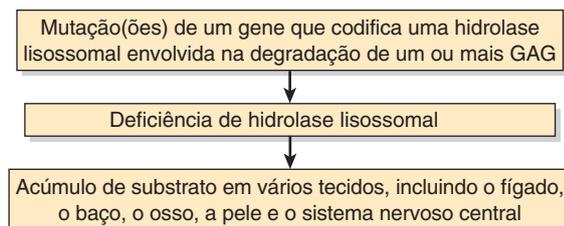


FIGURA 50-12 Esquema simplificado da etiologia de uma mucopolissacaridose, como a síndrome de Hurler. O acúmulo acentuado dos GAGs nos tecidos mencionados na figura pode provocar hepatomegalia, esplenomegalia, distúrbios do crescimento, traços faciais grosseiros e deficiência intelectual, respectivamente.

polissacaridoses e das esfingolipidoses (ver Capítulo 24). Na **sialidose** (mucopolipidose I, ML-I), vários oligossacarídeos derivados de glicoproteínas e de alguns gangliosídeos podem se acumular nos tecidos. A **doença da célula I** (ML-II) e a **polidistrofia pseudo-Hurler** (ML-III) são descritas no Capítulo 46. O termo “mucopolipidose” foi mantido, visto que ainda tem uso clínico relativamente amplo, embora não seja apropriado para descrever essas últimas duas doenças, pois o seu mecanismo etiológico envolve **localização incorreta** de determinadas enzimas lisossomais. Os defeitos genéticos do catabolismo das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas (p. ex., manosidose, fucosidose) também são descritos no Capítulo 46. Esses defeitos são caracterizados, em sua maioria, pela excreção aumentada de vários fragmentos das glicoproteínas na urina, que se acumulam em virtude do bloqueio metabólico, como no caso das mucopolipidoses.

A **hialuronidase** é uma enzima importante envolvida no catabolismo do ácido hialurônico e da condroitina-sulfato. Trata-se de uma endoglicosidase amplamente distribuída, que cliva as ligações hexosaminídicas. A partir do ácido hialurônico, a enzima gera um tetrassacarídeo com a estrutura (GlcUA β -1,3-GlcNAc- β -1,4)₂, que também pode ser degradado pela β -glicuronidase e β -N-acetil-hexosaminidase. Um distúrbio genético na hialuronidase causa MPS IX, um distúrbio do armazenamento lisossomal no qual há acúmulo de ácido hialurônico nas articulações.

Os proteoglicanos estão associados a doenças importantes e ao envelhecimento

O ácido hialurônico pode ser importante no sentido de permitir a **migração das células tumorais** através da MEC. As células tumorais podem induzir os fibroblastos a sintetizar quantidades muito elevadas desse GAG, talvez facilitando a sua própria disseminação. Algumas células tumorais possuem menos heparan-sulfato em suas superfícies, e isso pode contribuir para a **falta de adesividade** apresentada por essas células.

A íntima da **parede arterial** contém proteoglicanos, como ácido hialurônico e condroitina-sulfato, dermatan-sulfato e heparan-sulfato. Desses proteoglicanos, o dermatan-sulfato liga-se às lipoproteínas de baixa densidade. Além disso, o dermatan-sulfato parece ser o principal GAG sintetizado pelas células do músculo liso arterial. Como são essas células que proliferam **lesões ateroscleróticas** das artérias, o dermatan-sulfato pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Em vários tipos de **artrite**, os proteoglicanos podem atuar como **autoantígenos**, contribuindo para as manifestações patológicas dessas doenças. A quantidade de condroitina-sulfato na cartilagem diminui de acordo com a idade, e as quantidades de queratano-sulfato e de ácido hialurônico aumentam. Essas mudanças podem contribuir para o desenvolvimento da **osteoartrite**, assim como a atividade aumentada da enzima agreganase, que atua na degradação do agregano. São também observadas alterações nas quantidades de determinados GAGs da pele no **envelhecimento**, o que ajuda a explicar as modificações características observadas nesse órgão nos idosos.

Nos últimos anos, ficou claro que além do seu papel estrutural na MEC, os proteoglicanos atuam como moléculas sinalizadoras que influenciam o comportamento celular, sendo que, atualmente, acredita-se que eles desempenhem um importante papel em diversas doenças, como fibrose, doença cardiovascular e câncer.

O OSSO É UM TECIDO CONECTIVO MINERALIZADO

O osso contém materiais **orgânicos** e **inorgânicos**. A matéria **orgânica** consiste principalmente em **proteína**. A **Tabela 50-9** fornece uma lista das principais proteínas do osso; o **colágeno tipo I** é a principal proteína, representando 90 a 95% do material orgânico. O colágeno tipo V também está presente em quantidades pequenas, assim como várias proteínas não colágeno, algumas delas relativamente específicas do osso. O componente **inorgânico** ou mineral consiste principalmente em **hidroxiapatita** cristalina – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ –, juntamente com sódio, magnésio, carbonato e fluoreto; cerca de 99% do cálcio do corpo estão localizados no osso (ver Capítulo 44). A hidroxiapatita confere ao osso a força e a resistência necessárias para suas funções fisiológicas.

O osso é uma **estrutura dinâmica** que sofre ciclos contínuos de remodelagem, os quais consistem em reabsorção, seguida de deposição de novo tecido ósseo. Essa remodelagem permite ao osso se adaptar a sinais físicos (p. ex., aumento na sustentação do peso) e hormonais.

TABELA 50-9 Principais proteínas encontradas no osso^a

Proteínas	Comentários
Colágenos	
Colágeno tipo I	Cerca de 90% das proteínas ósseas totais; formado por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$
Colágeno tipo V	Componente menor
Proteínas não colágeno	
Proteínas plasmáticas	Mistura de várias proteínas plasmáticas
Proteoglicanos ^b CS-PG I (biglicano)	Contêm duas cadeias de GAG; encontrados em outros tecidos
CS-PG II (decorina)	Contém uma cadeia de GAG; encontrado em outros tecidos
CS-PG III	Específica do osso
Proteína SPARC ^c óssea (osteonectina)	Não específica do osso
Osteocalcina (proteína Gla óssea)	Contém resíduos de γ -carboxiglutamato (Gla) que se ligam à hidroxiapatita; específica do osso
Osteopontina	Não específica do osso; glicosilada e fosforilada
Sialoproteína óssea	Específica do osso; acentuadamente glicosilada e sulfatada na tirosina
Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs)	Família de proteínas secretadas (oito ou mais) com várias ações sobre o osso; muitas induzem o crescimento de osso ectópico
Osteoprotegerina	Inibe a osteoclastogênese

^aVárias funções têm sido atribuídas às proteínas não colágeno, inclusive na mineralização; todavia, a maioria dessas funções ainda é especulativa. Considera-se improvável que as proteínas não colágeno que não são específicas do osso possam desempenhar um papel essencial na mineralização. Várias outras proteínas também estão presentes no osso, incluindo a proteína ácida da matriz rica em tirosina (TRAMP), alguns fatores de crescimento (p. ex., TGF- β) e enzimas envolvidas na síntese do colágeno (p. ex., lisil-oxidase).

^bCS-PG, condroitina-sulfato-proteoglicano; esses compostos se assemelham aos dermatan-sulfato-PGs (DS-PGs) da cartilagem (Tabela 50-9).

^cSPARC, proteína ácida secretada e rica em cisteína.

Os principais tipos de células envolvidas na reabsorção e na deposição ósseas são os **osteoclastos** e os **osteoblastos**, respectivamente (**Figura 50-13**). Os **osteócitos** são encontrados no osso maduro e também estão envolvidos na manutenção da matriz óssea. Eles são descendentes dos osteoblastos e têm meia-vida bastante longa, em média 25 anos.

Os **osteoclastos** são células multinucleadas que se originam de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Eles possuem um domínio na membrana apical, exibindo uma borda ondulada que desempenha um papel fundamental na reabsorção óssea (**Figura 50-14**). Uma **ATPase** translocadora de prótons expelle os prótons através da borda ondulada para dentro da área de reabsorção, que é o microambiente de pH baixo ilustrado na figura. Isso reduz o pH local para 4,0 ou menos, aumentando a solubilidade da hidroxiapatita e auxiliando em sua quebra em Ca^{2+} , H_3PO_4 e H_2CO_3 e água, permitindo que ocorra a desmineralização. As proteases ácidas lisossomais como as catepsinas também são liberadas e digerem as proteínas de matriz que agora estão acessíveis.

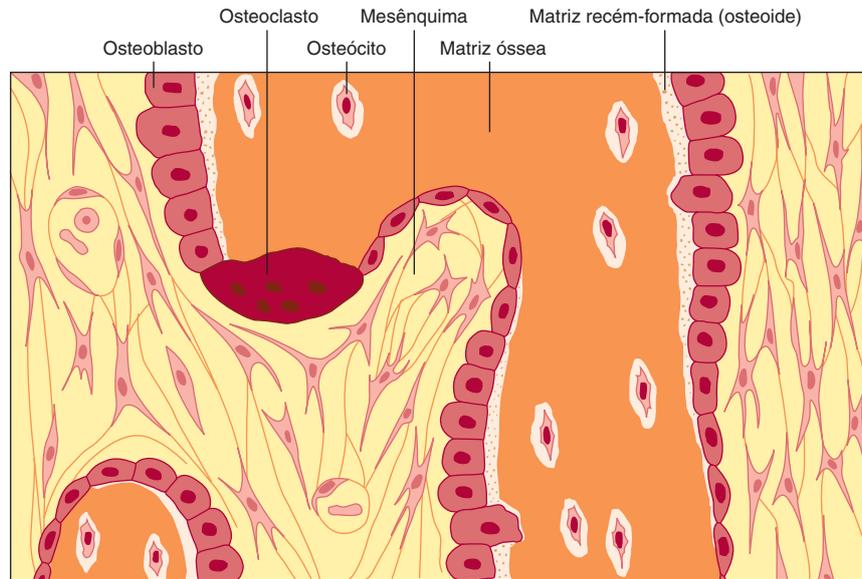


FIGURA 50-13 Ilustração esquemática das principais células presentes no osso membranoso. Os osteoblastos (cor mais clara) sintetizam colágeno tipo I, que forma uma matriz que retém as células. À medida que isso ocorre, os osteoblastos diferenciam-se gradualmente em osteócitos. (Reproduzida, com permissão, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas*, 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

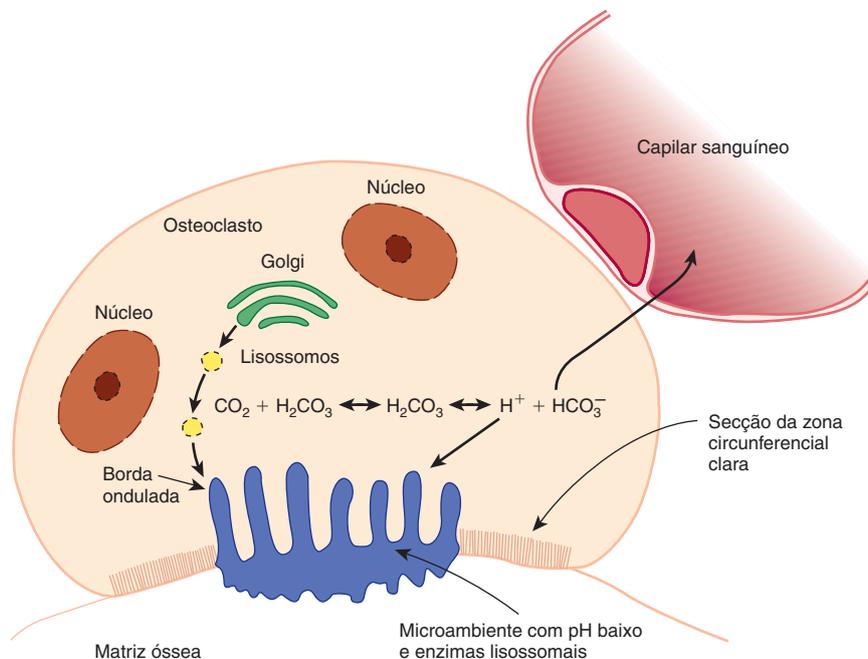


FIGURA 50-14 Ilustração esquemática de alguns aspectos da função do osteoclasto na reabsorção óssea. As enzimas lisossomais e os íons hidrogênio são liberados no microambiente confinado, criado pela fixação entre a matriz óssea e a zona periférica clara do osteoclasto. A acidificação desse espaço confinado facilita a dissolução do fosfato de cálcio do osso e constitui o pH ideal para a atividade das hidrolases lisossomais. Dessa maneira, a matriz óssea é removida, e os produtos da reabsorção óssea são captados no citoplasma do osteoclasto, provavelmente digeridos e transferidos para os capilares. A equação química apresentada refere-se à ação da anidrase carbônica II, descrita no texto. (Reproduzida, com permissão, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas*, 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

Os **osteoblastos** – células mononucleares que derivam de precursores mesenquimais pluripotentes – sintetizam a maior parte das proteínas encontradas no osso (Tabela 50-9), bem como vários fatores de crescimento e citocinas. Essas células são responsáveis pela deposição de nova matriz óssea (osteóide) e pela sua mineralização subsequente. Os osteoblastos **controlam a mineralização**, regulando a passagem de íons cálcio e fosfato através das membranas celulares. A **fosfatase alcalina**, uma enzima da membrana celular, gera íons fosfato a partir de fosfatos orgânicos. Os mecanismos envolvidos na mineralização ainda não estão totalmente elucidados, porém diversos fatores foram implicados. A fosfatase alcalina contribui para a mineralização, mas não é suficiente isoladamente. Também se acredita que as pequenas vesículas (vesículas da matriz) que contêm cálcio e fosfato e são formadas a partir do brotamento da membrana do osteoblasto desempenhem uma função. Além disso, o **colágeno tipo I** parece ser necessário, sendo a mineralização a primeira evidência nos intervalos entre as sucessivas moléculas. As **fosfoproteínas ácidas**, como a **sialoproteína** e a **osteopontina óssea**, podem atuar como sítios de nucleação. Essas proteínas contêm sequências RGD para ligação celular e motivos (p. ex., sequências poli-Asp e poli-Glu) que se ligam ao cálcio e podem fornecer estrutura inicial para o processo de mineralização. Algumas macromoléculas, como certos proteoglicanos e glicoproteínas, também podem atuar como **inibidores** da nucleação.

Estima-se que cerca de 4% do osso compacto sejam **renovados anualmente** no adulto saudável típico, ao passo que ocorre reposição de cerca de 20% do osso trabecular (osso menos denso encontrado nas extremidades dos ossos longos, próximo às articulações).

Muitos fatores estão envolvidos na **regulação do metabolismo ósseo**. Alguns **estimulam os osteoblastos** (p. ex., paratormônio e 1,25-di-hidroxicolecalciferol [ver Capítulo 44]), e outros os **inibem** (p. ex., corticosteroides). O paratormônio e o 1,25-di-hidroxicolecalciferol também estimulam os osteoclastos, e a calcitonina e os estrogênios inibem essas células.

O OSSO É AFETADO POR MUITOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS E GENÉTICOS

A **Tabela 50-10** fornece uma lista de vários dos exemplos mais importantes de distúrbios metabólicos e genéticos que afetam o osso.

A **osteogênese imperfeita** (ossos quebradiços) caracteriza-se por fragilidade anormal dos ossos. Com frequência, as escleras estão anormalmente finas e translúcidas, podendo parecer azuladas em virtude da deficiência de tecido conectivo. Foram identificados **oito tipos** (I a VIII) dessa condição. Os tipos I a IV são causados por mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* ou em ambos. O tipo I é brando, porém, o tipo II é grave, e bebês nascidos com essa condição geralmente não sobrevivem. Mais de 100 mutações desses dois genes foram documentadas e incluem deleções parciais dos genes e duplicações. Outras mutações afetam o *splicing* do RNA, e o tipo mais frequente resulta na **substituição da glicina** por outro aminoácido mais volumoso, afetando a formação da tripla-hélice. Em geral, essas mutações resultam em expressão diminuída do colágeno ou em cadeias pró estruturalmente anormais, que se reúnem em **fibrilas anormais**, enfraquecendo a estrutura global do osso. Quando uma cadeia anormal está presente, ela pode interagir com duas cadeias normais, porém o dobramento pode ser impedido, resultando em degradação enzimática de todas as cadeias. Esse processo é denominado “**suicídio do pró-colágeno**” e fornece um exemplo de mutação negativa dominante, resultado frequentemente observado quando uma proteína consiste em múltiplas subunidades diferentes. Os tipos V a VIII são menos comuns e são causados por mutações nos genes que codificam as proteínas envolvidas na mineralização óssea que não a do colágeno.

A **osteopetrose** (doença dos ossos de mármore), caracterizada por **densidade óssea aumentada**, é uma condição rara caracterizada pela incapacidade de reabsorção óssea. Uma

TABELA 50-10 Algumas doenças metabólicas e genéticas que afetam o osso e a cartilagem

Condição	Causas	Condição	Causas
Nanismo	Muitas vezes, deficiência do hormônio do crescimento, porém apresenta muitas outras causas	Osteoporose	Relacionada à idade, deficiência de estrogênio pós-menopausa, mutações em genes que afetam o metabolismo ósseo, ^a incluindo o receptor da vitamina D (<i>VDR</i>), o receptor do estrogênio α (<i>ER-α</i>) e o <i>COL1A1</i>
Raquitismo	Deficiência de vitamina D na infância	Osteoartrite	Degeneração da cartilagem relacionada à idade, mutações em vários genes, ^a incluindo <i>VDR</i> , <i>ER-α</i> e <i>COL2A1</i>
Osteomalácia	Deficiência de vitamina D em adultos	Condrodisplasias	Mutações em <i>COL2A1</i>
Hiperparatireoidismo	Excesso de paratormônio causando reabsorção óssea	Síndromes de Pfeiffer, Jackson-Weiss e Crouzon ^b	Mutações no gene do receptor do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR) 1 e/ou 2
Osteogênese imperfeita	Mutações em <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> , afetando a síntese e a estrutura do colágeno	Acondroplasia e displasia tanatofórica ^c	Mutação no gene para FGFR3

^aApenas um pequeno número de casos.

^bNas síndromes de Pfeiffer, Jackson-Weiss e Crouzon, ocorre fusão prematura de alguns ossos do crânio (craniossinostose).

^cA displasia tanatofórica é a mais comum displasia esquelética letal em recém-nascidos.

forma ocorre juntamente com acidose tubular renal e calcificação cerebral. Ela é causada por mutações do gene (localizado no cromossomo 8q22) que codifica a **anidrase carbônica II (AC II)**, uma das quatro isoenzimas da anidrase carbônica presente nos tecidos humanos. A reação catalisada pela anidrase carbônica é:



Nos osteoclastos envolvidos na reabsorção óssea, a AC II aparentemente fornece prótons para neutralizar os íons OH^- que se encontram dentro da célula quando os íons H^+ são bombeados através das bordas onduladas (ver anteriormente). Dessa forma, **se a atividade da AC II estiver deficiente** nos osteoclastos, não ocorrerá reabsorção óssea normal, com consequente desenvolvimento de osteopetrose. O mecanismo da calcificação cerebral não está bem esclarecido, ao passo que a acidose tubular renal reflete a atividade deficiente da CA II nos túbulos renais.

A **osteoporose** é a redução progressiva e generalizada da massa de tecido ósseo por unidade de volume, causando enfraquecimento do esqueleto. A condição primária tipo 1 ocorre comumente em mulheres após a menopausa, e a osteoporose primária tipo 2 ou senil ocorre em ambos os sexos após os 75 anos, embora seja mais prevalente em mulheres (proporção 2:1 [mulheres:homens]). A proporção entre **elementos minerais e orgânicos** não é alterada no osso normal remanescente. As fraturas de vários ossos, como a cabeça do fêmur, ocorrem com muita facilidade e representam enorme ônus, tanto para os pacientes acometidos quanto para o orçamento de assistência à saúde da sociedade. Entre outros fatores, os **estrogênios** e as citocinas **interleucinas 1 e 6** parecem estar estreitamente envolvidos na etiologia da osteoporose.

OS PRINCIPAIS COMPONENTES DA CARTILAGEM SÃO O COLÁGENO TIPO II E DETERMINADOS PROTEOGLICANOS

As **principais proteínas da cartilagem hialina** (o principal tipo de cartilagem) estão relacionadas na **Tabela 50-11**. O **colágeno tipo II** é a principal proteína (**Figura 50-15**), e vários outros tipos menores de colágeno também estão presentes. Além desses componentes, a cartilagem elástica contém elastina e a cartilagem fibroelástica contém colágeno tipo I. A cartilagem contém diversos **proteoglicanos**, que desempenham um importante papel na sua compressibilidade. O **agrecano** (com cerca de 2×10^3 kDa) é o proteoglicano principal. Conforme ilustrado na **Figura 50-16**, o agrecano apresenta estrutura muito complexa e contém vários GAGs (ácido hialurônico, condroitina-sulfato e queratan-sulfato), bem como proteínas de ligação e proteínas centrais. A proteína central apresenta três domínios: A, B e C. O ácido hialurônico liga-se de modo não covalente ao domínio A da proteína central, bem como à proteína de ligação, que estabiliza as interações entre o hialuronato e a proteína central. As cadeias de queratan-sulfato estão localizadas no domínio B, ao passo que as

TABELA 50-11 Principais proteínas encontradas na cartilagem

Proteínas	Comentários
Proteínas do colágeno	
Colágeno tipo II	90 a 98% do colágeno total da cartilagem articular; composto por três cadeias $\alpha 1(\text{II})$
Colágenos V, VI, IX, X e XI	Ligações cruzadas entre os colágenos tipos IX e II; o tipo XI pode ajudar a controlar o diâmetro das fibrilas tipo II
Proteínas não colágeno	
Proteoglicanos	Principal proteoglicano da cartilagem
Agrecano	Encontrado em alguns tipos de cartilagem
Proteoglicano grande não agregador DS-PG I (biglicano) ^a DS-PG II (decorina)	Semelhante ao CS-PG I do osso Semelhante ao CS-PG II do osso
Condronectina	Pode contribuir para a ligação do colágeno tipo II à superfície da cartilagem
Ancorina C II	Pode ligar o colágeno tipo II à superfície do condrócito

^aAs proteínas centrais do DS-PG I e do DS-PG II são homólogas às do CS-PG I e CS-PG II do osso (Tabela 50-11). Uma possível explicação é o fato de os osteoblastos carecerem da epimerase necessária para converter o ácido glicurônico em ácido idurônico, este último encontrado no dermatan-sulfato.

cadeias de condroitina-sulfato estão situadas no domínio C; ambos os tipos de GAGs estão ligados de forma covalente à proteína central. A proteína central também contém cadeias oligossacarídicas O-ligadas e N-ligadas.

Os outros proteoglicanos encontrados na cartilagem apresentam estruturas mais simples que a do agrecano.

A **condronectina** está envolvida na fixação do colágeno tipo II aos condrócitos (as células na cartilagem).

A cartilagem é um tecido avascular que obtém a maior parte de seus nutrientes a partir do líquido sinovial. Ela apresenta **turnover** lento, porém contínuo. Várias **proteases** (p. ex., collagenases e estromelina) sintetizadas pelos condrócitos podem **degradar o colágeno** e as outras proteínas encontradas na cartilagem. A interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) parecem estimular a produção dessas proteases, e o fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) geralmente exercem influência anabólica sobre a cartilagem.

AS CONDRODISPLASIAS SÃO CAUSADAS POR MUTAÇÕES EM GENES QUE CODIFICAM COLÁGENO TIPO II E RECEPTORES DO FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS

As condrodismplasias constituem um grupo de distúrbios hereditários mistos que acometem a cartilagem. Manifestam-se

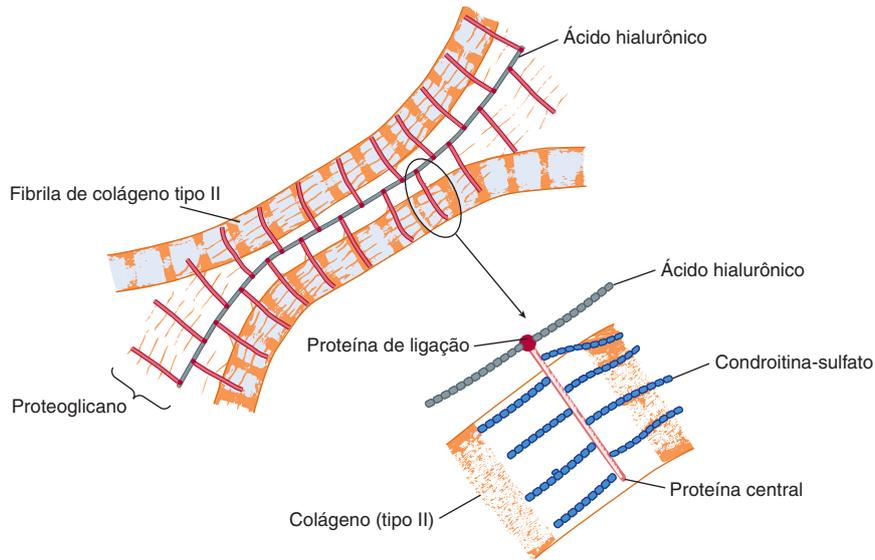


FIGURA 50-15 Representação esquemática da organização molecular da matriz cartilaginosa. As proteínas de ligação ligam, de modo não covalente, a proteína central (em vermelho) dos proteoglicanos às moléculas lineares de ácido hialurônico (em cinza). As cadeias laterais de condroitina-sulfato do proteoglicano ligam-se eletrostaticamente às fibrilas de colágeno, formando uma matriz de ligação cruzada. A marcação oval circunda a área ampliada na parte inferior da figura. (Reproduzida, com permissão, de Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology: Text & Atlas*, 10th ed. McGraw-Hill, 2003.)

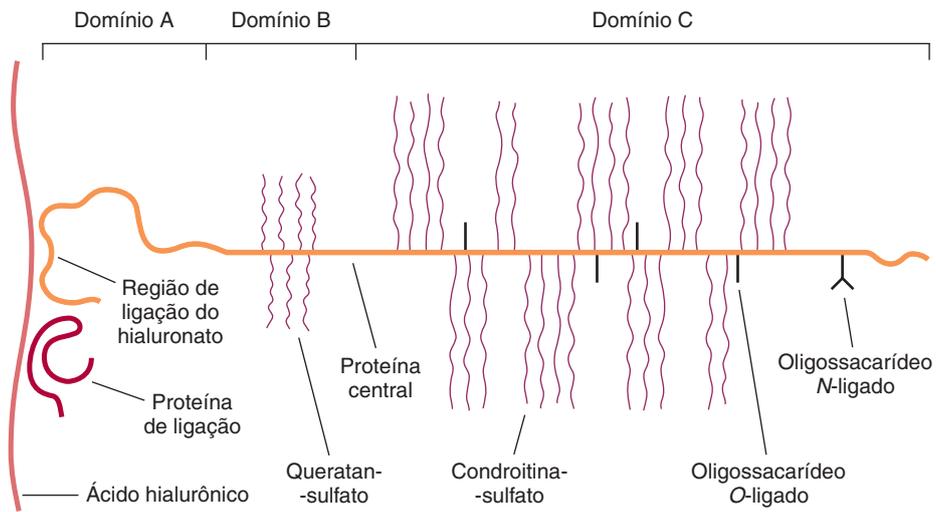


FIGURA 50-16 Ilustração esquemática do agregado de cartilagem nasal bovina. Uma fita de ácido hialurônico está representada à esquerda. A proteína central (cerca de 210 kDa) apresenta três domínios principais. O domínio A, localizado em sua extremidade aminoterminal, interage com cerca de cinco dissacarídeos repetitivos no hialuronato. A proteína de ligação interage com o hialuronato e com o domínio A, estabilizando as suas interações. Cerca de 30 cadeias de queratan-sulfato estão fixadas por meio de ligações GalNAc-Ser ao domínio B. O domínio C contém cerca de 100 cadeias de condroitina-sulfato unidas por ligações Gal-Gal-Xil-Ser e cerca de 40 cadeias oligossacarídicas O-ligadas. Uma ou mais cadeias de glicanos N-ligados também são encontradas próximo à extremidade carboxiterminal da proteína central. (Moran LA, et al.: *Biochemistry*, 2nd ed., © 1994, pp. 9-43. Adaptada, com permissão, de Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ.)

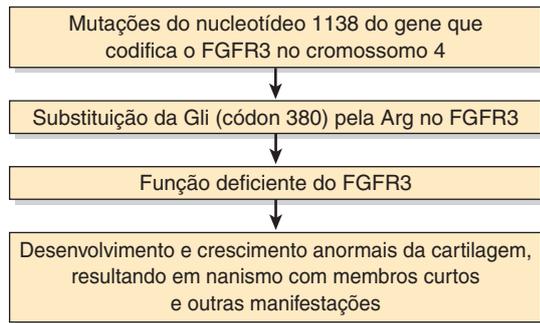


FIGURA 50-17 Esquema simplificado da etiologia da acondroplasia. Na maioria dos casos estudados até hoje, a mutação tem sido uma mudança de G para A no nucleotídeo 1138, resultando na substituição de um resíduo de Gli por um resíduo de Arg no segmento transmembrana do receptor.

por nanismo com membros curtos e numerosas deformidades esqueléticas. Algumas condrodisplasias são causadas por uma variedade de mutações do gene *COL2A1*, levando à produção de formas anormais de colágeno tipo II. Um exemplo é a **síndrome de Stickler**, manifestada pela degeneração da cartilagem articular e do corpo vítreo do olho.

Entre as condrodisplasias, a mais conhecida é a **acondroplasia**, a causa mais comum de **nanismo com membros curtos**. Os indivíduos acometidos possuem membros curtos, tronco de dimensões normais, macrocefalia e várias outras anormalidades esqueléticas. Com frequência, o distúrbio é herdado com caráter autossômico dominante, porém muitos casos são devido a novas mutações. A base molecular da acondroplasia está esquematizada na **Figura 50-17**. A acondroplasia não é um distúrbio do colágeno, porém é causada por mutações do gene que codifica o **receptor do fator de crescimento dos fibroblastos 3 (FGFR3)**. Os **fatores de crescimento dos fibroblastos** compreendem uma família de mais de 20 proteínas que afetam o crescimento e a diferenciação das células de origem mesenquimal e neuroectodérmica. Os seus **receptores** são proteínas transmembrana e constituem um subgrupo da família dos receptores tirosina-cinase. O FGFR3 é membro desse subgrupo e modula as ações do FGF3 na cartilagem. Em quase todos os casos de acondroplasia que foram investigados, foram identificadas mutações envolvendo o nucleotídeo 1138, resultando na substituição da glicina (resíduo número 380) pela arginina no domínio transmembrana da proteína, tornando-a inativa. Esse tipo de mutação não foi encontrado em indivíduos saudáveis.

Curiosamente, outras mutações do mesmo gene podem resultar em **hipocondroplasia**, **displasia tanatofórica** (tipos I e II) (outras formas de nanismo de membros curtos) e **fenótipo SADDAN** (acondroplasia grave com retardo do desenvolvimento e acantose nigricans [esta última consiste em hiperpigmentação castanha a preta da pele]).

Conforme indicado na Tabela 50-10, **outras displasias esqueléticas** (incluindo algumas síndromes de craniossinostose) também são causadas por mutações dos genes que codificam

receptores do FGF. Foi constatado que outro tipo de displasia esquelética, a **displasia diastrófica**, é devido à mutação de um transportador de sulfato.

RESUMO

- Os principais componentes da MEC consistem nas proteínas estruturais colágeno, elastina e fibrilina 1, diversas proteínas especializadas (p. ex., fibronectina e laminina) e vários proteoglicanos.
- O colágeno constitui a proteína mais abundante no reino animal; foram isolados 28 tipos. Todos os colágenos contêm extensões maiores ou menores de tripla-hélice e uma estrutura repetitiva (Gli-X-Y)*n*.
- A biossíntese do colágeno é complexa e caracteriza-se por muitos eventos pós-traducionais, incluindo hidroxilação da prolina e da lisina.
- As doenças associadas à síntese comprometida do colágeno incluem escorbuto, osteogênese imperfeita, síndrome de Ehlers-Danlos (seis subtipos) e doença de Menkes.
- A elastina confere extensibilidade e retração elástica aos tecidos. A elastina carece de hidroxilisina, sequências Gli-X-Y, estrutura helicoidal tripla e açúcares, porém contém ligações cruzadas de desmosina e isodesmosina não encontradas no colágeno.
- A fibrilina 1 localiza-se nas microfibrilas. As mutações do gene que codifica a fibrilina 1 causam a síndrome de Marfan. A citocina TGF-β parece contribuir para a patologia cardiovascular.
- Os glicosaminoglicanos (GAGs) são constituídos de dissacarídeos repetitivos contendo um ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico) ou uma hexose (galactose) e uma hexosamina (galactosamina ou glicosamina). Com frequência, existe também um sulfato.
- Os principais GAGs são o ácido hialurônico, a condroitina-4-sulfato e 6-sulfato, o queratan-sulfato I e II, a heparina, o heparan-sulfato e o dermatan-sulfato.
- Os GAGs são sintetizados pelas ações sequenciais de um conjunto de enzimas específicas (glicosiltransferases, epimerases, sulfotransferases, etc.) e são degradados pela ação sequencial de hidrolases lisossomais. As deficiências genéticas dessas últimas enzimas resultam nas mucopolissacaridoses (p. ex., síndrome de Hurler).
- Os GAGs ocorrem nos tecidos ligados a várias proteínas (proteínas de ligação e proteínas centrais), constituindo os proteoglicanos. Com frequência, essas estruturas apresentam peso molecular muito alto e desempenham muitas funções nos tecidos.
- Muitos componentes da MEC se ligam às proteínas da superfície celular, conhecidas como integrinas; isso constitui uma via pela qual o meio externo da célula pode se comunicar com o meio interno.
- O osso e a cartilagem são formas especializadas de MEC. O colágeno tipo I e a hidroxiapatita constituem os principais componentes do osso. O colágeno tipo II e alguns proteoglicanos são os principais constituintes da cartilagem.
- Diversas doenças hereditárias do osso (p. ex., osteogênese imperfeita) e da cartilagem (p. ex., as condrodistrofias) são causadas por mutações nos genes que codificam o colágeno e as proteínas envolvidas na mineralização óssea e na formação da cartilagem.

REFERÊNCIAS

- Baldrige D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B: Signaling pathways in human skeletal dysplasias. *Annu Rev Genomics Human Genet* 2010;11:189.
- Couchman JR: Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Develop Biol* 2010;26:89.
- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. McGrawHill, 2008. (Chapter 357, Heritable Disorders of Connective Tissue; Chapter 355, Lysosomal Storage Diseases; Chapter 326, Osteoarthritis; Chapter 346, Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease; Chapter 349, Paget Disease and Other Dysplasias of Bone).
- Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP: Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007;120:1955.
- Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C: Genetic control of bone formation. *Ann Rev Cell Develop Biol* 2009;25:629.
- Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ: Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 2008;118:421.
- Muiznieks LD, Keeley FW: Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: a fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:866.
- Neufeld EF: From serendipity to therapy. *Annu Rev Biochem* 2011;80. (Describes pioneering work on the causes and treatment of mucopolysaccharidoses.)
- Rowe RG, Weiss SJ: Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell–stroma interface. *Annu Rev Cell Develop Biol* 2009;25:567.
- Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001. (This comprehensive four-volume text and the updated online version [see Chapter 1] contain chapters on disorders of collagen biosynthesis and structure, Marfan syndrome, the mucopolysaccharidoses, achondroplasia, Alport syndrome, and craniosynostosis syndromes.)
- Shoulders MD, Raines RT: Collagen structure and stability. *Ann Rev Biochem* 2009;78:929.

Músculo e citoesqueleto

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Entender as características bioquímicas gerais da contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso.
- Conhecer os efeitos biológicos do óxido nítrico (NO).
- Explicar as diferentes necessidades de combustíveis metabólicos para uma corrida de velocidade e para uma maratona.
- Identificar as estruturas gerais e as funções dos principais componentes do citoesqueleto: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários.
- Compreender as bases da hipertermia maligna, das distrofias musculares de Duchenne e de Becker, das cardiomiopatias hereditárias, da síndrome de Hutchinson-Gilford (progéria) e de várias doenças cutâneas devidas à presença de queratinas anormais.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas desempenham um importante papel no **movimento** tanto em nível orgânico (p. ex., músculo esquelético, coração e intestino) quanto em nível celular. Neste capítulo, são descritas as funções de proteínas específicas e de algumas outras moléculas essenciais (p. ex., Ca^{2+}) na **contração muscular**. Também é apresentada uma descrição sucinta das **proteínas do citoesqueleto**.

O conhecimento sobre as bases moleculares de diversas condições que acometem o músculo progrediu muito nos últimos anos. A compreensão sobre a base molecular da **distrofia muscular tipo Duchenne** foi notavelmente ampliada quando se **descobriu** que a causa residia em mutações no gene que codifica a distrofina. Houve também progresso significativo na compreensão sobre a base molecular da **hipertermia maligna**, uma grave complicação que ocorre em alguns pacientes submetidos a certos tipos de anestesia. A **insuficiência cardíaca** é uma condição clínica muito comum, que apresenta várias causas; o seu tratamento equilibrado exige a compreensão da bioquímica do músculo cardíaco. As **cardiomiopatias** constituem um grupo de afecções que causam insuficiência cardíaca, algumas delas geneticamente determinadas. Constatou-se que o NO é um importante regulador do tônus do músculo liso. Muitos **vasodilatadores** amplamente utilizados – como a nitroglicerina, empregada no tratamento da angina de peito – atuam aumentando a formação de NO. O músculo, em parte devido à sua massa, desempenha funções importantes no **metabolismo global** do corpo.

O MÚSCULO É UM TRANSDUTOR DE ENERGIA QUÍMICA EM ENERGIA MECÂNICA

O músculo é o principal **transdutor** (máquina) bioquímico que converte a energia potencial (química) em energia cinética (mecânica). O músculo, maior tecido individualizado do corpo humano, constitui pouco menos de 25% da massa corporal ao nascimento, mais de 40% no adulto jovem e pouco menos de 30% no adulto idoso. Serão discutidos certos aspectos dos três tipos de músculos encontrados nos vertebrados: **esquelético, cardíaco e liso**. Tanto o músculo esquelético quanto o cardíaco exibem aparência **estriada** ao exame microscópico; o músculo liso **não é estriado**. Embora o músculo esquelético esteja sob controle nervoso voluntário, o controle dos músculos cardíaco e liso é involuntário.

O sarcoplasma das células musculares contém ATP, creatina-fosfato e enzimas glicolíticas

O músculo estriado é composto por fibras musculares multinucleadas, circundadas por uma membrana plasmática eletricamente excitável, o **sarcolema**. Uma fibra muscular individual, que pode se estender por todo o comprimento do músculo, contém um feixe constituído de numerosas **miofibrilas** dispostas paralelamente, embebidas no líquido intracelular, denominado **sarcoplasma**. Nesse líquido, há glicogênio, os compostos de alta energia ATP e creatina-fosfato e enzimas da glicólise.

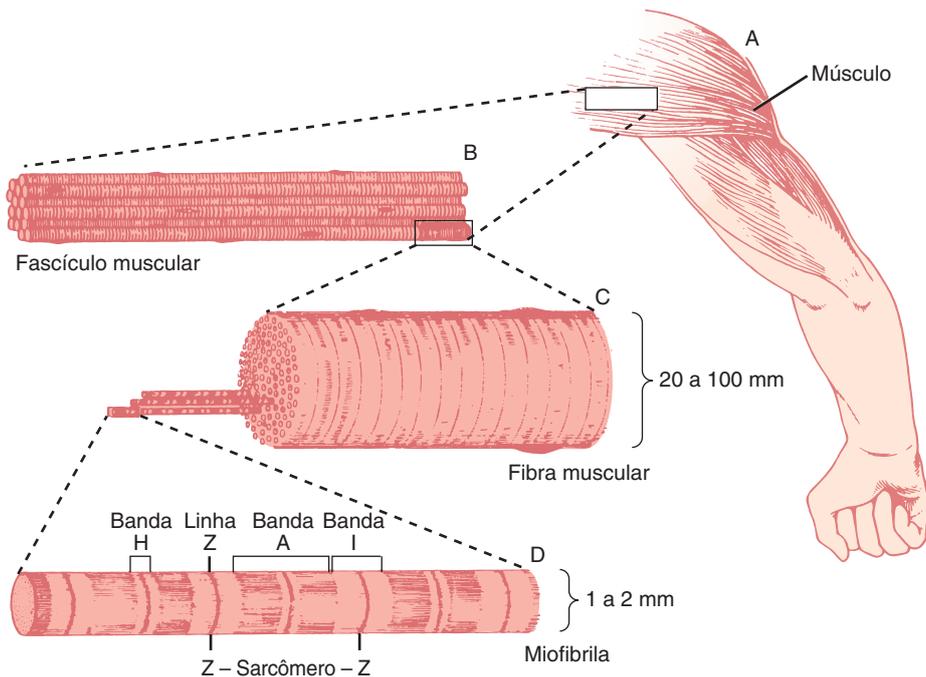


FIGURA 51-1 Estrutura do músculo voluntário. O sarcômero é a região localizada entre as linhas Z. (Desenho de Sylvia Colard Keene. Reproduzido, com permissão, de Bloom W, Fawcett DW: *A Textbook of Histology*, 10th ed. Saunders, 1975.)

O sarcômero é a unidade funcional do músculo

A **Figura 51-1** apresenta uma visão global do músculo voluntário em vários níveis de organização.

Quando a **miofibrila** é examinada por microscopia eletrônica, são observadas bandas alternadas escuras e claras (bandas anisotrópicas, que são birrefringentes na luz polarizada, e bandas isotrópicas, que não se alteram com a luz polarizada). Por conseguinte, essas bandas são designadas como **bandas A** e **I**, respectivamente. A região central da banda A (a banda H) aparece menos densa que o resto dela. A banda I é dividida por uma **linha Z** muito densa e estreita (**Figura 51-2**).

O **sarcômero** é definido como a região compreendida entre duas linhas Z (**Figuras 51-1** e **51-2**) que se repete ao longo do eixo de uma fibrila, a distâncias de 1.500 a 2.300 nm, dependendo do estado de contração.

A aparência **estriada** dos músculos voluntário e cardíaco em estudos com microscopia óptica resulta de seu alto grau de organização, em que a maior parte das fibras musculares se encontra alinhada, de modo que seus sarcômeros ficam em registro paralelo (**Figura 51-1**).

Os filamentos grossos contêm miosina; os filamentos finos contêm actina, tropomiosina e troponina

Quando examinadas por microscopia eletrônica, as **miofibrilas** aparecem constituídas de dois tipos de filamentos longitudinais. Um tipo, o **filamento grosso**, confinado à banda A, contém principalmente a proteína miosina. Esses filamentos medem cerca de 16 nm de diâmetro e, em secção transversal,

dispõem-se em arranjo hexagonal (**Figura 51-2**; centro, secção transversal à direita).

O **filamento fino** (com cerca de 7 nm de diâmetro) localiza-se na banda I e estende-se para dentro da banda A, porém sem alcançar a sua zona H (**Figura 51-2**). Os filamentos finos contêm as proteínas actina, tropomiosina e troponina (**Figura 51-3**). Na banda A, os filamentos finos estão dispostos em torno do filamento grosso (de miosina), formando um arranjo hexagonal secundário. Cada filamento fino situa-se simetricamente entre três filamentos grossos (**Figura 51-2**; centro, corte transversal central), e cada filamento grosso é circundado secção simetricamente por seis filamentos finos.

Os filamentos grossos e finos interagem por meio de **ligações cruzadas** que emergem a intervalos de 14 nm ao longo dos filamentos grossos. Conforme ilustrado na **Figura 51-2**, as ligações cruzadas (desenhadas, em cada extremidade dos filamentos de miosina, como pontas de setas que, no desenho, não se estendem totalmente pelos filamentos finos) apresentam polaridades opostas nas duas extremidades dos filamentos grossos. Os dois polos dos filamentos grossos são separados por um segmento de 150 nm (a banda M, não indicada na figura) que carece de projeções.

O modelo de deslizamento de filamentos com ligações cruzadas constitui o fundamento do pensamento atual acerca da contração muscular

Esse modelo foi proposto independentemente na década de 1950 por Henry Huxley e Andrew Huxley e colaboradores. O modelo baseou-se, em grande parte, em observações

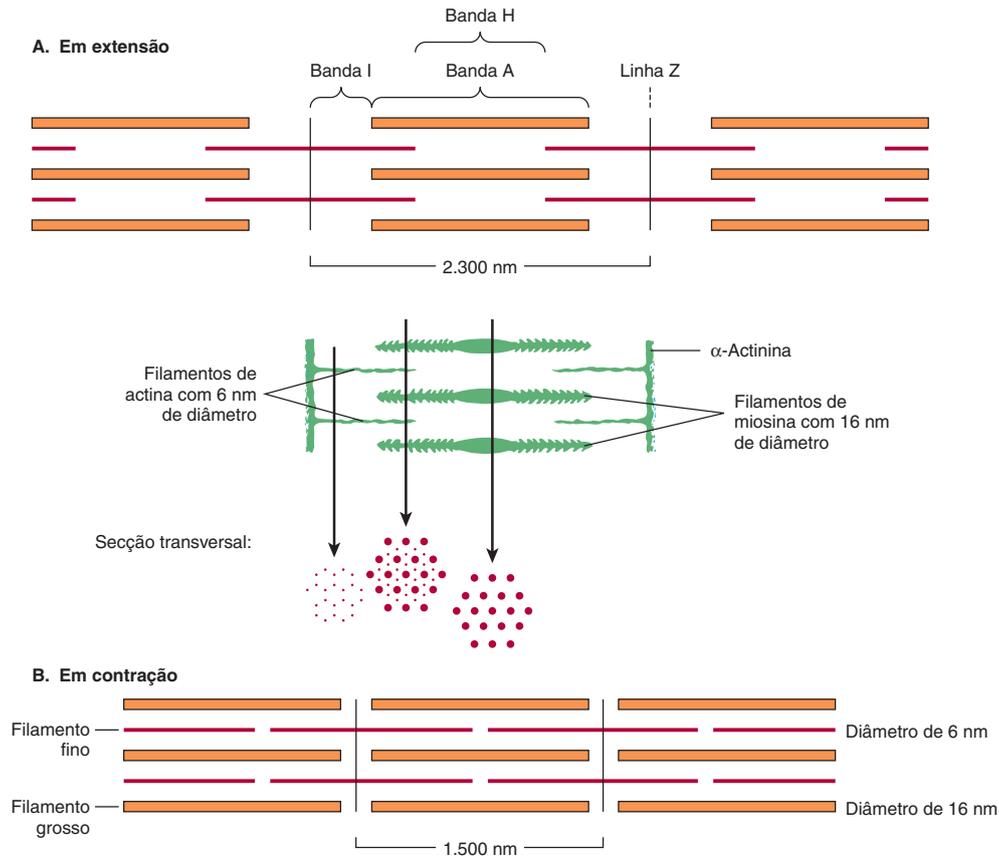


FIGURA 51-2 Arranjo dos filamentos no músculo estriado. (A) Em extensão. São mostradas as posições das bandas I, A e H no estado de extensão. Os filamentos finos sobrepõem-se parcialmente às extremidades dos filamentos grossos, e os filamentos finos estão ancorados nas linhas Z (frequentemente denominadas discos Z). Na parte inferior da Figura 51-2A, há “pontas de setas” que se originam dos filamentos de miosina (espessos) e apontam em direções opostas. A figura mostra quatro filamentos de actina (finos) ligados a duas linhas Z por meio da α -actinina. A região central dos três filamentos de miosina, que carece de pontas de setas, é denominada banda M (não indicada). São mostradas seções transversais feitas através das bandas M, em uma área onde os filamentos de miosina e de actina se sobrepõem e em uma área na qual estão presentes apenas filamentos de actina. **(B)** Em contração. Pode-se observar que os filamentos de actina deslizaram um em direção ao outro ao longo das fibras de miosina. Não houve mudança nos comprimentos dos filamentos grossos (indicados pelas bandas A) e dos filamentos finos (distância entre as linhas Z e as bordas adjacentes das bandas H). Entretanto, houve redução no comprimento dos sarcômeros (de 2.300 para 1.500 nm), e os comprimentos das bandas H e I também diminuíram, devido à sobreposição entre os filamentos grossos e finos. Essas observações morfológicas forneceram parte da base para o modelo da contração muscular por deslizamento de filamentos.

morfológicas cuidadosas de músculos em repouso, em extensão e em contração. Basicamente, quando o músculo se contrai, não há alteração nos comprimentos dos filamentos grossos e finos, porém as zonas H e as bandas I se encurtam (ver legenda da Figura 51-2). Portanto, os arranjos de filamentos interdigitados devem **deslizar uns sobre os outros** durante a contração. As **ligações cruzadas** que ligam os filamentos grossos e finos em certos estágios do ciclo da contração geram e sustentam a tensão. A tensão desenvolvida durante a contração muscular é proporcional à sobreposição dos filamentos e à quantidade de ligações cruzadas. Cada cabeça da ligação cruzada está conectada ao filamento grosso por meio de um segmento fibroso flexível, que pode se projetar para fora do filamento grosso. Esse segmento flexível facilita o contato entre a cabeça da ligação cruzada e o filamento fino quando necessário, embora seja maleável o suficiente para se acomodar no espaço entre os filamentos.

A ACTINA E A MIOSINA SÃO AS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO MÚSCULO

A massa de um músculo é constituída de 75% de água e de mais de 20% de proteína. As duas principais proteínas são a actina e a miosina.

A **actina G** monomérica (43 kDa; G, globular) constitui em até 25% da proteína muscular em peso. Na força iônica fisiológica e na presença de Mg^{2+} , a actina G sofre polimerização não covalente, formando um filamento insolúvel em dupla-hélice, denominado actina F (Figura 51-3). A fibra de **actina F** tem de 6 a 7 nm de espessura e apresenta um passo ou uma estrutura repetida a cada 35,5 nm.

As **miosinas** constituem uma família de proteínas, e pelo menos 12 classes já foram identificadas no genoma humano.

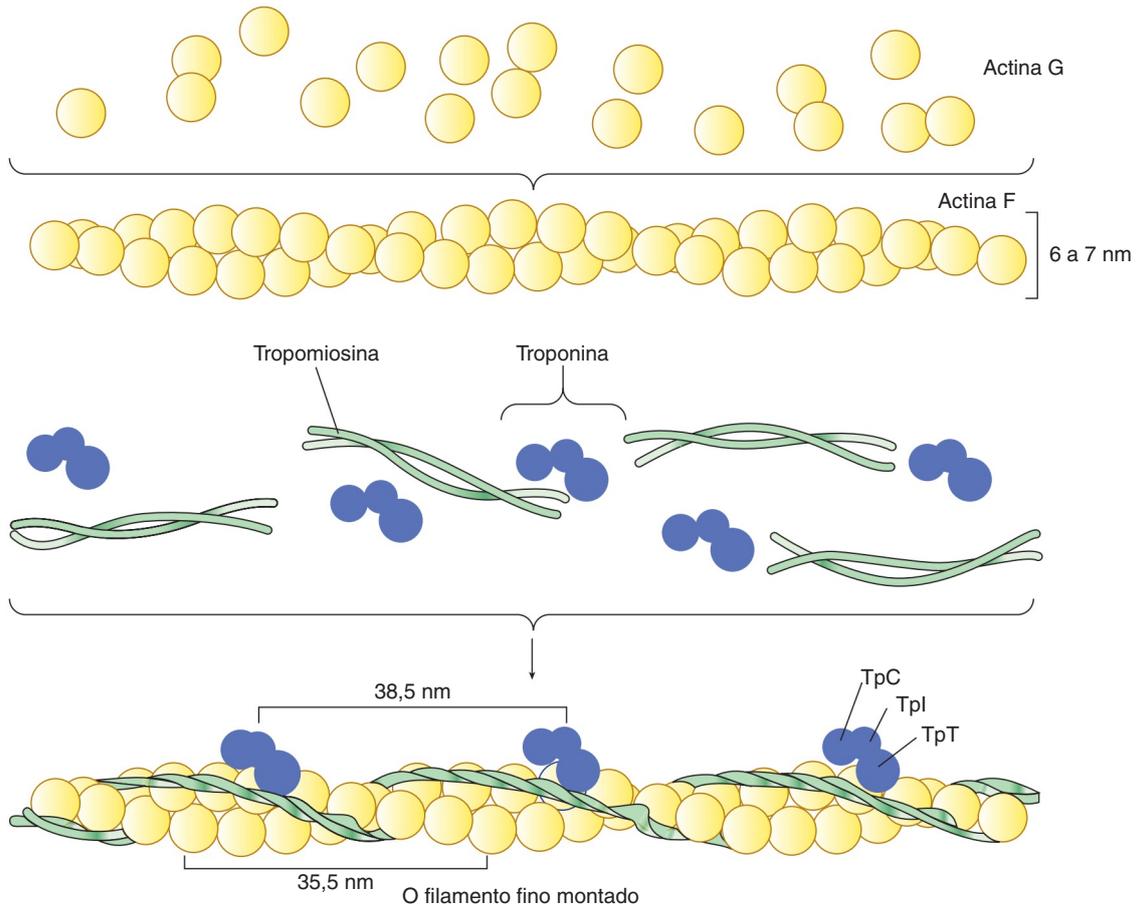


FIGURA 51-3 Representação esquemática do filamento fino, mostrando a configuração espacial de suas três principais proteínas componentes: a actina, a troponina e a tropomiosina. O painel superior mostra as moléculas individuais de actina G. O painel do meio mostra os monômeros de actina montados na actina F. As moléculas individuais de tropomiosina (dois feixes entrelaçados) e de troponina (composta por suas três subunidades) também são mostradas. O painel inferior mostra o filamento fino montado, que consiste em actina F, tropomiosina e três subunidades da troponina (TpC, Tpl e TpT).

A miosina discutida neste capítulo é a **miosina II**, e, quando se fala de miosina neste texto, refere-se a essa espécie, a não ser que esteja indicado de outro modo. A miosina I é uma espécie monomérica que se liga às membranas celulares. Ela pode servir de ligação entre os microfilamentos e a membrana celular em certos locais.

A **miosina** contribui com 55% da proteína do músculo em peso e forma os **filamentos grossos**. Trata-se de um hexâmero assimétrico, com massa molecular de aproximadamente 460 kDa. A miosina tem cauda fibrosa, que consiste em duas hélices entrelaçadas. Cada hélice apresenta uma porção constituída de uma cabeça globular fixada em uma das extremidades (Figura 51-4). O hexâmero consiste em um par de **cadeias pesadas** (H [do inglês, *heavy*]), cada uma com massa molecular de aproximadamente 200 kDa, e em dois pares de **cadeias leves** (L), cada uma com massa molecular de aproximadamente 20 kDa. As cadeias L diferem entre si, sendo uma delas denominada cadeia leve **essencial** e a outra, cadeia leve **regulatória**. A miosina do músculo esquelético liga-se à actina para formar a **actomiosina** (actina-miosina), e sua atividade intrínseca de ATPase está acentuadamente aumentada nesse complexo. Existem isoformas da

miosina, cuja quantidade pode variar em diferentes situações anatômicas, fisiológicas e patológicas.

As estruturas da actina e da cabeça de miosina foram determinadas por cristalografia de raios X; esses estudos confirmaram vários achados anteriores relacionados às suas estruturas e deram origem a muitas informações novas.

A digestão parcial da miosina com proteases ajudou a elucidar a sua estrutura e função

Quando a miosina é digerida pela **tripsina**, são produzidos dois fragmentos de miosina (meromiosinas). A **meromiosina leve** (LMM) consiste em fibras α -helicoidais insolúveis e agregadas provenientes da cauda da miosina (Figura 51-4). A LMM não exhibe atividade ATPase e não se liga à actina F.

A **meromiosina pesada** (HMM; massa molecular de cerca de 340 kDa) é uma proteína solúvel com uma porção fibrosa e uma porção globular (Figura 51-4). Ela apresenta atividade ATPase e liga-se à actina F. A digestão da HMM com **papaína** gera dois subfragmentos, o S-1 e o S-2. O fragmento S-2 é de natureza fibrosa, carece de atividade ATPase e não se liga à actina F.

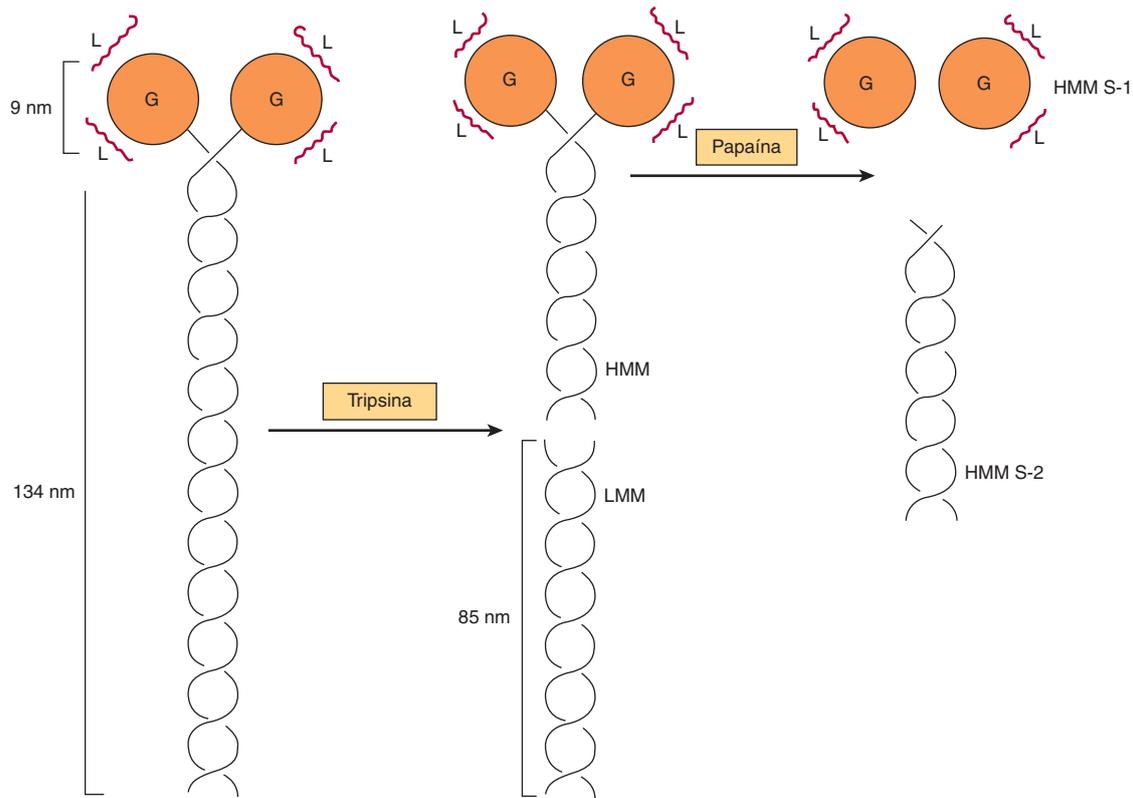


FIGURA 51-4 Diagrama de uma molécula de miosina, mostrando as duas α -hélices entrelaçadas (porção fibrosa), a região globular ou da cabeça (G), as cadeias leves (L) e os efeitos da clivagem proteolítica pela tripsina e pela papaína. A região globular (cabeça da miosina) contém um sítio de ligação da actina e um sítio de ligação de cadeias L e fixa-se também ao restante da molécula de miosina.

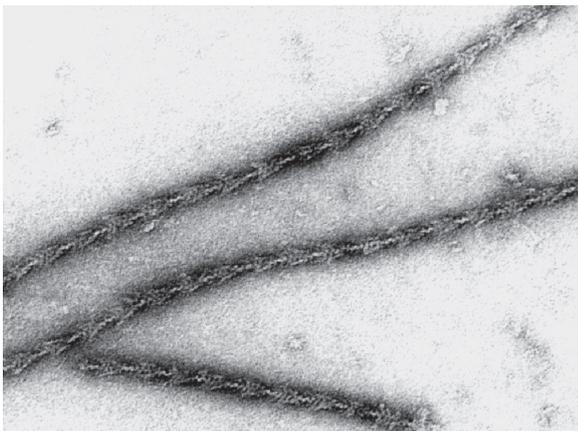


FIGURA 51-5 Decoração dos filamentos de actina com fragmentos S-1 da miosina, formando as "pontas de seta". (Cortesia de JA Spudich.)

O fragmento S-1 (massa molecular de cerca de 115 kDa) exibe atividade ATPase, liga-se às cadeias L e, na ausência de ATP, liga-se à actina e decora-a com "pontas de seta" (Figura 51-5). Tanto o fragmento S-1 quanto a HMM exibem atividade ATPase, que é acelerada em 100 a 200 vezes devido à formação de um complexo com a actina F. Conforme discutido adiante, a actina F acelera acentuadamente a velocidade em que a miosina ATPase libera seus produtos, o ADP e o P_i .

Assim, embora a actina F não afete a etapa de hidrólise em si, a sua capacidade de **promover a liberação** dos produtos gerados pela atividade ATPase acelera intensamente a velocidade global da catálise.

A CONTRAÇÃO MUSCULAR É ACIONADA POR MUDANÇAS NA CONFORMAÇÃO DA CABEÇA DA MIOSINA

Como a hidrólise do ATP pode produzir um movimento macroscópico? A contração muscular consiste essencialmente em **associações e dissociações** cíclicas da cabeça S-1 da miosina com os filamentos de actina F. Esse processo também pode ser descrito como a formação e a ruptura de ligações cruzadas. A fixação da actina à miosina é seguida de **alterações conformacionais** que são particularmente importantes na cabeça S-1 e dependem do tipo de nucleotídeo presente (ADP ou ATP). Essas alterações resultam no **movimento de força**, que aciona o movimento dos filamentos de actina ao longo dos filamentos de miosina. A energia necessária para o movimento de força é suprida, em última análise, pelo ATP, que é hidrolisado formando ADP e P_i . Entretanto, o próprio movimento de força ocorre como resultado de **alterações conformacionais** na cabeça da miosina que ocorrem quando o ADP se dissocia.

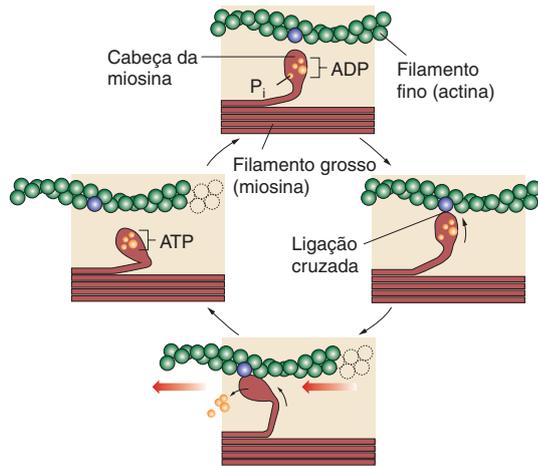


FIGURA 51-6 A hidrólise do ATP aciona o ciclo de associação e dissociação da actina e da miosina em cinco reações, descritas no texto. (Reproduzida, com permissão, de McGraw-Hill Higher Education.)

Os principais eventos bioquímicos que ocorrem durante um ciclo de contração e relaxamento muscular podem ser representados pelas cinco etapas ilustradas na **Figura 51-6**:

1. Na **fase de relaxamento** da contração muscular, a cabeça S-1 da miosina hidrolisa o ATP formando ADP e P_i , no entanto esses produtos permanecem ligados. O complexo ADP- P_i -miosina resultante já foi energizado e se encontra na denominada conformação de alta energia.
2. Quando a **contração** do músculo é estimulada (por eventos envolvendo Ca^{2+} , troponina, tropomiosina e actina, que são descritos adiante), a actina torna-se acessível, e a cabeça S-1 da miosina encontra-a, liga-se a ela e forma o complexo actina-miosina-ADP- P_i , conforme indicado.
3. A formação desse complexo **promove a liberação de P_i** , que inicia o movimento de força. Esse processo é seguido da liberação do ADP e acompanhado de uma grande mudança de conformação na cabeça da miosina em relação à sua cauda (**Figura 51-7**), tracionando a actina cerca de 10 nm em direção ao centro do sarcômero. Esse é o **movimento de força**. Nessa etapa, a miosina encontra-se no denominado estado de baixa energia, indicado como actina-miosina.
4. Outra molécula de ATP se liga à cabeça S-1, formando um complexo de actina-miosina-ATP.
5. O complexo miosina-ATP apresenta baixa afinidade pela actina, e a **actina é liberada**. Essa última etapa constitui um componente essencial do relaxamento e depende da ligação do ATP ao complexo de actina-miosina.

Outro ciclo começa com a hidrólise do ATP (etapa 1 da Figura 51-6), produzindo novamente a conformação de alta energia.

Desse modo, a hidrólise do ATP é utilizada para acionar o ciclo, e o real movimento de força é a alteração de conformação da cabeça S-1 que ocorre com a liberação do ADP. As **regiões de dobradiça** da miosina (indicadas como pontos flexíveis em cada extremidade de S-2 na legenda da Figura 51-7) possibilitam a grande amplitude de movimento de S-1, bem como o contato de S-1 com filamentos de actina.

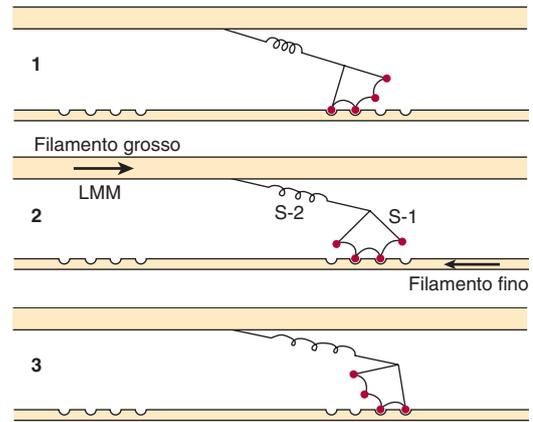


FIGURA 51-7 Representação das ligações cruzadas ativas entre os filamentos grossos e finos. Este diagrama foi adaptado por AF Huxley de HE Huxley: The mechanism of muscular contraction. *Science* 1969;164:1356. Esses autores propuseram que a força envolvida na contração muscular tem origem na tendência da cabeça da miosina (S-1) de sofrer rotação em relação ao filamento fino e é transmitida ao filamento grosso pela porção S-2 da molécula de miosina, que atua como ligação inextensível. Os pontos flexíveis em cada extremidade do segmento S-2 possibilitam a rotação do S-1 e a ocorrência de variações na separação entre os filamentos. Esta figura se baseia na proposta de HE Huxley, mas também incorpora os elementos elásticos (as espirais na porção S-2) e os elementos de encurtamento sequencial (mostrados aqui como quatro sítios de interação entre a porção S-1 e o filamento fino). (Ver Huxley AF, Simmons RM: Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* [Lond] 1971;233:533.) As forças de ligação dos sítios fixados são maiores na posição 2 do que na posição 1 e maiores na posição 3 do que na posição 2. A cabeça da miosina pode desprender-se da posição 3 com a utilização de uma molécula de ATP; esse é o processo predominante observado durante o encurtamento. Verifica-se que a posição da cabeça da miosina varia de cerca de 90° para cerca de 45°, conforme indicado no texto. (S-1, cabeça da miosina; S-2, porção da molécula de miosina; LMM, meromiosina leve) (ver legenda da Figura 49-4). (Reproduzida de Huxley AF: Muscular contraction. *J Physiol* 1974;243:1. Cortesia do autor e do *Journal of Physiology*.)

Se houver **queda dos níveis intracelulares de ATP** (p. ex., após a morte), não haverá ATP disponível para se ligar à cabeça S-1 (etapa 4, anteriormente), a **actina não se dissocia** e não ocorrerá relaxamento (etapa 5). Essa é a explicação para o **rigor mortis**, o enrijecimento do corpo que ocorre após a morte.

Cálculos realizados indicaram que a **eficiência** da contração é de cerca de 50%; a de um motor de combustão interna é de menos de 20%.

A tropomiosina e o complexo de troponina presentes nos filamentos finos desempenham funções essenciais no músculo estriado

No músculo estriado, existem duas outras proteínas de menor relevância em termos de massa, porém importantes em termos de sua função. A **tropomiosina** é uma molécula fibrosa, que consiste em duas cadeias, alfa e beta, que se ligam à actina F no sulco existente entre seus filamentos (Figura 51-3). A tropomiosina é encontrada em todas as estruturas musculares e semelhantes ao músculo. O **complexo de troponina** é exclusivo do músculo estriado e consiste em três polipeptídeos.

A **troponina T** (TpT) liga-se à tropomiosina, bem como aos outros dois componentes da troponina. A **troponina I** (TpI) inibe a interação entre a actina F e a miosina e liga-se também aos outros componentes da troponina. A **troponina C** (TpC) é um polipeptídeo de ligação ao cálcio, que é estrutural e funcionalmente análogo à **calmodulina**, uma importante proteína de ligação ao cálcio amplamente distribuída na natureza. Até quatro moléculas de íons cálcio podem ligar-se a cada molécula de troponina C ou de calmodulina, e ambas apresentam massa molecular de 17 kDa.

O Ca^{2+} desempenha um papel central na regulação da contração muscular

A contração muscular de qualquer origem ocorre pelo mecanismo geral descrito anteriormente. Enquanto músculos de diferentes organismos e de diferentes células e tecidos do mesmo organismo podem apresentar mecanismos moleculares distintos responsáveis pela regulação de sua contração e relaxamento muscular, em todos os sistemas, o Ca^{2+} desempenha um papel crucial. Existem dois mecanismos gerais de **regulação** da contração muscular: com **base na actina** e com **base na miosina**. O primeiro opera nos músculos esquelético e cardíaco, ao passo que o segundo é observado no músculo liso.

A regulação com base na actina ocorre no músculo estriado

A **regulação muscular com base na actina** ocorre nos músculos esquelético e cardíaco dos vertebrados, ambos estriados. No mecanismo geral descrito anteriormente (Figura 51-6), o único fator potencialmente limitante no ciclo de contração muscular poderia ser o ATP. O sistema muscular esquelético é **inibido** em repouso; essa inibição é aliviada para ativar a contração. O inibidor do músculo estriado é o **sistema de troponina**, que está ligado à tropomiosina e à actina F no filamento fino (Figura 51-3). No músculo estriado, não existe controle da contração, a não ser que os sistemas tropomiosina-troponina estejam presentes ao longo dos filamentos de actina e miosina. Conforme descrito anteriormente, a **tropomiosina** é encontrada ao longo do sulco da actina F, e os três componentes da **troponina** – TpT, TpI e TpC – estão ligados ao complexo de actina F-tropomiosina. A TpI impede a ligação da cabeça da miosina a seu sítio de ligação na actina F ao alterar a conformação da actina F por meio das moléculas de tropomiosina ou simplesmente ao rolar a tropomiosina até uma posição capaz de bloquear diretamente os sítios da actina F aos quais se ligam as cabeças de miosina. Qualquer via impede a ativação da miosina ATPase que é mediada pela ligação da cabeça de miosina à actina F. Portanto, o sistema TpI bloqueia o ciclo de contração na etapa 2 da Figura 51-6. Esse bloqueio é responsável pelo **estado inibido** do músculo estriado relaxado.

O retículo sarcoplasmático regula os níveis intracelulares de Ca^{2+} no músculo esquelético

No sarcoplasma do músculo em repouso, a concentração de Ca^{2+} é de 10^{-8} a 10^{-7} mol/L. O estado de repouso é obtido pelo bombeamento de Ca^{2+} para dentro do retículo sarcoplasmático (RS) por meio da ação de um sistema de transporte ativo, denominado Ca^{2+} -ATPase (Figura 51-8), que dá início ao

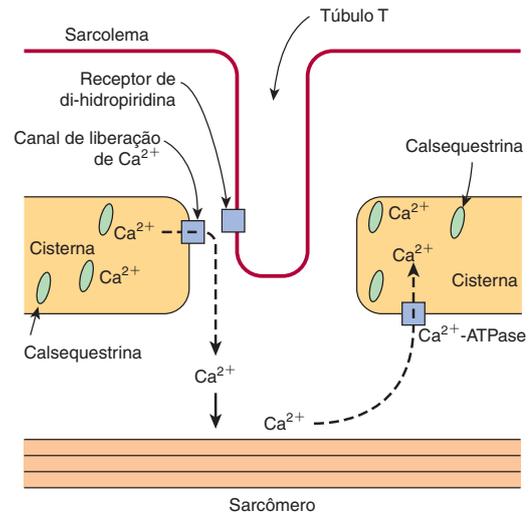


FIGURA 51-8 Diagrama das relações entre o sarcolema (membrana plasmática), um túbulo T e duas cisternas do RS do músculo esquelético (sem escala). O túbulo T estende-se de dentro do sarcolema. Uma onda de despolarização, iniciada por um impulso nervoso, é transmitida do sarcolema pelo túbulo T. Em seguida, é conduzida até o canal de liberação de Ca^{2+} (RYR), talvez pela interação entre esse canal e o receptor de di-hidropiridina (canal de voltagem de Ca^{2+} lento), que são mostrados em estreita proximidade. A liberação de Ca^{2+} a partir do canal de liberação de Ca^{2+} no citosol dá início à contração. Em seguida, o Ca^{2+} é bombeado de volta para dentro das cisternas do RS pela Ca^{2+} -ATPase (bomba de Ca^{2+}), onde é armazenado, em parte ligado à calsequestrina.

relaxamento. O RS consiste em uma rede de sacos membranosos finos. No interior do RS, o Ca^{2+} liga-se a uma proteína específica de ligação de Ca^{2+} , denominada **calsequestrina**. O sarcômero é circundado por uma membrana excitável (o sistema de túbulos T) composta por canais transversos (T) estreitamente associados ao RS.

Quando o sarcolema é excitado por um **impulso nervoso**, o sinal é transmitido ao sistema de túbulos T, e um **canal de liberação de Ca^{2+}** presente no RS adjacente abre-se, liberando Ca^{2+} do RS para o sarcoplasma. A concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma aumenta rapidamente para 10^{-5} mol/L. Os sítios de ligação a Ca^{2+} na TpC no filamento fino são rapidamente ocupados por Ca^{2+} . A TpC- 4Ca^{2+} interage com TpI e TpT, alterando a sua interação com a tropomiosina. Logo, a tropomiosina sai do caminho ou altera a conformação da actina F, de modo que a cabeça da miosina-ADP- P_i (Figura 51-6) possa interagir com a actina F, dando início ao ciclo de contração.

O canal de liberação de Ca^{2+} é também conhecido como **receptor de rianodina** (RYR). Existem duas isoformas desse receptor, RYR1 e RYR2; a primeira é encontrada no músculo esquelético, ao passo que a segunda ocorre no músculo cardíaco e no encéfalo. A **rianodina** é um alcaloide vegetal que se liga especificamente ao RYR1 e ao RYR2 e modula as suas atividades. O canal de liberação de Ca^{2+} é um homotetramero constituído de quatro subunidades de 565 kDa. Apresenta seqüências transmembrana em sua extremidade carboxiterminal, as quais provavelmente formam o canal de Ca^{2+} . O restante da proteína faz protrusão para o interior do citosol, preenchendo a lacuna entre o RS e a membrana de túbulos transversos. O canal é dependente de ligante, com

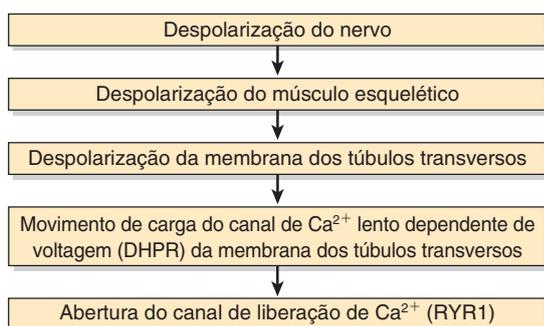


FIGURA 51-9 Possível cadeia de eventos que levam à abertura do canal de liberação de Ca^{2+} . Conforme indicado no texto, constatou-se que o canal de Ca^{2+} dependente de voltagem e o canal de liberação de Ca^{2+} interagem um com o outro *in vitro* através de regiões específicas de suas cadeias polipeptídicas. (DHPR, receptor de di-hidropiridina; RYR1, receptor de rianodina 1.)

atuação sinérgica do Ca^{2+} e do ATP *in vitro*, embora não se tenha esclarecido como ele opera *in vivo*. Uma possível sequência de eventos que leva à abertura do canal é mostrada na **Figura 51-9**. O canal situa-se muito próximo do **receptor de di-hidropiridina (DHPR)**, canal de cálcio dependente de voltagem do sistema de túbulos transversos (Figura 51-8). Experimentos *in vitro* que empregaram cromatografia em coluna de afinidade indicaram que um segmento de 37 aminoácidos no RYR1 interage com uma alça específica do DHPR.

Ocorre **relaxamento** quando o Ca^{2+} sarcoplasmático cai abaixo de 10^{-7} mol/L, devido a seu sequestro no RS pela Ca^{2+} -ATPase. Por conseguinte, a TpC-4Ca^{2+} perde o seu Ca^{2+} . Como consequência, a **troponina**, por meio de sua interação com a tropomiosina, **inibe** qualquer interação adicional da cabeça da miosina com actina F, e, na presença de ATP, a cabeça da miosina separa-se da actina F.

Nessas condições, o Ca^{2+} controla a contração e o relaxamento do músculo esquelético por um mecanismo alostérico mediado por TpC, TpI, TpT, tropomiosina e actina F.

Uma **redução** da concentração de ATP no sarcoplasma (p. ex., por uso excessivo durante o ciclo de contração-relaxamento ou pela redução de sua formação, como a que pode ocorrer na isquemia) tem dois efeitos importantes. (1) A Ca^{2+} -ATPase (bomba de Ca^{2+}) no RS deixa de manter a concentração baixa de Ca^{2+} no sarcoplasma. Como consequência, a interação das cabeças de miosina com a actina F é promovida. (2) A **separação das cabeças de miosina** dependentes de ATP da actina F não pode ocorrer, e a rigidez é estabelecida (contratura). A condição de **rigor mortis**, após a morte, é uma extensão desses eventos.

A contração muscular representa um delicado equilíbrio dinâmico de fixação e separação entre as cabeças de miosina à actina F, sujeita à regulação fina pelo sistema nervoso.

A **Tabela 51-1** fornece um resumo dos eventos globais da contração e do relaxamento do músculo esquelético.

As mutações no gene que codifica o canal de liberação de Ca^{2+} constituem uma causa de hipertermia maligna humana

Alguns pacientes geneticamente predispostos manifestam uma reação grave, denominada **hipertermia maligna (HM)**,

TABELA 51-1 Sequência de eventos na contração e no relaxamento do músculo esquelético

Etapas da contração	
1.	Descarga do neurônio motor
2.	Liberação do transmissor (acetilcolina) na placa motora
3.	Ligação da acetilcolina aos receptores nicotínicos de acetilcolina
4.	Aumento da condutância do Na^{+} e do K^{+} na membrana da placa motora
5.	Geração do potencial de placa motora
6.	Geração de potencial de ação nas fibras musculares
7.	Disseminação da despolarização ao longo dos túbulos T
8.	Liberação de Ca^{2+} das cisternas terminais do retículo sarcoplasmático e sua difusão para os filamentos grossos e finos
9.	Ligação do Ca^{2+} à troponina C, expondo os sítios de ligação da actina à miosina
10.	Formação de ligações cruzadas entre a actina e a miosina e deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos, produzindo encurtamento
Etapas do relaxamento	
1.	Ca^{2+} bombeado de volta para o interior do retículo sarcoplasmático
2.	Liberação de Ca^{2+} da troponina
3.	Cessação da interação entre a actina e a miosina

Fonte: reproduzida, com permissão, de Barrett KE, Barman SM, Boitano S, et al.: *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24th ed. McGraw-Hill, 2012.

devido à exposição a determinados anestésicos (p. ex., halotano) e relaxantes despolarizantes do músculo esquelético (p. ex., succinilcolina). A reação consiste principalmente em rigidez dos músculos esqueléticos, hipermetabolismo e febre alta. Um importante fator na gênese da HM consiste na presença de **elevada concentração citosólica de Ca^{2+}** no músculo esquelético. Se a HM não for reconhecida e tratada imediatamente, os pacientes podem morrer por fibrilação ventricular aguda ou sobreviver para depois sucumbir devido a outras complicações graves. O tratamento apropriado consiste em interromper o anestésico e administrar **dantroleno** por via intravenosa. O dantroleno é um relaxante muscular esquelético que atua ao inibir a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol, impedindo o aumento do Ca^{2+} citosólico observado na HM.

A HM também ocorre em **suínos**. Animais homozigotos suscetíveis à HM respondem ao estresse com uma reação fatal (**síndrome do estresse porcino**) semelhante à exibida em seres humanos. Se ocorrer antes do abate, a reação afeta adversamente a qualidade da carne do porco, resultando em produto inferior. Ambos os eventos podem resultar em consideráveis perdas econômicas para a indústria de suínos.

O achado de que ocorrem níveis citosólicos elevados de Ca^{2+} no músculo na HM sugeriu que a condução poderia ser causada por anormalidades da Ca^{2+} -ATPase ou do **canal de liberação de Ca^{2+}** . Não foi detectada nenhuma anormalidade na primeira; entretanto o sequenciamento de cDNAs para essa última proteína demonstrou ser esclarecedor, particularmente nos suínos. Todos os cDNAs de **suínos** com HM até hoje examinados apresentam substituição de C1843 por T, resultando na substituição de Cis por Arg⁶¹⁵ no canal de liberação de Ca^{2+} . A mutação afeta a função do canal, de modo que ele passa a se abrir mais facilmente e permanecer aberto por mais tempo. O resultado final consiste na liberação maciça de Ca^{2+} no citosol, causando, em última análise, contração muscular sustentada.

O quadro é mais complexo em seres **humanos**, visto que a HM exibe **heterogeneidade genética**. Os membros de várias

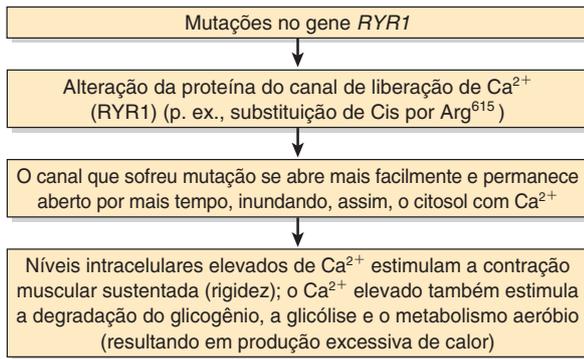


FIGURA 51-10 Esquema simplificado da etiologia da hipertermia maligna (OMIM 145600). Muitas mutações pontuais diferentes foram detectadas no gene *RYR1*, e algumas delas estão associadas à doença do núcleo central (OMIM 117000). Estima-se que pelo menos 50% das famílias com membros que apresentam hipertermia maligna tenham uma ligação com o gene *RYR1*. Também foram detectados alguns indivíduos com mutações no gene que codifica o DHPR; é possível que também sejam encontradas mutações em outros genes para proteínas envolvidas em determinados aspectos do metabolismo muscular.

famílias que sofrem de HM não demonstraram nenhuma ligação genética com o gene *RYR1*. Constatou-se que alguns seres humanos suscetíveis à HM exibem a mesma mutação encontrada nos suínos, ao passo que outros apresentam várias mutações pontuais em diferentes lócus do gene *RYR1*. Descobriu-se que certas famílias com HM apresentam mutações que afetam o DHPR. É possível que as mutações que afetam outras proteínas musculares – como a **calsequestrina 1**, uma proteína de ligação do Ca^{2+} do RS que modula a função do RyR1 – também possam causar HM. A **Figura 51-10** apresenta um resumo da provável cadeia de eventos que ocorre na HM. A perspectiva mais promissora desses achados é que, uma vez detectadas mutações adicionais, será possível proceder à **triagem**, utilizando sondas de DNA apropriadas para indivíduos com risco de desenvolver HM durante a anestesia. Os testes atuais de triagem (p. ex., o teste com cafeína-halotano *in vitro*) são relativamente pouco confiáveis. Os indivíduos acometidos poderiam então receber **anestésicos alternativos**, que não representassem risco de vida. Também deveria ser possível, caso desejado, eliminar a HM das populações de suínos por meio de práticas adequadas de cruzamento.

Outra condição causada por mutações no gene *RYR1* é a **doença do núcleo central**. Trata-se de uma miopatia rara que surge na infância, com hipotonia e fraqueza muscular proximal. A microscopia eletrônica revela ausência de mitocôndrias no centro de numerosas fibras musculares tipo I (ver adiante). A lesão das mitocôndrias, induzida por níveis intracelulares elevados de Ca^{2+} devido ao funcionamento anormal de *RYR1*, parece ser responsável pelos achados morfológicos.

AS MUTAÇÕES NO GENE QUE CODIFICA A DISTROFINA PROVOCAM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Diversas **proteínas adicionais** desempenham vários papéis na estrutura e na função do músculo. Essas proteínas incluem a

TABELA 51-2 Outras proteínas importantes do músculo

Proteína	Localização	Comentário ou função
Titina	Estende-se da linha Z até a linha M	É a maior proteína do corpo; contribui para o relaxamento do músculo
Nebulina	A partir da linha Z, ao longo do comprimento dos filamentos de actina	Pode regular a montagem e o comprimento dos filamentos de actina
α -Actinina	Ancora a actina às linhas Z	Estabiliza os filamentos de actina
Desmina	Situa-se ao longo dos filamentos de actina	Liga-se à membrana plasmática (plasmalema)
Distrofina	Ligada ao plasmalema	Deficiente na distrofia muscular de Duchenne; a ocorrência de mutações de seu gene também pode causar miocardiopatia dilatada
Calcineurina	Citosol	Proteína-fosfatase regulada por calmodulina; pode desempenhar papéis importantes na hipertrofia cardíaca e na regulação da quantidade de fibras de contração lenta e rápida no músculo
Proteína C de ligação à miosina	Distribuição transversal nas bandas A do sarcômero	Liga-se à miosina e à titina; desempenha um papel na manutenção da integridade estrutural do sarcômero

titina (a maior proteína conhecida), a nebulina, a α -actinina, a desmina, a distrofina e a calcineurina. A **Tabela 51-2** traz um resumo de algumas propriedades dessas proteínas.

A **distrofina** é de interesse especial. As mutações no gene que codifica essa proteína constitui a causa da **distrofia muscular de Duchenne** e da **distrofia muscular de Becker**, que é mais branda. Essas mutações também estão implicadas em alguns casos de **cardiomiopatia dilatada** (ver adiante). Como mostra a **Figura 51-11**, a distrofina faz parte de um grande complexo de proteínas que se ligam ao plasmalema ou que interagem com ele. A distrofina liga o citoesqueleto de actina à matriz extracelular e parece ser necessária para a montagem da junção sináptica. Acredita-se que o comprometimento desses processos pela formação de distrofina defeituosa seja crucial na etiologia da distrofia muscular de Duchenne. Certas mutações nos genes que codificam alguns dos componentes do **complexo de sarcoglicano** mostrado na **Figura 51-11** são responsáveis pela distrofia do **cíngulo dos membros** e algumas **outras formas congênitas** de distrofia muscular.

Descobriu-se que mutações que codificam **várias glicosiltransferases** envolvidas na síntese das cadeias de açúcar dos **α -distroglicanos** constituem a causa de certos tipos de **distrofia muscular congênita** (ver Capítulo 46).

O MÚSCULO CARDÍACO ASSEMELHA-SE AO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM MUITOS ASPECTOS

O quadro geral da contração muscular no coração assemelha-se ao do músculo esquelético. O músculo cardíaco, à semelhança

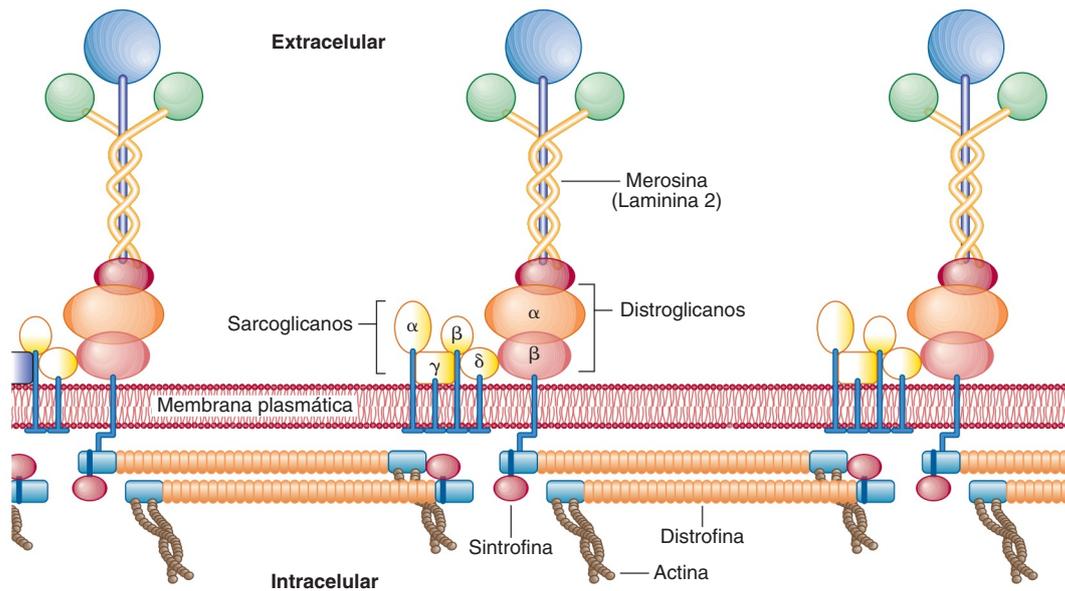


FIGURA 51-11 Organização da distrofina e de outras proteínas em relação à membrana plasmática das células musculares.

A distrofina faz parte de um grande complexo oligomérico associado a vários outros complexos proteicos. O complexo de distroglicano consiste em α -distroglicano, que se associa à merosina, uma proteína da lâmina basal (também denominada laminina 2, ver Capítulo 50), e em β -distroglicano, que se liga ao α -distroglicano e à distrofina. A sintrofina liga-se à extremidade carboxiterminal da distrofina. O complexo de sarcoglicano consiste em quatro proteínas transmembrana: α , β , γ e δ -sarcoglicano. A função do complexo de sarcoglicano e a natureza das interações dentro do complexo e entre ele e outros complexos não estão bem esclarecidas. O complexo de sarcoglicano é formado apenas no músculo estriado, e suas subunidades associam-se preferencialmente entre si, sugerindo que o complexo pode funcionar como uma única unidade. Mutações no gene que codifica a distrofina causam distrofias musculares de Duchenne e de Becker. Constatou-se que a ocorrência de mutações nos genes que codificam os vários sarcoglicanos é responsável pelas distrofias do cingulo dos membros (p. ex., OMIM 604286), ao passo que as mutações nos genes que codificam outras proteínas musculares causam outros tipos de distrofia muscular. As mutações nos genes que codificam determinadas glicosiltransferases envolvidas na síntese das cadeias de glicano do α -distroglicano são responsáveis por certas distrofias musculares congênitas. (Reproduzida, com permissão, de Duggan DJ et al.: Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 1997;336:618. Copyright © 1997 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

do músculo esquelético, é **estriado** e utiliza o sistema de actina-miosina-tropomiosina-troponina, descrito anteriormente. Diferentemente do músculo esquelético, o músculo cardíaco exibe **ritmicidade intrínseca**, e os miócitos individuais comunicam-se uns com os outros em virtude de sua natureza sincicial. O **sistema tubular T** está mais desenvolvido no músculo cardíaco, enquanto o **RS** é menos extenso e, em consequência, apresenta menor suprimento intracelular de Ca^{2+} para a contração. Portanto, o músculo cardíaco depende do Ca^{2+} extracelular para a sua contração; se for privado de Ca^{2+} , o músculo cardíaco isolado para de bater em cerca de 1 minuto, ao passo que o músculo esquelético pode continuar a se contrair por maior período de tempo na ausência de fonte extracelular de Ca^{2+} . O **AMP cíclico** desempenha um papel mais proeminente no músculo cardíaco do que no músculo esquelético. Ele modula os níveis intracelulares de Ca^{2+} por meio da ativação de proteínas-cinase que fosforilam várias proteínas de transporte no sarcolema e no RS. Elas também modulam o complexo regulador troponina-tropomiosina, afetando sua responsividade ao Ca^{2+} intracelular. Existe uma correlação aproximada entre a fosforilação da TpI e o aumento da contração do músculo cardíaco induzido pelas catecolaminas. Isso pode explicar os **efeitos inotrópicos** (aumento da contratilidade) dos compostos β -adrenérgicos sobre o coração. A **Tabela 51-3** exibe um resumo de algumas diferenças entre os músculos esquelético, cardíaco e liso.

O Ca^{2+} entra nos miócitos pelos canais de Ca^{2+} e sai deles via trocador de $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$

Conforme já assinalado, o Ca^{2+} **extracelular** desempenha um importante papel na contração do músculo cardíaco, mas não na contração do músculo esquelético. Isso significa que o Ca^{2+} entra e sai dos miócitos de modo regulado. Serão consideradas, de modo sucinto, três proteínas transmembrana que desempenham um papel nesse processo.

Canais de Ca^{2+}

O Ca^{2+} penetra nos miócitos via canais altamente seletivos. A principal porta de entrada é o canal tipo L (corrente de longa duração, grande condutância) ou canal **lento de Ca^{2+}** , que é dependente de voltagem, abrindo-se durante a despolarização induzida pela propagação do potencial de ação cardíaco e fechando-se quando o potencial de ação declina. Esses canais são equivalentes aos receptores de di-hidropiridina do músculo esquelético (Figura 51-8). Os canais lentos de Ca^{2+} são **regulados** por proteínas-cinase dependentes de cAMP (estimuladoras) e por proteínas-cinase dependentes de cGMP (inibidoras) e são bloqueados pelos denominados bloqueadores dos canais de cálcio (p. ex., verapamil). Os canais **rápidos** (ou T, de transitórios) de Ca^{2+} também estão presentes no plasmalema, embora em quantidades muito menores; esses canais provavelmente contribuem para a fase inicial do aumento do Ca^{2+} mioplasmático.

TABELA 51-3 Algumas diferenças entre os músculos esquelético, cardíaco e liso

Músculo esquelético	Músculo cardíaco	Músculo liso
1. Estriado	1. Estriado	1. Não estriado
2. Sem sincício	2. Sincicial	2. Sincicial
3. Túbulos T pequenos	3. Túbulos T grandes	3. Em geral, túbulos T rudimentares
4. Retículo sarcoplasmático bem desenvolvido e bomba de Ca^{2+} que atua rapidamente	4. Retículo sarcoplasmático presente e bomba de Ca^{2+} que atua de modo relativamente rápido	4. Retículo sarcoplasmático geralmente rudimentar e bomba de Ca^{2+} que atua lentamente
5. O plasmalema contém poucos receptores de hormônios	5. O plasmalema contém uma variedade de receptores (p. ex., α e β -adrenérgicos)	5. O plasmalema contém uma variedade de receptores (p. ex., α e β -adrenérgicos)
6. O impulso nervoso dá início à contração	6. Apresenta ritmicidade intrínseca	6. A contração é iniciada por impulsos nervosos, hormônios, etc.
7. O Ca^{2+} do líquido extracelular não é importante para a contração	7. O Ca^{2+} do líquido extracelular é importante para a contração	7. O Ca^{2+} do líquido extracelular é importante para a contração
8. Presença do sistema de troponina	8. Presença do sistema de troponina	8. Carece de sistema de troponina; utiliza a cabeça reguladora da miosina
9. A caldesmona não está envolvida	9. A caldesmona não está envolvida	9. A caldesmona é uma proteína reguladora importante
10. Ciclos muito rápidos das ligações cruzadas	10. Ciclos relativamente rápidos das ligações cruzadas	10. Ciclos lentos das ligações cruzadas, possibilitando contração lenta e prolongada e menor utilização de ATP

O aumento resultante do Ca^{2+} no mioplasma atua sobre o canal de liberação de Ca^{2+} do RS, induzindo a sua abertura. Esse processo é denominado **liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}** (CICR). Estima-se que aproximadamente 10% do Ca^{2+} envolvido na contração entre no citosol a partir do líquido extracelular, enquanto 90% provém do RS. Entretanto, os primeiros 10% são relevantes, visto que a taxa de aumento de Ca^{2+} no mioplasma é importante, e a entrada pelos canais de Ca^{2+} tem contribuição considerável.

Trocador de Ca^{2+} - Na^{+}

Trata-se da principal via de **saída** de Ca^{2+} dos miócitos. Nos miócitos em repouso, esse trocador ajuda a manter baixo nível intracelular de Ca^{2+} livre, trocando um Ca^{2+} por três Na^{+} . A energia para o movimento contra o gradiente do Ca^{2+} para fora da célula provém do movimento a favor do gradiente do Na^{+} plasmático para dentro da célula. Essa troca contribui para o relaxamento, mas pode ocorrer na direção oposta durante a excitação. Devido ao trocador de Ca^{2+} - Na^{+} , qualquer fator que produzir o aumento do Na^{+} intracelular (Na^{+}_i) secundariamente elevará o Ca^{2+}_i , aumentando a força da contração. Esse processo é designado como **efeito inotrópico positivo**. Um exemplo é o que ocorre quando o fármaco **digitálico** é utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca. Os digitálicos inibem a Na^{+} - K^{+} -ATPase do sarcolema, diminuindo a saída de Na^{+} e aumentando, portanto, o Na^{+}_i . Isso promove o influxo de Ca^{2+} via trocador de Ca^{2+} - Na^{+} . O aumento do Ca^{2+}_i resulta em maior força da contração cardíaca (**Figura 51-12**), que tem efeito benéfico na insuficiência cardíaca.

Ca^{2+} ATPase

Enquanto essa bomba de Ca^{2+} situada no sarcolema também contribui para a saída de Ca^{2+} , acredita-se que ela desempenhe um papel relativamente menor em comparação com o trocador de Ca^{2+} - Na^{+} .

Deve-se observar que vários **canais iônicos** (ver Capítulo 40) estão presentes na maioria das células para o Na^{+} , o K^{+} , o Ca^{2+} , etc. Muitos desses canais foram clonados, e foram estabelecidas as suas disposições em suas respectivas membranas (número de vezes que cada um atravessa a membrana, localização do sítio

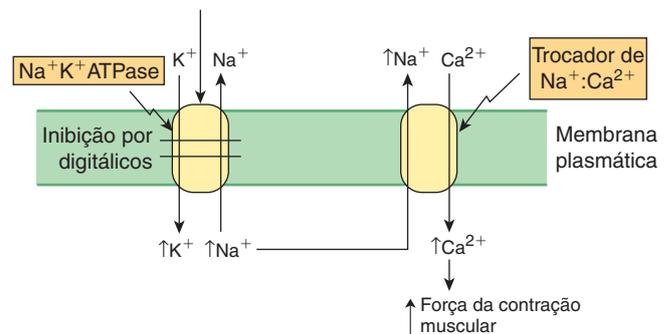


FIGURA 51-12 Esquema mostrando como o fármaco digitálico (utilizado no tratamento de certos casos de insuficiência cardíaca) aumenta a contração cardíaca. Os digitálicos inibem a Na^{+} - K^{+} -ATPase (ver Capítulo 40). Isso resulta em menor quantidade de Na^{+} bombeada para fora do miócito cardíaco e leva ao aumento da concentração intracelular de Na^{+} . Por sua vez, isso estimula o trocador de Na^{+} - Ca^{2+} , de modo que ocorre maior troca de Na^{+} para fora, ao passo que uma maior quantidade de Ca^{2+} entra nos miócitos. A consequente elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta a força da contração muscular.

efetivo de transporte iônico na proteína, etc.). Eles podem ser classificados conforme indicado na **Tabela 51-4**. O músculo cardíaco é rico em canais iônicos e eles também são importantes no músculo esquelético. Mutações dos genes que codificam os canais iônicos são responsáveis por algumas condições relativamente raras que acometem o músculo. Essas e outras doenças causadas por mutações de canais iônicos têm sido chamadas de **canalopatias**; algumas estão relacionadas na **Tabela 51-5**.

As cardiomiopatias hereditárias são causadas por distúrbios do metabolismo energético cardíaco ou por proteínas miocárdicas anormais

Uma **cardiomiopatia hereditária** refere-se a qualquer anormalidade estrutural ou funcional do miocárdio ventricular devido a uma causa hereditária. Existem tipos não hereditários de cardiomiopatia, porém esses casos não são descritos aqui. Como mostra a **Tabela 51-6**, as causas das cardiomiopatias

TABELA 51-4 Principais tipos de canais iônicos encontrados nas células

Tipo	Comentário
Dependente de ligante externo	Abre-se em resposta a uma molécula extracelular específica, como a acetilcolina
Dependente de ligante interno	Abre-se ou fecha-se em resposta a uma molécula intracelular específica, como um nucleotídeo cíclico
Dependente de voltagem	Abre-se em resposta a uma mudança no potencial de membrana (p. ex., canais de Na ⁺ , K ⁺ e Ca ²⁺ no coração)
Regulado mecanicamente	Abre-se em resposta à mudança de pressão mecânica

TABELA 51-5 Alguns distúrbios (canalopatias) causados por mutações dos genes que codificam polipeptídeos constituintes dos canais iônicos

Distúrbio ^a	Canal iônico e principais órgãos envolvidos
Doença do núcleo central (OMIM 117000)	Canal de liberação de Ca ²⁺ (RYR1), músculo esquelético
Paralisia periódica hipercalêmica (OMIM 170500)	Canal de sódio, músculo esquelético
Paralisia periódica hipocalêmica (OMIM 170400)	Canal de Ca ²⁺ lento dependente de voltagem (DHPR), músculo esquelético
Hipertermia maligna (OMIM 145600)	Canal de liberação de Ca ²⁺ (RYR1), músculo esquelético
Miotonia congênita (OMIM 160800)	Canal de cloreto, músculo esquelético

^aOutras canalopatias incluem a síndrome do QT longo (OMIM 192500); o pseudoalosteronismo (síndrome de Liddle, OMIM 177200); a hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente do lactente (OMIM 601820); a nefrolitíase hereditária recessiva ligada ao X tipo II do lactente (síndrome de Dent, OMIM 300009); e a miotonia generalizada recessiva (doença de Becker, OMIM 255700). O termo "miotonia" refere-se a qualquer condição em que não há relaxamento dos músculos após a sua contração. **Fonte:** dados obtidos, em parte, de Ackerman NJ, Clapham DE: Ion channels – basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 1997;336:1575.

TABELA 51-6 Causas bioquímicas de cardiomiopatias hereditárias^a

Causa	Proteínas ou processo afetado
Erros inatos da oxidação de ácidos graxos	Entrada de carnitina nas células e nas mitocôndrias Certas enzimas da oxidação de ácidos graxos
Doenças da fosforilação oxidativa mitocondrial	Proteínas codificadas por genes mitocondriais Proteínas codificadas por genes nucleares
Anormalidades de proteínas contráteis e estruturais do miocárdio	Cadeias pesadas da β -miosina, troponina, tropomiosina, distrofina

^aMutações (p. ex., mutações pontuais ou, em alguns casos, deleções) nos genes (nucleares ou mitocondriais) que codificam diversas proteínas, enzimas ou moléculas de tRNA são as causas principais de cardiomiopatias hereditárias. Algumas condições são moderadas, ao passo que outras são graves e podem ser parte de alguma síndrome que afeta outros tecidos.

Fonte: com base em Kelly DP, Strauss AW: Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994;330:913.

hereditárias dividem-se em duas grandes classes: (1) distúrbios do **metabolismo energético cardíaco**, principalmente mutações dos genes que codificam enzimas ou proteínas envolvidas na oxidação de ácidos graxos (uma importante fonte de energia para o miocárdio) e na fosforilação oxidativa; e (2) mutações em genes que codificam proteínas envolvidas ou que **afetam a contração do miocárdio**, como a miosina, a tropomiosina, as troponinas e a proteína C cardíaca de ligação da miosina. A ocorrência de mutações nos genes que codificam essas últimas proteínas provoca cardiomiopatia hipertrófica familiar, que é discutida aqui.

Mutações no gene da cadeia pesada da β -miosina cardíaca constituem uma causa de cardiomiopatia hipertrófica familiar

A cardiomiopatia hipertrófica familiar é uma das doenças cardíacas hereditárias mais frequentes. Os pacientes apresentam hipertrofia – frequentemente maciça – de um ou de ambos os ventrículos desde o início da vida, não relacionada a qualquer causa extrínseca, como hipertensão arterial. Os casos são transmitidos, em sua maioria, de modo autossômico dominante; o restante é esporádico. Até recentemente, a causa era desconhecida. Entretanto, essa situação mudou quando estudos de uma família acometida mostraram que uma **mutação de troca de sentido** (i.e., substituição de um aminoácido por outro) no **gene da cadeia pesada da β -miosina** era responsável pela condição. Estudos subsequentes demonstraram a ocorrência de certo número de mutações missense nesse gene, codificando, todas elas, resíduos altamente conservados. Alguns indivíduos apresentaram outras mutações, como a formação de um gene híbrido para uma cadeia pesada de α/β -miosina. Os pacientes com cardiomiopatia hipertrófica familiar podem exibir grande variação no seu quadro clínico. Isso reflete, em parte, a **heterogeneidade genética**; isto é, a mutação de vários **outros genes** (p. ex., os que codificam a actina cardíaca, a tropomiosina, as troponinas cardíacas I e T, as cadeias leves essenciais e reguladoras da miosina, a proteína C cardíaca de ligação da miosina, a titina e a tRNA-glicina e a tRNA-isoleucina mitocondriais) também pode causar cardiomiopatia hipertrófica familiar. Além disso, mutações em diferentes locais do gene para a cadeia pesada da β -miosina podem afetar, em maior ou menor grau, a função da proteína. As mutações de troca de sentido agrupam-se nas regiões da cabeça e da cabeça-haste da cadeia pesada da miosina. Uma hipótese sugere que os polipeptídeos mutantes (“polipeptídeos-venenos”) determinam a formação de miofibrilas anormais, resultando finalmente em hipertrofia compensatória. Algumas de troca de sentido alteram a **carga** de um aminoácido (p. ex., substituição de glutamina por arginina), afetando presumivelmente a **conformação** da proteína de forma mais acentuada do que outras substituições. Os pacientes portadores dessas mutações apresentam expectativa de vida significativamente mais curta que a dos pacientes nos quais a mutação não produziu nenhuma alteração de carga. Assim, a definição das mutações precisas envolvidas na gênese da cardiomiopatia hipertrófica familiar poderá se mostrar de importante valor prognóstico; pode ser obtida pelo uso apropriado da reação em cadeia da polimerase no DNA genômico de uma amostra de linfócitos do sangue. A **Figura 51-13** fornece um esquema simplificado dos eventos que causam cardiomiopatia hipertrófica familiar.

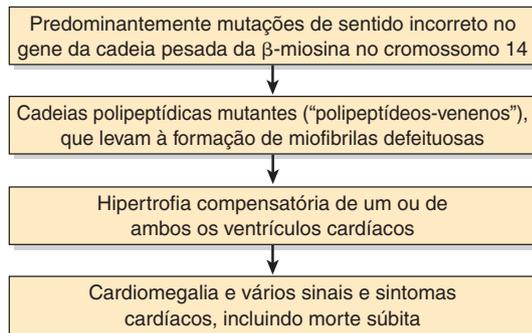


FIGURA 51-13 Esquema simplificado das causas da cardiomiopatia hipertrófica familiar (OMIM 192600) devido a mutações no gene que codifica a cadeia pesada da β-miosina. Mutações nos genes que codificam outras proteínas (ver o texto) também podem causar esse distúrbio.

Outro tipo de cardiomiopatia é denominado **cardiomiopatia dilatada**. Mutações dos genes que codificam a distrofina, a proteína LIM do músculo (assim denominada por ter sido comprovada a presença de um domínio rico em cisteína, originalmente detectado em três proteínas: Lin-II, Isl-1 e Mec-3), a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), a desmina e a lamina foram implicadas como causa dessa condição. As primeiras duas proteínas ajudam a organizar o aparelho contrátil das células do músculo cardíaco, ao passo que a CREB está envolvida na regulação de alguns genes nessas células. As pesquisas atuais não apenas estão elucidando as causas moleculares das cardiomiopatias, mas também estão identificando mutações que causam **distúrbios do desenvolvimento cardíaco** (p. ex., defeitos de septo) e **arritmias** (p. ex., devidas a mutações que afetam canais iônicos).

O Ca^{2+} também regula a contração do músculo liso

Embora todos os músculos contenham actina, miosina e tropomiosina, apenas os músculos **estriados** dos vertebrados contêm o **sistema de troponina**. Desse modo, os mecanismos que regulam a contração devem diferir em vários sistemas contráteis.

Os **músculos lisos** possuem estruturas moleculares semelhantes às dos músculos estriados, porém os sarcômeros não estão alinhados de modo a produzir aparência estriada. Os músculos lisos contêm moléculas de α-actinina e de tropomiosina, assim como os músculos esqueléticos. Eles **não possuem o sistema de troponina**, e as cadeias leves das moléculas de miosina dos músculos lisos diferem das da miosina do músculo estriado. A regulação da contração do músculo liso é **com base na miosina**, diferentemente do músculo estriado, cuja regulação é com base na actina. Todavia, à semelhança do músculo estriado, a contração do músculo liso é **regulada por Ca^{2+}** .

A fosforilação das cadeias leves de miosina inicia a contração do músculo liso

Quando a miosina do músculo liso se liga à actina F na ausência de outras proteínas musculares, como a tropomiosina, não há **nenhuma atividade ATPase detectável**. Essa ausência de atividade é bem diferente da situação descrita para a

miosina e a actina F do músculo estriado, que apresenta atividade ATPase abundante. A miosina do músculo liso contém **cadeias leves** que impedem a ligação da cabeça da miosina à actina F; elas **precisam ser fosforiladas** antes que permitam a ativação da miosina ATPase pela actina F. A atividade ATPase alcançada hidrolisa o ATP cerca de 10 vezes mais lentamente do que a atividade correspondente no músculo esquelético. O fosfato presente nas cadeias leves de miosina pode formar um quelato com o Ca^{2+} ligado ao complexo tropomiosina-TpC-actina, levando a uma maior taxa de formação de ligações cruzadas entre as cabeças de miosina e a actina. A fosforilação das cadeias leves **inicia** o ciclo de associação-dissociação da contração do músculo liso.

A cinase da cadeia leve da miosina é ativada pela calmodulina- 4Ca^{2+} e, em seguida, fosforila as cadeias leves

O sarcoplasma do músculo liso contém uma **cinase da cadeia leve da miosina** que é dependente de cálcio. A ativação da cinase da cadeia leve de miosina pelo Ca^{2+} requer a ligação da **calmodulina- 4Ca^{2+}** à sua subunidade cinase (**Figura 51-14**). A cinase da cadeia leve ativada pela calmodulina- 4Ca^{2+} fosforila as cadeias leves, que param de inibir a interação entre a miosina e a actina F. Então, o ciclo de contração começa.

No músculo liso, existe outra via independente de Ca^{2+} que dá início à contração. Essa via envolve a **Rho-cinase**, que é ativada por uma variedade de estímulos (não mostrada na Figura 51-14). Essa enzima fosforila a fosfatase da cadeia leve de miosina, inibindo-a e, assim, aumentando o nível de cadeias leves fosforiladas. A Rho-cinase também fosforila diretamente a cadeia leve de miosina. Essas duas ações aumentam a contração do músculo liso.

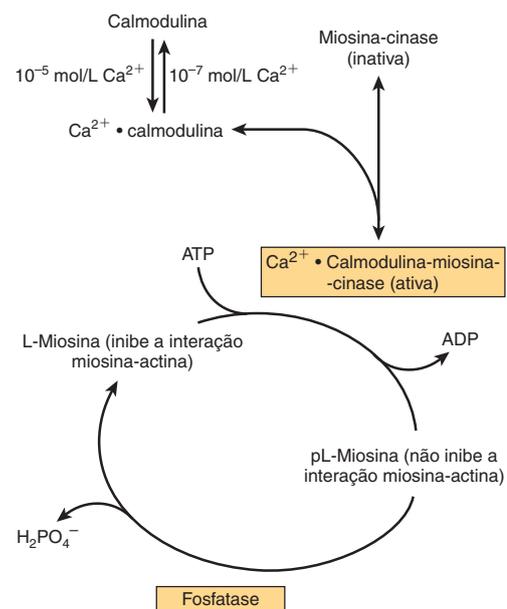


FIGURA 51-14 Regulação da contração do músculo liso pelo Ca^{2+} . A pL-miosina é a cadeia leve fosforilada da miosina, ao passo que a L-miosina é a cadeia leve desfosforilada. (Adaptada, com permissão, de Adelstein RS, Eisenberg R: Regulation and kinetics of actin-myosin ATP interaction. *Annu Rev Biochem* 1980;49:921. Copyright © 1980 por Annual Reviews, www.annualreviews.org.)

O músculo liso relaxa quando a concentração de Ca^{2+} cai abaixo de 10^{-7} molar

Ocorre relaxamento do músculo liso quando o Ca^{2+} sarcoplasmático cai abaixo de 10^{-7} mol/L. Em seguida, o Ca^{2+} dissocia-se da calmodulina, que, por sua vez, dissocia-se da cinase da cadeia leve da miosina, o que torna a cinase inativa. Nenhum fosfato novo é ligado à cadeia leve p, e a **proteína-fosfatase da cadeia leve**, que está continuamente ativa e é independente de cálcio, remove os fosfatos existentes das cadeias leves. Então, a cadeia leve p da miosina desfosforilada inibe a ligação das cabeças de miosina à actina F e sua atividade ATPase. A cabeça da miosina separa-se da actina F na presença de ATP, porém não pode se ligar novamente devido à presença de cadeia leve p desfosforilada; por isso, ocorre **relaxamento**.

A **Tabela 51-7** mostra um resumo e uma comparação da regulação das interações entre actina e miosina (ativação da miosina ATPase) nos músculos estriado e liso.

A cinase da cadeia leve da miosina não é diretamente afetada ou ativada pelo **cAMP**. Entretanto, a proteína-cinase ativada por cAMP pode fosforilar a cinase da cadeia leve de miosina (mas não as próprias cadeias leves). A cinase da cadeia leve de miosina fosforilada exibe afinidade significativamente menor pela calmodulina- 4Ca^{2+} e, portanto, é menos sensível à ativação. Assim, um **aumento do cAMP amortece a resposta**

TABELA 51-7 Interações actina-miosina nos músculos estriado e liso

	Músculo estriado	Músculo liso (e células não musculares)
Proteínas dos filamentos musculares	Actina Miosina Tropomiosina Troponina (TpI, TpT, TpC)	Actina Miosina ^a Tropomiosina
Interação espontânea da actina F e da miosina isoladas (ativação espontânea da miosina ATPase pela actina F)	Sim	Não
Inibidor da interação entre a actina F e a miosina (inibidor da ativação da ATPase dependente de actina F)	Sistema de troponina (TpI)	Cadeia leve da miosina não fosforilada
Contração ativada por	Ca^{2+}	Ca^{2+}
Efeito direto do Ca^{2+}	4Ca^{2+} ligam-se à TpC	4Ca^{2+} ligam-se à calmodulina
Efeito do Ca^{2+} ligado à proteína	A $\text{TpC} \cdot 4\text{Ca}^{2+}$ antagoniza a inibição da interação entre a actina F e a miosina pela TpI (possibilita a ativação da ATPase pela actina F)	A calmodulina $\cdot 4\text{Ca}^{2+}$ ativa a cinase da cadeia leve de miosina, que fosforila a cadeia leve p da miosina; a cadeia leve p fosforilada não inibe mais a interação entre a actina F e a miosina (possibilita a ativação da ATPase pela actina F)

^aAs cadeias leves da miosina são diferentes nos músculos estriado e liso.

de contração do músculo liso em determinada elevação do Ca^{2+} sarcoplasmático. Esse mecanismo molecular pode explicar o efeito relaxante da estimulação β -adrenérgica do músculo liso.

Outra proteína que parece desempenhar papel dependente de Ca^{2+} na regulação da contração do músculo liso é a **caldesmona** (87 kDa). Essa proteína é ubíqua no músculo liso e também é encontrada no tecido não muscular. Na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} , a caldesmona liga-se à tropomiosina e à actina. Isso **impede a interação da actina com a miosina**, mantendo o músculo em estado relaxado. Em concentrações mais altas de Ca^{2+} , a calmodulina- 4Ca^{2+} liga-se à caldesmona, **liberando-a da actina**. Essa última fica livre para se ligar à miosina, e pode ocorrer contração. A caldesmona também está sujeita à fosforilação-desfosforilação; quando fosforilada, não pode se ligar à actina, liberando novamente essa última para interagir com a miosina. A caldesmona também pode participar da organização da estrutura do aparelho contrátil no músculo liso. Muitos de seus efeitos foram demonstrados *in vitro*, e a sua importância fisiológica ainda está em fase de investigação.

Conforme assinalado na Tabela 51-3, o ciclo lento das ligações cruzadas possibilita contração prolongada e lenta do músculo liso (p. ex., nas vísceras e nos vasos sanguíneos), com menor utilização de ATP em comparação com o músculo estriado. A capacidade do músculo liso de manter a força em velocidades reduzidas de contração é designada como **estado de tranca**; trata-se de uma importante característica do músculo liso, cuja base molecular exata ainda está em estudo.

O óxido nítrico (NO) relaxa o músculo liso dos vasos sanguíneos e também desempenha muitas outras funções biológicas importantes

A acetilcolina é um vasodilatador que atua causando relaxamento do músculo liso dos vasos sanguíneos. Entretanto, ela não age diretamente sobre o músculo liso. Uma observação fundamental foi de que, se as **células endoteliais** são separadas das células musculares lisas subjacentes, a acetilcolina não exerce mais seu efeito vasodilatador. Esse achado indicou que os vasodilatadores, como a acetilcolina, interagem inicialmente com as células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos por meio de receptores. Os receptores estão acoplados ao ciclo de fosfoinosítídeo, levando à liberação intracelular de Ca^{2+} pela ação do inositol-trifosfato. Por sua vez, a elevação do Ca^{2+} determina a liberação do **fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)**, que se difunde no músculo liso adjacente. Nesse local, o fator reage com a fração heme de uma guanilato-ciclase solúvel, resultando em ativação dessa última, com consequente elevação dos níveis intracelulares de **cGMP** (**Figura 51-15**). Por sua vez, isso estimula as atividades de certas proteínas-cinase dependentes de cGMP, que provavelmente fosforilam proteínas musculares específicas, causando relaxamento; todavia os detalhes desse processo ainda estão sendo esclarecidos. O importante vasodilatador das artérias coronárias – a **nitroglicerina**, que é amplamente utilizada para aliviar a angina de peito – atua aumentando a liberação intracelular do EDRF e, portanto, de cGMP.

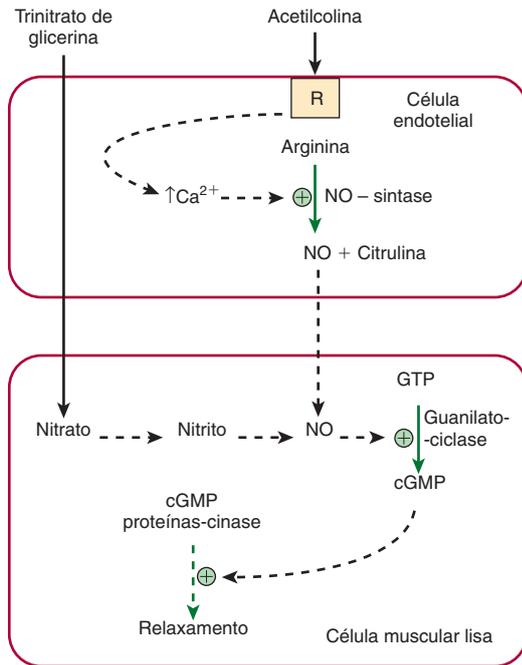


FIGURA 51-15 Diagrama mostrando a formação, em uma célula endotelial, do óxido nítrico (NO) a partir da arginina, em reação catalisada pela NO-sintase. A interação de um agonista (p. ex., acetilcolina) com um receptor (R) provavelmente leva à liberação intracelular de Ca^{2+} por meio do inositol-trifosfato gerado pela via do fosfoinositídeo, resultando em ativação da NO-sintase. Em seguida, o NO difunde-se para o interior do músculo liso adjacente, onde leva à ativação da guanilato-ciclase, à formação de cGMP, à estimulação das cGMP proteinase-cinase e ao relaxamento subsequente. A figura mostra o vasodilatador nitroglicerina entrando na célula muscular lisa, onde seu metabolismo também leva à formação de NO.

De maneira inesperada, constatou-se que o EDRF era o gás NO. O NO é formado pela ação da enzima NO-sintase, que é citosólica. As formas endotelial e neuronal da NO-sintase são ativadas pelo Ca^{2+} (Tabela 51-8). O substrato é a arginina, e os produtos são a citrulina e o NO.

A NO-sintase catalisa uma oxidação de cinco elétrons de um nitrogênio amidina da arginina. A L-hidroxiarginina é um intermediário que permanece firmemente ligado à enzima. A NO-sintase é uma enzima muito complexa, que utiliza

cinco cofatores redox: NADPH, FAD, FMN, heme e tetra-hidrobiopterina. O NO também pode ser formado a partir do nitrito, derivado do metabolismo de vasodilatadores, como o trinitrato de gliceril. O NO tem meia-vida muito curta (cerca de 3 a 4 segundos) nos tecidos, em virtude de sua reação com o oxigênio e o superóxido. O produto da reação com o superóxido é o **peroxinitrito** (ONOO^-), que origina o radical altamente reativo $\text{OH}\cdot$ radical quando se decompõe. O NO liga-se firmemente à hemoglobina e a outras proteínas heme. Encontram-se disponíveis **inibidores químicos da NO-sintase** que podem diminuir acentuadamente a formação de NO. A administração desses inibidores leva à vasoconstrição e a uma notável elevação da pressão arterial, indicando que o NO é de suma importância na manutenção da pressão arterial *in vivo*. Outro importante efeito cardiovascular é a **inibição da agregação de plaquetas**, uma consequência da síntese aumentada de cGMP (ver Capítulo 51).

Desde a descoberta do papel do NO como vasodilatador, surgiu um grande interesse experimental por essa substância. Verificou-se que o NO desempenha uma variedade de papéis fisiológicos, envolvendo praticamente todos os tecidos do corpo (Tabela 51-9). Foram identificadas três isoformas importantes da NO-sintase; cada uma delas foi clonada, e foi estabelecida a localização cromossômica de seus genes nos seres humanos. Foram realizados experimentos genéticos de *knockout* para cada uma das três isoformas, ajudando a estabelecer algumas das funções postuladas do NO.

Para resumir, as pesquisas realizadas na última década mostraram que o NO desempenha um importante papel em vários processos fisiológicos e patológicos.

VÁRIOS MECANISMOS EFETUAM A REPOSIÇÃO DAS RESERVAS DE ATP NO MÚSCULO

O ATP necessário como fonte de energia constante para o ciclo de contração-relaxamento do músculo pode ser gerado (1) pela glicólise, utilizando a glicose do sangue ou o glicogênio muscular, (2) pela fosforilação oxidativa, (3) a partir da creatina-fosfato e (4) a partir de duas moléculas de ADP, em uma reação catalisada pela adenilato-cinase (Figura 51-16).

TABELA 51-8 Resumo da nomenclatura das NO-sintases e dos efeitos do *knockout* de seus genes em camundongos

Subtipo	Nome ^a	Comentários	Resultado do <i>knockout</i> dos genes em camundongos ^b
1	nNOS	A atividade depende dos níveis elevados de Ca^{2+} ; inicialmente identificada em neurônios; ativada pela calmodulina	Estenose pilórica, resistente ao acidente vascular, comportamento sexual agressivo (em machos)
2	iNOS ^c	Independente dos níveis elevados de Ca^{2+} ; proeminente nos macrófagos	Mais suscetíveis a certos tipos de infecção
3	eNOS	A atividade depende dos níveis elevados de Ca^{2+} ; identificada inicialmente em células endoteliais	Elevação da pressão arterial média

^ae, endotelial; i, induzível; n, neuronal.

^bForam realizados *knockouts* de genes por recombinação de homólogos em camundongos. As enzimas são caracterizadas como neuronais, induzíveis (macrófagos) e endoteliais, com base nos locais onde foram identificadas pela primeira vez. Entretanto, todas as três enzimas já foram encontradas em outros locais, e a enzima neuronal também é induzível. Cada gene foi clonado, e a sua localização cromossômica nos seres humanos foi determinada.

^cA iNOS é independente de Ca^{2+} , porém se liga muito firmemente à calmodulina.

Fonte: adaptada de Snyder SH: NO. *Nature* 1995;377:196.

TABELA 51-9 Algumas funções fisiológicas e envolvimento patológicos do óxido nítrico (NO)

• Vasodilatador, importante na regulação da pressão arterial
• Envolvido na ereção peniana; o citrato de sildenafila (Viagra) afeta esse processo ao inibir a cGMP-fosfodiesterase
• Neurotransmissor no encéfalo e no sistema nervoso autônomo periférico
• Desempenha um papel na potencialização a longo prazo
• Desempenha um papel na neurotoxicidade
• Baixos níveis de NO envolvidos na causa do piloroespasmo na estenose pilórica hipertrófica infantil
• Pode desempenhar um papel no relaxamento do músculo esquelético
• Pode constituir parte de um sistema imune primitivo
• Inibe a adesão, a ativação e a agregação das plaquetas

A quantidade de ATP presente no músculo esquelético é apenas suficiente para fornecer a energia utilizada para a contração por alguns segundos, de modo que o ATP precisa ser constantemente renovado a partir de uma ou mais dessas fontes mencionadas, dependendo das condições metabólicas. Conforme discutido adiante, existem pelo menos **dois tipos distintos de fibras** no músculo esquelético – um é predominantemente ativo em condições **aeróbicas**, e o outro é ativo em condições **anaeróbicas**; como previsto, essas fibras utilizam, em graus diferentes, cada uma das fontes de energia mencionadas.

O músculo esquelético contém grandes quantidades de glicogênio

O sarcoplasma do músculo esquelético contém grandes reservatórios de **glicogênio**, localizados nos grânulos próximos às bandas I. A liberação de glicose a partir do glicogênio depende da

glicogênio-fosforilase específica do músculo (ver Capítulo 18), que pode ser ativada por Ca^{2+} , pela epinefrina e pelo AMP. Para gerar a glicose-6-fosfato destinada à glicólise no músculo esquelético, a glicogênio-fosforilase b precisa ser ativada à fosforilase a por meio de fosforilação catalisada pela fosforilase b cinase (ver Capítulo 18). O Ca^{2+} promove a ativação da fosforilase b cinase, também por fosforilação. Por conseguinte, o Ca^{2+} inicia a contração muscular e ativa uma via que fornece a energia necessária. O hormônio **epinefrina** também ativa a glicogênólise no músculo. O **AMP**, produzido pela atividade da adenilato-ciclase sobre o ADP durante o exercício muscular, também pode ativar alostericamente a fosforilase b. A fosforilase b do glicogênio muscular está inativa na **doença de McArdle**, um dos distúrbios do armazenamento de glicogênio (ver Capítulo 18).

Em condições aeróbicas, o músculo gera ATP principalmente por fosforilação oxidativa

A síntese do ATP via **fosforilação oxidativa** requer suprimento de oxigênio. Os músculos que apresentam alta demanda de oxigênio em consequência de contração sustentada (p. ex., para manter a postura) armazenam-no fixado à fração heme da **mioglobina**. Devido à presença da fração heme, os músculos que contêm mioglobina são vermelhos, ao passo que os músculos com pouca ou nenhuma mioglobina são brancos. A **glicose**, derivada da glicose do sangue ou do glicogênio endógeno, e os **ácidos graxos**, derivados dos triacilgliceróis do tecido adiposo, constituem os principais substratos utilizados no metabolismo aeróbio no músculo.

A creatina-fosfato constitui uma importante reserva de energia no músculo

A **creatina-fosfato** impede a rápida depleção do ATP, visto que disponibiliza prontamente um fosfato de alta energia que pode ser utilizado para regenerar o ATP a partir do ADP.

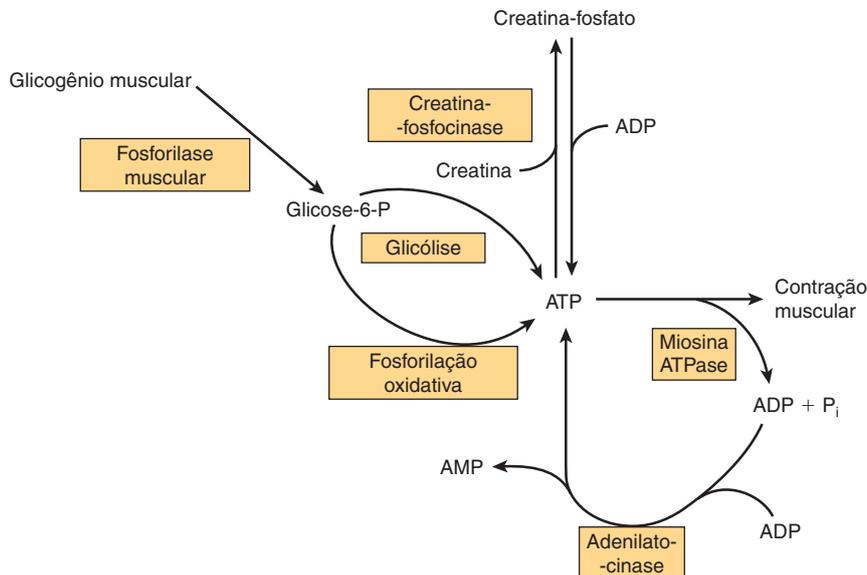


FIGURA 51-16 Múltiplas fontes de ATP no músculo.

A creatina-fosfato é formada a partir de ATP e creatina (Figura 51-16) em momentos nos quais o músculo está relaxado e a demanda por ATP é relativamente baixa. A enzima que catalisa a fosforilação da creatina é a **creatina-cinase** (CK), uma enzima muscular específica com utilidade clínica na detecção de doenças musculares agudas ou crônicas.

O MÚSCULO ESQUELÉTICO CONTÉM FIBRAS DE CONTRAÇÃO LENTA (VERMELHAS) E CONTRAÇÃO RÁPIDA (BRANCAS)

Foram detectados diferentes tipos de fibras no músculo esquelético. Uma classificação subdivide-as em tipo I (de contração lenta), tipo IIA (de contração rápida, oxidativas) e tipo IIB (de contração rápida, glicolíticas). Para simplificar, serão considerados apenas dois tipos: o tipo I (de contração lenta, oxidativas) e o tipo II (de contração rápida, glicolíticas) (Tabela 51-10). As fibras **tipo I** são vermelhas, pois contêm mioglobina e mitocôndrias; seu metabolismo é aeróbio, e elas mantêm contrações relativamente sustentadas. As fibras **tipo II**, que carecem de mioglobina e contêm poucas mitocôndrias, são brancas; elas obtêm a sua energia da glicólise anaeróbia e exibem contrações de duração relativamente curta. A **proporção** desses dois tipos de fibras varia entre os diferentes músculos do corpo, dependendo de sua função (p. ex., se determinado músculo está ou não envolvido em contrações sustentadas, como os que mantêm a postura). A proporção também varia com o **treinamento**; por exemplo, a quantidade de fibras tipo I em certos músculos das pernas aumenta em atletas que treinam para maratonas, ao passo que a quantidade de fibras tipo II aumenta nos velocistas.

Um velocista utiliza a creatina-fosfato e a glicólise anaeróbia para produzir ATP, ao passo que um corredor de maratona utiliza a fosforilação oxidativa

Tendo em vista os dois tipos de fibras no músculo esquelético e as várias fontes de energia descritas anteriormente, é interessante comparar a sua participação em uma corrida de velocidade (p. ex., 100 m) e em uma maratona (42,2 km) (Tabela 51-11).

TABELA 51-10 Características das fibras tipo I e tipo II no músculo esquelético

	Tipo I, de contração lenta	Tipo II, de contração rápida
Miosina ATPase	Baixa	Alta
Utilização de energia	Baixa	Alta
Mitocôndrias	Numerosas	Poucas
Cor	Vermelha	Branca
Mioglobina	Sim	Não
Velocidade de contração	Lenta	Rápida
Duração	Prolongada	Curta

TABELA 51-11 Tipos de fibras musculares e principais fontes de energia utilizadas por um velocista e por um maratonista

Velocista (100 m)	Maratonista
As fibras tipo II (glicolíticas) são predominantemente utilizadas	As fibras tipo I (oxidativas) são predominantemente utilizadas
A creatina-fosfato constitui a principal fonte de energia durante os primeiros 4-5 s	A fosforilação oxidativa constitui a principal fonte de energia durante todo o trajeto
A glicose derivada do glicogênio muscular e metabolizada pela glicólise anaeróbia constitui a principal fonte de energia	A glicose do sangue e os ácidos graxos livres constituem as principais fontes de energia
Ocorre depleção rápida do glicogênio muscular	Ocorre depleção lenta do glicogênio muscular

As principais fontes de energia na **corrida de 100 m** são a **creatina-fosfato** (4 a 5 segundos iniciais) e, em seguida, a **glicólise anaeróbia**, utilizando o glicogênio muscular como fonte de glicose. Os dois principais sítios de controle metabólico são a **glicogênio-fosforilase** e a **PFK-1**. A primeira é ativada pelo Ca^{2+} (liberado do RS durante a contração), pela epinefrina e pelo AMP. A PFK-1 é ativada por AMP, P_i e NH_3 . Atestando a eficiência desses processos, o fluxo pela glicólise pode aumentar em até mil vezes durante uma corrida de velocidade.

Por outro lado, na **maratona**, o **metabolismo aeróbio** é a principal fonte de ATP. As principais fontes de energia são a **glicose sanguínea** e os **ácidos graxos livres**, derivados, em grande parte, da degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo, estimulada pela epinefrina. O glicogênio hepático é degradado para manter a glicemia. O glicogênio muscular também representa uma fonte de energia, porém é degradado de modo muito mais gradual do que em uma corrida de velocidade. Foi calculado que as quantidades de glicose no sangue, de glicogênio no fígado, de glicogênio no músculo e de triacilglicerol no tecido adiposo são suficientes para fornecer aos músculos a energia para uma maratona durante 4, 18, 70 e aproximadamente 4 mil minutos respectivamente. Entretanto, a velocidade de oxidação dos ácidos graxos pelo músculo é mais lenta que a da glicose, de modo que a oxidação da glicose e dos ácidos graxos constitui uma importante fonte de energia na maratona.

Diversos procedimentos têm sido utilizados por atletas para combater a fadiga muscular e a falta de força. Esses procedimentos incluem **ingestão aumentada de carboidratos**, **ingestão aumentada de soda (bicarbonato de sódio)**, **doping sanguíneo** (administração de hemácias) e ingestão de **creatina** e **androstenediona**.

O MÚSCULO ESQUELÉTICO CONSTITUI A PRINCIPAL RESERVA DE PROTEÍNA DO CORPO

Em seres humanos, a **proteína do músculo esquelético** constitui a principal fonte não gordurosa de energia armazenada. Isso explica as perdas muito grandes de massa muscular, particularmente em adultos, em decorrência de subnutrição calórica prolongada.

O estudo da **degradação das proteínas teciduais *in vivo*** é complicado, visto que os aminoácidos liberados durante a degradação intracelular das proteínas podem ser extensamente reutilizados para a síntese proteica no interior da célula. Os aminoácidos também podem ser transportados para outros órgãos quando entram nas vias anabólicas. Todavia, a actina e a miosina são metiladas por uma reação pós-traducional, formando **3-metil-histidina**. Durante a degradação intracelular da actina e da miosina, ocorre liberação de 3-metil-histidina, que é excretada na urina. O débito urinário do aminoácido metilado fornece um índice confiável da velocidade de degradação das proteínas miofibrilares na musculatura dos seres humanos.

A **Tabela 51-12** mostra um resumo de vários aspectos do metabolismo muscular, a maior parte dos quais é tratada em outros capítulos desta obra.

TABELA 51-12 Resumo das principais características bioquímicas relativas ao metabolismo do músculo esquelético^a

• O músculo esquelético funciona em condições aeróbias (em repouso) e anaeróbias (p. ex., corrida de velocidade), de modo que tanto a glicólise aeróbia quanto a glicólise anaeróbia operam, dependendo das condições
• O músculo esquelético contém mioglobina como reservatório de oxigênio
• O músculo esquelético contém diferentes tipos de fibras, principalmente adaptadas para condições anaeróbias (fibras de contração rápida) ou aeróbias (fibras de contração lenta)
• A actina, a miosina, a tropomiosina, o complexo de troponina (TpT, TpI e TpC), o ATP e o Ca ²⁺ são constituintes essenciais para a contração
• A Ca ²⁺ -ATPase, o canal de liberação de Ca ²⁺ e a calsequestrina são proteínas envolvidas em vários aspectos do metabolismo do Ca ²⁺ no músculo
• A insulina atua sobre o músculo esquelético, aumentando a captação de glicose
• No estado alimentado, a maior parte da glicose é utilizada na síntese de glicogênio, que atua como reserva de glicose para uso durante o exercício físico; alguns atletas de longa distância utilizam uma “pré-carga” com glicose para aumentar as reservas de glicogênio
• A epinefrina estimula a glicogenólise no músculo esquelético; o glucagon não faz isso devido à ausência de seus receptores
• O músculo esquelético não pode contribuir diretamente para a glicose do sangue, visto que ele não contém glicose-6-fosfatase
• O lactato produzido no músculo esquelético pelo metabolismo anaeróbio passa para o fígado, que o utiliza na síntese de glicose, que pode, então, retornar ao músculo (ciclo de Cori)
• O músculo esquelético contém creatina-fosfato, que atua como reserva de energia para demandas de curto prazo (segundos).
• Os ácidos graxos livres no plasma constituem importante fonte de energia, particularmente em condições de maratona e no jejum prolongado
• O músculo esquelético pode utilizar corpos cetônicos durante jejum prolongado
• O músculo esquelético constitui o principal local de metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, que são utilizados como fonte de energia
• A proteólise do músculo durante o jejum prolongado supre aminoácidos para a gliconeogênese
• Os principais aminoácidos provenientes do músculo são a alanina (destinada principalmente à gliconeogênese no fígado e que faz parte do ciclo de glicose-alanina) e a glutamina (destinada principalmente ao intestino e aos rins).

^aEsta tabela reúne material de vários capítulos deste livro.

TABELA 51-13 Algumas propriedades dos microfilamentos e dos microtúbulos

	Microfilamentos	Microtúbulos
Proteína(s)	Actina	α e β-tubulinas
Diâmetro	8-9 nm	25 nm
Funções	Estrutural, motilidade	Estrutural, motilidade, polaridade

Nota: algumas propriedades dos filamentos intermediários são descritas na Tabela 51-14.

O CITOESQUELETO DESEMPENHA MÚLTIPLAS FUNÇÕES CELULARES

As células não musculares realizam trabalho mecânico, incluindo autopropulsão, morfogênese, clivagem, endocitose, exocitose, transporte intracelular e mudança do formato da célula. Essas funções celulares são executadas por uma extensa rede intracelular de estruturas filamentosas, constituindo o **citoesqueleto**. O citoplasma celular não é um saco contendo líquido, como se acreditava. Essencialmente, todas as células eucarióticas contêm três tipos de estruturas filamentosas: **filamentos de actina** (também conhecidos como microfilamentos), **microtúbulos** e **filamentos intermediários**. Cada tipo de filamento pode ser distinguido por métodos bioquímicos e por microscopia eletrônica. As **Tabelas 51-13** e **51-14** resumem algumas propriedades dessas três estruturas.

As células não musculares contêm actina que forma microfilamentos

A **actina G** é encontrada na maioria das células do corpo, se não em todas elas. Na presença de concentrações

TABELA 51-14 Classes de filamentos intermediários das células eucarióticas e suas distribuições

Proteínas	Massa molecular (kDa)	Distribuições
Laminas A, B e C	65-75	Lâmina nuclear
Queratinas Tipo I (ácidas) Tipo II (básicas)	40-60 50-70	Células epiteliais, pelos, unhas Iguais às do tipo I (ácidas)
Semelhantes à vimentina Vimentina Desmina Proteína ácida fibrilar glial Periferina	54 53 50 66	Várias células mesenquimais Músculo Células gliais Neurônios
Neurofilamentos Baixa (B), média (M) e alta (A) ^a	60-130	Neurônios

^aReferem-se à sua massa molecular.

Nota: Os filamentos intermediários apresentam diâmetro aproximado de 10 nm e desempenham várias funções. Por exemplo, as queratinas estão amplamente distribuídas nas células epiteliais e aderem aos desmossomos e aos hemidesmossomos por proteínas adaptadoras. As laminas fornecem suporte para a membrana nuclear.

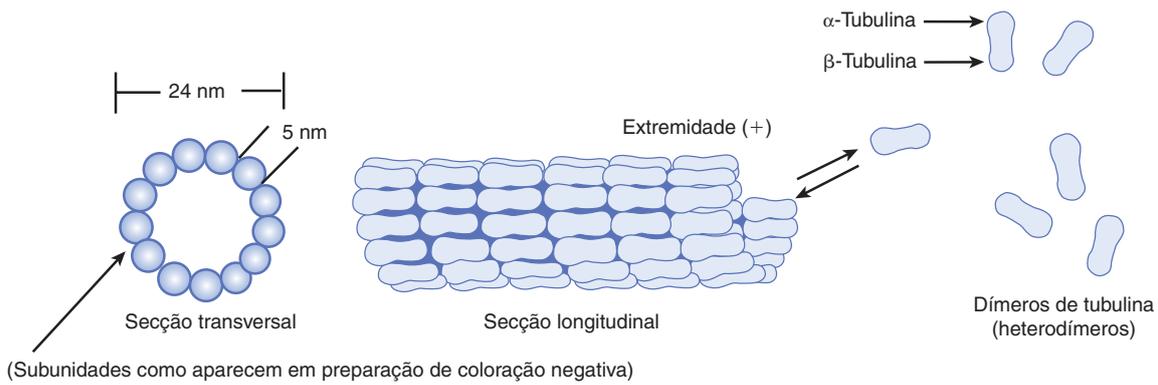


FIGURA 51-17 Representação esquemática dos microtúbulos. A parte superior esquerda mostra um desenho de microtúbulos como aparecem ao microscópio eletrônico após fixação com ácido tânico em glutaraldeído. As subunidades de tubulina não coradas são delimitadas pelo ácido tânico denso. As seções transversais dos túbulos revelam um anel de 13 subunidades de dímeros dispostos em uma espiral. As mudanças no comprimento dos microtúbulos devem-se ao acréscimo ou à perda de subunidades individuais de tubulina. São encontrados arranjos característicos de microtúbulos (não mostrados aqui) nos centríolos, nos corpúsculos basais, nos cílios e nos flagelos. (Reproduzida, com permissão, de Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: *Basic Histology*, 7th ed. Appleton & Lange, 1992.)

apropriadas de cloreto de magnésio e de potássio, a actina G sofre polimerização espontânea, formando filamentos de **actina F** em dupla-hélice, como os observados no músculo. Existem pelo menos dois tipos de actina nas células não musculares: a β -actina e a γ -actina. Ambos os tipos podem coexistir na mesma célula e, provavelmente, podem até mesmo copolimerizar no mesmo filamento. No citoplasma, a **actina F** forma **microfilamentos** de 7 a 9,5 nm, que, frequentemente, ocorrem na forma de feixes de uma rede de aparência emaranhada. Esses feixes proeminentes, que ficam logo abaixo da membrana plasmática de muitas células, são designados como **fibras de estresse**. Fibras de estresse desaparecem à medida que a motilidade das células aumenta ou com a transformação maligna das células por substâncias químicas ou vírus oncogênicos.

Embora não estejam organizados como nos músculos, os filamentos de actina nas células não musculares interagem com a **miosina**, produzindo movimentos celulares.

Os microtúbulos contêm α e β -tubulinas

Os **microtúbulos**, que constituem um componente integral do citoesqueleto celular, consistem em tubos citoplasmáticos de 25 nm de diâmetro e comprimento frequentemente muito grande (**Figura 51-17**). Os microtúbulos são necessários para a formação e para a função do **fuso mitótico** e, portanto, estão presentes em todas as células eucarióticas. Estão também envolvidos no movimento intracelular das **vesículas** endocíticas e exocíticas e formam os principais componentes estruturais de **cílios** e **flagelos**. Os microtúbulos constituem um importante componente dos **axônios** e dos **dendritos**, nos quais mantêm a estrutura e participam do fluxo axoplasmático de material ao longo desses processos neuronais.

Os **microtúbulos** são cilindros de 13 protofilamentos de orientação longitudinal, cada um deles consistindo em dímeros de α -tubulina e β -tubulina, proteínas estreitamente relacionadas de cerca de 50 kDa de massa molecular. Os dímeros de tubulina organizam-se em protofilamentos e, subsequentemente, em lâminas e, a seguir, em cilindros.

Um centro de organização dos microtúbulos, localizado ao redor de um par de centríolos, atua como núcleo para o crescimento de novos microtúbulos. Uma terceira espécie de tubulina, a γ -tubulina, parece desempenhar importante papel nessa montagem. O **GTP** é necessário para a montagem. Diversas proteínas estão associadas aos microtúbulos (**proteínas associadas aos microtúbulos [MAPs]** uma das quais é a **tau**) e desempenham papéis importantes na montagem e na estabilização dos microtúbulos. Os microtúbulos encontram-se em estado de instabilidade dinâmica, com montagem e desmontagem constantes. Eles apresentam **polaridade** (extremidades positiva e negativa); isso é relevante para o seu crescimento a partir dos centríolos e para a sua capacidade de orientar o movimento intracelular. Por exemplo, no transporte axônico, a proteína **cinesina**, que apresenta atividade ATPase semelhante à miosina, utiliza a hidrólise do ATP para deslocar as vesículas ao longo do axônio em direção à extremidade positiva da formação microtubular. O fluxo de materiais em sentido oposto, em direção à extremidade negativa, é impulsionado pela **dineína citosólica**, outra proteína com atividade ATPase. De modo semelhante, as **dineínas axonemais** dão impulso aos movimentos ciliares e flagelares. Outra proteína, a **dinamina**, utiliza o GTP e está envolvida na endocitose. As cinesinas, as dineínas, a dinamina e as miosinas são designadas como **motores moleculares**.

A ausência de dineína nos cílios e nos flagelos resulta em sua imobilidade, levando à esterilidade masculina, *situs inversus* e infecção respiratória crônica, condição conhecida como **síndrome de Kartagener** (OMIM 244400). Em indivíduos com essa síndrome, foram detectadas mutações nos genes que afetam a síntese de dineína.

Determinados **fármacos** se ligam aos microtúbulos e, assim, interferem na sua montagem ou desmontagem. Esses fármacos incluem a **colchicina** (utilizada no tratamento da artrite gotosa aguda), a **vimblastina** (alcaloide da vinca empregado no tratamento de certos tipos de câncer), o **paclitaxel** (efetivo contra o câncer de ovário) e a **griseofulvina** (um agente antifúngico).

Os filamentos intermediários diferem dos microfilamentos e dos microtúbulos

Existe um sistema fibroso intracelular de filamentos, com periodicidade axial de 21 nm e diâmetro de 8 a 10 nm, que é intermediário entre o dos microfilamentos (6 nm) e o dos microtúbulos (23 nm). São encontradas pelo menos quatro classes de **filamentos intermediários**, conforme indicado na Tabela 51-14.

Todos os filamentos intermediários são moléculas fibrosas alongadas, com um domínio em bastão central, uma cabeça aminoterminal e uma cauda carboxiterminal. Eles formam uma estrutura semelhante a uma corda, e os filamentos maduros são compostos por tetrâmeros reunidos em disposição helicoidal. Constituem componentes estruturais importantes das células, e a maioria consiste em componentes **relativamente estáveis** do citoesqueleto, que não sofrem rápida montagem e desmontagem e não desaparecem durante a mitose, como ocorre com a actina e com muitos filamentos microtubulares.

Uma significativa exceção é fornecida pelas **laminas**, que, após a fosforilação, sofrem desmontagem na mitose e reaparecem quando ela termina. As **laminas** formam uma rede em aposição à membrana nuclear interna.

As mutações no gene que codifica a **lamina A** e a **lamina C** causam a síndrome de progéria de Hutchinson-Gilford (**progéria**) (OMIM 176670), caracterizada pelo aparecimento de **envelhecimento acelerado** e outras características. Uma forma farnesilada (ver Figura 26-2 para a estrutura do farnesil) de pré-lamina A acumula-se nessa condição, uma vez que o sítio no qual a porção farnesilada da lamina A é normalmente clivado por proteases tem sido alterado por mutação. A lamina A constitui um importante componente do arcabouço estrutural que mantém a integridade do núcleo de uma célula. O acúmulo da pré-lamina A farnesilada parece desestabilizar os núcleos, alterando seu formato e predispondo as vítimas, de algum modo, a manifestarem sinais de envelhecimento prematuro. Experimentos em camundongos indicaram que a administração de inibidor da farnesiltransferase pode melhorar o desenvolvimento de núcleos deformados. As crianças acometidas por essa condição frequentemente morrem de aterosclerose na adolescência. A **Figura 51-18** apresenta um esquema resumido da causalidade da progéria.

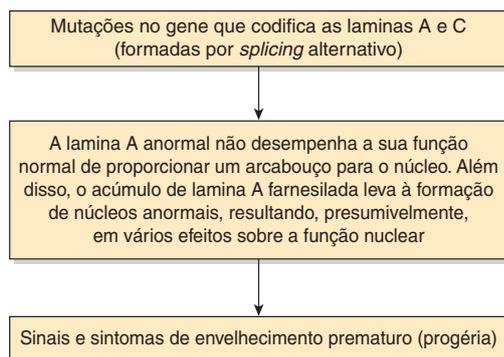


FIGURA 51-18 Esquema da causalidade da progéria (síndrome de Hutchinson-Gilford, OMIM 176670).

As **queratinas** formam uma grande família, na qual se distinguem cerca de 30 membros. Conforme indicado na **Tabela 51-14**, são encontrados dois tipos principais de queratina; todas as queratinas individuais são **heterodímeros** constituídos de um membro de cada classe.

As **vimentinas** estão amplamente distribuídas nas células mesodérmicas, e a desmina, a proteína ácida fibrilar glial e a periferina estão relacionadas com elas. Todos os membros da família semelhante à vimentina podem sofrer copolimerização uns com os outros.

Os filamentos intermediários são muitos proeminentes nas células nervosas; os neurofilamentos são classificados, em baixos, médios e altos, com base em suas massas moleculares. A **distribuição dos filamentos intermediários** nas células normais e anormais (p. ex., no câncer) pode ser estudada pelo uso de técnicas imunofluorescentes, utilizando anticorpos com especificidades apropriadas. Esses anticorpos dirigidos contra filamentos intermediários específicos também podem ser utilizados para ajudar o patologista a decidir a origem de certos tumores malignos desdiferenciados. Esses tumores ainda podem conservar o tipo de filamento intermediário encontrado em suas células de origem.

Foram descritas várias **doenças cutâneas**, caracterizadas principalmente pela formação de bolhas, devido a mutações nos genes que codificam **várias queratinas**. Dois desses distúrbios são a epidermólise bolhosa simples (OMIM 131800) e a queratoderma palmoplantar epidermolítica (OMIM 144200). As **bolhas** que ocorrem nesses distúrbios provavelmente refletem menor capacidade de várias camadas da pele resistirem aos estresses mecânicos, devido a anormalidades na estrutura das queratinas.

RESUMO

- As miofibrilas do músculo esquelético contêm filamentos grossos e finos. Os filamentos grossos contêm miosina. Os filamentos finos apresentam actina, tropomiosina e o complexo de troponina (troponinas T, I e C).
- O modelo de deslizamento dos filamentos com ligações cruzadas constitui a base sobre a qual se fundamenta o pensamento atual acerca da contração muscular. A base para esse modelo postula que os filamentos interdigitados deslizam uns ao longo dos outros durante a contração, ao passo que as ligações cruzadas entre a miosina e a actina geram e sustentam a tensão.
- A hidrólise do ATP é utilizada para acionar o movimento dos filamentos. O ATP liga-se às cabeças da miosina e é hidrolisado a ADP e P_i pela atividade ATPase do complexo actomiosina.
- O Ca²⁺ desempenha um papel essencial na iniciação da contração muscular pela sua ligação à troponina C. No músculo esquelético, o RS regula a distribuição do Ca²⁺ para os sarcômeros, ao passo que o influxo de Ca²⁺ pelos canais de Ca²⁺ do sarcolema é de suma importância nos músculos cardíaco e liso.
- Muitos casos de hipertermia maligna nos seres humanos se devem a mutações no gene que codifica o canal de liberação de Ca²⁺.
- Existem várias diferenças entre o músculo esquelético e o músculo cardíaco; em particular, esse último contém uma variedade de receptores em sua superfície.

- Alguns casos de cardiomiopatia hipertrófica familiar se devem a mutações de troca de sentido no gene que codifica a cadeia pesada da β -miosina. Também foram detectadas mutações nos genes que codificam várias outras proteínas.
- Diferentemente dos músculos esquelético e cardíaco, o músculo liso não contém o sistema de troponina; em vez disso, a fosforilação das cadeias leves de miosina inicia a contração.
- O NO é um regulador do músculo liso vascular; o bloqueio de sua formação a partir da arginina provoca elevação aguda da pressão arterial, indicando que a regulação da pressão arterial constitui uma de suas numerosas funções.
- A distrofia muscular tipo Duchenne é causada por mutações no gene, localizado no cromossomo X, que codifica a proteína distrofina.
- Nos seres humanos, são encontrados dois tipos principais de fibras musculares: as fibras brancas (anaeróbias) e as vermelhas (aeróbias). As primeiras são particularmente usadas em corridas de velocidade, ao passo que as segundas são utilizadas no exercício aeróbio prolongado. Durante uma corrida de velocidade, o músculo utiliza creatina-fosfato e glicólise como fontes de energia; nas maratonas, a oxidação dos ácidos graxos assume maior importância durante as últimas fases.
- As células não musculares executam vários tipos de trabalho mecânico realizados pelas estruturas que constituem o citoesqueleto. Essas estruturas incluem os filamentos de actina (microfilamentos), os microtúbulos (compostos principalmente por α -tubulina e por β -tubulina) e os filamentos intermediários. Esses últimos incluem as lamínas, as queratinas, as proteínas semelhantes à vimentina e aos neurofilamentos. As mutações no gene que codifica a lamina A causam progeria, condição caracterizada pela ocorrência de envelhecimento prematuro. Diversas doenças cutâneas são causadas por mutações em genes que codificam determinadas queratinas.

REFERÊNCIAS

- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, et al: *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24th ed. McGraw-Hill Lange, 2012.
- Blanchoin L, Bouiemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J: Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* 2014;94:235.
- Brosnan JT, Brosnan ME: Creatine: endogenous metabolite, dietary and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr* 2007;27:241.
- Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*, 5th ed. Sinauer Associates Inc., 2009.
- Kull FJ, Endow SA: Force generation by kinesin and myosin cytoskeleton proteins. *J Cell Sci* 2013;126:9.
- Murad F: Nitric oxide and cyclic GMP in cell signalling and drug development. *N Engl J Med* 2006;355:2003.
- Murphy RT, Starling RC: Genetics and cardiomyopathy: where are we now? *Cleve Clin J Med* 2005;72:465.
- Neubauer S: The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;356:1140.
- Pritchard RH, Shery Huang YY, Terentiev EM: Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter* 2014;10:1864.
- Sanders KM: Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20 Suppl 1:39.
- Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, et al (editors): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, 2001.
- Sequeira V, Nijenkamp LL, Regan JA, van der Velden J: The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838:700.
- Sweeney HL, Houdusse A: Structural and functional insights into the myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 2010;39:539.
- Taimen P, Pflieger K, Shimi T, et al: A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(49):20788.

Proteínas plasmáticas e imunoglobulinas

Peter J. Kennelly, Ph.D., Robert K. Murray, M.D., Ph.D., Molly Jacob, M.B.B.S., M.D., Ph.D. e Joe Varghese, M.B.B.S., M.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Citar as principais funções do sangue.
- Descrever as principais funções da albumina sérica.
- Explicar como a haptoglobina protege o rim contra a formação de precipitados de ferro nocivos.
- Descrever os papéis da ferritina, da transferrina e da ceruloplasmina na homeostasia do ferro.
- Descrever o mecanismo pelo qual a transferrina, os receptores de transferrina e a proteína HFE interagem para regular a síntese de hepcidina, um regulador fundamental da homeostasia do ferro.
- Explicar como a homeostasia de ferro pode ser perturbada pelas deficiências nutricionais ou determinados distúrbios.
- Detalhar as estruturas gerais e as funções das cinco classes de imunoglobulinas e o uso de anticorpos monoclonais.
- Explicar como nossos anticorpos são capazes de sintetizar até 1 milhão de diferentes imunoglobulinas utilizando menos de 150 genes.
- Descrever como o sistema do complemento é ativado e subsequentemente lisa os microrganismos invasores.
- Explicar como o sistema imune adaptativo do corpo difere do seu sistema imune inato.
- Definir o termo lectina.
- Explicar as diferenças principais entre anticorpos policlonais e monoclonais.
- Explicar as características marcantes dos distúrbios autoimunes e de imunodeficiência.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

As proteínas que circulam no plasma sanguíneo desempenham importantes papéis na fisiologia humana. As **albuminas** facilitam o trânsito de ácidos graxos, hormônios esteroides e outros ligantes entre tecidos. A **transferrina** auxilia na ingestão e na distribuição de ferro, um componente de diversas metaloproteínas de importância fundamental. O **fibrinogênio** circulante funciona como um bloco construtor rapidamente mobilizado da rede de fibrina que proporciona a fundação dos coágulos utilizados para selar vasos lesados. A formação do

coágulo é desencadeada por uma cascata de fatores da coagulação sanguínea, proteases latentes que normalmente circulam como pró-proteínas inativas, ou **zimogênios**. O plasma também contém diversas proteínas que atuam como inibidores das enzimas proteolíticas. A **antitrombina** ajuda a confinar a formação de coágulos na vizinhança de uma ferida, ao passo que a α_1 -antiproteínase e a α_2 -macroglobulina impedem que as proteases utilizadas para destruir patógenos invasores e células mortas ou defeituosas danifiquem o tecido saudável. As imunoglobulinas circulantes, chamadas de **anticorpos**, representam a primeira linha do sistema imune do corpo.

TABELA 52-1 Prevalência de doenças autoimunes selecionadas entre a população norte-americana

Doença autoimune	Taxa de prevalência média (por 100.000)	Porcentagem em mulheres
Doença de Graves/hipertireoidismo	1.152	88
Artrite reumatoide	860	75
Tireoidite/hipotireoidismo	792	95
Vitiligo	400	52
Diabetes tipo 1	192	48
Anemia perniciosa	151	67
Esclerose múltipla	58	64
Glomerulonefrite primária	40	32
Lúpus eritematoso sistêmico	24	88
Glomerulonefrite IgA	23	67
Síndrome de Sjögren	14	94
Miastenia grave	5	73
Doença de Addison	5	93
Escleroderma	4	92

Fonte: dados de Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH: Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *J Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:223.

Alterações na produção de proteínas plasmáticas podem acarretar graves consequências à saúde. Deficiências nos principais componentes da cascata da coagulação sanguínea podem levar a hematomas e sangramentos excessivos (**hemofilia**). Indivíduos que não possuem a ceruloplasmina plasmática, o carreador primário de cobre do corpo, estão sujeitos à degeneração hepatolenticular (doença de Wilson), ao passo que o enfisema está associado a uma deficiência genética na produção da α_1 -antitripsina circulante. A produção aberrante de imunoglobulinas caracteriza os diversos **distúrbios autoimunes**, como diabetes tipo 1, asma e artrite reumatoide, que afetam mais de 1 em cada 30 residentes da América do Norte (**Tabela 52-1**). Insuficiências na produção de anticorpos protetores – como ocorrem em vários indivíduos infectados pelo **vírus da imunodeficiência humana** (HIV) ou em pacientes que recebem fármacos imunossupressores – tornam-nos imunocomprometidos, extremamente suscetíveis à infecção por patógenos microbianos e virais e vulneráveis à sua disseminação. Enquanto as causas básicas das doenças relacionadas com as proteínas plasmáticas, como a hemofilia, são relativamente diretas, outras – em particular, diversos distúrbios autoimunes – surgem devido à interação complexa e crítica de fatores genéticos, alimentares, nutricionais, ambientais e médicos.

O SANGUE DESEMPENHA VÁRIAS FUNÇÕES

Como a via principal pela qual os tecidos estão conectados uns aos outros e ao ambiente circundante, o sangue que circula por todo o nosso corpo realiza uma variedade de funções. Estas incluem a liberação de nutrientes e de oxigênio, a remoção

TABELA 52-2 Principais funções do sangue

1. Respiração – transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de CO ₂ dos tecidos para os pulmões
2. Nutrição – transporte de substâncias nutricionais absorvidas
3. Excreção – transporte de resíduos metabólicos para rins, pulmões, pele e intestinos para eliminação
4. Manutenção do equilíbrio acidobásico normal do corpo
5. Regulação do equilíbrio hídrico por meio dos efeitos do sangue sobre a troca de água entre o líquido circulante e os líquidos teciduais
6. Regulação da temperatura corporal pela distribuição do calor corporal
7. Defesa contra infecção por leucócitos e anticorpos circulantes
8. Transporte de hormônios e regulação do metabolismo
9. Transporte de metabólitos
10. Coagulação

de produtos residuais, o transporte de hormônios e a defesa contra microrganismos infecciosos (**Tabela 52-2**). Essas várias funções são realizadas por um conjunto diversificado de componentes que incluem entidades celulares, como hemácias, plaquetas e leucócitos (ver Capítulos 53 e 54), e água, eletrólitos, metabólitos, nutrientes, proteínas e hormônios, que compreendem o **plasma**.

O PLASMA CONTÉM UMA MISTURA COMPLEXA DE PROTEÍNAS

O plasma contém uma mistura complexa de proteínas, e muitas delas contêm grandes quantidades de pontes dissulfeto, assim como carboidratos ligados de forma covalente (**glicoproteínas**) ou lipídeos (**lipoproteínas**). Com base na sua solubilidade relativa na presença de um solvente orgânico como o etanol, ou de agentes *salting out*, como o sulfato de amônio, os primeiros pesquisadores dividiram as proteínas plasmáticas em três grupos: **fibrinogênio**, **albumina** e **globulinas**. Em seguida, os cientistas clínicos utilizaram a eletroforese em uma matriz de **acetato de celulose** para analisar a composição proteica do plasma. Após a separação eletroforética, corantes revelaram cinco bandas principais que foram designadas como **frações albumina**, α_1 , α_2 , β e γ , respectivamente (**Figura 52-1**). A **Figura 52-2** mostra as dimensões relativas e as massas moleculares de algumas proteínas plasmáticas.

As proteínas plasmáticas auxiliam a determinar a distribuição de fluido entre sangue e tecidos

Em geral, a concentração agregada de proteínas presentes no plasma cai na faixa de 7 a 7,5 g/dL para seres humanos. A **pressão osmótica** (pressão oncótica) exercida pelas proteínas plasmáticas é de cerca de 25 mmHg. Como a **pressão hidrostática** nas arteríolas é de aproximadamente 37 mmHg, com pressão intersticial (tecidual) de 1 mmHg oposta a ela, uma força resultante dirigida para fora de cerca de 11 mmHg direciona o fluido para o interior dos espaços intersticiais. Nas vênulas, a pressão hidrostática é em torno de 17 mmHg, com pressões oncótica e intersticial iguais às anteriormente mencionadas;

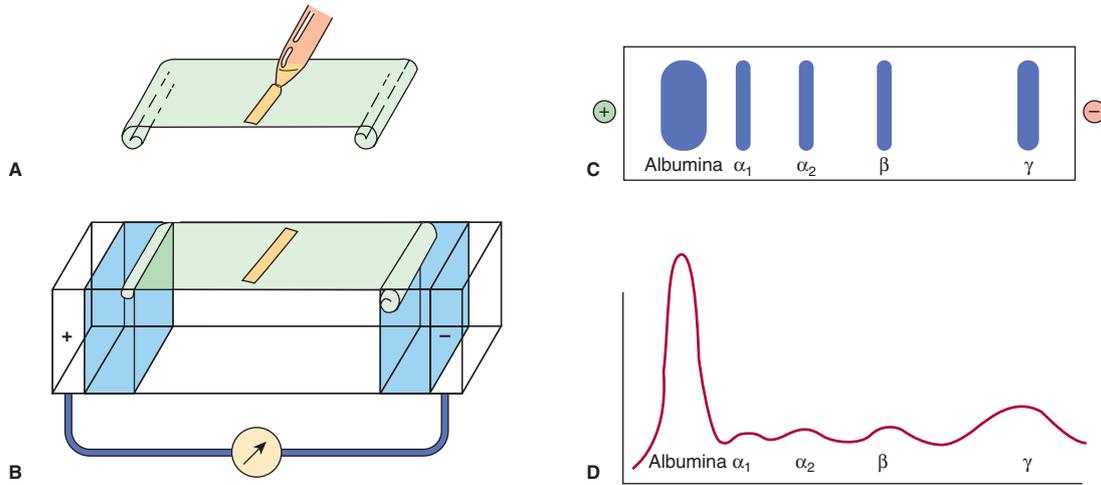


FIGURA 52-1 Técnica de eletroforese de zona em acetato de celulose. (A) Uma pequena quantidade de soro ou de outro líquido é aplicada a uma fita de acetato de celulose. (B) Efetua-se a eletroforese em tampão eletrolítico. (C) A coloração permite a visualização das bandas de proteínas separadamente. (D) A varredura densitométrica revela as mobilidades relativas da albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β -globulina e γ -globulina. (Reproduzida, com permissão, de Parslow TG et al [editors]: *Medical Immunology*, 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

assim, uma força efetiva de cerca de 9 mmHg atrai a água de volta à circulação. As pressões citadas são frequentemente designadas como **forças de Starling**. Se a concentração de proteínas plasmáticas estiver fortemente diminuída (p. ex., devido à desnutrição proteica severa), o fluido não mais voltará para o interior do compartimento intravascular. O acúmulo resultante de fluido nos espaços teciduais extravasculares leva à condição conhecida como **edema**.

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado

Cerca de 70 a 80% de todas as proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado. Elas incluem albumina, fibrinogênio, transferrina

e a maior parte dos componentes do complemento e da cascata de coagulação sanguínea, com exceção do fator de von Willebrand, que é sintetizado no endotélio vascular. As γ -globulinas, que são sintetizadas nos linfócitos, são uma exceção importante. A maioria das proteínas plasmáticas é modificada de forma covalente pela adição de cadeias oligossacarídicas N ou O-ligadas, ou de ambas (ver Capítulo 46). A albumina é a principal exceção. Essas cadeias oligossacarídicas realizam várias funções (ver Tabela 46-2). A perda de resíduos terminais de ácido siálico acelera a depuração de glicoproteínas plasmáticas da circulação.

Como é o caso de outras proteínas destinadas à secreção de uma célula, os genes das proteínas plasmáticas codificam uma **sequência sinal** aminoterminal que as direciona para o retículo endoplasmático. Como essa sequência-líder emerge do ribossomo, ela liga-se a um complexo proteico transmembrana no retículo endoplasmático, chamado de **partícula de reconhecimento do sinal**. A cadeia polipeptídica emergente é puxada através da partícula de reconhecimento do sinal para o interior do lúmen do retículo endoplasmático, processo durante o qual a sequência-líder é clivada por uma **peptidase-sinal** associada (ver Capítulo 49). As proteínas recém-sintetizadas atravessam, em seguida, a principal via secretora da célula (membrana endoplasmática rugosa → membrana endoplasmática lisa → aparelho de Golgi → vesículas secretoras) antes de entrar no plasma, processo durante o qual estão sujeitas a várias modificações pós-traducionais (proteólise, glicosilação, fosforilação, etc.). Os tempos de trânsito pelo hepatócito, desde o seu local de síntese até o plasma, variam de 30 minutos a várias horas para determinadas proteínas.

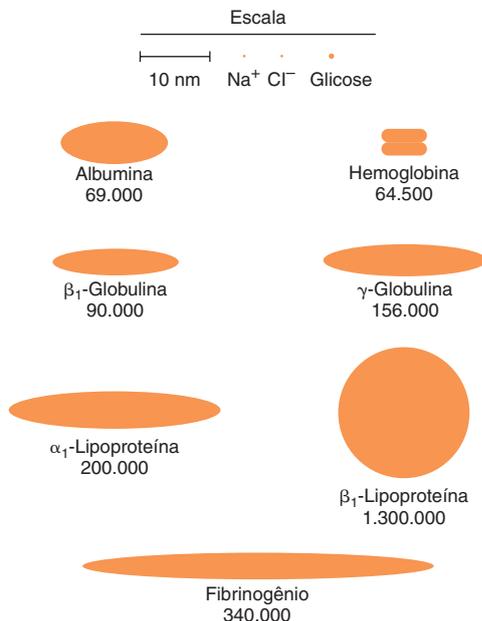


FIGURA 52-2 Dimensões relativas e massas moleculares aproximadas das moléculas de proteína no sangue.

Muitas proteínas plasmáticas exibem polimorfismo

Um **polimorfismo** é um traço mendeliano ou monogênico encontrado na população em pelo menos dois fenótipos, e nenhum deles é raro (i.e., nenhum dos fenótipos ocorre com frequência de < 1 a 2%). As substâncias do grupo sanguíneo

ABO (ver Capítulo 53) são os exemplos mais conhecidos de polimorfismos humanos. Outras proteínas plasmáticas humanas que apresentam polimorfismo incluem a α_1 -antitripsina, a haptoglobina, a transferrina, a ceruloplasmina e as imunoglobulinas. A maioria dos polimorfismos é inócua.

Cada proteína plasmática tem meia-vida característica na circulação

A **meia-vida** de uma proteína plasmática é o tempo necessário para que 50% das moléculas presentes em um determinado momento sejam degradadas ou, caso contrário, eliminadas do sangue. Sob condições normais, o **turnover** resultante, ou substituição, de moléculas proteicas mais antigas pelas recém-sintetizadas ocorre sem qualquer alteração na sua concentração total. Em outras palavras, os processos de compensação de síntese e depuração alcançam um **estado de equilíbrio** em que não é evidente nenhum aumento ou redução em nível macromolecular.

Nos adultos saudáveis, as meias-vidas observadas para a albumina e para a haptoglobina são de aproximadamente 20 e 5 dias, respectivamente. Em algumas doenças, a meia-vida de uma proteína pode estar acentuadamente alterada. Por exemplo, em algumas doenças gastrintestinais, como a ileíte regional (doença de Crohn), pode ocorrer perda de quantidades consideráveis de proteínas plasmáticas no intestino, incluindo albumina, por meio da mucosa intestinal inflamada. Pacientes com essa condição apresentam **gastrenteropatia com perda de proteínas**. A meia-vida da albumina nesses indivíduos poderá ser reduzida a apenas 1 dia.

A ALBUMINA É A PRINCIPAL PROTEÍNA DO PLASMA HUMANO

O fígado sintetiza aproximadamente 12 g de albumina por dia, o que representa cerca de 25% da síntese hepática total de proteínas e metade de suas proteínas secretadas. Aproximadamente 40% da albumina do corpo circulam no plasma, onde representa cerca de três quintos da proteína plasmática total por peso (3,4 a 4,7 g/dL). O restante reside no espaço extracelular. Em virtude de sua massa molecular relativamente baixa (em torno de 69 kDa) e de sua alta concentração, acredita-se que a albumina seja responsável por 75 a 80% da **pressão osmótica** do plasma humano. Como a maioria das outras proteínas secretadas, a albumina é inicialmente sintetizada como uma **pré-pró-proteína**. Seu **peptídeo-sinal** é removido quando a albumina entra nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, e um **hexapeptídeo** localizado na extremidade aminoterminal resultante é, em seguida, clivado ao longo da via secretora (ver Figura 49-12).

A albumina humana madura consiste em uma cadeia polipeptídica única de 585 aminoácidos de comprimento organizada em três domínios funcionais. A sua conformação elipsoidal é estabilizada por um total de 17 ligações dissulfeto internas à cadeia. Um dos principais papéis da albumina é ligar-se e, portanto, facilitar o transporte de diversos **ligantes**. Esses ligantes incluem ácidos graxos livres (AGL), cálcio, certos hormônios esteroides, bilirrubina, cobre e parte do tripotofano plasmático. Diversos fármacos, incluindo sulfonamidas, penicilina G, dicumarol e ácido acetilsalicílico ligam-se

à albumina, e esse achado tem implicações farmacológicas importantes. As preparações de albumina humana têm sido amplamente utilizadas no tratamento de queimaduras e do choque hemorrágico.

Alguns seres humanos sofrem mutações genéticas que prejudicam sua capacidade de sintetizar albumina. Diz-se que os indivíduos cujo plasma é completamente destituído de albumina exibem **analbuminemia**. Embora a albumina seja normalmente o principal determinante da pressão oncótica do plasma, indivíduos com analbuminemia apresentam apenas edema moderado. A síntese diminuída de albumina ocorre em várias doenças, sobretudo nas que acometem o fígado. O plasma de pacientes com **insuficiência hepática** frequentemente apresenta redução da razão entre albumina e globulinas (razão albumina-globulina diminuída). A síntese de albumina diminui de modo relativamente precoce em condições de desnutrição proteica, como o **kwashiorkor**.

OS NÍVEIS DE CERTAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS AUMENTAM DURANTE INFLAMAÇÃO OU APÓS LESÃO TECIDUAL

A **Tabela 52-3** fornece um resumo das funções de muitas das proteínas plasmáticas. A **proteína C-reativa** (CRP, assim denominada porque reage com o polissacarídeo C de pneumococos), a α_1 -antiproteínase, a haptoglobina, a α_1 -glicoproteína ácida e o fibrinogênio são classificados como **“proteínas de fase aguda”**. Acredita-se que as proteínas de fase aguda contribuam para a resposta do organismo à inflamação. A CRP pode estimular a via clássica do complemento (ver adiante), enquanto a α_1 -antitripsina neutraliza certas proteases liberadas durante o estado inflamatório agudo.

Os níveis das proteínas de fase aguda podem aumentar de 50% a até 1.000 vezes (no caso da CRP) durante estados inflamatórios crônicos e em pacientes com câncer. A **interleucina 1 (IL-1)**, um polipeptídeo liberado pelas células fagocíticas mononucleares, constitui o principal – mas não o único – fator estimulador da síntese da maioria dos reagentes de fase aguda pelos hepatócitos. Moléculas adicionais, como a IL-6, estão envolvidas. Como a sua concentração pode se elevar drasticamente, a CRP é utilizada como biomarcador de lesão tecidual, infecção e inflamação.

As **citocinas** são pequenas proteínas, como os interferons, as interleucinas (ILs) e os fatores de necrose tumoral, que facilitam a comunicação célula a célula entre os componentes do sistema imune. Elas podem ser de natureza autócrina ou parácrina. As citocinas IL-1 e IL-6 atuam em nível de transcrição gênica. Um de seus alvos primários é um fator de transcrição chamado de **fator nuclear kappa-B (NFκB)**, que também regula a expressão de genes que codificam muitas citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular. O NFκB, um heterodímero composto por um polipeptídeo de 50 e de 65 kDa, reside normalmente no citosol como um complexo inativo com uma segunda proteína, o inibidor- α do NFκB, também conhecido como **IκB α** . Sob estímulo em resposta à inflamação, à lesão ou à radiação, IκB α é

TABELA 52-3 Algumas funções das proteínas plasmáticas

Função	Proteínas plasmáticas
Antiproteases	Antiquimiotripsina α_1 -Antitripsina (α_1 -antiproteínase) α_2 -Macroglobulina Antitrombina
Coagulação sanguínea	Vários fatores da coagulação, fibrinogênio
Enzimas	Atuação no sangue (p. ex., fatores da coagulação, colinesterase) Extravasamento das células ou dos tecidos (p. ex., aminotransferases)
Hormônios	Eritropoietina ^a
Defesa imune	Imunoglobulinas, proteínas do complemento e β_2 -macroglobulina
Participação nas respostas inflamatórias	Proteínas da resposta de fase aguda (p. ex., proteína C-reativa, α_1 -glicoproteína ácida [orosomucoide])
Oncofetal	α_1 -Fetoproteína (AFP)
Proteínas de transporte ou de ligação	Albumina (vários ligantes, incluindo bilirrubina, ácidos graxos livres, íons [Ca^{2+}], metais [p. ex., Cu^{2+} , Zn^{2+}], met-heme, esteroides, outros hormônios e uma variedade de fármacos) Globulina de ligação aos corticosteroides (transcortina) (liga-se ao cortisol) Haptoglobina (liga-se à hemoglobina extracorpúscular) Lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, LDL, HDL) Hemopexina (liga-se ao heme) Proteína de ligação ao retinol (liga-se ao retinol) Globulina de ligação aos hormônios sexuais (liga-se à testosterona e ao estradiol) Globulina de ligação aos hormônios tireoidianos (liga-se a T_4 e a T_3) Transferrina (transporta o ferro) Transstiretina (anteriormente, pré-albumina; liga-se a T_4 e forma um complexo com a proteína de ligação ao retinol)

^aVários outros hormônios proteicos circulam no sangue, porém geralmente não são designados como proteínas plasmáticas. De modo semelhante, a ferritina também é encontrada no plasma em pequenas quantidades, mas muitas vezes não é caracterizada como proteína plasmática.

fosforilada e, em seguida, ubiquitinada e degradada. Uma vez liberado de sua porção inibidora, NF κ B ativo é translocado para o núcleo onde estimula a transcrição de seus genes-alvos.

A HAPTOGLOBINA PROTEGE OS RINS DA LESÃO PELA HEMOGLOBINA EXTRACORPUSCULAR

O ferro nas hemácias senescentes é reciclado pelos macrófagos

Normalmente, as hemácias apresentam tempo de sobrevivência de cerca de 120 dias. As hemácias senescentes ou danificadas são fagocitadas por macrófagos do sistema reticuloendotelial

(SRE) presentes no baço e no fígado. Cerca de 200 bilhões de hemácias (em cerca de 40 mL de sangue) são catabolizadas diariamente dessa maneira. No interior do macrófago, o heme proveniente da hemoglobina é degradado pela **hemo oxigenase**, que o converte em biliverdina (ver Figura 31-13). Ocorre liberação de monóxido de carbono e de ferro como subprodutos. O ferro liberado do heme é exportado da vesícula fagocítica no macrófago pela **NRAMP 1** (proteína do macrófago associada à resistência natural 1), um transportador homólogo ao DMT1. Em seguida, ela é transportada na circulação pela proteína transmembrana ferroportina (**Figura 52-3**). Portanto, a ferroportina desempenha um papel central, não apenas na absorção de ferro pelo intestino, mas também na sua liberação dos macrófagos. A **ceruloplasmina** (ver a seguir), uma proteína plasmática que contém cobre, sintetizada pelo fígado, é uma ferroxidase necessária para a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Em seguida, o Fe^{3+} liga-se à transferrina no sangue. O ferro liberado dos macrófagos por esse processo (cerca de 25 mg/dia) é reciclado e representa a principal fonte de ferro do organismo. Em comparação, a absorção intestinal de ferro contribui com apenas 1 a 2 mg das necessidades corporais diárias de ferro.

A haptoglobina remove a hemoglobina que escapou da reciclagem

Durante o curso do *turnover* da hemácia, cerca de 10% de uma hemoglobina da hemácia é liberada para a circulação. Essa hemoglobina **extracorpúscular** livre é suficientemente pequena, com cerca de 65 kDa, para atravessar o glomérulo renal para o interior dos túbulos, onde tende a formar precipitados nocivos. A **haptoglobina** (Hp) é uma glicoproteína plasmática que se liga à hemoglobina (Hb) extracorpúscular, formando um complexo firme não covalente (Hb-Hp). Como o complexo Hb-Hp é grande demais (≥ 155 kDa) para atravessar o glomérulo, este protege o rim da formação de precipitados nocivos e reduz a perda de ferro associada à hemoglobina extracorpúscular.

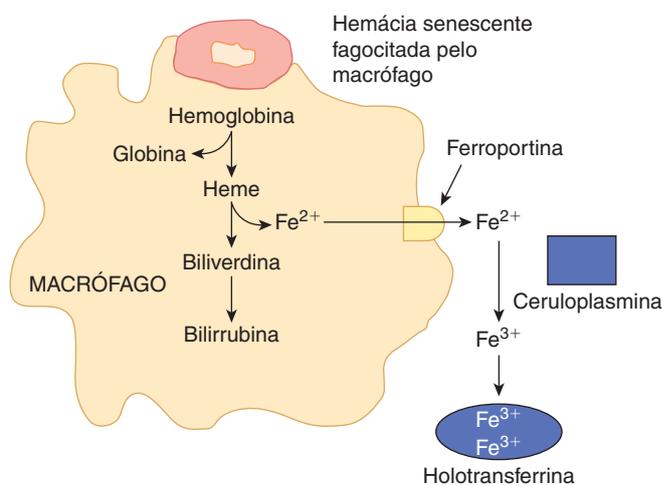


FIGURA 52-3 Reciclagem do ferro nos macrófagos. As hemácias senescentes são fagocitadas pelos macrófagos. A hemoglobina é degradada, e o ferro é liberado do heme pela ação da enzima hemo oxigenase. Então, o ferro ferroso é transportado para fora do macrófago pela ferroportina (Fp). No plasma, ele é oxidado à forma férrica pela ceruloplasmina antes de sua ligação à transferrina (Tf). No sangue, o ferro circula firmemente ligado à Tf.

A haptoglobina apresenta formas polimórficas

A haptoglobina humana é encontrada em **três formas polimórficas**, conhecidas como Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2. A Hp 1-1 migra durante a eletroforese em gel de amido como uma banda única, ao passo que a Hp 2-1 e a Hp 2-2 exibem padrões de bandas mais complexos. Dois genes, designados como Hp^1 e Hp^2 , determinam esses três fenótipos, com Hp 2-1 sendo o fenótipo heterozigoto.

Em geral, o nível de haptoglobina no plasma humano é suficiente para ligar 40 a 180 mg de hemoglobina por decilitro. As variações além do normal podem servir ocasionalmente como indicadores diagnósticos úteis. Por exemplo, a haptoglobina é uma proteína de fase aguda, e seu nível plasmático apresenta-se elevado em uma variedade de estados inflamatórios. Pacientes que sofrem de **anemias hemolíticas** exibem baixos níveis de haptoglobina. Isso ocorre porque, embora a meia-vida da haptoglobina seja de cerca de 5 dias, o complexo Hb-Hp é removido rapidamente pelos hepatócitos (meia-vida de 90 minutos). Consequentemente, quando a haptoglobina está ligada à hemoglobina, ela é depurada do plasma com velocidade cerca de 80 vezes maior do que a normal. Por esse motivo, o nível de haptoglobina declina rapidamente em situações nas quais a hemoglobina é liberada constantemente das hemácias, conforme observado nas anemias hemolíticas. O nível da **proteína relacionada à haptoglobina**, outra proteína plasmática que possui alto grau de homologia com a haptoglobina, encontra-se elevado em alguns pacientes com câncer, embora a importância desse fato não seja compreendida.

Algumas outras proteínas plasmáticas **se ligam ao heme**, mas não à hemoglobina. A **hemopexina** é uma β_1 -globulina que se liga ao heme livre. A **albumina** liga-se a algumas moléculas de met-heme (heme férrico), formando metalbumina, que, em seguida, transfere o met-heme para a hemopexina.

O FERRO É ESTRITAMENTE CONSERVADO

O **ferro** é um constituinte fundamental de muitas proteínas humanas, incluindo hemoglobina, mioglobina, grupo de enzimas do citocromo P450, vários componentes da cadeia de transporte de elétrons e ribonucleotídeo redutase, que catalisa a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. O ferro do corpo, que é distribuído como mostrado na **Tabela 52-4**, é altamente conservado. Um adulto saudável perde apenas cerca de 1 a 1,5 mg (< 0,05%) de suas 3 a 4 g de ferro corporal por dia. Entretanto, uma mulher na fase de pré-menopausa pode apresentar deficiência de ferro devida à perda sanguínea durante a menstruação.

A absorção de ferro não heme pelos enterócitos no duodeno proximal é um processo rigorosamente controlado (**Figura 52-4**). O **ferro inorgânico alimentar** no estado férrico (Fe^{3+}) é reduzido à sua forma ferrosa (Fe^{2+}) por uma ferrirredutase ligada à membrana da borda em escova, o **citocromo b duodenal (Dcytb)**. A vitamina C, o ácido gástrico e vários outros agentes redutores presentes nos alimentos também podem favorecer a redução do ferro férrico ao ferro ferroso.

TABELA 52-4 Distribuição de ferro em um homem adulto com 70 kg^a

Transferrina	3-4 mg
Hemoglobina das hemácias	2.500 mg
Na mioglobina e em várias enzimas	300 mg
Nas reservas (ferritina)	1.000 mg
Absorção	1 mg/dia
Perdas	1 mg/dia

^aEm uma mulher adulta de peso semelhante, as reservas geralmente seriam menores (100-400 mg), e as perdas, maiores (1,5-2 mg/dia).

A transferência do ferro pela membrana apical dos enterócitos é efetuada via **transportador de metais divalentes 1 (DMT1 ou SLC11A2)**. O DMT1 é relativamente inespecífico e também pode estar envolvido no transporte de outros cátions divalentes, como Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} . Uma vez no interior dos enterócitos, o ferro pode ser armazenado ligado à proteína de armazenamento do ferro **ferritina** ou pode ser transferido pela membrana basolateral para a circulação pela proteína exportadora de ferro, a **ferroportina** ou **proteína de regulação do ferro 1 (IREG1 ou SLC40A1)**. A **hefastina**, uma ferroxidase que contém cobre homóloga à ceruloplasmina, oxida o Fe^{2+} em Fe^{3+} antes da exportação. O ferro é transportado no plasma na forma Fe^{3+} pela proteína de transporte, a **transferrina**. Qualquer excesso de ferro ligado à ferritina retido pelos enterócitos é descartado quando os enterócitos são descartados no interior do lúmen intestinal.

O ferro de origem alimentar ingerido como heme é absorvido por um mecanismo distinto. Após a absorção pelos enterócitos, o ferro é liberado a partir do heme pela ação enzimática da hemeoxigenase (ver Capítulo 31). Uma vez liberado, o ferro é armazenado em associação com a ferritina ou transportado para a circulação pela ferroportina.

A ferritina pode ligar-se a milhares de átomos de Fe^{3+}

Em geral, o corpo humano pode armazenar até 1 g de ferro, a maior parte ligada à **ferritina**. A ferritina (peso molecular de 440 kDa) é composta por 24 subunidades idênticas, que envolvem até 3.000 a 4.500 átomos férricos. A subunidade pode ser do tipo H (pesada) ou do tipo L (leve). A subunidade H exibe atividade de ferroxidase, que é necessária para a ligação do ferro à ferritina. A função da subunidade L não está claramente estabelecida, no entanto sugeriu-se que ela contribua para a nucleação e a estabilidade da ferritina. Em condições normais, existe pequena quantidade de ferritina no plasma humano (50 a 200 $\mu g/dL$) proporcional às reservas totais de ferro do organismo. Portanto, os níveis plasmáticos de ferritina são considerados um **indicador das reservas corporais de ferro**. Entretanto, não se sabe se a ferritina do plasma é derivada de células lesadas ou da secreção de células saudáveis.

A **hemossiderina**, uma forma parcialmente degradada de ferritina que contém ferro, pode ser detectada em tecidos por corantes histológicos (p. ex., azul da prússia), sob condições de sobrecarga de ferro (**hemossiderose**).

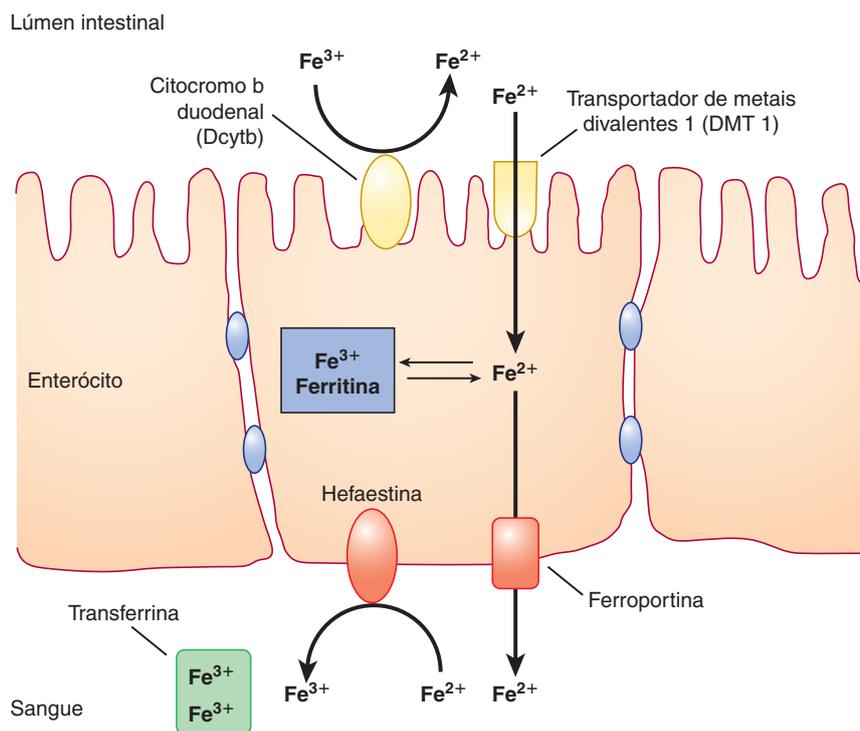


FIGURA 52-4 Transporte do ferro não heme nos enterócitos. O ferro férrico é reduzido à forma ferrosa por uma ferrirredutase luminal, o citocromo b duodenal (Dcytb). O ferro na forma ferrosa é transportado para o interior dos enterócitos pelo transportador de metais divalentes 1 (DMT1). No interior do enterócito, o ferro é armazenado como ferritina ou transportado para fora da célula pela ferroportina (Fp). O ferro ferroso é oxidado à sua forma férrica pela hefaestina. Em seguida, o ferro férrico é ligado pela transferrina para ser transportado pelo sangue a vários locais do organismo. (Com base em Andrews NC: Forging a field: the golden age of iron biology. Blood 2008;112:219.)

A transferrina transporta o ferro para onde for necessário

A toxicidade extrema do ferro livre é consequência de sua capacidade de catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio nocivas (Figura 52-5). Organismos biológicos minimizam a toxicidade potencial do ferro utilizando reservatórios especializados e proteínas de transporte. Em seres humanos, o ferro é transportado pelo corpo firmemente ligado à proteína plasmática **transferrina (Tf)**, uma glicoproteína sintetizada pelo fígado. Essa β_1 -globulina possui massa molecular de aproximadamente 76 kDa e contém dois sítios de ligação de alta afinidade pelo Fe^{3+} . A forma da proteína na qual ambos os sítios são ocupados é chamada de **holotransferrina (Tf-Fe)**. A transferrina é uma glicoproteína sintetizada no fígado. A concentração de Tf no plasma é de cerca de 300 mg/dL, suficiente para carregar um total de aproximadamente 300 μg de ferro por decilitro de plasma. Essa quantidade constitui a **capacidade total de ligação do ferro (TIBC)** do plasma. Na maioria dos casos, os sítios de ligação na transferrina não se encontram



FIGURA 52-5 Reação de Fenton. O ferro livre é extremamente tóxico, visto que pode catalisar a formação de radical hidroxil (OH^\cdot) a partir do peróxido de hidrogênio (ver também Capítulo 53). O radical hidroxil é uma espécie transitória, porém altamente reativa, que pode oxidar macromoléculas celulares com consequente lesão tecidual.

completamente ocupados, ou **saturados**. Em geral, cerca de 30% dos sítios de ligação do ferro na transferrina estão ocupados. A saturação pode cair para menos de 16% na deficiência grave de ferro e pode aumentar para mais de 45% em condições de sobrecarga de ferro.

A glicosilação da transferrina encontra-se comprometida em **distúrbios congênitos de glicosilação** (ver Capítulo 46), assim como no **alcoolismo crônico**. A presença da **transferrina deficiente em carboidratos (TDC)**, que pode ser avaliada por focalização isoeletrica (IEF), é utilizada como biomarcador do alcoolismo crônico.

O ciclo da transferrina facilita a captação celular de ferro

Para a liberação do ferro transportado, a célula receptora deve ligar-se à transferrina circulante via receptor de superfície, o **receptor de transferrina 1 (TfR1)**. O complexo do receptor de transferrina é, em seguida, internalizado por **endocitose mediada pelo receptor** (semelhante aos receptores de LDL descritos no Capítulo 25), e o ferro ligado é liberado da proteína enquanto os endossomos tardios são acidificados. O ferro dissociado sai do endossomo através do DMT1 e passa para o citoplasma. Ao contrário do componente proteico do LDL, a apoTf (Tf sem ferro ligado) não é degradada no interior do endossomo. Em vez disso, ela permanece associada ao seu receptor e retorna à membrana plasmática. Em seguida, a apoTf reciclada dissocia-se de seu receptor e volta ao plasma, onde

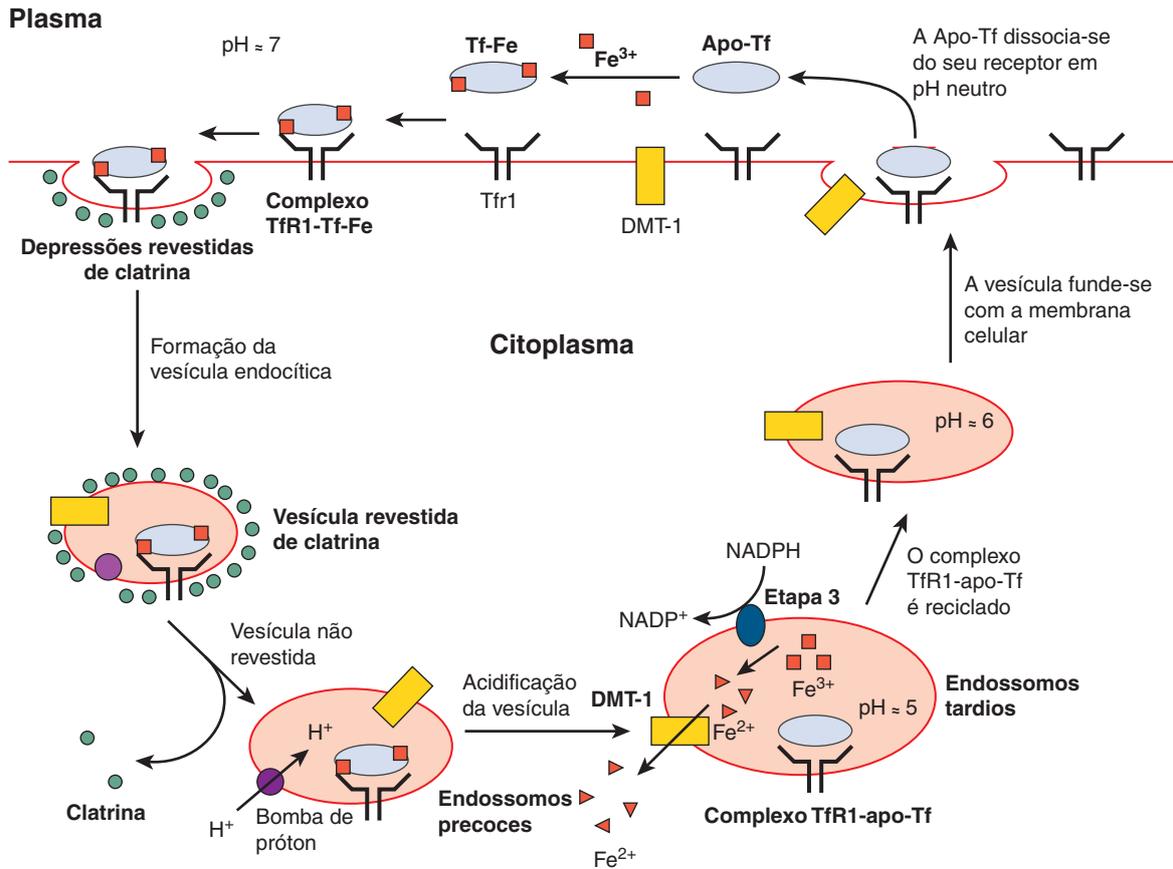


FIGURA 52-6 Ciclo da transferrina. A holotransferrina (Tf-Fe) liga-se ao receptor de transferrina 1 (TfR1) presente em depressões revestidas de clatrina na superfície celular. O complexo TfR1-Tf-Fe sofre endocitose, e as vesículas endocíticas fundem-se para formar os endossomos precoces. Os endossomos precoces transformam-se em endossomos tardios, que apresentam pH interno baixo. Essas condições ácidas de baixo pH causam a liberação de ferro da transferrina. A apotransferrina (apoTf) resultante permanece ligada ao TfR1. O ferro férrico é convertido à sua forma ferrosa pela ferrirredutase, Etapa 3, e em seguida transportada para o citosol via DMT1. O complexo TfR1-apoTf é reciclado de volta à superfície celular. Na superfície celular, a apoTf é liberada do TfR1. Em seguida, o TfR1 liga-se a uma nova Tf-Fe. Essa etapa completa o ciclo da transferrina.

capta mais ferro para liberar para as células. Esse processo é conhecido como **ciclo da transferrina** (Figura 52-6).

O TfR1 pode ser encontrado na superfície da maioria das células. O **receptor de transferrina 2 (TfR2)**, por outro lado, é expresso principalmente na superfície de hepatócitos e também nas células crípticas do intestino delgado. A afinidade de TfR2 por Tf-Fe é muito menor do que a de TfR1. A menor afinidade de TfR2 otimiza-o para o seu papel em relação à sensibilidade, e não à internalização do ferro, como será discutido adiante.

A oxidação pela ceruloplasmina é uma característica importante do ciclo do ferro

Após a destruição de hemácias fagocitadas, o ferro liberado dos macrófagos encontra-se principalmente sob o estado ferroso, Fe^{2+} . Entretanto, a fim de ser recuperado pelo ciclo da transferrina, esse ferro deve ser inicialmente oxidado ao seu estado férrico, Fe^{3+} . No sangue, a oxidação do ferro ferroso é catalisada pela ferroxidase multicobre **ceruloplasmina**, uma α_2 -globulina de 160 kDa sintetizada pelo fígado. A ceruloplasmina, que também é expressa nos enterócitos e na placenta, é

a principal proteína com cobre no plasma. Os seus seis átomos de cobre ligados funcionam como grupamentos prostéticos cataliticamente essenciais.

Deficiências na ceruloplasmina comprometem a homeostasia do ferro

Indivíduos que não possuem quantidades adequadas de ceruloplasmina cataliticamente ativas no sangue são incapazes de reciclar adequadamente o Fe^{2+} , levando ao acúmulo de ferro no fígado e em outros tecidos. A deficiência de ceruloplasmina pode originar-se de causas genéticas, assim como de falta de cobre – um micronutriente essencial – na dieta. Indivíduos que sofrem de **hipoceruloplasminemia**, uma condição geneticamente herdada na qual os níveis de ceruloplasmina se encontram aproximadamente a 50% do normal, em geral não apresentam anormalidades clínicas. Entretanto, mutações genéticas que anulam a atividade ferroxidase da ceruloplasmina, a **aceruloplasminemia**, podem levar a consequências fisiológicas graves. Quando não tratado, o acúmulo progressivo de ferro nas ilhotas pancreáticas e nos gânglios basais leva, por fim, ao desenvolvimento de diabetes dependente de insulina

e degeneração neurológica, que pode se manifestar como demência, disartria e distonia.

Os níveis de ceruloplasmina aumentam na doença de Wilson

Reduções graves no nível da proteína ceruloplasmina no soro também funcionam como biomarcador para a **doença de Wilson**, condição genética na qual uma mutação no gene que codifica uma **ATPase tipo P que se liga ao cobre** (proteína ATP7B) bloqueia a excreção de excesso de cobre na bile. Como consequência, o cobre acumula-se no fígado, no encéfalo, nos rins e nas hemácias. Paradoxalmente, níveis crescentes de cobre no interior de células hepáticas aparentemente interferem na incorporação desse metal nos polipeptídeos de ceruloplasmina recém-sintetizados (apoceruloplasmina), levando à queda nos níveis plasmáticos de ceruloplasmina. Quando não tratados, os pacientes que sofrem de **toxicose por cobre** podem desenvolver anemia hemolítica, insuficiência hepática crônica (cirrose e hepatite) e síndromes neurológicas devidas ao acúmulo de cobre nos gânglios basais e em outros centros. A doença de Wilson pode ser tratada limitando-se a ingestão alimentar de cobre e depletando o corpo do excesso de cobre pela administração regular de **penicilamina**, que quela o cobre e é, então, secretada na urina.

A HOMEOSTASIA INTRACELULAR DE FERRO É RIGOROSAMENTE REGULADA

As sínteses de TfR1 e ferritina são reciprocamente reguladas

As taxas de síntese do TfR1 e da ferritina estão ligadas reciprocamente aos níveis intracelulares de ferro. Quando o ferro está baixo, a síntese de TfR1 aumenta e a de ferritina diminui. O oposto ocorre quando o ferro é abundante e as necessidades teciduais tiverem sido satisfeitas. O controle é exercido por meio da ligação das proteínas regulatórias do ferro (IRPs) a estruturas em formato de alças, chamadas de **elementos de resposta ao ferro (IREs)**, localizadas nas regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3' dos mRNAs que codificam para ferritina e TfR1, respectivamente (**Figura 52-7**). As IRPs ligam-se aos IREs apenas quando os níveis intracelulares de ferro estão baixos. A ligação do mRNA do TfR1 à UTR 3' o estabiliza, aumentando a síntese e a expressão de TfR1 na superfície celular. Alternativamente, a ligação de uma IRP ao IRE localizado na UTR 5' do mRNA da ferritina bloqueia a tradução. De forma semelhante, quando os níveis de ferro estão elevados, as IRPs dissociam-se. Sob essas circunstâncias, a tradução do mRNA da ferritina é facilitada e o mRNA do TfR1 é rapidamente degradado.

A hepcidina constitui o principal regulador da homeostasia sistêmica do ferro

O peptídeo de 25 aminoácidos **hepcidina** desempenha um papel central na homeostasia do ferro. Sintetizada no fígado como precursor de 84 aminoácidos (pró-hepcidina), a

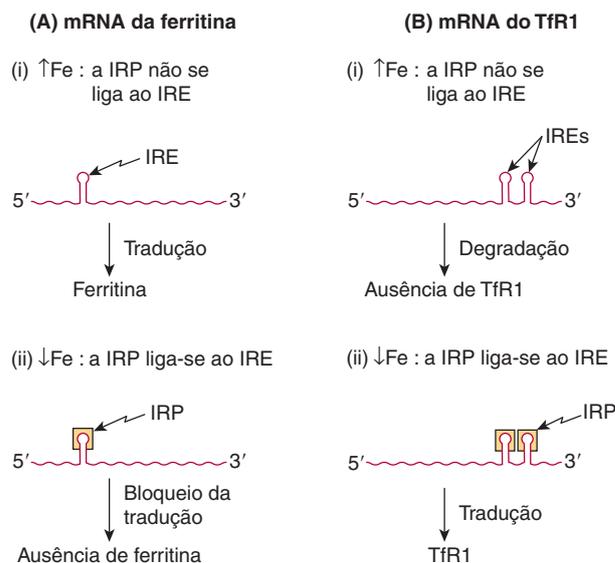


FIGURA 52-7 Representação esquemática da relação recíproca entre a síntese de ferritina e o receptor de transferrina 1 (TfR1). O mRNA para a ferritina está representado à esquerda, ao passo que o do TfR1 está representado à direita do diagrama. Na presença de altas concentrações de ferro, o ferro ligado à IRP impede a ligação dos IREs em qualquer tipo de mRNA. O mRNA da ferritina pode ser traduzido nessas circunstâncias, e ocorre síntese de ferritina. Por outro lado, quando a IRP é incapaz de se ligar ao IRE no mRNA para o TfR1, esse mRNA sofre degradação. Em contrapartida, na presença de baixas concentrações de ferro, a IRP pode ligar-se aos IREs em ambos os tipos de mRNA. No caso do mRNA da ferritina, isso impede a sua tradução. Em consequência, não há síntese de ferritina. No caso do mRNA para o TfR1, a ligação da IRP impede a degradação do mRNA, que é traduzido, e ocorre síntese de TfR1. IRE, elemento de resposta ao ferro; IRP, proteína reguladora do ferro.

hepcidina liga-se ao exportador celular de ferro, a ferroportina, ativando sua internalização e degradação. A consequente redução da ferroportina leva à diminuição da absorção de ferro no intestino (produzindo um “bloqueio da mucosa”) e à redução da reciclagem de ferro pelos macrófagos (**Figura 52-8**). Juntos, esses fatos levam à redução dos níveis circulantes de ferro (hipoferremia), assim como à redução da transferência placentária de ferro durante a gestação. Quando os níveis plasmáticos de ferro estão elevados, a síntese hepática de hepcidina aumenta, reduzindo a absorção do ferro e a reciclagem de ferro dos macrófagos. Observa-se o processo oposto quando os níveis plasmáticos de ferro estão baixos.

A expressão de hepcidina é influenciada por ferro, eritropoiese, inflamação e hipóxia

As células hepáticas monitoram os níveis de ferro utilizando um “complexo sensível ao ferro” multicomponente composto por dois receptores transmembranas cujos centros consistem em homodímeros de TfR1 e TfR2, respectivamente. Esses dois complexos são ligados por uma terceira proteína transmembrana, a **proteína HFE**, que se encontra normalmente mutada na hemocromatose (**Figura 52-9**). A proteína HFE é uma molécula semelhante ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I, expressa na superfície celular, onde se liga à

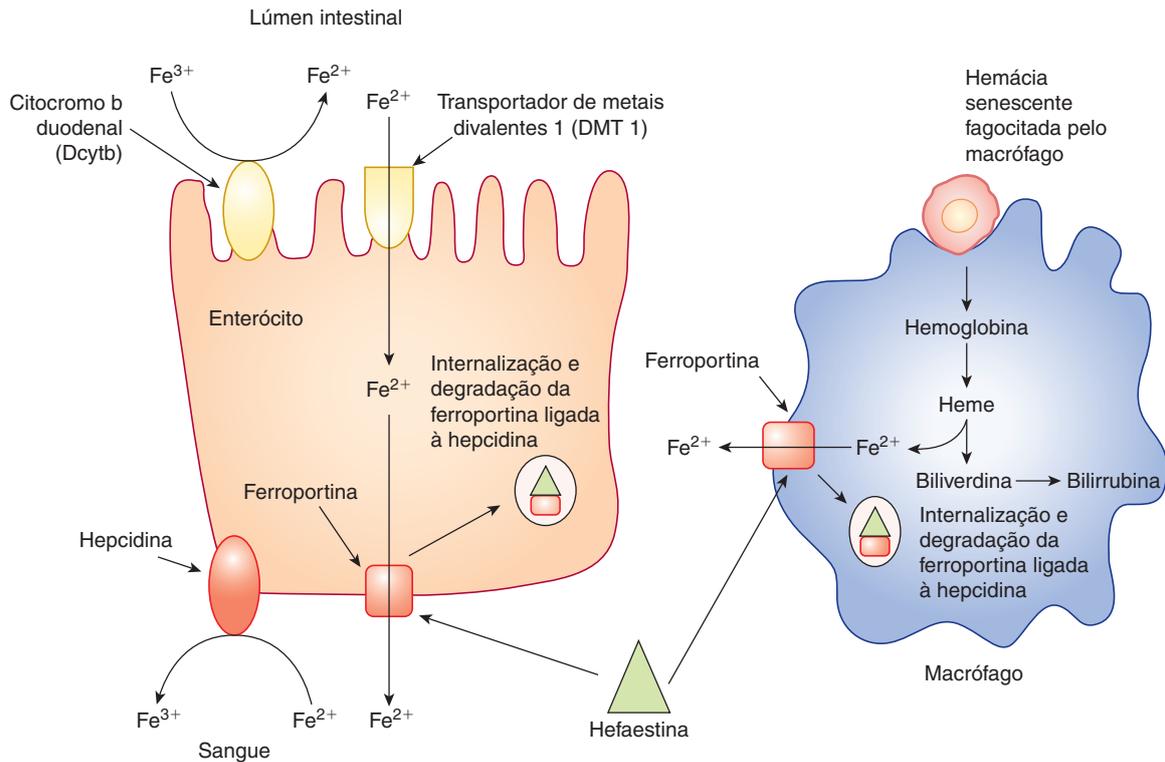


FIGURA 52-8 Papel da hepcidina na regulação sistêmica do ferro. A hepcidina liga-se à ferroportina expressa na superfície dos enterócitos e dos macrófagos e desencadeia a sua internalização e degradação. Isso diminui a absorção intestinal de ferro e inibe a liberação de ferro dos macrófagos, levando à hipoferremia. (Com base em Andrews NC: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112[2]:219.)

β_2 -microglobulina (um componente das moléculas do MHC de classe I, não mostradas na Figura 52-9) e, normalmente, ao TfR1. O TfR1 também se liga à forma da transferrina ligada ao ferro (Tf-Fe) e faz isso em um sítio que se sobrepõe ao sítio de HFE. Quando o ferro é abundante e os níveis de Tf-Fe estão elevados, a HFE é deslocada de TfR1. Então, a proteína HFE deslocada liga-se ao TfR2, formando um complexo que poderá ser posteriormente estabilizado, ligando-se a Tf-Fe. A ligação de HFE ao TfR2 desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que ativa a expressão de *HAMP*, o gene que codifica a hepcidina.

Proteínas morfogenéticas ósseas influenciam a expressão de hepcidina

Enquanto as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) atuam por mecanismos distintos da proteína HFE, existe considerável comunicação cruzada entre essas vias. A BMP liga-se a um receptor de superfície celular (BMPR) cuja afinidade de ligação é aumentada pela ligação a um correceptor, a **hemojuvelina** (HJV). A ativação do complexo BMPR-HJV desencadeia a fosforilação de proteínas de sinalização intracelular, chamadas de **SMADs**, resultando, posteriormente, na ativação transcripcional da hepcidina (Figura 52-9).

Sinais eritropoiéticos regulam os níveis de hepcidina

A síntese de hepcidina é reduzida em indivíduos que sofrem de β -talassemia maior, que é caracterizada por eritropoiese

ineficiente e sobrecarga de ferro. Duas moléculas secretadas pelos eritroblastos, o **fator de diferenciação do crescimento 15 (GDF15)** e a **gastrulação torcida 1 (TWSG1)**, também foram demonstradas como inibidoras da expressão da hepcidina na β -talassemia.

A síntese de hepcidina é induzida por citocinas, como a **interleucina 6 (IL-6)**, que são liberadas como parte de uma resposta inflamatória. A ligação de IL-6 ao seu receptor na superfície celular estimula a expressão gênica por meio da ativação da via JAK-STAT (Janus-cinase – transdutor de sinal e ativador da transcrição) (Figura 52-9). A anemia associada à inflamação crônica (**anemia da inflamação**, ou **AI**) é provavelmente causada pela *upregulation* da hepcidina mediada pela inflamação. A AI manifesta-se como anemia microcítica hipocrômica refratária à suplementação de ferro. A **hipóxia** é suprimida pela expressão de hepcidina. Esse efeito é mediado pela eritropoietina, cuja síntese é controlada pelos fatores de transcrição 1 e 2 induzíveis por hipóxia (HIF-1 e HIF-2).

A DEFICIÊNCIA DE FERRO E A ANEMIA SÃO COMUNS EM TODO O MUNDO

A deficiência de ferro é extremamente comum em muitas partes do mundo, sobretudo nos países subdesenvolvidos. As principais causas da insuficiência de ferro incluem deficiência alimentar, má absorção, hemorragia gastrointestinal e

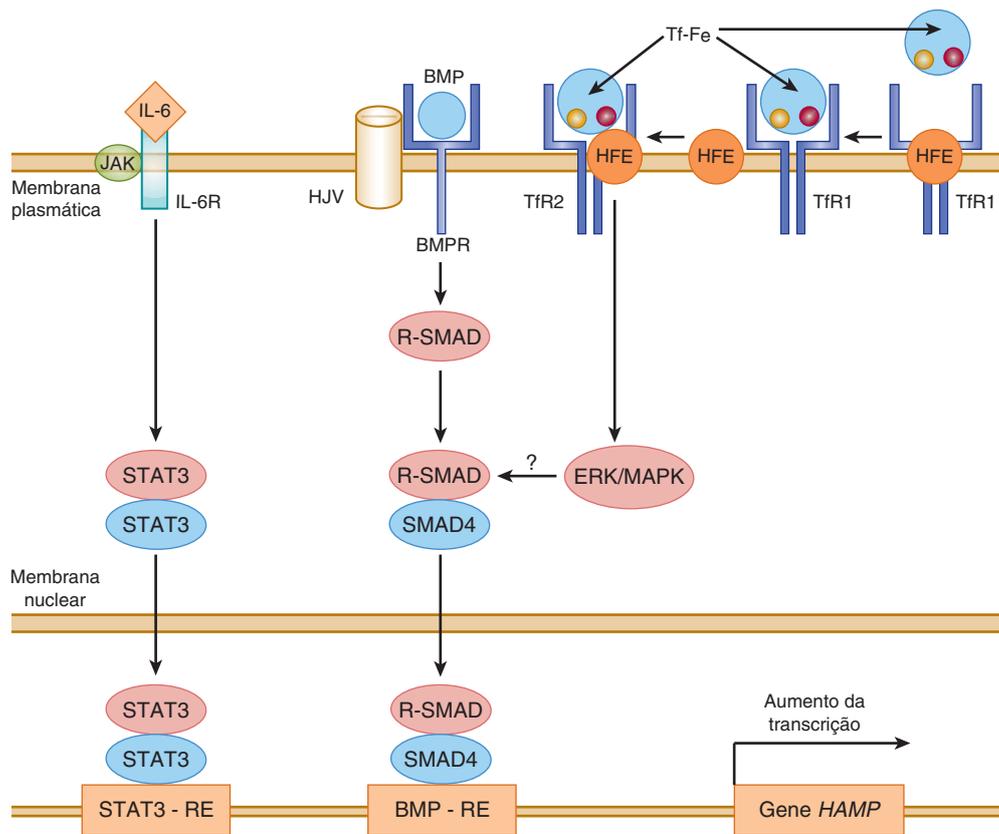


FIGURA 52-9 Regulação da expressão do gene da hepcidina. A Tf-Fe (holotransferrina) compete com a proteína HFE pela sua ligação ao TfR1. Os altos níveis de Tf-Fe deslocam a HFE de seu sítio de ligação no TfR1. A HFE deslocada liga-se ao TfR2 juntamente com Tf-Fe, sinalizando a via ERK/MAPK para induzir a expressão de hepcidina. A BMP liga-se a seu receptor BMPR e à HJV (correceptor) para ativar R-SMAD. R-SMAD sofre dimerização com SMAD4 e, em seguida, translocação para o núcleo, onde se liga ao BMP-RE, resultando em ativação transcricional da hepcidina, como mostra a figura. A IL-6, que é um biomarcador de inflamação, liga-se a seu receptor de superfície celular e ativa a via JAK-STAT. A STAT3 é translocada para o núcleo, onde se liga a seu elemento de resposta (STAT-RE) no gene da hepcidina para induzi-lo. BMP, proteína morfogenética óssea; BMPR, receptor da BMP; BMP-RE, elemento de resposta da BMP; ERK-MAPK, cinase extracelular regulada por sinal/proteína-quinase ativada por mitógeno; *HAMP*, gene que codifica o peptídeo antimicrobiano hepcidina (hepcidina); HJV, hemojuvelina; IL-6, interleucina-6; IL-6R, receptor de interleucina 6; JAK, cinase associada à Janus; SMAD, proteína relacionada a Sma e MAD (Mothers Against Decapentaplegic); STAT, transdutor de sinal e ativador da transcrição; STAT3-RE, elemento de resposta STAT3; TfR1, receptor de transferrina 1; TfR2, receptor de transferrina 2. (Redesenhada de Hentz MW, Muckenthaler MU, Gali B, et al: Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. Cell 2010;142:24.)

perda de sangue episódica, como na menstruação. A deficiência de ferro persistente poderá levar à anemia. A ausência de correspondência entre a absorção de ferro intestinal e as exigências do corpo leva ao **balanço negativo de ferro**. Esse fato leva à depleção progressiva dos reservatórios de ferro, conforme são mobilizados para atender às necessidades. Nesse estágio, todos os exames laboratoriais estão normais, com exceção dos baixos níveis séricos de ferritina, um biomarcador das reservas corporais de ferro. Se os níveis séricos de ferritina caírem abaixo de 15 µg/dL, os níveis de transferrina aumentarão, produzindo elevação na **capacidade total de ligação ao ferro**. O nível de **saturação da transferrina**, entretanto, cairá. Atingindo 20% ou menos, a síntese de hemoglobina será comprometida, levando à **eritropoiese deficiente em ferro**. Se a deficiência de ferro não for corrigida, os níveis de hemoglobina no sangue cairão gradualmente, levando à **anemia por deficiência de ferro**. Em geral, pacientes apresentam **quadro**

sanguíneo microcítico hipocrômico acompanhado por fadiga, palidez e capacidade de exercício reduzida.

As hemácias de indivíduos que sofrem de anemia por deficiência de ferro apresentam níveis elevados de receptor de transferrina 1 de superfície e déficits na incorporação de ferro na protoporfirina IX, catalisada pela ferroquelatase. O aumento resultante dos níveis da **proteína do receptor solúvel de transferrina (sTfR)** liberados no plasma pela proteólise parcial dos receptores de transferrina da superfície celular e o acúmulo de **protoporfirina da hemácia** funcionam como biomarcadores diagnósticos para a anemia por deficiência de ferro. A estimativa do nível sérico de sTfR é especialmente útil para distinguir a anemia devida à inflamação crônica, que não afeta o nível de receptores de transferrina da hemácia, da anemia por deficiência de ferro. A **Tabela 52-5** resume os níveis destes e de outros biomarcadores utilizados clinicamente, em geral observados conforme os pacientes progredem em cada estágio da anemia por deficiência de ferro.

TABELA 52-5 Alterações nos vários exames laboratoriais empregados para a avaliação de anemia ferropriva

Parâmetro	Normal	Balanco de ferro negativo	Eritropoiese deficiente em ferro	Anemia ferropriva
Ferritina sérica (µg/dL)	50-200	Diminuída < 20	Diminuída < 15	Diminuída < 15
Capacidade total de ligação do ferro (TIBC) (µg/dL)	300-360	Ligeiramente aumentada > 360	Aumentada > 380	Aumentada > 400
Ferro sérico (µg/dL)	50-150	Normal	Diminuído < 50	Diminuído < 30
Saturação da transferrina (%)	30-50	Normal	Diminuída < 20	Diminuída < 10
Protoporfirina eritrocitária (µg/dL)	30-50	Normal	Aumentada	Aumentada
Receptor solúvel de transferrina (µg/dL)	4-9	Aumentado	Aumentado	Aumentado
Morfologia das hemácias	Normal	Normal	Normal	Microcítica hipocrômica

Modificada, com permissão, da Figura 98-2, página 630, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. Fauci AS, et al. (editors). McGraw-Hill, 2008.

A hemocromatose hereditária caracteriza-se por sobrecarga de ferro

A presença de ferro corável nos tecidos, a **hemossiderose**, é característica de indivíduos que sofrem de **hemocromatose** ou sobrecarga de ferro. As formas hereditárias de hemocromatose são causadas por mutações no gene *HFE* ou, menos frequentemente, nos genes que codificam hepcidina, *TfR2*, *HJV* ou ferroportina que levam à hiperabsorção de ferro pelos intestinos (Tabela 52-6). A **sobrecarga de ferro secundária** está geralmente associada à eritropoiese ineficaz, conforme observado nas síndromes de talassemia. As transfusões repetidas de sangue também podem resultar em sobrecarga progressiva de ferro. Em qualquer um dos casos, o acúmulo de ferro no fígado, no coração e no pâncreas pode gerar níveis tóxicos de espécies reativas de oxigênio.

INIBIDORES DO SORO IMPEDEM A PROTEÓLISE INDISCRIMINADA

As proteases são participantes essenciais na remodelagem tecidual, na coagulação sanguínea, na eliminação de células velhas

TABELA 52-6 Condições de sobrecarga de ferro

Hemocromatose hereditária
<ul style="list-style-type: none"> • Hemocromatose relacionada à HFE (tipo 1) • Hemocromatose não relacionada à HFE <ul style="list-style-type: none"> • Hemocromatose juvenil (tipo 2) <ul style="list-style-type: none"> • Mutação da hepcidina (tipo 2A) • Mutação da hemojuvelina (tipo 2B) • Mutação do receptor de transferrina 2 (tipo 3) • Mutação da ferroportina (tipo 4)
Hemocromatose secundária
<ul style="list-style-type: none"> • Anemia caracterizada por eritropoiese ineficaz (p. ex., talassemia maior) • Transfusões sanguíneas repetidas • Ferroterapia parenteral • Sobrecarga alimentar de ferro (siderose de Bantu)
Diversas condições associadas à sobrecarga de ferro
<ul style="list-style-type: none"> • Doença hepática alcoólica • Esteato-hepatite não alcoólica • Hepatite C

ou lesadas, na destruição de patógenos invasores e em outras funções fisiológicas. Quando não controladas, entretanto, as enzimas proteolíticas que são secretadas ou escapam para a corrente sanguínea podem comprometer o tecido saudável. A proteção da proteólise indiscriminada envolve várias proteínas séricas que inibem e, portanto, limitam a ação da protease.

A deficiência genética de α_1 -antiproteinase (α_1 -antitripsina) está associada ao enfisema e a um tipo de doença hepática

A **α_1 -antiproteinase**, uma glicoproteína de 394 resíduos que constitui > 90% da fração α_1 das proteínas plasmáticas, é o principal **inibidor da serina-protease (serpin)** ou **Pi** no sangue humano. Anteriormente chamada de α_1 -antitripsina, a α_1 -antiproteinase inibe a tripsina, a elastase e outras serinas proteases, associando-se a elas e formando um complexo covalente inativo. Ocorrem pelo menos 75 **formas polimórficas**. O principal genótipo é MM e seu produto fenotípico é PiM. A α_1 -antiproteinase é sintetizada por hepatócitos e macrófagos. Uma deficiência dessa serpin desempenha um papel em certos casos (cerca de 5%) de enfisema, particularmente em indivíduos com o **genótipo ZZ** (que sintetizam PiZ) e nos heterozigotos PiSZ, ambos secretando uma quantidade de proteína consideravelmente menor do que os indivíduos PiMM.

A oxidação de Met₃₅₈ inativa a α_1 -antiproteinase

A fumaça produzida pela queima dos produtos do tabaco e por muitas atividades industriais contém componentes que reagem nos pulmões com a α_1 -antiproteinase, oxidando um resíduo fundamental de **metionina** localizado no seu domínio de ligação à protease, Met₃₅₈. A α_1 -antiproteinase oxidada não pode mais se ligar e neutralizar as serinas-proteases. O dano produzido pela atividade proteolítica não verificada da elastase e de outras serinas proteases no tecido pulmonar pode contribuir para o desenvolvimento de enfisema. O tabagismo pode ser particularmente devastador para pacientes (p. ex., fenótipo PiZZ) que já apresentam baixos níveis de α_1 -antiproteinase. A administração intravenosa de serpin (terapia de reforço) tem sido utilizada como medida adjuvante no tratamento de pacientes com enfisema que apresentam deficiência de α_1 -antiproteinase. A redução adicional da α_1 -antitripsina provocada pelo tabagismo resulta em maior destruição proteolítica do

tecido pulmonar, acelerando o desenvolvimento do enfisema. Indivíduos com deficiência de α_1 -antiproteínase também apresentam maior risco de lesão pulmonar sob condições, como a pneumonia, que induzem o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no pulmão.

A deficiência de α_1 -antiproteínase também está implicada na **insuficiência hepática por deficiência de α_1 -antitripsina**, que acomete indivíduos que possuem o fenótipo ZZ. A α_1 -antiproteínase acumula-se nos hepatócitos de indivíduos afetados, formando agregados poliméricos nas cisternas do retículo endoplasmático. A propensão para formar agregados tem sido associada à substituição do Glu₃₄₂ da α_1 -antiproteínase pela **lisina** em indivíduos ZZ. A **hepatite** leva à **cirrose**.

A α_2 -macroglobulina neutraliza muitas proteases e direciona determinadas citocinas para os tecidos

A **α_2 -macroglobulina**, um membro da família de proteínas plasmáticas tiol-éster, constitui 8 a 10% das proteínas plasmáticas totais em seres humanos. Essa glicoproteína homotetramérica é o membro mais abundante de um grupo de proteínas plasmáticas que incluem as proteínas do complemento C3 e C4. A α_2 -macroglobulina é sintetizada por monócitos, hepatócitos e astrócitos. Ela modula a inibição e a depuração de um amplo espectro de proteases ardilosas por um mecanismo de “planta carnívora”. Os componentes fundamentais da armadilha incluem um “domínio-isca” de 35 resíduos localizado próximo ao meio de sua sequência polipeptídica e um tiol-éster cíclico interno ligando uma cisteína a um resíduo de glutamina (**Figura 52-10**). A clivagem do domínio-isca desencadeia uma alteração conformacional maciça na α_2 -macroglobulina, causando a cobertura da protease efetiva. O tioéster reativo reage com a protease para formar uma ligação covalente entre as proteínas. Essa alteração conformacional também expõe uma sequência na α_2 -macroglobulina que é reconhecida pelos receptores da superfície celular localizados em vários tipos celulares, que leva à depuração do complexo mediada por receptor do plasma.

Além de funcionar como inibidor de amplo espectro predominante do plasma, ou **panproteínase**, a α_2 -macroglobulina também se liga a e transporta aproximadamente 10% do **zinco** no plasma (o restante sendo transportado pela albumina) assim como **citocinas**, como o fator de crescimento derivado de plaquetas, e o fator de transformação do crescimento β . Como transportador de citocinas, a α_2 -macroglobulina parece estar envolvida em direcionar esses efetores para tecidos

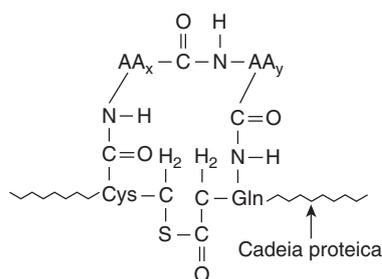


FIGURA 52-10 Uma ligação tiol-éster cíclica interna, como presente na α_2 -macroglobulina. AA_x e AA_y são aminoácidos adjacentes à cisteína e à glutamina.

TABELA 52-7 Classificação da amiloidose

Tipo	Proteína implicada
Primária	Principalmente cadeias leves de imunoglobulinas
Secundária	Amiloide sérico A (SAA)
Familiar	Transtirretina; raramente também apolipoproteína A-1, cistatina C, fibrinogênio, gelsolina, lisozima
Doença de Alzheimer	Peptídeo β -amilóide (ver Capítulo 57, caso 2)
Relacionada à diálise	β_2 -Microglobulina

Nota: outras proteínas além das listadas também foram implicadas na amiloidose.

ou células específicas. Uma vez captadas pelas células, as citocinas dissociam-se, libertando-se para modular o seu crescimento e função.

A DEPOSIÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM TECIDOS LEVA À AMILOIDOSE

A **amiloidose** refere-se a um comprometimento da função tecidual que leva ao acúmulo de agregados insolúveis de proteínas entre as células. O termo é uma designação incorreta, pois se pensava originalmente que as fibrilas insolúveis fossem de natureza semelhante à do amido. As fibrilas geralmente são feitas de fragmentos proteolíticos de proteínas plasmáticas cuja conformação é rica em **folhas β -pregueadas**. Na maioria dos casos, as fibrilas também contêm um **componente P**, que é derivado do **componente P do amiloide sérico**, uma proteína plasmática estreitamente relacionada à proteína C-reativa.

Anormalidades estruturais ou superprodução de pelo menos 20 proteínas diferentes foram implicadas em vários tipos de amiloidose. Na maioria das vezes, a amiloidose **primária** (**Tabela 52-7**) é causada por um distúrbio monoclonal do plasmócito, levando ao acúmulo de fragmentos gerados a partir das **cadeias leves** (ver a seguir) de uma imunoglobulina. A amiloidose **secundária** resulta de acúmulo de fragmentos de **amiloide sérico A (SAA)** resultante de infecções crônicas ou câncer. Sob essas condições, níveis elevados de citocinas inflamatórias estimulam o fígado a aumentar a síntese de SAA, o que leva ao aumento concomitante nos produtos de degradação proteolítica derivados do SAA. A **amiloidose familiar** resulta de acúmulo de formas mutadas de certas proteínas plasmáticas, particularmente a **transtirretina** (**Tabela 52-3**). Foram documentadas mais de 80 formas dessa proteína alteradas por mutação. Em pacientes submetidos à diálise crônica de longo prazo, pode acumular-se a proteína plasmática **β_2 -microglobulina**, que é retida no plasma pelas membranas de diálise.

AS IMUNOGLOBULINAS PLASMÁTICAS DESEMPENHAM UM IMPORTANTE PAPEL NOS MECANISMOS DE DEFESA DO CORPO

Os três principais componentes do sistema imune do corpo são: **linfócitos B (células B)**, **linfócitos T (células T)** e **sistema**

imune inato. Os linfócitos B são principalmente derivados das células da medula óssea, ao passo que os linfócitos T se originam do timo. As **células B** são responsáveis pela síntese dos anticorpos humorais circulantes, também conhecidos como **imunoglobulinas**. As **células T** estão envolvidas em uma série de importantes **processos imunológicos mediados por células**, como a rejeição de enxertos, as reações de hipersensibilidade e a defesa contra células malignas e muitos vírus. As células B e T respondem de forma **adaptativa**, desenvolvendo uma resposta específica para cada invasor encontrado. O **sistema imune inato** luta contra a infecção de forma inespecífica. Ele contém uma variedade de células, como fagócitos, neutrófilos, células *natural killer* e outras, que serão discutidas no Capítulo 54.

As imunoglobulinas são constituídas de múltiplas cadeias polipeptídicas

As imunoglobulinas (Ig) são proteínas oligoméricas cujas subunidades individuais foram tradicionalmente classificadas como pesadas (H) ou leves (L) com base na sua migração durante a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As imunoglobulinas humanas podem ser agrupadas em cinco classes abreviadas como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Tabela 52-8). As funções biológicas de cada classe estão resumidas na Tabela 52-9. A mais abundante das cinco classes, a IgG, consiste em duas cadeias leves idênticas (23 kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (53-75 kDa) reunidas por uma rede de ligações dissulfeto. As cadeias L e H são sintetizadas como moléculas separadas e sofrem montagem subsequente dentro da célula B ou do plasmócito, formando moléculas maduras de imunoglobulinas, que são todas **glicoproteínas**.

A configuração da unidade central da imunoglobulina em formato de Y está ilustrada pelo heterotetrâmero IgG (L₂H₂) mostrado na Figura 52-11. Algumas imunoglobulinas, como

a IgG imune, existem apenas na estrutura tetramérica básica. Outras, como IgA e IgM, podem formar oligômeros maiores constituídos de duas, três (IgA) ou cinco (IgM) cópias da unidade tetramérica central (Figura 52-12). O tipo de cadeia H determina a classe da imunoglobulina e, portanto, sua função efetora (ver a seguir): α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) e μ (IgM). As cadeias γ da IgG são organizadas em quatro domínios conservados: uma região variável aminoterminal (V_H) e três **regiões constantes** (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}). Os cinco tipos de cadeias H distinguem-se por diferenças em suas **regiões C_H**. As cadeias μ e ϵ têm quatro domínios C_H, em vez dos três habituais.

A cadeia leve IgG pode ser dividida em uma **região constante** (C_L) carboxiterminal e em uma **região variável** (V_L) aminoterminal. Existem dois tipos gerais de cadeias leves, **kappa** (κ) e **lambda** (λ), que podem ser distinguidos com base em diferenças estruturais observadas em suas regiões C_L. Uma determinada molécula de imunoglobulina sempre contém duas cadeias leves κ ou duas λ – nunca uma mistura de κ e λ . Nos seres humanos, as cadeias κ são mais frequentes do que as cadeias λ nas moléculas de imunoglobulinas.

As moléculas de IgG são **divalentes**. A extremidade de cada Y contém um sítio de ligação ao antígeno constituído de domínios V_H e V_L reunidos para formar duas cadeias de aminoácidos antiparalelos. O sítio do antígeno ao qual o anticorpo se liga é denominado **determinante antigênico**, ou **epítipo**. A região entre os domínios C_{H1} e C_{H2}, que pode ser prontamente clivada usando a pepsina ou a papaína (Figura 52-11), é conhecida como **“região da dobradiça”**. A região da dobradiça confere **flexibilidade** e permite que ambos os braços Fab se movam de maneira independente. Isso facilita a ligação aos sítios antigênicos que podem estar a distâncias variáveis ou que estejam presentes em dois diferentes vírus ou bactérias. Dessa forma, os complexos antígeno-anticorpo podem ser formados em tamanhos que os tornem mais facilmente reconhecíveis e

TABELA 52-8 Propriedades das imunoglobulinas humanas

Propriedade	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Porcentagem das imunoglobulinas totais no soro (aproximada)	75	15	9	0,2	0,004
Concentração sérica (mg/dL) (aproximada)	1.000	200	120	3	0,05
Coefficiente de sedimentação	7S	7S ou 11S ^a	19S	7S	8S
Peso molecular (× 1.000)	150	170 ou 400 ^a	900	180	190
Estrutura	Monômero	Monômero ou dímero	Monômero ou pentâmero	Monômero	Monômero
Símbolo da cadeia H	γ	α	μ	δ	ϵ
Fixação do complemento	+	—	+	—	—
Transferência placentária	+	—	—	?	—
Mediação das respostas alérgicas	—	—	—	—	+
Presente em secreções	—	+	—	—	—
Opsonização	+	—	— ^b	—	—
Receptor de antígenos na célula B	—	—	+	?	—
A forma polimérica contém cadeia J	—	+	+	—	—

^aA forma 11S é encontrada em secreções (p. ex., saliva, leite e lágrimas) e nos líquidos dos tratos respiratório, intestinal e genital.

^bIgM opsoniza indiretamente pela ativação do complemento. Este produz C3b, que é uma opsonina.

Fonte: reproduzida, com permissão, de Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology and Immunology*, 7th ed. McGraw-Hill, 2002.

TABELA 52-9 Principais funções das imunoglobulinas

Imunoglobulina	Principais funções
IgG	Principal anticorpo na resposta secundária; opsoniza as bactérias e facilita a sua fagocitose; fixa o complemento, potencializando a destruição das bactérias; neutraliza as toxinas bacterianas e os vírus; atravessa a placenta
IgA	A IgA secretora impede a fixação das bactérias e dos vírus às mucosas; não fixa o complemento
IgM	Produzida na resposta primária a um antígeno; fixa o complemento; não atravessa a placenta; receptor de antígeno na superfície das células B
IgD	Encontrada na superfície das células B, onde atua como receptor de antígeno
IgE	Medeia a hipersensibilidade imediata ao provocar a liberação de mediadores dos mastócitos e dos basófilos após exposição ao antígeno (alergeno); defende contra infecções por helmintos, provocando a liberação de enzimas dos eosinófilos; não fixa alérgeno o complemento; principal defesa do hospedeiro contra infecções helmínticas

Fonte: reproduzida, com permissão, de Levinson W, Jawetz E: *Medical Microbiology and Immunology*, 7th ed. McGraw-Hill, 2002.

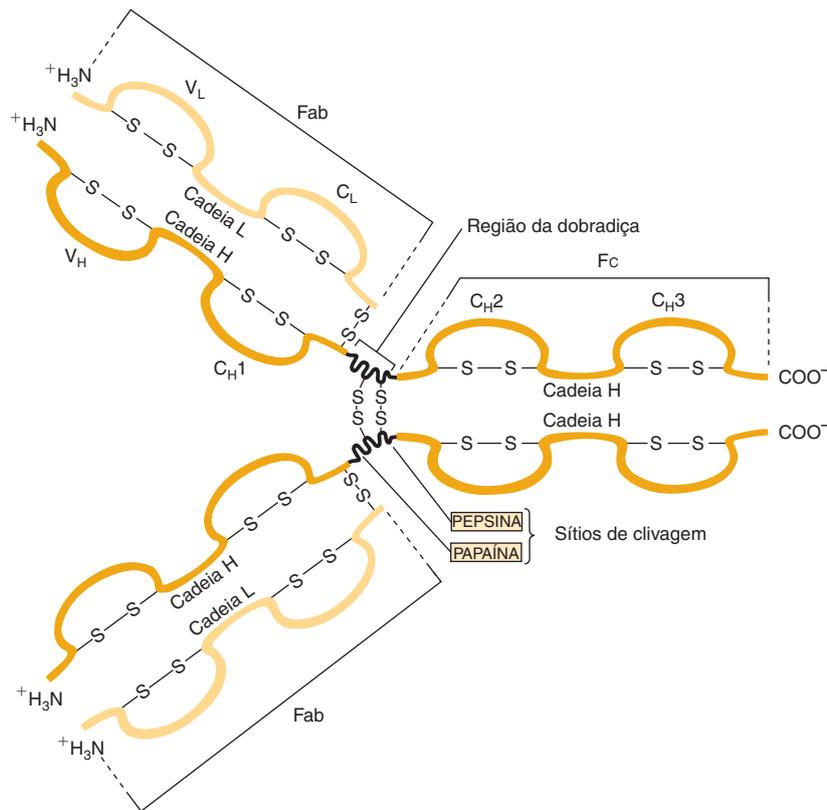


FIGURA 52-11 Estrutura da IgG. A molécula consiste em duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). Cada cadeia leve consiste em uma região variável (V_L) e em uma região constante (C_L). Cada cadeia pesada consiste em uma região variável (V_H) e uma região constante dividida em três domínios (C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}). O domínio C_{H2} contém o sítio de ligação do complemento, ao passo que o domínio C_{H3} apresenta um sítio que se liga aos receptores existentes nos neutrófilos e nos macrófagos. O sítio de ligação ao antígeno é formado pelas regiões hipervariáveis das cadeias leve e pesada, localizadas nas regiões variáveis dessas cadeias (ver Figura 50-10). As cadeias leve e pesada estão ligadas por ligações dissulfeto, e as cadeias pesadas também estão ligadas entre si por ligações dissulfeto. (Reproduzida, com permissão, de Parslow TG, et al. [editors]: *Medical Immunology*, 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

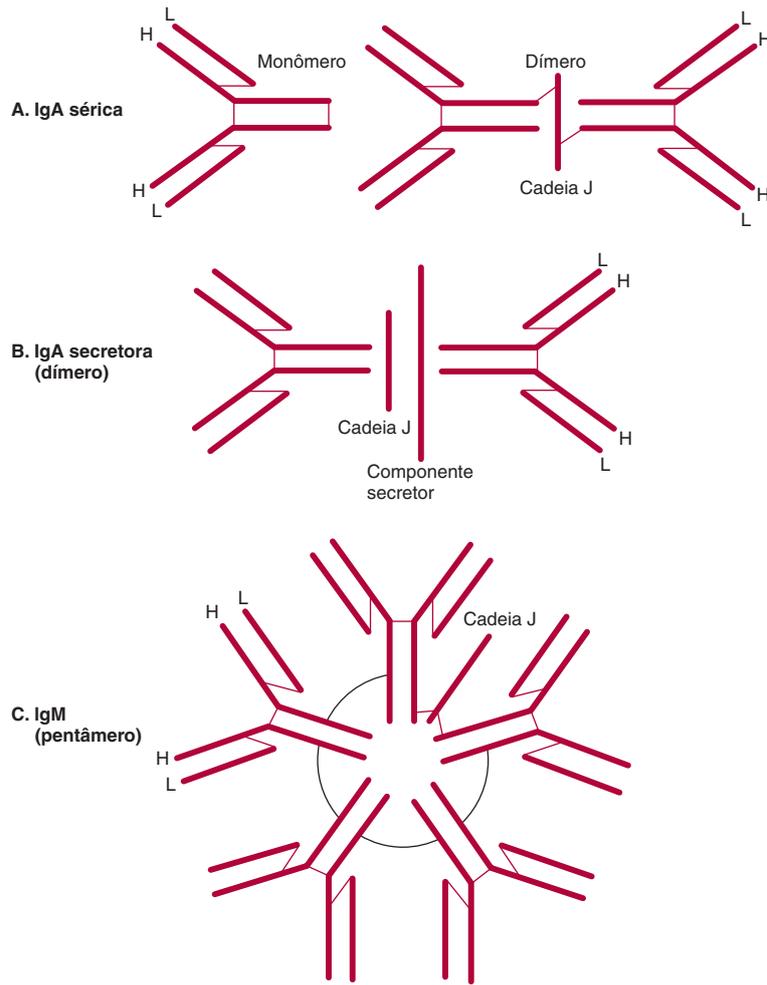


FIGURA 52-12 Representação esquemática da IgA sérica, da IgA secretora e da IgM. Tanto a IgA quanto a IgM apresentam uma cadeia J, porém apenas a IgA secretora tem um componente secretor. As cadeias polipeptídicas são representadas por linhas grossas; as ligações dissulfeto entre diferentes cadeias polipeptídicas são representadas por linhas finas. (Reproduzida, com permissão, de Parslow TG, et al. [editores]: *Medical Immunology*, 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

elimináveis pelos leucócitos fagocíticos. Esse fenômeno é normalmente demonstrado em laboratório pela formação de **rosetas** de hemácias.

As regiões variáveis conferem especificidade de ligação

As **regiões variáveis** das cadeias leve e pesada da imunoglobulina formam os **sítios de ligação ao antígeno** que comandam a extraordinária especificidade dos anticorpos. Como seu nome sugere, elas são bastante heterogêneas. Na verdade, não existem duas regiões variáveis de diferentes indivíduos que compartilhem sequências idênticas de aminoácidos. As regiões variáveis das cadeias L e H consistem em um conjunto de pequenas ilhas (5-10 resíduos), chamadas de **regiões hipervariáveis**, intercaladas em um “mar” de polipeptídeos por **regiões estruturais** relativamente invariáveis (Figura 52-13). As regiões hipervariáveis também são chamadas de **regiões determinantes da complementaridade (CDRs)**. Um **sítio de ligação ao antígeno** é formado quando as **regiões hipervariáveis** das cadeias H e L se alinham em conjunto no espaço tridimensional (estrutura

terciária) como alças que se projetam a partir da superfície do anticorpo.

Várias combinações das CDRs das cadeias H e L podem dar origem a múltiplos anticorpos com diferentes especificidades, uma característica conhecida como **diversidade combinatoria**. Os antígenos grandes interagem com todas as CDRs de um anticorpo, ao passo que os ligantes pequenos podem interagir com apenas uma ou algumas CDRs que formam uma bolsa ou cavidade na molécula do anticorpo. A essência das interações antígeno-anticorpo é a **complementaridade mútua** entre as superfícies das CDRs e os epítomos que envolvem múltiplas interações **não covalentes**, como as ligações de hidrogênio, as pontes salinas, as interações hidrofóbicas e as forças de van der Waals (ver Capítulo 2).

As regiões constantes determinam as funções efetoras específicas de cada classe

As **regiões constantes** das moléculas de imunoglobulinas, particularmente a C_{H2} e a C_{H3} (e a C_{H4} da IgM e da IgE) localizadas no fragmento Fc, são responsáveis pelas **funções**

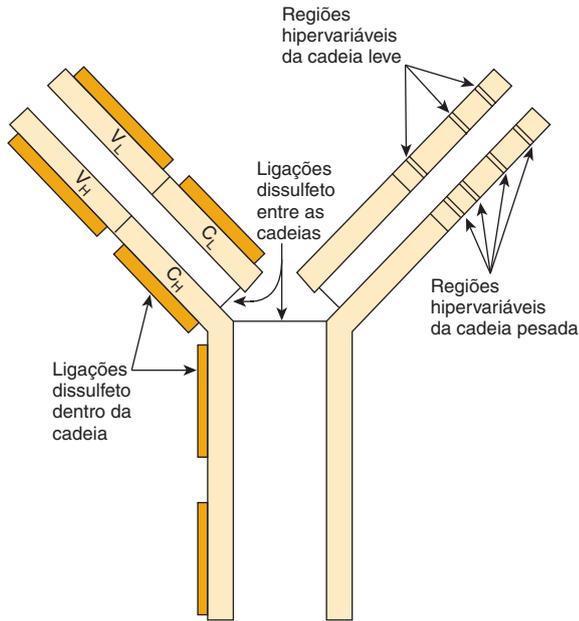


FIGURA 52-13 Modelo esquemático de uma molécula de IgG, mostrando as posições aproximadas das regiões hipervariáveis nas cadeias pesada e leve. O sítio de ligação ao antígeno é formado por essas regiões hipervariáveis. As regiões hipervariáveis também são denominadas regiões determinantes da complementaridade (CDRs). (Modificada e reproduzida, com permissão, de Parslow TG, et al.: [editores]: *Medical Immunology*, 10th ed. McGraw-Hill, 2001.)

efetoras específicas de cada classe das diferentes moléculas de imunoglobulina (Tabela 52-9, parte inferior), como a fixação do complemento ou a passagem transplacentária.

A diversidade dos anticorpos depende dos rearranjos gênicos

O genoma humano contém menos de 150 genes de imunoglobulinas. Mesmo assim, cada indivíduo é capaz de sintetizar talvez 1 milhão de diferentes anticorpos, cada um específico para um único antígeno. Claramente, a expressão da imunoglobulina não obedece ao paradigma “um gene, uma proteína”. Em vez disso, a diversidade da imunoglobulina é gerada por **mecanismos combinatórios** com base na mistura e no rearranjo de um conjunto finito de informações genéticas em múltiplas formas (ver Capítulos 35 e 38).

A primeira fonte de diversidade do anticorpo é a divisão da sequência codificadora para cada cadeia de imunoglobulina entre múltiplos genes. Cada cadeia leve é o produto de pelo menos três genes estruturais separados que codificam a **região variável** (V_L), a **região de junção** (J) (não tendo nenhuma relação com a cadeia J de IgA ou IgM) e a **região constante** (C_L) respectivamente. Da mesma forma, cada cadeia pesada é o produto de pelo menos **quatro** diferentes genes que codificam para um gene da **região variável** (V_H), um da **região de diversidade** (D), um da **região de junção** (J) e um gene da **região constante** (C_H). Cada gene está presente no genoma humano em várias versões, oferecendo o potencial para a montagem de uma multiplicidade de combinações.

A diversidade é posteriormente aumentada por meio da ação da **citidina-desaminase induzida por ativação (AID)**. Catalisando a conversão de citidina em uracila, a AID aumenta maciçamente a frequência de mutação dos genes V da imunoglobulina. Essas mutações são de natureza **somática**, isto é, exclusivas de uma célula diferenciada e não de uma célula germinativa. Consequentemente, cada ativação de AID gera novas subpopulações de células B que apresentam mutações exclusivas de seus genes V , levando cada uma a sintetizar imunoglobulinas de diferentes especificidades antigênicas. Em alguns estados patológicos, a ação mutagênica de AID pode levar à geração de **autoanticorpos** que direcionam os componentes endógenos do corpo, um fenômeno conhecido como **autoimunidade**.

Um terceiro mecanismo para gerar anticorpos dirigidos a novos antígenos é a **diversidade juncional**. Esta se refere à adição ou à deleção de números esporádicos de nucleotídeos que ocorre quando certos segmentos gênicos são reunidos. Como ocorre com a AID, as mutações geradas por diversidade juncional são de natureza somática.

A troca de classe (isótipo) ocorre durante as respostas imunes

Na maioria das respostas imunes humorais, são gerados anticorpos de diferentes classes que possuem especificidades antigênicas idênticas. Cada classe aparece em ordem cronológica específica em resposta ao imunógeno (antígeno imunizante). Por exemplo, os anticorpos da classe IgM normalmente precedem as moléculas da classe IgG. A transição da síntese de uma classe para outra é designada **troca de classe** ou **de isótipo**. A troca envolve a combinação de determinada cadeia leve de imunoglobulina com diferentes cadeias pesadas. Enquanto uma cadeia leve recém-sintetizada será inicialmente emparelhada com uma cadeia μ para gerar uma molécula IgM específica, ao longo do tempo a mesma cadeia leve antígeno-específica será emparelhada com uma cadeia γ . Essa cadeia γ irá, entretanto, apresentar uma região V_H idêntica à da cadeia μ , gerando uma IgG cuja especificidade antigênica será idêntica à da molécula IgM original. A mesma cadeia leve também pode se combinar com uma cadeia pesada α , que também contém a região V_H idêntica, formando uma molécula de IgA com especificidade antigênica idêntica. As moléculas de imunoglobulinas de diferentes classes que possuem domínios variáveis e especificidade antigênica idênticos compartilham um **idiótipo**. (Os idiótipos são determinantes antigênicos formados pelos aminoácidos específicos das regiões hipervariáveis.)

Anticorpos monoclonais são uma importante ferramenta de pesquisa

Os anticorpos surgiram como uma importante ferramenta na pesquisa, no diagnóstico e no tratamento biomédico. Originalmente, a produção de anticorpos contra um determinado antígeno exigia que o antígeno fosse injetado em um animal hospedeiro, como um coelho ou uma cabra, e o soro contendo as imunoglobulinas plasmáticas que incluíam (assim se esperava) os anticorpos contra o antígeno de interesse era obtido. Quando um antígeno é injetado em um animal, os anticorpos resultantes são produzidos por uma mistura de células B que

sintetizam anticorpos dirigidos contra diferentes sítios (epítomos ou determinantes) do antígeno. Portanto, anticorpos produzidos em hospedeiros animais são de natureza heterogênea ou **policlonal**. Além disso, a menos que submetidos a uma dispendiosa purificação por afinidade, as imunoglobulinas do soro também contêm anticorpos contra muitos milhares de antígenos aos quais o animal hospedeiro tenha sido exposto durante o seu período de vida.

Anticorpos **monoclonais** homogêneos dirigidos contra um único epítipo e livres de outras imunoglobulinas contaminantes podem ser gerados no laboratório. Em geral, são obtidas células B do baço de um camundongo (ou de outro animal apropriado) no qual se injetou previamente um antígeno ou uma mistura de antígenos (p. ex., células estranhas). As células B são misturadas com **células de mieloma** de camundongo e expostas ao polietilenoglicol, que provoca fusão celular. O produto dessa fusão é uma linhagem celular permanente, chamada de **hibridoma**, capaz de fornecer um suprimento contínuo de anticorpos monoclonais. A **Figura 52-14** resume os princípios envolvidos na geração das células do hibridoma. Por plaqueamento de misturas celulares altamente diluídas em meio seletivo contendo hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), poderão ser isoladas linhagens de hibridomas **clonais** homogêneas a partir de uma única célula. Pela identificação de linhagens que secretam um anticorpo monoclonal específico para o antígeno de escolha, é possível obter vários anticorpos monoclonais específicos para componentes individuais da mistura imunogênica ou para diferentes

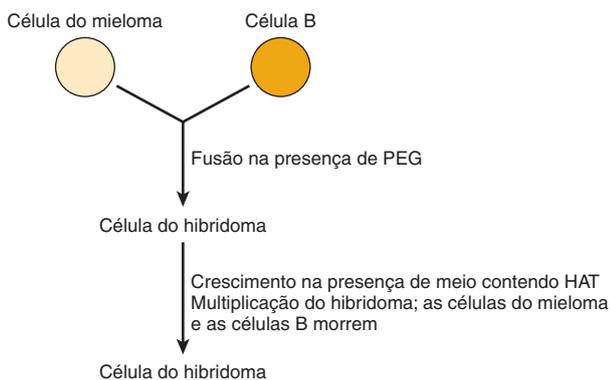


FIGURA 52-14 Esquema de produção de uma célula de hibridoma. As células do mieloma são imortalizadas, não produzem anticorpos e são HGPRT⁻ (tornando a via de recuperação da síntese de purinas [ver Capítulo 33] inativa). As células B não são imortalizadas, cada uma produz um anticorpo específico, e elas são HGPRT⁺. O polietilenoglicol (PEG) estimula a fusão celular. As células do hibridoma resultante são imortalizadas (pelas células do mieloma precursor), produzem anticorpos e são HGPRT⁺ (essas últimas duas propriedades são adquiridas das células B parentais). Quaisquer células B remanescentes morrerão, uma vez que não foram imortalizadas. Na presença de HAT, as células do mieloma também morrerão, visto que a aminopterina no meio contendo HAT suprime a síntese de purinas pela via *de novo* ao inibir a reutilização do tetra-hidrofolato (ver Capítulo 33). Todavia, as células do hibridoma sobrevivem, proliferam-se (visto que são HGPRT⁺) e – se forem clonadas – produzem anticorpo monoclonal. (HAT, hipoxantina-aminopterina-timidina; HGPRT, hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase.)

epítomos de um único antígeno. As células do hibridoma podem ser congeladas e armazenadas e, mais tarde, descongeladas quando forem necessários mais anticorpos; isso assegura o seu suprimento a longo prazo.

Para **uso terapêutico em seres humanos**, anticorpos monoclonais produzidos por linhagens celulares murinas podem ser **humanizados**. Isso é feito ao ligar os CDRs (os sítios que se ligam a antígenos) aos sítios apropriados em uma molécula de imunoglobulina humana. Assim, produz-se um anticorpo muito semelhante a um anticorpo humano, cuja **imunogenicidade** reduzida diminui muito as chances de reação anafilática.

A PROTEÇÃO POSTERIOR CONTRA A INFECÇÃO É CONFERIDA PELO SISTEMA DO COMPLEMENTO

As imunoglobulinas representam o centro do **sistema imune adaptativo** do corpo, uma denominação que reflete a sua capacidade de gerar anticorpos contra novas especificidades de ligação ao antígeno ao encontro de um novo agente infeccioso. Em contrapartida, a quantidade, a especificidade e a função dos componentes que constituem o **sistema imune inato** são fixas e permanecem constantes durante toda a vida. O braço plasmático do sistema imune inato é chamado de **sistema do complemento**, uma denominação derivada da observação de que ele pode ser ativado por complexos antígeno-anticorpo e que, portanto, atua em consequência e em apoio às imunoglobulinas do sistema imune adaptativo.

O sistema do complemento apresenta características reminiscentes da cascata de coagulação sanguínea. Ambos consistem em zimogênios circulantes (pró-proteínas) que permanecem cataliticamente dormentes até serem ativados por clivagem proteolítica. Essas proteínas, chamadas de **fatores do complemento**, são sintetizadas por uma variedade de tipos celulares, incluindo hepatócitos, macrófagos, monócitos e células endoteliais intestinais. Como ocorre com os fatores de coagulação, a maior parte dos fatores do complemento são pró-proteases (ver Capítulo 9) que, quando ativadas, dirigem-se para outros componentes do sistema, gerando uma série ou **cascata** de eventos de ativação proteolítica que amplificam a produção dos produtos finais protetores do sistema.

A **via clássica** para ativar o sistema do complexo é ativada quando um complexo antígeno-anticorpo se liga e estimula a atividade protease do fator C1. Em seguida, C1 cliva o fator C2 do complemento para formar duas proteínas menores, C2a e C2b, e cliva o fator C4 do complemento para formar C4a e C4b (**Figura 52-15**). Dois dos fragmentos proteolíticos, C2a e C4b, em seguida, associam-se para formar uma protease, a C3 convertase, que cliva o fator C3 do complemento em C3a e C3b. A C3a, então, se liga ao heterodímero C2a:C4b para formar um complexo heterotrimérico, a C5 convertase, que cliva o fator C5 do complemento em C5a e C5b. Em seguida, a proteína C5b combina-se aos fatores C6, C7, C8 e C9 do complemento para formar o **complexo de ataque à membrana (MAC)**. O MAC mata invasores bacterianos, ligando-se a e abrindo um poro nas suas membranas plasmáticas. Após a lise, os

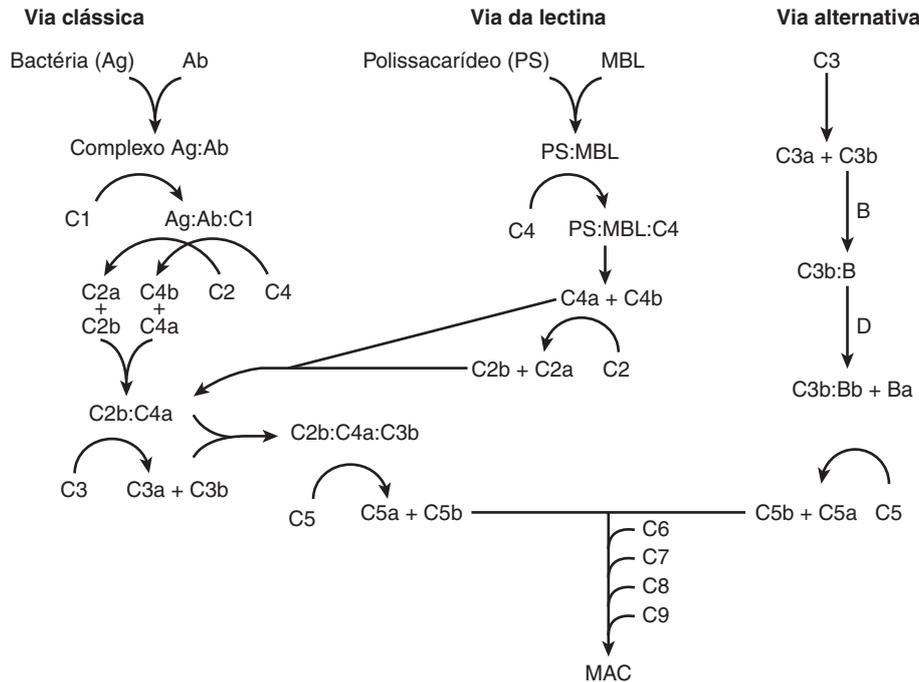


FIGURA 52-15 Cascata do complemento. A ativação do sistema do complemento pode ocorrer por três diferentes mecanismos, conhecidos como vias clássica, da lectina e alternativa. São mostrados os principais componentes envolvidos em cada via, os produtos formados pela clivagem proteolítica das pró-proteínas inativas e os principais complexos formados. Dois pontos são usados para indicar a associação em um complexo.

restos bacterianos são destruídos por macrófagos fagocíticos. Enquanto isso, as proteínas C3a e C5a atuam como quimioatraentes que recrutam leucócitos para o local da infecção e estimulam uma resposta inflamatória.

O direcionamento de MAC para a bactéria invasora é facilitado pela presença de ligações tioéster em C3 e C4. Como ocorre com a ligação tioéster no inibidor de protease plasmática α_2 -macroglobulina, essa ligação altamente reativa fica exposta como resultado da alteração conformacional que acompanha a ativação. No caso de C3 e C4, o tioéster reage com os grupos hidroxil dos polissacarídeos da superfície bacteriana, ancorando-os de forma covalente ao seu patógeno-alvo e também aos complexos C5 convertase dos quais fazem parte. Consequentemente, os componentes do MAC são formados e reunidos bem próximo à membrana bacteriana.

A ativação também pode ser desencadeada por meio da **via da lectina**, onde os complexos formados quando um fator do complemento conhecido como **lectina de ligação à manose** (MBL), também conhecida como **proteína de ligação à manana** (MBP), liga-se aos polissacarídeos bacterianos para gerar um complexo que recruta e ativa C4 (Figura 52-15). O termo **lectina** refere-se a qualquer proteína que se liga aos polissacarídeos. A maioria das lectinas é altamente seletiva. A MBL é específica para as porções de carboidrato que contêm manose (**mananas**) de glicoproteínas e **lipopolissacarídeos**, presentes na superfície de bactérias gram-positivas, alguns vírus e diversos fungos. Quando se liga ao complexo polissacarídeo-MBL, C4 sofre autoproteólise, formando C4a e C4b. Além disso, ele cliva C2 em C2a e C2b. Em seguida, a cascata de ativação prossegue como descrita para a via clássica.

A MBL circula como grandes complexos multivalentes de 400 a 700 kDa compostos por quatro ou mais cópias de uma unidade central homotrimérica constituída de três cópias de um polipeptídeo de cerca de 30 kDa. Cada polipeptídeo contém dois domínios principais, um domínio aminoterminal semelhante ao colágeno e um domínio carboxiterminal de ligação ao carboidrato. O centro do homotrímero é formado quando três domínios semelhantes ao colágeno se entrelaçam para gerar uma cauda estendida que leva a uma cabeça globular constituída dos três domínios de ligação ao carboidrato. Os homotrímeros associam-se por meio de suas regiões extremas aminoterminais em uma “haste” ligada por ligações dissulfeto, da qual as cabeças individuais de ligação ao carboidrato se estendem em um arranjo ramificado que lembra o das imunoglobulinas (Figura 52-16).

O sistema do complemento também pode ser ativado pela **via alternativa**, que envolve a ativação de C3 por hidrólise química, um processo algumas vezes conhecido como *ticking over*. Na via alternativa, C3b liga-se ao fator B do complemento, formando um complexo C3b:B que é, em seguida, clivado pelo complexo fator D. O complexo resultante C3b:Bb apresenta atividade C5 convertase.

AS DISFUNÇÕES DO SISTEMA IMUNE CONTRIBUEM PARA MUITAS CONDIÇÕES PATOLÓGICAS

As disfunções dos sistemas imunes inato e adaptativo podem apresentar graves consequências fisiológicas. Deficiências na

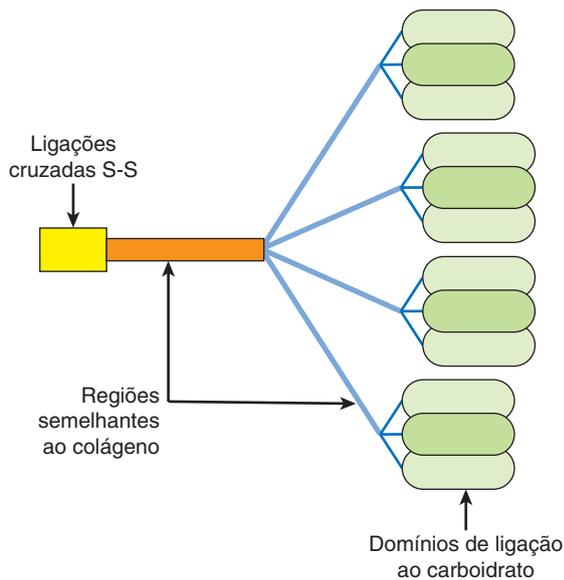


FIGURA 52-16 Representação esquemática da lectina de ligação à manose. É mostrado um diagrama esquemático de uma lectina de ligação à manose (MBL) constituída de quatro conjuntos de homotrímeros MBL. Os domínios de ligação ao carboidrato estão coloridos. Os domínios entrelaçados semelhantes ao colágeno para cada trímero estão mostrados em azul. A região da haste, onde as porções aminoterminais dos homotrímeros dos domínios semelhantes ao colágeno se associam, é mostrada em cor de laranja e em amarelo, com o amarelo evidenciando a região onde estão localizadas as ligações cruzadas S—S que estabilizam o tetrâmero dos homotrímeros.

produção de imunoglobulinas ou nos fatores do complemento podem deixar o indivíduo afetado extremamente suscetível à ocorrência e à disseminação de infecções bacterianas, fúngicas ou virais. Diz-se que esses indivíduos estão em estado **imunocomprometido**. Muitos fatores podem contribuir para a redução da eficácia do sistema imune. Eles incluem anormalidades genéticas (p. ex., **agamaglobulinemia**, na qual a produção de IgG se encontra fortemente afetada), exposição a toxinas, infecções virais, desnutrição, transformação neoplásica ou tratamento com fármacos imunossupressores.

A superprodução e a ativação precoce dos sistemas imune e do complemento também podem ser deletérias. A falha do sistema imune em diferenciar células hospedeiras de um invasor estranho pode desencadear uma **resposta autoimune**, na qual o sistema imune do corpo ataca seus próprios tecidos e órgãos. A lesão resultante poderá ser cumulativa, como ocorre na artrite reumatoide e na esclerose múltipla, ou aguda, como a destruição completa das ilhotas pancreáticas que ocorre no diabetes tipo 1. Na América do Norte, a incidência de distúrbios autoimunes é de 3 a cada 100 pessoas.

A Tabela 52-1 relaciona alguns dos distúrbios autoimunes mais observados.

RESUMO

- O plasma contém muitas proteínas com múltiplas funções. A maior parte é sintetizada no fígado. A maioria é glicosilada.
- A albumina representa aproximadamente 60%, por massa, do conteúdo proteico do plasma. Portanto, ela é o principal determinante da pressão osmótica intravascular. A albumina também se liga a e transporta ácidos graxos, bilirrubina, íons metálicos e certos fármacos.
- A haptoglobina liga-se à hemoglobina extracorpúscular e impede a sua perda pelo rim e pela urina, o que preserva o ferro para ser reutilizado e impede a formação de precipitados nocivos nos túbulos.
- A ferritina liga-se a e armazena ferro férrico no interior das células.
- A transferrina transporta ferro até os locais onde ele é necessário.
- A ceruloplasmina, principal proteína plasmática que contém cobre, é uma ferroxidase que desempenha um papel crucial na reciclagem do ferro liberado quando as hemácias senescentes são destruídas.
- A hepcidina regula a homeostasia de ferro, bloqueando a internalização da proteína celular de exportação de ferro, a ferroportina.
- A expressão de hepcidina é estimulada quando a ligação de complexos transferrina-ferro aos receptores de transferrina 1 deslocam a proteína HFE, que, em seguida, liga-se a e ativa os receptores de transferrina 2.
- A hemocromatose hereditária é uma doença genética que envolve a absorção excessiva de ferro.
- A α_1 -antitripsina é o principal inibidor de serina-protease do plasma. A deficiência genética dessa proteína pode levar ao enfisema e à insuficiência hepática.
- A α_2 -macroglobulina é uma proteína plasmática importante, que neutraliza muitas proteases e direciona determinadas citocinas para órgãos específicos.
- Nossos corpos podem sintetizar imunoglobulinas específicas para até milhões de diferentes alvos, chamados de antígenos.
- A estrutura central das imunoglobulinas é um tetrâmero que consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas dispostas em formato de Y.
- A síntese de diversos anticorpos a partir de um conjunto limitado de genes é possível por meio de combinação, rearranjo e mutação somática de genes das imunoglobulinas.
- A capacidade de sintetizar novos anticorpos para defender contra novos antígenos representa a característica que define o sistema imune adaptativo.
- As linhagens celulares monoclonais produzem anticorpos mono-específicos para uso clínico e laboratorial.
- O sistema do complemento é geralmente ativado por complexos formados entre microrganismos infectantes e anticorpos protetores ou entre polissacarídeos ricos em manose sobre a superfície do patógeno e a proteína de ligação à manose.
- O sistema do complemento é ativado por uma série de eventos de clivagem proteolítica que transformam os zimogênios latentes em proteases ativas.
- Distúrbios autoimunes ocorrem quando o sistema imune ataca os tecidos do nosso próprio corpo.

REFERÊNCIAS

- Andrew NC: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112:219.
- Burtis CA, Ashwood EA, Bruns DE (editors): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th ed. Elsevier Saunders, 2006. (Chapters 20, 26, and 31 give extensive coverage of plasma proteins, complement proteins, immunoglobulins, C-reactive protein, hemoglobin, iron, and bilirubin.)
- Carroll MV, Sim RB: Complement in health and disease. *Adv Drug Disc Rev* 2011;63:965.
- Craig WY, Ledue TB, Ritchie RF: *Plasma Proteins: Clinical Utility and Interpretation*. Foundation for Blood Research, 2008.
- Fauci AS, Branwald E, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. McGraw-Hill, 2008 (Chapters 58, 98, and 308 contain coverage of anemia and polycythemia, iron deficiency and other hypoproliferative anemias, and an introduction to the immune system).
- Ganz T: Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab* 2008;7:288.
- Hellman NE, Gitlin JD: Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 2002;22:439.
- Hentz MW, Muckenthaler MU, Gali B, et al: Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24.
- Lab Tests Online: <http://www.labtestsonline.org/> (A comprehensive web site provided by the American Association of Clinical Chemists that provides information on the measurement and significance of the various plasma proteins discussed in this Chapter, and also on most other lab tests.)
- Levinson W: *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 11th ed. Appleton & Lange, 2010. (Good description of the basics of Immunology.)
- Murphy KM, Travers P, Walport M: *Janeway's Immunobiology*, 7th ed. Garland Science Publishing, 2007.
- Noris M, Remuzzi G: Overview of complement activation and regulation. *Sem Nephrol* 2013;33:479.
- Schaller H, Gerber S, Kaempfer U, et al: *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. Wiley, 2008.
- Zaheen A, Martin A: Activation-induced cytidine deaminase and aberrant germinal center selection in the development of humoral autoimmunities. *Am J Pathol* 2011;178:462.

Hemácias

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender o conceito de células-tronco e sua importância.
- Explicar por que as hemácias dependem da glicose para obter energia.
- Descrever os papéis da eritropoietina, da trombopoietina e de outras citocinas na produção de hemácias e de plaquetas.
- Descrever os sistemas enzimáticos que protegem o ferro do heme da oxidação e reduzem a metemoglobina.
- Identificar os principais componentes do citoesqueleto da hemácia.
- Resumir as causas dos principais distúrbios que acometem as hemácias.
- Descrever a principal função da proteína banda 3 da hemácia.
- Conhecer as bases bioquímicas das substâncias do grupo sanguíneo ABO.
- Listar os principais componentes contidos nos grânulos densos e nos α -grânulos das plaquetas.
- Descrever as bases moleculares da púrpura trombocitopênica imune e da doença de von Willebrand.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

A evolução de um diverso arranjo de células sanguíneas que circulam livremente foi fundamental para o desenvolvimento da vida animal. O encerramento da hemoglobina e da anidrase carbônica no interior de células especializadas, chamadas de **hemácias**, ampliou enormemente a capacidade de o sangue circulante transportar oxigênio para os tecidos periféricos e dióxido de carbono para fora deles. A **anemia**, uma deficiência em nível de hemoglobina circulante (< 120 - 130 g/L), compromete a saúde por reduzir a capacidade de o sangue suprimir os tecidos com níveis adequados de oxigênio. A anemia pode surgir a partir de várias causas, que incluem anomalias genéticas (p. ex., caráter da célula falciforme, anemia perniciosa), hemorragia excessiva, insuficiências de ferro alimentar ou vitamina B₁₂, ou lise de hemácias por patógenos invasores (p. ex., malária). As **plaquetas** ajudam a estancar o fluxo sanguíneo dos tecidos lesados. Déficits na quantidade ou na função das plaquetas aumentam a vulnerabilidade de um paciente à hemorragia por reduzir a velocidade de formação e integridade estrutural de coágulos protetores. Como é o caso da anemia, a baixa contagem de plaquetas, chamada de **trombocitopenia**, pode ser causada por um conjunto de fatores, que incluem infecção bacteriana, antibióticos que contêm sulfá e alguns outros fármacos

ou reações autoimunes, como a púrpura trombocitopênica idiopática. Outras síndromes fisiopatológicas, como a **doença de von Willebrand** e a **trombastenia de Glanzmann**, são causadas por mutações genéticas que comprometem a aderência ou a agregação de plaquetas, e não a sua abundância.

AS HEMÁCIAS DERIVAM DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Tanto as hemácias quanto as plaquetas são renovadas a uma taxa relativamente alta. Portanto, as substituições são feitas constantemente a partir das **células-tronco** precursoras. As células-tronco possuem capacidade única de produzir células-filhas inalteradas (**autorrenovação**) e de gerar uma diversa faixa de tipos celulares (**potência**). Amplamente falando, as células-tronco podem ser consideradas em estado indiferenciado. As células-tronco podem ser **totipotentes** (capazes de produzir todas as células de um organismo), **pluripotentes** (capazes de se diferenciar em células de qualquer uma das três camadas germinativas), **multipotentes** (produzem apenas células de uma família estreitamente relacionada) ou **unipotentes** (só produzem um tipo de célula). As células-tronco também são

classificadas como **embrionárias** ou **adultas**. Como as células-tronco adultas são mais limitadas em relação à sua capacidade de diferenciação, intensos esforços estão sendo feitos para superar essa restrição.

A diferenciação de células-tronco hematopoiéticas é regulada por uma série de glicoproteínas secretadas, chamadas de **citocinas**. Um **fator de células-tronco (SCF)** e vários **fatores estimuladores de colônias (CSF)** colaboram com as interleucinas 1, 3 e 6 para estimular a proliferação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e seu comprometimento, para se diferenciar em um dos vários tipos de células mieloides (**Figura 53-1**). A ligação à **eritropoietina** ou à **trombopoietina** direciona as células progenitoras mieloides a se diferenciarem eventualmente em hemácias ou plaquetas, respectivamente.

AS HEMÁCIAS SÃO ALTAMENTE ESPECIALIZADAS

As hemácias maduras não possuem organelas internas

A estrutura e a composição das hemácias refletem a sua função altamente especializada: liberar a máxima quantidade possível

de oxigênio para os tecidos e auxiliar na remoção de dióxido de carbono, um resíduo da respiração celular, e de ureia. O interior da hemácia contém concentração maciça de hemoglobina, cerca de um terço do peso (30-34 g/dL em um adulto). Essa extraordinária capacidade da hemoglobina foi alcançada, em parte, pela adoção de estrutura celular raramente simplificada. As hemácias maduras não possuem as organelas intracelulares encontradas nas outras células eucarióticas (p. ex., núcleo, lisossomo, aparelho de Golgi, mitocôndrias). Como consequência, as hemácias **enucleadas** são incapazes de se reproduzir.

As hemácias possuem uma extensa rede de citoesqueleto responsável pela manutenção de sua configuração bicôncava (**Figura 53-2**). O seu formato incomum aumenta a troca de oxigênio e dióxido de carbono entre as hemácias e os tecidos de duas maneiras. Primeiramente, a sua configuração em formato de disco apresenta proporção muito mais alta da área superficial em relação ao volume do que as formas geométricas mais esféricas. Em segundo lugar, ela permite que as hemácias se dobrem e se comprimam através de estreitos capilares cujo diâmetro é menor do que a própria hemácia. Minimizando a distância a ser percorrida, esses fatores promovem a troca gasosa eficiente entre as paredes capilares e a movimentação rápida (até 2 mm/s) das hemácias.

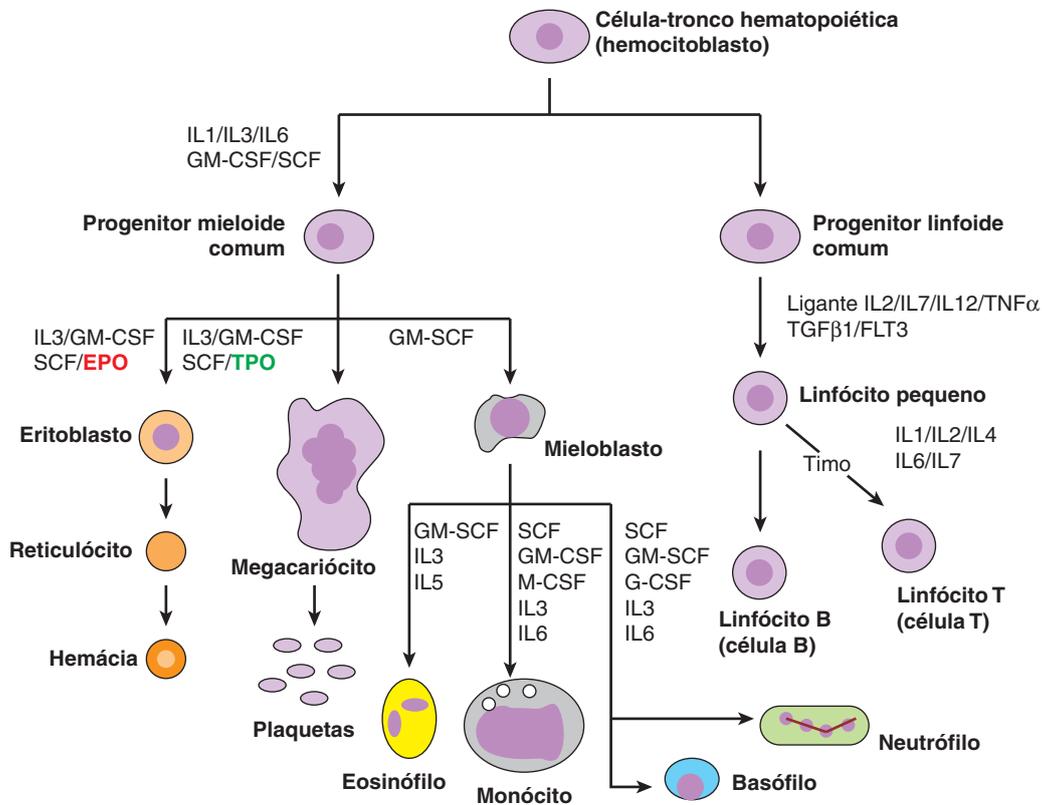


FIGURA 53-1 Hematopoiese. É mostrado um esquema simplificado e bastante abreviado indicando as vias pelas quais as células-tronco hematopoiéticas se diferenciam para produzir muitos dos leucócitos e hemácias quantitativamente mais proeminentes. São mostrados apenas os intermediários do desenvolvimento selecionados. A denominação de cada tipo celular está indicada em **negrito**. Os núcleos celulares estão evidenciados em **roxo**. Cada seta resume uma transição de vários estágios. Os hormônios e as citocinas que estimulam cada transição estão listados próximo às setas. As siglas utilizadas incluem IL, interleucina; SCF, fator de células-tronco; G-CSF, fator estimulador de colônias granulocíticas; M-CSF, fator estimulador de colônias macrofágicas; GM-CSF, fator estimulador de colônias granulocíticas e macrofágicas; ligante FLT3, ligante da tirosina-cinase 3 semelhante à FMS; TNF- α , fator de necrose tumoral α ; TGF- β 1, fator de transformação do crescimento β 1; **EPO**, eritropoietina; **TPO**, trombopoietina.

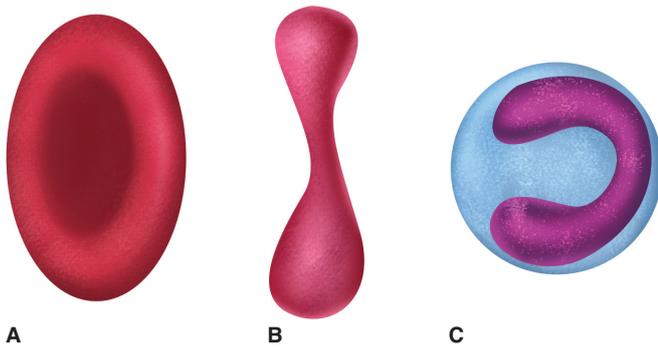


FIGURA 53-2 As hemácias apresentam formato de discos bicôncavos. São mostrados desenhos de (A) uma hemácia, (B) uma secção da hemácia ilustrando o seu formato bicôncavo e (C) uma hemácia dobrada para passar através de um capilar estreito.

As hemácias geram ATP exclusivamente via glicólise

As hemácias não possuem mitocôndrias e, portanto, não possuem enzimas do ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons, via da β -oxidação ou ATP-sintase. Isso as torna incapazes de utilizar ácidos graxos ou corpos cetônicos como combustível metabólico. Em consequência, as hemácias são completamente dependentes da glicólise para gerar ATP. A glicose penetra nas hemácias por **difusão facilitada** (ver Capítulo 40), um processo mediado pelo **transportador de glicose (GLUT1)**, também conhecido como glicose-permease (**Tabela 53-1**).

A via glicolítica nas hemácias também possui um ramo único, ou desvio, cujo propósito é isomerizar o 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG) a **2,3-bifosfoglicerato** (2,3-BPG). O 2,3-BPG liga-se à e estabiliza a hemoglobina no estado T (ver Capítulo 6). A conversão de 1,3-BPG a 2,3-BPG é catalisada pela 2,3-bifosfoglicerato-mutase, uma enzima bifuncional que também catalisa a hidrólise do 2,3-BPG ao intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato. Uma segunda enzima, a inositol-polifosfato

TABELA 53-1 Algumas propriedades do transportador de glicose da membrana da hemácia (GLUT1)

- Constitui cerca de 2% das proteínas da membrana da hemácia
- Exibe especificidade pela glicose e pelas D-hexoses relacionadas (as L-hexoses não são transportadas)
- O transportador funciona em cerca de 75% de seu $V_{máx}$ na concentração fisiológica de glicose sanguínea, é saturável e pode ser inibido por determinados análogos da glicose
- É um membro de uma família de transportadores de glicose homólogos encontrados nos tecidos de mamíferos
- O transportador não é dependente de insulina, diferentemente do carreador correspondente presente no músculo e no tecido adiposo
- A sua sequência de 492 aminoácidos foi determinada
- Transporta glicose quando inserido em lipossomos artificiais
- Estima-se que o transportador contenha 12 segmentos helicoidais transmembranas
- Atua gerando um poro regulado na membrana para possibilitar a passagem da glicose; a conformação do poro depende da presença de glicose e pode oscilar rapidamente (cerca de 900 vezes/s)

fosfatase múltipla, catalisa a hidrólise de 2,3-BPG ao intermediário glicolítico 2-bifosfoglicerato. As atividades dessas enzimas são sensíveis ao pH, o que assegura que os níveis de 2,3-BPG aumentem e diminuam nos momentos apropriados durante o ciclo de transporte de oxigênio.

A **Tabela 53-2** fornece um resumo de vários aspectos do metabolismo das hemácias, muitos dos quais são discutidos em outros capítulos.

A anidrase carbônica facilita o transporte de CO_2

Como o oxigênio, a solubilidade do dióxido de carbono em solução aquosa é baixa, muito baixa para acomodar mais do que uma pequena porcentagem de CO_2 produzida pelos tecidos metabolicamente ativos. Entretanto, a solubilidade da forma hidratada do CO_2 , o ácido carbônico (H_2CO_3), e seu produto de dissociação protônico, o bicarbonato (HCO_3^-), é relativamente alta. A presença de altos níveis da enzima **anidrase carbônica** (ver Figura 6-11) nas hemácias permite que

TABELA 53-2 Aspectos importantes do metabolismo das hemácias

- A hemácia é altamente dependente da glicose como fonte de energia, para a qual sua membrana contém transportadores de glicose de alta afinidade
- A glicólise, produzindo lactato, é o meio de produção de ATP
- Devido à ausência de mitocôndrias nas hemácias, não há produção de ATP por fosforilação oxidativa
- A hemácia possui uma variedade de transportadores que mantêm o equilíbrio iônico e hídrico
- A produção de 2,3-bifosfoglicerato por reações estreitamente associadas à glicólise é importante na regulação da capacidade de transporte do oxigênio pela Hb
- A via das pentoses-fosfato da hemácia metaboliza 5 a 10% do fluxo total de glicose e produz NADPH. A anemia hemolítica devida à deficiência da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase é comum
- A glutatona reduzida (GSH) é importante no metabolismo da hemácia, em parte para neutralizar a ação de peróxidos potencialmente tóxicos. A hemácia pode sintetizar GSH e o NADPH necessário para retornar a glutatona oxidada (G-S-S-G) ao seu estado reduzido GSH
- O ferro da Hb deve ser mantido no estado ferroso. O ferro férrico é reduzido ao estado ferroso pela ação de um sistema metemoglobina-reductase dependente de NADH envolvendo citocromo b_5 reductase e citocromo b_5
- A biossíntese de glicogênio, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos não ocorre nas hemácias, ao passo que alguns lipídeos (p. ex., o colesterol) da membrana da hemácia podem ser trocados pelos lipídeos plasmáticos correspondentes
- A hemácia contém certas enzimas do metabolismo dos nucleotídeos (p. ex., adenosina-desaminase, pirimidina-nucleotidase e adenilato-cinase). As deficiências dessas enzimas estão envolvidas em alguns casos de anemia hemolítica
- Quando as hemácias chegam ao fim de seu tempo de sobrevivência, a globina sofre degradação em aminoácidos (que são novamente utilizados pelo organismo), o ferro é liberado do heme e reaproveitado, e o componente tetrapirrólico do heme é convertido em bilirrubina, a qual é excretada principalmente no intestino por meio da bile

estas concentrem o resíduo de CO₂, catalisando a sua conversão rápida em ácido carbônico, e revertam esse processo, a fim de facilitar a sua expulsão pelos pulmões. As hemácias transportam algum CO₂ na forma de carbamatos ligados à hemoglobina (ver Capítulo 6), ao passo que cerca de 80% são transportados internamente como bicarbonato dissolvido.

AS HEMÁCIAS DEVEM SER CONTINUAMENTE SUBSTITUÍDAS

Cerca de 2 milhões de hemácias entram na circulação por segundo

A **vida útil de 120 dias** de uma hemácia normal requer que quase 1% dos cerca de 30 trilhões de hemácias de um indivíduo seja substituído diariamente. Isso equivale a uma taxa de produção de aproximadamente 2 milhões de novas hemácias por segundo. As hemácias recém-formadas conservam porções dos ribossomos, retículo endoplasmático, mitocôndrias, etc. que estavam presentes em seus precursores nucleados. Durante as cerca de 24 horas necessárias para completar a transição para hemácias maduras, as hemácias nascentes, chamadas de **reticulócitos**, conservam a capacidade para sintetizar polipeptídeos sob a direção de moléculas de mRNA vestigiais.

Em raros casos, mutações genéticas que levam ao comprometimento da função do ribossomo, chamadas de **ribiopatias**, poderão resultar em hipoplasia da hemácia. A **anemia de Diamond-Blackfan** é causada por mutações no gene que codifica a proteína RPS19 do processamento ribossomal. A **síndrome do 5q**, que apresenta quadro clínico semelhante, é causada por mutações que levam à insuficiência da proteína ribossomal RPS14.

A eritropoietina regula a produção das hemácias

Os estágios iniciais da **eritropoiese**, a produção de hemácias, envolvem SCF, CSFs e interleucinas 1, 3 e 6. O comprometimento das células progenitoras mieloides com a diferenciação em hemácias é amplamente dependente da **eritropoietina (EPO)**, uma glicoproteína de 166 aminoácidos (peso molecular de cerca de 34 kDa). A EPO, que é sintetizada principalmente pelo rim, é liberada na corrente sanguínea em resposta à hipóxia. Ao alcançar a medula óssea, ela interage com progenitores de hemácias via receptor transmembrana específico. O receptor de EPO consiste em duas subunidades diferentes organizadas em um conjunto de domínios. A ativação do receptor estimula as atividades das proteínas tirosinas-cinase envolvidas na transdução de sinal a jusante.

A eritropoietina é administrada terapêuticamente para tratar anemias que surgem a partir de insuficiência renal crônica ou de distúrbios de células-tronco hematopoiéticas (**mielodisplasia**), assim como de efeitos colaterais de tratamentos químicos e radiológicos do câncer. Atualmente, a tecnologia do DNA recombinante tornou possível a produção de quantidades substanciais de eritropoietina a partir de culturas de células humanas. Como descrito no Capítulo 49, tentativas estão sendo feitas para aumentar a relação dose-efeito da EPO

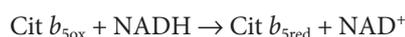
recombinante, prolongando a sua meia-vida na circulação por meio da manipulação da composição de suas cadeias polissacarídicas.

A OXIDAÇÃO DO FERRO HEME COMPROMETE O TRANSPORTE DE OXIGÊNIO

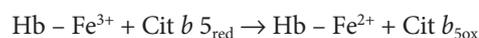
A citocromo b₅-redutase reduz a metemoglobina

A hemoglobina que contém um ou mais ferros heme no estado férrico (Fe³⁺) é chamada de **metemoglobina**. Os grupos heme que contêm ferro ferroso não se ligam ao oxigênio. Além disso, como as subunidades do tetrâmero da hemoglobina interagem de forma cooperativa (ver Capítulo 6), a oxidação de um único ferro heme poderá impactar contrariamente a liberação de oxigênio pelas três subunidades restantes.

Os átomos de ferro ferroso, Fe²⁺, na hemoglobina são suscetíveis à oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). A capacidade de recuperar a metemoglobina reduzindo o ferro ferroso é, portanto, de grande importância fisiológica. Nas hemácias, a hemoglobina é regenerada a partir da metemoglobina pelo sistema NADH-citocromo b₅ metemoglobina-redutase. O primeiro componente do sistema, a flavoproteína, chamada de **citocromo b₅-redutase** (também conhecida como metemoglobina redutase), transfere elétrons do NADH para o segundo componente, o **citocromo b₅**, utilizando elétrons fornecidos pelo NADH:



Em seguida, o citocromo b₅ reduzido transfere os elétrons para a metemoglobina, reduzindo o Fe³⁺ de volta ao seu estado Fe²⁺:



A última fonte de elétrons utilizada para reduzir a metemoglobina é a glicólise, em que o NAD⁺ é reduzido a NADH pela ação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. A eficiência desse sistema é tal que apenas quantidades mínimas de metemoglobina estão normalmente presentes nas hemácias.

A metemoglobinemia é hereditária ou adquirida

A **metemoglobinemia**, acúmulo anormal de metemoglobina, pode surgir a partir de anomalias genéticas (metemoglobinemia hereditária) ou a partir da ingestão de certos fármacos e substâncias químicas (metemoglobinemia adquirida), como as sulfonamidas ou a anilina (**Tabela 53-3**). Como a metemoglobina não se liga ao oxigênio, os pacientes afetados às vezes apresentam descoloração da pele e das membranas mucosas (cianose). A forma hereditária resulta mais frequentemente de mutações que levam à deficiência na quantidade ou na atividade da **citocromo b₅-redutase**, embora também tenham sido observadas mutações que afetam as propriedades da citocromo b₅.

TABELA 53-3 Resumo das causas de alguns distúrbios importantes que afetam as hemácias

Distúrbio	Causa principal ou única
Anemia ferropriva	Ingestão inadequada ou perda excessiva de ferro
Metemoglobinemia	Ingestão excessiva de oxidantes (várias substâncias químicas e fármacos) Deficiência genética do sistema de metemoglobina-redutase dependente de NADH (OMIM 250800) Herança de HbM (OMIM 141900)
Anemia falciforme (OMIM 603903)	Sequência do códon 6 da cadeia β alterada a partir de GAG no gene normal para GTG no gene da célula falciforme, resultando em substituição do ácido glutâmico por valina
α -Talassemias (OMIM 141800)	Mutações dos genes da α -globina, principalmente <i>crossing-over</i> desigual e grandes deleções e, com menos frequência, mutações sem sentido e de fase de leitura
β -Talassemias (OMIM 141900)	Uma ampla variedade de mutações do gene da β -globina, incluindo deleções, mutações sem sentido e de fase de leitura e outras, afetando qualquer aspecto de sua estrutura (p. ex., locais de <i>splicing</i> , mutantes promotores)
Anemias megaloblásticas	Deficiência de vitamina B ₁₂ – diminuição da absorção de vitamina B ₁₂ , frequentemente devida a uma deficiência do fator intrínseco, que é secretado normalmente pelas células parietais do estômago Deficiência de ácido fólico – ingestão diminuída, absorção deficiente ou aumento das demandas (p. ex., durante a gestação) de folato
Esferocitose hereditária ^a (OMIM 182900)	Deficiências na quantidade ou na estrutura da espectrina α ou β , anquirina, banda 3 ou banda 4.1
Deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) ^a (OMIM 305900)	Diversas mutações do gene (ligado ao X) da G6PD, principalmente mutações pontuais isoladas
Deficiência da piruvato-cinase (PK) ^a (OMIM 266200)	Várias mutações no gene que codifica a isozima R (hemácia) da PK
Hemoglobinúria paroxística noturna ^a (OMIM 311770)	Mutações no gene PIG-A, afetando a síntese de proteínas ancoradas ao GPI

^aOs números OMIM referem-se apenas aos distúrbios com base genética.

Em raros casos, a metemoglobinemia poderá resultar de mutações que tornem o átomo de ferro da hemoglobina mais suscetível à oxidação. Coletivamente conhecidas como hemoglobina M (HbM), essas formas anormais podem surgir de mutações que afetam os resíduos de histidina localizados em nível proximal ou distal do ferro heme. Na HbM_{Iwate}, por exemplo, a His87 da subunidade α é substituída por Tir. Na HbM_{Hyde Park}, a His92 da subunidade β é substituída por Tir. Na HbM_{Boston}, a His58 da subunidade α da hemoglobina é substituída por Tir, enquanto na HbM_{Saskatoon}, a His92 da subunidade β é substituída por Tir. Uma exceção a esse padrão é a HbM_{Milwaukee-1}, na qual a Val67 da subunidade β é substituída por Glu. Todos os transportadores conhecidos da HbM são heterozigotos.

A superóxido dismutase, a catalase e a glutatona protegem as hemácias de estresse e dano oxidativos

O radical aniônico **superóxido**, O₂⁻, é gerado nas hemácias pela auto-oxidação da hemoglobina a metemoglobina. Essas potentes **espécies reativas de oxigênio (ROS)** podem reagir e lesar uma grande variedade de biomoléculas, que incluem proteínas, lipídeos e nucleotídeos (ver Capítulo 58). Aproximadamente 3% da hemoglobina do sangue humano sofre auto-oxidação a cada dia. Além disso, a oxidação da proteína armazenadora de ferro, a ferritina, pelo superóxido pode levar à liberação do Fe²⁺ livre e à subsequente geração de OH[•] catalisada pelo ferro

(ver Figura 58-2). O superóxido pode, então, representar o estopim para a lesão tecidual que ocorre em indivíduos que sofrem de sobrecarga de ferro, a presença de níveis anormalmente elevados de ferro no corpo. A sobrecarga de ferro é característica de indivíduos que sofrem de **hemocromatose hereditária**, uma condição genética que faz o corpo absorver quantidades excessivas de ferro alimentar. A fonte endógena de superóxido é a enzima **NADPH-hemoproteína-redutase** (citocromo P450-redutase, ver Capítulo 12), que catalisa a redução do Fe³⁺ da metemoglobina a Fe²⁺, regenerando a hemoglobina funcionalmente competente (ver Capítulo 6).

A deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase é uma causa importante de anemia hemolítica

O conjunto limitado de vias metabólicas presentes nas hemácias as deixa completamente dependentes da **via das pentoses-fosfato** (ver Capítulo 20) ou, mais especificamente, da enzima ligada ao X **glicose-6-fosfato-desidrogenase** para a redução de NADP⁺ a NADPH. O NADPH reduzido é necessário para a redução de GSSG a GSH, um antioxidante intracelular chave, pela enzima glutatona-redutase. Uma deficiência na glicose-6-fosfato-desidrogenase deixa as hemácias hipersensíveis ao estresse oxidativo. Uma das características do estresse oxidativo nas hemácias é a formação dos **corpos de Heinz**, agregados insolúveis constituídos de moléculas de hemoglobina cujos grupos —SH foram oxidados e que se coram de roxo com cresil violeta.

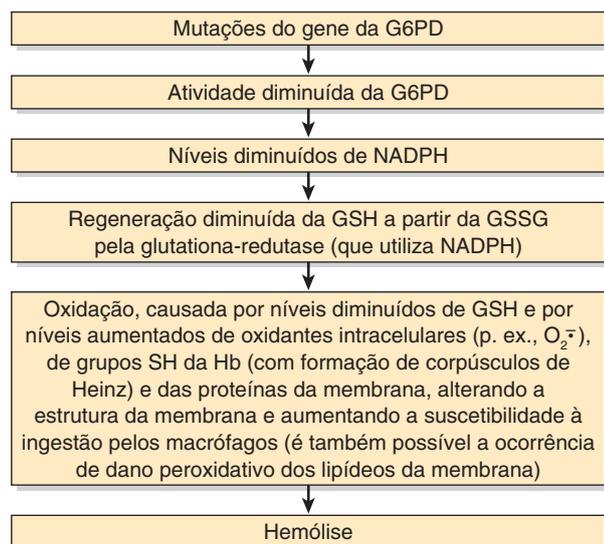


FIGURA 53-3 Resumo dos prováveis eventos que levam à anemia hemolítica causada pela deficiência da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (OMIM 305900).

A deficiência da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase é comum em nativos da África tropical, no Mediterrâneo, em certas regiões da Ásia e na América do Norte entre afro-americanos. Os indivíduos que apresentam a deficiência são vulneráveis aos ataques de anemia hemolítica, levando à incapacidade de gerar glutatona reduzida suficiente para combater episódios de estresse oxidativo (Figura 53-3). Picos de ROS indutores de sintomas podem ser desencadeados por fatores como ingestão de fármacos com **sulfonamida** ou do antimalárico **primaquina**, consumo de alimentos contendo pró-oxidantes como favas (*Vicia faba*) ou exposição a substâncias químicas como o naftaleno. A mais comum de todas as **enzimopatias** (doenças causadas por anormalidades de enzimas), estima-se que mais de 400 milhões de pessoas sejam portadoras de mais de 140 variantes genéticas da glicose-6-fosfato-desidrogenase. Como o caráter da anemia falciforme, a persistência dessas variantes genéticas tem sido atribuída ao seu potencial para conferir resistência aumentada à malária.

As anemias hemolíticas podem ser causadas por fatores extrínsecos, intrínsecos ou específicos da membrana

A anemia hemolítica pode ser desencadeada por uma variedade de fatores além das deficiências da glicose-6-fosfato-desidrogenase (Figura 53-4). Causas **extrínsecas** (além da membrana da hemácia) incluem **hiperesplenismo**, condição na qual o alargamento do baço faz as hemácias ficarem sequestradas no seu interior. As hemácias também podem ser lisadas quando atacadas por anticorpos incompatíveis presentes no plasma ou no sangue administrados por via intravenosa (p. ex., **reação de transfusão**). As incompatibilidades imunológicas também podem surgir quando um feto Rh⁺ é carregado por uma mãe Rh⁻ (**doença do Rh**) ou como consequência de um distúrbio autoimune (p. ex., **anemias hemolíticas por anticorpos quentes** ou **frios**). Alguns agentes infecciosos e

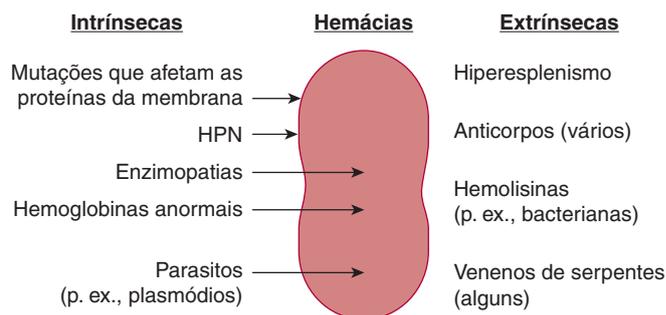


FIGURA 53-4 Representação esquemática de algumas causas de anemias hemolíticas. As causas extrínsecas incluem hiperesplenismo, vários anticorpos, determinadas hemolisinas bacterianas e alguns venenos de serpentes. As causas intrínsecas incluem mutações que afetam as estruturas das proteínas de membrana (p. ex., esferocitose hereditária e eliptocitose hereditária), HPN (hemoglobinúria paroxística noturna, ver Capítulo 47), enzimopatias, hemoglobinas anormais e determinados parasitos (p. ex., plasmódios que causam malária).

tóxicos lisam as hemácias, prejudicando diretamente a integridade estrutural de sua membrana. Por exemplo, os venenos de vários répteis e insetos contêm fosfolipases ou proteases que catalisam a quebra hidrolítica dos componentes da membrana. Da mesma forma, algumas bactérias infecciosas, incluindo certas cepas de *Escherichia coli* e clostrídios, secretam fatores líticos constituídos de proteínas, lipídeos ou uma combinação destes, chamada de **hemolisina**. As infecções **parasitárias** (p. ex., plasmódios que causam malária) também constituem causas importantes de anemias hemolíticas em determinadas áreas geográficas.

A causa primária de muitas anemias hemolíticas, como a deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase, é intracelular, também chamada de **intrínseca**. A deficiência da **piruvato-cinase** é a segunda mais comum – embora seja infrequente – deficiência enzimática associada à anemia hemolítica. A insuficiência dessa enzima glicolítica fundamental compromete a produção de ATP. Isso impacta vários aspectos da integridade da membrana, como a capacidade de exportar o excesso de água e íons como o Na⁺. Defeitos na composição ou na estrutura da hemoglobina, chamados de **hemoglobinopatias**, constituem a segunda principal classe de hemólise causada por fatores intrínsecos. A maior parte das hemoglobinopatias, como a anemia falciforme e as várias talassemias (ver Capítulo 6), é de natureza genética.

Os fatores **específicos da membrana** que tornam as hemácias vulneráveis à lise incluem mutações que afetam as proteínas do citoesqueleto responsáveis pela manutenção de seu formato bicôncavo e de sua resistência à pressão osmótica (ver a seguir). Os mais importantes desses distúrbios incluem a **esferocitose hereditária** e a **eliptocitose hereditária**, que surgem a partir de anormalidades na quantidade ou na estrutura da proteína do citoesqueleto **espectrina**. A **hemoglobinúria paroxística noturna** (ver Capítulo 46) é causada por defeitos na síntese dos grupos glicofosfatidilinositol que ancoram certas proteínas, como a acetilcolinesterase e o fator acelerador do decaimento à superfície da membrana da hemácia.

o bicarbonato gerado a partir da hidratação do CO_2 é trocado por cloreto. Nos pulmões, onde o dióxido de carbono é expirado, esse processo é reverso. A extremidade aminoterminal funciona como ponto de ancoramento para várias proteínas da hemácia, incluindo proteínas de banda 4.1 e 4.2, anquirina, hemoglobina e várias enzimas glicolíticas.

As **glicoforinas A, B e C** são proteínas de membrana *single-pass* (as cadeias polipeptídicas atravessam a membrana apenas uma vez). O segmento transmembrana de 23 aminoácidos possui configuração de α -hélice. A glicoforina A, a forma predominante, é altamente glicosilada. A extremidade aminoterminal desse polipeptídeo de 131 aminoácidos é modificada por 16 cadeias de oligossacarídeos, sendo 15 delas O-ligadas, o que representa cerca de 60% de sua massa. As cadeias de oligossacarídeos da glicoforina A representam aproximadamente 90% dos resíduos de ácido siálico ligados à membrana da hemácia. A extremidade carboxiterminal estende-se para o interior do citosol e liga-se à proteína de banda 4.1, que, por sua vez, liga-se à espectrina. O **polimorfismo** da glicoforina A fornece a base do sistema MN de grupos sanguíneos (ver a seguir). Alguns patógenos virais e bacterianos, como o vírus *influenza* e o *Plasmodium falciparum*, dirigem-se às hemácias, reconhecendo e ligando-se à glicoforina A. É intrigante o fato de os indivíduos cujas hemácias não possuem glicoforina A não apresentarem efeitos adversos.

A espectrina, a anquirina e outras proteínas de membrana periféricas ajudam a determinar o formato e a flexibilidade da hemácia

A fim de maximizar a eficiência das trocas gasosas, as hemácias devem apresentar a força estrutural para manter seu formato bicôncavo, mantendo-se flexíveis o suficiente para se espremer através dos capilares periféricos e dos sinusóides do baço. A bicamada de lipídeos da membrana da hemácia, que é inerentemente fluida, contribui significativamente para a deformabilidade da membrana da hemácia. Essa camada flexível é puxada para dentro do formato bicôncavo por uma rede forte, porém flexível, de **proteínas do citoesqueleto** (Figura 53-6).

A **espectrina** é a proteína mais abundante do citoesqueleto da hemácia. Ela é composta por dois polipeptídeos de mais de 2.100 resíduos de comprimento: espectrina 1 (cadeia α) e espectrina 2 (cadeia β). As cadeias α e β de cada dímero de espectrina entrelaçam-se em orientação antiparalela para formar uma unidade estrutural altamente estendida de cerca de 100 nm de comprimento. Em geral, dois dímeros de espectrina associam-se cabeça a cabeça para formar um tetrâmero de aproximadamente 200 nm de comprimento que fica ligado à superfície interna da membrana plasmática (e liga-se através de ligações a outros tetrâmeros de espectrina) via anquirina, actina e proteína de banda 4.1. O resultado é uma rede interna, o citoesqueleto, que é forte o suficiente para manter o formato da célula e resistir ao intumescimento devido à pressão osmótica, sendo ainda flexível o suficiente para permitir que a hemácia se dobre quando necessário.

A **anquirina** é uma proteína em formato de pirâmide que **se liga à espectrina**. Por sua vez, a anquirina liga-se firmemente à banda 3, assegurando a fixação da espectrina à membrana.

A anquirina é sensível à proteólise, explicando o aparecimento das bandas 2.2, 2.3 e 2.6, sendo todas derivadas da banda 2.1.

A **actina** (banda 5) é encontrada nas hemácias na forma de filamentos curtos em dupla-hélice de F-actina. A extremidade terminal dos dímeros da espectrina liga-se à actina. A actina também se liga à proteína 4.1.

A **proteína 4.1**, uma proteína globular, liga-se firmemente à extremidade distal da espectrina, próximo ao sítio de ligação da actina desta última e, portanto, constitui parte de um complexo ternário de proteína 4.1-espectrina-actina. A proteína 4.1 também se liga às proteínas integrais glicoforina A e glicoforina C, fixando, dessa maneira, o complexo ternário à membrana. Além disso, a proteína 4.1 pode interagir com alguns fosfolipídeos da membrana, conectando a bicamada lipídica ao citoesqueleto.

Algumas outras proteínas que existem em menor quantidade, como a banda 4.9, a aducina e a tropomiosina, também participam da **montagem do citoesqueleto**.

As anormalidades quantitativas ou estruturais da espectrina levam à esferocitose e à eliptocitose hereditárias

A **esferocitose hereditária**, doença genética transmitida como traço autossômico dominante, afeta aproximadamente 1 em cada 5 mil indivíduos de ascendência do norte da Europa. Ela caracteriza-se pela presença de esferócitos (hemácias esféricas com baixa razão superfície-volume) no sangue periférico, por **anemia hemolítica** e por esplenomegalia. Os esferócitos são mais vulneráveis à lise quando expostos a uma pressão osmótica menor do que a normal, uma vez que seu formato esférico oferece pouca capacidade para acomodar água adicional. O seu formato anormal também os deixa menos suscetíveis à deformação e mais propensos à destruição pelo baço, reduzindo muito a sua vida na circulação.

A **esferocitose hereditária** é causada por uma deficiência na quantidade de **espectrina** ou por anormalidades na sua estrutura que minam a sua capacidade de se associar a outros componentes do citoesqueleto. O conseqüente enfraquecimento das ligações que ancoram a membrana da hemácia ao citoesqueleto leva à adoção do formato esferocítico. A esferocitose hereditária também pode resultar de mutações que produzem anormalidades na anquirina ou nas bandas 3, 4.1 ou 4.2. A anemia associada à esferocitose hereditária é geralmente aliviada pela remoção cirúrgica do baço do paciente (**esplenectomia**).

A **eliptocitose hereditária** também advém de distúrbios genéticos que geram anormalidades na **espectrina** ou, menos frequentemente, na proteína da banda 4.1 ou na **glicoforina C**. Ela pode ser rapidamente diferenciada da esferocitose hereditária devido ao fato de as hemácias afetadas assumirem formato elíptico, semelhante a um disco.

BASE BIOQUÍMICA DO SISTEMA ABO

São reconhecidos cerca de 30 sistemas de grupos sanguíneos humanos, dos quais os mais conhecidos são os sistemas **ABO**,

à substância H. O gene *B* codifica uma UDP-Gal-específica, a **Gal-transferase** que adiciona o resíduo Gal à substância H. Indivíduos do **tipo AB** possuem ambas as enzimas e, portanto, apresentam duas cadeias oligossacarídicas (Figura 53-7), uma terminada por GalNAc e a outra, por Gal.

Os anticorpos anti-A são dirigidos contra o resíduo GalNAc adicional presente na substância A, ao passo que os anticorpos anti-B são dirigidos contra o resíduo Gal adicional existente na substância B. Para a substância do grupo sanguíneo A, GalNAc é o **açúcar imunodominante** (i.e., aquele que determina a especificidade do anticorpo formado), e Gal é o açúcar imunodominante da substância B. Indivíduos do tipo O possuem uma mutação de fase de leitura no gene que codifica a glicosiltransferase terminal que leva à produção de uma proteína inativa. Portanto, a substância H representa a substância do grupo sanguíneo ABO.

O alelo *h* do *locus* H codifica uma fucosiltransferase inativa. Indivíduos do genótipo *hh* não podem gerar substância H, o precursor dos antígenos A e B, embora possam ter as enzimas necessárias para converter a substância H nas substâncias A ou B. Indivíduos que possuem o genótipo *hh* apresentarão hemácias tipo O, conhecidas como fenótipo Bombay (O_h).

PLAQUETAS

As plaquetas contêm mitocôndrias, mas não possuem núcleo

Em resposta à trombopoietina, os megacariócitos que são os progenitores das hemácias podem se fragmentar para formar plaquetas (Figura 53-1). Como as hemácias, as plaquetas não possuem núcleo, porém, ao contrário daquelas, possuem mitocôndrias, lisozimas e uma rede tubular que forma um **sistema canalicular aberto**. O aspecto de “favo de mel” dos canais aumenta a área superficial das plaquetas, que são esféricas no repouso, facilitando a secreção de vários fatores endócrinos e da coagulação quando estimuladas (ver Capítulo 55). Esses fatores são armazenados no interior das plaquetas em vesículas secretoras densamente empacotadas, chamadas de **grânulos densos**, que contêm Ca^{2+} , ADP e serotonina, e de **α -grânulos**, que contêm fibrinogênio, fibronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de von Willebrand e outros fatores da coagulação. Em circunstâncias normais, essas pequenas (2 μ m de diâmetro) células enucleadas circulam à densidade de 2 a 4 $\times 10^5$ plaquetas por milímetro de sangue. As plaquetas derivam a maior parte da sua energia da metabolização da glicose, ao passo que suas mitocôndrias permitem que elas gerem ATP via β -oxidação de ácidos graxos. Os mecanismos pelos quais as plaquetas são ativadas para participar na formação de um coágulo serão discutidos no Capítulo 55.

Os distúrbios de plaquetas comprometem a homeostasia

As anormalidades na quantidade ou na função das plaquetas podem levar a graves consequências biomédicas. A **síndrome coronariana aguda** é caracterizada pela formação de plaquetas hiper-reativas aumentadas, levando ao risco aumentado de

trombose, que consiste na formação de coágulos sanguíneos no interior da circulação. A presença de plaquetas maiores do que o normal também se relaciona com frequência aumentada de infarto do miocárdio.

A **púrpura trombocitopênica imune** é uma doença autoimune marcada por contagem reduzida de plaquetas (**trombocitopenia**) causada pela geração de anticorpos contra as próprias plaquetas do paciente. As plaquetas cuja superfície é decorada com anticorpos estão sujeitas à depuração da circulação por macrófagos esplênicos. Em alguns casos, os autoanticorpos das plaquetas se ligarão aos megacariócitos em diferenciação, reduzindo a produção de plaquetas. A trombocitopenia também pode ocorrer quando indivíduos que são homocigotos para uma variante mutante da glicoproteína IIb/IIIa, na qual a leucina 33 é substituída por prolina, recebem sangue de um doador que é homocigoto ou heterocigoto para o tipo selvagem desse antígeno majoritário das plaquetas. A exposição às plaquetas do doador desencadeia a produção de **aloanticorpos** que atacam não apenas as plaquetas doadas, mas também as plaquetas endógenas do paciente. Na **trombocitopenia aloimune neonatal**, que afeta aproximadamente 1 em cada 200 gestações a termo, os anticorpos da circulação materna atravessam a barreira placentária e atacam as plaquetas no sistema circulatório do feto.

A trombocitopenia também pode ser induzida por fármacos, como tamoxifeno, ibuprofeno, vancomicina e muitas sulfonamidas. Os sintomas da **síndrome hemolítico-urêmica**, uma doença de bebês caracterizada por insuficiência renal progressiva, incluem tanto trombocitopenia quanto anemia hemolítica. A hemorragia anormal associada à **doença de von Willebrand** é causada por um distúrbio genético que compromete a capacidade de as plaquetas aderirem ao endotélio, e não por uma deficiência em sua quantidade. Outros distúrbios hemorrágicos que resultam de defeitos na aderência das plaquetas incluem a **síndrome de Bernard-Soulier** (deficiência herdada geneticamente na glicoproteína 1b) e a **trombastenia de Glanzmann** (deficiência herdada geneticamente no complexo glicoproteico IIb/IIIa).

A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE TEVE ENORME IMPACTO SOBRE A HEMATOLOGIA

A tecnologia do DNA recombinante teve grande impacto sobre muitos aspectos da hematologia. As bases das **talassemias** e de muitos **distúrbios da coagulação** (ver Capítulo 55) tem sido amplamente esclarecidas por pesquisas que utilizaram a clonagem gênica e o sequenciamento de DNA. O estudo dos oncogenes e das translocações cromossômicas ampliou o conhecimento sobre as **leucemias**. Conforme discutido, as técnicas de clonagem permitiram a disponibilidade de quantidades terapêuticas de **eritropoietina** e de **outros fatores de crescimento**. A deficiência de **adenosina-desaminase**, uma condição que afeta particularmente os linfócitos, foi a primeira doença a ser tratada por terapia gênica. Em 1990, o Dr. William French Anderson introduziu uma nova cópia do gene, transportada em um vetor retroviral, em uma menina de 4 anos

que sofria de imunodeficiência combinada grave (doença do “menino-bolha”). Embora a paciente ainda precise tomar medicações, o gene substituído permaneceu estável até a idade adulta.

RESUMO

- As principais causas de anemia consistem em perda de sangue, deficiência de ferro, folato e vitamina B₁₂ e vários fatores que causam hemólise.
- O formato das hemácias contribui para a eficiência da troca gasosa e para a sua capacidade de sofrer deformações que facilitam a sua passagem pelos capilares.
- A produção de hemácias e plaquetas é regulada por eritropoietina, trombopoietina e outras citocinas.
- As hemácias maduras não possuem organelas internas e, portanto, são dependentes da glicólise para gerar ATP.
- A 2,3-bifosfoglicerato-mutase isomeriza o intermediário glicolítico 1,3-bifosfoglicerato para formar 2,3-bifosfoglicerato, que estabiliza a hemoglobina em estado T.
- A metemoglobina é incapaz de transportar oxigênio. As causas genéticas e adquiridas da metemoglobinemia são reconhecidas.
- A citocromo b₅-redutase reduz o Fe³⁺ da metemoglobina a Fe²⁺, restaurando a sua função.
- A hemácia contém uma bateria de enzimas citosólicas – superóxido dismutase, catalase e glutatona-peroxidase – que catalisam a neutralização de oxidantes poderosos (ROS) gerados durante o seu metabolismo.
- A deficiência geneticamente determinada da atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que produz NADPH, constitui uma causa importante de anemia hemolítica.
- As proteínas do citoesqueleto, como a espectrina, a anquirina e a actina, interagem com proteínas de membrana integrais e específicas para ajudar a regular o formato e a flexibilidade das hemácias.
- A deficiência de espectrina resulta em esferocitose hereditária e eliptocitose hereditária, sendo que ambas causam anemia hemolítica.
- A proteína transmembrana de banda 4.1 facilita a troca dos íons bicarbonato e cloreto pelas hemácias.
- As substâncias no grupo sanguíneo ABO, na membrana da hemácia, são glicosíngolípídeos complexos. O açúcar imunodomi-

nante da substância A é a N-acetilgalactosamina, ao passo que o da substância B é a galactose. A substância O não possui nenhum desses dois resíduos de açúcar nas ligações particulares encontradas nas substâncias A e B.

- As plaquetas são pequenos fragmentos enucleados das grandes células precursoras, chamadas de megacariócitos.
- Quando ativadas, as plaquetas liberam moléculas efetoras, bem como fibrinogênio armazenado nos grânulos secretores.
- Uma mutação genética que compromete a capacidade de aderência das plaquetas é a causa da doença de von Willebrand, um distúrbio hemorrágico.

REFERÊNCIAS

- Dzierzak E, Philipsen S: Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011601.
- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. McGraw-Hill, 2008. (Chapters 58, 61, & 98–108 deal with various blood disorders. Chapters 66–68 deal with various aspects of hematopoietic and other stem cells).
- Hofmann R, Benz EJ Jr, Shattal SJ, et al (editors): *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- Imlay JA: Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008;77:755.
- Israels SJ (editor): *Mechanisms in Hematology*, 4th ed. Core Health Sciences Inc, 2011.
- Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, et al: The causal role of megakaryocyte platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* 2012;9:658.
- Naria A, Ebert BL: Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010;115:3196.
- Orkin SH, Higgs DR: Sickle cell disease at 100 years. *Science* 2010;329:291.
- Smyth SS, Whiteheart S, Italiano JE Jr, Collier BS: Platelet morphology, biochemistry, and function. In: *Williams Hematology*, 8th ed. Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al (editors). McGraw-Hill, 2010;1735.
- Weatherall DJ: The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health problem. *Blood* 2010;115:4331.
- Whichard ZL, Sarkar CA, Kimmel M, Corey SJ: Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood* 2010;115:2339.

Leucócitos

Peter J. Kennelly, Ph.D. e Robert K. Murray, M.D., Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender que os leucócitos trabalham em conjunto para combater a infecção e para desencadear a resposta inflamatória.
- Descrever os passos básicos na eliminação de microrganismos infecciosos por fagocitose.
- Descrever o papel da quimiotaxia na função do leucócito.
- Relacionar os principais componentes encontrados no interior dos grânulos de fagócitos, assim como os basófilos e suas funções primárias.
- Relacionar as espécies reativas de oxigênio produzidas durante a explosão respiratória.
- Explicar a base dos efeitos fisiológicos causados pelos defeitos no sistema NADPH-oxidase.
- Explicar a base molecular da deficiência da adesão leucocitária tipo 1.
- Descrever como neutrófilos e eosinófilos capturam os parasitos utilizando as NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos).
- Descrever o papel das células T auxiliares na produção de novos anticorpos.
- Definir o termo citocina e descrever as principais características de interleucinas, interferons, prostaglandinas e leucotrienos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Os glóbulos brancos, ou **leucócitos**, funcionam como sentinelas-chave e potentes defensores contra os patógenos invasores. O tipo de leucócito mais abundante, chamado de **neutrófilo**, ingere e destrói bactérias e fungos invasores, processo conhecido como **fagocitose**. Os parasitos maiores são fagocitados por **eosinófilos**. Os **monócitos** circulantes migram da corrente sanguínea para os tecidos lesados, onde se diferenciam em **macrófagos** fagocíticos. Os **granulócitos**, como os **basófilos** e os **mastócitos**, liberam efetores armazenados que atraem leucócitos adicionais para o sítio da infecção e desencadeiam resposta inflamatória. Os **linfócitos B** produzem e liberam anticorpos protetores com a assistência dos **linfócitos T**. Outros linfócitos, como as **células T citotóxicas** e as **células natural killer**, dirigem-se para as células hospedeiras infectadas por vírus e transformadas por neoplasias.

As neoplasias malignas dos tecidos formadores do sangue, chamadas de **leucemias**, podem levar à produção descontrolada de uma ou mais das principais classes de leucócitos. A hiperativação de granulócitos que ocorre como parte de uma

resposta alérgica pode, em casos extremos, levar à **anafilaxia** e ao óbito. A lesão ou a infecção da medula óssea pode levar à **leucopenia**, uma diminuição na produção de leucócitos. O déficit resultante nos níveis de leucócitos circulantes pode deixar o indivíduo afetado suscetível à infecção (**imunocomprometido**). A leucopenia pode resultar de lesão física, quimioterapia, radiação ionizante, infecção pelo **vírus Epstein-Barr** (mononucleose), resposta autoimune (**lúpus**) ou deslocamento de células da medula por tecidos fibrosos (**mielofibrose**).

A DEFESA CONTRA A INFECÇÃO REQUER VÁRIOS TIPOS CELULARES

Os **leucócitos** são importantes participantes da **resposta inflamatória aguda**, um processo multicomponente que defende o corpo contra organismos infecciosos e melhora o impacto da infecção tecidual ou da morbidade. As principais etapas da resposta inflamatória incluem (1) aumento da permeabilidade vascular, (2) entrada dos leucócitos ativados nos tecidos,

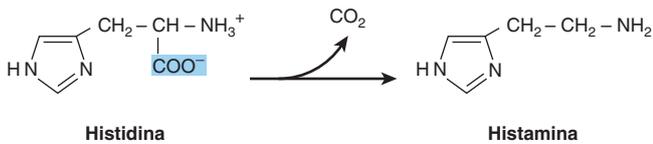


FIGURA 54-1 Estruturas da histidina e de seu produto de descarboxilação, a histamina.

(3) ativação das plaquetas e (4) regressão (resolução) espontânea, caso os microrganismos invasores tiverem sido erradicados com sucesso. Os **basófilos** secretam efetores hematológicos, como a histamina (Figura 54-1), que facilitam o acúmulo de fluido nos tecidos infectados ou lesados, assim como de quimiocinas, que atraem **neutrófilos** adicionais. Os neutrófilos ativados encapsulam bactérias invasoras no interior de vesículas membranosas (**fagocitose**) e destroem-nas utilizando uma combinação de enzimas hidrolíticas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e peptídeos antimicrobianos. Os **monócitos** circulantes são os precursores dos **macrófagos** fagocíticos, que fagocitam células hospedeiras infectadas ou lesadas. Os **linfócitos** produzem anticorpos protetores que se dirigem para invasores estranhos e os marcam para eliminação.

Os leucócitos, diferentemente das hemácias e das plaquetas, possuem um complemento completo de organelas internas. Os núcleos de muitos leucócitos apresentam desvios marcantes das organelas esféricas compactas presentes na maioria das células eucarióticas. Os núcleos dos monócitos, por exemplo, são anormalmente grandes e notavelmente irregulares em seu formato. Os núcleos dos **leucócitos polimorfonucleares**, como os neutrófilos e os eosinófilos, segmentam-se em múltiplos lobos.

MÚLTIPLOS EFETORES REGULAM A PRODUÇÃO DE LEUCÓCITOS

A maioria dos leucócitos se renova rapidamente e, portanto, deve ser continuamente substituída. O tempo de vida de um leucócito mieloide circulante, por exemplo, oscila de poucas horas a poucos dias, ao passo que a maioria dos linfócitos persiste por apenas poucas semanas no sangue. Uma notável exceção

a esse padrão são os **linfócitos de memória**, que podem viver por vários anos. A produção de monócitos e granulócitos ocorre pela formação de um **progenitor mieloide comum**, ao passo que a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em linfócitos ocorre via formação de **progenitor linfoide comum** (ver Figura 53-1). A proliferação de células-tronco hematopoiéticas e a determinação de seu destino final são controladas pelas influências conjuntas de múltiplas moléculas efetoras. O fator de crescimento da célula-tronco, o fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófágicas e as interleucinas 5 e 6, por exemplo, estimulam a produção de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e monócitos, um processo que ocorre via formação de **células progenitoras mieloides**. O fator de necrose tumoral α , o fator de transformação do crescimento $\beta 1$ e as interleucinas 2 e 7 promovem a formação das **células progenitoras linfoides** e a sua eventual maturação em células B e T.

OS LEUCÓCITOS SÃO MÓVEIS

Os leucócitos migram em resposta aos sinais químicos

Os leucócitos podem ser encontrados em todo o corpo, migrando do sangue para os sítios de lesão ou infecção em resposta aos sinais químicos, um processo conhecido como **quimiotaxia**. A locomoção ocorre por um mecanismo **ameboide** passo a passo. Impelidos pelas proteínas do citoesqueleto, os leucócitos estendem uma projeção, chamada de pseudópode. Uma vez que o pseudópode se ancore, as proteínas do citoesqueleto associadas ao corpo principal da célula se contraem, espremendo o conteúdo celular na direção do interior do pseudópode. O pseudópode enche-se de citoplasma e organelas, formando um novo corpo celular translocado. Os restos do corpo celular antigo são absorvidos, e um novo pseudópode estende-se para iniciar o próximo passo.

Os leucócitos iniciam sua migração a partir da corrente sanguínea para o interior dos tecidos adjacentes, espremendo-se através das paredes capilares. Chamado de **diapedese**, esse processo lembra o movimento ameboide no que se refere à capacidade das proteínas do citoesqueleto de contornarem o formato

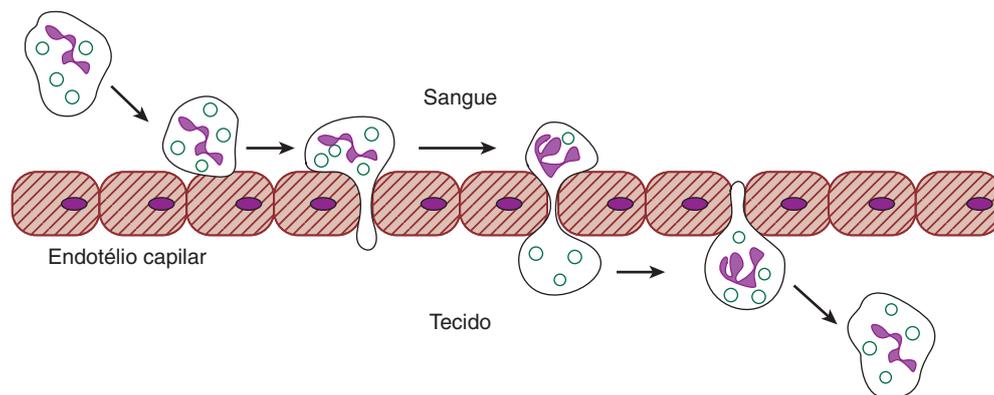


FIGURA 54-2 Diapedese. São mostradas, da esquerda para a direita, as principais etapas da diapedese, processo pelo qual os neutrófilos e outros leucócitos atravessam a parede capilar – cujas células estão evidenciadas em vermelho –, em resposta a sinais quimiotáticos. Os núcleos celulares são mostrados em roxo, e os grânulos, em verde.

do leucócito de maneira drástica. O processo inicia com a extensão de uma fina projeção semelhante a um pseudópode entre as células que constituem o epitélio capilar (Figura 54-2). Como ocorre no movimento ameboide, o conteúdo da célula é, em seguida, espremido pela estreita passagem formada pela projeção no interior da extremidade distal, que é preenchida para formar um novo corpo celular no lado oposto à parede capilar.

A quimiotaxia é mediada por receptores acoplados à proteína G

Os leucócitos são atraídos para os tecidos por **fatores quimiotáticos** que incluem quimiocinas, fragmento C5a do complemento, pequenos peptídeos derivados de bactérias (p. ex., *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina) e diversos leucotrienos. A ligação desses fatores aos receptores específicos da superfície celular ativa uma cascata de transdução de sinal semelhante à que modula a ativação das plaquetas. Ambas as cascatas são iniciadas pelo acoplamento do ligante aos receptores que contêm sete domínios transmembrana que estão intimamente ligados às proteínas de ligação do nucleotídeo heterotrimérico guanosina (**proteínas G**). As proteínas G ativam a **fosfolipase C**, que hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para produzir os **diacilgliceróis** e o segundo mensageiro hidrossolúvel **inositol-1,4,5-trifosfato** (IP₃). A presença de IP₃ desencadeia a liberação de Ca²⁺, levando ao aumento transitório do nível de Ca²⁺ citoplasmático. Nos neutrófilos, a presença de Ca²⁺ ativa os componentes do citoesqueleto actina-miosina responsáveis pela migração celular e pela secreção de grânulos. O diacilglicerol, juntamente com o Ca²⁺, estimula a proteína-quinase C e induz a sua translocação do citosol para a membrana plasmática, onde catalisa a **fosforilação** de várias proteínas, incluindo algumas envolvidas na ativação da explosão respiratória (ver a seguir).

As quimiocinas são estabilizadas por ligações dissulfeto

As quimiocinas são proteínas pequenas, geralmente de 6 a 10 kDa, secretadas por leucócitos ativados que atraem leucócitos adicionais para o sítio da infecção ou da lesão. As quimiocinas podem ser divididas em quatro subclasses de acordo com o número e o espaçamento de seus resíduos de cisteína que participam da formação das ligações dissulfeto que estabilizam a conformação da proteína (Figura 54-3). As quimiocinas tipo C são caracterizadas pela presença de um par de resíduos conservados de cisteína que formam uma ligação dissulfeto interna à cadeia. Além da ligação dissulfeto conservada presente no tipo C, os outros três grupos de quimiocinas reconhecidos possuem uma segunda ligação dissulfeto. Nas quimiocinas tipo CC, um dos resíduos adicionais de cisteína encontra-se adjacente ao primeiro do primeiro par de resíduos universalmente conservados. Nos tipos CXC e CX₃C, essas cisteínas são separadas por um e três resíduos de aminoácidos intervenientes, respectivamente. As quimiocinas CX₃C, as maiores dos quatro tipos de citocinas, apresentam uma extremidade C-terminal mais longa, que inclui sítios de modificação covalente por glicosilação.

As integrinas facilitam a diapedese

A adesão de leucócitos às células endoteliais vasculares é mediada por glicoproteínas transmembrana das famílias da **integrina** e da **selectina** (ver a discussão sobre **selectinas**, no Capítulo 46). As **integrinas** são constituídas de uma subunidade α e uma subunidade β ligadas de forma não covalente. Cada subunidade contém os segmentos extracelular, transmembrana e intracelular. Os segmentos extracelulares ligam-se a várias proteínas da superfície celular que possuem as sequências

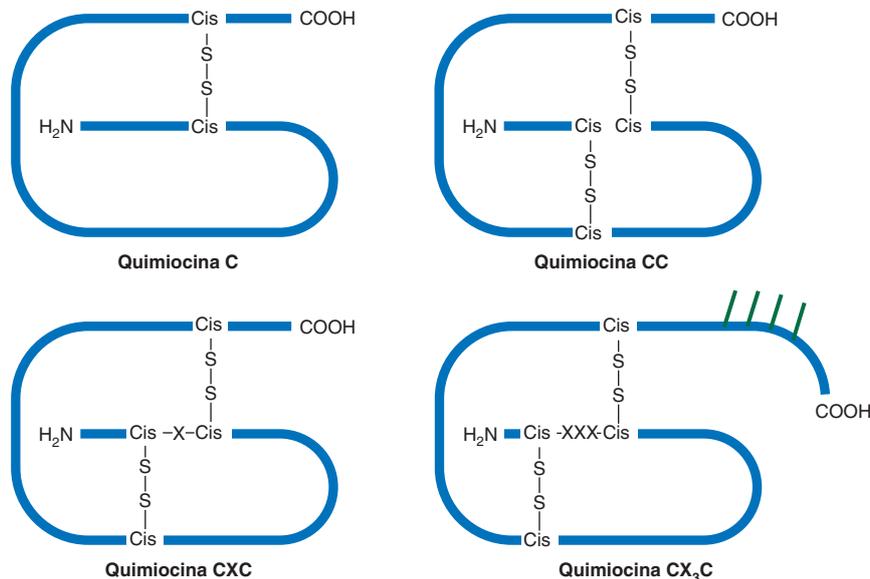


FIGURA 54-3 Quimiocinas. A figura mostra as principais características estruturais das quimiocinas tipo C, CC, CXC e CX₃C. As cadeias polipeptídicas estão evidenciadas em azul com seus terminais amino e carboxi marcados por H₂N e COOH, respectivamente. Os resíduos importantes de cisteína estão marcados como Cis, ligações dissulfeto conservadas, como S-S, e os aminoácidos espaçadores para os tipos CXC e CX₃C, por X. O carboidrato ligado está mostrado em verde.

TABELA 54-1 Principais integrinas dos leucócitos e das plaquetas^a

Integrina	Célula	Subunidade	Ligante	Função
VLA-1 (CD49a)	Leucócitos, outras células	$\alpha 1\beta 1$	Colágeno, laminina	Adesão célula-MEC
VLA-5 (CD49e)	Leucócitos, outras células	$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Adesão célula-MEC
VLA-6 (CD49f)	Leucócitos, outras células	$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Adesão célula-MEC
LFA-1 (CD11a)	Leucócitos	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1	Adesão dos leucócitos
Glicoproteína IIb/IIIa	Plaquetas	$\alpha IIb\beta 3$	ICAM-2	
Fibrinogênio, fibronectina, fator de von Willebrand	Adesão e agregação das plaquetas			

^aCD, *cluster* de diferenciação; ICAM, molécula de adesão intercelular; LFA-1, antígeno 1 associado à função do linfócito; MEC, matriz extracelular; VLA, antígeno muito tardio. **Nota:** a deficiência de LFA-1 e de integrinas relacionadas é encontrada na deficiência de adesão leucocitária tipo I (OMIM 116920). A deficiência do complexo de glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas ocorre na trombostenia de Glanzmann (OMIM 273800), um distúrbio caracterizado por história de sangramento, contagem normal de plaquetas e retração anormal do coágulo. Esses achados ilustram como o conhecimento básico das proteínas de adesão da superfície celular pode esclarecer a etiologia de diversas doenças.

Arg-Gli-Asp (p. ex., vários componentes da matriz extracelular). Os domínios intracelulares ligam-se a várias proteínas do citoesqueleto, como a actina e a vinculina. As integrinas ajudam a integrar as respostas dos leucócitos (p. ex., movimento e fagocitose) às alterações do ambiente devido à sua capacidade de ligar o exterior ao interior das células através de seus domínios de ligação duplos. A **Tabela 54-1** fornece uma lista de interesse específico no que diz respeito aos neutrófilos.

A **deficiência da adesão leucocitária tipo 1** é causada pela ausência da subunidade β_2 (também chamada de CD18) de LFA-1 e de duas integrinas relacionadas encontradas em neutrófilos e macrófagos, Mac-1 (CD11b/CD18) e p150,95 (CD11c/CD18). A ausência dessas proteínas compromete a capacidade dos leucócitos afetados de aderirem às células endoteliais, o primeiro passo da diapedese. Como menos leucócitos penetram em seus tecidos infectados, indivíduos afetados tendem a sofrer de infecções bacterianas e fúngicas recorrentes.

MICROORGANISMOS INVASORES E CÉLULAS INFECTADAS SÃO ELIMINADOS POR FAGOCITOSE

Os fagócitos ingerem células-alvo

Um mecanismo fundamental pelo qual os leucócitos destroem microrganismos invasores é a **fagocitose** (**Figura 54-4**). Os leucócitos fagocíticos reconhecem e ligam-se às células-alvo utilizando receptores que reconhecem grupos de superfície endógenos, como lipopolissacarídeos bacterianos ou peptídeo-glicanos. Na maioria dos casos, entretanto, patógenos infecciosos são reconhecidos indiretamente pela presença de anticorpos ou fatores do complemento que tenham aderido previamente à sua superfície (ver Capítulo 52). O processo de sinalização de um invasor com proteínas protetoras para facilitar o reconhecimento por leucócitos fagocíticos é chamado de **opsonização**.

A ligação ao receptor desencadeia alterações drásticas no formato do fagócito, que, em seguida, engloba a célula-alvo até que esteja envolvida em uma vesícula membranosa

internalizada, chamada de **fagossomo** (fagolisossomo). Em seguida, a célula internalizada é destruída, utilizando uma combinação de enzimas hidrolíticas (p. ex., lisozima, proteases), peptídeos antimicrobianos (defensinas) e espécies reativas de oxigênio. As enzimas e toxinas responsáveis pela lise da célula englobada e pela quebra de seus componentes

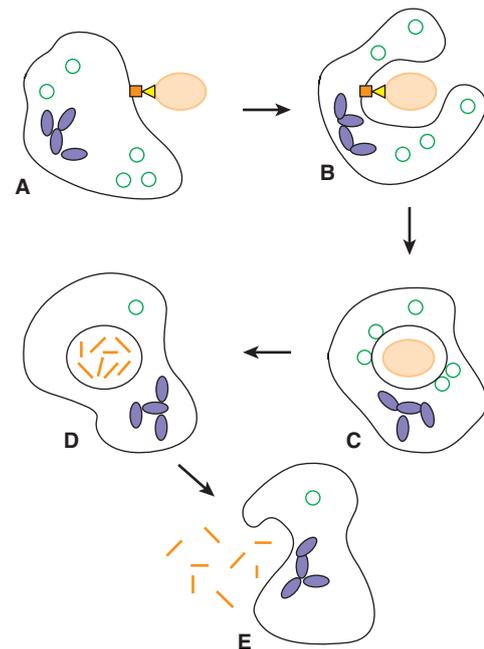


FIGURA 54-4 Fagocitose. Esta figura mostra a destruição de um microrganismo opsonizado, sombreado em cor de laranja, por um neutrófilo via fagocitose. O núcleo multilobado do neutrófilo é mostrado em roxo, e os grânulos secretores, em verde. A presença de um anticorpo ou complemento sinalizador é indicada por um triângulo amarelo, com o receptor correspondente na superfície celular como um quadrado cor de laranja-brilhante. Restos celulares do microrganismo estão representados como segmentos lineares alaranjados. (A) O neutrófilo liga-se a uma molécula de antígeno no microrganismo opsonizado via receptor. (B) O neutrófilo engloba o microrganismo. (C) Os grânulos secretores fundem-se com o fagossomo recém-internalizado, liberando seus conteúdos. (D) As enzimas e citotoxinas derivadas dos grânulos destroem o microrganismo. (E) Em seguida, o fagossomo funde-se com a membrana celular, expelindo quaisquer resíduos restantes.

TABELA 54-2 Enzimas e proteínas dos grânulos de leucócitos fagocíticos

Enzima ou proteína	Reação catalisada ou função	Comentário
Mieloperoxidase (MPO)	$H_2O_2 + X^-$ (halogeneto) + $H^+ \rightarrow HOX + H_2O$ em que $X^- = Cl^-$, HOX = ácido hipocloroso	Responsável pela cor verde do pus; deficiência genética pode causar infecções recorrentes
NADPH-oxidase	$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot -} + NADP + H^+$	Componente essencial da explosão respiratória; deficiente na doença granulomatosa crônica
Lisozima	Hidrolisa a ligação entre o ácido <i>N</i> -acetilmurâmico e a <i>N</i> -acetil-D-glicosamina encontrada em certas paredes celulares bacterianas	Abundante nos macrófagos; hidrolisa peptidoglicanos bacterianos
Defensinas	Peptídeos antibióticos básicos de 20-33 aminoácidos	Destroem aparentemente as bactérias, provocando dano nas membranas
Lactoferrina	Proteína de ligação ao ferro	Pode inibir o crescimento de certas bactérias por meio de sua ligação ao ferro e pode estar envolvida na regulação da proliferação das células mieloides
Elastase Colagenase Gelatinase Cathepsina G	Proteases	Abundantes em fagócitos; quebram componentes proteicos de organismos infecciosos; geram fragmentos para a apresentação do antígeno

macromoleculares (Tabela 54-2) são armazenadas em vesículas citoplasmáticas que se fundem com o fagossomo. Essas vesículas são algumas vezes chamadas de **grânulos**, e as células que as abrigam, de **granulócitos**, com base na sua aparência quando examinadas ao microscópio. Por fim, o fagossomo migra para a membrana plasmática do leucócito, onde se funde e expele os restos remanescentes.

Os componentes desses restos, que incluem fragmentos de proteínas, oligossacarídeos, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e polinucleotídeos, fornecem uma importante fonte de antígenos para o estímulo da produção de novos anticorpos. Os linfócitos e outros leucócitos absorvem esses materiais via endocitose (ver Figura 40-21). O fagócito ocasionalmente absorverá alguns restos do fagossomo e os mandará para a superfície celular em associação com uma proteína de membrana chamada de **complexo maior de histocompatibilidade (MHC)**. O MHC funciona como alicerce para a apresentação de antígenos potenciais para os linfócitos adjacentes em uma forma que estimula a produção de novos anticorpos.

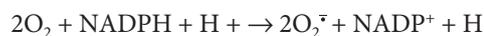
As três principais classes de leucócitos fagocíticos são **neutrófilos**, **eosinófilos** e **macrófagos**. Os neutrófilos, que representam cerca de 60% dos leucócitos presentes na circulação, fagocitam bactérias e pequenos microrganismos eucarióticos, como os fungos. Os **eosinófilos** são menos numerosos, constituindo 2 a 3% dos leucócitos do sangue, e ingerem microrganismos eucarióticos maiores, como os **paramécios**. Os macrófagos são derivados dos monócitos, que constituem aproximadamente 5% dos leucócitos do sangue. Os monócitos migram da corrente sanguínea para os tecidos de todo o corpo onde, após receber um estímulo, diferenciam-se para formar **macrófagos**. Enquanto os macrófagos também podem ingerir micróbios invasores, a função característica desses grandes fagócitos é remover as células hospedeiras humanas que tenham sido comprometidas por infecção, transformação maligna ou morte celular programada, também conhecida como **apoptose**. Essas células funcionalmente comprometidas são reconhecidas pelo aparecimento de proteínas e oligossacarídeos aberrantes na sua superfície. A ativação precoce de macrófagos é

associada à etiologia de muitas doenças degenerativas, como osteoporose, aterosclerose, artrite e fibrose cística, e pode facilitar a metástase de células cancerosas.

Os leucócitos fagocíticos geram espécies reativas de oxigênio durante a explosão respiratória

As **espécies reativas de oxigênio (ROS)**, como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} e $HOCl$ (ácido hipocloroso), formam o principal componente do arsenal químico e enzimático utilizado pelos fagócitos para destruir células ingeridas. A produção de vários derivados reativos de oxigênio ocorre lentamente (15 a 60 segundos) após a internalização de uma célula encapsulada, utilizando O_2 e elétrons derivados de NADPH. O aumento consequente no consumo de oxigênio tem sido chamado de **explosão respiratória**. A produção de grandes quantidades de NADPH é facilitada pela forte dependência dos fagócitos, que contêm relativamente poucas mitocôndrias, da glicólise aeróbia para gerar ATP. A consequente necessidade de manter robustos suprimentos de precursores e intermediários glicolíticos garante a disponibilidade da glicose-6-fosfato necessária para reduzir $NADP^+$ a NADPH pela via das pentoses-fosfato (ver Capítulo 20).

A formação de microbicidas derivados de oxigênio reativo durante a explosão respiratória inicia com a síntese de superóxido, que é catalisada pelo **sistema NADPH-oxidase**. A catálise procede via mecanismo de duas etapas. A primeira etapa é a redução do oxigênio molecular para formar superóxido (Tabela 54-2):



Esta é seguida pela dismutação espontânea do **peróxido de hidrogênio** a partir de duas moléculas de superóxido:

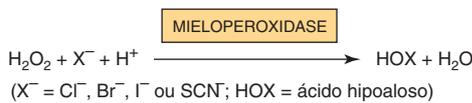


O sistema NADPH-oxidase é constituído de **citocromo b_{558}** , um heterodímero associado à membrana plasmática que contém polipeptídeos de 91 kDa e 22 kDa e dois peptídeos

citoplasmáticos de 47 kDa e 67 kDa. Após a ativação, os peptídeos citoplasmáticos são recrutados para a membrana, plasmática onde se associam ao citocromo b_{558} para formar o complexo ativo. O NADPH é gerado pelo ciclo da pentose fosfato, cuja atividade também aumenta consideravelmente durante a fagocitose. Qualquer superóxido dos fagossomos que penetre no citosol é convertido em H_2O_2 pela **superóxido dismutase**, que catalisa a mesma reação da dismutação espontânea mencionada anteriormente. Por sua vez, a H_2O_2 é utilizada pela mieloperoxidase (ver adiante) ou eliminada pela ação da glutatona-peroxidase ou catalase.

A mieloperoxidase catalisa a produção de oxidantes clorados

A formação de ácidos hipocloros durante a explosão respiratória é catalisada pela enzima **mieloperoxidase**.



Presente em grandes quantidades nos grânulos dos neutrófilos, essa enzima utiliza H_2O_2 para oxidar o Cl^- e outros halogenetos para produzir ácidos hipocloros como o **HOCl**. O HOCl, ingrediente ativo da água sanitária de uso doméstico, é um poderoso oxidante altamente microbicida. Quando aplicado aos tecidos normais, o seu potencial para causar lesão é reduzido, visto que ele reage com aminas primárias ou secundárias presentes nos neutrófilos e nos tecidos para produzir vários derivados de nitrogênio-cloro. Embora também sejam oxidantes, essas **cloraminas** são menos poderosas do que o HOCl e, portanto, podem atuar como agentes microbicidas (p. ex., na esterilização de feridas) sem causar lesão tecidual.

As mutações que afetam o sistema NADPH-oxidase podem causar a doença granulomatosa crônica

As mutações funcionalmente deletérias nos genes que codificam qualquer um dos quatro polipeptídeos do sistema NADPH-oxidase podem causar **doença granulomatosa crônica**. A diminuição resultante na produção de derivados de oxigênio reativos prejudica a capacidade dos neutrófilos e de outros leucócitos fagocíticos de destruir bactérias e outros microrganismos infecciosos. Indivíduos que sofrem dessa condição relativamente incomum experimentam infecções recorrentes. Eles também apresentam granulomas (lesões inflamatórias crônicas) na pele, nos pulmões e nos linfonodos para envolver patógenos invasores. Em alguns casos, o alívio pode ser proporcionado pela administração de interferon gama, que poderá aumentar a transcrição do componente de 91 kDa do citocromo b_{558} .

OS NEUTRÓFILOS E OS EOSINÓFILOS UTILIZAM NETs PARA ENVOLVER PARASITOS

Além de ingerir pequenos microrganismos, como bactérias por fagocitose, os neutrófilos e os eosinófilos podem auxiliar na eliminação de invasores maiores, aprisionando-os em

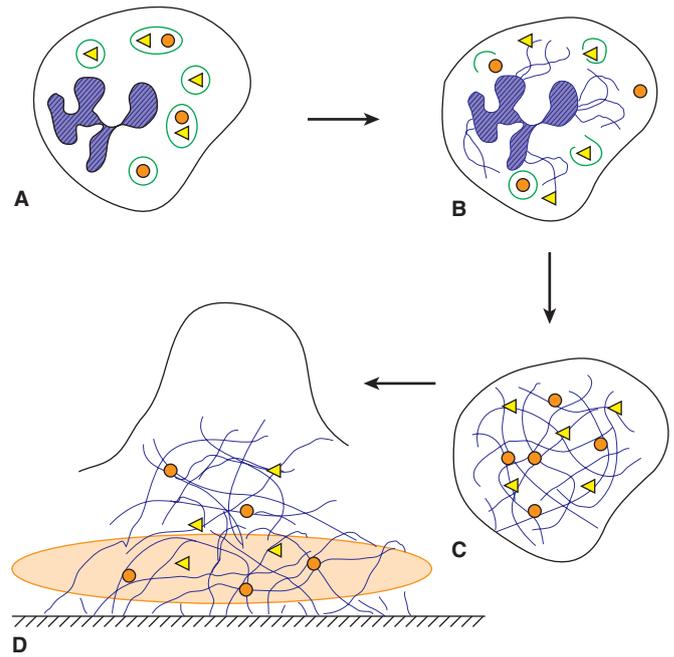


FIGURA 54-5 Aprisionamento dos parasitos utilizando NETs.

A figura mostra os estágios básicos da formação e do desdobramento de uma rede de DNA por um neutrófilo ou eosinófilo para aprisionar um microrganismo parasito. (A) Neutrófilo em repouso. O núcleo multilobado está mostrado em roxo hachurado, os grânulos intracelulares, em verde, e as enzimas e citotoxinas do grânulo, como círculos alaranjados e triângulos amarelos. (B) Após estímulo, as membranas que limitam o núcleo e os grânulos se rompem, liberando enzimas, citotoxinas e fitas de DNA (em roxo) a partir de cromossomos descondensados. (C) As fitas de DNA formam uma rede que preenche o interior da célula à qual algumas proteínas derivadas dos grânulos aderem. (D) O neutrófilo rompe-se, liberando sua rede de DNA-proteínas, que prende o parasito (em cor de laranja) contra a superfície do epitélio (hachurado).

redes, chamadas de **armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)** (Figura 54-5). A dispersão, ou **descondensação**, de um cromossomo do neutrófilo origina fitas de polinucleotídeos estendidos que funcionam como o centro de uma NET. Esse processo envolve a ruptura da membrana nuclear e o rompimento de interações favoráveis carga-carga que estabilizam a estrutura compacta da cromatina. A dissolução dos complexos histona-polinucleotídeo é promovida pela deiminização enzimática

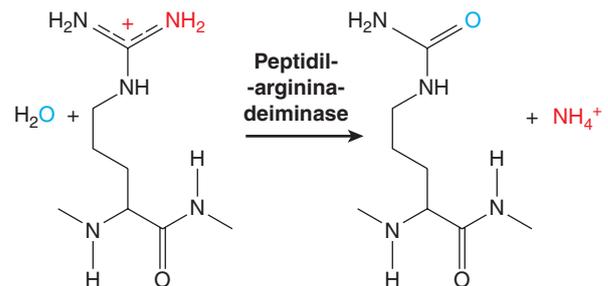


FIGURA 54-6 Citrulinação. A enzima peptidil-arginina-deiminase desloca um dos grupos imino (em vermelho) na cadeia lateral da arginina por um átomo de oxigênio (em azul) derivado da água. O objetivo final é substituir uma carga positiva fornecida pela cadeia lateral da arginina protonada por uma amida, que é neutra.

das cadeias laterais dos resíduos de arginina, que são protonados no pH fisiológico, para formar resíduos de citrulina, cujas cadeias laterais são neutras, pela **peptidil-arginina-deiminase** (Figura 54-6). Algumas proteínas da cromatina permanecem associadas ao DNA, estabelecendo ligações cruzadas entre as fitas de polinucleotídeos. As membranas dos grânulos também se rompem nesse momento, liberando o seu conteúdo no citoplasma onde se ligam às fitas de polinucleotídeos dispersas, decorando o DNA com proteases derivadas dos grânulos, peptídeos antimicrobianos e outros fatores. Por fim, os neutrófilos rompem-se para soltar suas NETs sobre os parasitos invasores, imobilizando-os, impedindo a sua propagação e auxiliando em sua eliminação.

AS PROTEASES DERIVADAS DOS FAGÓCITOS PODEM LESAR AS CÉLULAS SAUDÁVEIS

Os macrófagos e outros fagócitos produzem numerosas proteínases (Tabela 54-2), algumas das quais podem hidrolisar elastina, vários tipos de colágeno e outras proteínas presentes na matriz extracelular. Se deixado prosseguir sem oposição, esse processo poderá levar a graves lesões teciduais. Embora pequenas quantidades de elastase e de outras proteínases escapem para o interior dos tecidos normais, as suas atividades são normalmente colocadas em xeque por diversas **antiproteínases** presentes no plasma e no líquido extracelular (ver Capítulo 52). As antiproteínases, como a α_2 -**macroglobulina** circulante, atuam formando um complexo não covalente com uma ou mais proteínases específicas, inibindo a sua atividade. Um defeito genético que permite que a elastase atue sem oposição pelo **inibidor da α_1 -antiproteínase** (α_1 -antitripsina) no tecido pulmonar contribui significativamente para a causa do enfisema.

Níveis elevados de oxidantes clorados formados durante a inflamação podem alterar o equilíbrio entre proteínases e antiproteínases a favor das primeiras. Por exemplo, algumas das proteínases relacionadas na Tabela 54-2 são **ativadas** pelo HOCl, ao passo que certas antiproteínases são **inativadas** pelo HOCl. Além disso, o inibidor tecidual das metaloproteínases e da α_1 -antiquimiotripsina pode ser hidrolisado pela elastase ativada, e um inibidor da α_1 -antiproteínase pode ser hidrolisado por colagenase e gelatinase ativadas. Embora o **balanço** de proteínases e antiproteínases seja geralmente mantido, em certos casos, como no pulmão, quando o inibidor da α_1 -antiproteínase está deficiente ou quando grandes quantidades de neutrófilos se acumulam nos tecidos devido à drenagem inadequada, poderá ocorrer considerável **lesão tecidual**.

OS LEUCÓCITOS COMUNICAM-SE POR MEIO DE EFETORES SECRETADOS

O desenvolvimento de uma resposta imune e da inflamação associada dos tecidos lesados ou infectados requer a ação coordenada de leucócitos e outras células. A ativação de leucócitos vizinhos e o recrutamento de leucócitos adicionais para

o sítio da lesão ou infecção são mediados por moléculas efetoras secretadas, incluindo citocinas, leucotrienos e histamina. Na maioria dos casos, esses efetores são armazenados no interior de vesículas membranosas intracelulares que, quando estimuladas, migram e fundem-se com a membrana plasmática, a fim de expelir ou **secretar** o seu conteúdo. O termo **granulócito** refere-se aos leucócitos, como basófilos, eosinófilos e leucócitos, cujas vesículas secretoras são suficientemente grandes, numerosas e densas para transmitir aparência distintamente granular ao interior dessas células quando analisadas ao microscópio.

O termo **citocina** refere-se a um conjunto diverso de pequenas proteínas secretadas, geralmente com massa inferior a 25 kDa, que incluem **interleucinas**, **interferons** e **quimiocinas**. As interleucinas, das quais foram caracterizadas mais de três dúzias, têm o seu nome derivado das células nas quais são sintetizadas e pelas quais são secretadas. Elas são geralmente designadas pela abreviação da classe **IL**, seguida por um número identificador, por exemplo, IL-1, IL-3, IL-22. Os interferons (**IFNs**), por outro lado, têm o seu nome derivado de sua capacidade de inibir ou interferir a replicação dos vírus infectantes. Cerca de 10 famílias distintas de interferons foram identificadas em animais até hoje. A função característica das quimiocinas é funcionar como atrativos químicos que estimulem os leucócitos a migrarem na direção de sua origem (**quimiotaxia**). A maior parte das citocinas é glicosilada. Em geral, elas estimulam tanto os leucócitos pelos quais são secretadas (**sinalização autócrina**) quanto os outros tipos de leucócitos (**sinalização parácrina**). Historicamente, as citocinas foram diferenciadas dos hormônios pela sua associação à imunidade e à inflamação.

Os leucócitos também secretam mediadores lipídicos, chamados de **eicosanoides**, produzidos pela oxidação do ácido araquidônico (ver Capítulo 15). Esses mediadores lipídicos se encaixam em duas amplas classes, **leucotrienos** e **prostaglandinas**. Os leucotrienos são caracterizados pela presença de um conjunto de três ligações duplas carbono-carbono conjugadas. Alguns leucotrienos incorporam o aminoácido cisteína em sua estrutura. As prostaglandinas, que foram inicialmente isoladas da próstata, contêm 20 átomos de carbono e são caracterizadas pela presença de um anel de cinco membros.

A **histamina** (Figura 54-1), que é sintetizada pela descarboxilação do aminoácido histidina, é um mediador secretado em grandes quantidades por **basófilos** e **mastócitos**. A histamina atua com outros fatores hematológicos, como a heparina e os eicosanoides, para manter o fluxo sanguíneo na área e estimular o acúmulo de plasma derivado do sangue em um tecido infectado ou lesado. O acúmulo de fluido resultante (edema) representa um componente crucial da resposta inflamatória que acompanha a ativação do sistema imune, pois facilita enormemente a migração de leucócitos adicionais para a área afetada em resposta aos mediadores quimiotáticos.

OS LINFÓCITOS PRODUZEM ANTICORPOS PROTETORES

Os **linfócitos** constituem aproximadamente 30% dos leucócitos presentes no sangue. Em virtude da sua capacidade de

produzir anticorpos protetores otimizados para se ligar a antígenos recém-encontrados (ver Capítulo 53), os linfócitos representam o pilar do **sistema imune adaptativo** do corpo. A classificação de linfócitos nos tipos B e T foi originalmente baseada na identidade dos tecidos nos quais cada forma completa sua maturação. Em espécies aviárias, os linfócitos B (células B) são processados na **bursa de Fabricius**. As células B em seres humanos, que não possuem esse órgão, sofrem maturação na **medula óssea**. A maturação dos **linfócitos T (células T)** ocorre no **timo**. Os anticorpos solúveis presentes nos humores humanos (p. ex., plasma e líquidos intersticiais) são secretados pelos linfócitos B. Por essa razão, diz-se que as células B conferem **imunidade humoral**.

Os linfócitos que ainda não foram estimulados para produzir imunoglobulinas são chamados de **naïve**. A síntese de um novo anticorpo pode ser desencadeada por vários mecanismos. Os linfócitos podem ligar-se diretamente aos invasores estranhos por meio de um dos muitos receptores presentes na sua superfície, que incluem proteínas configuradas para se ligar a glicoproteínas, lipopolissacarídeos ou peptídeos glicanos bacterianos. Alternativamente, o linfócito pode ser ativado quando encontra um antígeno que foi exibido ou apresentado na superfície de outro leucócito em associação ao MHC. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos fagocíticos, chamados de **plasmócitos**, exibem ou apresentam fragmentos de macromoléculas que eles destruíram por fagocitose. As **células T auxiliares** ingerem (por endocitose) e apresentam antígenos na sua superfície, incluindo restos ejetados por fagócitos. As **células T auxiliares** funcionam como “painéis celulares”, coordenando a resposta imune ao receber, processar e enviar sinais de e para outros componentes do sistema imune.

As **células T citotóxicas** reconhecem proteínas que aparecem na superfície de células hospedeiras como consequência de infecção viral ou transformação oncogênica. Uma vez ligadas, elas induzem a lise da célula-alvo utilizando proteínas, chamadas de perforinas, que formam canais na membrana plasmática, e proteases, chamadas de granzimas. As granzimas mimetizam a ação das proteases endógenas, como a catepsina, que acionam a morte celular programada (**apoptose**). As **células natural killer** lembram as células T citotóxicas, porém contêm grânulos com substâncias químicas tóxicas adicionais para auxiliar em seu ataque.

RESUMO

- A eliminação de microrganismos infecciosos envolve as ações acumulativas de múltiplos tipos de leucócitos, incluindo linfócitos, fagócitos e basófilos.
- Os leucócitos comunicam-se utilizando moléculas efetoras secretadas, como quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas e interferons.
- Os leucócitos migram do sangue para os tecidos em resposta a atrativos químicos específicos, um processo chamado de quimiotaxia.

- O movimento ameboide e a diapedese de leucócitos dependem da flexibilidade e da deformação celular mediadas pelo citoesqueleto.
- Os basófilos secretam histamina e heparina, que facilitam a migração de leucócitos pela indução do acúmulo de fluido em um sítio de infecção ou lesão.
- As integrinas modulam a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, o primeiro passo na migração em direção aos tecidos infectados.
- Os fagócitos internalizam microrganismos invasores no interior de vesículas membranosas, chamadas de fagossomos.
- A destruição de microrganismos fagocitados é realizada utilizando-se uma combinação de espécies reativas de oxigênio (a explosão respiratória), enzimas hidrolíticas e peptídeos citotóxicos.
- As mutações em proteínas do sistema NADPH-oxidase causam doença granulomatosa crônica.
- Os neutrófilos e os eosinófilos inibem grandes parasitos imobilizando-os no interior de redes formadas principalmente a partir de seu DNA cromossômico.
- A descondensação do DNA cromossômico é facilitada pela citrulinização das cadeias laterais de arginina das histonas.
- Os linfócitos produzem imunoglobulinas protetoras (anticorpos).
- Os fagócitos e as células T auxiliares estimulam a produção de novos anticorpos por meio da apresentação de fragmentos de macromoléculas derivadas de patógenos em associação a uma proteína de membrana, chamada de complexo maior de histocompatibilidade.
- As células T citotóxicas e as células *natural killer* reconhecem e destroem as células hospedeiras que exibem proteínas de superfície características de infecção viral ou transformação maligna.

REFERÊNCIAS

- Adkiss M, Burgler S, Cramer R, et al: Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:701.
- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al (editors): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed. McGraw-Hill, 2008. (Chapters 58, 61, & 98-108 deal with various blood disorders. Chapters 66-68 deal with various aspects of hematopoietic and other stem cells.)
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA: The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014;9:181.
- Nordenfelt P, Tapper H: Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukocyte Biol* 2011;90:271.
- van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, et al: Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS ONE* 2009;4:e5234.
- Whichard ZL, Sarkar CA, Kimmel M, Corey SJ: Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood* 2010;115:2339.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW: Macrophage development in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013;496:445.
- Yonekawa K, Harlan JM: Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol* 2005;77:129.

Questões para estudo

Seção X – Tópicos especiais (B)

1. Descreva resumidamente o modo de ação da nitroglicerina, um agente comum para o tratamento da angina.
2. Pacientes tratados para insuficiência cardíaca, em geral, apresentam expressão reduzida e regulação deficiente de SERCA2a, a principal Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático. Explique como os distúrbios nessa proteína poderiam contribuir para a deterioração da função cardíaca.
3. Cite um ponto de similaridade e um ponto de diferença entre o modo de ação da cadeia leve da miosina-cinase nos músculos lisos *versus* estriado.
4. Um paciente anestesiado usando um composto de halotano apresenta uma elevação marcante da temperatura corporal, um comportamento indicativo de hipertermia maligna (MH). Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. A MH pode originar-se por mutações que alteram a sequência de aminoácidos da Na^+ - K^+ -ATPase.
 - B. A MH pode originar-se por mutações que alteram a sequência de aminoácidos do canal de liberação de Ca^{2+} sensível à rianodina.
 - C. A rigidez muscular que ocorre durante a MH é desencadeada pela presença de altas concentrações de Ca^{2+} no citoplasma.
 - D. A MH pode originar-se por mutações que alteram a sequência de aminoácidos do canal de Ca^{2+} do tipo K lento dependente de voltagem.
 - E. A MH pode ser tratada pela administração intravenosa de dantroleno, que inibe a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citossol.
5. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. A actina F é formada pela polimerização da actina G.
 - B. A miosina é o principal componente dos filamentos espessos encontrados no músculo estriado.
 - C. Os filamentos finos são conectados entre si pela α -actina.
 - D. O sistema troponina regula a contração do músculo liso.
 - E. O Ca^{2+} atua como segundo mensageiro para regular a contração dos músculos liso, cardíaco e esquelético.
6. Selecione uma das seguintes afirmações que NÃO representa uma característica do ciclo contrátil do músculo estriado:
 - A. A ligação do Ca^{2+} à troponina C expõe os sítios de ligação da miosina na actina.
 - B. O curso de potência é iniciado pela liberação de P_i do complexo actina-miosina-ADP- P_i .
 - C. A liberação de ADP do complexo actina-miosina-ADP é acompanhada por uma grande alteração na conformação do domínio da cabeça da miosina (em relação ao domínio de sua cauda).
 - D. A ligação do ATP pela miosina aumenta a sua afinidade pela actina.
 - E. O *rigor mortis* resulta da incapacidade da liberação da actina do complexo actina-miosina quando as células estão com deficiência de ATP.
7. Selecione uma das seguintes afirmações que NÃO atua como uma importante reserva de energia para a reposição de ATP no tecido muscular:
 - A. Glicogênio.
 - B. Creatina fosfato.
 - C. ADP (em conjunto com adenilato-ciclase).
 - D. Ácidos graxos.
 - E. Epinefrina.
8. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. Os fármacos colchicina e vimblastina inibem a polimerização dos microtúbulos.
 - B. As mutações que afetam a queratina podem levar à formação de bolhas.
 - C. As mutações no gene que codifica a lamina A e a lamina C causam progeria (envelhecimento acelerado).
 - D. A α - e a β -tubulina são as principais constituintes das fibras de estresse.
 - E. Os motores moleculares, como dineína, cinesina e dinamina, impulsionam o movimento ciliar, o transporte de vesículas e a endocitose.
9. Explique resumidamente a conexão entre a insuficiência hepática e o edema crônico.
10. Descreva o papel da haptoglobina na proteção dos rins dos efeitos potencialmente nocivos da hemoglobina extracorpúscular.
11. Descreva resumidamente como a ativação da citidina-desaminase auxilia na geração de imunoglobulinas com sítios específicos de ligação ao antígeno.
12. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. A interleucina 1 estimula a produção de proteínas de fase aguda.
 - B. O ferro deverá ser reduzido ao estado ferroso (Fe^{2+}), a fim de ser recuperado pelo ciclo da transferrina.
 - C. Muitas proteínas do complemento são zimogênios.
 - D. O receptor de transferrina tipo 2 (TfR2) atua primariamente como um sensor do ferro.
 - E. A lectina que se liga à manose se liga aos grupos de carboidratos presentes na superfície das bactérias invasoras.
13. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. A albumina é sintetizada como uma pró-proteína.
 - B. A albumina é estabilizada por múltiplas ligações dissulfeto intercadeias.
 - C. A albumina é uma glicoproteína.
 - D. A albumina facilita o movimento de ácidos graxos através da circulação.
 - E. A albumina é a principal determinante da pressão osmótica plasmática.
14. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
 - A. A doença de Wilson pode ser tratada usando-se quelantes, como a penicilamina.
 - B. A doença de Wilson é caracterizada pela toxicose do cobre (níveis anormalmente elevados de cobre).
 - C. A doença de Wilson é causada por mutações no gene que codifica a ceruloplasmina.

- D. A albumina facilita o movimento de fármacos de sulfonamida através da circulação.
- E. A albumina poderá ser perdida pelo corpo em caso de inflamação da mucosa intestinal.
15. Você encontra uma mulher de 50 anos na clínica, ela está pálida e cansada. Você suspeita que ela apresente anemia ferropriva e prescreve uma série de exames laboratoriais. Escolha um dos seguintes resultados prováveis do laboratório que NÃO seria consistente com o seu diagnóstico provisório:
- A. Níveis de protoporfirina da hemácia inferiores ao normal.
- B. Aumento da saturação de transferrina.
- C. Aumento da expressão de TfR.
- D. Níveis elevados de hepcidina plasmática.
- E. Níveis reduzidos de hemoglobina.
16. Selecione uma das seguintes afirmações que NÃO representa uma causa da amiloidose:
- A. Acúmulo de β_2 -macroglobulina.
- B. Deposição de fragmentos derivados das cadeias leves de imunoglobulinas.
- C. Acúmulo de produtos de degradação da amiloide A sérica.
- D. Presença de formas de transtiretina alteradas por mutações.
- E. Deficiência de amilase.
17. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. Todas as imunoglobulinas contêm pelo menos dois polipeptídeos de cadeia pesada e dois polipeptídeos de cadeia leve.
- B. As cadeias polipeptídicas da imunoglobulina estão ligadas entre si por ligações dissulfeto.
- C. As imunoglobulinas são multivalentes.
- D. As imunoglobulinas são glicosiladas.
- E. As imunoglobulinas são componentes primários do sistema imune inato do corpo.
18. Explique a ligação entre a deficiência na glicose-6-fosfato-desidrogenase das hemácias e a anemia hemolítica.
19. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. A extensa área de superfície das hemácias bicôncavas facilita as trocas gasosas.
- B. A eliptocitose hereditária pode ser causada por defeitos ou deficiência da espectrina.
- C. O diâmetro das hemácias excede o de muitos capilares periféricos.
- D. A proteína 4.1 auxilia a ligação do citoesqueleto da hemácia às proteínas da membrana plasmática da célula.
- E. A fim de atravessar estreitos capilares, as hemácias precisam comprimir-se em uma forma esférica compacta.
20. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. As hemácias contêm níveis elevados de superóxido dismutase.
- B. As substâncias A e B são formadas pela adição de fucose e N-acetilglicosamina, respectivamente, à substância H.
- C. As plaquetas geram ATP exclusivamente via glicólise.
- D. As hemácias maduras são desprovidas de organelas internas.
- E. As membranas da hemácia contêm níveis elevados da proteína de troca aniônica da Banda 3.
21. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. A eritropoietina estimula a formação de hemácias a partir das células-tronco hematopoéticas.
- B. As células-tronco multipotentes são capazes de se diferenciar em células de um tipo intimamente relacionado.
- C. A anidrase carbônica aumenta a capacidade das hemácias de transportar CO_2 .
- D. O GLUT1 modula o transporte ativo de glicose para o interior das hemácias.
- E. A hipóxia estimula a produção de eritropoietina pelos rins.
22. Um paciente recentemente exposto à anilina apresenta coloração azulada da pele e das membranas mucosas. Escolha um diagnóstico provisório plausível para a lista abaixo:
- A. Metemoglobinemia.
- B. Hemocromatose hereditária.
- C. Síndrome de 5q.
- D. Púrpura trombocitopênica imune.
- E. Trombastenia de Glanzmann.
23. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. A quimiotaxia do leucócito é modulada pelos receptores ligados a proteína G.
- B. A capacidade do citoesqueleto de manipular significativamente a morfologia dos leucócitos é crítica à quimiotaxia, à fagocitose e à secreção.
- C. Os leucócitos secretam proteases para gerar aberturas entre as células do endotélio vascular durante a diapedese.
- D. O acúmulo de fluido em um sítio de infecção facilita a migração de leucócitos.
- E. A deficiência de adesão de leucócitos é causada pela falta de expressão de polipeptídeos da integrina.
24. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. As interleucinas são mediadores importantes da produção de leucócitos.
- B. Os linfócitos produzem anticorpos protetores.
- C. Os monócitos podem ser encontrados em tecidos de todo o corpo.
- D. O fator hematológico histamina é sintetizado pela desaminação do aminoácido histidina.
- E. O termo polimorfonuclear refere-se aos leucócitos que apresentam um núcleo segmentado.
25. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. Os fagócitos destroem as bactérias ingeridas usando espécies reativas de oxigênio e enzimas hidrolíticas.
- B. A doença granulomatosa crônica é causada por uma deficiência na atividade da mieloperoxidase.
- C. O NADPH atua como fonte primária de elétrons para a geração de ROS durante o estresse oxidativo.
- D. Os neutrófilos auxiliam na eliminação de alguns parasitos, enredando-os em NETs formadas por seu DNA cromossômico.
- E. As quimiocinas são estabilizadas pela formação de ligações dissulfeto intercadeias.
26. Selecione uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. Os leucócitos ativados secretam mediadores lipídicos, chamados de interferons.
- B. Os neutrófilos facilitam a produção de anticorpos protetores, apresentando fragmentos de microrganismos fagocitados na sua superfície em associação ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC).
- C. As células T citotóxicas usam perforinas para lisar as células infectadas.
- D. Os anticorpos solúveis são liberados no plasma primariamente pelos linfócitos B.

- E. O enfisema pode originar-se da ação da elastase e de outras proteases derivadas de grânulos sobre o tecido pulmonar.
27. Escolha a única informação FALSA:
- A grande maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo genoma nuclear.
 - As proteínas Ran, como a ARF e as proteínas Ras, são GTPases monoméricas.
 - Uma causa da doença de Refsum são as mutações nos genes que codificam proteínas peroxissomais.
 - As proteínas peroxissomais são sintetizadas nos polirribossomos citossólicos.
 - A importação de proteínas para a mitocôndria envolve proteínas conhecidas como importinas.
28. Escolha a única informação FALSA:
- Os peptídeos sinalizadores *N*-terminal que dirigem proteínas nascentes para a membrana do RE contêm uma sequência hidrofóbica.
 - A translocação pós-traducional de proteínas para o RE não ocorre em mamíferos.
 - O SRP contém uma espécie de RNA.
 - A *N*-glicosilação é catalizada pela oligossacaridoproteína-transferase.
 - As proteínas de membrana tipo I apresentam a sua extremidade *N*-terminal voltada para o lúmen do RE.
29. Escolha a única informação FALSA:
- As chaperonas, em geral, apresentam atividade ATPase.
 - A dissulfeto-isomerase proteica e a peptidil-prolil-isomerase são enzimas envolvidas no auxílio do dobramento correto das proteínas.
 - A ubiquitina é uma pequena proteína envolvida na degradação proteica por lisossomos.
 - A mitocôndria contém chaperonas.
 - A retrotranslocação através da membrana do RE está envolvida no auxílio da eliminação de proteínas com dobramento deficiente.
30. Escolha a única informação FALSA:
- A Rab é uma pequena GTPase envolvida no endereçamento de vesículas.
 - As vesículas COPII estão envolvidas no transporte anterógrado de cargas do RE para o ERGIC ou para o aparelho de Golgi.
 - A brefeldina A impede a ligação de GTP a ARF e, portanto, inibe a formação de vesículas COPI.
 - A toxina botulínica B atua clivando a sinaptobrevina, inibindo a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular.
 - A furina converte a pré-pró-albumina à pró-albumina.
31. Qual dos seguintes tipos de proteínas NÃO atua como uma GTPase?
- Fator de ribosilação do ADP (ARF).
 - Proteínas Rab.
 - Fator sensível à *N*-etilmaleimida (NSF).
 - Sar1.
 - Proteínas Ran.
32. Escolha a única informação FALSA:
- O colágeno apresenta uma estrutura em tripla hélice, formando uma super-hélice para o lado direito.
 - A prolina e a hidroxiprolina conferem rigidez ao colágeno.
 - O colágeno contém uma ou mais ligações *O*-glicosídicas.
 - O colágeno não possui ligações cruzadas.
- E. A deficiência de vitamina C compromete a ação das prolil e lisil hidroxilases.
33. Escolha a única informação FALSA:
- A elastina contém hidroxiprolina, mas não hidroxilisina.
 - A elastina contém ligações cruzadas formados pelas desmosinas.
 - Ainda não foi identificada nenhuma doença devida às normalidades da elastina.
 - Ao contrário do colágeno, existe apenas um gene que codifica a elastina.
 - A elastina não contém quaisquer moléculas glicídicas.
34. Escolha a única informação FALSA:
- A síndrome de Marfan é devida a mutações no gene que codifica a fibrilina 1, um constituinte importante das microfibrilas.
 - Todos os subtipos da síndrome de Ehlers-Danlos são devidos a mutações que afetam os genes que codificam os vários tipos de colágeno.
 - A laminina é encontrada nos glomérulos renais juntamente com a entactina, o colágeno do tipo IV e a heparina ou heparan-sulfato.
 - As mutações que afetam o colágeno do tipo IV podem causar insuficiência renal grave.
 - As mutações no gene *IA1* do colágeno podem causar osteogênese imperfeita.
35. Escolha a única informação FALSA:
- A maioria, porém não todas as GAGs, contêm um aminoácido e um ácido urônico.
 - Todas as GAGs são sulfatadas.
 - As GAGs são construídas pela ação das glicosiltransferases usando açúcares doados pelos açúcares nucleotídicos.
 - O ácido glicurônico pode ser convertido a ácido idurônico por uma epimerase.
 - O proteoglicano agregano contém ácido hialurônico, sulfato de queratano e condroitina-sulfato.
36. Um bebê do sexo masculino não está se desenvolvendo e, quando examinado, apresentou hepatomegalia e esplenomegalia, entre outros achados. A urinalise revelou a presença de dermatan-sulfato e heparan-sulfato. Você suspeita que o paciente apresenta síndrome de Hurler. Da lista a seguir, escolha a enzima que você gostaria que fosse avaliada para sustentar o seu diagnóstico:
- β -Glicuronidase.
 - β -Galactosidase.
 - α -L-Iduronidase.
 - α -*N*-Acetilglucosaminidase.
 - Neuraminidase.
37. Você vê uma criança, na clínica, que se encontra bem abaixo da altura média. Você observa que a criança apresenta membros curtos, tamanho normal do tronco, macrocefalia e uma variedade de outras anormalidades esqueléticas. Você suspeita que a criança esteja com acondroplasia. Escolha da lista a seguir o teste que melhor confirmaria o seu diagnóstico:
- Avaliação do hormônio de crescimento.
 - Ensaio para enzimas envolvidas no metabolismo das GAGs.
 - Testes para mucopolissacarídeos urinários.
 - Testes genéticos para anormalidades do receptor 3 do fator de crescimento do fibroblasto (FGFR3).
 - Testes genéticos para anormalidades do hormônio de crescimento.

Homeostasia e trombose

Peter L. Gross, M.D., M.Sc., F.R.C.P.(C), Robert K. Murray, M.D., Ph.D., P. Anthony Weil, Ph.D. e Margaret L. Rand, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Compreender a importância da homeostasia e da trombose na saúde e na doença.
- Esquematizar as vias da coagulação que levam à formação da fibrina.
- Identificar os fatores da coagulação dependentes de vitamina K.
- Fornecer exemplos de distúrbios genéticos que causam sangramento.
- Descrever o processo da fibrinólise.
- Resumir as etapas que levam à agregação das plaquetas.
- Identificar fármacos antiplaquetários e seu mecanismo de inibição da agregação plaquetária.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Este capítulo descreve os aspectos básicos das proteínas do sistema de coagulação sanguínea e da fibrinólise. Também são apresentados alguns aspectos fundamentais da biologia das plaquetas. Os estados hemorrágicos e trombóticos podem resultar em graves emergências médicas, e a trombose das artérias coronárias e cerebrais constitui uma importante causa de morte em muitas partes do mundo. A abordagem racional dessas condições requer uma clara compreensão das bases da coagulação sanguínea, da fibrinólise e da ativação das plaquetas.

A HOMEOSTASIA E A TROMBOSE POSSUEM TRÊS FASES EM COMUM

A **homeostasia** é a interrupção de sangramento a partir de um corte ou de um vaso seccionado, ao passo que a **trombose** ocorre quando o endotélio que reveste os vasos sanguíneos é lesionado ou removido (p. ex., com a ruptura de uma placa aterosclerótica). Esses processos envolvem os vasos sanguíneos, a agregação plaquetária e as proteínas plasmáticas responsáveis pela formação ou dissolução dos agregados plaquetários e da fibrina.

Na homeostasia, ocorre vasoconstrição inicial do vaso lesionado, causando diminuição do fluxo sanguíneo distalmente à lesão. Portanto, a homeostasia e a trombose compartilham **três fases**:

1. Formação de um **agregado de plaquetas** frouxo e temporário no local da lesão. As plaquetas ligam-se ao colágeno no local da lesão da parede do vaso, formam tromboxano A_2 e liberam ADP, que ativa outras plaquetas que estão circulando na vizinhança da lesão. (O mecanismo de ativação das plaquetas é descrito adiante.) A trombina, formada durante a coagulação no mesmo local, provoca maior ativação das plaquetas. Com a sua ativação, as plaquetas mudam de formato e, na presença de fibrinogênio e/ou do fator de von Willebrand, agregam-se para formar o tampão hemostático (na homeostasia) ou o trombo (na trombose).
2. Formação de uma **rede de fibrina** que se liga ao agregado de plaquetas, formando um tampão hemostático ou um trombo mais estável.
3. **Dissolução** parcial ou completa do tampão hemostático ou do trombo pela plasmina.

Existem três tipos de trombos

São identificados três tipos de trombos ou coágulos. Todos contêm **fibrina** em diversas proporções.

1. O **trombo branco** é composto por plaquetas e fibrina e é relativamente pobre em hemácias. Forma-se no local de uma lesão ou de uma anormalidade da parede do vaso, particularmente em áreas onde o fluxo sanguíneo é rápido (artérias).
2. O **trombo vermelho** consiste principalmente em hemácias e fibrina. Assemelha-se morfológicamente a um coágulo formado em tubo de ensaio e pode ser composto *in vivo* em áreas de fluxo sanguíneo retardado ou estase (p. ex., veias), com ou sem lesão vascular, ou pode ser produzido no local de uma lesão ou em um vaso anormal, em associação a um tampão plaquetário em formação.
3. O terceiro tipo consiste no **depósito de fibrina** em vasos sanguíneos muito pequenos ou capilares.

Primeiramente, será descrita a via da coagulação que leva à formação de fibrina. Em seguida, brevemente, serão descritos alguns aspectos da atuação das plaquetas e das paredes dos vasos sanguíneos no processo global. Essa separação entre fatores da coagulação e plaquetas é artificial, visto que ambos desempenham papéis íntimos e, com frequência, interdependentes na homeostasia e na trombose; essa estratégia facilita a descrição dos processos globais envolvidos.

Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca levam à formação da fibrina

Duas vias levam à formação do **coágulo de fibrina**: as vias **extrínseca** e **intrínseca**. Elas não são independentes, como se acreditava anteriormente. Todavia, essa distinção artificial é mantida no texto para facilitar a sua descrição.

A formação de um coágulo de fibrina em resposta a uma **lesão tecidual** é efetuada pela **via extrínseca**. A **via intrínseca** pode ser ativada por superfícies de carga negativa *in vitro*, como o vidro. Ambas as vias levam à conversão proteolítica da **protrombina** à **trombina**. A trombina catalisa a clivagem do **fibrinogênio** para iniciar a formação do coágulo de **fibrina**. As vias extrínseca e intrínseca são complexas e envolvem muitas proteínas diferentes (Figuras 55-1 e 55-2; Tabela 55-1). Os fatores de coagulação representam outro exemplo de proteínas de múltiplos domínios que compartilham domínios conservados (ver Figura 5-9). Em geral, como mostra a Tabela 55-2, essas proteínas podem ser classificadas em **cinco tipos**: (1) zimogênios de proteases dependentes de serina, que são ativados durante o processo da coagulação; (2) cofatores; (3) fibrinogênio; (4) uma transglutaminase que estabelece ligação cruzada covalente com a fibrina e estabiliza o coágulo de fibrina; e (5) proteínas reguladoras e outras proteínas.

A via extrínseca leva à ativação do fator X

A **via extrínseca** envolve o fator tecidual, os fatores VII e X e o Ca^{2+} , levando à produção do fator Xa (por convenção, os fatores de coagulação ativados são conhecidos pelo uso do sufixo a). A via extrínseca é iniciada no sítio da **lesão tecidual** com a exposição do **fator tecidual** (FT; Figura 55-1), localizado no subendotélio e nos monócitos ativados. O FT interage com

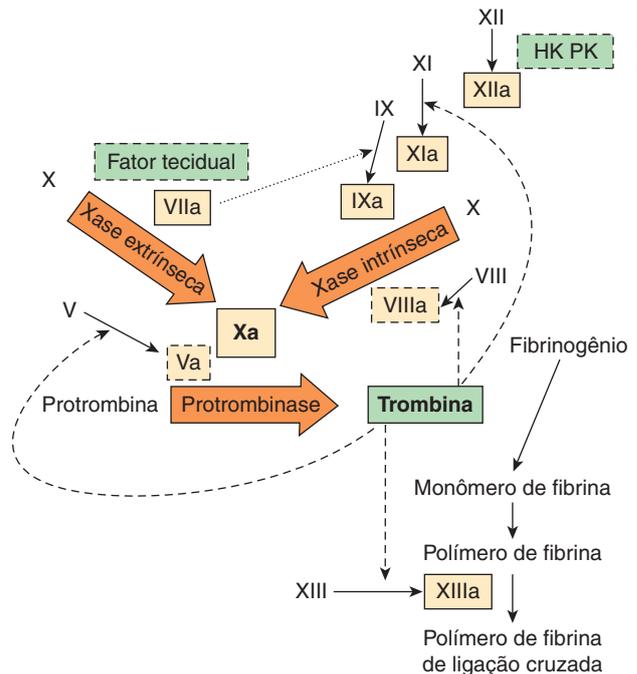


FIGURA 55-1 As vias da coagulação sanguínea, com a **via extrínseca** indicada na parte superior à esquerda, e a **via intrínseca**, na parte superior à direita. As vias convergem na formação do fator Xa e culminam na formação da fibrina de ligação cruzada. Os complexos de fator tecidual e fator VIIa ativam não apenas o fator X (Xase [tenase] extrínseca), mas também o fator IX na via intrínseca (seta pontilhada). Além disso, a retroalimentação da trombina ativa os sítios indicados (setas tracejadas) e também ativa o fator VII em fator VIIa (não ilustrado). Os três complexos predominantes, a Xase extrínseca, a Xase intrínseca e a protrombinase, estão indicados nas setas; essas reações exigem a presença de fosfolípido pró-coagulante aniônico da membrana e de cálcio. As proteases ativadas estão representadas nos retângulos com linhas sólidas; os cofatores ativados estão representados em retângulos com linhas tracejadas, e os fatores inativos não estão em retângulos. (HK, cininogênio de alto peso molecular; PK, pré-caliceína.)

e ativa o **fator VII** (53 kDa, um zimogênio que contém resíduos de γ -carboxiglutamato [Gla] dependentes de vitamina K; ver Capítulo 44), sintetizado no fígado. Convém assinalar que, nos zimogênios que contêm Gla (fatores II, VII, IX e X), os resíduos de Gla nas regiões aminoterminais das moléculas atuam como sítios de ligação de alta afinidade para o Ca^{2+} . O FT atua como cofator para o **fator VIIa**, aumentando a sua atividade enzimática para ativar o **fator X** (56 kDa). A reação pela qual o **fator X** é ativado requer a reunião do **complexo extrínseco da tenase** (Ca^{2+} -FT-fator VIIa), formado sobre a superfície de uma membrana celular, expondo o aminofosfolípido aniônico pró-coagulante fosfatidilserina. O fator VIIa cliva uma ponte Arg-Ile no fator X para produzir a serina-protease de duas cadeias, o **fator Xa**. O FT e o fator VIIa também ativam o fator IX na via intrínseca. Na verdade, a **formação de complexos entre o FT ligado à membrana e o fator VIIa é atualmente considerada o processo essencial envolvido na coagulação sanguínea *in vivo***.

O **inibidor da via do fator tecidual** (TFPI) é um importante inibidor fisiológico da coagulação. O TFPI é uma proteína que circula no sangue, onde inibe diretamente o fator Xa

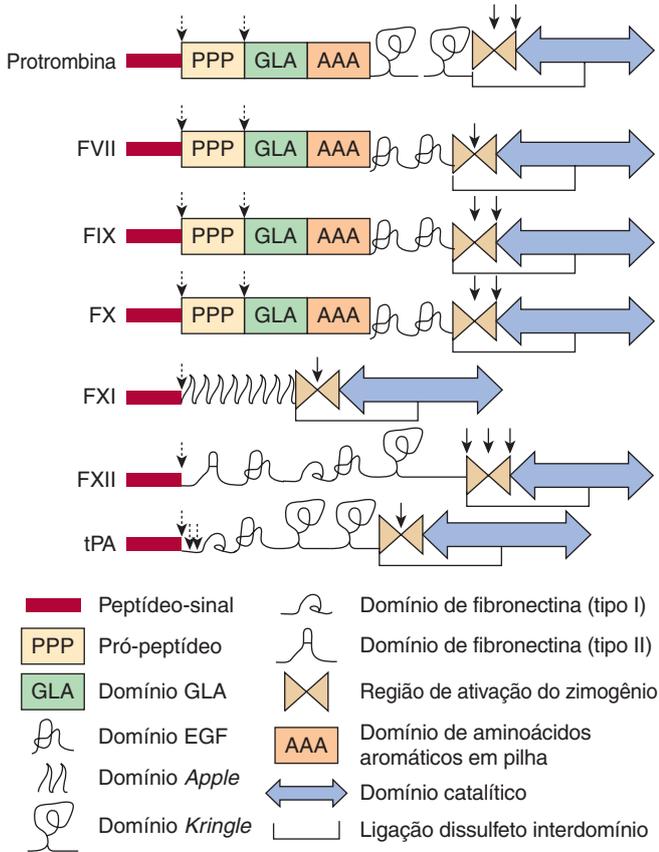


FIGURA 55-2 Domínios estruturais de proteínas selecionadas envolvidas na coagulação e na fibrinólise. Domínios compartilhados são resultantes de duplicação gênica e de rearranjo do éxon que contribuiu para a evolução molecular do sistema de coagulação. Os domínios estão identificados na base da figura e incluem o peptídeo-sinal, o pró-peptídeo, o domínio Gla (γ -carboxiglutamato), o domínio do fator de crescimento epidérmico (EGF), o domínio *apple*, o domínio *kringle*, o domínio da fibronectina (tipos I e II), a região de ativação do zimogênio, o domínio de aminoácidos aromáticos em pilha e o domínio catalítico. As ligações dissulfeto interdomínio estão indicadas, ao passo que numerosas ligações dissulfeto intradomínio não estão ilustradas. Os sítios de clivagem proteolítica na síntese ou na ativação estão indicados por setas (tracejadas e sólidas, respectivamente). FVII, fator VII; FIX, fator IX; FX, fator X; FXI, fator XI; FXII, fator XII; tPA, ativador de plasminogênio tecidual. (Adaptada, com permissão, de Furie B, Furie BC: The molecular basis of blood coagulation. Cell 1988;53:505.)

por meio de sua ligação à enzima próxima a seu sítio ativo. Em seguida, esse complexo fator Xa-TFPI inibe o complexo fator VIIa-FT.

A via intrínseca também leva à ativação do fator X

A formação do **fator Xa** constitui o principal local onde as vias intrínseca e extrínseca convergem (Figura 55-1). A **via intrínseca** (Figura 55-1) envolve os fatores XII, XI, IX, VIII e X, bem como a pré-caliceína, o cininogênio de alto peso molecular (HMW), o Ca^{2+} e a fosfatidilserina exposta na superfície. Essa via leva à produção do **fator Xa** pelo complexo intrínseco da tenase (ver a seguir para composição), no qual o fator IXa atua como serina-protease, e o fator VIIIa, como cofator. Como

TABELA 55-1 Sistema numérico para a nomenclatura dos fatores da coagulação

Fator	Nome comum	
I	Fibrinogênio	Esses fatores são geralmente designados pelos seus nomes comuns
II	Protrombina	
III	Fator tecidual	
IV	Ca^{2+}	Em geral, o Ca^{2+} não é designado como fator da coagulação
V	Proacelerina, fator lábil, globulina aceleradora (Ac-)	
VII ^a	Proconvertina, acelerador sérico da conversão de protrombina (SPCA), cotromboplastina	
VIII	Fator anti-hemofílico A, globulina anti-hemofílica (AHG)	
IX	Fator anti-hemofílico B, fator Christmas, componente da tromboplastina plasmática (PTC)	
X	Fator de Stuart-Prower	
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática (PTA)	
XII	Fator de Hageman	
XIII	Fator estabilizador da fibrina (FSF), fibrinolisase	

^aNão existe fator VI.

Nota: os números indicam a ordem na qual os fatores foram descobertos e não têm nenhuma ligação com a sequência na qual atuam.

mencionado anteriormente, a ativação do **fator X estabelece uma importante ligação entre as vias intrínseca e extrínseca.**

A **via intrínseca** pode ser iniciada pelo “contato” no qual a pré-caliceína, o cininogênio HMW, o fator XII e o fator XI são expostos a uma superfície ativadora de carga negativa. *In vivo*, os polímeros de fosfatos, como DNA, RNA e polifosfatos extracelulares (macromoléculas disponíveis apenas após lesão celular), poderão atuar como essa superfície ativadora de carga negativa. O caulim, um silicato de alumínio com cargas altamente negativas, pode ser utilizado em testes *in vitro* como iniciador da via intrínseca. Quando ocorre a reunião dos componentes da fase de contato sobre a superfície ativadora, o fator XII é ativado a **fator XIIa** mediante proteólise pela caliceína. O fator XIIa, gerado pela caliceína, ataca a pré-caliceína para gerar mais caliceína, estabelecendo uma alça de ativação de retroalimentação positiva. Uma vez formado, o fator XIIa ativa o **fator XI a XIa** e também libera **bradicinina** (um peptídeo com potente ação vasodilatadora) a partir do cininogênio HMW.

Na presença de Ca^{2+} , o fator XIa ativa o fator IX (55 kDa, um zimogênio que contém Gla) à serina-protease, o **fator IXa**. Este, por sua vez, também cliva uma ligação Arg-Ile no fator X, produzindo o **fator Xa**. Essa última reação requer a reunião de componentes, no chamado **complexo intrínseco da tenase, composto por Ca^{2+} -fator VIIIa-fator X**, que se forma na superfície da membrana das plaquetas ativadas para expor a fosfatidilserina pró-coagulante. (Observe que esse fosfolípido se encontra normalmente na face interna da membrana plasmática de plaquetas em repouso não ativadas.)

O **fator VIII** (330 kDa), uma glicoproteína circulante, não é um precursor da protease, mas, sim, um cofator que funciona como receptor na superfície das plaquetas para os fatores IXa e X. O fator VIII é ativado por quantidades mínimas de trombina para formar o **fator VIIIa**, que, por sua vez, é inativado mediante clivagem posterior da trombina.

TABELA 55-2 Funções das proteínas envolvidas na coagulação sanguínea

Zimogênios de serinas-proteases	
Fator XII	Liga-se a superfícies de carga negativa, como caulim e vidro; ativado pelo cininogênio de alto peso molecular e pela calicreína
Fator XI	Ativado pelo fator XIIa
Fator IX	Ativado pelo fator XIa e fator VIIa
Fator VII	Ativado pelo fator VIIa, fator Xa e trombina
Fator X	Ativado na superfície das plaquetas ativadas pelo complexo da tenase (Ca ²⁺ , fatores VIIIa e IXa) e pelo complexo extrínseco da tenase Ca ²⁺ , fator tecidual e fator VIIa
Protrombina Fator II	Ativado na superfície das plaquetas ativadas pelo complexo da protrombinase (Ca ²⁺ , fatores Va e Xa) para formar trombina [Os fatores II, VII, IX e X são zimogênios que contêm Gla] (Gla, γ -carboxiglutamato)
Cofatores	
Fator VIII	Ativado pela trombina; o fator VIIIa é um cofator na ativação do fator X pelo fator IXa
Fator V	Ativado pela trombina; o fator Va é um cofator na ativação da protrombina pelo fator Xa
Fator tecidual (fator III)	Glicoproteína localizada no subendotélio e expressa nos monócitos ativados para atuar como cofator para o fator VIIa
Fibrinogênio	
Fator I	Clivado pela trombina para formar o coágulo de fibrina
Transglutaminase dependente de tiol	
Fator XIII	Ativado pela trombina; estabiliza o coágulo de fibrina por ligação cruzada covalente
Proteínas reguladoras e outras proteínas	
Proteína C	Ativada a proteína C ativada (APC) pela trombina ligada à trombosmodulina; em seguida, degrada os fatores VIIIa e Va
Proteína S	Atua como cofator da proteína C; ambas as proteínas contêm resíduos de Gla (γ -carboxiglutamato)
Trombosmodulina	Proteína presente na superfície das células endoteliais; liga-se à trombina, que, em seguida, ativa a proteína C

O papel das etapas iniciais da via intrínseca na iniciação da coagulação tem sido questionado, já que pacientes com deficiência hereditária de fator XII, pré-calicreína ou cininogênio HMW não apresentam problemas de sangramento. De forma semelhante, pacientes com deficiência de fator XI podem não ter problemas hemorrágicos. Em modelos de trombose experimental, as deficiências na via intrínseca são protetoras contra a trombose. A via intrínseca serve, em grande parte, para **amplificar o fator Xa** e, por fim, a **formação de trombina**, por meio de mecanismos de retroalimentação (ver a seguir).

A via intrínseca também pode ser importante na **fibrinólise** (ver adiante), uma vez que a calicreína, o fator XIIa e o fator XIa podem clivar o plasminogênio, e a calicreína pode ativar a urocinase de cadeia simples.

O fator Xa leva à ativação da protrombina em trombina

O **fator Xa**, produzido tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca, ativa a **protrombina** (fator II) em **trombina** (fator IIa) (Figura 55-1).

A ativação da protrombina, como a do fator X, ocorre sobre uma superfície de membrana e requer a formação de um **complexo protrombinase**, que consiste em Ca²⁺, fator Va e fator Xa. A formação do complexo protrombinase, como a do complexo tenase, ocorre na superfície da membrana de plaquetas ativadas que expõe a fosfatidilserina.

O **fator V** (330 kDa) é sintetizado no fígado, no baço e nos rins e ocorre nas plaquetas, bem como no plasma. O fator V atua como cofator de forma semelhante ao fator VIII no complexo tenase. Quando ativado a **fator Va** por traços de trombina, liga-se especificamente à membrana plaquetária (Figura 55-3) e forma um complexo com o fator Xa e a protrombina. Subsequentemente, é inativado pela proteína C ativada (ver adiante), assegurando um meio de limitar a ativação da protrombina em trombina. A **protrombina** (72 kDa; Figura 55-3) é uma glicoproteína de cadeia única sintetizada no fígado. A região aminoterminal da protrombina (Figura 55-2) contém 10 resíduos de Gla, e o sítio ativo de protease dependente de serina encontra-se no domínio catalítico próximo à região carboxiterminal da molécula. Após ligar-se ao complexo dos fatores Va e Xa na membrana da plaqueta (Figura 55-3), a

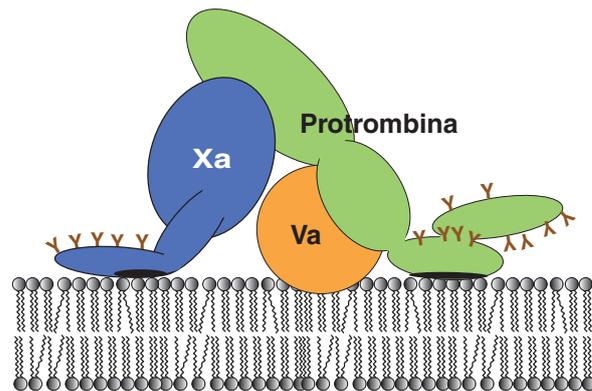


FIGURA 55-3 Representação diagramática do complexo protrombinase ligado à membrana plasmática da plaqueta ativada. O complexo protrombinase contém os fatores Va e Xa e a protrombina. Um tema central em coagulação sanguínea é a formação de complexos proteicos, isto é, os complexos tenase e o complexo protrombinase, sobre as superfícies das membranas nas quais a fosfatidilserina é exposta de forma dependente de Ca²⁺. A eficiência catalítica de ativação do zimogênio é aumentada em muitas ordens de magnitude em função dos complexos ligados à membrana. Os resíduos de γ -carboxiglutamato (indicados por Y) nas proteínas dependentes de vitamina K se ligam ao cálcio e contribuem para a exposição dos sítios de ligação da membrana nessas proteínas (ovais na cor preta, Xa e protrombinase).

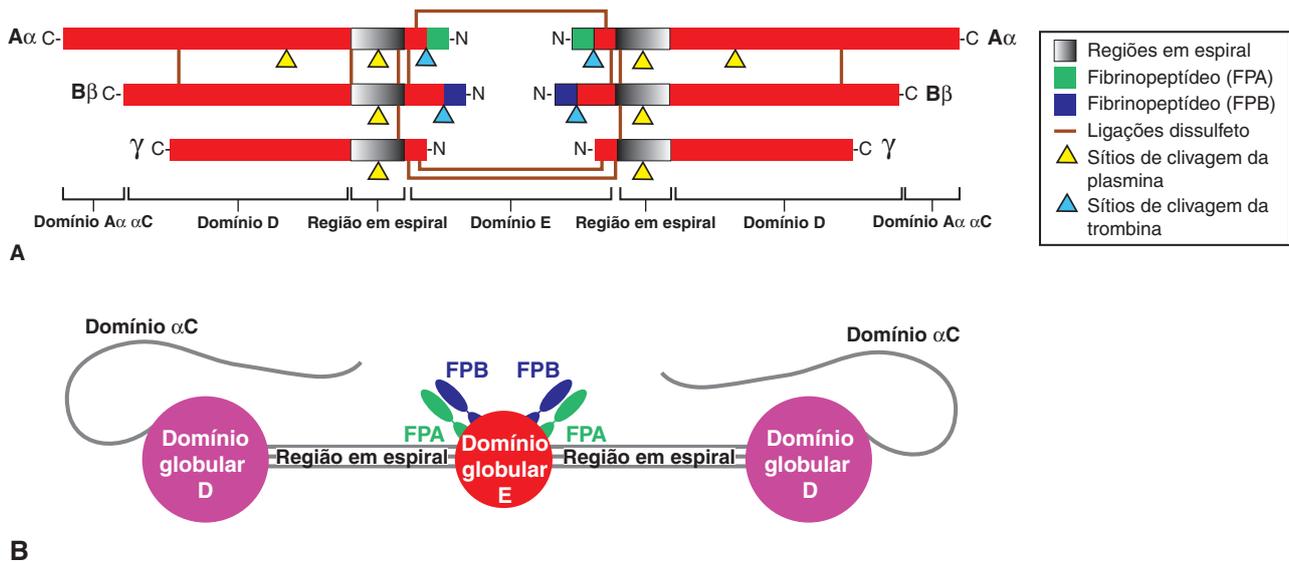


FIGURA 55-4 Representação diagramática do fibrinogênio. (A) O fibrinogênio é uma molécula dimérica, com cada metade composta por três cadeias polipeptídicas: $A\alpha$, $B\beta$ e γ . As ligações dissulfeto unem-se às cadeias e às duas metades da molécula. (B) O fibrinogênio forma uma estrutura trinodular com um domínio E central ligado via regiões enroladas em espiral aos dois domínios D laterais, cada um contendo um domínio $A\alpha$ αC de cadeia flexível. Os peptídeos reguladores clivados pela trombina, fibrinopeptídeo A (FPA) e fibrinopeptídeo B (FPB), encontram-se no interior do nóculo E, conforme mostrado na figura. (Figura modificada de Weitz JI: Overview of hemostasis and thrombosis. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LR, et al [editors]: *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed. Elsevier Saunders, 2013:1779.)

protrombina é clivada pelo fator Xa em dois sítios para gerar a molécula ativa de trombina de duas cadeias, que é, então, liberada da superfície plaquetária.

A conversão do fibrinogênio em fibrina é catalisada pela trombina

A **trombina**, produzida pelo complexo da protrombinase, além de exercer poderoso efeito estimulador sobre as plaquetas (veradiante), **converte o fibrinogênio em fibrina** (Figura 55-1). O **fibrinogênio** (fator I, 340 kDa; ver Figuras 55-1 e 55-4; Tabelas 55-1 e 55-2) é uma glicoproteína plasmática solúvel abundante (3 mg/mL), que consiste em um dímero de três cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$, γ)₂, ligada de forma covalente por 29 ligações dissulfeto. As cadeias $B\beta$ e γ contêm oligossacarídeos complexos ligados à asparagina (ver Capítulo 46). Todas as três cadeias são sintetizadas no fígado; os três genes que codificam essas proteínas estão no mesmo cromossomo onde sua expressão é regulada de modo coordenado nos seres humanos. As regiões aminoterminais das seis cadeias são mantidas muito próximas por várias ligações dissulfeto (uma subpopulação está mostrada na Figura 55-4), ao passo que as regiões carboxiterminais são mantidas à parte. Portanto, a molécula de fibrinogênio apresenta estrutura alongada trinodular com um domínio E central que está ligado aos domínios D laterais via regiões enroladas em espiral (Figuras 55-4 e 55-5A). As porções N-terminais A e B das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ são denominadas **fibrinopeptídeo A (FPA)** e **fibrinopeptídeo B (FPB)**, respectivamente; esses domínios possuem cargas altamente negativas como resultado da abundância de resíduos de aspartato e glutamato (ver a seguir). As cargas negativas contribuem para a solubilidade do fibrinogênio no plasma e,

de forma importante, também servem para impedir a agregação ao produzir repulsão eletrostática entre as moléculas de fibrinogênio.

A **trombina** (34 kDa), uma serina-protease formada pelo complexo da protrombinase, hidrolisa as quatro ligações Arg-Gli entre os fibrinopeptídeos N-terminais e as porções α e β das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio (Figuras 55-5A e 55-5B). A liberação de FPA e FPB pela trombina gera o **monômero de fibrina**, que apresenta a estrutura de subunidades (α , β , γ)₂. Como FPA e FPB contêm apenas 16 e 14 resíduos, respectivamente, a molécula de fibrina conserva 98% dos resíduos presentes no fibrinogênio. A remoção dos fibrinopeptídeos expõe os sítios de ligação no interior do domínio E dos monômeros da fibrina que interagem especificamente com domínios complementares no interior dos domínios D de outros monômeros de fibrina. Dessa forma, os monômeros de fibrina sofrem polimerização espontânea em padrão meio-escalonado para formar longas fitas (protofibrilas) (Figura 55-5A). Embora insolúvel, esse coágulo inicial de fibrina é instável, mantido unido apenas pela associação não covalente de monômeros de fibrina.

Além de converter fibrinogênio em fibrina, a trombina também ativa o **fator XIII a fator XIIIa**. O fator XIIIa é uma **transglutaminase** altamente específica que estabelece ligações covalentes cruzadas entre cadeias γ e, mais lentamente, cadeias α de moléculas de fibrina, formando ligações peptídicas entre os grupos amida da glutamina e os grupos ϵ dos resíduos de lisina (ver Figura 51-5C). Essa ligação cruzada gera um coágulo de fibrina mais estável com maior resistência à proteólise. Essa rede de fibrina serve para estabilizar o tampão hemostático ou o trombo.

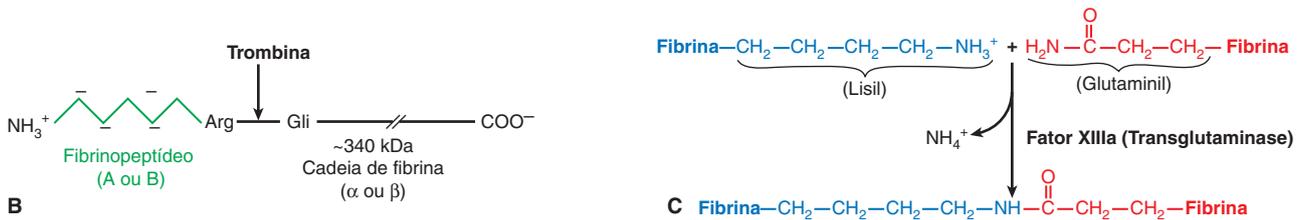
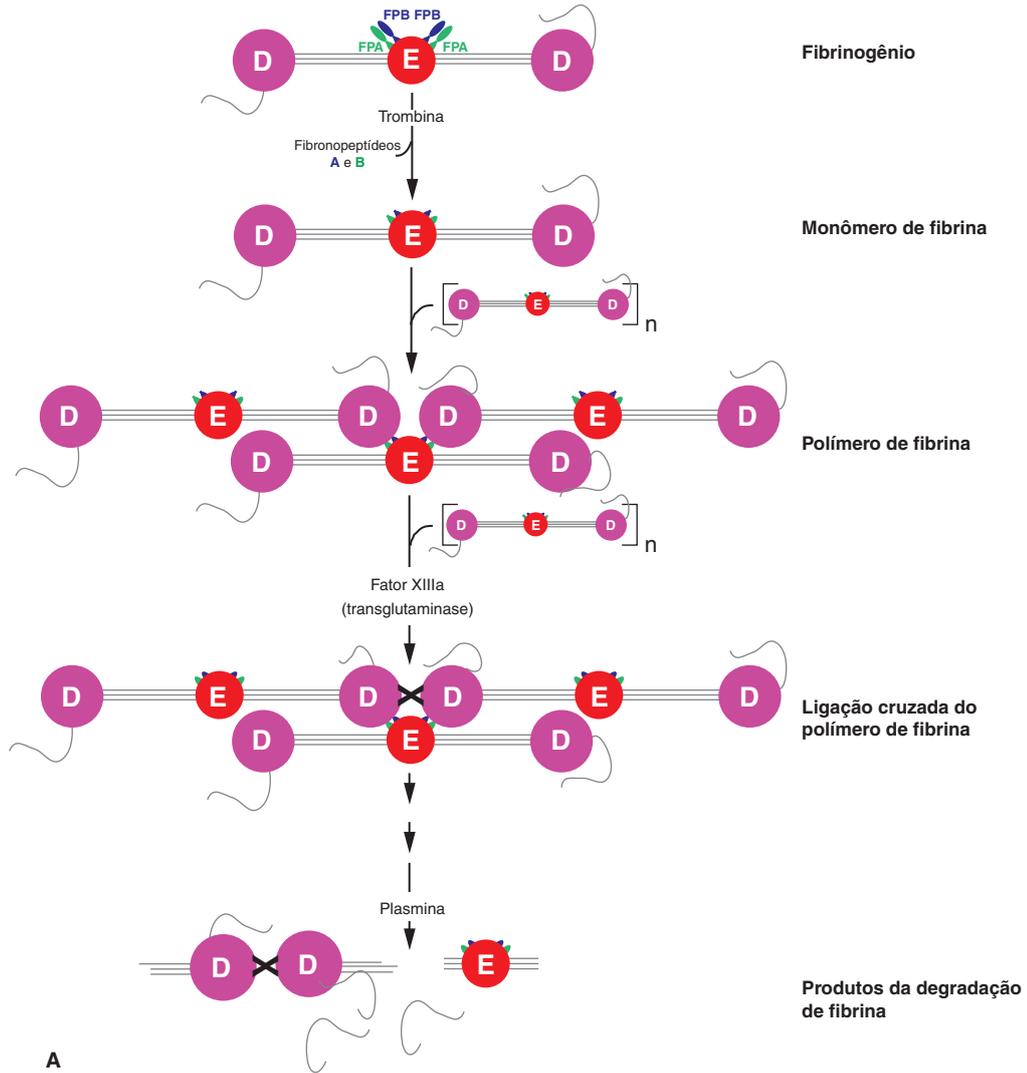


FIGURA 55-5 Polimerização e degradação da fibrina. (A) Formação do monômero da fibrina via clivagem do fibrinopeptídeo A (FPA) e do fibrinopeptídeo B (FPB) a partir do fibrinogênio pela trombina; polimerização espontânea de monômeros de fibrina a dímeros e oligômeros maiores; seguida pela estabilização de oligômeros de fibrina pela ligação cruzada covalente mediado pelo fator XIIIa de monômeros de fibrina adjacentes. Por fim (parte inferior), está ilustrada a degradação de polímeros de fibrina em produtos de degradação solúveis pela digestão da plasmina, que leva à dissolução do coágulo. (Figura modificada de Weitz JI: Overview of hemostasis and thrombosis. In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Silberstein LR, et al [editors]: *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed. Elsevier Saunders, 2013, pp. 1779.) (B) Sítio de clivagem da trombina nas cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio para gerar FPA/FPB (à esquerda; em verde) e nas cadeias α e β do monômero da fibrina (à direita; em preto). (C) Esquema da ligação cruzada de moléculas de fibrina mediada pelo fator XIIIa (transglutaminase). (Figura modificada de Weitz JI: Overview of hemostasis and thrombosis. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LR, et al. [editors]: *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed. Elsevier Saunders, 2013:1779.)

Os níveis de trombina circulante são cuidadosamente controlados

Uma vez formada durante a homeostasia ou trombose, a trombina ativa deve ter a sua concentração cuidadosamente controlada para impedir qualquer excesso de formação de fibrina ou ativação das plaquetas. Esse controle é obtido de **duas maneiras**. A trombina circula na sua forma de precursor inativo, a protrombina, a qual é ativada em consequência de uma cascata de reações enzimáticas, em que cada uma converte um zimogênio inativo em uma enzima ativa, levando, por fim, à conversão da protrombina em trombina (Figura 55-1). Em cada ponto da cascata, os **mecanismos de retroalimentação** produzem um delicado equilíbrio entre ativação e inibição. A concentração plasmática do fator XII é de aproximadamente 30 µg/mL, ao passo que a do fibrinogênio é de 3 mg/mL, com aumento na concentração dos fatores intermediários da coagulação à medida que a cascata prossegue; esses fatos ilustram que a cascata da coagulação proporciona **amplificação**. A segunda maneira de controlar a atividade da trombina consiste na **inativação de qualquer trombina** formada por **inibidores circulantes**, dos quais o mais importante é a antitrombina (ver adiante).

A heparina aumenta a atividade da antitrombina, um inibidor da trombina

Existem **quatro inibidores da trombina** de ocorrência natural no plasma normal. O mais importante é a **antitrombina**, que contribui com aproximadamente 75% da atividade de antitrombina. A antitrombina também pode inibir as atividades dos fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e VIIa complexados ao fator tecidual. A **α_2 -macroglobulina** contribui com a maior parte de atividade antitrombina restante, com a **heparina cofator II** e a **α_1 -antitripsina** atuando como inibidores discretos sob condições fisiológicas.

A atividade endógena da antitrombina é acentuadamente potencializada pela presença de glicosaminoglicanos sulfatados (heparanos) (ver Capítulo 48). Os heparanos ligam-se a um sítio catiônico específico da antitrombina, o qual induz alteração conformacional que promove a ligação da antitrombina à trombina, assim como a seus outros substratos. Esse mecanismo é a base para o uso da **heparina**, um heparano derivado, na medicina clínica para inibir a coagulação. Os efeitos anticoagulantes da heparina podem ser antagonizados por polipeptídeos fortemente catiônicos, como a **protamina**, que se ligam fortemente à heparina, inibindo a ligação da heparina à antitrombina.

As **heparinas de baixo peso molecular (LMWHs)**, derivadas da clivagem enzimática ou química da heparina não fracionada, estão sendo cada vez mais usadas clinicamente. Elas podem ser administradas por via subcutânea em regime domiciliar, apresentam maior disponibilidade do que a heparina não fracionada e não exigem monitoração laboratorial frequente.

Os indivíduos com **deficiências hereditárias de antitrombina** são propensos a desenvolver trombose venosa, fornecendo evidência de que a antitrombina desempenha função fisiológica e que o sistema de coagulação nos seres humanos se encontra, normalmente, em estado dinâmico.

A **trombina** está envolvida em um mecanismo regulador adicional que opera na coagulação. Ela combina-se com

a **trombomodulina**, uma glicoproteína presente nas superfícies das células endoteliais. O complexo ativa a **proteína C** no **receptor de proteína C endotelial**. Em combinação com a **proteína S**, a **proteína C ativada (APC)** degrada os fatores Va e VIIIa, limitando suas ações na coagulação. Uma deficiência genética tanto da proteína C quanto da proteína S pode causar trombose venosa. Além disso, pacientes com o **fator V de Leiden** (que apresenta um resíduo de glutamina, em vez de arginina, na posição 506) correm risco aumentado de doença trombótica venosa, visto que o fator V de Leiden é resistente à inativação pela APC; essa condição é.

Os anticoagulantes cumarínicos inibem a carboxilação dos fatores II, VII, IX e X dependentes de vitamina K

Os **fármacos cumarínicos** (p. ex., varfarina), utilizados como anticoagulantes, inibem a carboxilação dependente de vitamina K dos resíduos Glu em Gla (ver Capítulo 44), presentes nas regiões aminoterminais dos fatores II, VII, IX e X, bem como nas proteínas C e S. Essas proteínas, que são sintetizadas no fígado, dependem das propriedades de ligação ao Ca^{2+} dos resíduos de Gla para a sua função normal nas vias da coagulação. Os **cumarínicos inibem a redução dos derivados quinona da vitamina K nas formas de hidroquinona ativas** (ver Capítulo 44). Por conseguinte, a administração de vitamina K evita a inibição induzida pelos cumarínicos e possibilita a ocorrência da modificação pós-traducional de carboxilação. A **reversão** da inibição dos cumarínicos pela vitamina K requer 12 a 24 horas, enquanto a reversão dos efeitos anticoagulantes da heparina pela protamina é quase instantânea.

A **heparina** e a **varfarina** são utilizadas no tratamento de condições trombóticas e tromboembólicas, como trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A heparina é administrada em primeiro lugar em virtude de sua ação de início imediato, ao passo que a varfarina leva vários dias para alcançar o seu efeito integral. Os seus efeitos não são bem previsíveis pela dosagem, e, portanto, devido ao risco de produzir hemorragia, esses fármacos são cuidadosamente monitorados pelo uso de testes apropriados de coagulação (ver a seguir).

Os **novos inibidores orais** da trombina (dabigatran) ou do fator Xa (rivaroxabana, apixabana e outros) também são utilizados na prevenção e no tratamento das condições trombóticas. Esses fármacos são vantajosos, uma vez que o seu efeito é previsível com base na dose e alguns não necessitam de monitoramento rotineiro por testes laboratoriais.

Existem vários distúrbios hemorrágicos hereditários, incluindo a hemofilia A

Nos seres humanos, ocorrem **deficiências hereditárias** do sistema de coagulação, resultando em sangramento. A mais comum é a deficiência do fator VIII, causando **hemofilia A**, uma doença ligada ao cromossomo X. A **hemofilia B**, também **ligada ao cromossomo X**, é devida a uma deficiência do fator IX e tem sido recentemente identificada como a forma de hemofilia que desempenhou um papel importante na história das famílias reais da Europa. As características clínicas das hemofilias A e B são quase idênticas, porém essas duas doenças

podem ser prontamente diferenciadas com base em ensaios específicos para os dois fatores.

O **gene que codifica o fator VIII humano** possui 186 quilobases (kb) de comprimento e contém 26 éxons que codificam uma proteína de 2.351 aminoácidos. Foi detectada uma variedade de mutações dos genes dos fatores VIII e IX, levando à redução nas atividades das proteínas desses fatores; essas mutações incluem deleções parciais do gene e mutações pontuais e de sentido incorreto. Atualmente, é possível estabelecer o **diagnóstico pré-natal** pela análise do DNA após obtenção de amostra das vilosidades coriônicas (ver Figura 39-9).

No passado, o tratamento dos pacientes com hemofílias A e B consistia na administração de **crioprecipitados** (enriquecidos com fator VIII) preparados a partir de doadores individuais ou de **concentrados** liofilizados de fator VIII ou IX preparados a partir de misturas muito grandes de plasma. Assim, hoje é possível preparar os fatores VIII e IX pela tecnologia do DNA recombinante (ver Capítulo 39). Essas preparações são desprovidas de vírus contaminantes (p. ex., vírus das hepatites A, B e C ou HIV-1) encontrados no plasma humano, porém são de alto custo; o seu uso aumentará de acordo com a redução no custo de produção.

O distúrbio hemorrágico hereditário mais comum é a **doença devon Willebrand**, com prevalência de até 1% da população. Ela resulta de deficiência ou distúrbio no **fator de von Willebrand**, uma grande glicoproteína multimérica secretada pelas células endoteliais e plaquetas do plasma, onde estabiliza o fator VIII. O fator de von Willebrand também promove a adesão das plaquetas nos locais de lesão da parede vascular (ver adiante).

Os coágulos de fibrina são dissolvidos pela plasmina

Conforme assinalado anteriormente, o sistema de coagulação encontra-se, normalmente, em estado de equilíbrio dinâmico, em que os coágulos de fibrina são constantemente depositados e dissolvidos. Esse último processo é denominado **fibrinólise**. A **plasmina**, principal serina-protease responsável pela degradação da fibrina e do fibrinogênio, circula na forma de seu zimogênio inativo, o **plasminogênio** (90 kDa), e qualquer quantidade pequena de plasmina formada na fase líquida, em condições fisiológicas, é rapidamente inativada pelo inibidor da plasmina de ação rápida, a α_2 -antiplasmina. O plasminogênio liga-se à fibrina e, assim, incorpora-se aos coágulos à medida que são produzidos; já que a plasmina que é formada quando ligada à fibrina é protegida da ação da α_2 -antiplasmina, ela permanece ativa. Na maioria dos tecidos do corpo, são encontrados **ativadores de plasminogênio** de vários tipos e todos clivam a mesma ligação Arg-Val no plasminogênio, produzindo a plasmina, uma serina-protease de duas cadeias ligada por ligações dissulfeto (Figura 55-6). A **especificidade da plasmina pela fibrina** é outro mecanismo que regula a fibrinólise. Por meio de um de seus domínios *kringle*, a plasmina (plasminogênio) liga-se especificamente a resíduos de lisina na fibrina e, dessa maneira, incorpora-se progressivamente à rede de fibrina que cliva. (Os domínios *kringle* [Figura 55-2] são motivos proteicos comuns com comprimento de cerca de 100 resíduos de aminoácidos; eles apresentam estrutura covalente característica definida

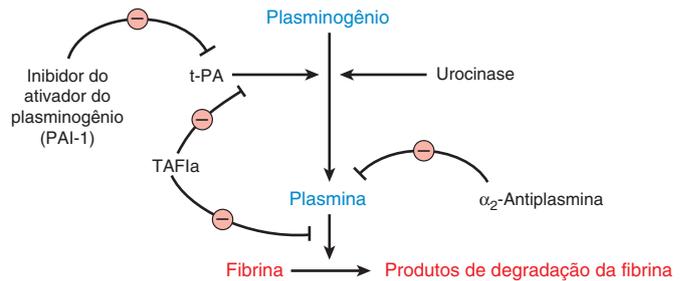


FIGURA 55-6 Iniciação da fibrinólise pela ativação do plasminogênio à plasmina. Esquema de sítios e formas de atuação do ativador de plasminogênio tecidual (tPA), da urocinase, do inibidor do ativador do plasminogênio, da α_2 -antiplasmina e do inibidor da fibrinólise ativável por trombina ativada (TAFIa).

por um padrão de três ligações dissulfeto.) Portanto, a carboxipeptidase **TAFIa (inibidor da fibrinólise ativável por trombina ativada)** (Figura 55-6), que remove as lisinas terminais da fibrina, tem a capacidade de inibir a fibrinólise. A trombina ativa TAFIa em TAFIa, inibindo a fibrinólise durante a formação do coágulo.

O **ativador de plasminogênio tecidual (tPA)** (Figuras 55-2 e 55-6) é uma serina-protease liberada na circulação a partir do endotélio, em condições de lesão ou de estresse, e que é cataliticamente inativa, a menos que esteja ligada à fibrina. Devido à ligação à fibrina, o tPA cliva o plasminogênio dentro do coágulo para gerar plasmina, que, por sua vez, digere a fibrina para formar produtos de degradação solúveis e, assim, dissolver o coágulo. Nem a plasmina nem o ativador do plasminogênio podem permanecer ligados a esses produtos de degradação e, portanto, são liberados na fase líquida, em que são inativados pelos seus inibidores naturais. A pró-urocinase é o precursor de um segundo ativador do plasminogênio, a **urocinase**. Originalmente isolada da urina, hoje se sabe que a urocinase é sintetizada por diversos tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. A principal função da urocinase parece ser a degradação da matriz extracelular. A Figura 55-6 indica os locais de ação de cinco proteínas que influenciam a ação e a formação da plasmina.

O tPA recombinante e a estreptocinase são utilizados como destruidores dos coágulos

O tPA, comercializado como **alteplase**, é produzido pela metodologia do DNA recombinante. Ele é usado terapeuticamente como agente fibrinolítico, como a **estreptocinase**, uma enzima secretada por diversas cepas bacterianas de estreptococos. Entretanto, essa última é menos seletiva do que o tPA, ativando o plasminogênio na fase líquida (em que pode degradar o fibrinogênio circulante), bem como o plasminogênio ligado a um coágulo de fibrina. A quantidade de plasmina produzida por doses terapêuticas de estreptocinase pode ultrapassar a capacidade da α_2 -antiplasmina circulante, causando a degradação do fibrinogênio e da fibrina e resultando no sangramento que frequentemente ocorre durante a terapia fibrinolítica. Devido à sua relativa **seletividade** para degradar a fibrina, o tPA recombinante tem sido amplamente usado para restaurar a desobstrução das artérias coronárias após a ocorrência de trombose.

Quando administrado suficientemente cedo, antes que ocorra lesão irreversível do músculo cardíaco (cerca de 6 horas após o início da trombose), o tPA pode reduzir a taxa de mortalidade da lesão miocárdica após a trombose coronária de maneira significativa. A estreptocinase também tem sido amplamente utilizada no tratamento de trombose coronariana, porém apresenta a desvantagem de ser antigênica. O tPA também tem sido utilizado no tratamento de acidente vascular isquêmico, oclusão arterial periférica, trombose venosa profunda e embolia pulmonar.

Existem diversos distúrbios, incluindo o câncer e a sepsé, nos quais as **concentrações de ativadores do plasminogênio aumentam**. Além disso, as **atividades antiplasmina** exercidas

pela α_1 -antitripsina e pela α_2 -antiplasmina podem estar comprometidas em doenças como a cirrose. Já que determinadas proteínas bacterianas, como a estreptocinase, são capazes de ativar o plasminogênio, elas podem ser responsáveis pela hemorragia difusa, algumas vezes observada em pacientes com infecções bacterianas disseminadas.

A agregação plaquetária requer sinalização transmembrana de fora para dentro e de dentro para fora

As plaquetas circulam normalmente em um formato discoide não estimulado. **Durante a homeostasia ou a trombose, as**

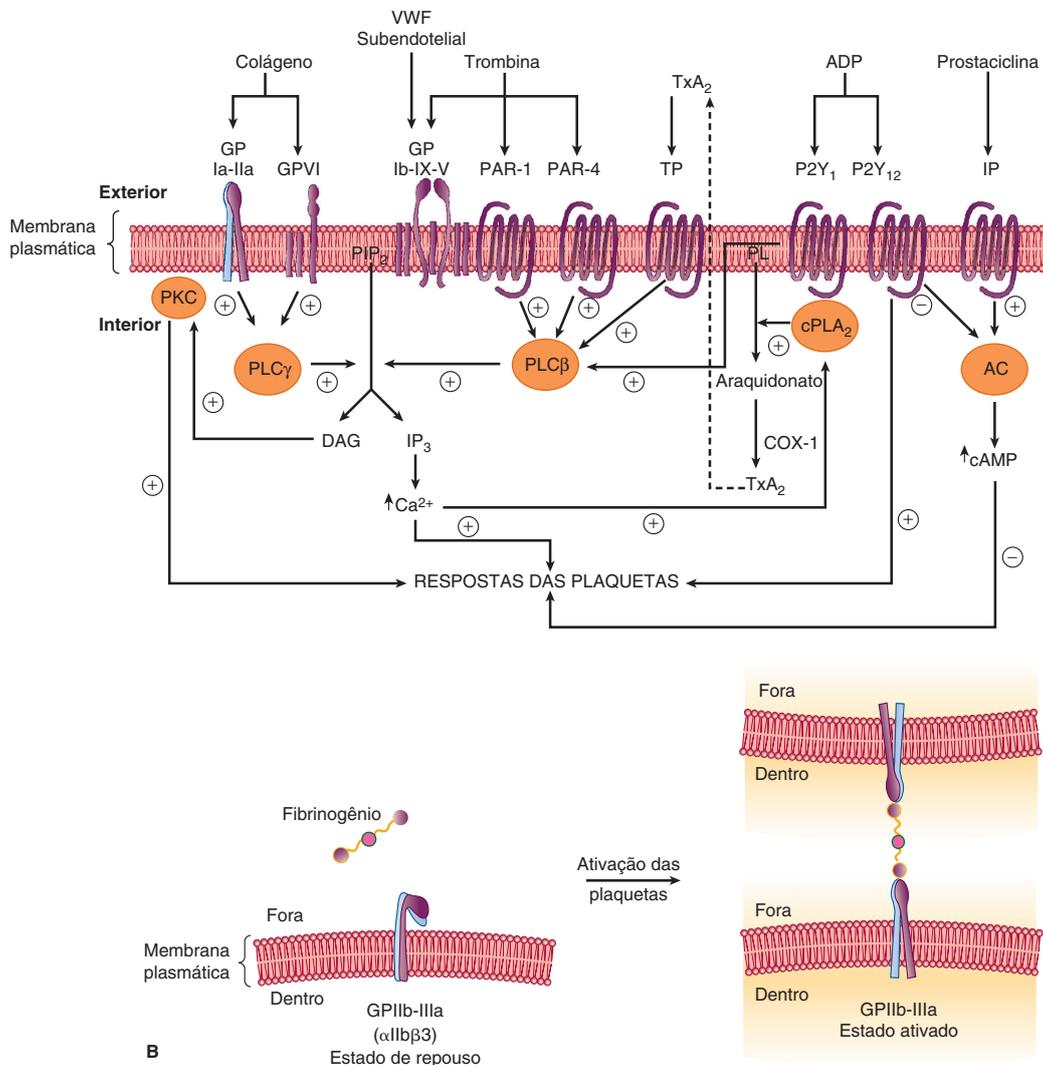


FIGURA 55-7 (A) Representação diagramática da ativação plaquetária por colágeno, trombina, tromboxano A₂ e ADP, e inibição pela prostaciclina. O ambiente externo, a membrana plasmática e o interior de uma plaqueta estão mostrados de cima para baixo. As respostas plaquetárias incluem, dependendo do agonista, alteração no formato da plaqueta, liberação dos conteúdos dos grânulos de armazenamento e agregação. (AC, adenilato-ciclase; cAMP, AMP cíclico; COX-1, cicloxigenase 1; cPLA₂, fosfolipase A₂ citosólica; DAG, 1,2-diacilglicerol; GP, glicoproteína; IP, receptor de prostaciclina; IP₃, inositol-1,4,5-trifosfato; P2Y₁, P2Y₁₂, receptores de purina; PAR, receptor ativado por protease; PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC, proteína-cinase C; PL, fosfolípido; PLC β , fosfolipase C β ; PLC γ , fosfolipase C γ ; TP, receptor de tromboxano A₂; TxA₂, tromboxano A₂; vWF, fator de von Willebrand.) As proteínas G envolvidas não estão ilustradas. (B) Representação diagramática da agregação plaquetária mediada pela ligação do fibrinogênio a moléculas ativadas de GPIIb-IIIa presentes nas plaquetas adjacentes. Os eventos de sinalização iniciados por todos os agentes agregadores transformam GPIIb-IIIa de seu estado de repouso em uma forma ativada, que pode ligar-se ao fibrinogênio divalente ou, na presença do alto cisalhamento que ocorre nos pequenos vasos, ao fator de von Willebrand multivalente.

plaquetas são ativadas e ajudam a **formar tampões hemostáticos ou trombos** (Figura 55-7). Três etapas principais estão envolvidas: (1) adesão ao colágeno exposto nos vasos sanguíneos, (2) liberação (exocitose) do conteúdo dos grânulos de armazenamento e (3) agregação.

As plaquetas aderem ao colágeno via receptores específicos situados na superfície da plaqueta, incluindo os complexos glicoproteicos GPIa-IIa (integrina $\alpha 2\beta 1$; Capítulo 52) e GPIb-IX-V, e GPVI. A ligação do complexo GPIb-IX-V ao colágeno é mediada pelo fator de von Willebrand; essa interação é particularmente importante na aderência das plaquetas ao subendotélio nas condições de alto estresse de cisalhamento que ocorrem nos pequenos vasos e nas artérias parcialmente estenosadas.

As plaquetas que estão ligadas ao colágeno alteram seu formato e se disseminam sobre o subendotélio. Essas plaquetas aderentes liberam os conteúdos de seus **grânulos de armazenamento** (os grânulos densos e os grânulos α); algumas das moléculas liberadas amplificam as respostas à lesão da parede vascular. A liberação de grânulos também é estimulada pela trombina.

A **trombina**, formada a partir da cascata da coagulação, é o ativador mais potente das plaquetas e inicia a ativação ao interagir com seus receptores **PAR (receptor ativado por protease)-1, PAR-4 e GPIb-IX-V** na membrana plasmática plaquetária (Figura 55-7A). Os eventos subsequentes que levam à ativação das plaquetas após a ligação ao PAR-1 e ao PAR-4 fornecem exemplos de **sinalização transmembrana** de fora para dentro, em que um mensageiro químico fora da célula gera moléculas efetoras dentro da célula. Nesse caso, a trombina atua como mensageiro químico externo (estímulo ou agonista). A interação da trombina com seus receptores acoplados à proteína G, PAR-1 e PAR-4, estimula a atividade de uma **fosfolipase C β (PLC β)**. Essa enzima hidrolisa o fosfolípido da membrana, o **fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂, um polifosfoinosítido)**, para formar duas moléculas efetoras internas (**1,2-diacilglicerol [DAG]** e **1,4,5-inositol-trifosfato [IP₃]**; ver Figura 42-7).

A hidrólise do PIP₂ também está envolvida na ação de muitos hormônios e fármacos. O DAG estimula a **proteína-quinase C**, que fosforila a proteína **plecstrina** (47 kDa). Isso resulta em agregação e liberação dos conteúdos dos grânulos de armazenamento. O **ADP** liberado dos grânulos densos também pode ativar as plaquetas por meio de seus receptores específicos acoplados à proteína G (Figura 55-7A), resultando em agregação de mais plaquetas. O **IP₃** causa a liberação de **Ca²⁺** para dentro do citosol, principalmente a partir do sistema tubular denso (ou retículo endoplasmático liso residual do megacariócito) que, a seguir, interage com a calmodulina e a cinase da cadeia leve da miosina, levando à fosforilação das cadeias leves de miosina. A seguir, essas cadeias interagem com a actina, causando modificações no formato da plaqueta.

A ativação induzida pelo colágeno de uma **fosfolipase citosólica A₂** plaquetária por níveis elevados de **Ca²⁺** intracelular resulta na liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidos da membrana plaquetária, levando à formação de **tromboxano A₂** (ver Capítulo 23). O tromboxano A₂, ao ligar-se a seu receptor específico acoplado à proteína G, pode ativar ainda mais a PLC β , promovendo a agregação plaquetária (Figura 55-6A).

Além de formar um agregado, as plaquetas ativadas aceleram a ativação do fator X e da protrombina pela exposição do fosfolípido aniônico, a fosfatidilserina, sobre a superfície da membrana (Figura 55-1). O polifosfato, liberado a partir dos grânulos densos, acelera a ativação do fator V e também acelera a ativação do fator XI pela trombina.

Todos os **agentes agregadores**, incluindo a trombina, o colágeno, o ADP e outros, como o fator de ativação de plaquetas, através da via de sinalização de dentro para fora, modificam o **complexo glicoproteico GPIIb-IIIa ($\alpha IIb\beta 3$; ver Capítulo 52)** da superfície da plaqueta, de modo que o receptor tenha maior afinidade pelo **fibrinogênio** ou pelo **fator de von Willebrand** (Figura 55-7B). Em seguida, as moléculas de fibrinogênio divalentes ou o fator de von Willebrand multivalente ligam plaquetas ativadas adjacentes entre si, formando um agregado plaquetário. Ocorre agregação plaquetária mediada pelo fator de von Willebrand em condições de alto estresse de cisalhamento. Alguns agentes, incluindo a epinefrina, a serotonina e a vasopressina, exercem efeitos sinérgicos com outros agentes agregadores.

As células endoteliais sintetizam prostaciclina e outros compostos que afetam a coagulação e a trombose

As **células endoteliais** nas paredes dos vasos sanguíneos contribuem de modo significativo para a regulação global da homeostasia e da trombose. Conforme descrito no Capítulo 23, essas células sintetizam o prostanóide **prostaciclina (PGI₂)**, um potente inibidor da agregação plaquetária. A prostaciclina atua ao estimular a atividade da adenilato-ciclase nas membranas superficiais das plaquetas por meio de seu receptor acoplado à proteína G (Figura 55-7A). A consequente elevação do **cAMP** intraplaquetário opõe-se ao aumento do nível de **Ca²⁺** intracelular produzido pelo IP₃ e, portanto, inibe a ativação das plaquetas. Isso contrasta com o efeito do prostanóide tromboxano A₂, formado pelas plaquetas ativadas, que consiste na promoção da agregação. As células endoteliais desempenham outros papéis na regulação da trombose. Por exemplo, essas células apresentam uma **ADPase**, que hidrolisa o ADP e que, dessa forma, opõe-se ao efeito agregador do ADP sobre as plaquetas. Além disso, essas células parecem sintetizar o **heparan-sulfato**, um anticoagulante, e também sintetizam os **ativadores de plasminogênio**, que podem ajudar a dissolver os trombos. O **óxido nítrico** (o fator de relaxamento derivado do endotélio) é discutido no Capítulo 49.

A análise dos mecanismos de **captação de lipoproteínas aterogênicas**, como as LDL, pelas células endoteliais, células do músculo liso e células monocíticas das artérias, juntamente com os estudos detalhados de como essas lipoproteínas provocam lesão dessas células, constitui uma área fundamental na pesquisa que visa à elucidação dos mecanismos da **aterosclerose** (ver Capítulo 26).

O ácido acetilsalicílico é um dos vários fármacos antiplaquetários efetivos

Os **fármacos antiplaquetários inibem respostas plaquetárias**. O fármaco antiplaquetário mais comumente utilizado é o **ácido acetilsalicílico**, que acetila irreversivelmente e, portanto, inibe

a **ciclooxigenase (COX-1)** plaquetária envolvida na formação do tromboxano A_2 (ver Capítulo 15), um poderoso agregador das plaquetas, bem como vasoconstritor. As plaquetas são muito sensíveis ao ácido acetilsalicílico, e o uso de apenas 30 mg/dia (um comprimido de ácido acetilsalicílico contém geralmente 325 mg) impede efetivamente a síntese de tromboxano A_2 . O ácido acetilsalicílico também inibe a produção de prostaciclina (PGI_2 , que se opõe à agregação plaquetária e atua como vasodilatador) pelas células endoteliais; todavia, diferentemente das plaquetas, essas células regeneram a ciclooxigenase dentro de poucas horas. Desse modo, o equilíbrio global entre o tromboxano A_2 e a prostaciclina pode ser deslocado em favor da prostaciclina, opondo-se à agregação plaquetária. As indicações para o tratamento com ácido acetilsalicílico incluem o tratamento de síndromes coronárias agudas (angina, infarto do miocárdio), síndromes de acidente vascular encefálico agudo (ataques sistêmicos transitórios, acidente vascular encefálico agudo), estenose grave da artéria carótida e prevenção primária destas e de outras doenças aterotrombóticas.

Outros **fármacos antiplaquetários** incluem **clopidogrel**, **prasugrel** e **ticagrelor**, inibidores específicos do receptor $P2Y_{12}$ para ADP e antagonistas da ligação do ligante GPIIb-IIIa (p.ex., **abciximabe**) que interferem na ligação do fibrinogênio e do fator de von Willebrand e, portanto, na agregação plaquetária.

A coagulação, a trombólise e a agregação plaquetária são avaliadas por testes de laboratório

Existem diversos **testes laboratoriais** disponíveis para **avaliar as fases de homeostasia** descritas anteriormente. Esses testes incluem a **contagem de plaquetas**, o **tempo de oclusão com tampão plaquetário**, a **agregação plaquetária**, o **tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa ou PTT)**, o **tempo de protrombina (TP)**, o **tempo de trombina (TT)**, a **concentração de fibrinogênio**, a **estabilidade do coágulo de fibrina** e a **determinação dos produtos de degradação da fibrina**. A **contagem de plaquetas** quantifica o número de plaquetas. O **tempo de sangramento** é um exame global de função das plaquetas e da parede vascular, ao passo que o **tempo de oclusão** medido com analisador da função plaquetária PFA-100 é um teste *in vitro* de homeostasia relacionada com as plaquetas. A **agregação plaquetária** avalia respostas a agentes agregadores específicos. TTPa é uma medida da via intrínseca, e TP, da via extrínseca, sendo o TTPa utilizado para monitorar a terapia por heparina, e o TP, para determinar a eficiência da varfarina. O leitor deve consultar um livro de hematologia para a descrição desses testes.

RESUMO

- A homeostasia e a trombose são processos complexos que envolvem os fatores da coagulação, as plaquetas e os vasos sanguíneos.
- Muitos fatores da coagulação são zimogênios de serinas-proteases que são ativados e, em seguida, inativados durante o processo global.
- Há uma via extrínseca e uma via intrínseca da coagulação, sendo a primeira iniciada *in vivo* pelo fator tecidual. As vias convergem para o fator Xa, resultando na conversão, catalisada pela trombina, do fibrinogênio em fibrina, que é fortalecida por ligações cruzadas covalentes, em um processo catalisado pelo fator XIIIa.
- Ocorrem distúrbios genéticos que causam sangramento; os principais envolvem o fator VIII (hemofilia A), o fator IX (hemofilia B) e o fator de von Willebrand (doença de von Willebrand).
- A antitrombina é um importante inibidor natural da coagulação; a deficiência genética dessa proteína pode resultar em trombose.
- Os fatores II, VII, IX e X e as proteínas C e S exigem γ -carboxilação dependente de vitamina K de determinados resíduos de glutamato para atuar na coagulação. Esse processo de carboxilação pode ser inibido pelo anticoagulante varfarina.
- A fibrina é dissolvida pela plasmina. A plasmina existe como um precursor inativo, o plasminogênio, que pode ser ativado pelo ativador de plasminogênio tecidual (tPA). tPA é ampla e clinicamente utilizado para tratar a trombose precoce das artérias coronárias.
- A trombina e outros agentes provocam agregação plaquetária, que envolve uma variedade de eventos bioquímicos e morfológicos. A estimulação da fosfolipase C e da via do polifosfoinosítídeo constitui um evento essencial na ativação das plaquetas, embora outros processos também estejam envolvidos.
- O ácido acetilsalicílico é um fármaco antiplaquetário importante que atua ao inibir a produção de tromboxano A_2 .

REFERÊNCIAS

- Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LR, et al (editors): *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed. Elsevier Saunders, 2013.
- Israels SJ (editor): *Mechanisms in Hematology*, 4th ed. Core Health Sciences Inc, 2011. (This text has many excellent illustrations of basic mechanisms in hematology.)
- Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th ed. McGraw-Hill, 2011.
- Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, et al (editors): *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- Michelson AD (editor): *Platelets*, 3rd ed. Elsevier, 2013.

Câncer: considerações gerais

Molly Jacob, M.B.B.S., M.D, Ph.D., Joe Varghese, M.B.B.S., M.D, Robert K. Murray, M.D, Ph.D. e P. Anthony Weil, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Fornecer uma visão geral das características bioquímicas e genéticas importantes das células neoplásicas.
- Descrever as propriedades importantes dos oncogenes e dos genes supressores de tumor.
- Relatar de modo sucinto os conceitos de instabilidade genômica, aneuploidia e angiogênese nos tumores.
- Discutir o uso de marcadores tumorais para acompanhar a resposta ao tratamento e detectar a ocorrência de recidiva.
- Reconhecer que a compreensão recente da biologia do câncer levou ao desenvolvimento de vários novos tratamentos.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Nos Estados Unidos e em muitos outros países, os **cânceres** constituem a **segunda causa mais comum de morte**, em seguida à doença cardiovascular. A cada ano, cerca de 8 milhões de pessoas morrem de câncer em todo o mundo, e estima-se que esse número aumentará. Seres humanos de todas as idades desenvolvem câncer, e uma grande variedade de órgãos é acometida. No mundo inteiro, os principais tipos de câncer que levam à morte são os que acometem os pulmões, o estômago, o colo, o reto, o fígado e as mamas. Outros tipos de câncer que também resultam em morte incluem os cânceres de colo do útero, de esôfago e de próstata. Os cânceres de pele são muito comuns, porém, com exceção dos melanomas, esses tipos de câncer geralmente não são tão agressivos quanto os mencionados anteriormente. A **incidência** de muitos tipos de câncer **aumenta com a idade**. Portanto, visto que as pessoas estão vivendo por mais tempo, um número muito maior desenvolverá doença. Os fatores hereditários contribuem em alguns tipos de tumores. Além do enorme sofrimento do indivíduo causado pela doença, o ônus econômico para a sociedade é imenso.

ALGUNS COMENTÁRIOS GERAIS SOBRE AS NEOPLASIAS

Uma neoplasia refere-se a qualquer novo crescimento anormal de tecido; pode ser de natureza benigna ou maligna. O termo “câncer” está geralmente associado a tumores malignos. Os tumores podem surgir em qualquer órgão do corpo e

podem resultar em manifestações clínicas distintas, dependendo da localização de seu crescimento.

As **células cancerosas** são caracterizadas por certas **propriedades principais**: (1) **proliferam-se rapidamente**; (2) **apresentam redução do controle do crescimento**; (3) **apresentam perda da inibição de contato *in vitro***; (4) **invadem tecidos locais** e se espalham, ou **sofrem metástase**, para outras partes do corpo; (5) são **autossuficientes em relação aos sinais de crescimento** e são **insensíveis aos sinais de anticrescimento**; (6) estimulam a **angiogênese local**; e (7) geralmente são capazes de **evitar a apoptose**. Essas propriedades são características de células dos **tumores malignos**. Em geral, a metástase é responsável pela morte do paciente com câncer. Esses aspectos estão resumidos na **Figura 56-1**. Por outro lado, as células dos **tumores benignos** também apresentam redução do controle de crescimento, porém não invadem os tecidos locais nem se disseminam para outras partes do corpo. A **Figura 56-2** mostra várias outras propriedades importantes associadas às células neoplásicas. Esses vários aspectos são discutidos adiante.

As **questões centrais relacionadas ao câncer** pretendem elucidar os mecanismos bioquímicos e genéticos subjacentes ao crescimento descontrolado das células cancerosas, a sua capacidade de invadir e metastatizar e desenvolver tratamentos bem-sucedidos capazes de destruir as células cancerosas, porém com lesão mínima das células normais. Tem sido feito um progresso considerável em relação à compreensão da natureza básica das células cancerosas, e atualmente se aceita que, embora as mutações em genes importantes contribuam significativamente para malignidades, sobretudo no início da fase da

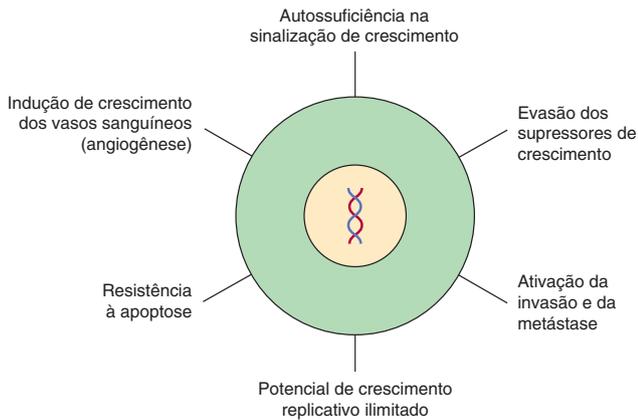


FIGURA 56-1 As seis principais características das células neoplásicas. Outras propriedades importantes das células neoplásicas são mostradas na Figura 56-2. (De Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.)

oncogênese, outros fatores também estão implicados no desenvolvimento de fenótipos malignos. O estado imunológico do organismo e o microambiente tecidual representam dois desses fatores. Trabalhos recentes mostraram que o microambiente do hospedeiro e das células tumorais e as interações entre eles contribuem para a patogênese das malignidades. Entretanto, muitos aspectos do comportamento das células cancerosas,

em particular a sua capacidade de sofrer metástase, ainda não estão totalmente explicados. Além disso, apesar dos progressos no tratamento de certos tipos de câncer, muitas vezes as terapias ainda não são bem-sucedidas. O estudo do câncer, ou oncologia, é um campo vasto, e, portanto, este capítulo servirá apenas para introduzir o leitor aos conceitos principais da biologia do câncer.

O **Glossário** no fim deste capítulo define o significado de diversos termos aqui empregados.

CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTAIS DA CARCINOGENESE

Acredita-se que a ocorrência de lesão genética não letal represente o evento iniciador na carcinogênese. Existem quatro classes principais de genes que, quando mutados para acarretar ganho ou perda de função ou regulação inadequada, podem resultar no desenvolvimento de tumor. Estes são os **proto-oncogenes**, os genes **supressores de tumor**, os genes de **reparo do DNA** e os genes que regulam a **apoptose** ou o escape da vigilância imunológica. O câncer é de **origem clonal**, com uma única célula anormal, em geral com múltiplas alterações genéticas, multiplicando-se para se tornar uma massa de células que formam um tumor. Como mencionado anteriormente, o **microambiente tecidual influencia os processos** que ocorrem. A exata natureza dessas

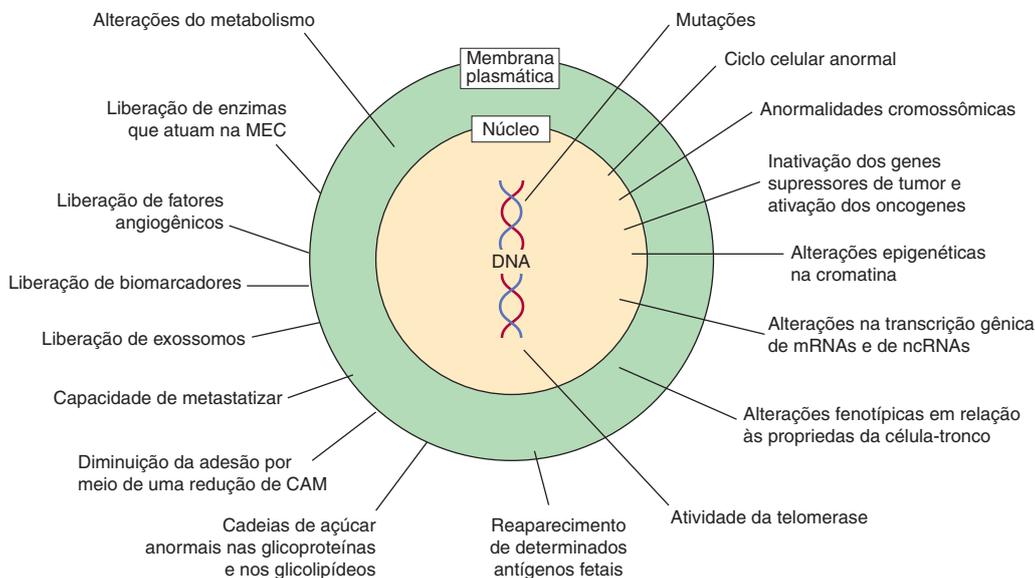


FIGURA 56-2 Algumas alterações bioquímicas e genéticas que ocorrem nas células neoplásicas humanas. Muitas alterações, além das indicadas na Figura 56-1, são observadas nas células neoplásicas; apenas algumas são mostradas aqui. O papel das mutações na ativação dos oncogenes e na inativação dos genes supressores de tumor é discutido no texto. É comum a ocorrência de anormalidades no ciclo celular e na estrutura dos cromossomos e da cromatina, incluindo aneuploidia. Foram relatadas alterações na expressão de mRNAs específicos e ncRNAs reguladores, e a relação das células-tronco com as células neoplásicas constitui uma área muito ativa de pesquisa. A atividade da telomerase pode ser detectada com frequência nas células neoplásicas. Às vezes, os tumores sintetizam determinados antígenos fetais que podem ser determinados no sangue. Em muitos estudos, foram detectadas alterações nos constituintes da membrana plasmática (p. ex., alteração das cadeias de açúcar de várias glicoproteínas – das quais algumas consistem em moléculas de adesão celular – e glicolipídeos), e essas alterações podem ser importantes no que se refere à diminuição da adesão celular e à ocorrência de metástases. Várias moléculas são liberadas a partir das células cancerosas, em forma solúvel ou sob formas vesiculares ligadas à membrana, e podem ser detectadas no sangue ou no líquido extracelular; elas incluem metabólitos, lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Alguns tumores liberam fatores angiogênicos e várias proteinases. Foram observadas muitas alterações do metabolismo; por exemplo, as células cancerosas frequentemente apresentam elevada taxa de glicólise aeróbia. (CAM, molécula de adesão celular; MEC, matriz extracelular.)

influências pode variar de acordo com os tipos celulares envolvidos, com as interações intercelulares e com a presença de fatores, como sinais parácrinos, hipóxia local e respostas pró-inflamatórias. A carcinogênese é, portanto, **um processo de passos múltiplos**, transformando, por fim, células normais em malignas. Portanto, em geral os tumores podem levar de apenas alguns anos até décadas para se desenvolver a níveis macroscópicos.

CAUSAS DA LESÃO GENÉTICA

A lesão genética pode ser causada por mutações adquiridas ou herdadas. As primeiras ocorrem em consequência da exposição a carcinógenos ambientais, ao passo que as últimas são hereditárias. As anormalidades hereditárias resultam em diversas **condições familiares** que predisõem ao desenvolvimento de câncer hereditário. Essas mutações são encontradas em genes específicos (p. ex., genes supressores de tumor; genes de reparo do DNA, etc.) presentes nas células germinativas, os quais serão discutidos posteriormente.

As **mutações espontâneas**, algumas das quais podem predispor ao câncer, ocorrem com frequência de aproximadamente 10^{-7} a 10^{-6} por célula por geração. Essa taxa é maior em tecidos que apresentam alta taxa de proliferação, uma dinâmica que pode aumentar a geração de células cancerosas a partir das células parentais afetadas. O **estresse oxidativo** (ver Capítulo 45), gerado pela produção de quantidade aumentada de espécies reativas de oxigênio, pode ser um fator no aumento da taxa de mutações em nível molecular.

A ENERGIA RADIANTE, OS PRODUTOS QUÍMICOS E ALGUNS VÍRUS CONSTITUEM AS PRINCIPAIS CAUSAS CONHECIDAS DE CÂNCER

Em geral, existem três classes de carcinógenos cuja exposição leva à formação de tumores: **energia radiante, produtos químicos e determinados vírus oncogênicos** (ver Figura 56-3). As duas primeiras classes causam mutações no DNA, ao passo que a terceira geralmente atua por meio da introdução de novos genes em células normais.

A seguir, são descritos, de modo sucinto, como a energia radiante, os produtos químicos e os vírus oncogênicos causam câncer.

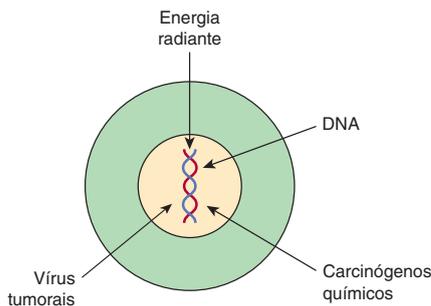


FIGURA 56-3 A energia radiante, os carcinógenos químicos e determinados vírus podem causar câncer por lesão do DNA cromossômico.

TABELA 56-1 Alguns tipos de lesão do DNA causados pela energia radiante

A energia radiante pode ser carcinogênica

Os **raios ultravioleta**, os **raios X** e os **raios γ** são mutagênicos e carcinogênicos. Estudos aprofundados mostraram que esses agentes podem danificar o DNA de diversas maneiras, incluindo as lesões listadas na **Tabela 56-1** (ver também Figura 35-22). Acredita-se que as mutações no DNA, devido a esse tipo de lesão, constituam o mecanismo básico da carcinogenicidade causada pela energia radiante, embora as vias exatas ainda estejam em fase de investigação. Além disso, os raios X e os raios γ podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são mutagênicas e provavelmente contribuem para os efeitos carcinogênicos da energia radiante.

A exposição à radiação ultravioleta é comum devido à exposição à luz solar, que constitui a sua principal fonte. Existem várias evidências mostrando que essa radiação está ligada ao câncer de pele. O risco de desenvolver câncer de pele devido à radiação ultravioleta aumenta com a frequência e a intensidade crescentes de exposição e a diminuição do conteúdo de melanina da pele.

Como detalhado no Capítulo 35, a lesão do DNA produzida por agentes ambientais é geralmente removida por mecanismos de reparo do DNA. Portanto, não é surpreendente o fato de que, dependendo da natureza mutagênica da lesão do DNA, indivíduos que possuem incapacidade hereditária para reparar o DNA apresentem risco aumentado de desenvolver malignidade (ver Tabela 35-9; ver Capítulo 57).

Muitos produtos químicos são carcinogênicos

Uma grande variedade de compostos químicos é carcinogênica (ver **Tabela 56-2** e **Figura 56-4**). Estima-se que talvez **80%** dos cânceres humanos sejam causados por fatores ambientais, principalmente produtos químicos.

Foram realizados amplos estudos no campo da carcinogênese química. Em geral, acredita-se que a maioria dos **carcinógenos**

TABELA 56-2 Alguns carcinógenos químicos

Classe	Composto
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Benzo[a]pireno, dimetilbenzantraceno
Aminas aromáticas	2-Acetilaminofluoreno, N-metil-4-aminoazobenzeno (MAB)
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina, dietilnitrosamina
Vários fármacos	Agentes alquilantes (p. ex., ciclofosfamida), dietilestilbestrol
Compostos de ocorrência natural	Dactinomicina, aflatoxina B ₁

Nota: conforme listado, alguns fármacos utilizados como agentes quimioterápicos (p. ex., ciclofosfamida) podem ser carcinogênicos. O dietilestilbestrol era antigamente ingerido por mulheres como agente estrogênico; caso estivessem grávidas, algumas de suas filhas desenvolveriam câncer vaginal.

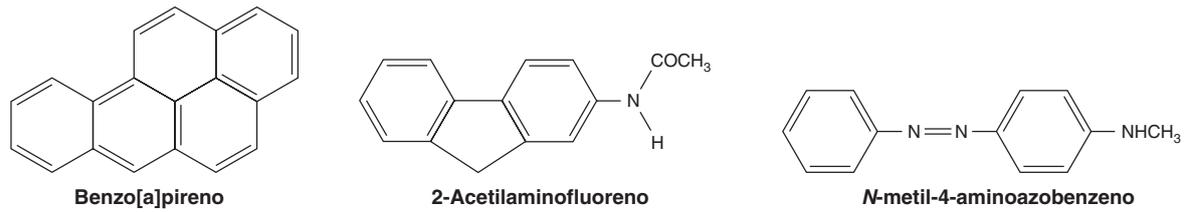


FIGURA 56-4 Estruturas de três carcinógenos químicos de amplo uso experimental.

químicos sejam DNAs modificados de forma covalente, formando uma ampla variedade de **adutos nucleotídicos**. Dependendo do grau de dano ao DNA e de seu reparo por sistemas de reparo do DNA (ver Capítulo 35), pode ocorrer uma variedade de mutações do DNA em consequência da exposição de um animal ou um ser humano a carcinógenos químicos, e algumas dessas mutações contribuem para o desenvolvimento de câncer.

Alguns compostos químicos interagem diretamente com o DNA (p. ex., mecloretamina e β -propiolactona), ao passo que **outros, chamados de pró-carcinógenos**, exigem a sua conversão por ação enzimática para transformar-se em **carcinógenos finais** (Figura 56-5). Os carcinógenos finais são, em sua maioria, **eletrófilos** (moléculas deficientes em elétrons) e atacam prontamente os grupos nucleofílicos (ricos em elétrons) do DNA. A conversão de compostos químicos em carcinógenos finais resulta, principalmente, das ações de várias espécies de **citocromo P450** localizadas no retículo endoplasmático (RE) (ver Capítulo 53). Esse fato é utilizado no ensaio de Ames (ver adiante), em que uma fração do sobrenadante pós-mitochondrial (contendo RE) é acrescentada ao sistema de ensaio como fonte de enzimas do citocromo P450.

A carcinogênese química compreende duas fases – a iniciação e a promoção. A iniciação refere-se ao estágio em que a exposição a determinado composto químico provoca lesão irreversível do DNA, e essa fase constitui um evento inicial necessário para que uma célula se torne cancerosa. A promoção compreende o estágio em que uma célula iniciada começa a crescer e proliferar-se anormalmente. O efeito cumulativo desses estágios é uma neoplasia.

Os carcinógenos químicos podem ser identificados por testes de sua capacidade para induzir mutações. Uma maneira simples de efetuar essa triagem consiste no uso do **ensaio de Ames** (Figura 56-6). Esse teste relativamente simples, que detecta mutações em *Salmonella typhimurium* causadas por substâncias químicas, demonstrou ser muito valioso para propósitos de triagem. Um aperfeiçoamento do teste de Ames consiste em acrescentar uma alíquota de RE de mamíferos ao ensaio para possibilitar a identificação de pró-carcinógenos. Pouquíssimos compostos, se houver algum, que foram negativos no teste de Ames demonstraram causar tumores em animais. Todavia, o ensaio

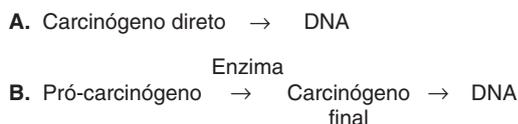


FIGURA 56-5 Carcinógenos (A) diretos e (B) indiretos. Os carcinógenos diretos podem interagir com o DNA sem ativação enzimática prévia. Os carcinógenos indiretos são ativados por uma enzima (p. ex., uma espécie do citocromo P450) em carcinógenos finais que, em seguida, interagem com o DNA.

em animais é necessário para demonstrar, de modo inequívoco, que determinada substância química é carcinogênica.

Convém assinalar que os compostos que alteram fatores epigenéticos (como a metilação do DNA e/ou modificações pós-traducionais da histona; ver Capítulo 38) que poderão predispor ao câncer não serão positivos no teste de Ames, uma vez que não são mutagênicos.

Cerca de 15% dos cânceres humanos podem ser causados por vírus

O estudo dos **vírus tumorais** contribuiu significativamente para a compreensão do câncer. Por exemplo, a descoberta dos oncogenes e dos genes supressores de tumor (ver adiante) emergiu de estudos de vírus oncogênicos. Foram identificados vírus tanto de DNA quanto de RNA que são capazes de causar câncer nos seres humanos (Tabela 56-3). Neste capítulo, não são descritos os detalhes de como cada um desses

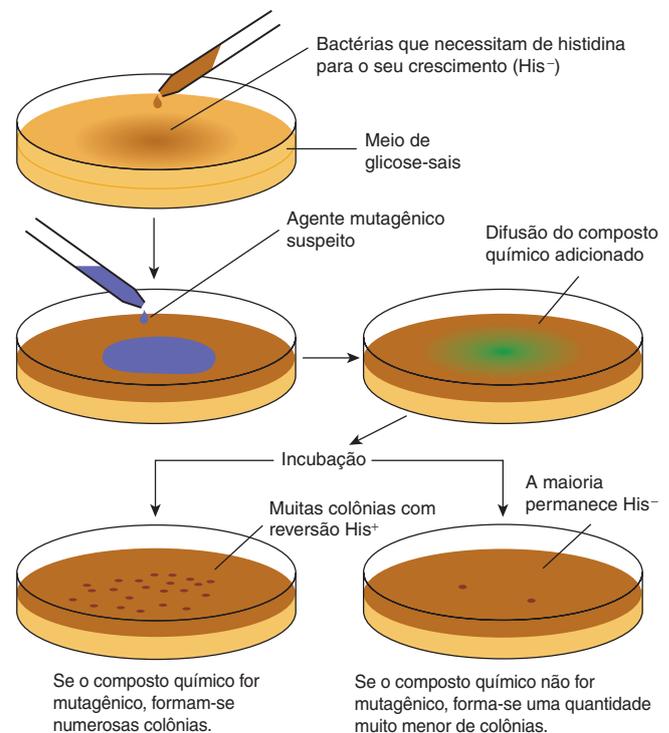


FIGURA 56-6 Teste de Ames para triagem de agentes mutagênicos. O composto químico testado aumentará a frequência de reversão de células His⁻ em células His⁺ se for um agente mutagênico e, portanto, um carcinógeno potencial. A placa de controle (não ilustrada) contém o solvente no qual o agente mutagênico suspeito está dissolvido. (Reproduzida, com permissão, de Nester EW et al.: *Microbiology: A Human Perspective*. 5th ed. McGraw-Hill, 2007.)

TABELA 56-3 Alguns vírus que causam ou que estão associados a cânceres humanos

Vírus	Genoma	Câncer
Vírus Epstein-Barr	DNA	Linfoma de Burkitt, câncer de nasofaringe, linfoma de células B
Hepatite B	DNA	Carcinoma hepatocelular
Hepatite C	RNA	Carcinoma hepatocelular
Herpes-vírus humano tipo I	DNA	Sarcoma de Kaposi
Papilomavírus humano (alguns tipos)	DNA	Câncer de colo do útero
Vírus da leucemia de células T humanas tipo 1	RNA	Leucemia de células T do adulto

Nota: estima-se que os cânceres humanos associados a vírus são responsáveis por cerca de 15% da incidência total de cânceres.

vírus provoca câncer. Em geral, o material genético dos vírus é incorporado ao genoma da célula hospedeira. No caso de vírus de RNA, isso deve ocorrer após a transcrição reversa do RNA viral em DNA viral. Essa integração do DNA viral (o denominado provírus) com o DNA do hospedeiro resulta em vários eventos, como a **desregulação do ciclo celular**, a **inibição da apoptose** e as **anormalidades das vias de sinalização**. Todos esses eventos são discutidos mais adiante neste capítulo. Os **vírus de DNA**, em geral, atuam modulando negativamente a expressão e/ou a função dos genes supressores de tumor *P53* e *RB* (ver a seguir) e de seus produtos proteicos. Os vírus de RNA frequentemente apresentam oncogenes em seus genomas; o processo pelo qual os oncogenes atuam para causar neoplasia maligna é discutido adiante.

OS ONCOGENES E OS GENES SUPRESSORES DE TUMOR DESEMPENHAM UM PAPEL FUNDAMENTAL NA ETIOLOGIA DO CÂNCER

Nos últimos 30 anos ou mais, foram realizados grandes avanços em relação à compreensão dos processos pelos quais as células cancerosas se desenvolvem e crescem. Dois achados fundamentais foram as descobertas dos **oncogenes** e dos **genes supressores de tumor**. Essas descobertas apontaram para mecanismos moleculares específicos pelos quais o crescimento e

Proto-oncogenes → Oncogenes → ↑Taxa de → → → Câncer
 crescimento
 Genes supressores de tumor → Inativados

FIGURA 56-7 Os oncogenes e a perda de atividade dos genes supressores de tumor direcionam o crescimento celular para o câncer. Os oncogenes codificam várias proteínas que podem estimular o crescimento de células cancerosas. Os oncogenes são derivados de proto-oncogenes. Os genes supressores de tumor codificam proteínas que normalmente suprimem o crescimento celular, mas que são inativadas quando alteradas por mutações. As moléculas de microRNA (não indicadas nesta figura) também são afetadas por mutações, e isso pode comprometer suas funções reguladoras normais. Além disso, alterações epigenéticas (também não indicadas aqui) afetam a expressão dos genes e, portanto, o crescimento de células cancerosas.

a divisão celular podem ser desregulados, resultando em crescimento anormal. A **Figura 56-7** fornece um resumo dos efeitos globais dos oncogenes e da perda de atividade dos genes supressores de tumor.

Os oncogenes são derivados de genes celulares denominados proto-oncogenes e codificam uma ampla variedade de proteínas que afetam o crescimento e a morte celular

Um **oncogene** pode ser definido como um gene alterado, cujo produto atua de maneira **dominante** para acelerar o crescimento celular ou a divisão da célula. Os oncogenes são gerados pela “ativação” de **proto-oncogenes** celulares normais; isto é, genes que codificam proteínas estimuladoras do crescimento. Essa ativação pode ser efetivada por meio de vários mecanismos distintos (**Tabela 56-4**).

A Tabela 56-4 mostra um exemplo de uma mutação pontual que ocorre no oncogene *RAS*. *RAS* codifica uma pequena GTPase. A perda da atividade GTPase desta proteína G leva ao estímulo crônico da atividade da adenilato-ciclase, levando à proliferação celular (lembrar que as proteínas G se tornam ativas quando complexadas ao GTP e inativas quando o GTP ligado é hidrolisado a GDP; ver Capítulo 42). Outra maneira como um oncogene pode ser ativado é via inserção de intensificador e/ou de promotor forte a montante da região codificadora da proteína, levando ao aumento da transcrição e, portanto, à expressão da proteína do gene cognato. A **Figura 56-8A** evidencia um exemplo no qual a integração de um intensificador/promotor de um provírus retroviral (i.e., a cópia do DNA gerado pela transcriptase reversa do genoma de RNA de um vírus tumoral como o vírus do sarcoma de Rous) ativa *MYC*, um gene do hospedeiro vizinho. A superprodução do fator de transcrição *myc* ativa a transcrição de genes reguladores do ciclo celular e, portanto, estimula a proliferação celular. As **translocações cromossômicas** são encontradas com muita frequência nas células cancerosas; literalmente, centenas

TABELA 56-4 Mecanismos de ativação dos oncogenes

Mecanismo	Explicação
Mutação	Um exemplo clássico é a mutação pontual do oncogene <i>RAS</i> . Essa mutação resulta no produto gênico, uma GTPase pequena, que tem menor atividade nos tumores e na estimulação resultante da atividade da adenilato-ciclase
Inserção de promotor	A inserção de uma região promotora viral próxima a um gene resulta em sua ativação
Inserção de intensificador	A inserção de uma região intensificadora viral próxima a um gene resulta em sua ativação
Translocação cromossômica	A base consiste na ruptura de um segmento de um cromossomo e sua junção a outro. Os exemplos clássicos desse mecanismo são observados no linfoma de Burkitt (ver Figura 56-8) e no cromossomo Filadélfia (ver Glossário, no fim deste capítulo)
Amplificação gênica ^a	Ocorre multiplicação anormal de um gene, resultando em muitas cópias. Esse mecanismo pode ocorrer nos oncogenes, bem como em genes envolvidos na resistência tumoral a fármacos

^aA amplificação gênica pode ser reconhecida como regiões de coloração homogênea nos cromossomos ou como cromossomos duplos diminutos.

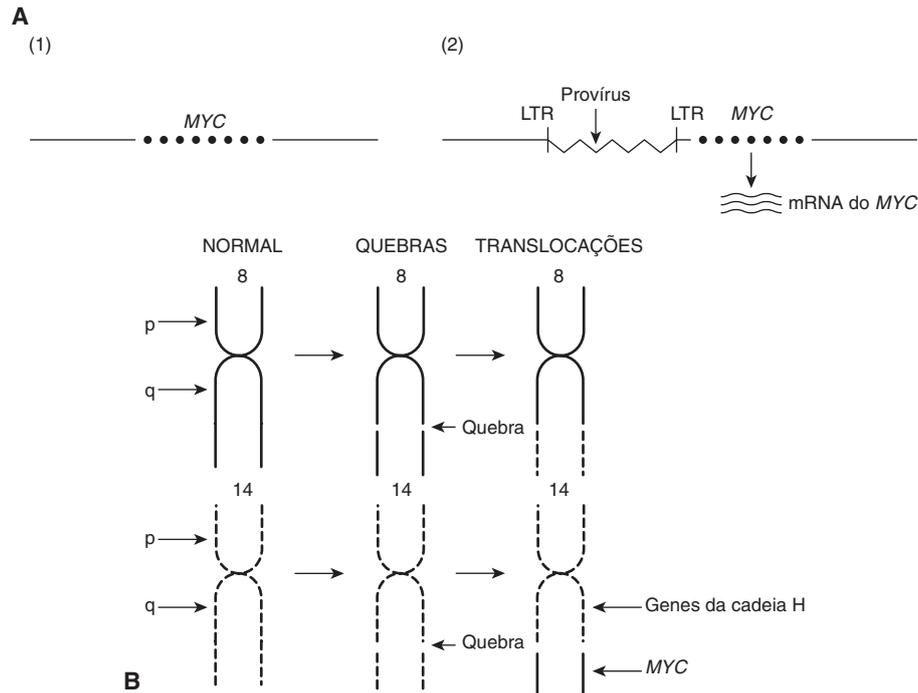


FIGURA 56-8 (A) Representação esquemática de como a inserção de um promotor pode ativar um proto-oncogene. (1) Cromossomo normal de galinha, mostrando um gene *MYC* inativo. (2) Um vírus de leucemia aviária foi integrado no cromossomo em sua forma proviral (uma cópia de DNA de seu genoma de RNA) adjacente ao gene *MYC*. A sua longa repetição terminal (LTR) à direita, que contém um promotor potente (ver Capítulo 36), localiza-se a montante do gene *MYC*, ativando-o e resultando na transcrição do mRNA de *MYC*. Para simplificar, apenas uma fita de DNA está ilustrada, e outros detalhes foram omitidos. A inserção do intensificador atua de modo semelhante, exceto pelo fato de o local de integração poder ser distal ou consideravelmente proximal e não poder atuar como promotor. Em vez disso, uma sequência proviral específica atua como elemento intensificador (ver Capítulo 36), resultando em ativação do gene *MYC* e sua transcrição. **(B) Representação esquemática da translocação recíproca envolvida no linfoma de Burkitt.** Os cromossomos envolvidos são o 8 e o 14. Um segmento da extremidade do braço q do cromossomo 8 sofre ruptura e passa para o cromossomo 14. O processo inverso transfere um pequeno segmento do braço q do cromossomo 14 para o cromossomo 8. O gene *MYC* está contido em um pequeno segmento do cromossomo 8 que foi transferido para o cromossomo 14; está, portanto, localizado próximo a genes que transcrevem as cadeias pesadas de moléculas de imunoglobulinas, e ele próprio torna-se ativado. Foram identificadas muitas outras translocações, dentre as quais a mais conhecida talvez seja a envolvida na formação do cromossomo Filadélfia (ver Glossário, no fim deste capítulo).

de exemplos diferentes foram documentados. A translocação encontrada nos casos de linfoma de Burkitt está ilustrada na **Figura 56-8B**. O efeito global dessa translocação também consiste na ativação da expressão do gene *MYC*, resultando em proliferação celular mais uma vez. Outro mecanismo de ativação dos oncogenes consiste na **amplificação gênica** (ver Capítulo 38), um processo de ocorrência muito comum em diversos tipos de câncer. Nesse caso, são formadas múltiplas cópias de um oncogene, o que leva ao aumento na produção de uma proteína promotora do crescimento.

Os oncogenes ativados promovem câncer por uma variedade de mecanismos como os mostrados na **Figura 56-9**. Os produtos proteicos de oncogenes ativados afetam as vias de sinalização celular, onde podem atuar como fator de crescimento, receptor do fator de crescimento, proteína G ou molécula de sinalização situada a jusante. Outras oncoproteínas atuam por meio da alteração da transcrição ou da desregulação do ciclo celular. Outras oncoproteínas, ainda, afetam as interações célula a célula ou o processo de apoptose. Coletivamente, esses mecanismos ajudam a explicar muitas das principais características das células cancerosas apresentadas na **Figura 56-1**, como seu potencial ilimitado de replicação, suas

vias de sinalização constitutivamente ativadas, sua capacidade de invasão e disseminação, e seu escape da apoptose.

Alguns **vírus tumorais** (p. ex., retrovírus, papovavírus) **contêm oncogenes**. O estudo desses vírus tumorais (p. ex., o vírus do sarcoma de Rous [RSV], um retrovírus) revelou pela primeira vez a existência de oncogenes. Estudos posteriores mostraram que muitos oncogenes retrovirais foram derivados de genes celulares normais, os chamados proto-oncogenes, que os vírus tumorais haviam captado durante a sua passagem pelas células hospedeiras.

Os genes supressores de tumor atuam para inibir o crescimento e a divisão celulares

Um **gene supressor de tumor** produz um produto proteico, que normalmente suprime o crescimento das células ou a divisão celular. Quando esse gene é alterado por alguma mutação, o efeito inibidor de seu produto é perdido ou diminuído. Essa perda de função do gene supressor de tumor leva ao aumento do crescimento e da divisão celulares. Conforme inicialmente sugerido por A.G. Knudson, com base em estudos da herança dos retinoblastomas, ambas as cópias de um gene supressor

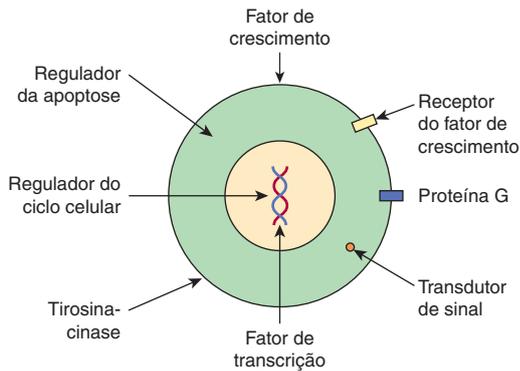


FIGURA 56-9 Exemplos de vias pelas quais as oncoproteínas atuam. São mostrados exemplos de diversas proteínas codificadas por oncogenes (oncoproteínas). As proteínas estão relacionadas a seguir, com o oncogene correspondente entre parênteses, juntamente com o número OMIM. Fator de crescimento, o fator de crescimento dos fibroblastos 3 (*INT2*, 164950); receptor de fator de crescimento, o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (*HER1*, 131550); proteína G (*H-RAS-1*, 190020); transdutor de sinais (*BRAF*, 164757); fator de transcrição (*MYC*, 190080); tirosina-cinase envolvida na adesão entre células (*SRC*, 190090); regulador do ciclo celular (*PRAD*, 168461); regulador da apoptose (*BCL2*, 151430).

de tumor precisam ser afetadas para perder seus efeitos inibidores sobre o crescimento (i.e., um alelo mutado de perda de função, *rb⁻*, é recessivo em relação a uma cópia do gene *RB* tipo selvagem).

Foi feita uma distinção útil entre as funções de **guardião** e de **manutenção** dos genes supressores de tumor. Os genes com função de guardião (produtos) controlam a proliferação celular e incluem principalmente genes que atuam para regular o ciclo celular e a apoptose. Por outro lado, os produtos dos genes de manutenção estão relacionados com a preservação da integridade do genoma e incluem genes cujos produtos estão envolvidos no reconhecimento e na correção da lesão do DNA e na manutenção da integridade cromossômica durante a divisão celular. Atualmente, têm sido identificados muitos oncogenes e genes supressores de tumor; apenas alguns são mencionados aqui. A **Tabela 56-5** apresenta as diferenças mais importantes entre os oncogenes e os genes supressores de tumor. A **Tabela 56-6** lista algumas das propriedades de dois dos oncogenes mais intensamente estudados (*MYC* e *RAS*) e de dois dos genes supressores de tumor (*P53* e *RB*) mais estudados.

TABELA 56-5 Algumas diferenças entre oncogenes e genes supressores de tumor

Oncogenes	Genes supressores de tumor
A ocorrência de mutação em um dos dois alelos é suficiente	Ambos os alelos precisam estar afetados
Ganho de função de uma proteína que sinaliza a divisão celular	Perda da função de uma proteína
A mutação surge em células somáticas, não é herdada	A mutação está presente em células germinativas (pode ser herdada) ou em células somáticas
Alguma preferência tecidual	Preferência tecidual frequentemente acentuada (p. ex., efeito do gene <i>RB</i> na retina)

Fonte: dados de Levine AJ: The p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1992;326:1350.

TABELA 56-6 Algumas propriedades de oncogenes e genes supressores de tumor importantes

Nome	Propriedades
<i>MYC</i>	Oncogene (OMIM 190080) que codifica um fator de transcrição de ligação ao DNA, p53, que pode alterar a transcrição. Envolvido no crescimento celular, na progressão do ciclo celular e na replicação do DNA. Sofre mutação em uma variedade de tumores
<i>P53</i>	Gene supressor de tumor (OMIM 191170) que responde a uma variedade de estresses celulares. Esse gene induz parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA e está envolvido em alguns aspectos da regulação do metabolismo celular. Ele foi denominado “o guardião do genoma”. Sofre mutação em cerca de 50% dos tumores humanos. A nomenclatura p53 refere-se à massa molecular aproximada da proteína codificada por <i>P53</i> , calculada a partir do SDS-PAGE
<i>RAS</i>	Família de oncogenes que codificam GTPases pequenas. Foram inicialmente identificados como genes transformadores de determinados vírus do sarcoma murino. Os membros importantes da família são K-RAS (Kirsten), H-RAS (Harvey) (OMIM 190020) e N-RAS (neuroblastoma). A ativação persistente desses genes em decorrência de mutações contribui para o desenvolvimento de uma variedade de cânceres
<i>RB</i>	Gene supressor de tumor (OMIM 180200) que codifica a proteína RB. RB regula o ciclo celular pela sua ligação ao fator de alongamento E2F. Reprime a transcrição de vários genes envolvidos na fase S do ciclo. A mutação do gene <i>RB</i> constitui a causa do retinoblastoma, mas também está envolvida na gênese de alguns outros tumores (ver Capítulo 35)

Os miRNAs desempenham um importante papel na carcinogênese e na metástase de tumores

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA de fita simples que podem regular a transcrição e/ou tradução de genes que codificam proteínas (ver Capítulo 34 para detalhes). Atualmente, sabe-se que desempenham múltiplos papéis em cada aspecto da formação e da progressão de tumores. Alguns miRNAs são supressores de tumor e podem atuar degradando o código do RNA para proteínas oncogênicas, reduzindo, assim, sua expressão. Esses miRNAs estão negativamente modulados em diversos tipos diferentes de câncer. Por outro lado, alguns miRNAs são de natureza oncogênica. Por exemplo, tem sido observado que o miR-21, um dos miRNAs oncogênicos mais amplamente estudados, apresenta vários graus de modulação positiva em quase todos os tipos de câncer. Outros miRNAs desempenham papéis importantes na ativação ou na inibição da metástase. O desenvolvimento de fármacos que têm como alvo o miRNA tem sido o foco das pesquisas mais recentes.

Os estudos sobre o desenvolvimento dos cânceres colorretais elucidaram a participação de oncogenes e genes supressores de tumor específicos

Muitos tipos de tumores têm sido analisados quanto à presença de alterações genéticas. Uma das áreas mais produtivas nesse aspecto tem sido a análise do **desenvolvimento do câncer colorretal** por Vogelstein e colaboradores. As suas

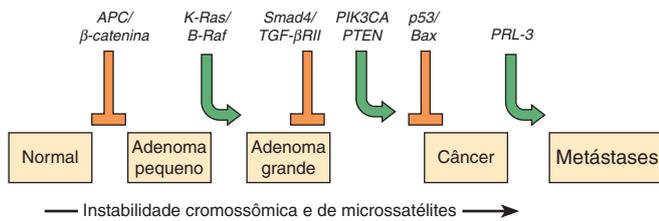


FIGURA 56-10 Alterações genéticas em múltiplas etapas associadas ao desenvolvimento do câncer colorretal. A ocorrência de mutações no gene *APC* inicia a formação de adenomas. A figura mostra uma sequência de mutações de um oncogene e de vários genes supressores de tumor que podem resultar em progressão subsequente, com desenvolvimento de grandes adenomas e câncer. Os pacientes com polipose adenomatosa familiar (OMIM 175100) herdam mutações do gene *APC* e desenvolvem numerosos focos de criptas aberrantes (ACFs) displásicas, alguns dos quais progridem à medida que adquirem as outras mutações assinaladas na figura. Os tumores de pacientes com câncer colorretal não poliposo hereditário (OMIM 120435) sofrem uma série semelhante, embora não idêntica, de mutações; a ocorrência de mutações no sistema de reparo de malpareamento (ver Capítulo 35) acelera esse processo. O *K-RAS* é um oncogene, e os outros genes específicos indicados consistem em genes supressores de tumor. A sequência de eventos apresentada nesta figura não é invariável no desenvolvimento de todos os cânceres colorretais. Foi descrita uma variedade de outras alterações genéticas em uma pequena fração de cânceres colorretais avançados. Elas podem ser responsáveis pela heterogeneidade das propriedades biológicas e clínicas observadas entre diferentes casos. Ocorrem instabilidade cromossômica e instabilidade dos microssatélites (ver Capítulo 35) em muitos tumores, provavelmente envolvendo mutações em um número considerável de genes. (Reproduzida, com permissão, de Bunz F, Kinzler KW, Vogelstein B: Colorectal tumors, Figura 48-2, The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, www.ommbid.com.)

pesquisas, bem como as de outros, mostraram a participação de vários oncogenes e genes supressores de tumor no desenvolvimento do câncer humano. (O Caso 4, no Capítulo 57, descreve a história de um paciente com câncer colorretal.) Esses pesquisadores analisaram diversos oncogenes, genes supressores de tumor e alguns outros genes relevantes em amostras de **epitélio colônico normal**, de **epitélio displásico** (uma condição pré-neoplásica, caracterizada pelo desenvolvimento anormal do epitélio), de vários estágios de **pólipos adenomatosos** e de **adenocarcinomas**. Alguns de seus principais achados estão resumidos na **Figura 56-10**, na qual se pode constatar que determinados genes sofreram mutação em estágios relativamente específicos da sequência total ilustrada. As funções dos vários genes identificados estão listadas na **Tabela 56-7**. A sequência global de alterações pode variar ligeiramente daquela demonstrada, e outros genes também podem estar envolvidos. Estudos semelhantes foram realizados com vários outros tumores humanos, revelando padrões um tanto diferentes de ativação de oncogenes e mutações dos genes supressores de tumor. Outras mutações nesses genes, bem como em outros genes, estão envolvidas na **progressão do tumor**, um fenômeno pelo qual clones de células tumorais são selecionados para uma rápida taxa de crescimento e capacidade de sofrer metástase. Assim, um tumor relativamente grande pode conter uma variedade de células com genótipos diferentes, tornando mais difícil o tratamento bem-sucedido. Por fim, é importante reconhecer que o microambiente tumoral

TABELA 56-7 Alguns genes associados à carcinogênese colorretal

Gene ^a	Ação da proteína codificada
<i>APC</i> (OMIM 611731)	Antagoniza a sinalização de WNT ^b ; quando sofre mutação, ocorre intensificação da sinalização de WNT, estimulando o crescimento celular
β - <i>CATENINA</i> (OMIM 116806)	Codifica a β -catenina, uma proteína presente nas junções de adesão, que são importantes para a integridade dos tecidos epiteliais
<i>K-RAS</i> (OMIM 601599)	Envolvido na sinalização da tirosina-cinase
<i>BRAF</i> (OMIM 164757)	Serina/treonina-cinase
<i>SMAD4</i> (OMIM 600993)	Afeta a sinalização pelo fator de transformação do crescimento β (TGF- β)
<i>TGF-βRII</i>	Atua como receptor do TGF- β ^c
<i>PI3KCA</i> (OMIM 171834)	Atua como subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-cinase
<i>PTEN</i> (OMIM 601728)	Uma proteína tirosina-fosfatase com região de homologia da tensina, uma proteína que interage com filamentos de actina em adesões focais
<i>P53</i> (OMIM 191170)	O produto, p53, é induzido na resposta à lesão do DNA e também é fator de transcrição para muitos genes envolvidos na divisão celular (ver Capítulo 35 e Tabela 56-10)
<i>BAX</i> (OMIM 600040)	Atua para induzir a morte celular (apoptose)
<i>PRL3</i> (OMIM 606449)	Proteína tirosina-fosfatase

Abreviações: *APC*, gene da polipose adenomatosa do colo; *BAX*, codifica a proteína X associada a BCL2 (BCL2 é um repressor da apoptose); *BRAF*, homólogo humano de um proto-oncogene aviário; *K-RAS*, gene associado a Kirsten-Ras; *PI3KCA*, codifica a subunidade catalítica da fosfatidilinositol-3-cinase; *PRL3*, codifica uma proteína tirosina-fosfatase com homologia da PRL1, outra proteína tirosina-fosfatase encontrada no fígado em regeneração; *PTEN*, codifica uma proteína tirosina fosfatase e um homólogo da tensina; *P53*, codifica p53, um polipeptídeo com massa molecular de cerca de 53 kDa; *SMAD4*, o homólogo de um gene encontrado em *Drosophila*.

^a*K-RAS* e *BRAF* são oncogenes; os outros genes listados são genes supressores de tumor ou genes cujos produtos estão associados às ações dos produtos dos genes supressores de tumor.

^bA família WNT de glicoproteínas secretadas está envolvida em uma variedade de processos de desenvolvimento. A tensina é uma proteína que interage com filamentos de actina em adesões focais.

^cTGF- β é um polipeptídeo (um fator de crescimento) que regula a proliferação e a diferenciação de muitos tipos celulares.

Nota: os vários genes listados são oncogenes, genes supressores de tumor ou genes cujos produtos estão estreitamente associados aos produtos desses dois tipos de genes. Os efeitos cumulativos das mutações dos genes listados consistem em estimular a proliferação das células epiteliais do colo, que acabam se tornando cancerosas. Isso é conseguido principalmente por meio de efeitos exercidos em diversas vias de sinalização que afetam a proliferação celular. Outros genes e proteínas não listados aqui também estão envolvidos. Esta tabela e a Figura 56-10 mostram claramente a importância do conhecimento detalhado da sinalização celular para a compreensão da gênese do câncer.

também contribui para esses processos, embora seu papel exato no câncer colorretal (e em outros tipos de câncer bastante estudados) ainda precise ser elucidado.

Várias outras conclusões podem ser obtidas a partir desses resultados e dos de outros estudos semelhantes. Em primeiro lugar, o câncer é verdadeiramente uma doença genética, porém em sentido ligeiramente diferente do significado normal da expressão, na medida em que muitas das alterações gênicas são causadas por mutações somáticas. Em segundo lugar, a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. Estima-se que, na maioria dos casos, é necessária a ocorrência de mutação de no mínimo 5 a 6 genes para que ocorra câncer.

Em terceiro lugar, acredita-se que mutações adicionais subsequentes possam conferir vantagem seletiva sobre os clones de células, alguns dos quais adquirem a capacidade de sofrer metástase com sucesso (ver adiante). Por fim, muitos dos genes implicados na carcinogênese do câncer colorretal e de outros tipos de câncer estão envolvidos em eventos de sinalização celular, mostrando mais uma vez o papel central que as alterações da sinalização desempenham no desenvolvimento do câncer.

OS FATORES DE CRESCIMENTO E AS ANORMALIDADES DE SEUS RECEPTORES E VIAS DE SINALIZAÇÃO DESEMPENHAM PAPÉIS IMPORTANTES NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

Existem muitos fatores de crescimento

Foi identificada uma grande variedade de fatores de crescimento polipeptídicos que atua nos tecidos e nas células dos seres humanos. Alguns desses fatores estão listados na **Tabela 56-8**. A seguir, o foco principal será a sua relação com o câncer.

Os fatores de crescimento podem atuar de forma **endócrina**, **parácrina** ou **autócrina** e estimular ampla variedade de células a produzirem **resposta mitogênica**. Conforme descrito anteriormente (Capítulo 53), os fatores de crescimento desempenham um importante papel na diferenciação das células hematopoiéticas.

Existem também **fatores inibidores do crescimento**. Por exemplo, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) exerce efeitos inibidores sobre o crescimento de determinadas células. Portanto, a exposição crônica a quantidades aumentadas de um fator de crescimento ou a quantidades diminuídas de um fator inibidor do crescimento pode alterar o equilíbrio do crescimento celular.

TABELA 56-8 Alguns fatores de crescimento polipeptídicos

Fator de crescimento	Funções
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Estimula o crescimento de numerosas células epidérmicas e epiteliais
Eritropoietina (EPO)	Regula o desenvolvimento das células eritropoiéticas no estágio inicial
Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs)	Promovem a proliferação de muitas células diferentes
Interleucinas	Exercem uma variedade de efeitos sobre as células do sistema imune
Fator de crescimento neuronal (NGF)	Efeito trófico sobre determinados neurônios
Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)	Estimula o crescimento das células mesenquimais e gliais
Fator de transformação do crescimento alfa (TGF- α)	Semelhante ao EGF
Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)	Exerce efeitos estimuladores e inibidores sobre determinadas células

Nota: foram identificados muitos outros fatores de crescimento. Os fatores de crescimento podem ser produzidos por uma variedade de células ou podem ter principalmente uma fonte de produção. Atualmente, muitas interleucinas diferentes têm sido isoladas; juntamente com os interferons e algumas outras proteínas/polipeptídeos, são designadas como citocinas.

Os fatores de crescimento atuam via receptores específicos e sinalização transmembrana para afetar as atividades de genes específicos

Os fatores de crescimento produzem seus efeitos por meio de interação com **receptores específicos** presentes nas superfícies celulares, iniciando **diversos eventos de sinalização** (Capítulo 42). Genes que codificam receptores para fatores de crescimento foram identificados e caracterizados. Em geral, apresentam segmentos curtos que atravessam a membrana de um lado a outro, bem como domínios externos e citoplasmáticos. Alguns desses receptores (p. ex., aqueles para o fator de crescimento epidérmico [EGF], para a insulina e para o fator de crescimento derivado das plaquetas [PDGF]) exibem atividade **tirosina-cinase**. A atividade de cinase, que está localizada nos domínios citoplasmáticos, provoca autofosforilação da proteína receptora e também fosforila algumas outras proteínas.

A análise do mecanismo de ação do **PDGF** ilustra como um determinado fator de crescimento produz seus efeitos. A interação do PDGF com seu receptor estimula a atividade da fosfolipase C (PLC). A PLC quebra o fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP₂) em inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (ver Figura 42-6). O aumento do IP₃ estimula a liberação do Ca²⁺ intracelular, e o DAG ativa a proteína-cinase C (PKC). A hidrólise do DAG pode liberar ácido araquidônico, o qual é capaz de estimular a produção de prostaglandinas e leucotrienos, e ambos exercem vários efeitos biológicos. A exposição de células-alvo ao PDGF pode levar à rápida ativação (de poucos minutos a 1 a 2 horas) de determinados proto-oncogenes celulares (p. ex., *MYC* e *FOS*) que participam na estimulação da mitose por meio de efeitos sobre o ciclo celular (ver adiante). O aspecto básico é o fato de os fatores de crescimento interagirem com receptores específicos para estimular vias de sinalização específicas que servem para aumentar ou diminuir as atividades de vários genes que afetam a divisão celular.

MUITOS TIPOS DE CÂNCER PODEM SER PREVENIDOS PELOS FATORES DE RISCO MODIFICÁVEIS

Os **fatores de risco modificáveis** têm sido associados a uma ampla variedade de tipos de câncer. Estima-se que é possível prevenir mais da metade de todos os cânceres nos países desenvolvidos se as medidas listadas na **Tabela 56-9** forem introduzidas em uma base populacional ampla. O **tabagismo** ainda representa uma importante causa de câncer no mundo inteiro. Nunca é demais enfatizar que a **prevenção** e a **detecção precoce do câncer** constituem a melhor abordagem para que a doença seja derrotada.

AS ANORMALIDADES DO CICLO CELULAR SÃO UBÍQUAS NAS CÉLULAS CANCEROSAS

É necessário dispor de conhecimento sobre o **ciclo celular** para compreender muitos dos mecanismos envolvidos no

TABELA 56-9 Medidas que podem prevenir aproximadamente 50% dos cânceres quando introduzidas em uma base populacional ampla

• Reduzir o uso de tabaco
• Aumentar a atividade física
• Controlar o peso
• Melhorar a dieta
• Limitar o consumo de álcool
• Adotar práticas sexuais mais seguras
• Efetuar testes de triagem de rotina para câncer
• Evitar a exposição excessiva ao sol

Fonte: dados de Stein CJ, Colditz GA: Modifiable risk factors for cancer. *Brit J Cancer* 2004;90:299.

desenvolvimento do câncer. Esse conhecimento é também importante devido ao fato de muitos fármacos antineoplásicos só atuarem contra células que estão em divisão ou que se encontram em determinada fase do ciclo.

Os aspectos básicos do ciclo celular foram descritos no Capítulo 35. Conforme ilustrado na Figura 35-20, o ciclo tem quatro fases: G_1 , S, G_2 e M. Se as células não estiverem no ciclo, elas estão na fase G_0 e são denominadas quiescentes. Elas podem ser recrutadas para o ciclo a partir da fase G_0 por várias influências (p. ex., determinados fatores de crescimento). O tempo de geração é o tempo necessário para que uma célula na fase G_0 entre no ciclo e produza duas células-filhas. As células de um câncer geralmente possuem menor tempo de geração do que as células normais, e são encontradas em menor quantidade na fase G_0 .

Os papéis de várias **ciclina**s, **cinases dependentes de ciclina**s (CDKs) e de várias outras moléculas importantes que afetam o ciclo celular (p. ex., os genes *RB* e *P53*) também estão descritos no Capítulo 35. Os pontos no ciclo em que algumas dessas moléculas atuam estão indicados na Figura 35-21 e na Tabela 35-7.

Como uma das principais propriedades das células cancerosas consiste em seu crescimento descontrolado, muitos aspectos de seu ciclo celular foram estudados detalhadamente. Apenas alguns dos resultados podem ser mencionados aqui. Foram descritas diversas mutações que afetam as ciclina

s e as CDKs. Muitos produtos dos proto-oncogenes e dos genes supressores de tumor desempenham importantes papéis na regulação do ciclo normal. Foi identificada uma ampla variedade de mutações nesses tipos de genes, incluindo *RAS*, *MYC*, *RB*, *P53* (que estão entre os mais estudados; ver adiante) e muitos outros.

Por exemplo, conforme discutido no Capítulo 35, o produto proteico do gene *RB* é um regulador do ciclo celular. Ele atua por meio da ligação ao fator de transcrição E2F, bloqueando a progressão da célula da fase G_1 para S. A perda da proteína RB devido às mutações remove, portanto, esse elemento de controle do ciclo celular.

Quando ocorre lesão do DNA (por radiação ou substâncias químicas), a proteína p53 aumenta quantitativamente e ativa a transcrição de genes que retardam o trânsito pelo ciclo celular. Se a lesão for muito grave, impossibilitando o seu reparo, a p53 ativa genes que causam apoptose (ver adiante). Se a p53 estiver ausente ou inativa devido a mutações, não ocorre apoptose, e as células com DNA lesionado persistem, tornando-se, talvez, progenitoras de células cancerosas.

A INSTABILIDADE GENÔMICA E A ANEUPLOIDIA SÃO CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DAS CÉLULAS CANCEROSAS

Conforme assinalado anteriormente, bem como mais adiante neste capítulo, as células cancerosas apresentam numerosas mutações. Uma possível explicação para a sua **instabilidade genômica** é que elas apresentam **um fenótipo mutador**. A ideia dos fenótipos mutadores foi originalmente postulada por Loeb e colaboradores, que argumentavam ser causados pelo fato de as células cancerosas terem adquirido mutações em genes envolvidos na replicação do DNA e no reparo do DNA, possibilitando o acúmulo de mutações. Posteriormente, esse conceito foi ampliado para incluir mutações que afetam a segregação dos cromossomos, a vigilância de dano do DNA e processos como a apoptose.

O termo instabilidade genômica é muitas vezes empregado para referir-se a duas anormalidades apresentadas por numerosas células cancerosas: a **instabilidade dos microssatélites** e a **instabilidade cromossômica (CIN)**. A **instabilidade dos microssatélites** foi descrita de forma sucinta no Capítulo 35; ela envolve a expansão ou contração de microssatélites, com frequência devido a anormalidades de reparo de pareamento desigual ou deslizamento de replicação. A CIN ocorre mais frequentemente do que a instabilidade dos microssatélites, e as duas geralmente são excludentes. A CIN refere-se ao ganho ou à perda de cromossomos causados por anormalidades da segregação dos cromossomos durante a mitose.

Outro campo de interesse em relação à CIN é a **variação no número de cópias (CNV)** (ver Glossário, no fim deste capítulo). Foram identificadas associações de diversas CNVs com muitos tipos de câncer, e o seu papel preciso no câncer está em fase de pesquisa.

Um importante aspecto da CIN é a **aneuploidia**, característica muito comum dos tumores sólidos. Ocorre aneuploidia quando o número de cromossomos de uma célula não é um múltiplo do número haploide. O grau de aneuploidia está frequentemente correlacionado com prognóstico pouco favorável. Esse fato sugeriu que as anormalidades da segregação cromossômica podem contribuir para a progressão do tumor, aumentando a diversidade genética. Alguns cientistas acreditam que a aneuploidia seja um aspecto fundamental do câncer.

Muitas pesquisas almejam determinar a base da CIN e da aneuploidia. Conforme ilustrado na **Figura 56-11**, vários

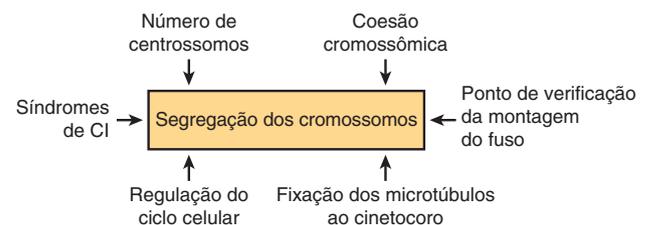


FIGURA 56-11 Fatores envolvidos na segregação cromossômica que são importantes para a compreensão da instabilidade cromossômica (CIN) e da aneuploidia. As síndromes de CIN incluem a síndrome de Bloom (OMIM 210900) e outras. (Com base em Thompson SL, et al.: Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* 2010;20(6):R285.)

processos diferentes estão envolvidos na segregação normal dos cromossomos. Cada processo é complexo e envolve várias organelas e diversas proteínas individuais. Um livro-texto de biologia celular poderá ser consultado sobre os detalhes do processo de segregação cromossômica e de divisão celular. Existem estudos em andamento para comparar esses processos nas células normais e tumorais e para determinar quais diferenças detectadas podem contribuir para a CIN e para a aneuploidia. Nessa linha de pesquisa, espera-se que seja possível desenvolver fármacos capazes de diminuir ou até mesmo impedir a CIN e a aneuploidia.

MUITAS CÉLULAS CANCEROSAS EXIBEM NÍVEIS ELEVADOS DE ATIVIDADE DA TELOMERASE

Há considerável interesse na participação dos telômeros (ver Capítulo 35) em diversas doenças, bem como no processo de envelhecimento. No que diz respeito ao câncer, quando as células tumorais se dividem rapidamente, muitas vezes ocorre encurtamento de seus telômeros. Esses telômeros (em geral, detectados nos leucócitos, em virtude de sua facilidade de obtenção) foram implicados como fator de risco para muitos tumores sólidos (p. ex., câncer de mama). Os **telômeros curtos** parecem ter valor preditivo referente à progressão de doenças inflamatórias crônicas (como colite ulcerativa e esôfago de Barrett) para o câncer. A ocorrência de anormalidades na estrutura e na função dos telômeros pode contribuir para a CIN (ver anteriormente). A atividade da **telomerase**, a principal enzima envolvida na síntese dos telômeros, muitas vezes está elevada nas células cancerosas, proporcionando um mecanismo para superar o encurtamento dos telômeros. Inibidores seletivos da telomerase foram considerados como possíveis fármacos para o tratamento do câncer, porém essa possibilidade ainda não se manifestou em uso clínico bem-sucedido.

DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER APRESENTAM PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA

Há muitos anos, sabe-se que determinados tipos de câncer têm base hereditária. Estima-se que cerca de 5% dos cânceres estejam incluídos nessa categoria. A descoberta dos oncogenes e dos genes supressores de tumor possibilitou a pesquisa da base desse fenômeno. Atualmente, são reconhecidos muitos tipos hereditários de câncer, e apenas alguns deles estão listados na **Tabela 56-10**. Em vários casos, quando há suspeita de síndrome hereditária, uma triagem genética apropriada das famílias possibilita a realização de intervenção precoce. Por exemplo, algumas mulheres jovens que herdaram um gene *BRCA1* ou *BRCA2* com mutação optaram por mastectomia profilática para evitar a ocorrência de câncer de mama posteriormente durante a vida.

O SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA E DO EXOMA DAS CÉLULAS TUMORAIS ESTÁ FORNECENDO NOVAS INFORMAÇÕES A RESPEITO DO CÂNCER

Desde a conclusão do Projeto Genoma Humano, há cerca de 10 anos, a tecnologia do sequenciamento em larga escala e a análise de bioinformática e interpretação dos dados da sequência avançaram consideravelmente. O sequenciamento do DNA em larga escala tornou-se mais rápido e mais barato. Esses avanços permitiram as análises em larga escala das sequências de DNA de muitos tipos diferentes de tumores. Essa tarefa está sendo realizada de duas formas. A primeira é por meio do sequenciamento dos genomas completos, e a segunda, pelo sequenciamento dos exomas completos (Capítulo 39) de diferentes tipos de tumores, juntamente com seus tecidos normais cognatos. Dessa

TABELA 56-10 Algumas condições hereditárias do câncer

Condição	Gene	Principal função	Principais características clínicas
Polipose adenomatosa do colo (OMIM 175100)	<i>APC</i>	Ver Tabela 56-7	Desenvolvimento de muitos pólipos adenomatosos de início precoce, os quais são precursores imediatos do câncer colorretal
Câncer de mama 1, início precoce (OMIM 113705)	<i>BRCA1</i>	Reparo do DNA	Cerca de 5% das mulheres na América do Norte com câncer de mama apresentam mutações desse gene ou do <i>BRCA2</i> ; também aumenta substancialmente o risco de câncer de ovário
Câncer de mama 2, início precoce (OMIM 600185)	<i>BRCA2</i>	Reparo do DNA	Conforme descrito para <i>BRCA1</i> ; as mutações desse gene também aumentam o risco de câncer de ovário, porém em menor grau
Câncer não polipoide hereditário tipo 1 (OMIM 120435)	<i>MSH2</i>	Reparo de malpareamento do DNA	Início precoce de câncer colorretal
Síndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623)	<i>P53</i>	Ver Tabela 56-6	Síndrome rara envolvendo cânceres em diferentes locais, desenvolvendo-se em idade precoce
Neurofibromatose tipo 1 (OMIM 162200)	<i>NF1</i>	Codifica a neurofibromina	Varia desde algumas manchas café com leite até o desenvolvimento de milhares de neurofibromas
Retinoblastoma (OMIM 180200)	<i>RB1</i>	Ver Tabela 56-6	Retinoblastoma hereditário ou esporádico ^a

^aNo retinoblastoma hereditário, ocorre mutação de um alelo na linhagem germinativa, exigindo apenas uma mutação subsequente para o desenvolvimento de tumor. No retinoblastoma esporádico, nenhum dos alelos sofre mutação ao nascimento, de modo que é necessária a ocorrência de mutações subsequentes em ambos os alelos. Também foram identificadas muitas outras condições hereditárias no câncer.

forma, **catálogos abrangentes** de tipos específicos e diversas **mutações gênicas** observadas em diferentes cânceres podem ser determinados. Por fim, essa informação revolucionará o **teste diagnóstico** e o desenvolvimento da **terapia sob medida**. Um recente estudo analisou a sequência dos cerca de 5 mil cânceres humanos em 21 tipos diferentes de tumores, juntamente com seus tecidos-controle normais. Como muito poucos genes são mutados próximos aos níveis universais como *P53*, é importante identificar os genes cancerosos mutados em menores frequências, pois ainda contribuem significativamente para a oncogênese. Sequenciando esses 5 mil pares de exomas tumorais/normais dos 21 tipos de tumores e realizando a análise estatística dos dados resultantes, foram identificados 33 genes associados ao câncer previamente desconhecidos. As proteínas codificadas por esses 33 novos genes estão relacionadas com a estabilidade do genoma, a regulação gênica epigenética/cromatina, a evasão imune, a proliferação, a apoptose, o processamento do RNA e a homeostasia proteica e os resultados consistentes com os papéis dessas proteínas na transformação maligna (Figuras 56-1 e 56-2). Uma análise estatística mais detalhada dos dados indica que a identificação quase completa dos genes cancerosos, pelo sequenciamento do exoma, poderá ser alcançada com 600 a 5 mil amostras de qualquer tipo de tumor determinado. O número absoluto de amostras analisadas dependerá da taxa de mutação intrínseca em um tipo particular de tumor – atributo que poderá variar drasticamente, conforme demonstrado em outros estudos. É particularmente interessante identificar mutações de genes que causam e aceleram cânceres; essas são conhecidas como mutações **indutoras**, ao passo que outras mutações são chamadas de **passageiras**. Espera-se que essa nova informação cause grande impacto sobre os próximos estágios da genômica do câncer e, por fim, sobre o diagnóstico e a terapia.

Outro exemplo fascinante da informação que pode ser gerada pelo sequenciamento genômico é fornecido pelos resultados de um recente estudo de carcinomas pancreáticos, os quais estão entre os cânceres mais letais. Entretanto, uma questão ainda não resolvida é se a sua letalidade se deve à sua agressividade (i.e., capacidade de crescer, invadir e sofrer metástase) ou ao diagnóstico tardio. Nesse estudo, foi efetuado o sequenciamento dos genomas de sete cânceres primários de pâncreas, e os genomas das metástases foram obtidos na necropsia. Em cada uma das metástases, foram detectadas cerca de 61 mutações conhecidas relacionadas com câncer. Utilizando-se uma técnica de “relógio molecular”, emprestada da biologia evolutiva, foi calculado o tempo que essas metástases levavam para acumular as mutações. Isso foi possível graças ao conhecimento prévio da sequência global das mutações. Segundo os cálculos, decorreram pouco mais de 10 anos desde o momento da mutação inicial até o desenvolvimento de tumores primários não metastáticos do pâncreas. Foram necessários mais 5 anos para esses tumores adquirirem o seu potencial metastático. Depois disso, cerca de 2 anos transcorreram para que os tumores sofressem metástase, levando à morte. Por conseguinte, foi sugerido que a evolução de muitos cânceres de pâncreas é um processo relativamente lento, e que esses tipos de câncer de pâncreas não são altamente agressivos. O problema reside na dificuldade de seu diagnóstico. Espera-se que alguns métodos, como a detecção de mutações em

células de câncer de pâncreas presentes em amostras de fezes, o desenvolvimento de novos biomarcadores sanguíneos para o câncer de pâncreas e, talvez, novas técnicas de imagem, possibilitem diagnóstico precoce, que constitui sempre um fator crucial no tratamento do câncer.

AS CÉLULAS NEOPLÁSICAS APRESENTAM ANORMALIDADES DA APOPTOSE QUE PROLONGAM A SUA CAPACIDADE PROLIFERATIVA

A **apoptose** é um programa geneticamente regulado que, quando ativado, **provoca morte celular**. As principais proteínas envolvidas na apoptose são enzimas proteolíticas, denominadas **caspases**, que, em geral, ocorrem como **pró-caspases** inativas. O termo caspase reflete que essas enzimas são cisteínas proteases que clivam ligações peptídicas na extremidade C-terminal de resíduos de aspartato. Foram identificadas cerca de 15 caspases humanas, embora nem todas tenham participação no processo de apoptose. Quando as caspases envolvidas na apoptose são ativadas (principalmente 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10), elas atuam em uma **cascata** de eventos (comparar com a cascata da coagulação, Capítulo 51) que, por fim, mata as células por meio da digestão de várias proteínas e outras moléculas. As **caspases a montante** (p. ex., 2, 8 e 10) ao início da cascata são geralmente chamadas de **iniciadoras**, e as que atuam a jusante no fim da via (p. ex., 3, 6 e 7) são denominadas **efetoras** ou **executoras**. A **DNase ativada por caspase (CAD)** fragmenta o DNA, produzindo um padrão característico em escada detectado por eletroforese em gel. As características microscópicas da apoptose incluem condensação da cromatina, mudanças do formato do núcleo e formação de bolhas na membrana. As células mortas são rapidamente eliminadas por atividade fagocítica, evitando a reação inflamatória.

A apoptose difere da **necrose**, uma forma patológica de morte celular não geneticamente programada. Ocorre necrose após exposição a agentes externos, como determinadas substâncias químicas e calor extremo (p. ex., queimaduras). Várias enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, nucleases, etc.) estão envolvidas na necrose. A liberação do conteúdo celular das células que estão morrendo pode causar inflamação local, ao contrário da apoptose.

O processo completo de apoptose é complexo e estritamente regulado. Ele inclui proteínas que atuam como receptores, adaptadores, pró-caspases e caspases e fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos. Existem as **vias extrínseca e intrínseca**, e as **mitocôndrias** são participantes importantes da via intrínseca.

A **Figura 56-12** apresenta um esquema muito simplificado de alguns dos principais eventos no processo de apoptose. Duas vias principais estão envolvidas: a via dos receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca).

As principais características da **via do receptor de morte** estão ilustradas no lado esquerdo da figura. Os **sinais externos** que iniciam o processo de apoptose incluem o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o ligante Fas. Foram identificados diversos receptores de morte; eles são proteínas transmembranas, algumas das quais interagem com **proteínas adaptadoras**

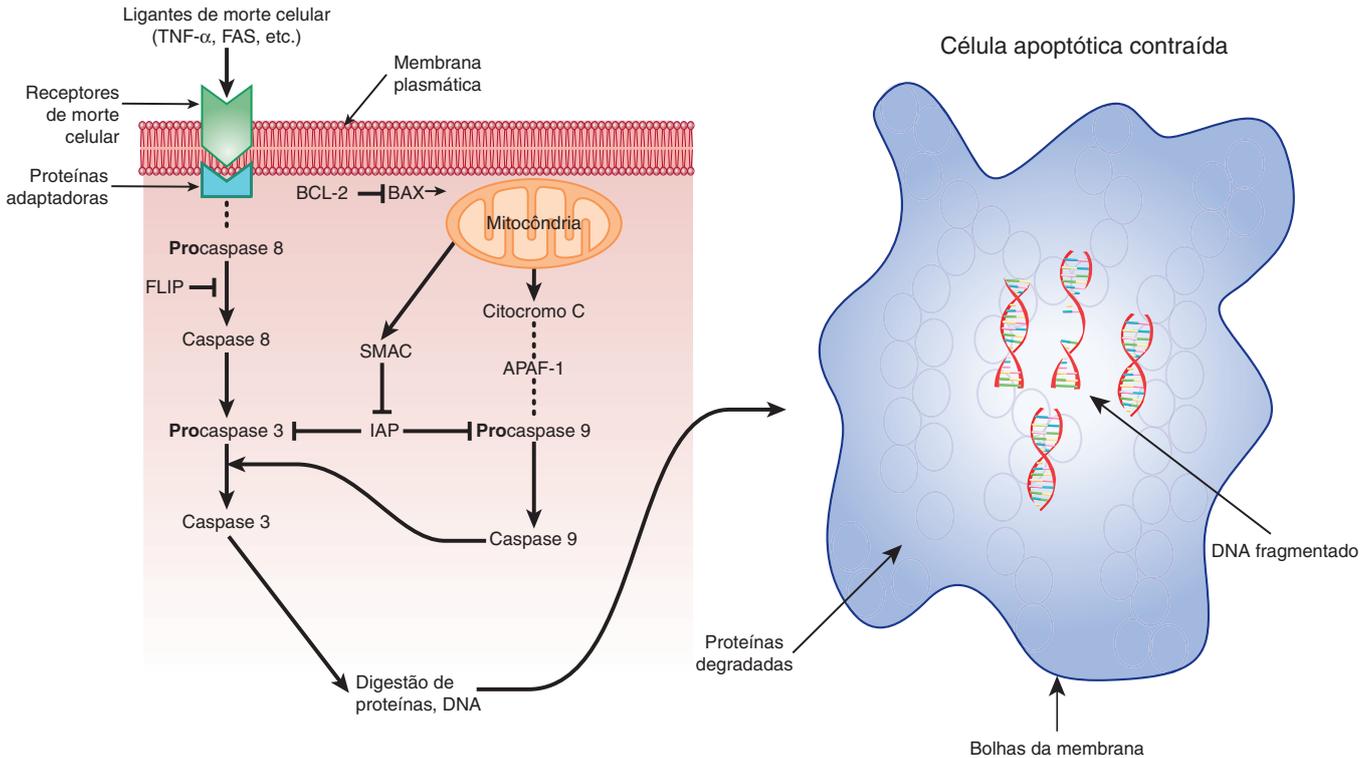


FIGURA 56-12 Esquema da apoptose (simplificado). Os principais eventos moleculares na via extrínseca. Os sinais de morte celular incluem o $TNF-\alpha$ e o FAS (presentes na superfície dos linfócitos e de algumas outras células). Os sinais (ligantes) interagem com receptores específicos de morte celular (existem vários deles), à esquerda. Em seguida, o receptor ativado interage com uma proteína adaptadora (FADD é uma de várias dessas proteínas) e forma um complexo com a pró-caspase 8. (O complexo está indicado por ... entre o receptor e a pró-caspase 8 na figura.) Por meio de uma série de etapas adicionais, ocorre formação da caspase 3 ativa, que constitui o principal efetor (executor) de lesão celular. A regulação da via extrínseca pode ocorrer devido ao efeito inibidor da FLIP sobre a conversão da pró-caspase 8 em caspase 8, bem como devido ao efeito inibidor do IAP sobre a pró-caspase 3. Os principais eventos celulares na via intrínseca (mt). Vários estresses celulares afetam a permeabilidade da membrana mt externa, resultando no efluxo do citocromo c para o citoplasma. O citocromo c forma um complexo multiproteico com o APAF-1 e a pró-caspase 9, denominado apoptossomo. Por meio dessas interações, a pró-caspase 9 é convertida em caspase 9. Por sua vez, a caspase 9 pode atuar sobre a pró-caspase 3, convertendo-a em sua forma ativa. A regulação da via intrínseca pode ocorrer em nível de BAX, o que facilita o aumento da permeabilidade mt, possibilitando o efluxo do citocromo c, sendo, portanto, pró-apoptótica. A BCL-2 opõe-se a esse efeito de BAX e, por isso, é antiapoptótica. O IAP também inibe a pró-caspase 9, e esse efeito do IAP pode ser superado pelo SMAC. (APAF-1, fator de ativação da protease apoptótica 1; BAX, proteína X associada a BCL-2; BCL-2, célula B de LLC/linfoma 2 [LLC representa leucemia linfocítica crônica]; FADD, domínio de morte associado a FAS; FAS, antígeno FAS; FLICE, ICE semelhante a FADD; FLIP, proteína inibidora de FLICE; IAP, inibidor das proteínas da apoptose; ICE, interleucina 1- β convertase; SMAC, segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria.) —|significa oposição à ação de.

(como FADD [proteína associada ao Fas com domínio de morte]). Por sua vez, esses complexos interagem com a **pró-caspase 8**, levando à sua conversão em **caspase 8** (uma iniciadora). Uma **caspase 3** (uma efetora) é ativada por uma série de reações subsequentes. Ela digere proteínas estruturais importantes, como a lamina (associada à condensação nuclear), várias proteínas do citoesqueleto e enzimas envolvidas no reparo do DNA, causando morte celular.

A regulação dessa via ocorre em vários níveis. A **FLIP** inibe a conversão da pró-caspase 8 em sua forma ativa. Os **inibidores de apoptose (IAPs)** inibem a conversão da pró-caspase 3 em sua forma ativa. Esses efeitos podem ser contornados pela proteína **SMAC** (segunda ativadora de caspase derivada da mitocôndria), que é liberada a partir das mitocôndrias.

A **via mitocondrial** pode ser iniciada por exposição a espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA e outros estímulos. Esses eventos levam à formação de poros na membrana mitocondrial externa, através dos quais o **citocromo c** escapa para o interior do citoplasma. No citoplasma, o citocromo c interage com

APAF-1, pró-caspase 9 e **ATP** para formar um complexo multiproteico, conhecido como **apoptossomo**. Como resultado dessa interação, a **pró-caspase 9** é convertida em sua forma ativa, que, por sua vez, atua na **pró-caspase 3** para produzir a **caspase 3**.

Quanto à **regulação**, a ativação do **gene P53** ativa a transcrição de **BAX**. A **BAX** é pró-apoptótica, uma vez que provoca perda do potencial de membrana mitocondrial, ajudando a iniciar a via apoptótica mitocondrial. Por outro lado, a **BCL-2** inibe essa perda do potencial de membrana e, portanto, é antiapoptótica. Os IAPs inibem a conversão da pró-caspase 9 em caspase 9; **SMAC** pode contornar essa ação.

Observe que a via de morte utiliza a **caspase 8** como iniciadora, ao passo que a via mitocondrial utiliza a **caspase 9**. Essas duas vias podem interagir. Além disso, também existem outras vias de apoptose não discutidas aqui.

As células cancerosas escapam da apoptose

As células cancerosas desenvolveram mecanismos para escapar da apoptose e, portanto, continuam crescendo e dividindo-se.

Em geral, esses mecanismos envolvem mutações que provocam perda da função de proteínas pró-apoptóticas ou da superexpressão de genes antiapoptóticos. Um desses exemplos é fornecido pela perda de função do gene *P53*, talvez o gene que mais comumente sofre mutação no câncer. A consequente perda de regulação positiva do *BAX* pró-apoptótico (ver anteriormente) desvia o equilíbrio a favor das proteínas antiapoptóticas. A superexpressão de muitos genes antiapoptóticos constitui um achado frequente nos cânceres. A consequente evasão da apoptose favorece o crescimento contínuo de cânceres. Esforços estão sendo realizados para desenvolver fármacos ou outros compostos que estimularão especificamente a apoptose nas células cancerosas, levando à sua morte.

Conforme assinalado anteriormente, a apoptose é uma via complexa altamente regulada com numerosos componentes, muitos dos quais não serão mencionados aqui nesta descrição abreviada. A apoptose também está envolvida em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento. Embora pareça ser paradoxal, a regulação da morte celular é tão importante na manutenção da saúde quanto a formação de novas células. Além do câncer, a apoptose também está implicada em outras doenças, incluindo determinadas doenças autoimunes e distúrbios neurológicos crônicos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, nas quais a ocorrência de **morte celular excessiva** (em vez de crescimento excessivo) constitui uma característica.

A **Tabela 56-11** resume algumas das principais características da apoptose.

Efeitos pró-inflamatórios e promotores de tumores da necrose

Ao contrário da apoptose, a necrose do tecido leva à liberação de conteúdo intracelular no seu microambiente adjacente. Este inclui mediadores pró-inflamatórios, que resultam na infiltração de tecido pelas células inflamatórias imunes. Tem sido demonstrado que essas células podem apresentar efeitos

TABELA 56-11 Resumo de algumas características importantes da apoptose

<ul style="list-style-type: none"> • A apoptose envolve uma série de eventos geneticamente programados e difere da necrose
<ul style="list-style-type: none"> • Toda a série de reações é uma cascata, semelhante à coagulação sanguínea
<ul style="list-style-type: none"> • Caracteriza-se por retração da célula, formação de bolhas na membrana, ausência de inflamação e padrão distinto (em escada) de degradação do DNA
<ul style="list-style-type: none"> • Muitas caspases (proteínases) estão envolvidas; algumas são iniciadoras, enquanto outras são efetoras (executoras)
<ul style="list-style-type: none"> • Existem as vias mitocondriais extrínseca e intrínseca
<ul style="list-style-type: none"> • O FAS e outros receptores estão envolvidos na via dos receptores de morte celular (externa) da apoptose
<ul style="list-style-type: none"> • O estresse celular e outros fatores ativam a via mt; a liberação do citocromo c no citoplasma constitui um importante evento dessa via
<ul style="list-style-type: none"> • A apoptose é regulada por um equilíbrio entre inibidores (antiapoptóticos) e ativadores (pró-apoptóticos)
<ul style="list-style-type: none"> • As células neoplásicas adquiriram mutações que possibilitam a sua evasão da apoptose, promovendo a sua proliferação, embora indiretamente

ativos promotores de tumores. Foi relatado que as células inflamatórias imunes promovem angiogênese, proliferação celular e poder de invasão. Portanto, a necrose, que parece contrariar a tendência proliferativa das células neoplásicas, poderá paradoxalmente beneficiar a tumorigênese. Assim, tumores em desenvolvimento parecem lucrar, pela tolerância de certo grau de necrose celular, já que esta leva ao recrutamento de células inflamatórias que suprem as células neoplásicas com fatores que promovem crescimento.

OS MECANISMOS EPIGENÉTICOS ESTÃO ENVOLVIDOS NO CÂNCER

Há evidências crescentes de que os mecanismos epigenéticos (ver Capítulo 36) estão envolvidos na etiologia do câncer. Esses mecanismos produzem alterações não mutacionais que afetam a regulação da expressão gênica. A metilação de bases de citosina específicas nos genes está implicada na supressão das atividades de determinados genes. Foram identificadas alterações do processo normal de metilação/demetilação dos resíduos de citosina de genes específicos em células cancerosas. As modificações pós-traducionais das histonas, como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, também afetam a expressão gênica. Foram detectadas alterações da acetilação das histonas H3 e H4 que afetam a transcrição dos genes em células cancerosas. As mutações que acometem as estruturas de complexos proteicos (p. ex., os complexos SWI/SNF) envolvidos na remodelagem da cromatina também podem afetar a transcrição dos genes. Na verdade, vários componentes dos complexos Swi/Snf podem atuar como genes supressores de tumor. A **Figura 56-13** sintetiza alguns desses aspectos da epigenética.

Um aspecto de interesse particular no que diz respeito às alterações epigenéticas é o fato de muitas dessas modificações pós-traducionais e modificações do DNA serem potencialmente **reversíveis**. Nesse sentido, **5-azadesoxicitidina** e **decitabina** são inibidoras das **DNA-metiltransferases (DNMTs)**,

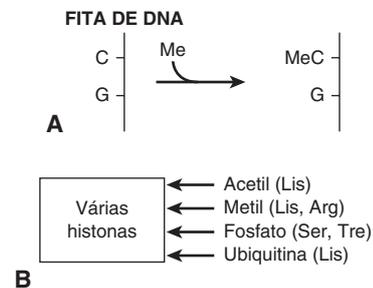


FIGURA 56-13 Alguns fatores envolvidos na epigenética. **(A)** Metilação da citosina para formar 5'-metilcitosina. A citosina geralmente está localizada próxima a um resíduo de guanina, formando uma ilha CpG. A metilação da citosina por uma metiltransferase está associada ao silenciamento das atividades de determinados genes. **(B)** Modificações pós-traducionais de várias histonas. Resíduos específicos de histonas específicas são modificados por várias enzimas, alterando a conformação e as atividades das histonas modificadas. Por exemplo, a acetilação das lisinas N-terminais em algumas histonas está associada à abertura da cromatina e ao aumento na transcrição de determinados genes. Ver também a modificação e a remodelagem da cromatina, detalhadas nas Figuras 36-10, 38-8 e 38-9.

ao passo que o **ácido valproico** e o **vorinostate** agem para inibir as **histonas-desacetilases (HDACs)**. Ambos os agentes têm sido utilizados para tratar certos tipos de leucemias e linfomas, e acredita-se que atuem desreprimindo a transcrição de determinados genes reguladores críticos do crescimento, como os supressores de tumor.

O uso crescente de técnicas de triagem para o estudo das alterações epigenéticas (p. ex., análise do metiloma [a soma total das modificações de metilação em todo o genoma]) em um maior número de tipos de câncer provavelmente irá contribuir de modo considerável para o conhecimento dessa área.

EXISTE MUITO INTERESSE NO PAPEL DAS CÉLULAS-TRONCO NO CÂNCER

As células-tronco foram discutidas de maneira breve nos Capítulos 39 e 52. Atualmente, muitos cientistas estão pesquisando o papel desempenhado pelas células-tronco no câncer. Acredita-se que as células-tronco no câncer abriguem mutações que – por elas próprias ou em associação com outras mutações – tornam essas células cancerosas. As células-tronco podem ser detectadas pelo uso de marcadores de superfície específicos ou por outras técnicas. Há evidências de que os tecidos circundantes (p. ex., componentes da matriz extracelular [MEC]) podem influenciar significativamente o comportamento dessas células. Um importante conceito que estimula parte da pesquisa nesse campo é a crença de que uma das razões pelas quais a quimioterapia do câncer muitas vezes não é bem-sucedida reside na **existência de um reservatório de células-tronco cancerosas** que não é suscetível à quimioterapia convencional. As razões para que isso ocorra incluem o fato de muitas células-tronco serem relativamente latentes, apresentarem sistemas ativos de reparo do DNA (ver Figura 35-23), expressarem transportadores de fármacos capazes de expelir os agentes antineoplásicos e, muitas vezes, serem resistentes à apoptose.

Há evidências cumulativas de que as células-tronco cancerosas desempenham papéis efetivamente fundamentais em muitos tipos de neoplasia. Se assim for, o desenvolvimento de terapias com alta especificidade para destruição dessas células será de extremo valor.

OS TUMORES FREQUENTEMENTE ESTIMULAM A ANGIOGÊNESE

As células tumorais necessitam de suprimento sanguíneo adequado para obter nutrientes para a sua sobrevivência. Constatou-se que tanto as células tumorais quanto as células de tecidos adjacentes aos tumores **secretam fatores angiogênicos** que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos. Há muito interesse na angiogênese tumoral, em parte porque, se for possível inibi-la, isso poderá fornecer um método seletivo de destruição das células tumorais.

O crescimento de vasos sanguíneos que irrigam as células tumorais pode ser estimulado por **hipóxia** e por outros fatores. A hipóxia leva a níveis elevados de **fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1)**, que, por sua vez, aumenta os níveis de **fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)**, um importante fator estimulante da angiogênese. Foram identificados cerca de cinco tipos de VEGF (VEGF-A a VEGF-E), com maior interesse no VEGF-A. As proteínas VEGF interagem com receptores

específicos de tirosina-cinase nas células endoteliais e nas células linfáticas. Esses receptores, por meio de vias de sinalização, causam regulação positiva da via NF- κ B (ver Capítulo 50), resultando em proliferação de células endoteliais e formação de novos vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos que suprem os tumores não são normais; com frequência, apresentam estrutura desorganizada, apresentam menor integridade e, portanto, são em geral mais permeáveis do que os vasos sanguíneos normais. Além dos VEGFs, outras moléculas, como a angiopoietina, o fator de crescimento dos fibroblastos β (FGF- β), o TGF- β e o fator de crescimento da placenta, também estimulam a angiogênese. Algumas outras moléculas também inibem o crescimento dos vasos sanguíneos (p. ex., angiogenina e endostatina).

Foram desenvolvidos **anticorpos monoclonais (mAbs)** contra o VEGF-A (p. ex., bevacizumabe ou Avastatina), que têm sido utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer (p. ex., cânceres de colo e de mama). Esses mAbs se ligam ao VEGF e impedem-no de agir, provavelmente por meio do bloqueio da interação do VEGF com o receptor de VEGF. Foi constatado que esses mAbs terapêuticos aumentam a sobrevivência global dos pacientes, porém a maioria deles acaba sofrendo recidiva. Como ocorre com muitas terapias antineoplásicas, acredita-se que esses mAbs sejam mais bem utilizados em combinação com outras terapias anticâncer. Anticorpos monoclonais dirigidos contra outros fatores de crescimento que estimulam a angiogênese também estão sendo desenvolvidos e se encontram em fase de ensaios clínicos, assim como moléculas pequenas inibidoras da angiogênese. Os inibidores da angiogênese são úteis em outras condições, como a degeneração macular “úmida” ou relacionada à idade e à retinopatia diabética, em que a proliferação de vasos sanguíneos constitui uma característica.

A METÁSTASE É O ASPECTO MAIS GRAVE DO CÂNCER

Estima-se que cerca de **85% da mortalidade** associada ao câncer resultam de metástases. A disseminação do câncer geralmente ocorre via vasos linfáticos ou sanguíneos. A metástase é um processo complexo, e suas bases moleculares ainda não estão elucidadas.

A **Figura 56-14** fornece um esquema simplificado de metástase. O evento inicial consiste no **destacamento** de células tumorais do tumor primário. Em seguida, essas células podem ter acesso à circulação (ou aos vasos linfáticos) em um processo denominado **intravasamento**. Uma vez na circulação, elas tendem a ficar **paradas** no leito capilar mais próximo. Nesse local, elas **extravasam** e **migram** pela MEC adjacente para alcançar um local de estabelecimento. Posteriormente, caso sobrevivam aos mecanismos de defesa do hospedeiro, elas crescem em velocidade variável. Para assegurar o seu crescimento, as células metastáticas necessitam de suprimento sanguíneo adequado, conforme discutido anteriormente.

Muitos estudos mostraram que as células neoplásicas apresentam um complemento anormal de proteínas em suas superfícies. Essas alterações podem possibilitar redução da adesão celular e destacamento de células cancerosas do câncer original. As moléculas presentes nas superfícies celulares envolvidas na adesão celular são denominadas **moléculas de adesão celular (CAMs)** (**Tabela 56-12**). A diminuição nas quantidades de **caderina-E**, uma molécula de grande

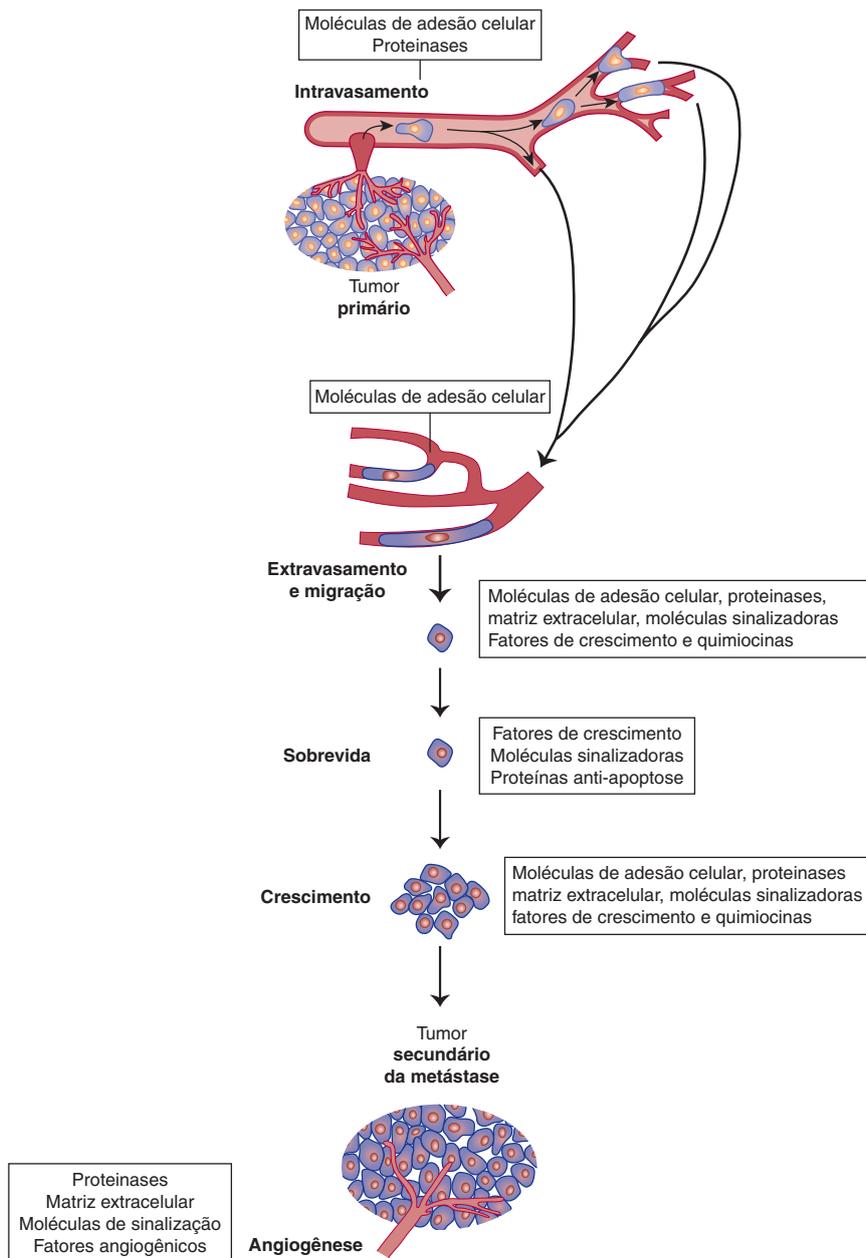


FIGURA 56-14 Esquema simplificado de metástase. Representação esquemática da sequência de etapas no processo de metástase, indicando alguns dos fatores supostamente envolvidos. (De Tannock IF, et al.: *The Basic Science of Oncology*. 4th ed. McGraw-Hill, 2005.)

importância na adesão de muitas células normais, pode ajudar a explicar a aderência reduzida de muitas células cancerosas. Muitos estudos mostraram a ocorrência de alterações das cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas de superfície celular, como consequência da atividade alterada de várias glicosiltransferases (ver Capítulo 47). Uma alteração importante consiste no aumento da atividade da GlcNAc-transferase V. Essa enzima catalisa a transferência da GlcNAc para uma cadeia oligossacarídica em crescimento, formando uma ligação b1-6 e possibilitando o crescimento adicional da cadeia. Foi proposto que essas cadeias alongadas participam de uma rede de glicanos alterados na superfície celular. Isso pode causar reorganização estrutural dos receptores e de outras moléculas, predispondo, talvez, à disseminação das células cancerosas.

Uma propriedade importante de muitas células cancerosas é a sua capacidade de liberar várias **proteínases** no interior da MEC. Das quatro classes principais de proteínases (serina, cisteína, aspartato e metalo), no câncer, o foco de interesse particular tem sido as **metaloproteínases (MPs) da matriz**, que constituem uma família muito grande de enzimas dependentes de metais (em geral, zinco). Diversos estudos mostraram aumento de atividade das MPs, como a MP-2 e a MP-9 (também conhecidas como gelatinases), em tumores. Essas enzimas são capazes de degradar proteínas na membrana basal e na MEC, como colágenos e outras proteínas, facilitando a disseminação das células tumorais. Foram desenvolvidos inibidores dessas enzimas, porém não apresentaram sucesso clínico até o momento.

TABELA 56-12 Algumas moléculas de adesão celular (CAMs) importantes

• Caderinas
• Superfamília de imunoglobulinas (Ig) (CAMs Ig; moléculas de adesão celular)
• Integrinas
• Selectinas

Nota: as CAMs podem ser homofílicas ou heterofílicas. As CAMs homofílicas interagem com moléculas idênticas nas células adjacentes, ao passo que as CAMs heterofílicas fazem isso com moléculas diferentes. As caderinas são homofílicas, ao passo que as selectinas e as integrinas são heterofílicas, e as CAMs Ig podem ser tanto homofílicas quanto heterofílicas. As integrinas são discutidas de modo sucinto no Capítulo 52, e as selectinas, no Capítulo 46.

Um fator que possibilita aumento da mobilidade das células cancerosas é a **transição epiteliomesenquimal (EMT)**. Trata-se de uma mudança da morfologia e da função das células epiteliais para o tipo mesenquimal, talvez induzida por fatores de crescimento. O tipo mesenquimal caracteriza-se por maior quantidade de filamentos de actina, possibilitando aumento de motilidade, que constitui uma propriedade essencial das células que sofrem metástase.

A **matriz extracelular (MEC)** desempenha um importante papel nas metástases. Há evidências de comunicação por mecanismo de sinalização entre células cancerosas e células da MEC. Os tipos de células existentes na MEC também podem afetar a ocorrência de metástase. Conforme assinalado anteriormente, as proteinases que degradam as proteínas na MEC podem facilitar a disseminação das células cancerosas. Além disso, a MEC contém diversos fatores de crescimento passíveis de influenciar o comportamento dos tumores.

Em seus trajetos, as células tumorais ficam expostas a várias células do sistema imune (como as células T, as células *natural killer* [NK] e os macrófagos) e devem ser capazes de sobreviver à sua exposição. Algumas dessas células de vigilância secretam várias **quimiocinas**, pequenas proteínas capazes de atrair diversas células, como os leucócitos, causando, às vezes, resposta inflamatória às células tumorais.

Estima-se que apenas cerca de 1 em cada 10 mil células neoplásicas possa ter capacidade genética de efetuar colonização bem-sucedida. Algumas células tumorais exibem predileção por sofrer metástase para órgãos específicos (p. ex., células da próstata aos ossos). É provável que moléculas específicas da superfície celular estejam envolvidas nesse tropismo.

Diversos estudos demonstraram que determinados genes potencializam a metástase, ao passo que outros atuam como genes supressores da metástase. A determinação exata de como esses genes funcionam é objeto de intensa investigação. A **Tabela 56-13** contém um resumo de alguns aspectos importantes relativos ao processo de metástase.

AS CÉLULAS CANCEROSAS APRESENTAM PROGRAMAÇÃO METABÓLICA ALTERADA

Muitos aspectos do metabolismo das células cancerosas (p. ex., de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos) estão sendo estudados intensivamente devido ao fato de as alterações no metabolismo serem, até hoje, reprodutivamente observadas na maioria das células cancerosas. Esse fato – reunido aos recentes

TABELA 56-13 Características importantes da metástase

• Com frequência, identifica-se a existência de uma transição celular epiteliomesenquimal nos cânceres, possibilitando maior motilidade das células potencialmente metastáticas
• O processo de metástase é relativamente ineficaz (apenas cerca de 1:10.000 células tumorais pode ter o potencial genético de colonização)
• As células metastáticas precisam evadir-se de várias células do sistema imune para sobreviver
• Alterações nas moléculas de superfície celular (p. ex., CAMs e outras) estão envolvidas
• O aumento da atividade das proteinases (p. ex., da MP-2 e da MP-9) facilita a invasão
• Foi demonstrada a existência de genes potencializadores e supressores da metástase
• Algumas células cancerosas metastizam preferencialmente para órgãos específicos
• As assinaturas de genes envolvidos na metástase podem ser detectadas pela análise do transcriptoma/exoma; essa informação do transcriptoma poderá ser de valor prognóstico, possibilitando potencialmente um tratamento terapêutico personalizado

Abreviações: CAMs, moléculas de adesão celular; MP, metaloproteinase.

estudos de sequenciamento em larga escala do DNA exômico (ver anteriormente) que mostram que os genes que codificam proteínas metabólicas (e genes relacionados) estão comumente mutados nos 21 diferentes tipos de tumores comuns analisados – reanimou a pesquisa sobre o metabolismo em geral e sobre o metabolismo das células cancerosas em particular.

A glicose e o aminoácido glutamina constituem dois dos metabólitos mais abundantes no plasma e, juntos, são responsáveis por grande parte do metabolismo dos carbonos e do nitrogênio nas células humanas. Em 1924, o bioquímico Otto Warburg e seus colaboradores descobriram que as células cancerosas captam grandes quantidades de glicose e a metabolizam em ácido láctico, mesmo na presença de oxigênio. Essa observação foi chamada de **efeito Warburg**. Com base nesses dados, Warburg formulou duas hipóteses: primeira, que a proporção aumentada da glicólise em relação à respiração aeróbia era devida a defeitos na cadeia respiratória mitocondrial; e segunda, que a glicólise aumentada possibilitava que as células cancerosas se proliferassem preferencialmente na tensão de oxigênio reduzida, geralmente observada nos tumores. Além disso, Warburg argumentou que o desvio do metabolismo da glicose de aeróbio para anaeróbio seria um/o direcionador da tumorigênese.

Trabalhos recentes têm mostrado que, em vez de defeitos evidentes nas mitocôndrias, a respiração mitocondrial reprogramada geralmente observada nas células tumorais representa um efeito direto de pelo menos dois tipos de influências. Primeira, a sinalização autossustentável do fator de crescimento proliferativo característico das células cancerosas (Figuras 56-1 e 56-2); e segunda, alterações genéticas em genes que codificam enzimas metabólicas específicas e outros genes. Essas alterações genéticas incluem expressão preferencial de certas variantes de *splicing* de mRNA (piruvato-cinase/*PKM*, fosfofrutocinase/*PFKFB3*, glutaminase/*GLS*); amplificação de genes que codificam enzimas particulares (hexocinase II/*HXX2*, ácido graxo-sintase/*FASN*, fosfoglicerato-desidrogenase/*PHGDH*); eficiências e especialidades catalíticas alteradas (isocitrato-desidrogenase 1 e 2/*IDH*, *IDH2*); e produtos metabólicos (enzimas *IDH* normalmente

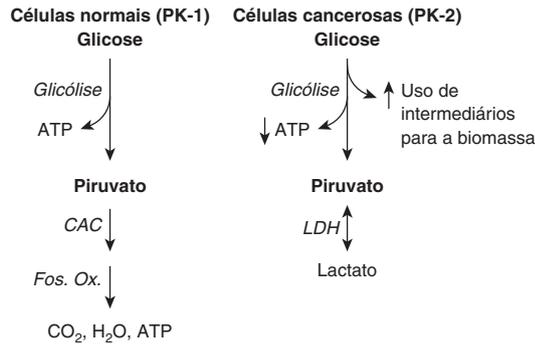


FIGURA 56-15 Isoenzimas da piruvato-cinase e glicólise nas células normais e cancerosas. Nas células normais, a principal fonte de ATP é a fosforilação oxidativa. A glicólise fornece certa quantidade de ATP. A principal isoenzima da piruvato-cinase (PK) nas células normais é a PK-1. Nas células cancerosas, a glicólise aeróbia é proeminente, ocorre produção de ácido láctico pela ação da lactato-desidrogenase (LDH), e a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa está diminuída (não ilustrada na figura). Nas células cancerosas, a PK-2 constitui a principal isoenzima da PK. Por razões complexas que ainda não estão totalmente elucidadas, essa alteração no perfil de isoenzima das células cancerosas está associada à diminuição da produção efetiva de ATP a partir da glicólise, porém há aumento na utilização de metabólitos para o desenvolvimento da biomassa. (CAC, ciclo do ácido cítrico; Fos. Ox., fosforilação oxidativa.)

produzem α -cetogluturato, porém as enzimas IDH1 e/ou IDH2 mutadas produzem 2-hidroxi-glutarato [2HG]) e o efeito que esses “oncometabólitos” (i.e., 2HG) apresentam sobre o controle epigenético da expressão gênica (metilação do DNA e da proteína histona). Essa **reprogramação enzimática metabólica** leva, por fim, a um menor *shuttling* da energia química derivada da glicose para a produção de ATP (Figura 56-15), com desvio concomitante da energia química da glicose para a construção da biomassa celular de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, etc. Essas macromoléculas essenciais são fundamentais para a proliferação celular (nesse caso, proliferação das células cancerosas). Coletivamente, essas observações oferecem uma explicação para a vantagem seletiva observada conferida às células tumorais por apresentarem alta taxa de glicólise.

Considerando esses dados, uma promissora abordagem atual consiste na análise de amostras de sangue e de urina por espectrometria de massa à procura de alterações no perfil de metabólitos que possam ajudar a detectar a presença de câncer em estágio inicial.

Apesar da angiogênese, muitos tumores sólidos têm áreas localizadas de **suprimento sanguíneo deficiente** e, portanto, altas taxas de **glicólise anaeróbia**. Isso leva à produção excessiva de ácido láctico e **acidose** local. Foi postulado que a produção local de ácido pode facilitar a invasão das células tumorais. A **baixa tensão de oxigênio** em áreas de tumores com suprimento sanguíneo deficiente estimula a formação do **fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1)**. Esse fator de transcrição, cuja atividade é acionada pela baixa tensão de oxigênio, regula positivamente – entre outras funções – as atividades de pelo menos oito genes que controlam a síntese de enzimas glicolíticas.

O **pH** e a **tensão de oxigênio** nos tumores constituem fatores importantes que afetam as ações dos fármacos antineoplásicos e de outros tratamentos. Por exemplo, a eficácia antineoplásica da radioterapia do câncer é significativamente menor em condições de hipóxia. Foram desenvolvidas substâncias químicas para inibir a glicólise nas células tumorais e que,

TABELA 56-14 Alguns compostos que inibem a glicólise e demonstraram ter atividade antineoplásica variável

Composto	Enzima inibida
3-Bromopiruvato	Hexocinase II
2-Desoxi-D-glicose	Hexocinase I
Dicloroacetato	Piruvato-desidrogenase (PDH) cinase
Iodoacetato	Gliceraldeído-fosfato-desidrogenase

Nota: a justificativa para o desenvolvimento desses agentes consiste no fato de a glicólise estar muito mais ativa nas células tumorais, de modo que a sua inibição pode causar maior lesão dessas células do que das células normais. A inibição da PDH-cinase resulta em estimulação da PDH, desviando o piruvato da glicólise.

talvez, matem-nas seletivamente (Tabela 56-14); elas incluem **3-bromopiruvato** (um inibidor de HK-2) e **2-desoxi-D-glicose** (um inibidor de HK-1). Outro composto, o **dicloroacetato** (DCA), inibe a atividade da piruvato-desidrogenase-cinase e, portanto, estimula a atividade da piruvato-desidrogenase (ver Capítulo 18), desviando o substrato da glicólise para o ciclo do ácido cítrico. Até então, nenhum deles alcançou algum uso clínico; talvez uma segunda geração derivada desses ou de outras moléculas dirigidas ao metabolismo provem ser eficazes em seres humanos como fármacos antineoplásicos.

OS BIOMARCADORES TUMORAIS PODEM SER MEDIDOS NO SANGUE E EM OUTRAS AMOSTRAS DE FLUIDOS CORPORAIS

A realização de testes bioquímicos muitas vezes é útil no tratamento de pacientes com câncer (p. ex., alguns pacientes com cânceres avançados podem apresentar níveis plasmáticos elevados de cálcio, que podem causar graves problemas se não forem controlados). Muitos cânceres estão associados à produção anormal de enzimas, proteínas e hormônios, que podem ser determinados em amostras de plasma ou de soro. Essas moléculas são conhecidas como **biomarcadores tumorais**. Algumas delas estão listadas na Tabela 56-15.

TABELA 56-15 Alguns biomarcadores tumorais úteis medidos no sangue

Biomarcador tumoral	Câncer associado
α -Fetoproteína (AFP)	Carcinoma hepatocelular, tumor de células germinativas
Calcitonina (CT)	Tireoide (carcinoma medular)
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Colo, pulmão, mama, pâncreas, ovário
Gonadotrofina coriônica humana (hCG)	Doença trofoblástica, tumor de células germinativas
Imunoglobulina monoclonal	Mieloma
Antígeno prostático específico (PSA)	Próstata

Nota: observa-se também elevação da maioria desses biomarcadores tumorais no sangue de pacientes com doenças não neoplásicas. Por exemplo, o CEA está elevado em uma variedade de distúrbios gastrointestinais não neoplásicos, e ocorre elevação do PSA na prostatite e na hiperplasia prostática benigna. Essa é a razão pela qual a interpretação dos resultados elevados dos biomarcadores tumorais precisa ser feita com cautela e também o motivo pelo qual a sua principal aplicação consiste em acompanhar a eficiência dos tratamentos e a detecção de recorrências. Existem também vários outros biomarcadores tumorais amplamente utilizados.

Todavia, elevações significativas de alguns dos biomarcadores listados na Tabela 56-15 também ocorrem em uma variedade de **condições não neoplásicas**. Por exemplo, elevações do nível do **antígeno prostático específico (PSA)**, uma glicoproteína sintetizada pelas células da próstata, ocorrem não apenas em pacientes com câncer de próstata, mas também naqueles com prostatite e **hiperplasia prostática benigna (HPB)**. De forma semelhante, são detectadas elevações do **antígeno carcinoembrionário (CEA)** não apenas em pacientes com vários tipos de câncer, mas também em fumantes compulsivos e indivíduos com colite ulcerativa e cirrose. Como as elevações dos biomarcadores tumorais geralmente não são específicas de câncer, a determinação da maioria desses biomarcadores não é utilizada basicamente para o diagnóstico do câncer. A sua principal aplicação consiste em acompanhar a eficiência dos tratamentos e detectar a ocorrência precoce de recidiva. O uso do CEA no tratamento de um paciente com câncer colorretal é discutido de modo sucinto no Capítulo 57, Caso 4. Assim como outros exames laboratoriais (Capítulo 56), é preciso considerar o quadro clínico global quando se interpretam os resultados das determinações dos biomarcadores tumorais.

Espera-se que as análises em curso da **proteômica** de fluidos corporais e células cancerosas acessíveis forneçam novos **biomarcadores tumorais** de maior sensibilidade e especificidade, bem como marcadores capazes de indicar a presença de câncer no estágio inicial de seu desenvolvimento.

As análises do sequenciamento do genoma total e do transcriptoma (ver Capítulo 39) de células cancerosas revelaram uma plethora de biomarcadores da oncogênese potencialmente muito úteis. Esses métodos também são úteis na subclassificação mais precisa de tumores (a chamada “medicina personalizada”; ver Capítulo 39) a fim de fornecer diagnósticos mais precisos e orientar formas mais eficazes de terapia. Esses métodos diagnósticos moleculares estão se tornando o padrão de tratamento para uma subpopulação seleta de cânceres. Por fim, nesse contexto, um recente resultado particularmente promissor foi a análise da sequência de DNA de uma amostra extraída de 5 mL de sangue obtido de pacientes com câncer, capaz de detectar precisamente a presença de DNA tumoral em 50 a 75% de 640 pacientes com diversos tipos de tumores. Trata-se de uma área de análise laboratorial e oncologia em rápida expansão (ver a seguir).

O CONHECIMENTO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE LEVOU AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS

Uma das grandes expectativas na pesquisa do câncer é que a elucidação dos mecanismos fundamentais envolvidos nessa doença possa levar a novas terapias mais bem-sucedidas. De certa maneira, isso já ocorreu, e espera-se que os avanços contínuos acelerem esse processo.

Os agentes quimioterápicos clássicos incluem os agentes alquilantes, os complexos da platina, os antimetabólitos, os venenos do fuso e outros fármacos. Esses agentes não são discutidos aqui.

Entre as classes de fármacos desenvolvidas mais recentemente destacam-se os inibidores da transdução de sinais

TABELA 56-16 Alguns agentes antineoplásicos baseados nos recentes avanços sobre o conhecimento da biologia do câncer

Classe	Exemplo	Utilizado para tratar
Inibidores da transdução de sinais	Imatinibe, um inibidor da tirosina-cinase	LMC
Anticorpos monoclonais	Trastuzumabe, um mAb dirigido contra o receptor HER2/Neu	Estágio avançado do câncer de mama
Agentes antiangiogênicos	Bevacizumabe, um mAb dirigido contra o VEGF-A	Cânceres de colo e de mama
Agentes anti-hormonais	Tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio	Câncer de mama
Afetam a diferenciação	Ácido retinoico <i>all-trans</i> , direcionado para o receptor de ácido retinoico nas células da leucemia promielocítica, que induzem a sua diferenciação	Leucemia promielocítica
Afetam alterações epigenéticas	5-Azadesoxicidina, inibe as DNA-metiltransferases SAHA, inibe as histonas desacetilases	Algumas leucemias Linfoma cutâneo de células T

Abreviações: LMC, leucemia mieloide crônica; mAb, anticorpo monoclonal; SAHA, ácido suberoilânilida hidroxâmico (Vorinostat); VEGF-A, fator de crescimento do endotélio vascular A.

Nota: em alguns casos, os agentes listados podem ter sido substituídos por outros agentes mais eficazes. Além disso, alguns dos agentes listados são utilizados no tratamento de outras condições.

(incluindo inibidores da tirosina-cinase), os anticorpos monoclonais dirigidos contra várias moléculas-alvo, os inibidores dos receptores de hormônios, os fármacos que afetam a diferenciação, os agentes antiangiogênese e os modificadores da resposta biológica. A **Tabela 56-16** fornece exemplos de cada um desses fármacos.

O achado acerca de defeitos disseminados nos mecanismos de sinalização em células cancerosas e, em particular, a detecção de mutações nas **tirosinas-cinase** levaram ao desenvolvimento de inibidores dessas enzimas. O sucesso mais notável tem sido, provavelmente, a introdução do Imatinibe no tratamento da **leucemia mieloide crônica (LMC)**. O Imatinibe é um fármaco administrado por via oral, que inibe a tirosina-cinase formada devido à translocação cromossômica *ABL-BCR* envolvida na gênese da LMC. O Imatinibe, um análogo do ATP, liga-se competitivamente ao sítio de ligação do ATP da cinase. Esse fármaco produziu remissões completas em muitos pacientes. Ele pode ser combinado com outros fármacos. Foram também desenvolvidos outros inibidores da tirosina-cinase. Dois deles são o Erlotinibe e o Gefitinibe, que inibem o receptor (EGFR) do fator de crescimento epidérmico (EGF). EGFR é superexpresso em determinados tipos de câncer de pulmão (p. ex., câncer de células não pequenas) e de mama, resultando em sinalização aberrante (constitutiva). É importante perceber que o desenvolvimento desses fármacos requer **conhecimento estrutural detalhado** como o obtido por cristalografia de raios X, estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) e construção de modelos das moléculas-alvo. Outra classe de fármacos que demonstrou ser útil é a dos **anticorpos monoclonais** dirigidos contra várias moléculas expostas nas superfícies de células cancerosas

(ver discussão anterior sobre o mAb anti-VEGF). Alguns mAbs clinicamente úteis e terapêuticos estão listados na Tabela 56-16.

Outras abordagens em relação ao tratamento do câncer que estão sendo desenvolvidas ou utilizadas, mas que não estão relacionadas na Tabela 56-16, incluem vários tipos de **terapia gênica** (incluindo siRNAs, Capítulo 34), **imunoterapia** (ver a seguir), **vírus oncolíticos** (vírus que invadem preferencialmente células tumorais, levando-as à morte), **inibidores do receptor de progesterona**, **inibidores da aromatase** (ver Capítulo 41) (para alguns cânceres de mama e de ovário), **inibidores da telomerase**, aplicações de **nanotecnologia** (p. ex., *nanoshells* e outras nanopartículas), **fototerapia** (ver Capítulo 31) e fármacos que serão **dirigidos seletivamente para as células-tronco cancerosas**.

Como ocorre com todos os fármacos, é importante reconhecer que os fármacos antineoplásicos possuem efeitos colaterais, alguns dos quais são intensos, e que pode haver desenvolvimento de resistência a muitos deles depois de um período de tempo variável. A bioquímica do mecanismo de desenvolvimento de resistência das células cancerosas a fármacos constitui uma importante área de pesquisa. As células cancerosas utilizam várias estratégias para desenvolver resistência aos fármacos (ver resumo, Tabela 56-17). O objetivo global no

TABELA 56-17 Mecanismos pelos quais as células cancerosas podem desenvolver resistência aos fármacos

Mecanismo de resistência ao fármaco	Exemplo
Efluxo aumentado do fármaco da célula	A superexpressão das proteínas de transporte como as proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (p. ex., glicoproteína P ou MDR1) causa efluxo de importantes agentes quimioterapêuticos de câncer, como os taxanos, inibidores de topoisomerase e antimetabólitos
Redução da ativação de fármacos	Redução da conversão de profármacos (como a 5-fluoruracil) às suas formas ativas devido à regulação negativa de enzimas que catalisam a sua ativação
Inativação de fármacos	Fármacos derivados da platina (cisplatina e carboplatina) são inativados por conjugação com glutatona
Aumento da expressão do alvo do fármaco	Aumento da expressão da timidilato-sintase, o alvo de antimetabólitos, como a 5-fluoruracil
Apoptose disfuncional	Superexpressão de proteínas antiapoptóticas, como a família de proteínas de BCL-2, e redução da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como BAX e BAK
Ativação da sinalização de pró-sobrevivência	Ativação da sinalização mediada pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em resposta aos vários agentes quimioterápicos
Modificação do microambiente tumoral	Expressão aumentada de integrinas, proteínas que ligam as células à matriz extracelular, que inibe a apoptose e altera os alvos dos fármacos (resistência aos fármacos mediada pelo ambiente)

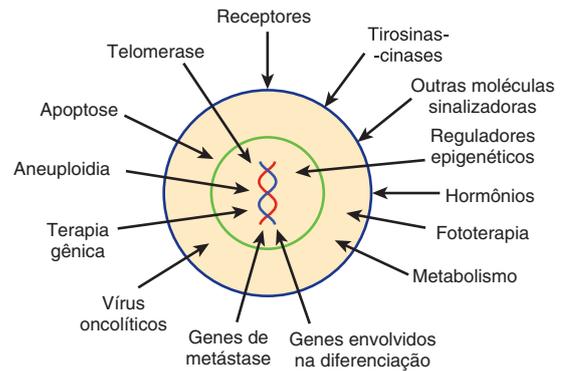


FIGURA 56-16 Exemplos de alvos para fármacos antineoplásicos e algumas terapias emergentes, ambos desenvolvidos a partir de pesquisas relativamente recentes. A figura não mostra os agentes antiangiogênicos, as aplicações da nanotecnologia, as terapias dirigidas contra as células-tronco cancerosas e as abordagens imunológicas. Os alvos e as terapias assinalados são, em sua maioria, discutidos de modo sucinto no texto.

desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer consiste em usar as novas informações obtidas de estudos básicos da biologia celular, molecular e do câncer para o desenvolvimento de agentes mais seguros e mais efetivos. A intensa pesquisa realizada durante as últimas décadas levou a uma maior compreensão das alterações genéticas que baseiam o desenvolvimento de tipos específicos de câncer. Esse conhecimento gerou uma mudança do uso de fármacos citotóxicos de amplo espectro para terapias que são especificamente elaboradas e direcionadas para tumores individuais. Atualmente, uma importante área de pesquisa consiste nas **mutações condutoras (driver)**, mutações que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento de tumores (ver discussão anterior sobre câncer colorretal). O **perfil molecular do câncer** em pacientes individuais permite aos oncologistas escolher o fármaco ou a modalidade de tratamento mais adequada direcionada para a anormalidade molecular de cada tumor. Essa **terapia anticâncer personalizada** tem mostrado aumento significativo na resposta ao fármaco e na sobrevida em vários tipos de câncer. A compreensão das diferenças genéticas no metabolismo de fármacos anticâncer (ver Capítulo 53) também pode ajudar a personalizar os tratamentos anticâncer.

A Figura 56-16 fornece um resumo de alguns dos alvos da terapia farmacológica e de algumas terapias emergentes que foram desenvolvidas a partir de estudos relativamente recentes dos aspectos básicos do câncer.

EXISTEM MUITOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO CÂNCER

A imunologia de tumores representa uma grande área de interesse, portanto serão feitos apenas alguns comentários em relação a esse tópico. É provável que o declínio normal da responsividade imunológica que acompanha o **envelhecimento** desempenhe um papel na incidência aumentada de câncer no idoso. Uma esperança de longa data é que as abordagens imunológicas para tratar o câncer (**imunoterapia**), devido à sua **especificidade**, possam ser capazes de matar seletivamente as células neoplásicas. Existem muitos estudos clínicos em andamento

que estão investigando essa possibilidade. Esses estudos envolvem o uso de anticorpos, vacinas e diversos tipos de células T, que geralmente podem ser manipulados de uma maneira ou de outra para aumentar a sua capacidade de destruir as células neoplásicas. Um dos métodos provados como eficazes é o uso de anticorpos contra certas proteínas da superfície do linfócito T. Por exemplo, foi demonstrado que anticorpos desenvolvidos contra o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (anti-CTLA-4) ou contra a morte programada-1 (anti-PD1) “removem os freios” dessas células, deixando-as livres para atacar as células cancerosas. Outras estratégias que utilizam células T modificadas também se demonstraram eficazes. A principal vantagem da imunoterapia é que ela apresenta um amplo espectro de ação e pode, portanto, ser utilizada contra uma grande variedade de cânceres. Além disso, é menos provável que ocorra resistência a essa forma de tratamento. Acredita-se que a imunoterapia venha a ser a quarta principal arma contra o câncer, após a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, tornando-a o “Breakthrough of the Year 2013” da revista *Science*.

A **inflamação crônica** envolve aspectos de função imune. Há evidências de que ela possa **predispôr ao câncer** (p. ex., a incidência de câncer colorretal é muito maior do que o normal em indivíduos que tiveram colite ulcerativa de longa duração). Algumas células inflamatórias produzem quantidades relativamente grandes de **espécies reativas de oxigênio**, que podem causar lesão ao DNA e, talvez, contribuir para a oncogênese. Também foi relatado que **baixas doses de ácido acetilsalicílico** podem diminuir o risco de desenvolvimento de câncer colorretal, talvez em virtude de sua ação anti-inflamatória.

Câncer: relação com inflamação e obesidade

Hoje, a associação entre inflamação e câncer está bem estabelecida. A inflamação é um componente crítico da tumorigênese. Dito isso, os mecanismos exatos que ligam a inflamação e o câncer são muito pouco compreendidos. Exemplos de possíveis moléculas envolvidas na indução de um processo inflamatório incluem o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). NF- κ B é um fator de transcrição que induz a expressão de proteínas que estão envolvidas nos processos pró-inflamatórios, proliferativos e reparadores. A ativação de NF- κ B tem sido demonstrada em tumores em resposta a estímulos inflamatórios ou mutações oncogênicas (Capítulo 42). A sinalização via STAT3 é ativada pela interleucina 6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória que ativa a sinalização Janus-cinase (JAK)-STAT e seus eventos de efeitos consecutivos (ver Capítulo 42). Acredita-se que esses eventos sejam responsáveis pelo desencadeamento de características importantes do câncer. Além disso, o “**inflamassomo**”, um complexo multiproteico que atua como sensor da lesão celular, é outro potencial candidato que modula a inflamação. A ativação dos inflamassomos leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a IL-18, ambas implicadas na tumorigênese. Existem muitas evidências para implicar outros mediadores inflamatórios no desenvolvimento de tumores.

A obesidade está associada à inflamação de baixo grau. O tecido adiposo visceral é considerado uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e de outros fatores

implicados no processo. Hoje, já se sabe que o microambiente que envolve as células tumorais influencia a tumorigênese. Acredita-se que as células inflamatórias do microambiente do tumor desempenhem um papel crucial no processo. Tem sido demonstrado que a obesidade modula e exacerba alterações disfuncionais no microambiente; essa ocorrência foi demonstrada tanto no tecido normal quanto em tumores. Essas alterações incluem modificações em fatores que podem ser de natureza endócrina, metabólica ou inflamatória. Por outro lado, tem sido demonstrado que a restrição calórica inibe a tumorigênese em modelos experimentais. Muitas vias celulares, como as envolvidas na sinalização de fatores de crescimento, inflamação, homeostasia celular e no microambiente tumoral, são afetadas por essa restrição calórica. Essas observações sugerem que esses alvos podem ser considerados para a prevenção do câncer em seres humanos.

RESUMO

- O câncer deve-se a mutações nos genes que controlam a multiplicação celular, a morte celular (apoptose) e as interações célula-célula (p. ex., adesão celular). Outros aspectos importantes do câncer consistem em defeitos nas vias de sinalização celular, estimulação da angiogênese, aneuploidia e alterações no microambiente celular.
- A grande maioria dos cânceres resulta de mutações que acometem as células somáticas. Entretanto, foram identificados vários cânceres hereditários.
- As principais classes de genes envolvidos no câncer incluem os oncogenes e os genes supressores de tumor. As mutações que afetam genes que controlam a síntese e a expressão dos microRNAs também são importantes.
- As alterações epigenéticas estão sendo progressivamente reconhecidas no câncer (e em outras doenças); um dos motivos de interesse em epigenética é que as “marcas” epigenéticas responsáveis são provavelmente reversíveis por fármacos.
- Os mecanismos de metástase estão sendo explorados intensivamente; a descoberta de genes potencializadores e supressores, entre outros achados, pode levar ao desenvolvimento de novas terapias.
- A apoptose, morte celular programada, desempenha papéis importantes na oncogênese. As células cancerosas adquirem mutações que possibilitam a sua evasão da apoptose, prolongando e possibilitando a sua replicação continuada.
- O sequenciamento do genoma e do exoma das células cancerosas está ajudando a revelar as mutações importantes que ocorrem em muitos tipos de câncer e está fornecendo novas informações sobre a evolução das células cancerosas.
- As células cancerosas exibem várias alterações no seu metabolismo. Um importante achado que atraiu muita atenção é a elevada taxa de glicólise aeróbia exibida por muitas células. Foram descritas as possíveis explicações para esse fenômeno. As funções mitocondriais estão alteradas em muitas células cancerosas.
- De modo geral, o desenvolvimento do câncer é um processo em múltiplas etapas, que envolve alterações genéticas, epigenéticas e microambientais que conferem vantagem seletiva dos clones de células, dos quais alguns acabam adquirindo a capacidade de metastatizar com sucesso. Em virtude da diversidade das mutações, é possível que não existam dois tumores com genomas idênticos.

- Os marcadores tumorais podem ajudar no estabelecimento precoce do diagnóstico de câncer. Esses marcadores são particularmente utilizados para acompanhar a resposta do câncer ao tratamento e para detectar a ocorrência de recidivas. Esses marcadores podem ser pequenas moléculas, proteínas ou, como demonstrado recentemente, DNA circulante derivado de tumores.
- Os avanços na compreensão da biologia molecular das células neoplásicas levaram à introdução de muitas terapias novas, enquanto outras estão em fase de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–421.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ: Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24.
- Dawson MA, Kouzarides T: Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012;150:12–27.
- Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al: Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumors, immune cells and microorganisms. *Nature Rev Cancer* 2013;13:759–771.
- Green DR: *Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms*. Cold Spring Harbor Press, 2010.
- Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, et al: Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13:714–726.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al: Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types. *Nature* 2014;505:495–501.
- Ling H, Fabbri M, Calin GA: MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:847–865.
- Link A, Balaguer F, Goel A: Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1771–1792.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology*. 7th ed. WH Freeman & Co, 2012. (Contains a comprehensive chapter on cancer.)
- Tafari M, Pucci B, Russo A, et al: Modulators of HIF1a and NFkB in cancer treatment: is it a rational approach for controlling malignant progression? *Frontiers Pharmacol* 2013;4:1–10.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al: Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339:1546–1558. (This is one of four reviews on cancer biology in this issue of Science.)
- Ward PS, Thompson CB: Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012;21:297–308.
- Weinberg R: *The Biology of Cancer*, 2nd ed. Garland Science, 2013.
- Yachida S, Jones S, Bozic I, et al: Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010 (Oct 28);467(7319):1114.
- Zhao J, Lawless MW: Stop feeding cancer: proinflammatory role of visceral adiposity in liver cancer. *Cytokine* 2013;64:626–637.

WEBSITES ÚTEIS

- American Cancer Society. <http://www.cancer.org>
- National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health. <http://www.cancer.gov>
- The Cancer Genome Atlas. <http://cancergenome.nih.gov>

GLOSSÁRIO

- Aneuploidia:** refere-se a qualquer condição na qual o número de cromossomos de uma célula não é um múltiplo exato do número haploide básico. A aneuploidia é encontrada em muitas células tumorais e pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento do câncer.
- Angiogênese:** formação de novos vasos sanguíneos. A angiogênese geralmente está ativa ao redor das células tumorais, assegurando o fornecimento de suprimento sanguíneo adequado. Diversos fatores de crescimento são secretados pelas células tumorais e adjacentes (p. ex., fator de crescimento do endotélio vascular [VEGF]) e estão envolvidos nesse processo.
- Apoptose:** morte celular em decorrência da ativação de um programa genético que provoca fragmentação do DNA celular e outras alterações. As caspases desempenham um papel central no processo. A apoptose é afetada por numerosos reguladores positivos e negativos. A proteína p53 induz a apoptose como resposta à lesão do DNA. As células cancerosas exibem, em sua maioria, anormalidades no processo de apoptose, em decorrência de várias mutações que ajudam a garantir a sua sobrevivida prolongada.
- Câncer:** crescimento maligno de células.
- Carcinógeno:** qualquer agente (p. ex., um composto químico ou radiação) capaz de transformar células normais em cancerosas.
- Carcinoma:** crescimento maligno de origem epitelial. Um câncer de origem glandular ou que exiba características glandulares é geralmente designado como adenocarcinoma.
- Caspases:** enzimas proteolíticas que desempenham um papel central na apoptose, mas que também estão envolvidas em outros processos. Foram identificadas cerca de 15 caspases nos seres humanos. As caspases hidrolisam as ligações peptídicas imediatamente C-terminais aos resíduos de aspartato.
- Células malignas:** células cancerosas – células que têm a capacidade de crescer de modo desenfreado, invadir e propagar-se (sofrer metástase) para outras partes do corpo.
- Célula-tronco cancerosa:** célula dentro de um tumor que tem a capacidade de autorrenovação e de dar origem às linhagens heterogêneas de células cancerosas encontradas no tumor.
- Centríolo:** conjunto de microtúbulos em pares encontrado no centro de um centróssomo. (Ver também **Centrôssomo**)
- Centrômero:** região de constrição de um cromossomo mitótico onde as cromátides estão unidas. Está em estreita proximidade ao cinetocoro. A ocorrência de anormalidades nos centrômeros pode contribuir para CI. (Ver também **Cinetocoro**)
- Centrôssomo:** organela de localização central que constitui o principal centro de organização dos microtúbulos de uma célula. Atua como polo do fuso durante a divisão celular.
- Ciclo celular:** os vários eventos pertinentes à divisão celular, que ocorrem à medida que uma célula passa de uma mitose para outra.
- Cinetocoro:** estrutura que se forma em cada cromossomo mitótico em posição adjacente ao centrômero. As mutações que afetam as estruturas de suas proteínas constituintes podem contribuir para a CI. (Ver também **Centrômero**)
- Clone:** todas as células de um clone derivam de uma célula-mãe.
- Complexo cromossômico passageiro:** complexo de proteínas que desempenham um papel essencial na regulação da mitose. No centrômero, o complexo direciona o alinhamento dos cromossomos e participa na organização do fuso. As suas proteínas incluem a aurora B-quinase e a survivina. As mutações que afetam as proteínas desse complexo podem contribuir para a CI e a aneuploidia.
- Cromátide:** um único cromossomo.
- Cromossomo Filadélfia:** cromossomo formado por uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Constitui a causa da

leucemia mieloide crônica (LMC). Para formar o cromossomo anormal, parte do gene *BCR* (região de agrupamento de pontos de quebra) do cromossomo 22 funde-se com parte do gene *ABL* (que codifica uma tirosina-cinase) do cromossomo 9, dirigindo a síntese de proteína quimérica que apresenta atividade desregulada de tirosina-cinase e que estimula a proliferação celular. A atividade dessa cinase é inibida pelo fármaco Imatinibe, que tem sido utilizado com sucesso no tratamento da LMC. (Ver também **Translocação cromossômica**)

Deslizamento na replicação: processo em que, devido ao alinhamento incorreto das fitas de DNA onde ocorrem sequências repetidas, a DNA-polimerase para e dissocia-se, resultando em deleções ou inserções de sequências repetidas.

Ensaio de Ames: sistema de ensaio planejado pelo Dr. Bruce Ames que utiliza cepas especiais de *Salmonella typhimurium* para detectar agentes mutagênicos. Os carcinógenos são, em sua maioria, mutagênicos, porém, se a mutagenicidade de determinado composto químico for detectada, o ideal é que sejam testados novos compostos químicos para a sua carcinogenicidade em animais.

Epigenética: refere-se a alterações da expressão gênica, sem qualquer alteração da sequência de bases do DNA. Os fatores que provocam alterações epigenéticas incluem metilação de bases do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e remodelagem da cromatina.

Fatores de crescimento: variedade de peptídeos secretados por muitas células normais e tumorais. Essas moléculas atuam de modo autócrino (afetam as células que produzem o fator de crescimento), parácrino (afetam as células adjacentes) ou endócrino (circulam no sangue para afetar células distantes). Eles estimulam a proliferação de células-alvo por meio de interações com receptores específicos. Também apresentam muitas outras propriedades biológicas.

Fatores induzíveis por hipóxia (HIFs): família de fatores de transcrição (pelo menos três) importantes na determinação das respostas celulares a níveis variáveis de oxigênio. Cada fator é constituído de uma subunidade α diferente regulada por oxigênio e de uma subunidade β constitutiva comum. Na presença de níveis fisiológicos de oxigênio, a subunidade α sofre rápida degradação, sendo o processo iniciado por prolil-hidroxilases. Os HIFs desempenham várias funções; por exemplo, o HIF-1 regula positivamente vários genes que codificam enzimas da glicólise, bem como a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

Gene de manutenção (Gatekeeper): versão mutada de um gene que inicia a cascata de eventos que causa oncogênese (p. ex., *RB*).

Gene supressor de tumor: gene cujo produto proteico normalmente reprime o crescimento celular; entretanto, quando a sua atividade é perdida ou reduzida por mutações, ele contribui para o desenvolvimento de uma célula cancerosa.

Instabilidade cromossômica (CIN): taxa de ganho ou de perda de cromossomos inteiros ou de segmentos em decorrência de anormalidades de sua segregação durante a mitose. (Ver também **Instabilidade genômica** e **Instabilidade dos microssatélites**) Existem vários distúrbios designados como síndromes de CIN devido à sua associação a anormalidades cromossômicas. Uma delas é a síndrome de Bloom, na qual se observa elevada frequência de trocas de cromátides-irmãs. Nessas condições, observa-se alta incidência de vários tipos de câncer.

Instabilidade dos microssatélites: expansão ou contração de repetições em *tandem* curtas (microssatélites), devido ao deslizamento da replicação ou a anormalidades no reparo de pareamento desigual ou de recombinação homóloga. Para **Microssatélites**, ver Capítulo 35.

Instabilidade genômica: refere-se a diversas alterações do genoma; as duas principais consistem em instabilidade cromossômica e instabilidade dos microssatélites. Em geral, reflete o fato de os genomas das células cancerosas serem mais suscetíveis a mutações do que as células normais, devido, em parte, ao comprometimento dos sistemas de reparo do DNA.

Leucemias: variedade de doenças malignas em que diferentes leucócitos (p. ex., mieloblastos, linfoblastos, etc.) se proliferam de maneira descontrolada. As leucemias podem ser agudas ou crônicas.

Linfoma de Burkitt: trata-se de um linfoma de células B endêmico em certas regiões da África, onde acomete principalmente a mandíbula e os ossos da face. É também encontrado em outras áreas. Caracteriza-se por translocação recíproca envolvendo o gene *C-MYC* no cromossomo 8 e o gene da cadeia pesada das imunoglobulinas no cromossomo 14.

Linfoma: grupo de neoplasias que surgem nos sistemas reticuloendotelial e linfático. Os principais membros do grupo são os linfomas de Hodgkin e os linfomas não Hodgkin.

Metástase: capacidade das células cancerosas de se propagarem em partes distantes do corpo, onde crescem.

Modificadores da resposta biológica: moléculas produzidas pelo corpo ou em laboratório que, quando administradas a pacientes, alteram a resposta do corpo à infecção, à inflamação e a outros processos. Os exemplos incluem anticorpos monoclonais, citocinas, interleucinas, interferons e fatores de crescimento.

Mutação condutora (driver): mutação de um gene que ajuda a causar câncer ou a acelerá-lo. As mutações encontradas em tumores que não provocam câncer nem a sua progressão são denominadas mutações passageiras.

Nanotecnologia: desenvolvimento e aplicação de dispositivos cujo tamanho é de apenas alguns nanômetros. (10^{-9} m = 1 nm). Alguns estão sendo aplicados na terapia do câncer. Por exemplo, os **nanoshells** (partículas esféricas muito pequenas com centro de sílica e revestimento de ouro), ajustados para a luz próxima ao infravermelho, foram administrados a camundongos com tumores, nos quais essas partículas se acumulam. Subsequentemente, os tumores foram submetidos a uma luz de *laser* próxima ao infravermelho. Isso aqueceu seletivamente os tumores, destruindo-os, e não houve sinal de recidiva durante o acompanhamento. (Morton JG, et al: Nanoshells for photothermal cancer therapy. *Methods Mol Biol* 2010;624:101. June 25, 2010.)

Necrose: morte celular induzida por compostos químicos ou lesão tecidual. Várias enzimas hidrolíticas são liberadas e digerem as moléculas celulares. Não se trata de um programa geneticamente programado, como no caso da apoptose. As células afetadas sofrem ruptura e liberam seu conteúdo, causando inflamação local.

Neoplasia: qualquer crescimento novo de tecido, seja ele benigno ou maligno.

Oncogene: proto-oncogene mutado, cujo produto proteico está envolvido na transformação de uma célula normal em célula cancerosa.

Oncologia: área da ciência médica que trata de todos os aspectos do câncer (causas, diagnóstico, tratamento, etc.).

Perda da heterozigosidade (LOH): ocorre quando há perda do alelo normal (que frequentemente codifica um gene supressor de tumor) de um par de cromossomos heterozigotos, possibilitando a manifestação clínica das consequências do alelo defeituoso.

Pólipo adenomatoso: tumor benigno de origem epitelial que apresenta potencial para se transformar em carcinoma. Com frequência, os adenomas são polipoides. Um pólipo é um crescimento que faz protrusão de uma membrana mucosa; a maioria é de natureza benigna, porém alguns podem se tornar malignos.

Pró-carcinógeno: composto químico que se transforma em carcinógeno quando alterado pelo metabolismo.

Proto-oncogene: gene celular normal que, quando sofre mutação, pode dar origem a um produto que estimula o crescimento das células, contribuindo para o desenvolvimento do câncer.

Receptor de FAS: receptor que inicia a apoptose quando se liga a seu ligante, FAS. A FAS é uma proteína encontrada na superfície de células *natural killer* (NK) ativadas, linfócitos T citotóxicos e outras fontes.

Remodelagem da cromatina: envolve mudanças na conformação dos nucleossomos produzidas pelas ações de complexos multiproteicos (como o complexo SW1/SNF). Essas mudanças alteram a transcrição dos genes (estimulação ou repressão, dependendo das condições específicas). Os complexos contêm domínios homólogos à helicase dependente de ATP; esses complexos estão envolvidos nas mudanças de conformação. As mutações que afetam as proteínas dos complexos, como as que podem ocorrer em células cancerosas, podem afetar a expressão dos genes. (Ver também **Epigenética**)

Retinoblastoma: tumor raro da retina. A mutação do gene supressor de tumor *RB* desempenha um papel essencial no seu desenvolvimento. Os pacientes com retinoblastoma hereditário herdam uma cópia do gene *RB* que sofreu mutação e necessitam de apenas uma mutação adicional para desenvolver o tumor. Pacientes com retinoblastoma esporádico nascem com duas cópias normais e devem sofrer duas mutações para inativar o gene.

Sarcoma: tumor maligno de origem mesenquimal (p. ex., de células da matriz extracelular ou de outras fontes).

Síndrome de Bloom: uma das síndromes de instabilidade cromossômica. Deve-se às mutações em uma DNA-helicase; os indivíduos são sensíveis à lesão do DNA e podem desenvolver vários tumores.

Telômeros: estruturas nas extremidades do cromossomo que contêm múltiplas repetições de sequências específicas de DNA de hexanucleotídeos. Os telômeros das células normais encurtam-se com as divisões celulares repetidas, podendo levar à morte da célula. A enzima telomerase atua na replicação dos telômeros e,

com frequência, está expressa nas células cancerosas, ajudando-as a escapar da morte celular. Em geral, a telomerase não é detectada nas células somáticas normais.

Transformação: processo pelo qual células normais em cultura de tecido transformam-se em células anormais (p. ex., por vírus oncogênicos ou por compostos químicos), algumas das quais podem ser malignas.

Translocação cromossômica: ocorre quando parte de um cromossomo se funde com outro, causando a ativação de um gene nesse local. O cromossomo Filadélfia (ver anteriormente) é um dos muitos exemplos de translocação cromossômica envolvida na etiologia do câncer.

Translocação: deslocamento de uma parte de um cromossomo para outro cromossomo ou para uma parte diferente do mesmo cromossomo. Os exemplos clássicos incluem a translocação encontrada no linfoma de Burkitt (ver anteriormente) e a translocação entre os cromossomos 9 e 22, que produz o cromossomo Filadélfia encontrado na LMC. Foram identificadas translocações em muitas células cancerosas.

Tumor benigno: massa de células de proliferação anormal cujo crescimento é orientado por mutações em pelo menos um oncogene ou gene supressor de tumor. Essas células tumorais não são invasivas e não sofrem metástase.

Tumor: qualquer crescimento novo de tecido, mas frequentemente se refere a uma neoplasia benigna ou maligna.

Variações no número de cópias (CNVs): variações (devido a duplicações ou a deleções) entre indivíduos no número de cópias de determinados genes. As CNVs estão sendo mais reconhecidas para diversos genes, e algumas podem estar associadas a várias doenças, incluindo determinados tipos de câncer.

Vírus do sarcoma de Rous (RSV): vírus tumoral de RNA que provoca sarcomas em galinhas. Foi descoberto, em 1911, por Peyton Rous. Trata-se de um retrovírus que utiliza a transcriptase reversa em sua replicação; a cópia de DNA de seu genoma integra-se subsequentemente no genoma da célula hospedeira. Foi amplamente utilizado em estudos de cânceres, resultando em muitos achados importantes.

Histórias de casos bioquímicos

David A. Bender, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Utilizar o seu conhecimento para explicar os distúrbios bioquímicos básicos nas doenças.

INTRODUÇÃO

Neste capítulo final, são apresentadas nove histórias de casos como questões não solucionadas para você resolvê-las com base no que aprendeu a partir do estudo deste livro. Não são fornecidas soluções e não existem discussões dos casos; tudo o que você precisa saber para explicar os problemas está disponível em algum lugar deste livro.

Em muitos casos, os resultados clínicos do paciente são apresentados juntamente com as faixas de referência. Estas poderão diferir entre um problema e outro e a partir das faixas de referência da Tabela 48-3, pois, conforme discutido no Capítulo 48, os níveis de referência de diferentes laboratórios diferem em muitos casos.

CASO 1

O paciente é um menino de 5 anos, nascido em 1967, a termo, após uma gestação sem intercorrências. Ele foi um bebê doente e não cresceu saudável. Em várias ocasiões, a sua mãe observou que ele parecia sonolento ou até comatoso, e disse haver notado um odor “químico, semelhante a álcool” na sua respiração e na sua urina. O clínico geral suspeitou de diabetes melito e mandou-o para o Middlesex Hospital, em Londres, para fazer um teste de tolerância à glicose. Os resultados são mostrados na **Figura 57-1**.

Também foram colhidas amostras de sangue para avaliação da insulina no momento zero e 1 hora após a carga de glicose. Nesse momento, estava sendo desenvolvido um novo método para avaliação da insulina, o radioimensaio (ver Capítulo 48) e, portanto, tanto este quanto o ensaio biológico convencional foram utilizados. O método biológico para avaliação da insulina atua por meio da sua capacidade de estimular a captação e o metabolismo da glicose em músculo de rato *in vitro*; este pode ser realizado de forma relativamente

simples medindo-se a radiatividade no $^{14}\text{CO}_2$ após incubar amostras-duplicatas do músculo com $[^{14}\text{C}]$ glicose, na presença e na ausência da amostra contendo insulina. Os resultados estão mostrados na **Tabela 57-1**.

Como parte de seus estudos sobre o novo radioimensaio para insulina, a equipe do Middlesex Hospital realizou a cromatografia de exclusão em gel de uma amostra mista de soro normal e determinou a insulina nas frações eluídas das colunas tanto por radioimensaio (gráfico A da **Figura 57-2**) quanto pelo estímulo da oxidação da glicose (gráfico B). Foram utilizados três marcadores de peso molecular, os quais foram eluídos nas seguintes amostras: M_r 9.000 na fração 10, M_r 6.000 na fração 23 e M_r 4.500 na fração 27.

Os pesquisadores também avaliaram a insulina nas frações eluídas da coluna de cromatografia após o tratamento de cada fração com a tripsina. Os resultados estão mostrados no gráfico C.

Após ver os resultados desses estudos, eles submeteram a mesma amostra de soro mista a um breve tratamento com tripsina e realizaram a cromatografia de exclusão em gel do produto. Mais uma vez, avaliaram a insulina por radioimensaio (gráfico D) e por ensaio biológico (gráfico E).

Desde a realização desses estudos nos anos 1960, o gene da insulina humana tem sido clonado. Embora a insulina compreenda duas cadeias peptídicas, com 21 e 30 aminoácidos de comprimento respectivamente, estas são codificadas por um único gene, que possui um total de 330 pares de bases entre os códons de início e de término. Como seria esperado para uma proteína secretada, existe uma sequência sinalizadora que codifica 24 aminoácidos na extremidade 5' do gene.

O que sugere essa informação sobre os processos que ocorrem na síntese da insulina?

Qual deverá ser a base bioquímica inicial do problema do paciente?

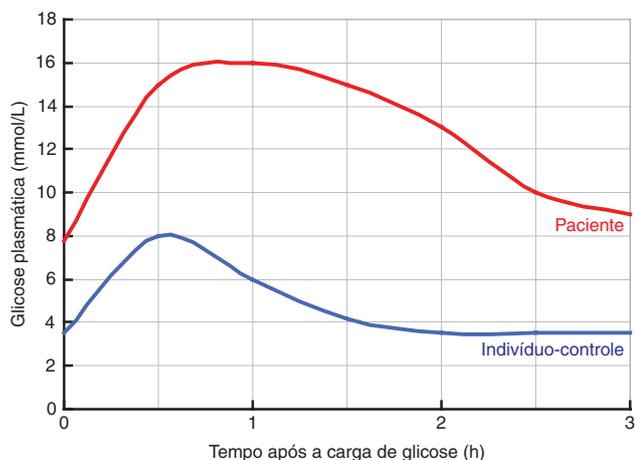


FIGURA 57-1 Glicose plasmática do paciente e de um controle após uma dose-teste de glicose.

CASO 2

O paciente é um homem de 50 anos, com 1,74 m de altura e pesando 105 kg. Ele é engenheiro e trabalha no destacamento em um dos rigorosos estados islâmicos, no Golfo, onde o consumo de álcool é proibido. No início de agosto, voltou para casa para cumprir sua licença anual. De acordo com sua família, ele comportou-se como sempre fazia quando em licença, consumindo grande quantidade de álcool e recusando refeições. Sabia-se que ele bebia 2 L de uísque, 2 ou 3 garrafas de vinho a uma dúzia ou mais de latas de cerveja por dia; a sua única comida sólida consistia em doces e biscoitos.

No dia 1º de setembro, ele foi admitido no departamento de emergência, semiconsciente e apresentando frequência respiratória acelerada (40/min). A sua pressão era de 90/60 e seu pulso, 136/min. A sua temperatura estava normal (37,1°C). A análise gasosa do sangue na emergência revelou acidose grave: pH de 7,02 e excesso de base – 23; pO_2 de 91 mmHg e pCO_2 de 10 mmHg. Ele foi transferido para o tratamento intensivo e recebeu bicarbonato intravenoso.

O seu pulso permaneceu elevado, e a sua pressão sanguínea, baixa; foi realizado, então, um cateterismo cardíaco de emergência, que revelou débito cardíaco de 23 L/min (normal: 4 a 6). A radiografia de tórax revelou significativo alargamento cardíaco.

A Tabela 57-2 mostra os resultados clínicos laboratoriais de uma amostra de plasma colhida logo após sua admissão.

Qual é a provável base bioquímica para o problema do paciente que levou à sua hospitalização de emergência?

Qual(is) teste(s) adicional(is) você pediria para confirmar sua hipótese?

Qual tratamento de emergência você sugeriria?

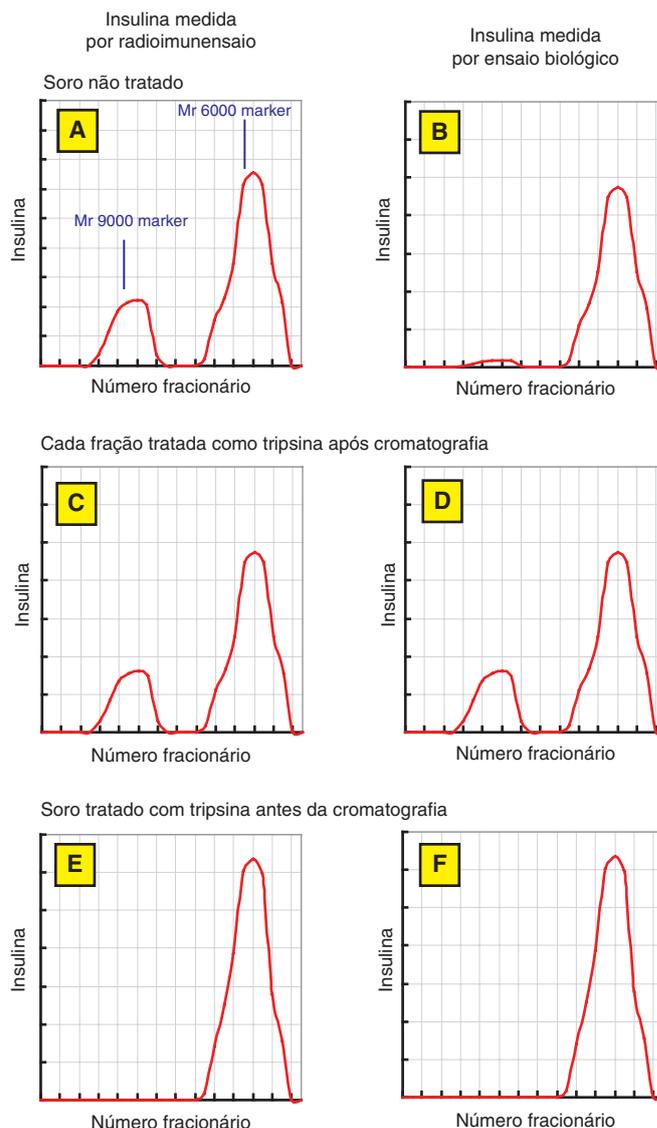


FIGURA 57-2 Insulina medida por radioimunensaio e ensaio biológico antes e depois do tratamento das amostras de plasma com tripsina.

CASO 3

O paciente é um afro-americano recruta do exército. Ele recebeu o fármaco antimalárico primaquina e apresentou reação tardia com dor renal, urina escura e baixas contagens de hemácias que o levaram à anemia e à fraqueza. A centrifugação de uma amostra de sangue evidenciou baixo hematócrito e plasma de cor vermelha.

TABELA 57-1 Insulina sérica (mU/L) medida por ensaio biológico e radioimunensaio

	Amostra sanguínea inicial (jejum)		1 hora após carga de glicose	
	Paciente (Caso 1)	Indivíduos-controle	Paciente (Caso 1)	Indivíduos-controle
Ensaio biológico	0,8	6 ± 2	5	40 ± 11
Radioimunensaio	10	6 ± 2	50	40 ± 11

TABELA 57-2 Resultados clínicos laboratoriais do paciente do Caso 2 na sua admissão; todos os valores estão expressos em mmol/L

	Paciente do Caso 2	Faixa de referência
Glicose	10,6	3,5-5
Sódio	142	131-151
Potássio	3,9	3,4-5,2
Cloro	91	100-110
Bicarbonato	5	21-29
Lactato	18,9	0,9-2,7
Piruvato	2,5	0,1-0,2

Foram observados ataques hemolíticos agudos semelhantes, predominantemente em homens de origem afro-caribenha, em resposta à primaquina e a uma variedade de outros fármacos, incluindo dapsona, o antipirético acetilfenil-hidrazina, o antibacteriano bactrim/septrin, sulfonamidas e sulfonas, cuja única característica comum é sofrerem reações não enzimáticas cíclicas na presença de oxigênio para produzir peróxido de hidrogênio e uma variedade de radicais de oxigênio que podem causar dano oxidativo aos lipídeos da membrana, levando à hemólise. A infecção moderadamente grave também pode precipitar crise hemolítica em indivíduos suscetíveis.

Uma forma de avaliar a sensibilidade à primaquina baseia-se na observação de que a concentração de glutatona das hemácias de indivíduos suscetíveis é, de alguma forma, inferior à dos indivíduos-controle e cai consideravelmente quando incubada com acetilfenil-hidrazina.

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo, γ -glutamil-cisteinil-glicina, que sofre oxidação rapidamente para formar um hexapeptídeo ligado por ligações dissulfeto, a glutatona oxidada, geralmente abreviada como GSSG. A Tabela 57-3 mostra as concentrações de GSH e GSSG nas hemácias do paciente e de 10 indivíduos-controle, antes e depois da incubação com acetilfenil-hidrazina.

Quanto de GSH é oxidado por mol de acetilfenil-hidrazina adicionado?

O K_m registrado da glutatona redutase para GSSG é de 65 mmol/L e, para NADPH, de 8,5 μ mol/L. Os lisados de hemácias foram incubados com concentração saturante de GSSG (1 μ mol/L) e de NADPH ou NADH (100 mmol/L). Cada incubação continha o hemolisado de 0,5 mL de hemácias (Tabela 57-4).

TABELA 57-4 Glutaciona-reductase, μ mol de produto formado/min

	Paciente do Caso 3	Indivíduos-controle
NADPH	0,64	0,63 \pm 0,06
NADH	0,01	0,01 \pm 0,001

Como nenhum dos lisados de hemácias apresentou qualquer atividade significativa com NADH, é improvável que exista qualquer atividade transidrogenase nas hemácias, para reduzir NADP⁺ a NADPH com o consumo de NADH. Esse fato traz o problema da origem do NADPH nas hemácias.

O corante azul de metileno oxidará o NADPH; em seguida, o corante reduzido sofre oxidação não enzimática no ar, de modo que a adição de quantidade relativamente pequena de azul de metileno depletará o NADPH efetivamente e deverá estimular qualquer via que reduza NADP⁺ a NADPH.

As hemácias dos indivíduos-controle foram incubadas com 10 mmol/L [¹⁴C]glicose com ou sem adição de azul de metileno; todos os seis possíveis isômeros posicionais de [¹⁴C]glicose foram usados, e foi determinada a radiatividade do (lactato + piruvato) após cromatografia de camada fina da mistura de incubação. Cada incubação continha 1 mL de hemácias em um volume total de incubação de 2 mL (Tabela 57-5).

Em estudos posteriores, apenas a formação de ¹⁴CO₂ a partir da [¹⁴C-1]glicose foi avaliada, com a adição de:

- Ascorbato de sódio (que sofre reação não enzimática no ar para produzir H₂O₂)
- Acetilfenil-hidrazina (que sabidamente precipita a hemólise em indivíduos sensíveis e depleta a glutatona reduzida)
- Azul de metileno (que oxida NADPH)

As incubações foram repetidas com *N*-etilmaleimida, que sofre reação não enzimática com o grupo —SH da glutatona reduzida e, em seguida, depleta a célula de glutatona total. Os resultados são mostrados na Tabela 57-6.

Estudos posteriores mostraram que as hemácias do paciente continham apenas cerca de 20% da atividade normal da glicose-6-fosfato-desidrogenase (ver Capítulo 20). A fim de investigar por que essa atividade enzimática era tão baixa, uma amostra de suas hemácias foi incubada a 45°C por 60 minutos e, em seguida, resfriada a 30°C, e a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase foi determinada. Após a pré-incubação a 45°C, suas hemácias apresentaram apenas 60% de sua atividade inicial. Por outro lado, as hemácias dos indivíduos-controle conservaram 90% de sua atividade inicial após pré-incubação a 45°C por 60 minutos.

O que você pode concluir a partir desses resultados?

TABELA 57-3 Efeito da incubação com 330 μ mol/L de acetilfenil-hidrazina na glutatona da hemácia

	Paciente do Caso 3		Indivíduos-controle	
	GSH (mmol/L)	GSSG (mmol/L)	GSH (mmol/L)	GSSG (mmol/L)
Inicial	1,61	400	2,01 \pm 0,29	4,2 \pm 0,61
+ Acetilfenil-hidrazina	0,28	1.540	1,82 \pm 0,24	190 \pm 28

TABELA 57-5 Produção de [¹⁴C]lactato, piruvato e CO₂ por 1 mL de hemácias dos indivíduos-controle incubados por 1 hora com 10 mmol/L [¹⁴C]glicose a 10 μCi/mmol

	Controle		+ Azul de metileno	
	Lactato + piruvato	CO ₂	Lactato + piruvato	CO ₂
[¹⁴ C-1]Glicose	12.680 ± 110	1.410 ± 15	1.830 ± 20	12.260 ± 130
[¹⁴ C-2]Glicose	14.080 ± 120	ND	14.120 ± 120	ND
[¹⁴ C-3]Glicose	14.100 ± 120	ND	14.090 ± 120	ND
[¹⁴ C-4]Glicose	14.060 ± 120	ND	14.080 ± 120	ND
[¹⁴ C-5]Glicose	14.120 ± 120	ND	14.060 ± 120	ND
[¹⁴ C-6]Glicose	14.090 ± 110	ND	14.100 ± 120	ND

ND, não detectável, isto é, abaixo dos limites de detecção.

Os valores mostram dpm, média ± desvio-padrão para incubações quintuplicadas.

CASO 4

O paciente é um menino maltês de 10 anos. No seu aniversário, uma tia deu-lhe uma torta feita de feijão-fava (uma especialidade local), e naquela noite ele apresentou dor renal e urina escura. Um esfregaço de sangue evidenciou baixa contagem de hemácias e plasma de cor vermelha. Esse problema não é raro em Malta, e, na verdade, vários de seus colegas de escola (todos meninos) morreram quando uma crise aguda foi precipitada pela ingestão de feijões-fava ou após febre moderada associada a uma infecção.

Estudos posteriores mostraram que ele apresentava apenas 10% de glicose-6-fosfato-desidrogenase em suas hemácias e K_m muito elevado para o NADP⁺. Ao contrário do paciente do Caso 3, a sua enzima da hemácia apresentava-se tão estável quando incubada a 45°C quanto a dos indivíduos-controle.

O que você pode concluir a partir dessas observações?

CASO 5

O paciente é uma bebê de 28 semanas. Ela foi admitida no departamento de emergência em coma, tendo sofrido convulsão após se alimentar. Na ocasião, apresentou infecção branda e febre moderada. Desde o seu nascimento, ela era uma criança doente, vomitava frequentemente e ficava sonolenta após se alimentar. Ela foi alimentada com mamadeira e em algum momento se suspeitou de alergia ao leite de vaca, embora os problemas tenham persistido quando foi alimentada com leite de soja.

TABELA 57-6 Produção de ¹⁴CO₂ por 1 mL de hemácias de indivíduos-controle incubados por 1 hora com 10 mmol/L [¹⁴C-1]glicose a 10 μCi/mmol

Adições	Controle	+ N-Etilmaleimida
Nenhuma	1.410 ± 70	670 ± 30
Ascorbato	8.665 ± 300	2.133 ± 200
Acetilfenil-hidrazina	7.740 ± 320	4.955 ± 325
Azul de metileno	12.230 ± 500	11.265 ± 450

Os valores mostram dpm, média ± desvio-padrão para incubações quintuplicadas.

Em sua admissão, ela estava levemente hipoglicêmica e cetótica, e o pH do seu plasma era de 7,29. A análise de uma amostra de sangue mostrou níveis normais de insulina, porém considerável hiperamoniemia (concentração de íon amônio no plasma de 500 μmol/L; faixa de referência de 40 a 80 μmol/L). Ela respondeu bem à infusão intravenosa de glicose e à infusão retal de lactulose, recuperando a consciência. Apresentava tônus muscular fraco.

Foi feita biópsia hepática e foram determinadas as atividades das enzimas da síntese de ureia (ver Capítulo 28) e comparadas com as atividades de amostras hepáticas *postmortem* de 6 bebês da mesma idade. Os resultados são mostrados na Tabela 57-7. Ela continuou bem quando submetida a uma dieta de alto carboidrato e baixa proteína por vários dias, embora tenham persistido o tônus muscular fraco e a fraqueza muscular. Foi colhida uma segunda amostra de biópsia hepática após 4 dias, e a atividade das enzimas foi novamente determinada.

A sua dieta com teor proteico muito reduzido foi mantida; no entanto, para garantir suprimento adequado de aminoácidos essenciais para seu crescimento, ela recebeu uma mistura dos cetoácidos de treonina, metionina, leucina, isoleucina e valina. Após cada refeição, mais uma vez ela se mostrava anormalmente sonolenta e fortemente cetótica, com acido-se significativa. Sua concentração plasmática de íon amônio estava na faixa normal e seu teste de tolerância à glicose era normal, com aumento normal na secreção de insulina após a carga de glicose.

A cromatografia líquida de alta pressão do seu plasma revelou concentração anormalmente elevada de ácido propiônico (24 μmol/L; faixa de referência de 0,7 a 3,0 μmol/L). A análise da urina evidenciou considerável excreção de metilcitrato (1,1 μmol/mg de creatinina), que normalmente não é detectável. Ela estava sempre secretando uma quantidade significativa de acilcarnitina de cadeia curta (principalmente propionilcarnitina) – 28,6 μmol/24 h, comparada com uma faixa de referência de 5,7 + 3,5 μmol/24 h.

O metabolismo de uma dose-teste de [¹³C]propionato administrada por infusão intravenosa foi determinado no paciente, em seus pais e em um grupo de indivíduos-controle; os fibroblastos da pele foram cultivados e a atividade da propionil-CoA-carboxilase foi determinada por incubação com

TABELA 57-7 Atividade das enzimas do ciclo da síntese da ureia em amostras de biópsia hepática da paciente do Caso 5 na admissão e após 4 dias mantida em dieta de alto carboidrato e baixa proteína, comparada às atividades de amostras *postmortem* de 6 bebês da mesma idade

	μmol de produto formado/min/mg de proteína		
	Paciente		Indivíduos-controle
	Na admissão	Após 4 dias	
Carbamoil-fosfato-sintase	0,337	1,45	1,30 ± 0,40
Ornitina-carbamiltransferase	29,0	28,6	18,1 ± 4,9
Argininossuccinato-sintase	0,852	0,75	0,49 ± 0,09
Argininossuccinase	1,19	0,95	0,64 ± 0,15
Arginase	183	175	152 ± 56

propionato e $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, seguida por acidificação e avaliação da radioatividade nos produtos. Os resultados estão mostrados na **Tabela 57-8**.

Os resultados da avaliação da carnitina na primeira amostra de biópsia hepática e em uma amostra de biópsia muscular geraram os resultados mostrados na **Tabela 57-9**.

O que você pode concluir a partir desses resultados?

Explique a base bioquímica da condição da paciente.

CASO 6

A paciente é uma menina de 9 meses de idade, a segunda filha de pais não consanguíneos. Ela nasceu a termo após uma gravidez sem intercorrências, pesando 3,4 kg, e foi amamentada no peito, com introdução gradual de sólidos a partir dos 3 meses de idade. A sua mãe informou que, embora ela gostasse de queijo, carne e peixe, frequentemente ficava irritada e acinzentada após as refeições e se tornava letárgica, sonolenta e “flácida” após ingerir quantidades relativamente grandes de alimentos ricos em proteína. Nessas ocasiões, sua urina apresentava odor estranho, descrito pela sua mãe como “semelhante à do gato”.

Aos 9 meses de idade, ela deu entrada no departamento de emergência em coma e apresentando convulsões. Ela não estava bem nos últimos 3 dias, apresentava febre branda e, nas últimas 12 horas, recusou qualquer alimento ou bebida. Naquela ocasião, ela pesava 8,8 kg e seu comprimento era de 70,5 cm.

Os testes sanguíneos de emergência revelaram acidose moderada (pH 7,25) e hipoglicemia severa (glicose < 1 mmol/L); o teste de gota para a presença de corpos cetônicos no plasma foi negativo. Foi retirada uma amostra de sangue para a

realização dos testes clínicos laboratoriais completos e ela recebeu glicose intravenosa. Em um curto período de tempo, ela recuperou a consciência. Os resultados dos testes sanguíneos são mostrados na **Tabela 57-10**.

Ela permaneceu no hospital por várias semanas, e nesse tempo foram realizados testes adicionais. De maneira geral, ela passou bem durante esse período, porém se tornava sonolenta e severamente hipoglicêmica e hiperventilada caso fosse privada de alimento por mais de 8 a 9 horas. O seu tônus muscular era fraco, e ela ficou muito fraca, com consideravelmente menos força (p. ex., ao empurrar seus braços ou pernas contra a mão do pediatra) do que seria esperado para uma menina da sua idade.

Na ocasião, sua glicose sanguínea foi monitorada a intervalos de 30 minutos durante 3 horas após acordar, sem que fosse alimentada. A dosagem caiu de 3,4 mmol/L ao acordar para 1,3 mmol/L 3 horas mais tarde. Ela foi novamente privada do café da manhã no dia seguinte e mais uma vez a glicose sanguínea foi medida em intervalos de 30 minutos por 3 horas, durante as quais ela recebeu infusão intravenosa de β-hidroxibutirato (50 μmol/min/kg de peso corporal). Durante a infusão de β-hidroxibutirato, a sua glicose plasmática permaneceu entre 3,3 e 3,5 mmol/L.

Em nenhum momento foram detectados corpos cetônicos em sua urina e não houve evidência de qualquer excreção anormal de aminoácidos. Entretanto, diversos ácidos orgânicos anormais foram detectados na sua urina, incluindo quantidades relativamente grandes dos ácidos 3-hidroxi-3-metilglutárico e 3-hidroxi-3-metilglutacônico. A excreção desses dois ácidos aumentou consideravelmente sob duas condições:

1. Quando recebeu refeição de teor proteico relativamente elevado (ela tornou-se acinzentada, letárgica e irritada). Uma amostra colhida após essa refeição mostrou hiperamoniemia significativa (130 mmol/L), mas glicose normal (5,5 mmol/L).
2. Quando ficou em jejum por um período maior que o jejum noturno normal, com ou sem a infusão de β-hidroxibutirato.

Um precursor metabólico óbvio do ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico é a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é normalmente clivada para gerar acetato e a acetil-CoA pela

TABELA 57-8 Metabolismo do [^{13}C]propionato

	Paciente do Caso 5			Indivíduos-controle
	Mãe	Pai		
Percentual recuperado em $^{13}\text{CO}_2$ durante 3 h	1,01	32,6	33,5	65 ± 5
dpm fixada/mg de proteína do fibroblasto/30 min	5,0	230	265	561 ± 45

TABELA 57-9 Carnitina hepática e muscular

μmol/g de peso de tecido	Fígado		Músculo	
	Paciente do Caso 5	Indivíduos-controle	Paciente do Caso 5	Indivíduos-controle
Carnitina total	0,23	0,83 ± 0,26	1,56	2,29 ± 0,75
Carnitina livre	0,05	0,41 ± 0,17	0,29	1,62 ± 0,67
Acilcarnitina de cadeia curta	0,16	0,37 ± 0,20	1,16	0,58 ± 0,32
Acilcarnitina de cadeia longa	0,01	0,05 ± 0,02	0,11	0,09 ± 0,03

enzima hidroximetilglutaril-CoA-liase (Capítulo 22). Portanto, a atividade dessa enzima foi determinada em leucócitos a partir de amostras de sangue da paciente e de seus pais. Os resultados são mostrados na **Tabela 57-11**.

A análise da sua urina também revelou excreção considerável de carnitina, como mostrado na **Tabela 57-12**.

Qual é a provável base bioquímica inicial do problema da paciente?

Até que ponto você pode explicar os diversos problemas metabólicos da paciente a partir das informações que recebeu?

Quais manipulações alimentares poderiam mantê-la em boa saúde e prevenir posteriores internações hospitalares de emergência?

CASO 7

O paciente é um menino de 9 meses de idade, o segundo filho de pais não consanguíneos; seu irmão tem 5 anos, está em boa forma e é saudável. Ele nasceu a termo após uma gestação sem intercorrências, pesando 3,4 kg (o 50º centil), e desenvolveu-se normalmente até os 6 meses de idade, quando, em seguida, apresentou algum retardo de desenvolvimento. Também desenvolveu erupção cutânea bastante escamosa nesse período, e seu cabelo, que antes era normal, tornou-se fino e esparso.

TABELA 57-10 Resultados clínicos laboratoriais de uma amostra de plasma da paciente do Caso 6 na admissão e faixa de referência para 24 horas de jejum

	Paciente do Caso 6	Faixa de referência
Glicose, mmol/L	0,22	4-5
pH	7,25	7,35-7,45
Bicarbonato, mmol/L	11	21-29
Amônio, μmol/L	120	< 50
Corpos cetônicos, mmol/L	Indetectável	2,5-3,5
Ácidos graxos não esterificados, mmol/L	2	1,0-1,2
Insulina, mU/L	5	5-35
Glucagon, ng/mL	140	130-160

Aos 9 meses de idade, ele deu entrada no departamento de emergência em coma; os resultados de seus testes clínicos laboratoriais de uma amostra de sangue são mostrados na **Tabela 57-13**.

A acidose foi tratada por infusão intravenosa de bicarbonato, e ele recuperou a consciência. Durante os próximos dias, ele continuou a mostrar sinais de acidose (respiração rápida), e, mesmo após uma refeição, os corpos cetônicos estavam presentes na sua urina. A sua concentração plasmática de lactato, piruvato e corpos cetônicos permaneceu elevada; a glicose plasmática estava no limite inferior do normal, e a sua insulina plasmática estava normal tanto durante o jejum quanto após carga de glicose oral.

A análise da urina revelou a presença de quantidades significativas de diversos ácidos orgânicos que normalmente não são excretados na urina, incluindo:

- Lactato, piruvato e alanina
- Propionato, hidroxipropionato e propionilglicina
- Metilcitrato
- Tiglato e tigilglicina
- 3-Metilcrotonato, 3-metilcrotonilglicina e 3-hidroxi-isovalerato

O seu exantema cutâneo e sua perda de cabelo foram reminiscentes dos sinais de deficiência de biotina (ver Capítulo 44), como o causado pelo consumo excessivo de clara de ovo crua. Entretanto, a sua mãe relatou que ele definitivamente não havia ingerido ovos crus ou malcozidos, embora ele gostasse de ovos cozidos e extrato de levedura (que são fontes ricas em biotina). Sua concentração plasmática de biotina era de 0,2 nmol/L (normal > 0,8 nmol/L), e ele excretou quantidade significativa de biotina sob a forma de biocitina (ver Figura 44-17) e de pequenos peptídeos contendo biocitina, que, normalmente, não são detectáveis na urina.

Ele foi tratado com 5 mg de biotina por dia. Após 3 dias, os ácidos orgânicos anormais não mais eram detectados na sua urina, e sua concentração plasmática de lactato, piruvato e corpos cetônicos tinha retornado ao normal, embora

TABELA 57-11 Atividade em leucócitos da HMG-CoA-liase, nmol de produto formado/min/g de proteína

Paciente do Caso 6	1,7
Mãe	10,2
Pai	11,4
Indivíduos-controle	19,7 ± 2,0

TABELA 57-12 Excreção urinária de carnitina, nmol/mg de creatinina

	Paciente do Caso 6	Faixa de referência
Carnitina total	680	125 ± 75
Carnitina livre	31	51 ± 40
Acilcarnitina	649	74 ± 40

a sua excreção de biocitina e de peptídeos contendo biocitina tenha aumentado. Nesse estágio, ele foi liberado do hospital, com um suprimento de cápsulas de biotina. Após 3 semanas, seu exantema cutâneo começou a clarear e sua perda capilar cessou.

Três meses mais tarde, em uma visita ambulatorial regular, foi decidida a interrupção dos suplementos de biotina. Em 1 semana, os ácidos orgânicos anormais foram novamente detectados em sua urina e ele foi tratado com doses variáveis de biotina até o fim da acidúria orgânica. Isso foi conseguido com ingestão de 150 µg/dia (comparada com ingestão referencial de 10 a 20 µg/dia para um bebê à menos de 2 anos de idade).

Ele continuou a ingerir 150 µg diárias de biotina e permaneceu com boa saúde durante os últimos 4 anos.

Explique a base bioquímica do problema do paciente.

CASO 8

A paciente é uma menina de 4 anos, filha única de pais não consanguíneos, nascida a termo após uma gestação sem intercorrências. Aos 14 meses de idade, ela deu entrada no hospital com história de 1 dia de vômito persistente, respiração superficial acelerada e desidratação. Na admissão, sua frequência

TABELA 57-13 Resultados clínicos laboratoriais de uma amostra de plasma do paciente do Caso 7 na admissão e faixa de referência para 24 horas de jejum

	Paciente do Caso 7	Faixa de referência
Glicose, mmol/L	3,3	3,5-5,5
pH	6,9	7,35-7,45
Bicarbonato, mmol/L	2,0	21-25
Corpos cetônicos, mmol/L	21	1-2,5
Lactato, mmol/L	7,3	0,5-2,2
Piruvato, mmol/L	0,31	< 0,15

respiratória era 60/min, e seu pulso, 178/min. A primeira coluna da **Tabela 57-14** mostra os resultados de seus testes clínicos laboratoriais naquele período. Ela respondeu rapidamente ao bicarbonato intravenoso e a uma única injeção intramuscular de insulina.

Os resultados de um teste de tolerância à glicose 3 dias após a internação foram normais, e sua concentração plasmática de insulina em resposta a uma carga de glicose oral se apresentou dentro da faixa normal. Ela foi liberada do hospital 7 dias após a entrada, aparentemente apta e bem. A segunda coluna da **Tabela 57-14** mostra os resultados dos testes clínicos laboratoriais realizados pouco antes de sua alta.

Ela retornou ao hospital com 16, 25, 31 e 48 meses de idade, apresentando inquietação, marcha instável, respiração superficial rápida, vômito persistente e desidratação. A cada vez, a crise era precedida por uma doença comum da infância e apetite reduzido, e ela respondia bem à injeção intravenosa de fluidos e de bicarbonato. Alguns episódios mais brandos foram tratados em casa com fluido oral e bicarbonato.

TABELA 57-14 Resultados clínicos laboratoriais de amostras de plasma e de urina da paciente do Caso 8 na admissão e novamente após 1 semana

	Admissão aguda	Após 1 semana	Faixa de referência
Plasma			
Glicose, mmol/L	14	5,1	3,5-5,5
Sódio, mmol/L	132	137	135-145
Cloreto, mmol/L	111	105	100-106
Bicarbonato, mmol/L	1,5	20	21-25
Ureia, mmol/L	4,1	4,9	2,9-8,9
Lactato, mmol/L	7,3	5,5	0,5-2,2
Piruvato, mmol/L	0,31	0,25	< 0,15
Alanina, mmol/L	–	852	99-313
Aspartato, mmol/L	–	Indetectável	3-11
pH	6,89	7,36	7,35-7,45
Urina			
Lactato, mg/g de creatinina	–	1,48	< 0,1
Corpos cetônicos, usando Ketostix	Muito alto	Negativo	Negativo

TABELA 57-15 Atividades das enzimas mitocondriais de fibroblastos cutâneos em cultura (nmol do produto formado/min/mg de proteína)

	Paciente do Caso 8	Indivíduos-controle
Citrato-sintase	32,8	76,3 ± 15,1
Redução da citocromo c pelo NADH	11,6	16,7 ± 4,6
Redução da citocromo c pelo succinato	9,43	12,3 ± 3,2
Citocromo-oxidase	37,7	50,3 ± 11,6
NADH-desidrogenase	633	910 ± 169
Piruvato-carboxilase	0,03	1,62 ± 0,39
Piruvato-desidrogenase	1,86	1,72 ± 0,35
Succinato-oxidase	190	210 ± 30

Durante seu retorno aos 25 meses, foi realizada biópsia de pele, foram cultivados fibroblastos, e as atividades das enzimas mitocondriais mostradas na Tabela 57-15 foram determinadas.

Explique a base bioquímica da condição da paciente.

CASO 9

O paciente é um menino diabético de 5 anos. Existe história familiar de diabetes, que sugere fortemente um padrão de herança dominante. Ele secreta quantidade significativa de insulina, embora menos do que os indivíduos normais, sugerindo que o problema não seja diabetes tipo 1. Ao contrário do diabetes tipo 2, essa condição se desenvolve no início da infância e é geralmente conhecida como diabetes do jovem com início na maturidade (MODY).

Os resultados de estudos da secreção de insulina pelo pâncreas de coelho incubado *in vitro* com duas concentrações de glicose, na presença e na ausência do açúcar de 7 carbonos mano-heptulose, que é um inibidor da fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato, são mostrados na Tabela 57-16.

Duas enzimas catalisam a formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose (ver Capítulo 17):

- A hexocinase é expressa em todos os tecidos; ela apresenta K_m para a glicose de cerca de 0,15 mmol/L.
- A glicocinase é expressa apenas nas células β do pâncreas; ela apresenta K_m para a glicose de cerca de 20 mmol/L.

TABELA 57-16 Secreção de insulina ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{incubação}$) pelo pâncreas de coelho *in vitro*

	Controle	+ Mano-heptulose
3,3 mmol/L de glicose	3,5	3,5
16,6 mmol/L de glicose	12,5	3,5

Fonte: dados registrados por Coore HG, Randle PJ: Biochemical J 1964;93:66-77.

A faixa normal de glicose plasmática está entre 3,5 e 5 mmol/L, elevando-se no sangue periférico para 8 a 10 mmol/L após ingestão de glicose moderadamente alta. Após uma refeição, a concentração de glicose no sangue portal, vindo do intestino delgado para o fígado, poderá ser consideravelmente mais elevada do que isso.

- Que efeito as alterações na concentração plasmática de glicose terão na taxa de formação da glicose-6-fosfato catalisada pela hexocinase?
- Que efeito as alterações na concentração plasmática de glicose terão na taxa de formação da glicose-6-fosfato catalisada pela glicocinase?
- Qual é a importância da glicocinase no fígado?

Froguel e colaboradores (1993) reportaram estudos do gene da glicocinase em diversas famílias afetadas por MODY e também em famílias não afetadas. Eles publicaram uma lista de 16 variantes do gene da glicocinase, mostradas na Tabela 57-17. Todos os pacientes com MODY apresentaram anormalidade do gene.

- Quais são as alterações de aminoácidos associadas a cada mutação gênica?
- Por que as mutações que afetam os códons 4, 10 e 116 não apresentam efeito nos indivíduos envolvidos?
- O que você pode concluir a partir dessa informação?

Os mesmos autores também estudaram a secreção de insulina em resposta à infusão de glicose em pacientes com MODY e em indivíduos-controle. Eles receberam infusão intravenosa

TABELA 57-17 Mutações no gene da glicocinase

Códon	Alteração de nucleotídeo	Alteração de aminoácido	Efeito
4	GAC \Rightarrow AAC	?	Nenhum
10	GCC \Rightarrow GCT	?	Nenhum
70	GAA \Rightarrow AAA	?	MODY
98	CAG \Rightarrow TAG	?	MODY
116	ACC \Rightarrow ACT	?	Nenhum
175	GGA \Rightarrow AGA	?	MODY
182	GTG \Rightarrow ATG	?	MODY
186	CGA \Rightarrow TGA	?	MODY
203	GTG \Rightarrow GCG	?	MODY
228	ACG \Rightarrow ATG	?	MODY
261	GGG \Rightarrow AGG	?	MODY
279	GAG \Rightarrow TAG	?	MODY
300	GAG \Rightarrow AAG	?	MODY
300	GAG \Rightarrow CAG	?	MODY
309	CTC \Rightarrow CCC	?	MODY
414	AAG \Rightarrow GAG	?	MODY

Fonte: dados reportados por Froguel P, et al.: N Engl J Med 1993;328:697-702.

TABELA 57-18 Concentrações plasmáticas de glicose e insulina antes e 60 minutos após a infusão de glicose

	Glicose plasmática (mmol/L)		Insulina (mU/L)	
	Pacientes com MODY	Indivíduos-controle	Pacientes com MODY	Indivíduos-controle
Jejum	7,0 ± 0,4	5,1 ± 0,3	5 ± 2	6 ± 2
60 min após a infusão de glicose	Mantida a 10 mmol/L pela variação da taxa de infusão		12 ± 7	40 ± 11

Fonte: dados reportados por Froguel P et al: N Engl J Med 1993;328:697-702.

de glicose; a taxa de infusão foi variada de modo a manter concentração plasmática constante de glicose de 10 mmol/L. As suas concentrações plasmáticas de glicose e insulina foram medidas antes e 60 minutos após a infusão de glicose; os resultados estão apresentados na **Tabela 57-18**.

- O que você pode concluir a partir dessa informação sobre o possível papel da glicocinase nas células β do pâncreas?
- Você é capaz de deduzir a maneira como as células β do pâncreas percebem aumento na glicose plasmática e sinalizam a secreção de insulina?

Bioquímica do envelhecimento

Peter J. Kennelly, Ph.D.

OBJETIVOS

Após o estudo deste capítulo, você deve ser capaz de:

- Descrever as características essenciais das teorias de uso e desgaste do envelhecimento.
- Citar pelo menos quatro fatores ambientais comuns que comprovadamente causam lesão de macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA.
- Elucidar por que as bases nucleotídicas são particularmente vulneráveis ao dano.
- Delinear a diferença fisiológica mais importante entre os genomas mitocondrial e nuclear.
- Detalhar a teoria oxidativa do envelhecimento e citar as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos seres humanos.
- Descrever três mecanismos pelos quais as células evitam ou efetuam o reparo dos danos causados por ERO.
- Referir os princípios básicos das teorias metabólicas do envelhecimento.
- Especificar o mecanismo do “relógio de contagem regressiva” do telômero.
- Relatar a nossa compreensão atual da contribuição genética para o envelhecimento.
- Explicar as implicações evolutivas de um tempo de vida geneticamente codificado.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA

Considere os vários estágios no período de vida do *Homo sapiens*. O período de lactância e a infância são caracterizados pelo crescimento contínuo de altura e massa corporal. Ocorre desenvolvimento das habilidades motoras e intelectuais básicas: marcha, linguagem, etc. A lactância e a infância também representam um período de vulnerabilidade durante o qual a criança depende dos adultos para obter água, alimentos, abrigo, proteção e instrução. A adolescência testemunha o estirão final do crescimento que ocorre na estrutura do esqueleto. Mais importante ainda é a ocorrência de uma série de mudanças radicais do desenvolvimento – acúmulo de massa muscular, perda da “gordura de bebê” residual, maturação das gônadas e do tecido cerebral e aparecimento das características sexuais secundárias –, que transformam a criança dependente em um adulto forte, independente e capaz de se reproduzir. A idade adulta, o período mais longo da vida, não apresenta nenhuma mudança física radical em termos de crescimento ou desenvolvimento. Com a notável exceção da gravidez nas mulheres, não é raro que os adultos mantenham o mesmo peso corporal, aparência e nível geral de atividade durante duas ou três décadas.

Salvo a ocorrência de alguma doença ou lesão fatal, o início da etapa final da vida, a velhice, é sinalizado pelo reaparecimento de mudanças físicas e fisiológicas. Os cabelos começam a ficar perceptivelmente finos e tornam-se brancos ou acinzentados com a perda de sua pigmentação. A pele perde a elasticidade e acumula manchas. O indivíduo parece encolher à medida que ocorre perda progressiva das massas muscular e óssea. O tempo de atenção e a memória declinam. Por fim, e inevitavelmente, a própria vida chega ao término quando uma ou mais funções orgânicas essenciais deterioram.

A compreensão das causas subjacentes, dos fatores desencadeantes do envelhecimento e das alterações que acompanham esse processo é de grande importância biomédica. As síndromes de Hutchinson-Gilford, de Werner e de Down são três doenças genéticas humanas cujas patologias incluem aceleração de muitos eventos fisiológicos associados ao envelhecimento. Retardar ou interromper alguns dos processos degenerativos que causam o envelhecimento ou que o acompanham nesse último estágio de vida pode conceder ao indivíduo mais vitalidade, torná-lo mais produtivo e fornecer vida plena. O reconhecimento dos fatores responsáveis por desencadear a morte celular poderá permitir aos médicos destruir seletivamente os tecidos e as células prejudiciais, como tumores, pólipos e cistos, sem dano colateral aos tecidos saudáveis.

TEMPO DE VIDA VERSUS LONGEVIDADE 2

Do Paleolítico até a Idade Média, passando pela Idade de Ouro da Grécia, a expectativa média de vida para um recém-nascido permaneceu relativamente constante, oscilando de 25 a 35 anos. A partir do Renascimento, esse número aumentou gradualmente, de modo que, no século XX, a expectativa de vida de indivíduos nascidos em países desenvolvidos atingiu, em média, cerca de 40 anos. Atualmente, decorridos 100 anos, a média atual no mundo é de 67 anos e, para os países desenvolvidos, aproxima-se dos 80. Isso levou a imprensa popular a especular sobre por quanto tempo se pode esperar que essa tendência continue. As futuras gerações poderão esperar viver por mais de 100 anos? É possível que os seres humanos tenham o potencial, com exceção da ocorrência de acidentes e com os devidos cuidados e manutenção apropriada, de viver indefinidamente?

Infelizmente, é pouco provável que essa extrapolação se concretize, pois se baseia em uma interpretação equivocada do termo **expectativa de vida**. A expectativa de vida é calculada a partir da média de todos os nascimentos. Portanto, é acentuadamente influenciada pela taxa de mortalidade infantil. Enquanto a expectativa de vida de uma criança romana era de 25 anos, se for calculado o tempo de vida esperado apenas para os indivíduos que sobreviveram na lactância, um cálculo que se refere à **longevidade**, a média quase duplicará para 48. Se for considerado o acentuado declínio na taxa de mortalidade infantil que ocorreu nesses últimos 150 anos, a duplicação aparente no tempo de vida dos seres humanos desaparece em grande parte, *mas não inteiramente*. Conforme observado na **Tabela 58-1**, a longevidade prevista de uma criança de 5 anos de idade nos Estados Unidos aumentou de 70,5 anos, em 1950, para 77,5 anos, em 2000. Existe algum tipo de limite superior para o tempo de vida de um ser humano adequadamente nutrido e bem mantido? Talvez não.

TABELA 58-1 Expectativa média de vida por década nos Estados Unidos

Período	Expectativa média de vida (anos)	
	A partir do nascimento	Com sobrevida até os 5 anos
1900-1902	49,24	59,98
1909-1911	51,49	61,21
1919-1921	56,40	62,99
1929-1931	59,20	64,29
1939-1941	63,62	67,49
1949-1951	68,07	70,54
1959-1961	69,89	72,04
1969-1971	70,75	72,43
1979-1981	73,88	75,00
1989-1991	75,37	76,22
1999-2001	76,83	77,47

Fonte: adaptada da Tabela 12 do *National Vital Statistics Reports* (2008) 57, vol. 1.

ENVELHECIMENTO E MORTALIDADE: PROCESSOS NÃO ESPECÍFICOS OU PROGRAMADOS?

Serão o envelhecimento e a morte processos indeterminados ou **estocásticos** em que as criaturas vivas alcançam inevitavelmente um ponto crítico, no qual sucumbem a um acúmulo de danos durante a vida, causados por doenças, lesões e simples uso e desgaste? Embora o corpo humano tenha certa capacidade de reparo e reposição nos níveis molecular e celular, essa capacidade é variável e finita. Não importa quanta atenção seja dispensada aos cuidados e à manutenção, como um automóvel ou algum outro aparelho mecânico sofisticado, mais cedo ou mais tarde algum componente essencial de nosso corpo se desgastará. Outra linha de pensamento postula que o envelhecimento e a morte são processos geneticamente programados análogos à puberdade, que evoluíram por um processo de seleção natural.

É muito provável que o envelhecimento e a morte sejam processos multifatoriais em que numerosos fatores, alguns indeterminados e outros programados, fazem importantes contribuições. Embora muito estudo e pesquisa ainda sejam necessários para que se possa definir a exata constituição desse mosaico mecanicista, foram identificados vários fatores contribuintes potenciais. Entre esses fatores, os mais proeminentes são considerados nas seções seguintes.

TEORIAS DE USO E DESGASTE DO ENVELHECIMENTO

Muitas teorias sobre o envelhecimento e a mortalidade sustentam a hipótese de que o corpo humano, por fim, sucumbe ao acúmulo de agressões ocorridas com o passar do tempo como resultado de exposição prolongada a uma variedade de fatores ambientais que reagem com biomoléculas orgânicas. Essas teorias assinalam que, embora existam mecanismos de reparo e renovação para repor ou substituir muitas classes de moléculas danificadas, esses mecanismos não são tão perfeitos. Por isso, algumas lesões inevitavelmente escapam – danos que se acumularão com o passar do tempo, particularmente em populações de células de vida longa que sofrem pouca ou nenhuma renovação (**Tabela 58-2**). Ironicamente, muitos dos agentes que causam maior dano às proteínas, ao DNA e a outras biomoléculas também são essenciais para a vida terrestre: a água, o oxigênio e a luz solar.

As reações hidrolíticas podem causar dano em proteínas e nucleotídeos

A água é um nucleófilo relativamente fraco. Entretanto, em virtude de sua ubiquidade e alta concentração (> 55 M, ver Capítulo 2), até mesmo esse nucleófilo fraco irá reagir com alvos suscetíveis no interior das células. Nas proteínas, a hidrólise das ligações peptídicas leva à clivagem da cadeia polipeptídica. As ligações amida mais frequentemente atacadas pela água são as encontradas nas cadeias laterais dos aminoácidos asparagina e glutamina, presumivelmente por serem mais expostas, em

randômica. Nessa lista, estão incluídas as ligações éster que ligam os ácidos graxos a seus glicerolípídeos relacionados, as ligações glicosídicas que ligam as unidades de monossacarídeos dos carboidratos e as ligações fosfodiéster que mantêm unidos os polinucleotídeos e que ligam os grupos-cabeça dos fosfolípídeos com seus diacilgliceróis adjacentes. Entretanto, essas reações parecem ocorrer muito raramente (p. ex., hidrólise de ligações fosfodiéster no interior do esqueleto de DNA ou de RNA) ou gerar produtos insuficientemente prejudiciais para produzir consequências biológicas significativas.

A respiração gera espécies reativas de oxigênio

Vários processos biológicos exigem a oxidação catalisada por enzimas de moléculas orgânicas pelo oxigênio molecular (O_2). Esses processos incluem a hidroxilação das cadeias laterais de prolina e lisina no colágeno (ver Capítulo 5), a destoxificação dos xenobióticos pelo citocromo P450 (ver Capítulo 47), a degradação dos nucleotídeos purínicos em ácido úrico (ver Capítulo 33), a reoxidação dos grupamentos prostéticos nas enzimas contendo flavina que catalisam a descarboxilação oxidativa (p. ex., o complexo de piruvato-desidrogenase; ver Capítulo 17) e outras reações redox (p. ex., aminoácidos oxidases; ver Capítulo 28), bem como a geração do gradiente quimiosmótico nas mitocôndrias pela cadeia de transporte de elétrons (ver Capítulo 13). As enzimas redox frequentemente empregam grupamentos prostéticos, como flavinas nucleotídeos, centros de ferro-enzofre ou íons metálicos ligados ao heme (ver Capítulos 12 e 13) para auxiliar na difícil tarefa de gerar e estabilizar os intermediários de oxianions e radicais livres altamente reativos que são formados durante esses processos. A cadeia de transporte de elétrons emprega carreadores especializados, como a ubiquinona e os citocromos, para o transporte seguro de elétrons individuais não pareados entre seus vários complexos multiproteicos e dentro deles.

Em certas ocasiões, esses intermediários altamente reativos escapam na célula sob a forma de ROS, como superóxido e peróxido de hidrogênio (Figura 58-2A). Em virtude de sua complexidade estrutural e funcional e do nível extremamente alto de fluxo de elétrons, o “vazamento” da cadeia de transporte de elétrons constitui a principal fonte de ROS na maioria das células de mamíferos. Além disso, muitas células de mamíferos sintetizam e liberam o segundo mensageiro óxido nítrico (NO^*), que contém um elétron não pareado, para promover a vasodilatação e o relaxamento muscular no sistema circulatório (ver Capítulo 51).

As espécies reativas de oxigênio são quimicamente prolíficas

Em virtude de sua reatividade extremamente alta, as ROS são muito perigosas. As ROS podem reagir com praticamente qualquer composto orgânico e alterá-lo quimicamente, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Algumas reações levam à clivagem de ligações covalentes. As ROS também apresentam forte tendência a formar **adutos** – termo que se refere ao produto formado quando dois compostos se combinam – com bases nucleotídicas, ácidos graxos poli-insaturados

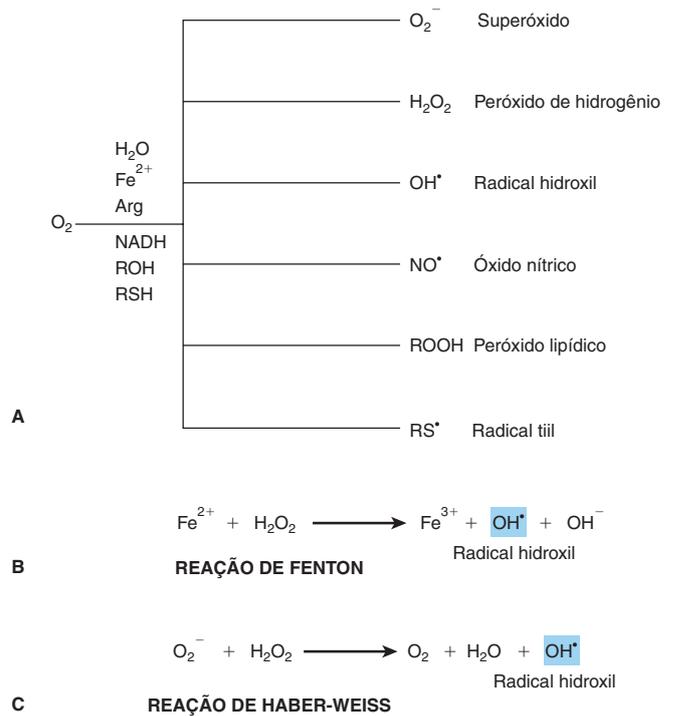


FIGURA 58-2 As espécies reativas de oxigênio (ROS) são subprodutos tóxicos da vida em um ambiente aeróbico. (A) São encontrados muitos tipos de ROS nas células vivas. (B) Geração de radical hidroxil pela reação de Fenton. (C) Geração de radical hidroxil pela reação de Haber-Weiss.

e outros compostos biológicos que apresentam múltiplas ligações duplas (Figura 58-3). Os adutos formados com bases nucleotídicas podem ser particularmente perigosos, em virtude de seu potencial, quando não corrigido, de causar leituras errôneas durante a replicação que introduzem mutações no DNA.

A facilidade do oxigênio de provocar as alterações químicas que tornam a manteiga rançosa é uma prova da reatividade das gorduras insaturadas, as que contêm uma ou mais ligações duplas de carbono-carbono (ver Capítulo 23), com ROS. A peroxidação dos lipídeos pode levar à formação de adutos de lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína de ligação cruzada, bem como à perda da fluidez e da integridade da membrana. Por sua vez, a perda de integridade da membrana pode – no caso das mitocôndrias – prejudicar a eficiência da cadeia de transporte de elétrons de converter equivalentes redutores em ATP, resultando em maior produção de ROS deletérias. A perda de integridade da membrana também pode desencadear **apoptose**, a morte programada de uma célula.

As reações em cadeias multiplicam a destrutividade das ROS

A destrutividade inerente à alta reatividade de muitas ROS, particularmente os radicais livres, é exacerbada pela sua capacidade de participar em reações em cadeias, nas quais o produto da reação entre o radical livre e alguma biomolécula é uma biomolécula danificada e outra espécie contendo um elétron não pareado altamente reativo. A cadeia será finalizada

quando um radical livre for capaz de adquirir outro elétron isolado para formar um par de elétrons relativamente inócuo sem gerar um novo elétron não pareado como subproduto. Esse é o caso observado quando um radical livre entra em contato com outro radical livre. Os dois elétrons “ímpares” combinam-se para formar um par. Como alternativa, as ROS podem ser eliminadas por um dos conjuntos de enzimas antioxidantes eficientes da célula (ver Capítulos 12 e 53).

A reatividade – e, portanto, a destrutividade – das ROS variam. Por exemplo, o peróxido de hidrogênio é menos reativo do que o superóxido, que, por sua vez, é menos reativo do que o radical hidroxil (OH[•]). Infelizmente, existem duas vias nos organismos vivos pelas quais o radical hidroxil altamente tóxico pode ser gerado a partir de ROS menos destrutivas. Por exemplo, na presença de ferro férrico, a reação de Fenton é capaz de transformar o peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil (Figura 58-2B). Por sua vez, o ferro ferroso (+ 3) pode ser novamente reduzido ao estado férrico (+ 2) por outras moléculas de peróxido de hidrogênio, permitindo a ação catalítica do ferro para produzir radicais hidroxil adicionais. O radical hidroxil também pode ser produzido quando o superóxido e o peróxido de hidrogênio tornam-se desproporcionais, um processo denominado reação de Haber-Weiss (Figura 58-2C).

Radicais livres e a teoria mitocondrial do envelhecimento

Em 1956, Denham Harman propôs a denominada teoria dos radicais livres para o envelhecimento. Foi relatado que a toxicidade do tratamento com oxigênio hiperbárico e radiação poderia ser explicada por um fator comum a ambos: a geração de ROS. Esse relato se coadunava muito bem com a própria observação de Harman de que o tempo de vida estava inversamente relacionado à taxa metabólica e, por extrapolação, à respiração. Assim, postulou que o dano cumulativo era causado pela produção contínua e inevitável de ROS.

Nos últimos anos, os proponentes da teoria dos radicais livres para o envelhecimento concentraram a sua atenção nas mitocôndrias. Não apenas as mitocôndrias abrigam a principal fonte de EROs na célula, a cadeia de transporte de elétrons, como também o dano oxidativo aos componentes dessa via pode levar à liberação aumentada de peróxido de hidrogênio, superóxido, etc. no citoplasma. A lesão às mitocôndrias tenderia a afetar adversamente a eficiência delas de desempenharem a sua função mais importante, isto é, a síntese de ATP. Uma redução significativa na taxa de ATP poderia facilmente levar ao declínio da função fisiológica que ocorre no envelhecimento.

Um segundo fator contribuinte para o ciclo autoperpetuante proposto de lesão redox mitocondrial é o fato de vários componentes da cadeia de transporte de elétrons serem codificados pelo próprio genoma da mitocôndria. O genoma mitocondrial é um remanescente vestigial e muito reduzido do genoma da antiga bactéria que foi precursora da atual organela. Por meio de um processo chamado **endossimbiose**, os eucariotos primitivos tornaram-se dependentes de bactérias do meio circundante para lhes fornecerem certos materiais, e vice-versa. Por fim, a bactéria menor foi absorvida e passou a viver no interior de seu hospedeiro eucariótico. Com o passar do tempo, a

TABELA 58-3 Genes codificados pelo genoma das mitocôndrias humanas

rRNA	rRNA 12S, 16S
tRNA	22 tRNAs (2 para Leu e Ser)
Subunidades de NADH-ubiquinona-oxidorreductase (Complexo I, > 40 no total)	ND 1-6, ND 4L
Subunidades de ubiquinol-citocromo c-oxidorreductase (Complexo III, 11 no total)	Citocromo b
Subunidades de citocromo-oxidase (Complexo IV, 13 no total)	COX I, COX II, COX III
Subunidades da ATPase F ₁ , F ₀ (ATP-sintase, 12 no total)	ATPase 6, ATPase 8

maior parte dos genes contidos no genoma bacteriano, se não todos, foi eliminada como supérflua para as necessidades do novo organismo de fusão ou foi transferida para o DNA nuclear da célula hospedeira. Atualmente, o genoma da mitocôndria humana codifica um RNA ribossomal pequeno e um RNA ribossomal grande, 22 tRNAs e certas subunidades polipeptídicas para os complexos I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons, bem como a ATPase F₁, F₀ (Tabela 58-3). O genoma mitocondrial carece dos mecanismos de vigilância e de reparo que ajudam a manter a integridade do DNA nuclear. Por isso, as mutações induzidas por adutos ou pela reação com ROS, bem como quaisquer defeitos funcionais decorrentes dessas mutações, passam a constituir uma característica permanente do genoma de cada mitocôndria individual, que continuará a acumular mutações com o passar do tempo.

Embora a hipótese mitocondrial não seja mais considerada como capaz de fornecer uma explicação unificadora para todas as alterações que estão associadas ao envelhecimento humano e suas comorbidades, ela provavelmente representa uma importante contribuição. Evidências circunstanciais convincentes para essa hipótese são fornecidas pelo papel central que essa organela desempenha nas vias sensoriais de resposta que deflagram o processo de apoptose.

As mitocôndrias são participantes essenciais no processo de apoptose

A apoptose confere aos organismos superiores a capacidade de eliminar seletivamente as células que se tornaram supérfluas por alterações de desenvolvimento, como as que ocorrem de modo contínuo durante a embriogênese ou as que foram danificadas a ponto de seu reparo não ser possível. Durante a remodelagem do tecido em desenvolvimento, o programa de apoptose celular é desencadeado por sinais mediados por receptores. No caso de células lesadas, qualquer um de vários indicadores internos pode atuar como deflagrador: ROS, dsRNA viral, lesão do DNA e choque térmico. Esses sinais induzem a abertura do complexo de poros de transição de permeabilidade inseridos na membrana externa da mitocôndria, pelos quais as moléculas da pequena proteína carreadora de elétrons citocromo c (cerca de 12,5 kDa) podem escapar para o citoplasma. Nesse local, o citocromo c atua como centro para a formação de um complexo multiproteico, o apoptossomo, que inicia a uma cascata de

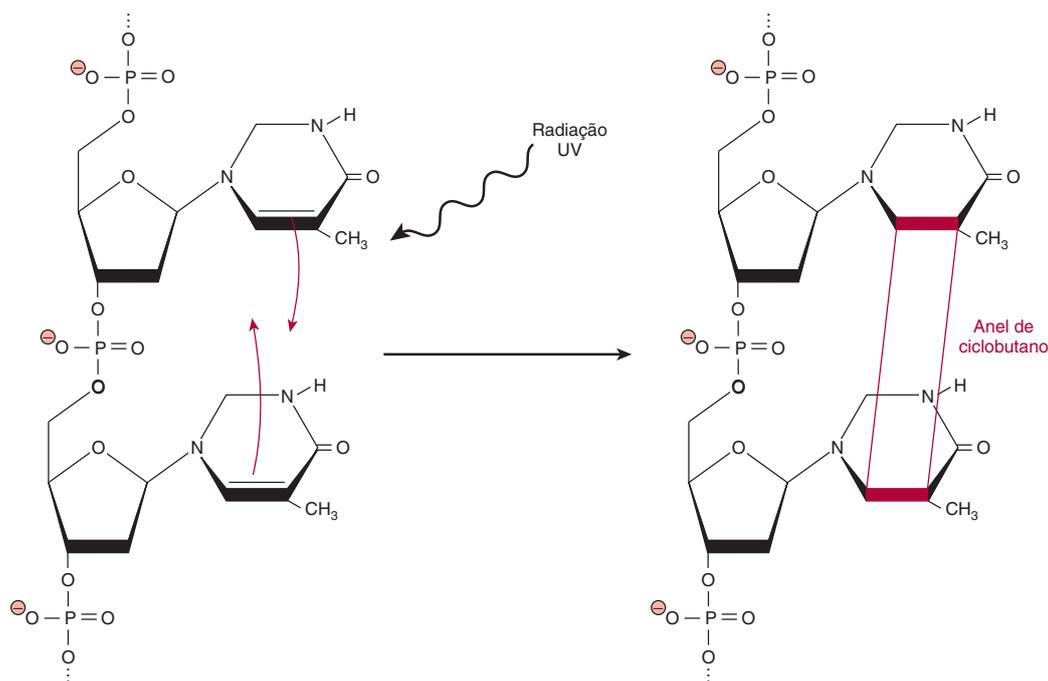


FIGURA 58-4 Formação de um dímero de timina após excitação pela luz UV. Quando bases consecutivas de timina estão empilhadas umas sobre as outras em uma dupla-hélice de DNA, a absorção de luz UV pode levar à formação de um anel de ciclobutano (em vermelho, sem escala), ligando, de modo covalente, as duas bases para formar um dímero de timina.

eventos de ativação proteolíticos direcionados para as formas de proenzima de um conjunto de cisteínas proteases, conhecidas como caspases. As caspases terminais, números 3 e 7, degradam as proteínas estruturais no citoplasma e as proteínas da cromatina no núcleo; esses eventos levam à morte da célula afetada e à sua eliminação por fagocitose. A presença de uma via intrínseca de morte celular mediada por receptor oferece a esperança de que seja possível eliminar células prejudiciais, como as do câncer, ativando seletivamente suas vias apoptóticas.

A radiação ultravioleta pode ser extremamente prejudicial

O termo **radiação ultravioleta (UV)** refere-se aos comprimentos de onda de luz situados imediatamente além do azul ou à extremidade de comprimentos de onda curtos do espectro visível. Embora o olho humano não possa detectar esses comprimentos de onda de luz, eles são fortemente absorvidos por compostos orgânicos que possuem anéis aromáticos ou múltiplas ligações duplas conjugadas, como as bases nucleotídicas de DNA e RNA; as cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano; os ácidos graxos poli-insaturados; os grupos heme; e os cofatores e as coenzimas, como flavinas, cianocobalamina, etc. A absorção dessa luz de comprimentos de onda curtos e de alta energia pode causar a ruptura das ligações covalentes nas proteínas, no DNA e no RNA; a formação de dímeros de timina no DNA (**Figura 58-4**); a ligação cruzada de proteínas; e a geração de radicais livres, incluindo ROS. Apesar de a radiação UV não penetrar além das primeiras camadas de células cutâneas, a alta eficiência de sua absorção leva ao rápido acúmulo de lesão da população limitada de células cutâneas que sofrem impacto. Como as bases

nucleotídicas do DNA e do RNA são particularmente efetivas na absorção da radiação UV, ela é altamente mutagênica. A exposição prolongada à luz solar intensa pode levar ao acúmulo de múltiplas lesões do DNA, que podem sobrecarregar a capacidade intrínseca de reparo da célula. Assim, é relativamente comum que as pessoas cujo trabalho ou estilo de vida envolva exposição prolongada à luz solar manifestem alterações do tecido cutâneo na forma de nevos e mielomas cancerosos. Muitos desses últimos podem proliferar e disseminar-se com muita rapidez, exigindo cuidadosa vigilância e intervenção médica rápida.

A glicação das proteínas frequentemente leva à formação de ligações cruzadas prejudiciais

Quando grupos amino, como os encontrados na cadeia lateral da lisina ou em algumas das bases nucleotídicas, são expostos a um açúcar redutor, como a glicose, lentamente surge um aduto reversível por intermédio da formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeído ou cetona do açúcar e a amina. Com o passar do tempo, a proteína glicada sofre uma série de rearranjos para formar produtos de **Amadori**, que contêm uma ligação dupla carbono-carbono conjugada que pode reagir com o grupo amina de uma proteína adjacente (**Figura 58-5**). O resultado final consiste na formação de uma ligação cruzada covalente entre duas proteínas ou outras macromoléculas biológicas, que, por sua vez, podem sofrer glicação adicional e ligação cruzada com outra macromolécula. Esses agregados com ligação cruzada são, às vezes, denominados **produtos finais da glicação avançada (AGEs)**.

O impacto fisiológico da glicação das proteínas pode ser particularmente pronunciado quando proteínas de vida longa,

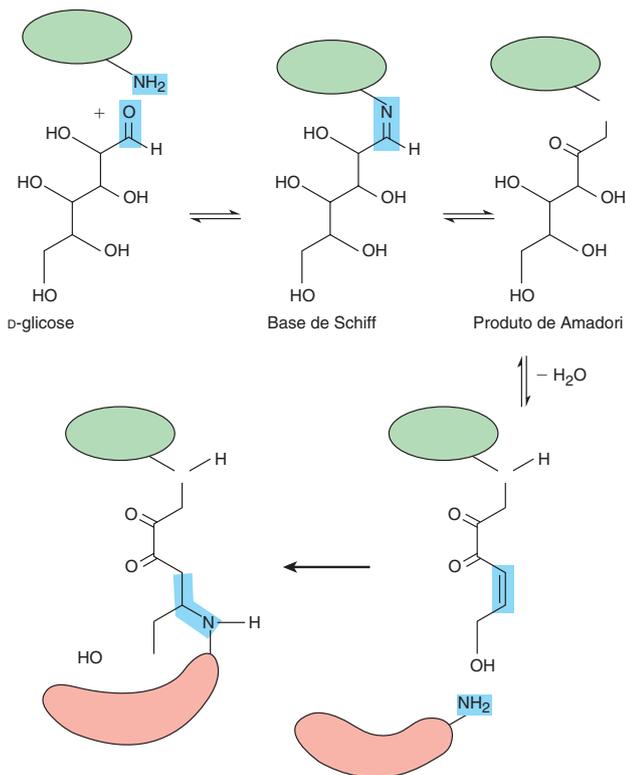


FIGURA 58-5 A glicação das proteínas pode levar à formação de ligações cruzadas de proteína-proteína. A figura mostra a sequência de reações que gera o produto de Amadori na superfície da proteína indicada em verde e a formação subsequente de uma ligação cruzada de proteína-proteína por meio de um grupo amina na superfície de uma segunda proteína, em vermelho.

como o colágeno ou as β -cristalinas, estão envolvidas. A sua persistência fornece a oportunidade para a ocorrência de múltiplos eventos de glicação e ligação cruzada. A ligação cruzada progressiva da rede de colágeno nas células endoteliais vasculares leva à perda progressiva da elasticidade e ao espessamento da membrana basal dos vasos sanguíneos, promovendo a formação de placas. O resultado global consiste em aumento progressivo da carga de trabalho do coração. Nos olhos, o acúmulo de proteínas agregadas compromete a opacidade da lente e manifesta-se, por fim, na forma de catarata. O comprometimento da homeostasia da glicose torna o diabético particularmente suscetível à formação de produtos finais da glicação avançada. De fato, a glicação da hemoglobina e da albumina sérica é utilizada como biomarcador para o diagnóstico de diabetes melito e para a avaliação de seu tratamento.

OS MECANISMOS DE REPARO MOLECULAR COMBATEM O USO E O DESGASTE

Os mecanismos enzimáticos e químicos interceptam as ROS prejudiciais

Uma consequência da teoria de uso e desgaste do envelhecimento é o fato de a longevidade refletir a eficiência e a robustez

dos mecanismos de prevenção, reparo e reposição moleculares em determinada espécie e nos indivíduos a ela pertencentes. Enzimas como a superóxido dismutase e a catalase protegem a célula, convertendo o superóxido e o peróxido de hidrogênio, respectivamente, em produtos menos reativos e, portanto, impedindo o dano molecular potencial antes que este ocorra (ver Capítulo 53). Por exemplo, as moscas-da-fruta que foram geneticamente alteradas para expressar níveis elevados de superóxido dismutase apresentam aumento significativo do tempo de sobrevivência.

No citoplasma, a glutatona, um tripeptídeo contendo cisteína, atua como protetor redox químico ao reagir diretamente com as ROS, gerando compostos menos reativos, como a água. A glutatona oxidada, que consiste em dois tripeptídeos ligados por uma ligação S-S, é reduzida enzimaticamente para manter o reservatório de proteção (ver Capítulo 53). A glutatona também pode reagir diretamente com a cisteína de ácidos sulfênicos e com os dissulfetos nas proteínas para restaurar o seu estado reduzido e formar produtos de adição com xenobióticos tóxicos (ver Capítulo 47). Outras biomoléculas, como o ácido ascórbico e a vitamina E, também possuem propriedades antioxidantes, explicando o fato de muitas dietas “populares” incluírem alimentos ricos nesses compostos, em um esforço de sustentar a capacidade do organismo de neutralizar as ROS e retardar o envelhecimento.

A integridade do DNA é mantida por mecanismos de revisão e reparo

Além das medidas profiláticas mencionadas anteriormente, os organismos vivos são dotados de capacidade limitada de substituir ou repor as macromoléculas danificadas. A maior parte dessa capacidade é direcionada à manutenção da integridade do genoma nuclear (mas não mitocondrial), que confere ao DNA a sua função singular de armazenamento de informações, a vulnerabilidade das bases nucleotídicas aromáticas heterocíclicas à agressão química e radiação UV, e o fato de – diferentemente de quase todas as outras macromoléculas – cada célula humana conter apenas uma ou duas cópias de cada cromossomo. Uma **célula somática** é a que forma parte do corpo de um organismo. A manutenção da integridade do genoma começa na replicação, onde ocorre cuidadoso processo de revisão para assegurar que o novo genoma formado no processo de divisão das células somáticas reproduza fielmente o modelo que dirigiu a sua síntese. Além disso, os organismos vivos possuem, em sua maioria, um impressionante quadro de enzimas, cuja função é inspecionar e corrigir aberrações que possam ter escapado do processo de revisão ou que foram subsequentemente produzidas pela ação da água (quebras de duplas-fitas, perda de uma base nucleotídica e desamidação da citosina), da radiação UV (dímeros de timina e quebras de filamentos) ou da exposição a modificadores químicos (formação de adutos). Esse sistema em múltiplas camadas é composto por enzimas de reparo de combinação errada, enzimas de reparo por excisão de nucleotídeo e enzimas de reparo por excisão de base, bem como pelo sistema Ku para reparo de quebras de filamentos duplos na estrutura fosfodiéster (ver Capítulo 35). Como último recurso, as células que apresentam mutações deletérias estão sujeitas à remoção por apoptose.

Todavia, a despeito das inúmeras precauções tomadas para assegurar a fidelidade durante a replicação e proceder ao reparo subsequente dos danos citados anteriormente, algumas mutações escapam inevitavelmente. Na verdade, é necessário haver algum escape no sistema de vigilância e de reparo para gerar a variabilidade genética que impulsiona a evolução. A **teoria da mutação somática do envelhecimento** propõe que ela também sirva como força propulsora do processo de envelhecimento. Em outras palavras, o acúmulo de células mutantes, com o passar do tempo, deve levar inevitavelmente ao comprometimento da função biológica, que se manifesta, pelo menos em parte, na forma de alterações físicas que são associadas ao processo de envelhecimento.

Alguns tipos de dano proteico podem ser reparados

Diferentemente do DNA, a capacidade de uma célula proceder ao reparo de lesões de outras biomoléculas é relativamente limitada. Em grande parte, as células parecem depender de renovação habitual, em que a população global de determinada biomolécula é degradada e substituída por nova síntese em um processo contínuo ou de base constitutiva (ver Capítulo 9) para remover os lipídeos, os carboidratos e as proteínas aberrantes. Algumas proteínas, particularmente as proteínas fibrosas que contribuem para a integridade estrutural de tendões, ligamentos, ossos, matriz, etc., sofrem pouca ou nenhuma renovação. Essas proteínas de longa vida tendem a acumular lesões no transcorrer de muitos anos, contribuindo para perda da elasticidade nos tecidos vasculares e nas articulações, perda da opacidade da lente, etc. Os mecanismos mais proeminentes para reparo de proteínas danificadas são direcionados para os átomos de enxofre das cadeias laterais de cisteína e metionina

e para os grupos isoaspartil formados quando uma ligação peptídica se altera de um grupo carboxílico α para um grupo carboxila de cadeia lateral.

O grupo sulfidril da cadeia lateral da cisteína frequentemente desempenha um importante papel catalítico, regulador e estrutural em proteínas que dependem de seu estado de oxidação. Todavia, tanto o grupo sulfidril quanto o éter de enxofre da metionina são extremamente vulneráveis à oxidação (Figura 58-3C). Como no caso de muitas outras biomoléculas oxidadas, o tripeptídeo glutatona pode reagir diretamente com dissulfetos de cisteína, ácidos cisteína sulfênicos e metionina sulfóxido para regenerar a cisteína e a metionina, respectivamente. Além disso, as dissulfetorreductases e as sulfóxidos de metionina-redutase são responsáveis por um mecanismo de redução catalisado enzimaticamente, que utiliza o NADPH como doador de elétrons. Infelizmente, o potencial de redução da glutatona e do NADPH é apenas suficiente para reduzir os estados de menor oxidação desses átomos de enxofre: dissulfetos de cisteína ou ácidos sulfênicos e sulfóxido de metionina. O ácido cisteína sulfínico, o ácido cisteína sulfônico e a metioninassulfona são refratários à redução em condições fisiológicas.

Os resíduos de ácido aspártico exibem a geometria precisa necessária para possibilitar a reação do grupo carboxil da cadeia lateral com o grupo amino da ligação peptídica formada com o seu grupo carboxílico α . A diamida cíclica resultante pode, então, abrir-se novamente para formar a ligação peptídica original ou um resíduo isoaspartil, no qual o carboxil da cadeia lateral constitui, agora, parte da estrutura peptídica da proteína (Figura 58-6). A metilação do grupo carboxílico α proporciona um grupo que promove a nova formação da diamida cíclica, que pode abrir-se mais uma vez para formar a ligação peptídica normal (Figura 58-6).

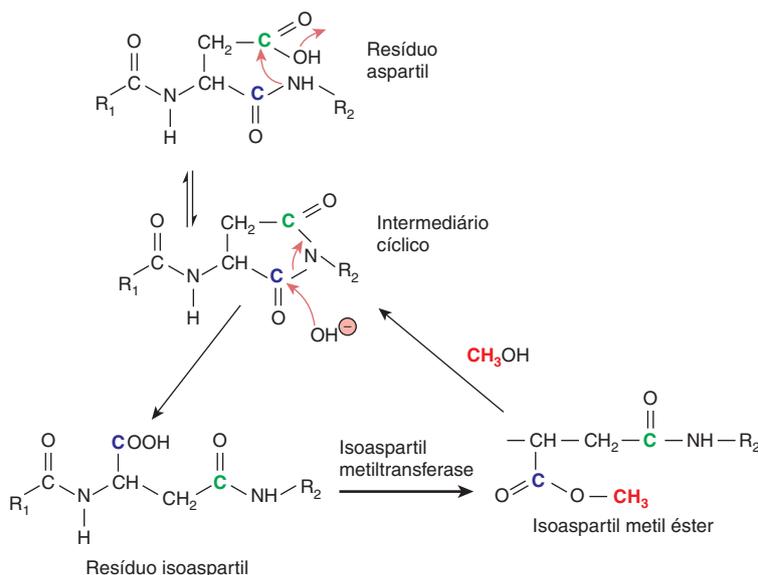


FIGURA 58-6 Formação de uma ligação isoaspartil em uma estrutura polipeptídica e seu reparo pela intervenção da isoaspartil-metiltransferase. A figura mostra a sequência de reações químicas e catalisadas por enzimas que levam à formação de uma ligação isoaspartil e à restauração de uma ligação peptídica normal. Os carbonos que correspondem ao α e ao ácido carboxílico da cadeia lateral no ácido aspártico estão em azul e em verde, respectivamente. As setas vermelhas indicam as vias de ataque nucleofílico durante a ciclização e as reações de hidrólise. O grupo metil acrescentado pela isoaspartil-metiltransferase está em cor-de-rosa.

As proteínas agregadas são altamente refratárias à degradação ou ao reparo

As modificações na composição ou na conformação de uma proteína que provocam a sua aderência a outras moléculas de proteínas podem levar à formação de agregados tóxicos, denominados **amiloides**. Esses agregados constituem a característica básica de várias doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, ataxia espinocerebelar e as encefalopatias espongiiformes transmissíveis. Os efeitos tóxicos desses agregados insolúveis são exacerbados pela sua persistência, visto que, nesse estado, a maioria é geralmente refratária à ação catalítica das proteases que normalmente são responsáveis pela sua renovação.

O ENVELHECIMENTO COMO PROCESSO PRÉ-PROGRAMADO

Embora, sem dúvida alguma, o uso e o desgaste moleculares contribuam para o processo de envelhecimento, várias observações também sugerem a participação de mecanismos deterministas programados. Por exemplo, em vez de “enferrujar” gradualmente, muitas das manifestações físicas do envelhecimento – manchas de velhice, cabelos grisalhos, tremor das mãos, lapsos de memória – em geral surgem tardiamente na vida adulta e progredem em ritmo acelerado, como se os mecanismos de manutenção moleculares responsáveis por seu reparo e substituição tivessem subitamente recebido um comando para cessar a sua operação. A menopausa na mulher fornece um exemplo inequívoco de alteração fisiológica associada à idade, que é geneticamente programada e controlada por hormônios. Os parágrafos seguintes descrevem várias teorias atuais sobre os mecanismos programados deterministas para o controle do envelhecimento e da morte.

Teorias metabólicas do envelhecimento: “a chama mais brilhante queima mais rápido”

Uma das muitas variantes da famosa citação atribuída ao antigo filósofo chinês Lao Tzu resume as características proeminentes das **teorias metabólicas do envelhecimento**. As suas origens podem remontar à observação de que as espécies de maior porte no reino animal tendem a viver por mais tempo do que as de menor porte (Tabela 58-4). Partindo do raciocínio de que a base causal dessa correlação pode residir em algum fator relacionado ao tamanho, mais do que no próprio tamanho, muitos cientistas concentraram a sua atenção no órgão mais frequentemente associado à vida e à vitalidade – o coração. Em geral, a frequência cardíaca em repouso de animais de pequeno porte, como os beija-flores, que é de 250 batimentos por minuto, tende a ser maior que a de animais de grande porte, como as baleias, cuja frequência cardíaca é de 10 a 30 batimentos por minuto. As estimativas do número cumulativo de vezes que o coração de cada animal vertebrado bate ao longo da vida exibiram uma convergência surpreendente de $1,0 \times 10^9$ batimentos: 1 bilhão.

A denominada **hipótese dos batimentos cardíacos** postulava que toda criatura viva tem a capacidade de realizar apenas determinada quantidade de batimentos cardíacos e/

TABELA 58-4 Tempo de vida versus massa corporal de vários mamíferos

Espécie	Massa aproximada (kg)	Expectativa média de vida na maturidade (anos)
Camundongo-de-patas-brancas (<i>Peromyscus leucopus</i>)	0,02	0,28
Rato-veadeiro (<i>Peromyscus maniculatus</i>)	0,02	0,43
Rato-toupeiro (<i>Myodes glareolus</i>)	0,025	0,48
Esquilo-oriental (<i>Tamias striatus</i>)	0,1	1,63
Pika-americana (<i>Ochotona princeps</i>)	0,13	2,33
Esquilo-terrestre-de-capa-dourada (<i>Callospermophilus lateralis</i>)	0,155	2,12
Esquilo-vermelho (<i>Sciurus vulgaris</i>)	0,189	2,45
Esquilo-terrestre-de-belding (<i>Urocyon beldingi</i>)	0,25	1,78
Esquilo-terrestre-de-uinta (<i>Urocyon armatus</i>)	0,35	1,72
Esquilo-cinza (<i>Sciurus carolinensis</i>)	0,6	2,17
Esquilo-do-ártico (<i>Spermophilus parryi</i>)	0,7	1,71
Coelho-da-flórida (<i>Sylvilagus floridanus</i>)	1,25	1,48
Cangambá (<i>Mephitis mephitis</i>)	2,25	1,90
Texugo-americano (<i>Taxidea taxus</i>)	7,15	2,33
Lontra-norte-americana (<i>Lontra canadensis</i>)	7,2	3,79
Lince-vermelho (<i>Lynx rufus</i>)	7,5	2,48
Castor-norte-americano (<i>Castor canadensis</i>)	18	1,52
Impala (<i>Aepyceros melampus</i>)	44	4,80
Carneiro selvagem (<i>Ovis canadensis</i>)	55	5,48
Porco selvagem (<i>Sus scrofa</i>)	85	1,91
Javali africano (<i>Phacochoerus africanus</i>)	87	2,82
Tahr-de-nilgiri (<i>Nilgiritragus hylocrius</i>)	100	4,71
Gnu-listrado (<i>Connochaetes taurinus</i>)	165	4,79
Macho de veado-vermelho	175	4,90
Cobe-untuoso (<i>Kobus ellipsiprymnus</i>)	200	5,87
Zebra-de-burchell (<i>Equus quagga burchellii</i>)	270	7,95
Búfalo africano (<i>Syncerus caffer</i>)	490	4,82
Hipopótamo	2.390	16,40
Elefante africano	4.000	19,10

Fonte: adaptada de Millar JS, Zammuto: Life histories of mammals: an analysis of life tables. Ecology 1983;64:631.

ou respirações. Uma variação mais sutil dessa ideia básica, distintamente designada como **hipótese metabólica** ou **hipótese da taxa de vida**, foi formulada por Raymond Pearl, na década de 1920. Pearl propôs que o tempo de vida de um indivíduo

estava reciprocamente ligado à sua taxa metabólica basal. Em outras palavras, os que “viviavam em ritmo frenético”, por assim dizer, morreriam mais cedo. Uma nova série de cálculos revelou que, embora os animais exibam acentuada diferença quanto a seu tamanho, longevidade e frequência cardíaca, cada um deles gasta, ao longo da vida, uma quantidade semelhante de energia metabólica total *por unidade de massa corporal*, 7×10^5 J/g. Apesar de intuitivamente atraente, a identificação de uma ligação mecanicista entre o tempo de vida e o gasto de energia ou taxa metabólica demonstrou ser evasiva. Os defensores da teoria mitocondrial do envelhecimento sugerem que o que está sendo “contado” não são os batimentos cardíacos ou a energia, mas as ROS que constituem o subproduto da respiração. Com o passar do tempo, a produção contínua de energia e o consumo relacionado de O_2 levam ao acúmulo de danos induzidos por ROS no DNA, nas proteínas e nos lipídeos, até que, por fim, seja alcançado um ponto crítico universalmente conservado. As células que experimentam déficits calóricos ajustam (reprogramam) suas vias metabólicas para utilizar recursos disponíveis de forma mais eficiente que reduza concomitante a geração de ROS colaterais.

Telômeros: um relógio de contagem regressiva molecular?

Uma segunda linha de pensamento sustenta que o suposto relógio de contagem regressiva que controla o envelhecimento e o tempo de vida não detecta os batimentos cardíacos, a energia ou as ROS. Em vez disso, ele utiliza os **telômeros** para rastrear o número de vezes que cada célula somática se divide.

Os telômeros são compostos por longas cadeias de repetições de hexanucleotídeos ricas em bases GT que recobrem as extremidades dos cromossomos eucarióticos. Diferentemente do DNA circular fechado dos genomas bacterianos, o DNA genômico dos eucariotos é linear. Se não estivessem protegidas, as extremidades expostas desses polinucleotídeos lineares estariam acessíveis para participar de eventos de recombinação genética potencialmente deletérios. Uma segunda função dos telômeros consiste em proporcionar algum DNA disponível para acomodar o desperdício que ocorre quando as moléculas de DNA linear sofrem replicação.

Esse desperdício é uma consequência do fato de todas as DNA-polimerases atuarem de modo unidirecional, de 3' para 5' (ver Capítulo 35). Embora isso não represente um problema no DNA circular fechado, quando ocorre replicação das extremidades 5' de um DNA de dupla-fita linear por meio de síntese contínua de 3' para 5' e ligação de pequenos fragmentos de **Okazaki**, simplesmente não há espaço suficiente nas extremidades para acomodar o pequeno RNA *primer*, a polimerase, etc. A síntese da extremidade 5' de cada fita encurtará geralmente em 100 pares de bases (pb), ou mais. Toda vez que uma célula se divide, os seus cromossomos serão encurtados posteriormente (**Figura 58-7**). Os telômeros proporcionam uma fonte inócua de DNA, em que a diminuição de comprimento tem pouca consequência para a célula. Entretanto, uma vez esgotado o suprimento de DNA do telômero, o que corresponde aproximadamente a 100 divisões celulares nos seres humanos, a mitose cessa, e a célula somática entra em estado

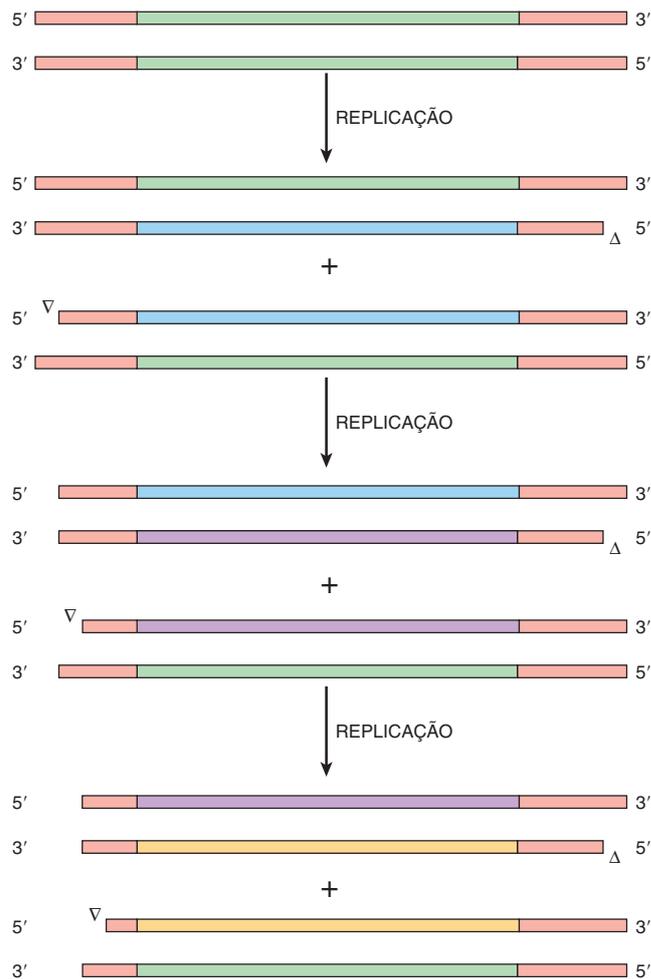


FIGURA 58-7 Os telômeros nas extremidades dos cromossomos eucarióticos tornam-se progressivamente mais curtos a cada ciclo de replicação. Diagrama esquemático do DNA linear de um cromossomo eucariótico (em verde) contendo telômeros em cada extremidade (em vermelho). Durante a primeira replicação, são sintetizadas novas fitas de DNA (em verde) utilizando o cromossomo original como molde. Para simplificar, os dois ciclos seguintes de replicação (em roxo, em amarelo) mostram apenas o destino do mais baixo dos dois produtos nucleotídicos do ciclo precedente de replicação. As cabeças de seta vazias indicam o local de síntese incompleta da fita. O modelo pressupõe que as projeções de fita simples nas extremidades de cada cromossomo são reduzidas ao completar cada ciclo de divisão celular. Observe o encurtamento progressivo das repetições dos telômeros.

de **senescência replicativa**. À medida que mais e mais células no corpo entram nesse estado de senescência, ele progressivamente perde a capacidade de repor as células perdidas ou danificadas.

Os organismos são capazes de produzir uma progênie contendo telômeros de comprimento integral, em virtude da intervenção da enzima **telomerase**. A telomerase é uma ribonucleoproteína expressa nas células-tronco e na maioria das células cancerosas, mas não nas células somáticas. Com o uso de um molde de RNA, a telomerase acrescenta sequências repetidas de hexanucleotídeos ricos em GT, que variam desde algumas centenas (leveduras) a vários milhares de nucleotídeos (seres humanos) nas extremidades das moléculas de DNA

lineares, a fim de restaurar o comprimento total de seus telômeros. Quando células somáticas são obtidas por engenharia genética no laboratório para expressar a telomerase, elas continuam se dividindo em cultura por mais tempo do que uma linhagem celular controle inalterada. A capacidade de impedir a senescência replicativa utilizando uma enzima que mantém o comprimento total dos telômeros representa a evidência mais convincente da atuação de um relógio de telômero.

Kenyon utilizou um organismo-modelo para descobrir os primeiros genes do envelhecimento

Muitos avanços na ciência biomédica representam o produto de pesquisas que utilizam uma variedade dos denominados organismos-modelo como seus alvos de teste. A mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, tem proporcionado rica coleta de informações a respeito dos genes que orientam a diferenciação celular e o desenvolvimento dos órgãos. A levedura de pão e a rã-de-unhas-africana, *Xenopus laevis*, têm servido de instrumentos para dissecar o complexo circuito de transdução de sinais que coordena o ciclo de divisão celular. Várias linhagens de células de mamíferos em cultura servem de substitutos para adipócitos, células renais, tumores, dendritos, etc. Embora à primeira vista possa parecer que muitos desses sistemas-modelo compartilhem poucos aspectos em comum com os seres humanos, cada um apresenta atributos exclusivos, tornando-os convenientes como veículos para abordar certos problemas e explorar sistemas específicos.

O *Caenorhabditis elegans* é um verme que serviu como importante material para o estudo da biologia do desenvolvimento. Ele é transparente e cresce rapidamente, e esses atributos facilitaram o rastreamento de todo o programa de desenvolvimento de todas as 959 células encontradas no adulto maduro de volta ao ovo fertilizado. No início da década de 1990, Cynthia Kenyon e colaboradores observaram que vermes que apresentam mutações no gene que codifica uma molécula semelhante ao receptor de insulina, *daf-2*, tinham tempo de vida 70% maior do que os vermes de tipo selvagem. Fato igualmente importante foi a observação de que os vermes mutantes se comportam de modo semelhante ao *C. elegans* de tipo selvagem jovem durante grande parte desse período. Isso constitui uma importante distinção. Para qualificá-lo como “gene de envelhecimento”, a sua manipulação precisa ter efeito maior do que meramente retardar o ponto terminal da vida – ele precisa ter impacto na programação das alterações associadas ao envelhecimento.

Uma pesquisa mais detalhada dos genes do envelhecimento indica que eles codificam um pequeno conjunto de fatores de transcrição, que incluem PHA-4 ou DAF-16, que presumivelmente controlam a expressão de genes cruciais de envelhecimento, ou proteínas de sinalização, como DAF-2, que provavelmente ativam PHA-4, DAF-16, etc., em resposta a sinais ambientais específicos. Ainda resta muito a aprender acerca do grau de controle do envelhecimento por eventos geneticamente programados e de como esses genes e seus produtos interagem com fatores nutricionais e outros que influenciam a vitalidade e a longevidade.

POR QUE A EVOLUÇÃO SELECIONARIA PERÍODOS DE VIDA LIMITADOS?

A ideia de que os animais teriam desenvolvido mecanismos destinados especificamente a limitar o seu tempo de vida parece, à primeira vista, altamente contraintuitiva. Se a força motriz por trás da evolução é a seleção de traços que potencializam a aptidão e a sobrevivência, isso não deveria se traduzir em expectativa de vida cada vez mais longa? Embora prolongar ao máximo o tempo de vida possa representar um traço desejável do ponto de vista do indivíduo, isso não se aplica necessariamente a uma população ou a uma espécie como um todo. Um limite do tempo de vida geneticamente programado poderia beneficiar o grupo ao eliminar a perda de recursos disponíveis causada por membros que não estão mais ativamente envolvidos na produção, no desenvolvimento e na formação dos descendentes. Na verdade, o atual tempo de vida de três gerações pode ser racionalizado como um tempo proporcionado (a) para que os recém-nascidos cresçam e se tornem adultos jovens reprodutivamente ativos, (b) para que esses adultos jovens possam gerar e nutrir seus filhos e (c) para servir como fonte de orientação e assistência aos adultos jovens que enfrentam os desafios do nascimento e da criação dos filhos.

RESUMO

- O envelhecimento e a longevidade são controlados pela interação complexa e, em grande parte, oculta entre fatores aleatórios e deterministas, que incluem programação genética, estresse ambiental, estilo de vida, relógio de contagem regressiva celular e processos de reparo molecular.
- As teorias de uso e desgaste do envelhecimento partem da hipótese de que as alterações associadas ao envelhecimento e à própria morte refletem o acúmulo de danos com o passar do tempo.
- Os elementos ambientais ubíquos e essenciais à vida – água, oxigênio e luz – têm a capacidade intrínseca de provocar lesão de macromoléculas biológicas.
- As ROS, como o radical hidroxil e o superóxido, são particularmente problemáticas, pois são altamente reativas, participando muitas vezes de reações em cadeia que multiplicam o seu impacto e são continuamente geradas como subproduto da complexa rede de reações redox que ocorrem na cadeia de transporte de elétrons.
- Em virtude da reatividade de seus sistemas de anéis insaturados e da capacidade de absorver a luz UV, as bases de nucleotídeos do DNA são particularmente vulneráveis à lesão UV ou química.
- As mutações que resultam de erros causados por bases nucleotídicas ausentes ou quimicamente modificadas podem ser particularmente deletérias, uma vez que podem resultar em transformação oncogênica ou tornar uma célula vulnerável a danos subsequentes.
- As mitocôndrias ocupam lugar central em muitas teorias do envelhecimento e da morte. Essa proeminência pode ser atribuída a diversos fatores. Elas constituem o local da cadeia de transporte de elétrons, que representa a maior fonte de ROS na célula.
- A produção eficiente de ATP é essencial para a vitalidade da célula. As mitocôndrias desempenham um papel central na apoptose

– isto é, a morte celular programada. As mitocôndrias carecem da capacidade de reparo de lesão de seu DNA.

- Nas células eucarióticas, as extremidades dos cromossomos lineares são recobertas por longas sequência repetidas, denominadas telômeros. Estes sofrem encurtamento progressivo toda vez que uma célula somática se divide. Quando os telômeros de uma célula somática se tornam muito curtos, a célula entra em estado de senescência replicativa. Em consequência, foi aventada a hipótese de que os telômeros atuem como relógio de contagem regressiva para as células somáticas.
- O tempo de vida dos animais pode ser geneticamente programado. A mutação do gene *daf-2* em *Caenorhabditis elegans* produziu vermes cujo tempo de vida foi 70% maior que o tempo de vida dos vermes do tipo selvagem.
- A seleção evolutiva de um tempo de vida limitado pode otimizar a vitalidade da população, e não a de seus membros individualmente.

REFERÊNCIAS

- Aguzzi A, O'Connor T: Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Drug Discov* 2010;9:237.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457.
- Arias E, Curtin LR, Wei R, et al: U.S. decennial life tables for 1999–2001, United States life tables. *Natl Vital Stat Rep* 2008;57:1.
- Baraibar MA, Friguet B: Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp Gerontol* 2013;48:620.
- Clarke S: Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Res Rev* 2003;2:263.
- Eisenberg DTA: An evolutionary overview of human telomere biology: the thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. *Am J Hum Biol* 2011;23:149.
- Kenyon CJ: The genetics of aging. *Nature* 2010;464:504.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al: The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153:1194.
- Martin-Molvano A, de Cabo R: Mitochondrial metabolic reprogramming induced by calorie restriction. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:310.
- Nakamura T, Cho DH, Lipton SA: Redox regulation of protein misfolding, mitochondrial dysfunction, synaptic damage, and cell death in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol* 2012;238:12.
- Newgard CB, Sharpless NE: Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013;23:946.
- Speakman JR: Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol* 2005;208:1717.
- Ulrich P, Cerami A: Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:1.
- Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH: Oxidative stress responses elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med* 2013;238:450.

Questões para estudo

Seção XI – Tópicos especiais (C)

- Qual das seguintes afirmações está INCORRETA em relação às vias de coagulação sanguínea?
 - Os componentes do complexo Xase extrínseco (tenase) são o fator VIIa, o fator tecidual, o Ca^{2+} e o fator X.
 - Os componentes do complexo Xase extrínseco (tenase) são o fator IXa, o fator VIIa, o Ca^{2+} e o fator X.
 - Os componentes do complexo protrombinase são o fator Xa, o fator Va, o Ca^{2+} e o fator II (protrombina).
 - Os complexos Xase extrínseco e intrínseco e o complexo protrombinase precisam do pró-coagulante aniônico fosfatidilserina do LDL (lipoproteína de baixa densidade) para a sua formação.
 - A fibrina formada pela clivagem do fibrinogênio pela trombina sofre ligação cruzada de forma covalente pela ação do fator XIIIa, que, por sua vez, é formado pela ação da trombina sobre o fator XIII.
- Em qual dos seguintes fatores de coagulação um paciente que está recebendo warfarina para o seu distúrbio trombótico apresentará redução de resíduos Gla (γ -carboxiglutamato)?
 - Fator tecidual.
 - Fator XI.
 - Fator V.
 - Fator II (protrombina).
 - Fibrinogênio.
- Um homem de 65 anos sofre um infarto do miocárdio e recebe um ativador do plasminogênio tecidual em 6 horas após a ocorrência da trombose para alcançar qual das seguintes consequências?
 - Impedir a ativação da via extrínseca da coagulação.
 - Inibir a trombina.
 - Aumentar a degradação dos fatores VIIIa e Va.
 - Aumentar a fibrinólise.
 - Inibir a agregação plaquetária.
- Qual das seguintes afirmações está INCORRETA em relação à ativação plaquetária na hemóstase e na trombose?
 - As plaquetas aderem diretamente ao colágeno subendotelial via GPIa-IIa e GPVI, ao passo que a ligação de GPIb-IX-V é modulada pelo fator de von Willebrand.
 - O agente agregador tromboxano A_2 é formado a partir do ácido aracônico, liberado dos fosfolípidos da membrana plaquetária pela ação da fosfolipase A_2 .
 - O agente agregador ADP é liberado dos grânulos densos de plaquetas ativadas.
 - O agente agregador trombina ativa a fosfolipase intracelular $\text{C}\beta$, que forma as moléculas efetoras internas 1,2-diacilglicerol e 1,4,5-inositol-trifosfato a partir do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.
 - Os receptores de ADP, o receptor de tromboxano A_2 , os receptores de trombina PAR-1 e PAR-4 e o receptor de fibrinogênio GPIIb-IIIa são todos exemplos de receptores acoplados à proteína G.
- Uma menina de 15 anos chegou na clínica com contusões em seus membros inferiores. Das seguintes, qual é a informação *menos provável* para explicar os sinais de hemorragia exibidos por esta pessoa?
 - Hemofilia A.
 - Doença de von Willebrand.
 - Uma baixa contagem de plaquetas.
 - Ingestão de ácido acetilsalicílico.
 - Um distúrbio plaquetário com ausência de grânulos de armazenamento.
- Em relação à carcinogênese química, escolha a única afirmação FALSA:
 - Aproximadamente 80% dos cânceres humanos podem ser devidos a fatores ambientais.
 - Em geral, carcinógenos químicos interagem de forma não covalente com o DNA.
 - Algumas substâncias químicas são convertidas a carcinógenos por enzimas, geralmente espécies do citocromo P450.
 - A maioria dos carcinógenos finais são eletrofílicos e atacam grupos nucleofílicos no DNA.
 - O ensaio de Ames é um teste útil para selecionar substâncias químicas quanto à mutagenicidade; entretanto, é necessário o teste animal para mostrar que uma substância química é carcinogênica.
- Em relação à carcinogênese viral, escolha a única afirmação FALSA:
 - Aproximadamente 15% dos cânceres humanos podem ser causados por vírus.
 - Apenas vírus de RNA são conhecidos como carcinógenos.
 - Os vírus de RNA que causam tumores ou estão a eles associados ou incluem o vírus da hepatite C.
 - Os retrovírus possuem a transcriptase reversa, que transcreve RNA para DNA.
 - Os vírus tumorais atuam desregulando o ciclo celular, inibindo a apoptose e interferindo nos processos normais de sinalização celular.
- Em relação aos oncogenes e aos genes supressores de tumores, escolha a única afirmação FALSA:
 - Ambas as cópias de um gene supressor de tumor deverão sofrer mutação para que seu produto perca a atividade.
 - A mutação de um oncogene ocorre nas células somáticas e não é herdado.
 - O produto de um oncogene mostra um ganho de função que sinaliza a divisão celular.
 - O *RB* e o *P53* são genes supressores de tumores; *MYC* e *RAS* são oncogenes.
 - A mutação de um gene supressor de tumor ou de um oncogene é considerada suficiente para causar câncer.
- Em relação aos fatores de crescimento, escolha a única afirmação FALSA:
 - Eles incluem um grande número de polipeptídeos, a maioria dos quais estimula o crescimento celular.
 - Os fatores de crescimento podem atuar de maneira endócrina, parácrina ou autócrina.

- C. Determinados fatores de crescimento, como o TGF- β , podem atuar de forma a inibir o crescimento.
- D. Alguns receptores para fatores de crescimento apresentam atividade de tirosina-cinase; as mutações nesses receptores ocorrem em células cancerosas.
- E. O PDGF estimula a fosfolipase A₂, que hidroliza PIP₂ para formar DAG e IP₃, sendo ambos segundos mensageiros.
10. Em relação ao ciclo celular, escolha a única afirmativa FALSA:
- A. As células que ciclam podem se encontrar em qualquer uma das cinco fases do ciclo celular (i.e, G₁, G₀, S, G₂ e M).
- B. As células cancerosas geralmente apresentam um tempo de geração mais curto do que as células normais e poucas são encontradas na fase G₀.
- C. Uma variedade de mutações nas ciclinas e nas CDKs tem sido observada nas células cancerosas.
- D. O RB é um regulador do ciclo celular, onde se liga ao fator de transcrição E2F, permitindo, assim, a progressão da célula da fase G₁ para a S.
- E. Quando ocorre lesão no DNA, a quantidade de p53 aumenta e ativa a transcrição de genes que retardam o trânsito ao longo do ciclo.
11. Em relação aos cromossomos e à instabilidade genômica, escolha a única afirmativa FALSA:
- A. As células cancerosas podem apresentar um fenótipo mutante, isto é, apresentam mutações em genes que afetam a replicação e o reparo do DNA, a segregação cromossômica, a vigilância aos danos no DNA e a apoptose.
- B. A instabilidade cromossômica refere-se ao ganho ou à perda de cromossomos causada por anormalidades de segregação cromossômica durante a mitose.
- C. A instabilidade de microssatélites envolve a expansão ou a contração de microssatélites devida às anormalidades no reparo da excisão de nucleotídeos.
- D. A aneuploidia (quando o número de cromossomos de uma célula não é múltiplo do número haploide) é uma característica comum de células tumorais.
- E. As anormalidades na coesão de cromossomos e na ligação cinetocoro-microtúbulo podem contribuir para a instabilidade cromossômica e a aneuploidia.
12. Escolha a única afirmativa FALSA:
- A. A atividade da telomerase encontra-se frequentemente elevada nas células cancerosas.
- B. Vários cânceres apresentam uma forte predisposição ou suscetibilidade hereditária: estes incluem a síndrome de Li-Fraumeni e o retinoblastoma.
- C. Os produtos de *BRCA1* e *BRCA2* (responsáveis pelos cânceres de mama hereditários tipos I e II) parecem estar envolvidos no reparo do DNA.
- D. As células tumorais geralmente apresentam uma alta taxa de glicólise anaeróbia; esta pode ser explicada, em parte, pela presença da isozima PK-2 em muitas células tumorais, a qual está associada a uma menor produção de ATP e, possivelmente, ao uso aumentado de metabólitos para construir a biomassa.
- E. O dicloroacetato, um composto que desencadeia certa atividade anticâncer, inibe a piruvato-carboxilase e, portanto, desvia o piruvato da glicólise.
13. Escolha a única afirmativa FALSA:
- A. O sequenciamento do genoma total e do exoma está revelando importantes novas informações sobre a quantidade e os tipos de mutações nas células cancerosas.
- B. As anormalidades dos mecanismos epigenéticos, como a desmetilação de resíduos de citosina, a modificação anormal de histonas e o remodelamento aberrante da cromatina, estão sendo cada vez mais detectadas nas células cancerosas.
- C. A persistência de células-tronco cancerosas (que, em geral encontram-se dormentes e apresentam sistemas de reparo do DNA ativos) pode ajudar a explicar algumas das deficiências da quimioterapia.
- D. A angiogenina é um inibidor da angiogênese.
- E. A inflamação crônica, possivelmente via aumento da produção de espécies ativas de oxigênio, predispõe ao desenvolvimento de certos tipos de câncer.
14. Em relação à apoptose, escolha a única afirmativa FALSA:
- A. A apoptose pode ser iniciada pela interação de certos ligantes com receptores específicos na superfície da célula.
- B. O estresse celular e outros fatores ativam a via mitocondrial da apoptose; a liberação de citocromo P450 para o citoplasma é um evento importante nessa via.
- C. Um padrão distinto de fragmentos de DNA é observado nas células apoptóticas; ele é causado pela DNase ativada por caspase.
- D. A caspase 3 digere proteínas celulares, como a lamina, certas proteínas do citoesqueleto e várias enzimas, levando à morte celular.
- E. As células cancerosas apresentam várias mutações adquiridas que permitem que elas escapem da apoptose, prolongando a sua existência.
15. Escolha a única afirmativa FALSA:
- A. As proteínas envolvidas na adesão celular incluem as caderinas, as integrinas e as selectinas.
- B. Quantidades reduzidas de E-caderina nas superfícies das células cancerosas podem ajudar a explicar a capacidade de adesão reduzida apresentada pelas células tumorais.
- C. O aumento de atividade da GlcNAc-transferase V nas células cancerosas pode levar à alteração na estrutura dos glicanos na superfície celular, predispondo, possivelmente, à sua disseminação.
- D. As células cancerosas secretam metaloproteinasas que degradam proteínas na MEC e facilitam a sua disseminação.
- E. Todas as células tumorais possuem a capacidade genética para colonizar.
16. O número de enzimas dedicadas ao reparo de lesões hidrolíticas, oxidativas e fotoquímicas aos polinucleotídeos, como o DNA, é muito maior do que o número responsável pelo reparo de proteínas lesadas. Identifique a afirmação da lista a seguir que está INCONSISTENTE com essa observação:
- A. Os polinucleotídeos absorvem a luz ultravioleta com mais eficiência do que as proteínas.
- B. As proteínas contêm enxofre, um elemento que é suscetível à oxidação.
- C. Em geral, as proteínas são recicladas com mais frequência que o DNA.
- D. As mutações em um gene estrutural apresentam o potencial para alterar as proteínas que codificam, assim como o próprio DNA.
- E. Quando não corrigidas, as mutações genômicas serão transmitidas para as gerações seguintes.

17. Qual das seguintes afirmativas NÃO representa uma característica da hipótese de envelhecimento mitocondrial?
- A. As espécies ativas de oxigênio são geradas como um subproduto da cadeia de transporte de elétrons.
 - B. A mitocôndria não possui a capacidade de reparar o DNA lesado.
 - C. Muitos dos complexos da cadeia de transporte de elétrons são construídos a partir de uma mistura de subunidades codificadas pelo núcleo e pela mitocôndria.
 - D. As mitocôndrias lesadas formam agregados resistentes à protease.
 - E. As mitocôndrias lesadas podem desencadear a apoptose-morte celular programada.
18. Qual das seguintes NÃO representa um componente da suíte celular de reparo às lesões e aos agentes de prevenção?
- A. Superóxido dismutase.
 - B. Glutathiona.
 - C. Isoaspartil-metiltransferase.
 - D. Catalase.
 - E. Caspase 7.
19. Escolha uma das afirmações a seguir que descreve um aspecto da teoria metabólica de envelhecimento:
- A. Os níveis elevados de glicose plasmática promovem a formação de agregados proteicos com ligações cruzadas.
 - B. A lesão pelas ROS é multiplicada pela tendência dos radicais de oxigênio de se multiplicarem via reações em cadeia.
 - C. As dietas com restrição calórica promovem atividade metabólica menor e mais eficiente.
 - D. O fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco se torna restrito ao longo do tempo devido à formação de placas arteriais induzidas pelo colesterol.
 - E. A atividade física vigorosa correlaciona-se à perda de células-tronco.
20. Escolha uma das seguintes afirmações que está INCORRETA:
- A. Os telômeros impedem a recombinação genética ao cobrirem as extremidades das moléculas de DNA lineares.
 - B. Os genes do envelhecimento podem ser distinguidos pelo seu impacto sobre um ciclo de vida de um organismo.
 - C. O curto ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* os torna um modelo atraente de organismo para o estudo do envelhecimento.
 - D. O encurtamento do telômero é uma consequência da natureza descontínua do processo pelo qual a “fita tardia” é sintetizada durante a replicação cromossômica.
 - E. A atividade telômera é elevada em ambas as células-tronco e em muitas células cancerosas.

Banco de respostas

Seção I – Proteínas: estrutura e função

- Muito antes do registro histórico, a maioria das civilizações sabia que os açúcares podiam ser convertidos em bebidas alcoólicas. No entanto, a capacidade de os cientistas anteriores ao século XX descobrirem os intermediários desse processo foi prejudicada pela defesa de Louis Pasteur de que a fermentação poderia ocorrer apenas em células intactas. A descoberta casual dos Büchners de que um extrato de leveduras livre de células armazenado em solução concentrada de açúcar produziu etanol e dióxido de carbono permitiu que bioquímicos e médicos identificassem intermediários, enzimas e cofatores envolvidos na fermentação e no processo intimamente relacionado de glicólise.
- Logo foi descoberto que a fermentação era interrompida depois de certo tempo, apesar da presença de grande quantidade de açúcar como substrato. Apenas quando o ortofosfato inorgânico foi adicionado, a fermentação voltou a ocorrer. Essa observação levou rapidamente ao isolamento e à caracterização de cada intermediário da fermentação e da glicólise. Com exceção do açúcar inicial e dos produtos finais, etanol e piruvato, esses intermediários são todos ésteres de fosfato. Experimentos semelhantes utilizando extratos de levedura facilitaram a descoberta do ATP, do ADP e do cofator NAD.
- Preparações utilizadas ao longo do século XX para identificar e estudar os metabólitos e as enzimas dos processos bioquímicos incluem, em ordem decrescente de complexidade, fígados intactos perfundidos, fatias de tecido hepático, homogenatos *in natura*, porções particuladas e solúveis de homogenatos separadas por centrifugação de alta velocidade e preparações brutas e purificadas de enzimas.
- A disponibilidade de isótopos radioativos de carbono, hidrogênio e fósforo (^{14}C , ^3H e ^{32}P) simplificou muito a capacidade de detectar e isolar os intermediários de processos metabólicos como a biossíntese do colesterol, a biossíntese de nucleotídeos e as vias pelas quais os aminoácidos são degradados.
- Garrod propôs que alcaptonúria, albinismo, cistinúria e pentosúria fossem consequências de metabolismo alterado e denominou essas condições como “erros inatos do metabolismo” – termo que hoje chamaríamos de “distúrbios genéticos do metabolismo”. As percepções de Garrod forneceram uma base para o desenvolvimento do campo da genética bioquímica descrito nos últimos capítulos deste livro.
- O controle da biossíntese do colesterol ilustra a ligação entre bioquímica e genética. Os receptores da superfície da célula internalizam o colesterol circulante no plasma, que, então, regula a biossíntese de colesterol. Como discutido em capítulos posteriores, os indivíduos com receptores defeituosos ou truncados não conseguem internalizar o colesterol e, conseqüentemente, sofrem de hipercolesterolemia extrema.
- Os organismos-modelo mais importantes incluem as leveduras (p. ex., *Saccharomyces cerevisiae*), mixomicetos (*Dictyostelium discoideum*), a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) e o pequeno nematódeo *Caenorhabditis elegans*. As vantagens desses organismos-modelo incluem crescimento e manipulações fáceis, curtos tempos de geração e capacidade de gerar formas mutantes com informações úteis.
- D. Hidrocarbonos são insolúveis em água.
- A. Fenilalanina, tirosina e triptofano são os únicos aminoácidos de proteínas que absorvem a luz em 280 nm.
- D. Uma vez que no seu pK_a um ácido fraco não apresenta qualquer carga elétrica *líquida*, a sua mobilidade seria essencialmente zero em um tampão cujo pH fosse igual ao pK_a .
- C. A importante distinção aqui é entre “carga” e “carga *líquida*”. No seu pI, um típico aminoácido contém um número igual de cargas positivas e negativas e, portanto, é carregado, mas não apresenta carga geral *líquida*.
- C. Durante o sequenciamento de uma proteína, a técnica de Edman envolve a derivação sucessiva e a remoção de sucessivos resíduos N-terminais.
- As moléculas não polares tendem a autoassociar em ambiente aquoso. Uma grande gota reduz a área da superfície em contato com a água. Como as moléculas de água em uma interface lipídica apresentam menores possibilidades de ligações de hidrogênio (i.e., apresentam menores graus de liberdade), uma grande gota maximiza o número de moléculas de água livres para otimizarem suas interações de ligações de hidrogênio, uma situação que é termodinamicamente favorável.
- A distinção baseia-se no quão completamente uma base se dissocia em solução. Uma base forte é quase completamente dissociada em solução. Por exemplo, o hidróxido de sódio existe em solução como íons sódio e hidróxido. Em contrapartida, uma base fraca, como o hidróxido de bário, dissocia-se apenas parcialmente em solução. A maioria permanece como $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Considerações semelhantes fazem a distinção entre ácidos fortes e fracos.
- E. Misturas complexas de peptídeos podem ser separadas por espectrometria de massas em *tandem* sem a sua purificação prévia.
- E. Muitas proteínas sofrem processamento pós-traducional. Um exemplo antigo é a insulina, que é sintetizada como um único polipeptídeo que a proteólise posterior converte em duas cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto.
- pI é o pH em que uma molécula não apresenta carga *líquida*. Neste exemplo, o pI é um pH a meio caminho entre os 3º e 4º valores de pK_a : $pI = (6,3 + 7,7)/2 = 7,0$. Para confirmar essa conclusão, imagine como a carga final de uma molécula mudará à medida que a solução for ajustada de um pH fortemente ácido para um pH fortemente básico. À medida que os grupos carboxilatos e, subsequentemente, os grupos amônio começam a se ionizar, a carga final mudará sucessivamente como a seguir: +3, +2, +1, 0, -1, -2, -3.
- Todos os aminoácidos de proteínas são *essenciais*, uma vez que a síntese proteica não pode ocorrer a menos que todos estejam presentes. No entanto, alguns aminoácidos devem estar presentes na dieta de um determinado organismo. Esses aminoácidos “essenciais nutricionalmente” (10 para seres humanos) são os que um organismo não consegue sintetizar a partir de intermediários anfibiólicos. Embora muitas vitaminas possam ser denominadas como “essenciais na dieta”, isso varia entre os organismos. Por exemplo, a vitamina C é *essencial na dieta* apenas para seres humanos, bagres e alguns outros organismos.

19. **D.** Arranjos gênico, também denominados *chips* de DNA ou arranjos de DNA, contêm múltiplas sondas de DNA com diferentes sequências ligadas a locais conhecidos em um suporte sólido de vidro, silicone ou náilon. A hibridização de sondas complementares de DNA ou RNA em locais específicos fornece informações sobre a sua composição de ácidos nucleicos.
20. **D.** Uma interação de ligação de hidrogênio envolve o resíduo da quarta posição ao longo da hélice.
21. **E.** Ao contrário dos vírus, que contêm DNA ou RNA encapsulado no interior de um revestimento proteico, os príons não contêm ácido nucleico e são exclusivamente proteínas. As doenças causadas por príons são transmissíveis apenas pela proteína, sem participação de DNA ou RNA.
22. Ao contrário do segundo grupo do ácido fosfórico que se dissocia ($pK_2 = 6,82$), os outros dois grupos do ácido fosfórico que se dissociam não podem servir como tampões eficazes no pH fisiológico, pois se encontram totalmente dissociados ou predominantemente protonados naquele pH.
23. **A:** Grupos carboxil (pK_1 a pK_3) e grupos amino (pK_4 a pK_7).
B: Menos um.
C: Mais 0,5.
D: Na direção do cátodo.
24. O pK de um grupo em dissociação de um tampão eficaz não deve ter menos que 0,5 unidade de pH removida do pH desejado. O composto tamponante também deve estar presente em excesso suficiente para tamponar o influxo previsto de ácido ou base.
25. A carboxilação de um resíduo glutamyl forma γ -carboxilglutamato, um quelante potente de Ca^{++} , essencial para a coagulação do sangue e a dissolução de coágulos. A hidroxilação da prolina e da lisina forma 4-hidroxi prolina e 5-hidroxi lisina, componentes importantes de várias proteínas estruturais, incluindo o colágeno.
26. (a) O cobre é um grupamento prostético essencial da amina-oxidase, a enzima responsável por converter a lisina em hidroxil lisina no colágeno. A hidroxilação da lisina é essencial para a formação de ligações cruzadas covalentes que ajudam a dar ao colágeno a sua força excepcional.
(b) O ácido ascórbico é um cofator essencial para a enzima prolina-hidroxilase, que converte prolina à hidroxiprolina no colágeno. O grupo hidroxil da hidroxiprolina fornece ligações de hidrogênio entre as cadeias que estabilizam a tripla-hélice de colágeno.
27. Sequências-sinal são utilizadas para marcar proteínas para localizações subcelulares específicas na célula ou para secreção a partir da célula.

Seção II – Enzimas, cinética, mecanismo, regulação e bioinformática

1. A anidrase carbônica catalisa a hidratação do dióxido de carbono para formar ácido carbônico. Uma parte desse ácido fraco, por sua vez, dissocia-se para produzir bicarbonato e um próton. À medida que a concentração de dióxido de carbono cai, o ácido carbônico decompõe-se em dióxido de carbono e água. Para compensar a perda de ácido carbônico, bicarbonato e prótons recombinam-se para restaurar o equilíbrio, levando a uma queda líquida na $[H^+]$ e a um aumento no pH.
2. **D.** 3. **E.** 4. **B.** 5. **A.**
6. **E.** 7. **B.** 8. **C.** 9. **A.**
10. **D.** 11. **E.** 12. **B.** 13. **B.**
14. **C.** 15. **D.** 16. **B.** 17. **B.**
18. **C.**

Seção III – Bioenergética

1. **A.** Uma reação com ΔG negativo é exergônica; ela ocorre espontaneamente e há liberação de energia livre.
2. **E.** Em uma reação exergônica, ΔG é negativo, e, em uma reação endergônica, é positivo. Quando ΔG é zero, a reação está em equilíbrio.
3. **B.** Quando os reagentes estão presentes em concentrações de 1,0 mol/L, ΔG^0 é a variação de energia livre padrão. Para reações bioquímicas, o pH (7,0) também é definido e este é o ΔG^0 .
4. **D.** O ATP contém duas ligações fosfato de alta energia e é necessário para promover reações endergônicas. Ele não é armazenado no corpo, e a sua síntese é bloqueada na presença de desacopladores.
5. **A.** O citocromo c reduzido é oxidado pela citocromo c-oxidase (complexo IV da cadeia respiratória), com a redução concomitante do oxigênio molecular a duas moléculas de água.
6. **E.** A citocromo-oxidase não é uma desidrogenase, embora todos os outros citocromos sejam classificados dessa maneira.
7. **B.** Embora os citocromos p450 estejam localizados principalmente no retículo endoplasmático, eles são encontrados nas mitocôndrias de alguns tecidos.
8. **D.** A oxidação de uma molécula de NADH via cadeia respiratória gera 2,5 moléculas de ATP no total. Uma é formada via complexo I, 1 via complexo II e 0,5 via complexo IV.
9. **C.** 1,5 molécula de ATP é formada no total quando o $FADH_2$ é oxidado, 1 via complexo II e 0,5 via complexo IV.
10. **E.** A oligomicina bloqueia as oxidações e a síntese de ATP, visto que evita o fluxo de prótons para a matriz mitocondrial por meio da ATP-sintase.
11. **A.** Os desacopladores permitem que os elétrons reentrem na matriz mitocondrial sem passar através da ATP-sintase.
12. **E.** Na presença de um desacoplador, a energia liberada quando os prótons retornam para a matriz mitocondrial não é capturada como ATP, sendo dissipada como calor.
13. **C.** A termogenina é um desacoplador fisiológico encontrado no tecido adiposo marrom. A sua função é gerar calor corporal.
14. **D.** Três moléculas de ATP são geradas para cada revolução da molécula de ATP-sintase.
15. **B.** A diferença de potencial eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial interna provocada pelo transporte de elétrons deve ser negativa do lado da matriz, de modo que os prótons sejam forçados a reentrar via ATP-sintase para descarregar o gradiente.

Seção IV – Metabolismo dos carboidratos

- | | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1. C. | 2. D. | 3. E. | 4. D. |
| 5. C. | 6. C. | 7. E. | 8. B. |
| 9. B. | 10. E. | 11. C. | 12. D. |
| 13. D. | 14. D. | 15. D. | 16. E. |
| 17. E. | 18. C. | 19. C. | 20. C. |
| 21. D. | 22. A. | 23. B. | 24. C. |
| 25. D. | 26. E. | 27. A. | 28. B. |

Seção V – Metabolismo dos lipídeos

1. **D.**
2. **D.**
3. **A.** Os gangliosídeos são derivados da glicosilceramida.
4. **C.** A, B, D e E são classificados como antioxidantes preventivos, uma vez que atuam reduzindo a taxa de iniciação da cadeia.

5. **D.**
6. **B.**
7. **C.** Os ácidos graxos de cadeia longa são ativados ao se ligarem à CoA, mas a acil-CoA graxo não consegue atravessar a membrana mitocondrial interna. Após a transferência do grupo acil da CoA para a carnitina pela carnitina-palmitoil-transferase (CPT)-I, a acilcarnitina é transportada através da membrana pela carnitina-acilcarnitina-translocase em troca de uma carnitina. Dentro da matriz, a CPT-II transfere o grupo acil de volta para a CoA, e a carnitina é levada de volta para o espaço intermembrana pela enzima-translocase.
8. **E.** A quebra do ácido palmítico (C16) requer 7 ciclos de β -oxidação, cada um produzindo 1 molécula de FADH₂ e 1 molécula de NADH, resultando na formação de 8 moléculas de acetil-CoA de 2C.
9. **B.** Quando a ação da carnitina-palmitoiltransferase-I é inibida pela malonil-CoA, os grupos acil graxos não são capazes de entrar na matriz da mitocôndria, onde ocorre a sua quebra por β -oxidação.
10. **C.** Seres humanos (e a maioria dos mamíferos) não apresentam enzimas capazes de introduzir uma ligação dupla nos ácidos graxos além do Δ^9 .
11. **D.** A inibição do transportador de ácidos tricarbóxicos faz os níveis de citrato no citosol diminuírem, e isso favorece a inativação da enzima.
12. **A.**
13. **C.**
14. **E.**
15. **E.** O glucagon é liberado quando os níveis de glicose no sangue estão baixos. Nessa situação, os ácidos graxos são quebrados para produzir energia, e a síntese de ácidos graxos é inibida.
16. **E.** Glucagon, ACTH, epinefrina e vasopressina promovem a ativação da enzima.
17. **B.**
18. **D.**
19. **A.** Os quilomícrons são lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, sintetizadas na mucosa intestinal, utilizam gorduras da dieta e secretadas para a linfa.
20. **E.** A VLDL é sintetizada e secretada pelo fígado, e os tecidos adiposo e muscular capturam os ácidos graxos liberados pela ação da lipase lipoproteica.
21. **D.** A lipoproteína de densidade muito baixa secretada pelo fígado é convertida em lipoproteína de densidade intermediária e, então, em lipoproteína de baixa densidade (LDL) pela ação de lipases e pela transferência de colesterol e proteínas a partir da lipoproteína de alta densidade. A LDL fornece colesterol para tecidos extra-hepáticos e também é removida pelo fígado.
22. **A.** Os quilomícrons são sintetizados no intestino e secretados para a linfa após uma refeição gordurosa.
23. **E.** Os quilomícrons e seus remanescentes são removidos da circulação rapidamente após uma refeição, e, em seguida, a secreção de lipoproteína de densidade muito baixa pelo fígado aumenta. Os corpos cetônicos e os ácidos graxos não esterificados são elevados no estado de jejum.
24. **C.** Quando o éster de colesterol é transferido da HDL para outras lipoproteínas pela ação da CETP, ele é, em última análise, levado ao fígado na forma de VLDL, IDL ou LDL.
25. **D.** Os quilomícrons são metabolizados por uma lipase lipoproteica quando ligados à superfície de células endoteliais. Esse processo libera ácidos graxos do triacilglicerol, os quais são capturados pelos tecidos. As partículas resultantes menores de quilomícrons remanescentes enriquecidas com colesterol são liberadas na circulação e removidas pelo fígado.
26. **C.** O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático a partir de acetil-CoA. A etapa limitante de velocidade é a formação do mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA pela HMG-CoA-redutase, e o lanosterol é o primeiro intermediário cíclico.
27. **C.**
28. **C.** Os ácidos biliares secundários são produzidos pela modificação dos ácidos biliares primários no intestino.
29. **B.** Se o receptor de LDL for defeituoso, a LDL não é removida do sangue, provocando hipercolesterolemia grave.
30. **A.** PCSK9 regula a reciclagem de receptores de LDL para a superfície celular após ter ocorrido a endocitose. Portanto, a inibição da atividade de PCSK9 aumenta o número de moléculas receptoras de LDL na superfície celular, levando a uma maior velocidade de remoção e a níveis de colesterol mais baixos.

Seção VI – Metabolismo de proteínas e aminoácidos

1. **D.** A fenilalanina-hidroxilase catalisa uma reação funcionalmente irreversível e, portanto, não pode converter tirosina em fenilalanina.
2. **E.** A histamina é um catabólito, e não um precursor, da histidina.
3. **B.** A inserção de selenocisteína em um peptídeo ocorre durante, e não após, a tradução.
4. **C.** A transaminação dependente de piridoxal é a primeira reação na degradação de todos os aminoácidos comuns, exceto treonina, lisina, prolina e hidroxiprolina.
5. **B.** Glutamina.
6. **C.** O esqueleto de carbono da alanina é o que mais contribui para a gliconeogênese hepática.
7. **B.** O ATP e a ubiquitina participam da degradação de proteínas associadas à membrana e de proteínas com meias-vidas *curtas*.
8. **C.** Em função da incapacidade de incorporar NH₄⁺ na ureia, os sinais clínicos de distúrbios metabólicos do ciclo da ureia incluem *alcalose*, e não *acidose*.
9. **E.** A fumarase *citossólica* e a malato-desidrogenase *citossólica* convertem a fumarase em oxalacetato após uma reação *citossólica* do ciclo da ureia. A fumarase *mitocondrial* e a malato-desidrogenase funcionam no ciclo TCA, não na biossíntese da ureia.
10. **A.** A serina, e não a treonina, fornece a porção tioetanol da coenzima A.
11. **E.** A descarboxilação do *glutamato*, e não da *glutamina*, forma GABA.
12. A 5-hidroxilisina e o γ -carboxiglutamato representam exemplos de modificações pós-traducionais de resíduos de peptidil-lisil e peptidil-glutamil, respectivamente. Em contrapartida, a selenocisteína é incorporada em proteínas de modo cotraducional, do mesmo modo que os 20 aminoácidos comuns de proteínas. O processo é complexo e envolve o tRNA incomum, denominado tRNA^{sec}.
13. A biossíntese de aminoácidos que são essenciais na dieta de seres humanos requer reações múltiplas. Como as dietas humanas, em geral, contêm quantidades adequadas desses aminoácidos, a perda de genes que podem codificar essas enzimas “desnecessárias” e a ausência da necessidade de gastar a energia necessária para as copiar fornecem vantagem evolutiva.

14. Como a glutamato-desidrogenase desempenha múltiplos papéis centrais no metabolismo, a sua completa ausência seria inquestionavelmente fatal.
15. E. A albumina não é uma hemoproteína. Em casos de anemia hemolítica, a albumina pode ligar-se a algum met-heme, porém, ao contrário das outras proteínas listadas, a albumina não é uma hemoproteína.
16. A. A porfiria intermitente aguda deve-se a mutações no gene da uroporfirina-sintase I.
17. A. A bilirrubina é um tetrapirrol *linear*.
18. D. Icterícia grave, dor abdominal superior e perda de peso, além de resultados laboratoriais que indiquem um tipo obstrutivo de icterícia são consistentes com o câncer de pâncreas.
19. O ensaio explora as diferentes solubilidades em água das bilirrubinas conjugada e não conjugada. Dois ensaios são realizados, um na ausência e outro na presença de um solvente orgânico; em geral, o metanol. Os grupos altamente polares do ácido glicurônico da bilirrubina conjugada conferem solubilidade em água, o que assegura que ela reagirá com o reagente colorimétrico mesmo na ausência de qualquer solvente orgânico adicionado. O resultado de um ensaio realizado na *ausência* de metanol adicionado, denominado “bilirrubina direta”, é o glicuronídeo de bilirrubina. Outro ensaio, realizado na *presença* de metanol adicionado, mede a bilirrubina *total*, isto é, tanto a bilirrubina conjugada como a não conjugada. A *diferença* entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta, chamada de “bilirrubina indireta”, é a bilirrubina *não conjugada*.
20. A biossíntese do heme a partir da succinil-CoA e da glicina ocorre apenas quando a disponibilidade de ferro livre sinaliza o potencial para a síntese do heme. A regulação tem como alvo a primeira enzima da via metabólica, a δ -aminolevulinato-sintase (ALA-sintase), em vez de uma reação subsequente. Esse fato conserva energia ao evitar o desperdício de um tioéster da coenzima A.

Seção VII – Estrutura, função e replicação de macromoléculas informacionais

- D. β,γ -Metileno e β,γ -imino trifosfatos de purina e pirimidina não liberam o fosfato terminal de forma imediata por hidrólise ou por transferência do grupo fosforil
 - D.
 - E. A pseudouridina é excretada de modo não alterado na urina humana. A sua presença na urina não é indicativa de patologia.
 - A. Os distúrbios metabólicos são poucas vezes associados a defeitos no catabolismo da pirimidina, que forma produtos solúveis em água.
- | | | | |
|--------|--------|--------|--------|
| 5. B. | 6. D. | 7. B. | 8. C. |
| 9. C. | 10. D. | 11. E. | 12. B. |
| 13. D. | 14. D. | 15. E. | 16. A. |
| 17. C. | 18. B. | 19. D. | 20. B. |
| 21. C. | 22. A. | 23. C. | 24. A. |
| 25. E. | 26. B. | 27. A. | 28. E. |
| 29. C. | 30. A. | 31. A. | 32. C. |
| 33. D. | 34. E. | 35. C. | 36. B. |
| 37. C. | 38. E. | 39. D. | 40. D. |
| 41. B. | 42. A. | 43. A. | 44. E. |
| 45. C. | 46. A. | 47. C. | 48. D. |
| 49. C. | 50. B. | 51. E. | 52. C. |
| 53. D. | 54. A. | 55. E. | 56. A. |

- | | | | |
|--------|--------|--------|--------|
| 57. E. | 58. C. | 59. A. | 60. D. |
| 61. D. | 62. E. | 63. A. | 64. C. |
| 65. C. | 66. E. | 67. D. | |

Seção VIII – Bioquímica da comunicação extracelular e intracelular

- B. Os glicolipídeos estão localizados na parte externa.
 - A. As α -hélices são os principais constituintes de proteínas de membrana.
 - E. A insulina também aumenta a captação de glicose no músculo.
 - A. A sua ação mantém a alta concentração intracelular de potássio comparada à de sódio.
- | | | | |
|--------|--------|--------|--------|
| 5. D. | 6. B. | 7. C. | 8. B. |
| 9. D. | 10. A. | 11. E. | 12. B. |
| 13. D. | 14. E. | 15. B. | 16. C. |
| 17. A. | 18. C. | 19. A. | 20. B. |
| 21. D. | 22. A. | | |

Seção IX – Tópicos especiais (A)

- | | | | |
|--------|--------|--------|--------|
| 1. A. | 2. E. | 3. C. | 4. D. |
| 5. E. | 6. D. | 7. C. | 8. B. |
| 9. D. | 10. E. | 11. C. | 12. B. |
| 13. C. | 14. D. | 15. B. | 16. A. |
| 17. B. | 18. C. | 19. E. | 20. D. |
| 21. E. | 22. A. | 23. C. | 24. C. |
| 25. A. | 26. E. | 27. A. | 28. A. |
| 29. A. | 30. C. | 31. E. | 32. A. |
| 33. B. | 34. A. | 35. B. | 36. C. |
| 37. D. | 38. E. | 39. E. | 40. A. |
| 41. D. | 42. C. | 43. B. | 44. E. |
| 45. C. | 46. B. | 47. B. | 48. B. |
| 49. B. | 50. C. | 51. D. | 52. C. |
| 53. A. | 54. A. | 55. A. | 56. E. |
| 57. A. | | | |

Seção X – Tópicos especiais (B)

- No corpo, a hidrólise de nitroglicerina libera íons nitrato que podem ser reduzidos pela aldeído-desidrogenase mitocondrial para produzir óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador.
 - O ciclo contrátil do músculo cardíaco é controlado por oscilações nos níveis de Ca^{2+} citosólico. Se a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático for retardada suficientemente por uma deficiência de atividade da SERCA2a, os miócitos cardíacos não serão capazes de remover esse segundo mensageiro do seu citoplasma antes do início do próximo ciclo de excitação. A persistência de altos níveis basais de Ca^{2+} citosólico levará tanto à redução na amplitude do ciclo contrátil quanto ao progressivo desacoplamento do ciclo de excitação-contração.
 - As semelhanças incluem o fato de ambas as formas de miosina-cinase de cadeia leve serem ativadas por Ca^{2+} -calmodulina e o fato de ambas as enzimas fosforilarem a cadeia leve reguladora (cadeia leve 2) no grupo da cabeça da miosina. A diferença essencial é que a fosforilação das cadeias leves de miosina é uma etapa obrigatória para o início da contração no músculo liso, ao passo que esse papel é desempenhado pelo sistema da troponina do músculo estriado.
- | | | | |
|-------|-------|-------|-------|
| 4. A. | 5. D. | 6. B. | 7. E. |
|-------|-------|-------|-------|

8. **D.**
9. Como a principal proteína, em termos de massa, no sangue, a albumina serve como contribuinte primário para a manutenção da pressão osmótica. Como a albumina é sintetizada principalmente nos hepatócitos, a manutenção da pressão osmótica do sangue pode ser comprometida se doença ou lesão hepática comprometer a capacidade de o fígado sintetizar albumina. Se a pressão osmótica cair o suficiente, as forças de Starling que normalmente dirigem o fluxo resultante de água dos tecidos para o sangue serão dissipadas, levando ao acúmulo de líquido nos tecidos.
10. A haptoglobina liga-se à hemoglobina extracorpúscular, formando um complexo grande demais para passar através do glomérulo para os túbulos renais.
11. A produção de novos anticorpos com propriedades únicas de ligação aos antígenos depende da recombinação e da mutação do DNA que codifica regiões hipervariáveis das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas. A citidina-desaminase provoca mutações genéticas ao catalisar a hidrólise das bases de citosina presentes no DNA, transformando-as em uracila.
12. **B.** 13. **C.** 14. **C.** 15. **B.**
 16. **E.** 17. **E.**
18. As hemácias deficientes em glicose-6-fosfato-desidrogenase são consideradas extremamente vulneráveis à destruição por espécies reativas de oxigênio devido à falta de glutatona reduzida, um agente importante para a proteção contra o estresse oxidativo. Isso é consequência da sua dependência nessa enzima para produzir um suprimento abundante de NADPH utilizado pela glutatona-redutase.
19. **E.** 20. **C.** 21. **D.** 22. **A.**
 23. **C.** 24. **D.** 25. **B.** 26. **A.**
27. **E.** As importinas estão envolvidas na importação de proteínas para o núcleo.
28. **B.** Algumas proteínas de mamíferos são translocadas pós-traducionalmente.
29. **C.** A ubiquitina marca proteínas para degradação por proteossomos.
30. **E.** A furina converte pró-albumina em albumina.
31. **C.** A NSF é uma ATPase.
32. **D.** As ligações cruzadas constituem uma característica importante da estrutura do colágeno.
33. **C.** As deleções no gene da elastina foram identificadas como responsáveis por muitos casos da síndrome de Williams-Beuren.
34. **B.** Os subtipos cifoescoliose e dermatosparaxia da síndrome de Ehlers-Danlos são causados por defeitos em genes que não codificam o colágeno.
35. **B.** O ácido hialurônico (hialuronan) não é sulfatado.
36. **C.** A síndrome de Hurler é causada por deficiência de α -L-iduronidase.
37. **D.** A acondroplasia é causada por mutações no gene *FGFR3*.

Seção XI – Tópicos especiais (C)

1. **D.**
2. **D.** Das proteínas listadas, apenas o fator II é um fator de coagulação dependente da vitamina K.
3. **D.**
4. **E.** GPIIb-IIIa (integrina α Ib β 3) não é um receptor acoplado à proteína G.
5. **A.** A hemofilia A, sendo uma doença ligada ao cromossomo X, dificilmente ocorre em mulheres.
6. **B.** A maioria das substâncias químicas carcinogênicas interage covalentemente com o DNA.
7. **B.** Certos vírus de DNA também são carcinogênicos.
8. **E.** Mutações em 5 a 6 desses dois tipos de genes promotores ou supressores de câncer são necessárias para a carcinogênese.
9. **E.** A PDGF estimula a fosfolipase C, não a fosfolipase A.
10. **D.** A ligação da RB à E2F bloqueia a progressão da célula da fase G₁ à fase S.
11. **C.** A instabilidade de microssatélites é causada por anomalias do reparo de malpareamentos.
12. **E.** O dicloroacetato inibe a piruvato-desidrogenase-cinase.
13. **D.** A angiogenina é um inibidor da angiogênese.
14. **B.** O citocromo c é liberado por mitocôndrias.
15. **E.** Apenas cerca de 1 em cada 10 mil casos de câncer pode ter a capacidade de colonizar.
16. **B.** 17. **D.** 18. **D.** 19. **C.**
 20. **B.**

Índice

Nota: os números de páginas seguidos por *f* indicam figuras, e os números de páginas seguidos por *t* indicam tabelas.

- A**
- AAV. *Ver* Vírus associado ao adenovírus
- ABC-1. *Ver* Transportador 1 com cassete de ligação ao ATP
- Abetalipoproteinemia, 256-257, 275*t*
- Abordagem de animais transgênicos, 442
- Abordagem de engenharia reversa, 107
- Abordagem do gene quimérico, 442-443
- Absorção, 537-544
- Ação hormonal dependente de cálcio e metabolismo de fosfatidilinosíteis, 525-526
- ACAT (acil-CoA:colesterol-aciltransferase), 271
- ACAT. *Ver* Acil-CoA:colesterol-aciltransferase
- Acelerador de conversão da protrombina sérica, 712, 712*f*, 713*t*, 714*t*
- fármacos cumarínicos afetando, 717
- Aceptores de prótons, bases como, 10
- Aceruloplasminemia, 675
- Acetacetato, 226, 227*f*
- no catabolismo da tirosina, 305*f*
- Acetilação, 586-587
- de histonas, 735
- na modificação covalente, 31*t*
- na regulação da catálise enzimática, 94
- Acetilação de proteínas, 94
- Acetil-CoA-carboxilase, 233
- na regulação da lipogênese, 234*f*, 237, 237*f*
- Acetilcolina, inibição da liberação de, 623
- Acetil-transacilase, 233, 233*f*, 234*f*
- Acetiltransferases, 587
- Acetoacetil-CoA-sintase, na síntese do mevalonato, 267, 267*f*
- Acetona, 226
- Acidemia isovalérica, 300*t*, 309
- Acidemia isovalérica, 309
- Ácido 2,4-diaminobutírico, 19*t*
- Ácido acético, 213*t*
- valor de pK/pK_a , 13*t*
- Ácido acetilsalicílico
- ação antiplaquetária do, 720-721
- ciclooxigenase afetada por, 240
- síntese de prostaglandinas afetada por, 232
- Ácido araquidônico/araquidonato, 215*f*, 238, 238*f*
- formação de eicosanoide e, 239, 240*f*, 241*f*, 242*f*
- para deficiência de ácidos graxos essenciais, 239
- Ácido ascórbico (vitamina C), 196, 561-562, 561*f*
- como antioxidante, 220
- deficiência de, 562, 631
- colágeno afetado na, 47, 562
- na síntese de colágeno, 47, 562
- Ácido aspártico, 17*t*
- Ácido butírico, 213*t*
- Ácido caproico, 213*t*
- Ácido carbônico, valor de pK/pK_a do, 12, 13*t*
- Ácido cervônico, 213*t*
- Ácido cítrico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido cólico, 273
- Ácido conjugado, 11
- Ácido desoxicólico, síntese de, 274
- Ácido desoxirribonucleico. *Ver* DNA
- Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), como antioxidante preventivo, 220
- Ácido docosa-hexaenoico (DHA), 214, 239
- Ácido eicosapentaenoico (EPA), 214, 238*f*
- Ácido eláidico, 213, 213*t*, 215*f*
- Ácido esteárico, 213*t*
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), como antioxidante preventivo, 220
- Ácido fitânico, doença de Refsum causada pelo acúmulo de, 231
- Ácido fítico (inositol-hexafosfato), absorção de cálcio afetada por, 541
- Ácido fólico, 546, 559-560, 559*f*
- coenzimas derivadas do, 62
- deficiência de, 299
- formas de, na dieta, 559-560
- inibidores do metabolismo do, 559
- suplementar, 560
- Ácido fórmico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido fosfatídico, 215, 216*f*, 479, 479*f*
- Ácido fosfórico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido glicocólico, síntese de, 273*f*
- Ácido glicoenodesoxicólico, síntese de, 273*f*
- Ácido glutâmico, 17*t*
- Ácido glutárico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido graxo-sintase, 80, 233-234
- Ácido hialurônico, 156, 159*f*, 637, 640
- Ácido hidroxâmico suberoilânilida, 735
- Ácido β -hidroxibutírico, 347
- Ácido hipúrico/hipurato, síntese de, 315, 315*f*
- Ácido láctico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido láurico, 213*t*
- Ácido linoleico/linoleato, 213*t*, 238, 238*f*, 239
- na deficiência de ácidos graxos essenciais, 239
- síntese de, 239*f*
- Ácido α -linolênico, 214
- para deficiência de aminoácidos essenciais, 239
- Ácido litocólico, síntese de, 273*f*, 274
- Ácido mirístico, 213*t*
- Ácido *N*-acetilneuramínico, 159*f*, 159*t*, 204*f*, 574
- em glicoproteínas, 203, 204*f*, 571*t*
- nos gangliosídeos, 250, 251*f*
- Ácido neuramínico, 159, 218
- Ácido nicotínico, 556. *Ver também* Niacina como fármaco hipolipidêmico, 275
- Ácido β -*N*-oxalil-diaminopropiônico, 19*t*
- Ácido oleico, 212, 212*f*, 213*t*, 215*f*
- Ácido palmítico, 213*t*
- Ácido palmitoleico, 213*t*, 238*f*
- síntese de, 238
- Ácido pantotênico, 233, 561, 561*f*
- coenzimas derivadas do, 62
- no ciclo do ácido cítrico, 164
- Ácido pteroilglutâmico. *Ver* Ácido fólico
- Ácido quenodesoxicólico, 273, 273*f*, 274
- Ácido retinoico, 547. *Ver também* Retinol receptores para, 547
- Ácido ribonucleico. *Ver* RNA
- Ácido succínico, valor de pK/pK_a do, 13*t*
- Ácido tauroquenodesoxicólico, síntese do, 273*f*
- Ácido timnodônico, 213*t*
- Ácido todo-*trans*-retinoico, 740*t*
- Ácido úrico, 342, 342*f*
- catabolismo de purinas na formação de, 354, 355*f*
- Ácido urônico, 634
- Ácido valérico, 213*t*
- Ácidos, 13*t*
- como doadores de prótons, 10
- conjugados, 11
- estrutura molecular afetando a força de, 13 fortes, 10
- fracos. *Ver* Ácidos fracos
- polifuncionais, nucleotídeos como, 342
- Ácidos biliares (sais), 273-274
- circulação entero-hepática dos, 274
- na digestão de lipídeos e na absorção, 539
- secundários, 273*f*, 274
- síntese de, 273-274, 273*f*
- regulação de, 273*f*, 274
- Ácidos fortes, 10
- Ácidos fracos, 13
- equação de Henderson-Hasselbalch descrevendo o comportamento dos, 12
- valores de pK/pK_a dos, 13
- constantes de dissociação para, 11-12
- importância fisiológica dos, 11-12
- capacidade de tamponamento dos, 12-13
- Ácidos graxos, 3, 212-215
- absorção de cálcio afetada por, 541
- anti-inflamatórios, 214-215
- ativação de, 224, 224*f*
- eicosanoides formados a partir de, 239, 241*f*
- em membranas, 479
- essenciais, 232, 238, 238*f*, 239
- deficiência de, 239
- metabolismo anormal de, 241
- produção de prostaglandinas e, 239

- interconvertibilidade de, 145
livres. *Ver* Ácidos graxos livres
metabolismo de, 140-141, 141f
não esterificados (livres). *Ver* Ácidos graxos livres
- não saturados, 213. *Ver também* Ácidos graxos insaturados
- nomenclatura de, 212, 212f
- oxidação de, 224-226. *Ver também* Cetogênese
- aspectos clínicos da, 231
hipoglicemia causada por comprometimento da, 231
liberação de acetil-CoA e, 141, 141f, 224-226, 224f, 225f
propriedades físicas/fisiológicas dos, 213-214
- saturados, 213, 213t
- síntese de, 232-236, 233f, 234f. *Ver também* Lipogênese
- ciclo do ácido cítrico na, 165-168, 166f
extramitocondrial, 234
metabolismo de carboidratos e, 140
nas mitocôndrias, 224, 224f
- trans*, 213, 239
- transporte de, carnitina no, 224, 224f
- triacilgliceróis (triglicerídeos) como forma de armazenamento de, 215, 216f
- Ácidos graxos de cadeias longas, 133
- Ácidos graxos essenciais, 232, 238, 238f, 239
- deficiência de, 239
- metabolismo anormal de, 241
- produção de prostaglandinas e, 239
- Ácidos graxos insaturados, 213, 213t. *Ver também* Ácidos graxos
- eicosanoides formados a partir de, 232, 239, 241f, 242f
- em membranas, 479f, 480, 481f
- essenciais, 238, 238f
- deficiência de, 239
- metabolismo anormal de, 241
- produção de prostaglandinas e, 232
- estruturas de, 238f
- ligações duplas *cis* em, 213, 215f
- metabolismo de, 239
- na dieta, níveis de colesterol afetados por, 274
- oxidação de, 226, 227f
- síntese de, 238-239, 239f
- Ácidos graxos livres, 223, 254, 254t
- insulina afetando, 262
- lipogênese afetada por, 236, 237f
- metabolismo da glicose afetando, 262
- metabolismo de, 255
- fome e, 148t, 149, 149f
- na esteatose hepática, 260
- regulação da cetogênese e, 229-230, 229f
- Ácidos graxos monoinsaturados, 213, 213t.
- Ver também* Ácidos graxos: Ácidos graxos insaturados
- na dieta, níveis de colesterol afetados por, 274
- síntese de, 238-239, 239f
- Ácidos graxos não esterificados. *Ver* Ácidos graxos livres
- Ácidos graxos não esterificados. *Ver* Ácidos graxos livres
- Ácidos graxos nutricionalmente essenciais, 238, 282t. *Ver também* Ácidos graxos
- deficiência de, 239, 241
- metabolismo anormal de, 241
- Ácidos graxos poli-insaturados, 213, 213t.
- Ver também* Ácidos graxos: Ácidos graxos insaturados
- eicosanoides formados a partir de, 239, 240f, 241f
- essenciais, 238, 238f
- na dieta, níveis de colesterol afetados por, 274
- síntese de, 239, 239f
- Ácidos graxos saturados, 213, 213t
- Ácidos graxos *trans*, 213, 239
- Ácidos nucleicos. *Ver* DNA: RNA
- Ácidos polifuncionais, nucleotídeos como, 342
- Ácidos poli-insaturados C20, eicosanoides formados a partir de, 239, 240f, 241f
- Ácidos siálicos, 159, 159f, 203, 204f, 218
- em gangliosídeos, 204f, 250, 251f
- em glicoproteínas, 159t, 571, 571t, 575f
- Ácidos urônicos, 159
- Acidose
- lática. *Ver* Acidose lática
- metabólica, amônia na, 292
- Acidose lática, 168
- metabolismo do piruvato e, 174
- deficiência de tiamina e, 556
- por defeitos mitocondriais hereditários, 127
- Acidose metabólica, amônia na, 292
- Acidúria
- dicarboxílica, 231
- metilmalônica, 187
- orótica, 356-357
- urocânica, 299, 300t
- Acidúria 4-hidroxi-butírica, 320
- Acidúria argininosuccínica, 295
- Acidúria dicarboxílica, 231
- Acidúria orótica, 356-357
- Acidúria urocânica, 299, 300t
- Acilcarnitina, 224, 224f
- Acil-CoA:colesterol-aciltransferase, 271
- Acil-CoA-desidrogenase, 121, 224f, 225, 225f
- de cadeia média, deficiência de, 231
- na ativação de ácidos graxos, 224f, 226
- na síntese de triacilglicerol, 248, 261, 262f
- Acil-CoA-desidrogenase de cadeia média, deficiência de, 231
- Acil-CoA-sintase, 127
- Acilglicerol, 246-250
- Acondroplasia, 496t, 645f
- Aconitase (aconitato-hidratase), 162
- Acoplamento, 114, 114f
- ATP no, 115
- Acoplamento excitação-resposta, membranas no, 477
- Acoplamento receptor-efetor, 500
- ACP. *Ver* Proteína transportadora de grupos acil
- ACTH. *Ver* Hormônio adrenocorticotrófico e hipercortisolismo
- Actina, 648, 695t, 696
- actina F, 650, 651
- actina G, 649
- decoração da, 651, 651f
- na contração muscular, 651-655, 654
- regulação do músculo estriado e, 653
- Actina F, 650, 651
- Actina G, 649
- Actomiosina, 650
- Açúcares, 156. *Ver também* Carboidratos
- amino (hexosaminas), 156, 156f
- classificação de, 152-153, 153t
- em glicosaminoglicanos, 156, 203, 204f
- em glicosíngolipídeos, 203, 204f
- glicose como precursora de, 203, 204f
- inter-relações no metabolismo de, 204f
- desoxi, 156, 159f
- em lipídeos anfipáticos, 480
- isomerismo de, 153-154, 154f
- Açúcares de nucleotídeos, 571, 574
- Açúcares desóxi, 156, 156f
- Adaptações homeostáticas, 518
- Adenilato-ciclase, 521-522, 521t
- cAMP derivado da, 179
- na lipólise, 263, 263f
- Adenilato-cinase (miocinase), 117, 127
- como fonte de ATP no músculo, 662
- na regulação da gliconeogênese, 189
- Adenina, 341t, 342f
- Adenosina, 341t
- conformadores *syn* e *anti* da, 341f
- na formação do ácido úrico, 354, 355f
- pareamento de bases no DNA, 360, 361f
- Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfossulfato, 343f, 344
- Adesão celular, glicosíngolipídeos na, 250
- Adição de cauda de homopolímeros, 453
- Adipócitos, 263
- reposição, 757t
- ADP, 116f
- ADPase, 720, 721t
- ADP-ribose, NAD como fonte de, 556
- Adrenoleucodistrofia neonatal, 614, 614f
- Adutos, 758
- Afetam a diferenciação, medicamentos anticâncer, 740t
- Afetam alterações epigenéticas, medicamentos anticâncer, 740t
- Afinidade de SRP-R, para SRP, 616
- AFP. *Ver* α -Fetoproteína
- Agamaglobulinemia, 687
- AGE. *Ver* Ácidos graxos essenciais
- Agentes antiangiogênese, 740t
- Agentes anticâncer, 739t
- Agentes anti-hormonais, 740t
- AGEs. *Ver* Produtos finais da glicação avançada
- AGL. *Ver* Ácidos graxos livres
- Aglomerado do gene da β -globina, representação esquemática do, 461f
- AGNE (ácidos graxos não esterificados). *Ver* Ácidos graxos livres
- Agrecanos, 643
- Agregados, formação de, 45
- Água, 3, 6-7
- coeficiente de permeabilidade da, 481f
- estrutura da, 7f
- como solvente biológico, 6-7, 7f
- em ligações de hidrogênio, 7, 7f
- estrutura biomolecular e, 7-8, 7t
- dissociação de, 9-10
- como nucleófilo, 9-10
- Água corporal. *Ver* Água
- AHG. *Ver* Fator anti-hemofílico A/globulina
- AINEs. *Ver* Anti-inflamatórios não esteroides
- ALA. *Ver* Alanolevulinato
- Alactasia, 599
- β -Alanil-dipeptídeos, 318-320
- β -Alanil-imidazol, 318
- Alanina, 16t, 289, 314
- na formação do piruvato, 301
- síntese da, 283, 283f
- α -alanina, 301
- β -alanina, 318
- Alanina-aminotransferase, 69, 598t
- e icterícia, 598
- importância diagnóstica da, 68t
- na síntese da ureia, 291, 291f

- Alanina-transaminase. *Ver*
Alanina-aminotransferase
- ALAS1 (ALA-sintase hepática), 326-327
na porfiria, 328t, 330
- ALA-sintase, 326-327
- ALA-sintase eritroide (ALAS2), 326-327
na porfiria, 328t
- ALA-sintase hepática (ALAS1), 326-327
na porfiria, 328t, 330
- Albumina, 623, 634, 668, 669, 671
ácidos graxos livres em combinação com, 223,
254t, 255, 671
bilirrubina conjugada ligada à, 333
cobre ligado à, 675
- Albuminúria, 634
- Alcalose, amônia na, 292
- Alcalose metabólica, amônia na, 292
- Alcaptonúria, 304
- Alças (conformação de proteínas), 39
- Alças antiparalelas, mRNA e tRNA, 416
- Álcool, etil. *Ver* Etanol
- Álcool-desidrogenase na esteatose hepática, 261
- Alcoolismo
cirrose e, 261
esteatose hepática e, 261
estudo de caso, 747
glicosilação da transferrina no, 674
- Aldeído-desidrogenase, 120
na esteatose hepática, 261
- Aldolases
aldolase B, 202, 202f
deficiência de, 205
deficiência de aldolase A, 174
na glicólise, 170, 170f
- Aldose-redutase, 202, 202f, 205
- Aldoses, 152, 153t, 154, 155f
estrutura em anel das, 153f
- Alfa-hélice, 38-39, 38f
- Alinhamento de sequência múltipla, 103, 103f
- Alongamento
na síntese de RNA, 398
na síntese proteica, 423f
- Alongamento da cadeia. *Ver* Alongamento
- Alopurinol, 344, 344f, 354, 356-357
- ALP. *Ver* Fosfatase alcalina
- ALT. *Ver* Alanina-aminotransferase
- Alta altitude, adaptação à, 57
- Alteplase. *Ver* Ativador de plasminogênio tecidual
- Alteração de Gibbs na energia livre, 113
- Alterações na duração da vida, níveis de
colesterol afetados por, 274-275
- Altitude, adaptação à elevada, 57
- Ambiente desfavorável, para o ferro heme, 53
- Ambiente extracelular, membranas na
manutenção de, 478, 478t
- Ambiente intracelular, membranas na
manutenção do, 478, 478t
- Ambiguidade e código genético, 414
- Amido, 156, 158f
índice glicêmico do, 538
hidrólise do, 538
- Amilases, 60-61
na hidrólise do amido, 538
- Amiloide sérico A, 680
- Amiloidose, 680
Amiloidose hereditária, 680
Amiloidose primária, 680
Amiloidose secundária, 680
- Amilopectina, 156, 158f, 538
- Amilopectinose, 179t
- Amilose, 156, 158f
- Aminoácido gliconeogênico, 289, 290f
- Aminoácidos, 3, 15-24, 16t-17t, 291f. *Ver*
também Peptídeos
absorção de, 539, 541
análise/identificação de, 23-24
biossíntese, 283
cadeia ramificada, catabolismo de, 308-309,
310f
distúrbios de, 309-311
carga elétrica resultante de, 20, 20f
cetogênicos, 146
deficiência de, 281, 544
degradação de proteínas e, 288-289, 288f
desaminação de. *Ver* Desaminação
em peptídeos, 15, 22, 23f
em proteínas, 16t-17t
estereoquímica, 18, 18f
excitatórios. *Ver* Aspartato: Glutamato
extraterrestres, 18-19
glicemia e, 190
glicogênicos, 146
hidrólise das ligações peptídicas, 756-757
incomuns, 22-23, 23f
interconvertibilidade de, 146
intermediários do catabolismo para
biossíntese de carboidratos e lipídeos,
298
metabolismo de, 140f, 141, 141f. *Ver também*
Esqueletos de carbono de aminoácidos:
Nitrogênio de aminoácidos
piridoxal-fosfato no, 557
modificações pós-traducionais de, 16, 18, 18f
na catálise, conservação de, 66, 66t
na gliconeogênese, 164, 165f
não proteicos, 19t
necessidades para, 543-544
no ciclo do ácido cítrico, 146
nutricionalmente essenciais, 141, 282, 282t
nutricionalmente não essenciais, 141, 282,
282t
síntese de, 282-286
ponto de solubilidade de, 21-22, 22f
potencialmente tóxicos, 19-20, 19t
produtos derivados de, 313-321. *Ver também*
produto específico
propriedades de, 16-20
propriedades dos grupos funcionais, 20-22
remoção de amônia dos, 291-294, 291f
reposição de, por cetóácidos na dieta, 285
sequência na estrutura primária, 22
síntese, 282-286, 282t
ciclo do ácido cítrico na, 164, 165f
no metabolismo de carboidratos, 140
sistemas transportadores/carreadores,
hormônios afetando, 487
substituições, mutações de troca de sentido
causadas por, 417, 417f
transaminação de. *Ver* Transaminação
troca entre órgãos mantendo os níveis
circulantes de, 289-290
valores de pK/pK_a, 16t-17t, 20, 20f
ambiente afetando, 21
- α -Aminoácidos. *Ver também* Aminoácidos
em proteínas, 15, 16t-17t
código genético especificando, 16, 16t-17t
- Aminoácidos cetogênicos, 146
- Aminoácidos de cadeia ramificada, catabolismo
de, 289-290, 308-309, 310f
distúrbios de, 309-311
- Aminoácidos essenciais. *Ver* Aminoácidos
nutricionalmente essenciais
- Aminoácidos glicogênicos, 146
- Aminoácidos livres, absorção de, 539, 541
- Aminoácidos nutricionalmente essenciais, 141,
282, 544. *Ver também* Aminoácidos
- Aminoácidos nutricionalmente não essenciais,
141, 281, 282t, 544
síntese de, 282-286
- Aminoacil-tRNA na síntese proteica, 422
- Aminoacil-tRNA-sintase, 415, 415f
- Aminoácúcares (hexosaminas), 156, 156f
em glicosaminoglicanos, 156, 203, 204f
em glicosfingolipídeos, 203, 204f
glicose como precursor de, 203, 204f
inter-relações no metabolismo de, 204f
- L- α -Aminoácido, 306f
- L- α -Aminoácido-D-semialdeído, 306f
- Aminofosfolipídeos, assimetria da membrana
e, 482
- β -Aminoisobutirato, 318
- Aminolevulinato, 325, 325f
na porfiria, 329
- Aminolevulinato-desidratase, 325, 325f
na porfiria, 328t, 329
- Aminolevulinato-sintase, 325-327, 325f, 326-327
na porfiria, 328f, 328t, 329
- Aminopeptidases, 539
- Aminotransferases, 165, 165f, 283
importância diagnóstica de, 68t
na biossíntese de ureia, 291, 291f
- Aminotransferases de hemácias, na avaliação do
estado da vitamina B₆, 557-558
- Amobarbital e fosforilação oxidativa, 127
- Amônia
destoxificação da, 292
glutamina-sintase fixando, 292, 292f
nitrogênio removido como, 291-294, 292f
no equilíbrio acidobásico, 292
- AMP, 116f, 341f, 341t, 342f
cíclico. *Ver* AMP cíclico
conversão de IMP a, 348, 350f
derivados da coenzima do, 344t
energia livre da hidrólise de, 115
estrutura do, 342f
PRPP glutamyl-amidotransferase regulada
por, 350
regulação por retroalimentação do, 350-351,
351f
- AMP cíclico, 179, 180f, 343, 343f, 344t
adenilato-ciclase afetando, 179, 521-522, 521t
como segundo mensageiro, 179
contração de músculo liso afetada por, 660
fosfodiesterases, 523
fosfoproteínas, 523
fosfoproteínas-fosfatases e, 523-524
na gliconeogênese, 189, 190f, 193
na regulação do metabolismo do glicogênio,
179-180, 181f, 183f
proteínas-cinase e, 522-523
- Ampicilina, 455
- Amplificação das sequências de DNA e
sequenciamento de proteínas, 30
- Amplificação de genes, 726t, 727
- Anafilaxia, substância de reação lenta da, 242
- Analbuminemia, 671
- Análise de heredograma para anemia falciforme,
462-463
- Análogos de glutamina, síntese de nucleotídeos
purínicos afetada por, 348, 350

- Análogos de pirimidina, na biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos, 354
- Análogos de substrato, inibição competitiva por, 82
- Âncora, 623
- Ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (ancoradas por GPI), 573
- Ancoragem, 621
na importação nuclear, 612
- Androgênios, aromatização periférica de, 505
- Anemia de Diamond-Blackfan, 692
- Anemia falciforme, 693t
- Anemia ferropriva, 693t
- Anemia hemolítica sensível à primaquina, 694
- Anemia megaloblástica
deficiência de folato causando, 560
deficiência de vitamina B₁₂ causando, 559
- Anemia perniciosa, 546, 559
- Anemias, 58
causas de, 689, 693t
deficiência de ferro, 541, 560, 677-679, 679t
definição, 689
hemolíticas, 168, 174
deficiência causando, 196, 204-205
hiperbilirrubinemia/icterícia em, 334, 334t
níveis de haptoglobina em, 673
peroxidase e, 200, 200f
megaloblásticas
deficiência de folato causando, 560
deficiência de vitamina B₁₂ causando, 559
falciformes. *Ver* Doença falciforme perniciosas, 550t
prevalência de, 689
- Anemias hemolíticas, 168, 174, 204
causas de, 694f
deficiência de
glicose-6-fosfato-desidrogenase, 196, 204-205, 693-694
possível cadeia de eventos nas, 694f
hiperbilirrubinemia/icterícia nas, 334, 334t
níveis de haptoglobina nas, 673
peroxidase e, 200, 200f, 204
- Anemias megaloblásticas, 693t
- Aneuploidia, 731, 731f
- Angiotensina II
biossíntese, 513
formação e metabolismo da, 514f
- Angiotensinogênio, 513
- Ângulo phi, 37
- Ângulo psi, 37
- Anidrase carbônica II (AC II), 643
- Anidridos ácidos, potencial de transferência do grupo para, 343
- Animais transgênicos, 464
- Ânions de tricarboxilato, sistemas de transporte para regulação da lipogênese e, 237
- Anomalias de peroxissomos, distúrbios devidos a, 608t, 625
- Anômeros alfa, 154
- Anômeros beta, 154
- Anquirina, 695t, 696
- Anserina, 315, 316f, 318
- Antecedente da tromboplastina plasmática, 712f, 713, 713t
deficiência de, 714
- Antibióticos
aminoácidos em, 156
inibidores do folato como, 559
síntese de proteínas bacterianas afetada por, 426
- Anticoagulantes (cumarínicos), 717
- Anticonformadores, 341-342, 341f
- Anticorpos, 668. *Ver também* Imunoglobulinas monoclonais, hibridomas na produção de, 684-685
- Anticorpos antimicrosossomais (contra a tireoide-peroxidase), 599
- Anticorpos antirreceptores de TSH, 599
- Anticorpos antitireoide-peroxidase (antimicrosossomais), 599
- Anticorpos monoclonais, 740t
ao VEGF, 736
e utilização terapêutica em humanos, 685
hibridomas na produção de, 684-685, 685f
- Antígeno carcinoembrionário, 592, 739t, 740
- Antígeno prostático específico, 739t, 740
- Anti-inflamatórios não esteroides
ciclooxigenase afetada por, 240
síntese de prostaglandinas, 232, 240
- Antioxidantes, 125, 220
retinoides e carotenoides como, 219, 546
vitamina C como, 220
vitamina E como, 125, 220, 553, 554f
- Antiporta ornitina-citrulina, defeituosa, 299
- α₁-Antiproteínase
inibidor, 706
no enfisema e na doença hepática, 679
- Antiproteínases, 706
- Antiquimiotripsina, 672t
- α₁-Antitripsina, 706, 717
- Antitrombina/antitrombina III, 668, 672t
heparina ligando-se à, 717
- Aorta, 632
- Apagadores de códigos, 437
- Aparelho de Golgi, 572, 576, 608
lúmen do, 615
na formação da VLDL, 256f
na separação de proteínas, 608, 608f
na síntese de membrana, 608
parecendo unir-se ao RE, 623
proteínas destinadas à membrana do, 608, 615
transporte retrógrado a partir do, 616, 618
- APC. *Ver* Proteína C ativada
- Apo A-I, 254t, 255, 274
deficiências de, 275t
- Apo A-II, 254t, 255
lipoproteína lipase afetada por, 257
- Apo A-IV, 254t, 255
- Apo B-100, 254t, 255
no metabolismo de LDL, 257f, 258
regulação de, 271
- Apo B-48, 254t, 255
- Apo C-I, 254t, 255
- Apo C-II, 254t, 255
na atividade da lipoproteína lipase, 257
- Apo C-III, 254t, 255
lipoproteína lipase afetada por, 257
- Apo D, 254t, 255
- Apo E, 254t, 255, 258
- Apolipoproteínas/apoproteínas, 255
distribuição de, 254t, 255
hemoglobina, oxigenação afetando, 55
- Apomioglobina, ambiente desfavorável para o grupo heme de ferro e, 53
- Apoproteínas. *Ver* Apolipoproteínas/apoproteínas
- Apoptose, 248, 250, 758
características microscópicas da, 733
características principais da, 735t
como as células cancerosas escapam da, 734-735
- definição, 733
esquema da, 734f
fosfatidilcolinas na, 216
p53 e, 392
vs. necrose, 733
- APP. *Ver* Proteínas amiloides precursoras
- Aquaporinas, 490
- Arabinosilcitosina (citarabina), 344, 345f
- Aracnodactilia contratural congênita, 632
- Arcabouço, 632
- Argentafinoma (carcinoide), serotonina no, 316
- Arginase, 300t
distúrbios da, 295-296, 295t
na síntese da ureia, 301f
- Arginina, 17t, 314
catabolismo da, 299, 301f
metabolismo da, 314f
na síntese de ureia, 299
- Argininossuccinato, na síntese da ureia, 293f, 294
- Argininossuccinato-liase
deficiência de, 295, 295t
na síntese da ureia, 293f, 294
- Argininossuccinato-sintase, 295
deficiência de, 295, 295t
- Armadilhas extracelulares de neutrófilos, 705-706, 705f
- Arsenato, oxidação e fosforilação afetada por, 171
- Arsenito, oxidação e fosforilação afetada por, 174
- ARSs. *Ver* Sequências de replicação autônoma
- Artrite gotosa, 354
- Artrite reumatoide, 580, 627
- Ascorbato, 200, 201f, 567, 568t
- Asma, leucotrienos na, 213
- Asparagina, 17t
no catabolismo de nitrogênio de aminoácidos, 298-299, 299f
síntese de, 283, 283f
- Asparaginase, no catabolismo de nitrogênio de aminoácidos, 292, 292f
- Asparagina-sintase, 283, 283f
- Aspartato, 165
catabolismo de, 298-299, 298f
na síntese de ureia, 294
síntese de, 283, 283f
- Aspartato 102, na catálise covalente, 64-65
- Aspartato transcarbamoilase, 91
na síntese de pirimidinas, 353f, 354
- Aspartato-aminotransferase, 598, 598t
importância diagnóstica da, 68t, 69
- Aspartato-transaminase. *Ver* Aspartato-aminotransferase
- Assimetria
em membranas, 482
lado interno-lado externo, 482
ligação de importina e, 612
lipídeos e proteínas, montagem de membrana e, 624, 624f
- Assimetria lado interno/externo, membrana, 482
- Assimetria transversa, 624
- Assimetrias regionais, membrana, 482
- AST. *Ver* Aspartato-aminotransferase
- Ataxia-telangiectasia, 390
- ATCase. *Ver* Aspartato-transcarbamoilase
- α-talassemias, 58, 693t
- Aterosclerose, 254, 565, 720
colesterol e, 218, 267, 274
concentração plasmática de LDL e, 259
HDL e, 258
hiper-homocisteinemia e suplementos de ácido fólico na prevenção de, 560

- lisofosfatidilcolina e, 217
 α -tocoferol. *Ver* Tocoferol
- Ativação da apo-transcetilase, na avaliação do estado nutricional da tiamina, 556
- Ativação de protrombina à trombina, pelo fator Xa, 714-715
- Ativação de transcetilase de hemácias, na avaliação do estado nutricional da tiamina, 556
- Ativador de plasminogênio tecidual, 69, 718-719, 718f
- Ativadores. *Ver também* Potencializadores/elementos potencializadores na regulação da expressão gênica, 429
- Ativadores alostéricos, 188
- Atividade da fosfatase alcalina sérica, 598
- Atividade da histona-acetiltransferase, 531
- Atividade HAT. *Ver* Atividade da histona acetiltransferase
- Atividade óptica/isômero, 153-154
- Atlas do Genoma do Câncer, 102
- Átomo de carbono anomérico, 154
- Átomos coplanares, caráter de ligação dupla parcial e, 23
- Atorvastatina, 275
- ATP, 115-116, 116f, 341f, 343, 610, 613
 a partir da energia livre do catabolismo, 131-132
 a partir do controle respiratório, 131-132, 132t
 controle respiratório na manutenção do suprimento de, 167
 degradação de proteínas e, 288
 energia livre da hidrólise de, 115-116, 116f
 fosforilação oxidativa, 662
 hidrólise de
 na contração muscular, 651, 652f, 663
 por NSF, 623
 na síntese de purinas, 348
 na síntese e importação de proteína mitocondrial, 614
 na transferência de energia livre a partir de processos exergônicos para processos endergônicos, 115, 117f
 no acoplamento, 115
 no músculo/contração muscular, 648-649, 651, 654
 fontes múltiplas de, 662f
 no transporte ativo, 490-491, 491f
 oxidação de ácidos graxos produzindo, 224, 225-226, 226t
 produção de pirofosfato inorgânico e, 117-118
 síntese de
 no ciclo do ácido cítrico, 162f, 164, 169t, 173
 oxidação da glicose produzindo, 169t, 173
 transporte de elétrons na cadeia respiratória na, 130-131, 131f, 132f
- ATPase, 490-491, 491f
 chaperonas exibindo atividade de, 619
 no transporte ativo, 490-491, 491f
 tipo P ligadora de cobre, mutações no gene para doença de Wilson causadas por, 676
- ATPase do tipo P ligadora de cobre, mutações no gene para, 676
- ATP-citrato-liase, 166, 166f
- acetil-CoA para lipogênese e, 234
- ATP-sintase, 130, 132f
- Atracilósido, na cadeia respiratória, 132, 132f
- Atrofia girata da retina, 299
- Ausência de enzimas ramificadas, 179t
 na biossíntese do glicogênio, 178f
- Autoanticorpos, 684
- Autoanticorpos da tireoide, 599
- Autoassociação, interações hidrofóbicas e, 8
- Autoimunidade, 684
- Auto-organização de bicamada lipídica, 480
- Auto-oxidação. *Ver* Peroxidação
- Autorradiografia, definição de, 468
- Avidina, deficiência de biotina causada por, 560
- Azacitidina 5' ou 6', 344
- Azadesoxicitidina 5', 735, 740t
- 8-Azaguanina, 344, 344f
- Azatioprina, 344, 345f
- Azauridina 5' ou 6', 344, 344f
- B**
- Bactérias
 ciclo de transcrição em, 397
 intestinais, na desconjugação da bilirrubina, 332
- Bactérias intestinais, no metabolismo da bilirrubina, 332
- Bacteriófago, definição de, 468
- Bainhas de mielina, 491
- BAL. *Ver* Dimercaprol
- Balsas lipídicas, 216, 484, 623, 624
- BamHI, 452, 452t
- Banco de dados de mutações de genes humanos, 102
- Banco de dados de transcrição gênica
 GeneCards, 102. *Ver também* Transcrição
- Banco de dados HapMap, 102
- Banco de dados Online Mendelian Inheritance In Man, 102
- Bancos de dados, 99
- Banda A, 648
- Banda de Soret, 327
- Bandas H, 648, 649f
- Bandas I, 648, 649f
- Barbituratos, na cadeia respiratória, 132, 132f
- Barreira da energia de ativação, enzimas afetando, 77
- Base conjugada, 11
- Bases
 como aceptores de prótons, 10
 conjugadas, 11
 fortes, 11
 fracas, 11
- Bases de Schiff, 578
- Bases fortes, 10
- Bases fracas, 10
- Basic Local Alignment Search Tool. *Ver* BLAST
- Basófilos, 700-701, 706
- Beri beri, 546
- Beri beri Shoshin, 555
- Bevacizumabe, 740t
- BgIII, 452t
- BHA. *Ver* Hidroxianisol butilado
- BHT. *Ver* Hidroxitolueno butilado
- Biblioteca, 469
- Biblioteca de cDNA, 456
- Biblioteca de DNA complementar (cDNA), 455
- Biblioteca genômica, 455
- Bibliotecas virtuais, triagem de, 105-106, 105f
- Bicamada lipídica, 481, 481f
 proteínas de membrana e, 481
- Bicamadas, lipídeos, 480-481, 480f
 proteínas de membrana e, 481
- Bicarbonato de sódio, 663
- Bicarbonato nos líquidos extracelular e intracelular, 478t
- 2,3-Bifosfoglicerato, 691
 estrutura T da hemoglobina estabilizada por, 57
- 2,3-Bifosfoglicerato-fosfatase, em hemácias, 172, 172f
- Bifosfoglicerato-mutase, na glicólise em hemácias, 172, 172f
- Bile, secreção de bilirrubina para, 331, 331f
- Bilirrubina
 acúmulo de (hiperbilirrubinemia), 332-333, 332t
 captação hepática de, 331, 331f
 catabolismo do grupo heme produzindo, 330-332, 330f
 conjugação de, 331, 331f
 conjugada
 ligada à albumina e, 333
 redução, a urobilinogênio, 332
 fecal, na icterícia, 334t
 glicuronidação da, 586
 não conjugada, distúrbios ocorrendo na, 332
 secreção para a bile, 331, 331f
 urina, na icterícia, 333-334, 334t
 valores normais para, 334t
- Bilirrubina conjugada
 ligação à albumina e, 333
 redução, a urobilinogênio, 332
- Bilirrubina não conjugada, distúrbios ocorrendo a partir de, 332
- Biliverdina, 330, 330f
- Biliverdina-reductase, 330
- Biocitina, 560, 561f
- Bioenergética, 113. *Ver também* ATP
- Bioengenharia, 3
- Bioética, 3
- Biofísica, 3
- Bioinformática, 3, 99, 467
 biologia computacional, 102
 células virtuais, 107
 definição de, 99
 desenvolvimento de fármacos com auxílio computacional, 105-107
 fontes genômicas para, 101-102
 função de proteínas e, 34
 genomas e medicina, 98-99
 Projeto Genoma Humano na, 98
 "proteínas desconhecidas", identificação de, 103-105
 proteínas, identificação de, 102-103
- Biologia, 3-4
- Biologia computacional, 102
 definição de, 102
 genomas e medicina, 98-99
 Projeto Genoma Humano na, 98
 recursos genômicos para, 101-102
- Biologia de células-tronco, 3, 464
- Biologia de sistemas, 3, 107-108
- Biologia do desenvolvimento, alvos de teste para estudo, 766
- Biologia molecular, 30. *Ver também* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
- Biologia sintética, 3-4
- Biomarcadores tumorais, 739t, 740

- Biomoléculas. *Ver também* tipo específico
 água afetando a estrutura de, 6-7, 7-8
 estabilização de, 8
 reação com espécies reativas de oxigênio, 759f
- Bioquímica, 1-4
 como base de saúde/doença, 3
 história da, 1-2
 importância biomédica, 1
 Projeto Genoma Humano e, 3-4, 4f
 relação com a medicina, 2-3, 2f
- Biossíntese de catecolamina, 509f
 dopa-descarboxilase na, 509-510
 dopamina β -hidroxilase na, 510
 PNMT na, 510
 tirosina-hidroxilase na, 510
- Biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos, 352
 polipeptídeos multifuncionais na, 352, 353f
 regulação de, 354, 354f
 via para, 353f
- Biossíntese de purinas hepáticas, 350-352, 351f
 regulação da formação de AMP e GMP na, 350-352
 regulação da PRPP glutamyl-amidotransferase na, 350
- Biocologia, 3
- Biotina, 560-561, 561f
 como grupo prostético, 62
 deficiência de, 560-561
 na síntese do malonil-CoA, 233, 233f
- BiP. *Ver* Proteína de ligação da imunoglobulina
- BLAST, 103
 blastn, 103
 blastp, 103
 blastx, 103
- Bolhas de replicação, 386-387, 386f
- Bomba de sódio-potássio (Na^+ - K^+ -ATPase), 490-491, 491f
 no transporte de glicose, 491, 492f
- Bombardamento de átomos rápidos (FAB), na espectrometria de massas, 31
- Bombas, 485f, 491
 no transporte ativo, 491, 491f
- Bombas de prótons, 130
 cadeia respiratória como, 127-130
- BPG. *Ver* 2,3-Bisfosfoglicerato
- Braço acceptor do tRNA, 366, 366f, 416, 416f
- Braço D do tRNA, 366, 416
- Braço extra, do tRNA, 366, 367f
- Bradicinina, 713
- Brefeldina A, 623
- Brotamento de vesículas, 621
- Bursa de Fabricius, 706
 de neutrófilos, 704t
- C**
- Cabeça de miosina, 651, 658
 alterações de conformação na, na contração muscular, 651
- CADD. *Ver* Desenvolvimento de medicamentos assistido com auxílio computacional
- Cadeia de alongamento
 na síntese de ácidos graxos, 236, 237f
 no ciclo de transcrição, 396f, 398
- Cadeia J, 683f
- Cadeia leve da cinase da miosina, 659
- Cadeia respiratória, 126-135. *Ver também* Fosforilação oxidativa
 aspectos clínicos da, 135
 como bomba de prótons, 127-130
 complexo III (ciclo Q) na, 127, 128-129, 130f
 complexo IV na, 127, 128f, 130
 complexos de proteínas mitocondriais na, 120t, 127, 128f
 complexos I e II na, 127, 128, 128f
 desidrogenases na, 121
 energia capturada no catabolismo a partir de, 116, 131-132, 169t
 flavoproteínas e proteínas ferro-enxofre na, 127-128
 fosforilação oxidativa na, 130, 169t
 gradiente de proteínas promovendo a síntese de ATP a partir do transporte de elétrons na, 130-131, 131f, 132f
 inibição de veneno da, 132, 132f
 NADH-Q oxidoredutase como acceptor de elétrons na, 127, 128f, 163f
 nas mitocôndrias, 128f
 oxidação de equivalentes redutores na, 127-130, 128f
 substratos para, ciclo do ácido cítrico fornecendo, 161-162, 162f
 suprimento de ATP a partir do, 131-132, 132t
 teoria quimiosmótica do, 131f, 132-133
 teoria quimiosmótica no controle respiratório e desacopladores na, 131f, 132-133
- Cadeias de ácidos graxos, alongamento de, 236, 237f
- Cadeias de N-glicanos, 615
- Cadeias de oligossacarídeos, 670
- Cadeias de poli-N-acetilactosamina, 575
- Cadeias L. *Ver* Cadeias leves
- Cadeias laterais, em porfirinas, 323, 324f
- Cadeias leves
 genes produzindo imunoglobulina, 684
 rearranjo do DNA e, 380-381
- Cadeias leves da imunoglobulina, 681
 genes produzindo, 684
 rearranjo de DNA e, 380-381
- Cadeias leves de miosina, 659
 na contração do músculo liso, 659
- Cadeias pesadas de miosina, 650-651
 miocardiopatia hipertrófica hereditária causada por mutações no gene para, 658
- Caderina-E, 736
- Cafeína, 342, 343f
 regulação hormonal da lipólise e, 263
- Calbindina, 541
- Calcidiol (25-hidroxicoalciferol), no metabolismo da vitamina D, 552f
- Calciferol. *Ver* Vitamina D
- Calcineurina, 655
- Calcinose, 553
- Cálcio, 552-553
- Cálcio ATPase, 657
- Calcitonina como biomarcador tumoral, 739t
- Calcitriol ($1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$), 552
 absorção de, 541
 metabolismo da vitamina D e, 541, 552-553
 absorção de ferro afetada por, 541
 biossíntese, 508-509
 na pele, 508
 no fígado, 508-509
 nos rins, 509
 como biomarcador tumoral, 739t
 concentração de cálcio regulada por, 552
 mediador da ação hormonal, 525-526
 metabolismo da vitamina D afetado por, 552-553
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
 na coagulação sanguínea, 712, 712f, 714t
 na contração muscular, 655
 ativação da fosforilase e, 180
 no músculo liso, 659
 retículo sarcoplasmático e, 656
 na hipertermia maligna, 654
 no líquido extracelular, 478, 478t
 no líquido intracelular, 478, 478t
- Cálculos biliares, 537
 colesterol, 267
- Caldesmona, 660
- Calmodulina, 524, 659
 fosforilase muscular e, 180, 181f
- Calmodulina-4 Ca^{2+} , na contração do músculo liso, 659
- Calnexina, 576-577, 618
- Calor, a partir da cadeia respiratória, 132
- Calreticulina, 618
 proteína do RE, 577
- Calsequestrina, 653, 655
- Camada bimolecular da membrana, 480-481.
Ver também Bicamada lipídica
- cAMP. *Ver* AMP cíclico
- CAMs. *Ver* Moléculas de adesão celular
- Canais de água, 490
- Canais de cálcio no músculo cardíaco, 656-657
- Canais dependentes de ligantes, 489, 658t
- Canais dependentes de voltagem, 489, 489f, 490f, 658t
- Canais iônicos, 477, 487-489, 488f, 489t, 491, 496, 658t
 doenças associadas a distúrbios dos, 658t
 no músculo cardíaco, 657, 658t
- Canais iônicos dependentes, 489
- Canais iônicos mecanicamente regulados, 658t
- Canal condutor de proteínas, 615
- Canal de cálcio tipo L, 656
- Canal de K^+ , 489, 489f, 490f
- Canalização, no ciclo do ácido cítrico, 162
- Canalopatias, 657
- Câncer, 565
 agentes anticâncer para, 739t
 alvos de medicamentos anticâncer, 741f
 aspectos imunológicos do, 741-742
 causas de, 724
 comprometimento mitocondrial no, 738
 disseminação do, 736
 mecanismos epigenéticos, 735-736
 metástase e, 736-738
 oncogenes e genes supressores de tumor no, 726-730
 origem clonal, 723
 papel das células-tronco no, 736
 predisposição hereditária ao, 732
 prevalência, 722
 prevenção por fatores de risco modificáveis, 730, 731t
 relação de inflamação e obesidade com, 742
 relação dos fatores de crescimento de polipeptídeos com, 730
 resistência a fármacos, 741t
 tipos de, 722
- Câncer colorretal
 desenvolvimento de
 alterações genéticas associadas ao, 729f
 genes associados ao, 729f
 genes supressores de tumor e papel dos oncogenes no, 728-730, 729f
 genes de reparo de malpareamentos no, 390t

- Câncer colorretal não poliposo hereditário, genes de reparo de malpareamentos no, 390t
- Câncer de colo. *Ver* Câncer colorretal
- Câncer dependente de hormônios, deficiência de vitamina B₆ e, 557
- CAP. *Ver* Proteína ativadora do catabolismo
- Capacidade de ligação do ferro total, 674
- Capacidade de ligação do ferro total, 674
- Cápsulas, 620
- Captura de energia, 115-116
- Caquexia, 148
- Caquexia no câncer, 172, 543
- Carapaça, de proteínas de revestimento, 622
- Carbamatos, hemoglobina, 56
- Carbamoil-fosfato
energia livre da hidrólise do, 116t
excesso de, 356
na síntese da ureia, 293, 293f, 294
- Carbamoil-fosfato-sintase
carbamoil-fosfato-sintase I, 293, 294
deficiência de, 295, 295t
na síntese de ureia, 293, 293f, 294
carbamoil-fosfato-sintase II, na síntese de pirimidinas, 352, 353f
- Carboidratos, 152-160. *Ver também* Glicose:
Açúcares: tipos específicos
classificação dos, 152-153, 153t
digestão e absorção de, 538
em lipoproteínas, 159
em membranas celulares, 159
interconvertibilidade de, 145
isomerismo de, 153-154, 154f
metabolismo de, 140, 140f, 141f
doenças associadas ao, 152
vitamina B₁ no, 550t
na síntese de ácidos graxos, 145
perda de peso muito baixa a partir de dietas com, 194
superfície celular e glicolipídeos, 152
- Carboidratos da superfície da célula,
glicolipídeos e, 218
- Carboxibiotina, 560, 561f
- Carboxipeptidases, 539
- Carcinogênese, 723-724
- Carcinogênese química, 724-725
estágios da, 725
- Carcinogênico direto, 725f
- Carcinogênicos químicos
diretos e indiretos, 725f
e câncer, 724-726
estruturas dos, 725f
interação com o DNA, 724
variedade de, 724t
- Carcinogênio indireto, 725f
- Carcinoide (argentafinoma), serotonina em, 316
- Carcinomas pancreáticos, 733
- Cardiolipina, 127, 216f, 217
síntese de, 246, 246f, 248, 248f
- Cardiomíocitos, taxa de reposição de, 757t
- Carga, na síntese proteica, 415, 415f
- Carga resultante, de aminoácido, 20, 20f
- Carioferinas, 612
- Cariótipo, 375f
- Carnitina
deficiência de, 223, 231
excreção urinária de, 752t
fígado e músculo, 751t
no transporte de ácidos graxos, 224, 224f
- Carnitina-acilcarnitina-translocase, 224, 224f
- Carnitina-palmitoiltransferase, 223
- Carnitina-palmitoiltransferase-I, 224, 224f
deficiência de, 231
na regulação da cetogênese, 229, 229f
- Carnitina-palmitoiltransferase-II, 224, 224f
deficiência de, 231
- Carnosina, 315, 316f, 319
- Carnosinúria, 319
- Caroteno, 564, 567
- Caroteno-dioxigenase, 547
- Carotenoides, 547. *Ver também* Vitamina A
- Carotenoides provitamina A, 547
- Cartilagem
componentes da, 643
doenças metabólicas e genéticas, 642t
principais proteínas da, 643t
representação esquemática da, 644f
- Cartilagem hialina, principais proteínas da, 643
- Cartilagem nasal bovina, diagrama esquemático da, 644f
- Cascata, 685
- Cascata de fosfatases, 501t
- Caspases, 733
- Catalase, 122, 693
como antioxidante, 220
no metabolismo do nitrogênio, 291, 292f
- Catalise acidobásica, 63
- Catalise covalente, 63, 63f, 77
quimiotripsina na, 64-65, 77
- Catalise específica de ácidos/bases, 63
- Catalise geral ácido/base, 63
- Catalise/reações catalíticas (enzimáticas). *Ver também* Metabolismo
acidobásica, 63
protease do HIV na, 64, 64f
cinética de, 77
alterações de energia livre e, 75
concentração de substrato e, 78-79
energia de ativação afetando, 74-75
equações equilibradas e, 74
estados de transição e, 81
fatores afetando as taxas de, 75-77
inibição competitiva vs. não competitiva e, 81
modelos de, 79
no desenvolvimento de fármacos, 85
velocidade inicial e, 78
coenzimas/cofatores na, 61-62
concentração de substrato afetando a velocidade de, 78-79
modelo de Hill de, 79
modelo de Michaelis-Menten de, 79
conservação de resíduos e, 66
constante de equilíbrio e, 76-77
covalente, 63, 77
quimiotripsina na, 64-65, 77
frutose-2,6-bifosfatase em, 65f
deslocamento duplo, 84
deslocamento sequencial, 84
detecção de enzimas facilitada por, 66-68
especificidade da, 61
grupamentos prostéticos na, 61-62
isozimas e, 66
mecanismos de
grupos prostéticos/cofatores/coenzimas nos, 61-62
mutagênese direcionada por local no estudo de, 71
quimiotripsina, 64-65
no sítio ativo, 62-63
oxalacetato e, 162
“pingue-pongue”, 84, 85f
- por cepa, 63
por proximidade, 63
reações Bi-Bi, 84
cinética de Michaelis-Menten, 84
regulação de, 87-96, 88f, 145, 146f
alostérica, 90-91, 90f, 145, 146f
compartimentalização na, 88-89
constante de Michaelis (K_m) na, 88, 88f
covalente, 90, 92, 93f
fluxo de metabólitos e, 88
fosforilação-desfosforilação na, 93f, 94t
inibição por retroalimentação e, 90f, 91
processos ativos e passivos na, 88, 88f
protólise na, 92, 93f
quantidade de enzimas e, 89-90
regulação por retroalimentação e, 91, 145
- Catarata diabética, 205
- Catecolaminas. *Ver também* Biossíntese de catecolamina: biossíntese de tipo específico
armazenamento de, 515t
- Cátions. *Ver também* cátions específicos
penetração da membrana por, 134
- Cauda poli(A) de mRNA, 365, 409
na iniciação da síntese proteica, 421
- Cavéolas, 484
- Caveolina 1, 484
- CBG. *Ver* Globulina de ligação dos corticosteroides
- CBP. *Ver* Proteína de ligação da CREB
- CBP/p300 e vias de transdução de sinais, 532f
- CDKs. *Ver* Proteínas-quinase dependentes de ciclina
- CDRs. *Ver* Regiões determinantes da complementaridade
- CEA. *Ver* Antígeno carcinoembrionário
- Cefalina (fosfatidiletanolamina), 216, 216f
assimetria da membrana e, 482
síntese de, 246, 246f
- Cegueira, deficiência de vitamina A causando, 546
- Cegueira noturna, deficiência de vitamina A causando, 188t, 546
- Célula no transporte de macromoléculas, 492-493, 492f, 495f
- Célula-alvo, 495
conceito de, 498-499
determinantes de concentração de hormônio na, 499t
- Células cancerosas, 577, 580
alterações bioquímicas e genéticas ocorrendo em, 623f
aneuploidia de, 731
anomalias da apoptose, 733-735
anomalias de membrana e, 496t
anomalias do ciclo celular em, 730-731
ciclina e, 389
dependentes de hormônios, deficiência de vitamina B₆ e, 557
efeito Warburg em, 738
estímulo da angiogênese por, 736
instabilidade genômica das, 731-732
isozimas de piruvato-quinase e glicólise em, 739f
maneiras de evitar a apoptose, 734-735
níveis elevados de atividade de telomerase em, 732
propriedades das, 623f, 722
propriedades metastáticas das, 580
sequenciamento de todo o genoma, benefícios do, 732-733
sequenciamento do exoma, benefícios do, 732-733
taxa de glicólise aeróbica em, 739

- Células cultivadas, 581
- Células de levedura, importação de proteínas mitocondriais estudadas em, 610
- Células do mieloma, hibridomas originados das, 685, 685f
- Células do sangue, 689-692. *Ver também*
Hemácias: Neutrófilos: Plaquetas derivadas a partir de células-tronco hematopoiéticas, 689-690
importância funcional, 690-692
reações de importância em relação ao estresse oxidativo nas, 693
via de diferenciação, 690, 690f
- Células dos músculos esqueléticos intercostais, taxa de reposição, 757t
- Células endoteliais, 579
na coagulação e na trombose, 720, 721t
- Células fagocíticas
explosão respiratória de, 704
proteases derivadas de, 706
- Células *natural killer*, 707
- Células neoplásicas/neoplasia. *Ver* Câncer:
Células cancerosas
- Células plasmáticas, 707
- Células progenitoras linfoides, 701
- Células progenitoras mieloides, 701
- Células T auxiliares, 707
- Células T citotóxicas, 707
- Células transfectadas em cultura, 443
- Células virtuais, 107
- Células-tronco hematopoiéticas, origem das células sanguíneas a partir de, 689-690
- Célula-tronco
definição, 689
potência, 689
- Celulose, 156, 158f
- Centrómero, 374, 375f
- Cepa, catálise por, 63
- Ceramidas, 216, 217f, 249-250, 250f
em membranas, 479
síntese de, 249-250, 250f
- Ceras, 212
- Cerebrosídeos, 250
- Ceruloplasmina, 672
deficiência de, 675-676
importância diagnóstica da, 68t, 676
- Cetoacidose, 223, 231
no diabetes melito, 149
- 3-Cetoacil-sintase, 233, 234f
- Cetoaminas, 578
- Cetogênese, 141f, 144, 226-230. *Ver também*
Ácidos graxos
altas taxas de oxidação de ácidos graxos e, 226-229, 227f, 228f
HMG-CoA na, 226-227, 228f
regulação de, 229-230, 229f
- α -Cetogluturato, 299
complexo desidrogenase, 163
no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 298f
- Cetonemia, 227
- Cetonúria, 231
cadeia ramificada (doença da urina do xarope de bordo), 309
- Cetonúria de cadeia ramificada (doença da urina do xarope de bordo), 309
função defeituosa do complexo da α -cetoácido-descarboxilase na, 311t
- Cetonúria intermitente da cadeia ramificada, 309
- Cetose, 223, 229, 231
cetoacidose causada por, 231
na fome, 231
na lactação, 149
não patológica, 231
no diabetes melito, 149, 231
no gado
esteatose hepática e, 261
lactação e, 231
- Cetoses (açúcares), 152-153, 153t, 154, 155f
- CFTR. *Ver* Regulador transmembrana da fibrose cística
- cGMP (GMP cíclico), 501t
- Chaperonas, 45, 618-619, 618t
atividade de ATPase das, 619
histonas, 373
na seleção de proteínas, 608-610, 609t, 625t
proteína dependente de ATP de ligação de, 610, 620
- Chaperonas histonas, 373
- Chaperonas moleculares. *Ver* Chaperonas
- Chaperoninas, 45, 609-610
- Chips, sequência de genética, expressão proteica e, 33
- Chips de arranjo de genes, expressão de proteínas e, 33
- CI₅₀, 83
- Cianeto
na cadeia respiratória, 132, 132f
na fosforilação oxidativa, 127
- Ciclinas, 388-389, 388f, 388t
- Ciclinas A, 388f, 388t, 389
- Ciclinas B, 388f, 388t
- Ciclinas D, 388, 388f, 388t
câncer e, 389
- Ciclinas E, 388-389, 388f, 388t
- Ciclo celular
anomalias em células cancerosas, 730-731
aspectos básicos do, 731
fase S do, síntese do DNA durante, 388-389, 388f, 388t
regulação, 620
- Ciclo celular eucariótico, versatilidade do, 95-96, 95f
- Ciclo da calnexina, modelo do, 576-577
- Ciclo da glicose-alanina, 191, 191f
- Ciclo da transferrina, 675f
- Ciclo de Cori, 190, 191f
- Ciclo de Krebs. *Ver* Ciclo do ácido cítrico
- Ciclo do ácido cítrico, 117, 127, 145, 161-167, 162f, 163f
ATP produzido pelo, 162f, 164, 169t, 173
desaminação e, 164-165
dióxido de carbono liberado pelo, 161-162, 163f
em mitocôndrias, 143, 144, 144f
equivalentes redutores liberados por, 162-164, 163f
gliconeogênese e, 164, 165f, 185-187, 186f
no metabolismo, 140, 140f, 141f, 143, 144f, 161-162, 164-165, 165f
aminoácidos, 140f, 141f
carboidratos, 140, 140f, 164, 165f
lipídeos/ácidos graxos, 140f, 141, 165-168, 166f
no nível subcelular, 144, 144f
papel das vitaminas no, 164
regulação do, 166-167
substratos da cadeia respiratória fornecidos por, 161-162, 162f
transaminação e, 165, 165f
- Ciclo do ácido láctico, 190, 191f
- Ciclo do ácido tricarbóxico. *Ver* Ciclo do ácido cítrico
- Ciclo hidroxilase, 124, 124f
- Ciclo Q, 129, 129f, 130f
- Ciclo urobilinogênico entero-hepático, 332
- Ciclo-hexamida, 426
- CIN, estruturas moleculares esquemáticas da, 434f
- CIN. *Ver* Instabilidade cromossômica
- Cinética (enzima), 73-86. *Ver também* Catálise/reações catalíticas (enzimáticas)
alterações de energia livre afetando, 75
concentração de substrato e, 78-79, 82
modelos de efeitos de, 79-81
energia de ativação afetando, 74-75
enzimas multissubstrato e, 84
equações balanceadas e, 74
estados de transição e, 74-75
fatores afetando a velocidade de reação e, 75-77
inibição competitiva vs. não competitiva e, 81-84
no desenvolvimento de medicamentos, 85
saturação, 81
sigmoide (equação de Hill), 81
velocidade inicial e, 78
- Cinética da saturação, 81
substrato sigmoide, equação de Hill na avaliação de, 81
- Cinética de saturação de substrato sigmoide, equação de Hill na avaliação de, 81
- Cinetocoro, 374
- Circulação entero-hepática, 274
absorção de lipídeos e, 539
- Cirrose hepática, 161, 261
- Cistationina- β -sintase, 300t
- Cisteína, 17t, 314-315
conversão à taurina, 315f
metabolismo da, 301-302, 303f
anomalias da, 301-303, 303f
na formação do piruvato, 301-303, 303f
necessidades para, 544
síntese de, 284-285, 285f
- Cistina-redutase, 301, 302f
- Cistinose (doença do armazenamento da cistina), 303
- Cistínúria (cistina-lisínúria), 301
- Cístron, 430
- Citarabina (arabinosilcitosina), 344, 345f
- Citidina, 341f, 341t
- Citidina-desaminase induzida por ativação, 684
- Citocinas, 671, 706
na caquexia, 148
- Citocromo aa₃, 120
- Citocromo b duodenal (Dc1tb), 673
- Citocromo c-oxidase, 127, 128f
- Citocromo P450. *Ver* Sistema do citocromo P450
- Citocromo P450 mitocondrial, 123-124, 584-585. *Ver também* Sistema do citocromo P450
- Citocromo Q c oxidorreductase, 127, 128f
- Citocromo-oxidase, 120
- Citocromos
citocromo aa₃, 120
citocromo b₅, 124, 618, 692
citocromo b₅₅₈, 704
como desidrogenases, 121-122
- Citoesqueleto, múltiplas funções celulares, 664-666
- Citosina, 341t, 357f
desoxirribonucleosídeos de, na síntese de pirimidinas, 352-351
pareamento de bases no DNA, 361f

- Citosol, 616
 glicólise no, 144, 144f, 169
 lipogênese no, 232-236, 235f, 237
 reações da via das pentoses-fosfato no, 198-200
 síntese de ALA no, 325, 325f
 síntese de pirimidinas no, 352
- Citrato
 na regulação da lipogênese, 234
 no ciclo do ácido cítrico, 161, 162f
- Citrato-sintase, 162, 163f
- Citrulina, 19t
 na síntese de ureia, 292, 294
- Citrulinemia, 295
- CJD. *Ver* Doença de Creutzfeldt-Jakob
- CK. *Ver* Creatina-quinase
- Cl. *Ver* Cloreto
- Clara de ovo, não cozida, deficiência de biotina causada por, 560
- Classificação de Villefranche, 631t
- Clatrina, 271, 492f, 493
- Clearance de creatinina, 597
- Clivagem
 da pré-pró-albumina, à pró-albumina, 623f
 da ubiquitina, 620
- Clivagem da cadeia lateral do colesterol e estruturas básicas dos hormônios esteroides, 503f
- Clivagem proteolítica, 26f
- Clofibrato, 275
- Clonagem, 454-455
- Clonagem de vetores, 455t
- Clones na produção de anticorpos monoclonais, 685
- Clopidogrel, 721
- Cloraminas, 705
- Cloreto
 coeficiente de permeabilidade do, 481f
 nos líquidos extracelular e intracelular, 478, 478t
- Clorofila, 323
- CMC. *Ver* Complexo modificador de cromatina
- CMP. *Ver* Monofosfato de citidina
- CMP-ácidos siálicos, 571
- CNV. *Ver* Variação no número de cópias
- CO. *Ver* Monóxido de carbono
- CO₂. *Ver* Dióxido de carbono
- Coagulação (sangue), 711
 exames laboratoriais na avaliação da, 721
 formação da fibrina na, 712, 712f, 715-717, 716f
 produtos das células endoteliais na, 720-721, 721t
 prostaglandinas na, 232
 proteínas envolvidas na, 713f, 714t. *Ver também* Fatores de coagulação
 via extrínseca da, 712-713, 712f, 714t
 via intrínseca da, 712, 712f, 713-714, 714t
 vias de, 712f
 vitamina K na, 554
 anticoagulantes cumarínicos afetando, 717
- Coagulação do sangue. *Ver* Coagulação (sangue)
- Coagulação sanguínea, 712f. *Ver também* Coagulação (sangue): Fatores de coagulação
- Coativadores, transcrição, 403, 404-405
- Cobalamina, 558, 558f
 absorção de, fator intrínseco na, 541
 na acidúria metilmalônica, 187
- Cobalofilina, 558
- Cobalto, 558
- Cobamida, coenzimas derivadas da, 62
- Cobre, 561
 ceruloplasmina na ligação do, 675
 como cofator, 675
 enzimas contendo, 675
 na doença de Wilson, 676
- Código de histonas, 437-438
- Código de trincas, código genético como, 414t
- Código dos açúcares da vida, 570
- Código epigenético de histonas, 438
- Código genético, 359, 414, 414t
 características do, 415, 415t
- Códon de término, 423, 424f
- Códons, 413, 414t
 sem sentido, 414
 sequência de aminoácidos de proteínas codificadas especificadas por, 414
- Códons sem sentido, 414, 417
- Coefficiente de ativação enzimática, 595
- Coefficiente de Hill, 81
- Coefficiente de temperatura (Q₁₀), reações catalisadas por enzimas e, 77-78
- Coefficientes de permeabilidade, de substâncias na bicamada lipídica, 481f
- Coenzima Q, 127
- Coenzimas, 62, 344t
 derivados de nucleotídeos, 343
 na catálise, 62
 síntese de coenzima A, 561, 561f
- Cofator II da heparina, como inibidor de trombina, 717
- Cofatores, 62
 na catálise, 62
 na coagulação sanguínea, 712, 714t, 717
 na regulação do ciclo do ácido cítrico, 164
- Colágeno, 46-47, 426
 classificação do, 629f, 629t
 condrodismplasias, 630, 643, 645
 elastina diferenciada do, 632t
 estrutura em tripla-hélice do, 46-47, 46f, 627-631
 formação de fibrilas por, 628
 genes para, 627, 628t
 doenças causadas por mutações em, 47, 630, 630t
 glicação de, 578
 interação celular, representação esquemática da, 634f
 ligações cruzadas do, 578
 maturação/síntese de, 47
 ácido ascórbico na, 47, 562
 distúrbios da, 47
 modificação pós-traducional do, 629-630
 mundo animal, proteína abundante, 627
 mutações, 630, 630t
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
 na cartilagem, 643, 643t
 nos ossos, 640-643
 osteogênese imperfeita, 642, 642t
 tipo I, 640
 tipo IV, 631
 tipo IX, 630
 tipo V, 640
 tipos de, 628t
- Colágeno tipo I, 640
- Colágeno tipo IV, 631
- Colágeno tipo IX, 630
- Colágeno tipo V, 640
- Colágenos, 573
- Colecalciferol (vitamina D₃)
 no metabolismo da vitamina D, 552
 síntese na pele de, 552
- Cólera
 epidemiologia inicial do, 100
 toxina, 250
 transporte de glicose no tratamento do, 491
- Colesterol, 218, 219, 219f, 253, 254, 270f, 539, 624
 da dieta, 267
 em lipoproteínas, 253, 254, 255f
 em membranas, 479
 modelo do mosaico fluido e, 484
 excesso de. *Ver* Hipercolesterolemia
 excreção de, 273-274, 273f
 metabolismo de, 141f, 143
 aspectos clínicos do, 270-276, 274-276, 275t
 lipoproteínas de alta densidade no, 258-259, 258f
 variações diurnas no, 270
 na síntese de ácidos biliares, 273-274, 273f
 níveis plasmáticos de
 alterações na dieta afetando, 274
 alterações no estilo de vida afetando, 274
 aterosclerose e doença cardíaca coronariana e, 274
 terapia medicamentosa afetando, 275
 nos tecidos, 219, 219f
 fatores afetando o equilíbrio de, 270-271, 271f
 síntese de, 267-270, 267f, 268f, 269f
 acetil-CoA na, 141, 141f, 267-270, 267f, 269f
 HMG-CoA-redutase na regulação de, 270
 metabolismo de carboidratos e, 140
 transporte de, 271-272, 272f
 inverso, 258f, 259, 267, 271f, 274
- Colil-CoA, na síntese de ácidos biliares, 273, 273f
- Colina, 216, 216f
 assimetria de membrana e, 482
 deficiência de, esteatose hepática e, 261
 na síntese de glicina, 283, 284f
- Colipase, 539
- Combustíveis metabólicos, 146-149. *Ver também* Digestão
 aspectos clínicos, 149
 dieta fornecendo, 541
 interconvertibilidade de, 146-149
 no adulto normal, 139
 nos estados alimentado e de jejum, 146-149, 147f, 148t, 149f
 provisão de, 139-150. *Ver também* Metabolismo
- Comentário, 102-103
- Compartimentalização, 88-89
- Complementaridade
 do DNA, 362f
 do RNA, 366, 367f
- Complemento sérico, 490
- Complexo ADP-chaperona, 609. *Ver também* Chaperonas
- Complexo da ácido graxo-sintase, 233-234, 233f, 234f, 238
- Complexo da enzima aromatase, 505
- Complexo da α -cetoácido-descarboxilase de cadeia ramificada, 300t
- Complexo de ataque à membrana (MAC), 685

- Complexo de carboidratos. *Ver* tipos específicos
- Complexo de clivagem da glicina, 301
- Complexo de iniciação 43S, na síntese proteica, 419, 420f
- Complexo de iniciação 80S, na síntese proteica, 419, 420f
- Complexo de pré-iniciação, 397
na síntese proteica, 419, 420f
- Complexo de pré-iniciação 43S, na síntese proteica, 420f
- Complexo de pré-iniciação 48S, na síntese proteica, 419-420
- Complexo de reconhecimento da origem, 382
- Complexo de transcrição, em eucariotos, 401f, 403-405
- Complexo de vitaminas B. *Ver também* vitamina específica
- coenzimas derivadas do, 62
 - no ciclo do ácido cítrico, 164
- Complexo eIF-4E, na síntese proteica, 421-422
- eIFs, na síntese proteica, 419
- Complexo enzima-substrato (ES), 62, 78, 80, 81
- Complexo ES. *Ver* Complexo enzima-substrato (ES)
- Complexo ligante-receptor, 519-520, 519f
- Complexo maior de histocompatibilidade (MHC), 704
- Complexo modificador de cromatina, 439
- Complexo piruvato-desidrogenase, 172
- Complexo receptor-correpressor, 520
- Complexo repressor policomb 2 (PRC2), 438
- Complexo ribonucleotídeo redutase, 352, 352f
- Complexo sacarase-isomaltase, 538
- Complexo Sec61, 615
- Complexo silenciador induzido por RNA (RISC), 409
- Complexo tenase, 712, 713
- Complexo tenase intrínseco, 713
- Complexos de iniciação, na síntese proteica, 419, 420f
- Complexos de proteínas mitocondriais, na cadeia respiratória, 120t, 127, 128f
- Complexos de translocação, 610
- Complexos dos poros nucleares, 611
- Complexos proteína-RNA, na iniciação, 419-421
- Complexos siRNA-miRNA, 368
- Componente da tromboplastina plasmática, 712, 712f, 713, 713t
- deficiência de, 718
 - fármacos cumarínicos afetando, 717
- Componente P, na amiloidose, 680
- Componente secretor, de IgA, 683f
- Composição de lipídeos do RE, 624
- Comunicação célula a célula, via junções comunicantes 495f
- ConA. *Ver* Concanavalina A
- Concanavalina A, 159
- Concentração de íons hidrogênio. *Ver* pH
- Concentração de reagentes, velocidade de reações químicas afetadas por, 76
- Concentrados do fator VIII, tecnologia do DNA recombinante na produção de, 718
- Condições aeróbias, 662
músculo produz ATP, 662
- Condições anaeróbias, 662
- Condições de câncer hereditário, 732t
- Condições de triagem, medicamento, cinética enzimática em, 85
- Condrodisplasias, 643, 645
bases moleculares de, 645
- Condronectina, 643
- Conexina, 494, 495f
- Configuração do *switch* lítico/lisogênico de, 434f
- Conformação. *Ver também* substâncias específicas
- nativa, 44
 - polipeptídeos/proteínas, 26f
- Conformação nativa, proteína, 44
- Conformadores, biblioteca virtual, 106f
- Conformadores syn, 340f, 341-342, 341f
- Conjugação de bilirrubina, 331, 331f
- Conjuntos não covalentes, em membranas, 479
- Conservação de energia, 116-117
- Constante catalítica, 80
- Constante de dissociação, 10
- constante de Michaelis (K_m) e, 79
 - de ácidos fracos, 10
 - no cálculo do pH, 10
- Constante de equilíbrio, 77
- alterações de energia livre e, 75
 - na catálise enzimática, 77
- Constante de ligação, aproximando a constante de Michaelis (K_m), 81-82
- Constante de Michaelis, 79
- constante de ligação aproximada por, 81
 - da glutatona-redutase, 748
 - efeitos alostéricos na, 91
 - inibidores afetando, 82-83
 - velocidade de catálise enzimática e, 79, 88, 88f
- Constante de velocidade, 76-77
- K_{eq} como proporção de, 76-77
- Constante dielétrica, da água, 7
- Contração muscular, 648-649, 651-655
- cinase de cadeia leve de miosina na, 659
 - eventos bioquímicos ocorrendo durante, 652
 - fármaco afetando, 657, 657f
 - fase de relaxamento da, 652, 653
 - hidrólise de ATP na, 651, 652f
 - modelo de ligações cruzadas de filamento deslizante da, 648-649
 - no músculo liso, 659, 659f, 660-661
 - óxido nítrico na, 660-661, 662t
 - papel do cálcio na, 655
 - ativação da fosforilase, 180
 - músculos lisos, 659
 - retículo sarcoplasmático, 656
 - regulação da
 - cálcio na, 653
 - com base na actina, 653
 - retículo sarcoplasmático e, 653-654
 - tropomiosina e troponina na, 652-653
- Contratibilidade/contração. *Ver* Contração muscular
- Controle da retroalimentação dos níveis de trombina circulante, 717
- Controle da retroalimentação na regulação alostérica, 91, 145
- Controle respiratório, 114, 166
- Controles de verificação, 391
- Conversão gênica, 380
- Coproporfirinas, 324f, 327
- espectrofotometria para detecção de, 327-329
- Coproporfirinogênio I, 326, 326f, 328f
- Coproporfirinogênio III, 326, 326f, 328f
- Coproporfirinogênio-oxidase, 326, 326f, 328f
- na porfiria, 328t
- Coprostanol (coprosterol), 273
- Coração
- deficiência de tiamina afetando, 546
 - metabolismo no, 150t
- Corpos cetônicos, 141, 141f, 143, 223, 227f
- ácidos graxos livres como precursores de, 229
- como combustível para tecidos extra-hepáticos, 227, 229f
 - na fome, 148t, 149, 149f
 - no estado de jejum, 149
- Corpos de Heinz, 694
- Corpos P, 425f, 426, 447
- Correguladores, transcrição, 403
- Correguladores de receptores nucleares e transcrição, 530-533
- proteínas correguladoras de mamíferos, 532t
- Corrinoides, 558. *Ver também* Cobalamina
- Corticotrofina. *Ver* Hormônio adrenocorticotrófico e hipercotisolismo
- Cosmídeos, 454, 455
- Cotromboplastina (fator VII), 712, 712f
- fármacos cumarínicos afetando, 717
 - no início da coagulação sanguínea, 712, 713t
- Coxibes, 240
- CPT-I. *Ver* Carnitina-palmitoil-transferase-I
- CRE. *Ver* Elemento de resposta ao AMP cíclico
- Creatina, 318, 320f
- Creatina-cinase, 127, 135, 663
- importância diagnóstica da, 69
- Creatina-fosfato, 314f, 318, 320f, 663
- energia livre de hidrólise da, 116t
 - no músculo, 663t
- Creatinina, 318, 320f
- como marcador da função renal, 597
- CREB (proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico), 523
- Crioprecipitados, tecnologia do DNA recombinante na produção de, 718
- Criptoxantina, 547
- Cristalografia, raios X, estrutura proteica revelada por, 41-43
- Cromátides, 375t, 381f
- acondicionamento de nucleoproteínas nas, 375
 - irmãs, 374, 375f
 - trocas entre, 380
- Cromátides-irmãs, 374, 375f
- troca, 380, 381f
- Cromatina, 371-374, 372f, 373t
- estrutura/compactação de ordem superior de, 372f, 373
 - inativa, 373-374
 - reconstituição na replicação de DNA, 387-388
 - regiões ativas vs. inativas da, 373-374, 374f
 - remodelagem na expressão gênica, 437-438
- Cromatina ativa, 373-374, 374f, 437
- Cromatografia. *Ver também* tipo específico
- afinidade
 - para purificação de proteínas por fusão recombinante, 70
 - para purificação de proteínas/peptídeos, 28
 - para purificação de proteínas/peptídeos, 26-29
 - afinidade
 - na purificação de proteínas de fusão recombinante, 70
 - para purificação de proteínas/peptídeos, 28

- Cromatografia de alta pressão de fase reversa, para purificação de proteínas/peptídeos, 30
- Cromatografia de coluna, para purificação de proteínas/peptídeos, 26
- Cromatografia de exclusão por tamanho, para purificação de proteínas/peptídeos, 26, 27, 28f
- Cromatografia de troca iônica, purificação de proteínas/peptídeos por, 27
- Cromatografia líquida, 26-27, 27f
- Cromatografia líquida de alta pressão, 26-27
- Cromatografia líquida de alto desempenho em fase inversa, para purificação de proteínas/peptídeos, 26-27
- Cromatografia por interação hidrofóbica, para purificação de proteínas/peptídeos, 27
- Cromo, 562t
- Cromossomos, 372f, 374-376, 375t, 376f
integridade dos, monitoramento, 390-392
interfase, fibras de cromatina em, 373
metáfase, 372f, 375, 375t
politênicos, 374
- Cromossomos da metáfase, 374, 375, 375f, 375t, 379, 379f
- Cromossomos na interfase, fibras de cromatina em, 373
- Cromossomos politênicos, 374, 374f
- Crossing over* desigual, 379, 379f
- Crossing over*, na recombinação cromossômica, 379, 379f, 381f
- CRP. *Ver* Proteína reguladora de catabólitos: Proteína C-reativa
- CSE. *Ver* Fator estimulador de colônias
- CT. *Ver* Calcitonina
- CTP. *Ver* Trifosfato de citidina
- Cumarina, 717
- Curva de dissociação do oxigênio, para mioglobina e hemoglobina, 53
- ## D
- D-3-Hidroxiubutirato-desidrogenase, 226, 227f
- DAF. *Ver* Fator acelerador de degradação
- D-Aminoácidos livres, 20
- dAMP, 342f
- Dano ao DNA
por agentes ambientais, 724
por energia radiante, 724, 724t
- Dano genético, causas do, 724
- Dano proteico, reparo de, 763
- Dantroleno, para hipertermia maligna, 654
- D-Arabinose, 155t
- Database of Genotype and Phenotype, 102
- dbGAP. *Ver* Database of Genotype and Phenotype
- DBH. *Ver* Dopamina β-hidroxilase
- DCG. *Ver* Distúrbios congênitos da glicosilação
- Dcitb. *Ver* Citocromo b duodenal
- Decisão de separação principal, 607
- Dedos de zinco, 444-445
- Defeitos do tubo neural, suplementos de ácido fólico na prevenção de, 560
- Defensinas, 704t
- Defesa do corpo contra infecções bacterianas, papel dos neutrófilos na, 700-701
- Deficiência de 3-cetoacil-CoA-tiolase, 231
- Deficiência de adenosina-desaminase, 355
- Deficiência de adesão leucocitária II (LAD II), 580
- Deficiência de adesão leucocitária tipo I, 703
- Deficiência de carnosinase, 319
- Deficiência de ferro/anemia ferropriva, 541
- Deficiência de fosforilase hepática, 179t
- Deficiência de miofosforilase, 179t
- Deficiência de piruvato-cinase (PK), 693t
- Deficiência de purina nucleosídeo fosforilase, 355
- Deficiência de uridil-transferase, 205
- Deficiência múltipla de sulfatase, 251
- Deficiência neurológica, profunda, 614
- Deficiências de dissacarídeos, 599
- Deficiências nutricionais, 537
na Aids e no câncer, 543
- Degeneração, do código genético, 414
- Degeneração hepatolenticular (doença de Wilson), 496t, 676
metil-histidina na, 315
mutações gênicas na, 496t, 677
níveis de ceruloplasmina na, 676
- Degradação, de vírus, 620
- Degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) de proteínas dobradas erroneamente, 618-620, 620f
- Degradação de proteínas
dependente de ATP e ubiquitina, 288-289
independente de ATP, 288
- Degradação de proteínas, ubiquitina na, 620, 620f
- Depuração da inulina, 597
- Depuração do promotor, 398
- Derivados de tirosina, 502f
- Derivados do colesterol, 502f
- Desacetilases de histonas, 94
- Desacopladores/proteínas desacopladoras na cadeia respiratória, 131f, 132
subnutrição e, 543
- Desaminação, 141, 141f
ciclo do ácido cítrico na, 164
fígado na, 143
- Desaminação oxidativa, 292f
- Descarboxilação da S-adenosilmetionina, 316
- Descarboxilação oxidativa, 163
- Descoberta de medicamentos, ensaios enzimáticos disponíveis para triagem “completa” em, 66-67
- Desenvolvimento de medicamentos
cinética enzimática, mecanismo e inibição em, 85
RNA-alvos para, 368
- Desenvolvimento de medicamentos com auxílio computacional, 105-107
- Desfosforilação. *Ver também* Fosforilação, de proteínas
na modificação covalente, 94-95, 94t
- Desidrocolesterol, no metabolismo da vitamina D, 547
- Desidroepiandrosterona, 505
- Desidrogenases, 120-122, 122f
dependentes de riboflavina, 121
na cadeia respiratória, 120-122
na detecção de enzimas, 68, 69
nicotinamida dependente de coenzima, 121, 122f
- Desidrogenases dependentes de NAD(P)⁺, na detecção de enzimas, 67-68, 67f
- Deslocamento, 619
- Deslocamento isomorfo, 43
- Desmina, 655
- Desmossomos, 484
- Desmosterol, na síntese de colesterol, 269, 269f
- Desnaturação
análise da estrutura do DNA e, 361
redobramento de proteínas e, 45
temperatura e, 77-78
- Desoxiadenuilato, 359
- Desoxicidilato, 359
- Desoxiguanilato, 359
- Desoxi-hemoglobina
desoxi-hemoglobina S, receptor *sticky patch* na, 58f
ligação de prótons pela, 56
- Desoxi-hemoglobina A, receptor *sticky patch* na, 56, 58f
- Desoxinucleotídeos, 359-361
- Desoxirribonucleases (DNase)/DNase I, 368
cromatina ativa e, 373
- Desoxirribonucleosídeos, 340
na síntese de pirimidinas, 352-351
- Desoxirribonucleosídeos difosfatos, redução de NDPs a, 352f
- Desoxirribose, 152, 156, 156f
- 3-Desoxiuridina, 344
- Despolarização, na transmissão do impulso nervoso, 491
- Dessorção e ionização à *laser* assistida por matriz (MALDI)
na espectrometria de massas, 31, 32f
- Destoxificação, sistema do citocromo P450 na, 123-124, 123f, 124f
- Destoxificação/interações medicamentosas, citocromos P450 e, 123-124, 123f, 124f
- Detergentes, 480
- Determinante antigênico (epítipo), 39
- Dextrinas, 156
- Dextrinose, limite, 179t
- Dextrose, 154
- D-Fructofuranose, 154f
- D-Fructopiranoose, 154f
- D-Fructose, 155f, 155t
- D-Galactosamina (condrosamina), 156
- D-Glicofuranose, 154f
- D-Glicopiranoose, 154f
- D-Glicose, 154f, 155t
- D-Glicuronato, 154-155, 156f
- DHA. *Ver* Ácido docosa-hexaenoico (DHA)
- DHEA. *Ver* Desidroepiandrosterona
- DHPR. *Ver* Receptor de di-hidropiridina
- DHT. *Ver* Di-hidrotestosterona
- Diabetes insípido nefrogênico, 490
- Diabetes melito, 152, 192, 254
cetose/cetoacidose no, 231
como doença metabólica, 140
distúrbios de transporte e armazenamento de lipídeos, 254
esteatose hepática e, 261
estudo de caso, 746-747, 753-754
hiperglicemia no, 149
lesões teciduais no, 578-579
lipogênese no, 232, 236
níveis de ácidos graxos livres no, 255
- Diabetes melito dependente de insulina, 193-194. *Ver também* Diabetes melito
- Diabetes melito não dependente de insulina, 193-194
- Diabetes melito tipo 1. *Ver* Diabetes melito dependente de insulina
- Diacilglicerol, 215, 539, 702
formação de, 246f
na ativação plaquetária, 719f, 720
- Diacilglicerol-aciltransferase, 246, 247f
- Diagramas GRASP, 104, 105f
- Diapedese, 701, 701f

- Diarreia, 581
transporte de glicose no tratamento da
diarreia grave, 491
- Dicumarol (4-hidroxicumarina), 554
- Dieta. *Ver também* Nutrição
com teor muito baixo de carboidratos, perda
de peso por, 194
controle da glicemia e, 190
níveis de colesterol afetados por, 274, 275
rica em gorduras, esteatose hepática e, 261
secreção hepática de VLDL e, 259-260, 260f
- Dieta vegetariana, deficiência de vitamina B₁₂
e, 558
- Dietas com baixo teor de carboidratos, perda de
peso a partir de, 194
- Diferenciação tecidual, ácido retinoico na, 547
- Difosfatidilglicerol. *Ver* Cardiolipina
- Difosfato de guanosina, 571
- Difração e cristalografia de raios X, estrutura
proteica revelada por, 41-43
- Difusão
facilitada, 485, 485f, 485t, 486-487, 488f
da bilirrubina, 331
da glicose. *Ver* Transportadores de glicose
insulina afetando, 491
na membrana de hemácias
hormônios na regulação da, 487
modelo "pingue-pongue" da, 487, 488f
passiva, 485f, 485t, 486f
resultante, 485f
simples, 485f, 485t
- Difusão resultante, 486
- Difusão simples, 485f, 485t, 486
- Difusão/transporte passivo, 485, 485f, 485t, 486f, 487
- Digestão, 538-541
- Digitálicos, 491, 657, 657f
Na⁺-K⁺-ATPase afetada por, 491
permutador de Ca²⁺-Na⁺ na ação de, 656-657
- Di-hidrobiopterina, defeito na síntese de, 304
- Di-hidrobiopterina-reductase, defeito na, 304
- Di-hidrofolato/di-hidrofolato-reductase,
metotrexato afetando, 353-354, 559
- Di-hidrolipoamida-desidrogenase, 311t
- Di-hidrolipoil-desidrogenase, 121, 173, 173f
- Di-hidrolipoil-transacetilase, 172, 173f
- Di-hidrotestosterona, 505, 506f
- Di-hidroxiacetona, 155f
- Di-hidroxiacetona-fosfato, na glicólise, 246, 247f
- 24,25-Di-hidroxitamina D₃ (24-hidroxicalcidiol)
no metabolismo da vitamina D, 552
- Di-iodotirosina, 510
- Dimercaprol, 132, 132f
- Dímero de histonas, 371, 373
- Dímeros
de histona, 373
proteína Cro, 434, 435f
proteína repressora lambda (cI), 434, 435f
- Dimetilalil-difosfato, no colesterol, 268f
síntese, 267
- Dimetilaminoadenina, 342f
- Dinâmica molecular, 44
- Dinamina, na pinocitose absorptiva, 493
- Dineínas do axonema, 665
- 2,4-Dinitrofenol, 132
- Dinucleotídeo, 344, 345
- Dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD⁺),
121, 556
como coenzima, 121, 122f, 344t
espectro de absorção da, 67-68, 67f
no ciclo do ácido cítrico, 164
- Dinucleotídeo de nicotinamida adenina-fosfato
(NADP⁺), 121, 556
como coenzima, 121, 122f, 344t
na via das pentoses-fosfato, 197f, 198, 199f
- Dióxido de carbono
ciclo do ácido cítrico na produção de,
161-162, 163f
transporte de, pela hemoglobina, 56
- Dioxigenases, 123
- Dipalmitoil-lecitina, 216
- Dipeptidases, 539
- Dipolos, água formando, 6-7, 7f
- Disbetalipoproteinemia hereditária, 275t
- Dislipoproteinemias, 275-276, 275t
- Displasia acromiocrítica, 632
- Displasia geoleofísica, 632
- Displasia tanatofórica, 645
- Dissacaridases, 538
- Dissacarídeos, 153, 156, 157f, 157t. *Ver também*
tipo específico
- Dissociação, 622
do feixe de quatro hélices, 623
- Dissociação da água, 9-10
- Dissociação induzida por colisão, na
espectrometria de massas, 31
- Dissociação ribossomal, na síntese de proteínas, 419
- Distrofia muscular, de Duchenne, 647, 655
- Distrofia muscular de Becker, 655
- Distrofia muscular de Duchenne, 463, 655
- Distrofias musculares congênitas, 580
- Distrofina, 647, 655
- Distúrbios congênitos da glicosilação, 580, 674
- Distúrbios da tireoide, diagnóstico laboratorial
de, 598t
- Distúrbios de armazenamento de lipídeos
(lipídios), 251, 251t
- Distúrbios de conformação, 625
- Distúrbios do ciclo da ureia, 295
- Distúrbios ligados ao X, RFLPs no diagnóstico
de, 463
- DIT. *Ver* Di-iodotirosina
- Diversidade
combinatória, 684
de anticorpos, 684
juncional, 684
- Diversidade combinatória, 684
- Diversidade de anticorpos, 684
- Diversidade juncional, 684
- D-Lixose, 155f
- D-Manosamina, 156
- D-Manose, 154f, 155t
- DMCs. *Ver* Distrofias musculares congênitas
- DMID. *Ver* Diabetes melito dependente de
insulina
- DMNID. *Ver* Diabetes melito não dependente
de insulina
- DMT. *Ver* Transportador de metais divalentes
- DNA, 370-392, 387f
complementaridade do, 362-363, 362f, 455
cromossômico, 372f, 375t, 376f
dano ao, 390, 390f, 390t
reparo do, 389-390, 390t
de dupla-fita, 360-361, 362-363, 362f
de extremidade cega, 452, 453
de sequência única (não repetitiva), 377
desenrolamento, 398
diversidade de anticorpos em rearranjos de,
380-381
em nucleossomos, 371-373, 371f, 373, 374f
estabilização do, 8
- estrutura do, 359-362, 360f, 361f
desnaturação na análise da, 361
dupla-hélice, 8, 360-361, 361f
forma relaxada de, 362
informação genética contida no, 359-362
ligases, 385
mitocondrial, 378-379, 378f, 378t
monitoramento da integridade, 390-392
mutações no, 370-371, 379-381. *Ver também*
Mutações
na cromatina, 372f, 373t, 374-376, 374f
na síntese de RNA, 395-398
pareamento de bases no, 8, 360, 361f
combinação de, para renaturação, 361-362
tecnologia do DNA recombinante e,
451-468
recombinante. *Ver* DNA recombinante/
tecnologia do DNA recombinante
regiões codificadoras do, 376, 376f
relação com o mRNA, 376f
renaturação de, pareamento de pares de bases
e, 361-362
reparo da quebra da dupla-fita de, 389-390,
391f
reparo de, 389-390, 390t, 620
reparo de malpareamentos no, 389, 389t, 390f,
390t
reparo por excisão de bases de, 389, 390f, 390t
reparo por excisão de nucleotídeos do, 389,
390f, 390t
replicação/síntese de, 362-363, 363f, 381-392,
381t, 382f, 388t
complexo da DNA-polimerase na, 382t
formação da bolha de replicação e,
386-387, 386f, 387f
formação da forquilha de replicação e, 382f,
383
iniciação da, 384f
na fase S do ciclo celular, 388-389, 388f
natureza semiconservativa da, 363, 363f
origem da, 381-382
polaridade, 386
primer de RNA na, 381t, 382f, 383
reconstituição da estrutura de cromatina e,
387-388
redução do ribonucleosídeo difosfato e, 352
reparo durante, 389-390, 390t
semidescontínua, 382f, 385f, 386
- ribosilação de ADP para, 556
- sequência repetitiva, 377
- sequenciamento do, 458f, 464
- sulcos no, 361f, 362
- superespiralado, 362, 387, 387f
- transcrição do, 362-363
- transposição do, 380
- DNA de dupla-fita, 360-361, 371, 396. *Ver*
também DNA
- DNA de eucariotos 439-441
- DNA de fita simples. *Ver também* DNA
replicação a partir de, 381
- DNA de sequência única (não repetitiva), 377
- DNA mitocondrial, 378f, 378t
- DNA não repetitivo (sequência única), 377
- DNA recombinante/tecnologia do DNA
recombinante
clonagem em, 454-455
DNA-ligase em, 452-454
e hematologia, 698-699
enzimas de restrição e, 452-454, 452t
moléculas quiméricas em, 452-454

- no estudo enzimático, 70
tecnologia, 451-468
- "DNA saltante", 380
- DNA-helicase, 382f
- DNA-ligase e tecnologia do DNA recombinante, 452-454, 453t, 454f
- DNA-PK. *Ver* Proteína-cinase dependente de DNA
- DNA-polimerase, 381, 382f, 383, 459f
de procariotos e eucariotos, 383t
na tecnologia do DNA recombinante, 453t
- DNA-primase, 382f
- DNase (desoxirribonuclease)/DNase I, 368
cromatina ativa e, 373
na tecnologia do DNA recombinante, 453t
- DNase ativada por caspase, 733
- DNA-topoisomerases, 362, 386, 387f
- dNDPs. *Ver* Desoxirribonucleosídeos difosfatos
- Doadores de prótons, ácidos como, 10
- Dobra de nucleotídeos. *Ver* Dobra de Rossmann
- Dobra de Rossmann, 40
- Dobramento
código, identificação de proteínas desconhecidas, 103
de proteínas, 26f, 44-45
formação após a desnaturação, 45
posicionamento de grupo polar e com carga e, 8
- Dobramento de proteínas, 26f, 44-45
chaperonas e, 608-610, 618-620, 618t
degradação do, 618-619, 619f
dobramento errado no, 618-619
ubiquitinação no, 620, 620f
- Dobramento errado de proteínas
acúmulo no RE no, 618-619
degradação do, associada ao RE, 618-620, 619f
ubiquitinação no, 620, 620f
- Dobras (conformação proteica), 39, 40f
- Doença. *Ver também* Relatos de caso
bioquímicos: doenças específicas
base bioquímica da, 3-4
de conformação, 619t
Projeto Genoma Humano e, 3-4
- Doença cardíaca, coronária. *Ver* Aterosclerose
- Doença cardíaca coronariana (isquêmica). *Ver também* Aterosclerose
colesterol e, 274
- Doença causadora de variações gênicas, 460
- Doença celíaca, 537
- Doença coronariana, 565
- Doença da beta larga, 275t
- Doença da célula I, 496, 496t
causa da, 581
- Doença da deficiência clínica. *Ver também* doenças específicas
vitaminas e, 546
- Doença da remoção de remanescentes, 275t
- Doença da urina do xarope de bordo (cetônúria de cadeia ramificada), 309
funcionamento defeituoso do complexo de α -cetoácido-descarboxilase na, 311t
- Doença da vaca louca (encefalopatia espongiiforme bovina), 45
- Doença de Alzheimer, 46
- Doença de Andersen, 179t
- Doença de Cori, 179t
- Doença de Creutzfeldt-Jakob, 45-46
- Doença de Fabry, 251t
- Doença de Farber, 251t
- Doença de Forbes, 179t
- Doença de Gaucher, 251t
- Doença de Hartnup, 308, 557
- Doença de Hers, 179t
- Doença de inclusão celular (célula I), 496, 496t
- Doença de Krabbe, 251t
- Doença de Niemann-Pick, 251t
- Doença de Pompe, 179t
- Doença de Refsum, 231, 614, 614t
- Doença de Refsum do lactente, 231, 614, 614t
- Doença de Tangier, 275t
- Doença de Tarui, 179t
- Doença de Tay-Sachs, 251t
- Doença de von Gierke, 179t, 355
- Doença de von Willebrand, 698, 718
- Doença de Wilson, 496t, 676
metil-histidina na, 315
mutações gênicas na, 496t, 676
níveis de ceruloplasmina na, 676
- Doença do núcleo central, 655
- Doença do olho de peixe, 275t
- Doença dos cordeiros gêmeos. *Ver* Toxemia da gravidez em ovelhas
- Doença falciforme, 417, 460
análise de heredograma de, 462f
- Doença granulomatosa crônica, 705
- Doença jamaicana do vômito, 231
- Doença/síndrome de McArdle, 179t
- Doenças autoimunes, 565
- Doenças de armazenamento de glicolipídeos, 245
- Doenças de armazenamento do glicogênio, 152, 176, 179t, 183
- Doenças de príons (encefalopatias espongiiformes transmissíveis), 45-46
- Doenças genéticas. *Ver também* doenças específicas
enzimas no diagnóstico de, 70
tecnologia do DNA recombinante no diagnóstico de, 460, 462f
terapia gênica para, 464
- Doenças metabólicas do metabolismo de aminoácidos, 300t
- Doenças neurológicas, alterações na conformação proteica e, 45
- Dolicol, 219, 220f, 575
estrutura do, 575
na síntese do colesterol, 268f, 269
- Dolicol-pirofosfato-oligosacarídeo (Dol-P-P-oligosacarídeo), 575-576
- Dolicol-P-P-GlcNAc (Dol-P-P-GlcNAc), 575f
- Dolicol-P-P-oligosacarídeo
estrutura do, 575f
via da biossíntese, 576f
- Domínio de ligação ao ligante, 530
- Domínio ligador da C-terminal, 40
- Domínios. *Ver também* tipo específico
albumina, 671
cromatina, 372f, 373
ligação do DNA e ativação da transcrição, 447f
proteína, 40
- Domínios da membrana hidrofóbica, 41
- Domínios em alça, cromatina, 372f, 375
- Domínios reguladores, 41
- Dopa-descarboxilase, 317, 320f
na biossíntese de catecolamina, 509-510
- Dopamina. *Ver também* Catecolaminas
biossíntese de, 509, 509f
síntese de, 317, 320f
- Dopamina β -hidroxilase (DBH), 561
na biossíntese de catecolamina, 510
- Dor, prostaglandinas na, 232
- D-Ribose, 155f, 155t, 340, 344f
- D-Ribulose, 155f, 155t
- dsDNA. *Ver* DNA de dupla-fita
- D-Sedo-heptulose, 155f
- DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético), como antioxidante preventivo, 220
- Dupla-hélice, da estrutura do DNA, 8, 360-361, 361f
- Dúplipes de RNA-RNA, imperfeitos, 368
- D-Xilose, 155f, 155t
- D-Xilulose, 155f
- E**
- E. coli*, metabolismo da lactose em, hipótese operon e, 430-433, 430f
- E0. *Ver* Potencial redox (oxidação-redução)
- E_{at}. *Ver* Energia de ativação
- EcoRI*, 452, 452t, 454f
- EcoRII*, 452t
- Edema
concentração de proteína plasmática e, 669
na deficiência de tiamina, 555
no kwashiorkor, 543
- Edematoso. *Ver* Kwashiorkor
- Editoramento do RNA, 409-411
- EDRF. *Ver* Fator de relaxamento derivado do endotélio
- EDTA, como antioxidante preventivo, 220
- EEB. *Ver* Encefalopatia espongiiforme bovina
- Efeito Bohr, na hemoglobina M, 58
- Efeito da antimicina A na cadeia respiratória, 132
- Efeito de Warburg, 738
- Efeito eletrogênico, 491
- Efeito hidrofóbico, na auto-organização da bicamada lipídica, 480
- Efeito hipoglicêmico do glucagon, 192
- Efetores, 733
- Efetores/modificadores alostéricos, 26f, 145
na regulação da gliconeogênese, 188-189
negativos, 90. *Ver também* Inibição por retroalimentação na regulação alostérica
segundos mensageiros como, 91-92
- Eficiência catalítica, 80
- Eicosanoides, 213, 239, 241f, 706
- Elastase, na digestão, 539
- Elastina, 631-632
- Elemento de origem da replicação, 381
- Elemento de resposta ao AMP cíclico
- Elemento de resposta do potencializador, 440f
- Elementos de contorno, 444
- Elementos de controle da transcrição, 405t
- Elementos de DNA, combinações de, 443f
- Elementos de resposta férricos, 676
- Elementos de resposta hormonal
definição, 529
mapeamento, 443f
seqüências de DNA de, 519, 520t
- Elementos do DNA, expressão gênica afetada por, 438
- Elementos reguladores do DNA, 442f
- Eletrófilos, 9
- Eletroforese
bidimensional, expressão proteica e, 33
em poliacrilamida, para purificação de proteínas/peptídeos, 28, 28f
para análise de proteínas do plasma, 669

- Eletroforese bidimensional, expressão proteica e, 33
 Eletroforese em gel, poliacrilamida, para purificação de proteínas/peptídeos, 28-29, 28f, 29f
 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
 membrana de hemácias, 695, 695f
 para purificação de proteínas/peptídeos, 28, 30f
 Eletroforese em zona de acetato de celulose, 669, 670f
 Eliptocitose hereditária, 694, 696
 ELISA. *Ver* Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
 Elongase, 236, 237f
 na síntese de ácidos graxos poli-insaturados, 239, 239f
 Emaciação, 140
 Emulsões, lipídeos anfipáticos formando, 220-221, 221f
 Encéfalo, metabolismo no, 150t
 glicose como necessidade para, 146-147
 Encefalopatia de Wernicke, 556
 Encefalopatia espongiiforme bovina, 45
 Encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e acidente vascular cerebral (MELAS), 135
 Encefalopatias
 de Wernicke, 556
 espongiiformes, 45
 hiperbilirrubinemia provocando, 332
 por defeitos mitocondriais hereditários, 127
 Encefalopatias espongiiformes, transmissíveis (doenças de prions), 45
 Encefalopatias espongiiformes transmissíveis, 45
 Endocitose, 477, 492-493, 492f
 mediada por receptores, 492f, 493
 Endocitose mediada por receptor, 492f, 493
 Endoglicosidases F, 571
 Endonucleases, 368, 454
 de restrição, 368, 451-454, 452t
 na tecnologia do DNA recombinante, 452t, 453t
 Endonucleases/enzimas de restrição, 70, 368, 452-454, 452t
 na tecnologia do DNA recombinante, 452-454, 452t, 453t
 Endopeptidases, 539
 Endossimbiose, 760
 Energia
 de ativação, 74-75
 livre. *Ver* Energia livre
 necessidade nutricional para, 541-542
 transdução em membranas, 477
 Energia de ativação, 74-75
 Energia livre
 alterações na, 114
 acoplamento e, 114, 114f
 direção da reação química e, 74
 enzimas afetando, 77
 estado de equilíbrio e, 74
 estados de transição e, 74-75
 potencial redox e, 119-120, 120t
 de hidrólise do ATP, 115-116, 116t
 Energia livre de Gibbs/energia de Gibbs. *Ver* Energia livre
 Energia radiante
 dano do DNA causado por, 724, 724f
 e câncer, 724-726
 Engenharia reversa, 106f
 Enolase, na glicólise, 170f, 171
 Ensaio de Ames, 725f
 Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima, 67
 Ensaios de ligação de ligantes competitivos, 595-596
 Ensaio-sanduiche, 596
 Entactina, 634
 Entalpia, 114
 Enterócitos, absorção de ferro em, 673
 Enteropeptidase, 539
 Entricitabina, 85
 Entropia, 114
 Envelhecimento
 como processo pré-programado, 764-766
 e mortalidade, 756
 teoria de mutações somáticas do, 763
 teorias de uso e desgaste do, 756-762
 espécies reativas de oxigênio, 758-760, 758f, 759f
 glicação de proteínas, 761-762, 762f
 mitocôndrias, 760-761
 radiação ultravioleta, 761, 761f
 radicais livres, 760
 reações hidrolíticas, 756-758, 757f
 teorias metabólicas do, 764-765
 Enzima acetil (acil)-malonil, 233, 234f
 acetil-CoA, 140, 140f, 145
 catabolismo da, 162f, 163f. *Ver também* Ciclo do ácido cítrico
 lipogênese e, 233, 234f, 235f
 como unidade construtora de ácidos graxos, 233
 metabolismo de carboidratos e, 140, 140f
 na regulação da lipogênese, 237
 na síntese do fator de ativação de plaquetas, 248f
 oxidação de ácidos graxos para, 140, 141f, 224f
 oxidação do piruvato para, 165, 166f, 169t, 172-174, 173f, 174f
 regulação da piruvato-desidrogenase pela, 173, 174f, 237
 síntese de colesterol e, 267-270, 267f, 269f
 Enzima ativadora, na ubiquitinação, 620
 Enzima conjugadora, 620
 Enzima conversora da angiotensina, 513
 Enzima de clivagem da cadeia lateral do citocromo P450 (P450_{sc}), 503
 Enzima málica, na produção de NADPH, 234, 234f, 235f
 “Enzima suicida”, cicloxigenase como, 240
 Enzimas, 9
 ativadas por metal, 62
 atividade catalítica de. *Ver também* Catalíse/reações catalíticas (enzimáticas)
 cinética da, 77. *Ver também* Cinética (enzima)
 detecção facilitada por, 66-68
 cinética de, 77. *Ver também* Cinética (enzima)
 classificação de, 61, 61f
 de neutrófilos, 703, 704t
 de restrição. *Ver* Endonucleases/enzimas de restrição
 degradação de, controle de, 90
 desramificação
 ausência de, 179t
 na glicogenólise, 178, 178f
 diagnóstico de auxílio à análise, 68-69
 infarto do miocárdio, 68-69
 ensaio de, 67
 especificidade de, 61
 isostéricas, 91
 isozimas e, 66
 mecanismos de ação de, 60-71
 membranas na localização de, 477
 no desenvolvimento de medicamentos, 85
 especificidade de, 61
 regulação de, 146f
 no diagnóstico/prognóstico de doenças, 68-69
 no plasma, importância diagnóstica de, 68-69
 no reparo do DNA, 389, 390t
 quantidade de, capacidade catalítica afetada por, 89-90
 ramificação, na biossíntese de glicogênio, 178, 178f
 redes de controle e, 95-96
 regulação de, 87-96
 reguladoras, 144, 146f
 sítios ativos de, 62-63
 substratos afetando a conformação de, 64
 taxa de hidrólise afetada por, 9
 tecnologia do DNA recombinante no estudo de, 70
 Enzimas alostéricas, 90-91, 145
 aspartato transcarambolase como modelo de, 91
 Enzimas ativadas por metais, 62
 Enzimas de borda em escova, 538
 Enzimas de peroxissomos, 614
 Enzimas de restrição. *Ver* Endonucleases/enzimas de restrição
 Enzimas dependentes de vitamina B₁₂, 558
 Enzimas desramificadoras
 ausência de, 179t
 na glicogenólise, 178, 178f
 Enzimas glicolíticas, no músculo, 647-648
 Enzimas isostéricas, 91
 Enzimas lisossomais extracelulares, 581
 Enzimas lisossomais na doença da célula I, 496, 496t
 Enzimas metabolizadoras de xenobióticos, fatores afetando, 587
 Enzimas plasmáticas. *Ver também* Enzimas importância diagnóstica de, 68-69
 Enzimas processadoras de glicoproteínas, 577t
 Enzimas proteolíticas, 68-69
 Enzimas séricas, no diagnóstico clínico, 68t
 Enzimas-carboxilase, biotina como coenzima de, 561
 Enzimologia, molécula única, 66, 67f
 Enzimologia de moléculas individuais, 66, 67f
 Enzimologia diagnóstica, 68
 Enzimopatia, 694
 Eosinófilos, 700, 703
 na captura do parasito, 705-706
 EPA. *Ver* Ácido eicosapentaenoico
 Epidemiologia
 análise bioinformática em, 101
 definição de, 100
 Epiderme, 757t
 Epidermólise bolhosa, 631
 Epimerases, 636
 na via das pentoses-fosfato, 198, 199f
 no metabolismo da galactose, 203, 203f
 Epímeros, 154, 154f
 Epinefrina, 509. *Ver também* Catecolaminas biossíntese de, 509f, 510
 glicemia afetada por, 193
 na regulação da gliconeogênese, 188
 na regulação da lipogênese, 237
 síntese de, 317, 320f

- Epítipo (determinante antigênico), 39
 EPO (eritropoietina humana), 692
 Epóxido-hidrolase, 588, 588f
 Epóxidos, 588
 Equação de Henderson-Hasselbalch, 12
 Equação de Hill, 79-81
 Equação de Michaelis-Menten, 79
 concentração de substrato e, 79-81
 reações Bi-Bi e, 84
 regulação do fluxo de metabólitos e, 88, 88f
 Equações químicas equilibradas, 74
 Equilíbrio acidobásico, 292
 Equilíbrio de energia, 541-543, 542f
 Equilíbrio de nitrogênio, 543-544
 Equilíbrio negativo de nitrogênio, 543
 Equilíbrio positivo de nitrogênio, 543
 Equivalentes redutores
 em mitocôndrias, 127-130, 128f
 na via das pentoses-fosfato, 198, 200
 no ciclo do ácido cítrico, 162-164, 163f
 Ercalcitriol, 552
 Ergocalciferol (vitamina D₂), 552
 Ergosterol, 219, 219f
 Ergotioneína, 315, 316f
 Eritropoiese, deficiente de ferro, 678
 Eritropoiese ferropriva, 678
 Eritropoietina e produção de hemácias, 692
 Eritropoietina humana (EPO), 692
 Eritropoietina recombinante, 577, 692
 Eritropoietina/eritropoietina recombinante
 (epoietina alfa/EPO), 672t
 regulação da hepcidina, 677
 Erlotinibe, 740
 EROs. *Ver* Espécies reativas de oxigênio
 Erros inatos do metabolismo, 2, 297
 testagem de neonatos para, 596
Escherichia coli, metabolismo da lactose em,
 hipótese óperon e, 430-433, 430f
 Esclerose múltipla, 250-251
 Escorbuto, 281, 285, 562, 631
 colágeno afetado no, 47
 Escritores de códigos, 437
 Esferocitose, hereditária, 496t
 Esferocitose hereditária, 496t, 693t, 694
 causa da, 696
 Esfingofosfolípidos, 212
 Esfingolípídeos, 245
 assimetria de membrana e, 482
 em membranas, 479, 482
 metabolismo de, 249-250, 250f
 aspectos clínicos de, 250-251, 251t
 na esclerose múltipla, 250-251
 Esfingolipídoses, 251, 251t
 Esfingomielinas, 215, 217f, 250, 250f, 624
 Esfingosina, 215, 217f
 Espaço mitocondrial intermembrana, proteínas
 no, 610
 Espécies reativas de oxigênio, 693, 758-760, 758f, 759f
 como subprodutos tóxicos da vida, 758f
 geradas durante a explosão respiratória, 704
 mecanismos enzimáticos e químicos
 interceptam o dano, 762
 quimicamente prolíficas, 758
 reação com moléculas biológicas, 759f
 reações em cadeia e, 758, 760
 Especificidade, enzima, 61
 Especificidade de exames de laboratório, 592,
 592f, 592t
 Especificidade de reconhecimento do promotor,
 397
 Espectrina, 694, 695t, 696
 Espectrofotofluorimetria, 593, 594f
 Espectrofotometria
 para desidrogenases dependentes de NADP⁺,
 67-68, 67f
 para porfirinas, 327-329
 Espectrometria, modificações covalentes
 detectadas por, 31, 31t, 32f
 Espectrometria de massas, 31-33, 32f
 configurações, 31-33
 em *tandem*, 33
 detecção de doenças metabólicas, 296
 modificações covalentes detectadas por, 31
 peptídeos/proteínas, análise de, 31-33
 perfil de transcrito-proteína e, 465
 quadrupolo, 31
 Espectrometria de massas em *tandem*, 33
 Espectrometria de massas por tempo de voo, 31
 Espectrometria de massas quadrupolo, 31
 Espectrometria por fluorescência, 593, 594f
 Espectros de absorção, das porfirinas, 327, 329f
 Espectroscopia, ressonância magnética nuclear
 (RMN), 43-44
 Espectroscopia por ressonância magnética
 nuclear (RMN), 43-44
 Espermidina, síntese de, 316, 317f
 Espermina, síntese de, 316, 317f
 Espessura, da bicamada, 624
 Espinha bífida, suplementos de ácido fólico na
 prevenção de, 560
 Esqualeno
 na síntese de colesterol, 267-268, 268f
 síntese de, 269f
 Esqualeno epoxidase, na síntese de colesterol,
 268, 269f
 Esqueleto de carbono, aminoácido. *Ver*
 Esqueletos de carbono de aminoácidos
 Esqueletos de carbono de aminoácidos
 catabolismo de. *Ver* Esqueletos de carbono de
 aminoácidos, catabolismo dos
 destino dos, 298t
 Esqueletos de carbono de aminoácidos,
 catabolismo dos, 298
 cadeia ramificada, 308-309, 310f
 distúrbios da, 309-311
 formação de acetil-CoA e, 303f, 305f, 310f, 311f
 formação do piruvato e, 299f, 301, 303f
 transaminação no início dos, 298-299, 298f
 Estabilização, de intermediários não dobrados
 ou parcialmente dobrados, 608-610
 Estado alimentado, combustíveis metabólicos
 no, 140, 147-148, 148t
 Estado de jejum, combustíveis metabólicos no,
 140, 148-149, 148t, 149f
 Estado de transição, 74-75
 análogos, 63
 estabilização, 63
 intermediário, 63
 formação durante reação química simples,
 75f
 tetraédrico, na catálise acidobásica, 64
 Estado imunocomprometido, 687
 Estado *latch*, 660
 Estado ligado ao GTP, 623
 Estado prófago, 434
 Estado R (relaxado), da hemoglobina,
 oxigenação e, 55f, 56
 Estado redox, 226
 Estado relaxado (R), da hemoglobina,
 oxigenação e, 55f, 56
 Estado T (tenso), da hemoglobina
 2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 56f
 oxigenação e, 55
 Estado tenso ou Taut (T), da hemoglobina
 2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 57
 oxigenação e, 55
 Estados de deficiência múltipla, vitamina, 546
 Estanho, 562t
 Esteatose hepática
 alcoolismo e, 261
 da gravidez, 231
 desequilíbrio do metabolismo de
 triacilglicerol e, 260-261
 doença da esteatose hepática não alcoólica,
 260
 esteatose hepática não alcoólica, 260
 Esteatose hepática aguda da gravidez, 231
 Estenose supraavicular aórtica, 632
 Estequiometria, 74
 Estereoisômeros, 216, 219f. *Ver também*
 Isomerismo de estereoides
 Êsteres de colesterol, 219, 253, 254, 270
 no núcleo de lipoproteína, 254, 255f
 Esteroides, 218-219, 218f, 219f. *Ver também* tipo
 específico
 afinidade para proteínas séricas de ligação, 516t
 armazenamento de, 515t
 estereoisômeros de, 218-219, 219f
 síntese de, 141, 141f
 suprarrenais. *Ver* Glicocorticoides:
 Mineralocorticoides
 Esteroides gonadais, transporte de, 517
 Esteroidogênese. *Ver* Esteroides
 Esteroidogênese ovariana, 505, 507, 507f, 508f
 Esteroidogênese suprarrenal, 502-505
 síntese de androgênios, 504f, 505
 síntese de glicocorticoides, 504-505, 504f
 síntese de mineralocorticoides, 503, 504f
 vias envolvidas na, 504f
 Esteroidogênese testicular, 505
 Esteróis, 218, 479
 Esterol-27-hidroxilase, 273
 Estímulo da angiogênese por células cancerosas,
 736
 Estreptocinase, 69, 718-719
 Estreptomicina, 156
 Estresse oxidativo, 724
 Estrogênios
 biossíntese de, 508f
 etapas de hidroxilação na, 505
 por aromatização periférica de
 androgênios, 505
 no transporte de aminoácidos, 487
 Estrona, 505
 Estrutura de capeamento de 7-metilguanossina,
 mRNA, 409
 Estrutura de tripla-hélice, do colágeno, 46-47
 Estrutura do 2-acetilaminofluoreno, 725f
 Estrutura do benzo[a]pireno, 725f
 Estrutura do N-metil-4-aminoazobenzeno, 725f
 Estrutura nuclear monoglicosilada, 576
 Estrutura primária, 30, 37. *Ver também*
 Sequenciamento de proteínas
 biologia molecular na determinação da, 30
 de polinucleotídeos, 345
 genômica na análise da, 33
 proteômica e, 33-34
 reação de Edman na determinação de, 30, 31
 sequência de aminoácidos determinando, 22
 técnica de Sanger na determinação da, 29

- Estrutura proteica
 primária, 26-29. *Ver também* Estrutura primária
 quaternária, 37, 39-41, 40f
 de hemoglobinas, propriedades alostéricas
 e, 54-57
 fatores estabilizadores e, 41
 secundária, 37-41
 supersecundária, 39
 terciária, 37
 fatores estabilizadores e, 41
 Estrutura quaternária, 37
 de hemoglobinas, propriedades alostéricas e,
 54-57
 fatores estabilizadores e, 41
 Estrutura secundária, 37-41
 supersecundária, 39
 Estrutura terciária, 40f
 fatores estabilizadores e, 41
 Estruturas cilíndricas, 609
 Estruturas de anéis de piranose, 154, 154f
 Estruturas do anel de furanose, 154, 154f
 Estruturas supersecundárias, 39
 Etanol
 absorção de ferro e, 541
 esteatose hepática e, 261
 glicosilação da transferrina com abuso
 crônico de, 674
 Éter lipídeos, biossíntese de, 248f
 Eucromatina, 374
 Evolução e período de vida, 766
 Evolução humana, 3
 Exames bioquímicos laboratoriais. *Ver também*
 Exames laboratoriais
 usos dos, 590t
 Exames laboratoriais
 amostras para análise, 593
 avaliação da validade, 592-593
 causas de anormalidades nos níveis de
 analitos mensurados em, 589-590, 590t
 exames das funções dos órgãos, 596-599, 596t,
 597t, 598t
 faixa de referência de, 590-591
 importância na medicina clínica, 589
 técnicas utilizadas na química clínica, 593-596
 testes bioquímicos. *Ver* Exames bioquímicos
 laboratoriais
 validade de resultados, 591-592
 Exames laboratoriais de distúrbios da tireoide,
 598t
 Exatidão, exames laboratoriais, 591, 591f
 Excesso de lipoproteína, hereditário, 275t
 Excitose, 477, 492, 493, 493f, 495f
 Éxons, 376, 413
 interrupções em. *Ver* Íntrons (sequências
 intervenientes)
 Exonucleases, 368, 451
 na tecnologia do DNA recombinante, 453t
 Exopeptidases, 539
 Exossomos, 494
 Expansões repetitivas de trinucleotídeos, 378
 Expectativa de vida
 cálculo, 756
 média, 756t
 Explosão respiratória, 543, 704
 Exportinas, 612
 Expressão gênica
 constitutiva, 430
 inibição por miRNA e siRNA da, 368
 na síntese de nucleotídeos pirimidínicos,
 regulação da, 354
 regulação da, 428-449
 ácido retinoico na, 547
 em procariotos vs. eucariotos, 447-449
 negativa vs. positiva, 429, 429t
 respostas temporais e, 429-437, 429f
 transcrição de eucariotos e, 433-437
 Expressão gênica constitutiva, 430, 433
 Expressão gênica em eucariotos, 433-437, 433f.
Ver também Expressão gênica
 interações DNA-proteína na, bacteriófago
 lambda como paradigma para, 433-437
 Expressão gênica em procariotos. *Ver também*
 Expressão gênica
 características únicas da, 430
 como modelo para estudo, 430
 Ezetimiba, para hipercolesterolemia, 275
F
 FAD. *Ver* Flavina adenina dinucleotídeo
 FADH₂, oxidação de ácidos graxos produzindo,
 224f, 225
 Fadiga muscular, 168
 Fago lambda, 433-437, 433f, 436f
 Fagocitose, 492, 700, 701, 703-705, 703f
 Fagos, na tecnologia do DNA recombinante, 455
 Fagossomos, 703
 Falhas no desenvolvimento cardíaco, 659
 Família Alu, 377, 380
 Família da protease aspártica, na catálise
 acidobásica, 64, 64f
 Família das proteínas plasmáticas do éster-tiol,
 680
 Família de peptídeos da
 pró-opiomelanocortina (POMC),
 514-515, 515f. *Ver também* tipo
 específico
 Família de proteínas Rab, 622-623
 Farmacogenômica, 3, 102
 Fármacos como inibidores enzimáticos, 85
 Fármacos de estatina, 267, 267f, 275
 Fármacos quimioterápicos clássicos, 740
 Fármacos sulfonilureias, 231
 Farnesil-difosfato, na síntese de colesterol/
 poli-isoprenoide, 267, 268f, 269-270
 Fase de relaxamento
 da contração dos músculos esqueléticos,
 654
 da contração dos músculos lisos, cálcio na,
 660
 Fase não oxidativa, da via das pentoses-fosfato,
 198
 Fase oxidativa, da via das pentoses-fosfato, 197f,
 198, 199f
 Fase S do ciclo celular, síntese de DNA durante,
 388-389, 388f, 388t
 Fases, nucleossomo, 373
 Fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), 736
 Fator acelerador de degradação, 580
 Fator anti-hemofílico A/globulina, 714, 714t
 deficiência de, 718
 Fator anti-hemofílico B (fator IX)
 deficiência de, 718
 medicamentos cumarínicos afetando, 717
 Fator de ativação de plaquetas, 245
 síntese de, 246f, 248, 248f
 Fator de células-tronco, 690
 Fator de Christmas (fator IX), 712, 712f, 713f, 714t
 deficiência de, 718
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator de crescimento derivado das plaquetas, 730
 Fator de crescimento do endotélio vascular, 736
 Fator de crescimento epidérmico, receptor para, 43f
 Fator de diferenciação do crescimento 15
 (GDF15), 677
 Fator de Hageman (fator XII), 712f, 713, 713f,
 713t, 714t
 Fator de relaxamento derivado do endotélio, 660.
Ver também Óxido nítrico
 Fator de transcrição da forquilha, 43f
 Fator de transformação do crescimento β
 (TGF- β), 730
 Fator de von Willebrand, 718, 720
 na ativação de plaquetas, 720
 Fator estimulador de colônias, 690
 Fator I (fibrinogênio), 670f, 714t, 715
 conversão à fibrina, 715-717
 Fator II (protrombina), 714, 714t
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator III (fator tecidual), 712, 712f, 713t, 714t
 Fator intrínseco, 541, 558
 na anemia perniciosa, 559
 Fator IV. *Ver* Cálcio
 Fator IX (fator anti-hemofílico B/fator Christmas/
 componente da tromboplastina
 plasmática), 712f, 713, 713f, 713t, 714t
 deficiência de, 718
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator lábil (fator V), 713f, 713t, 714
 Fator lipotrófico, 261
 Fator nuclear capa B (NF- κ B), 671
 Fator Rho (ρ), 398
 Fator sensível à N-etilmaleimida, 621t, 623
 Fator Stuart-Prower (fator X), 712f, 713t, 714t
 ativação de, 712f, 713-714
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator tecidual (fator III), 712, 712f
 Fator V (proacelerina/fator lábil/globulina
 aceleradora), 712f, 713t, 714, 714t
 Fator V de Leiden, 717
 Fator VII (proconvertina/acelerador de
 conversão da protrombina sérica/
 cotromboplastina), 712, 712f, 713t, 714t
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator VIII (fator anti-hemofílico A/globulina),
 712f, 713t, 714, 714t
 deficiência de, 718
 Fator X (fator de Stuart-Prower), 712f, 713f,
 713t, 714t
 ativação do, 712f, 713-714
 fármacos cumarínicos afetando, 717
 Fator X, ativação da protrombina à trombina
 pelo, 712f, 713, 714-715
 Fator XI (antecessor da tromboplastina
 plasmática), 712f, 713f, 713t, 714t
 deficiência de, 718
 Fator XII (fator de Hageman), 712f, 713, 713f,
 713t, 714t
 Fator XIII (fator estabilizador de fibrina/
 fibrinoglicase), 712f, 713t, 714t, 715
 Fatores associados à TBP, 400
 Fatores de alongamento, na síntese proteica,
 421, 423f
 fator de alongamento 2, 422, 423f
 fator de alongamento EF1A, 421, 423f
 Fatores de coagulação, 713t. *Ver também* tipo
 específico em Fator
 vitamina K na síntese de, 553-555
 Fatores de coagulação dependentes de vitamina
 K, 717
 anticoagulantes cumarínicos afetando, 717

- Fatores de crescimento, polipeptídeos, 730t
funções de, 730
relação com o câncer, 730
- Fatores de inibição do crescimento, 730
- Fatores de liberação, RF1/RF3, no término da síntese proteica, 423, 424f
- Fatores de risco modificáveis, câncer, 730
- Fatores de transcrição, 405t
na regulação da catálise enzimática, 89-90
- Fatores de troca de nucleotídeos de guanina, 612, 612f
- Favismo, 204
- FC. *Ver* Fibrose cística
- Fe. *Ver* Ferro
- Feixe de quatro hélices, 623
- Fenilalanina, 17t
catabolismo da, 304, 306, 306f
na fenilcetonúria, 304, 306f
na síntese da tirosina, 285, 285f
necessidades para, 544
- Fenilalanina-hidroxilase, 43f, 300t
defeito na, 304
na síntese da tirosina, 285, 285f
- Fenilcetonúria, 304
- Feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT)
na biossíntese de catecolamina, 510
- Fenilisotiocianato (reagente de Edman), no sequenciamento de proteínas, 29, 30f
- Fenótipo SADDAN, 645
- Fermentação de células de levedura, 1-2
- Ferritina, 541, 673
síntese proteica afetada por, 425
- Ferro, 550t
absorção de, 541, 542f, 672f, 673
na hemocromatose, 541
vitamina C e etanol afetando, 541
- ferroso, no transporte de oxigênio, 52-53
- heme, 330, 673
absorção de, 323, 541
ambiente desfavorável para, 53
na metemoglobinemia, 57
- incorporação à protoporfirina, 324f, 326
- metabolismo do, 672f, 673
- não heme, 673
- sobrecarga de, 679t
- transferrina no transporte de, 673-674
- Ferro férrico, 330
na metemoglobinemia, 57
- Ferro ferroso
incorporação de, na protoporfirina, 326
- no transporte de oxigênio, 52-53
- Ferro heme, 330
absorção de, 541, 672f, 673
ambiente desfavorável para, 53
- Ferro não heme, 673
- Ferroportina, 541, 673
- Ferroquelatase (heme-sintase), 326, 328t, 329
na porfiria, 328t
- Fertilização, 579
- α -Fetoproteína, 672t
como biomarcador tumoral, 739t
- FGFR3 (receptor 3 do fator de crescimento dos fibroblastos), 645
- Fibras musculares, tipos de, 663t
- Fibrina
depósitos, 712
dissolução pela plasmina, 718, 718f
fibrilina 1, 632
fibrilina 2, 632
- formação da rede de, 711
- formação de, 712f, 715
trombina na, 715-717
nos trombos, 712
- Fibrinogênio (fator I), 668, 670f, 714t, 715
conversão à fibrina, 715-717
- Fibrinólise, 721t
- Fibrinólise, 721t
- Fibrinopeptídeos A e B, 716f
- Fibroblastos, 577
- Fibronectina, 630, 633
interagindo com a célula, 633f
representação esquemática da, 633f
- Fibrose cística, 496, 496t, 537
- Fígado
cirrose do, 161, 261
consumo de bilirrubina pelo, 331, 331f
consumo de glicose no, 148
corpos cetônicos produzidos pelo, 227, 227f, 229
- esteatose do
alcooolismo e, 261
desequilíbrio do metabolismo do triacilglicerol e, 260-261
na gravidez, 231
- fosforilase no, controle da, 179-180
- frutose-2,6-bisfosfato na regulação do, 189, 190f
glicogênio, 177f
lipídeo, 260f, 261
- glicogênio no, 176-178, 177t
- glicogenólise no, 178
- metabolismo de vitamina D no, 552, 552f
- metabolismo no, 141, 141f, 143f, 150t, 161
- frutose, 202-203, 202f
- glicose, 186f, 189, 191f
- oxidação de ácidos graxos e cetogênese, 226-229, 227f, 228f
- no estado de jejum, 148
- síntese de heme no, 326-327
ALA-sintase na regulação da, 326-327, 328f
- síntese de proteína plasmática no, 143, 670
- síntese de vitamina D₃ no, 552f
- sobrecarga de frutose e, 205
- Figlu. *Ver* Formiminoglutamato
- Filamentos (espessos) de miosina, 649f, 650
- Filamentos de actina (finos), 622, 648, 649f
- Filamentos de actina, 664-665
- Filamentos espessos (miosina), 648, 650
- Filamentos finos (actina), 549-650, 648
- Filamentos intermediários, 664t, 665
- Filoquinona, 550t, 554, 554f. *Ver também* Vitamina K
- Filtração em gel, para purificação de proteínas/peptídeos, 28f
- Filtração glomerular, 634
- Filtro de seletividade, 488, 489
- FISH. *Ver* Hibridização *in situ* por fluorescência
- Fita codificadora, 360, 399f
na síntese de RNA, 394
- Fita de DNA não molde, 395
- Fita lenta (retrógrada), na replicação do DNA, 382f, 383, 385f
- Fita não codificadora, 360
- Fita-líder, na replicação do DNA, 382f, 383
- Fita-molde de DNA, 360, 364, 364f
transcrição da, na síntese de RNA, 395
- Fitas antiparalelas, DNA, 360, 361f
- Fitas descartáveis *dipstick*, 596
- Fitase, 541
- Fixação, 621, 623
- Flavina adenina dinucleotídeo, 120, 344t, 556, 556f
no ciclo do ácido cítrico, 164
- Flavina mononucleotídeo, 62, 120, 556, 556f
- Flavoproteína transportadora de elétrons, 121, 225
- Flavoproteínas
como oxidases, 120, 123f, 124f
em complexos da cadeia respiratória, 121, 127-128
transferidoras de elétrons, 121
- Flipases, 482
- Flip-flop*, fosfolipídeos, assimetria de membrana e, 482
- Fluidez, membrana, 483-484
- Fluoracetato, 162
- Fluorescência, de porfirinas, 327-329, 328f
- Fluoreto, 562t
na glicólise, 170f
- 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger) para sequenciamento de polipeptídeos, 29
- Fluoroacetato, 163f
- 5-Fluoruracil, 344f, 354
- Fluvastatina, 275
- Fluxo de metabólitos, 88
- Fluxo eletrônico, através da cadeia respiratória, 127, 128f
- “Fluxo em massa”, de proteínas de membrana, 622
- FMN. *Ver* Flavina mononucleotídeo
- Focalização isoeétrica, 29, 29f
- Folato. *Ver* Ácido fólico
- Fome, 113
aspectos clínicos da, 149
cetose na, 231
esteatose hepática e, 261
mobilização do combustível metabólico na, 148-149, 148t, 149f
redirecionamento de triacilgliceróis e, 257
- Fontes genômicas, 101-102
- Footprinting*, DNA, 469
- Footprinting* do DNA, 469
- Força próton-motora, 130
- Forças de Starling, 669
- Forças de van der Waals, 8, 8f, 360
- Forças não covalentes
conformação de peptídeos e, 23
na estabilização de biomoléculas, 7-8
- Formação do dímero de timina e luz UV, 761, 761f
- Formas congênicas de distrofia muscular, 655
- Formil-tetra-hidrofolato, 559
- Formiminoglutamato, 299, 302f
- Forquilha de replicação, 386f
- Fosfágenos, 117
- Fosfatase ácida, importância diagnóstica da, 68
- Fosfatase alcalina, 642
isozimas de, importância diagnóstica de, 68t
- Fosfatases
ácidas, importância diagnóstica de, 68t
alcalinas
isozimas de, importância diagnóstica das, 68t
na tecnologia do DNA recombinante, 453t
- Fosfatases de fosfoproteínas, 523-524
- Fosfatidato, 246, 246f
na síntese de triacilglicerol, 246, 247f
- Fosfatidato-fosfo-hidrolase, 246, 247f

- Fosfatidilcolinas (lecitinas), 216, 216f
 assimetria de membrana e, 482
 metabolismo de, 249f
 síntese de, 246, 246f
- Fosfatidiletanolamina (cefalina), 216, 216f
 assimetria de membrana e, 482
 síntese de, 246, 247f
- Fosfatidilglicerol, 216f, 217
- Fosfatidilinositol, 501t
- Fosfatidilinositol/fosfatidilinosítido, 216, 216f
 como segundo mensageiro/precursor de segundo mensageiro, 216, 216f
 síntese de, 246f, 248
- Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), 216
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
- Fosfatidilserina, 216, 216f, 246
 assimetria de membrana e, 482
- Fosfatos de alta energia, 115. *Ver também* ATP
 como "moeda energética" da célula, 116-117, 131
 na captura e transferência de energia, 115, 116t
 símbolo designando, 115
- Fosfatos de baixa energia, 115
- Fosfatos/fósforo, 557
 alta energia, 115. *Ver também* ATP
 como "moeda de energia" da célula, 116-117, 131
 na captura e transferência de energia, 115-116, 116t
 símbolo designando, 115
- baixa energia, 115
 energia livre da hidrólise de, 115-116, 116t
 nos líquidos extracelular e intracelular, 478t
- Fosfocreatina, no músculo, 647-648
- Fosfodiesterase de nucleotídeos 3',5' cíclicos, na lipólise, 263
- Fosfodiesterases, 345, 523
 cAMP hidrolisado por, 179
- Fosfoenolpiruvato, 185-186
 energia livre da hidrólise do, 116t
 na gliconeogênese, 164, 165f
- Fosfoenolpiruvato-carboxicinase, 164, 165f
 na regulação da gliconeogênese, 164, 165f, 185-186, 186f
- Fosfoenolpiruvato-carboxilase, 188t
 na gliconeogênese, 188t
- Fosfofrutocinase (fosfofrutocinase 1), 188t
 músculo, deficiência de, 174, 179t
 na glicólise, 170, 170f, 188t
 regulação e, 172
 na regulação da gliconeogênese, 189
- 3-Fosfoglicerato
 na glicólise, 170f, 172
 na síntese de serina, 283, 284f
- Fosfoglicerato-cinase, na glicólise, 170-171, 170f
 em hemácias, 172, 172f
- Fosfoglicerato-mutase, na glicólise, 170f, 171
- Fosfoglicerídeos, em membranas, 479, 479f
- Fosfogliceróis
 lisofosfolípídeos no metabolismo de, 216, 217f
 síntese de, 246, 246f
- Fosfoglicomutase, 176
 na biossíntese de glicogênio, 177f, 201f
- 6-Fosfogliconato-desidrogenase, 197f, 198, 199f
- Fosfo-hexose-isomerase, na glicólise, 170, 170f
- Fosfolipase A₁, 249, 249f
- Fosfolipase A₂, 248f, 249, 249f
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
- Fosfolipase C (PLC), 249, 249f, 702
- ativação e interações do receptor hormonal, 525f
 clivagem de PIP₂ por, 526f
- Fosfolipases
 fosfolipase D, 249, 249f
 na degradação e remodelagem de fosfoglicerol, 249, 249f
- Fosfolipídeos, 212, 253, 254
 como precursores de segundos mensageiros, 245
 digestão e absorção de, 538-539
 em membranas, 215-217, 217f, 479, 479f, 481, 624
 assimetria de membranas e, 624
 éter de glicerol, síntese de, 248-249, 248f
 na atividade da lipoproteína lipase, 257
 na esclerose múltipla, 250-251
 síntese de, 247f
- Fosfolipídeos de éter de glicerol, síntese de, 248-249, 248f
- Fosfoproteínas, 523
- Fosfoproteínas ácidas, 642
- Fosforilação, de proteínas
 multissítio, no metabolismo de glicogênio, 183
 na modificação covalente, 92, 93f, 94t
 aumentos de massa e, 31t
 no nível do substrato, 131, 131f
 oxidativa. *Ver* Fosforilação oxidativa
 versatilidade da, 94-95, 94t, 95f
- Fosforilação multissítio, no metabolismo de glicogênio, 183
- Fosforilação oxidativa, 116, 127, 140, 662. *Ver também* Fosforilação, de proteínas:
 Cadeia respiratória
 ao nível da cadeia respiratória, 130, 169t
 enzimas como marcadores de compartimentos separados por membranas mitocondriais na, 127
 NADH-Q, 127, 128f
 como acceptor de elétrons, 127, 128f, 163f
 produção de ATP por, 130
 reações em células sanguíneas, 693
- Fosforilação proteica. *Ver* Fosforilação, de proteínas
- Fosforilase
 ativação de, cAMP e, 180
 cálcio/contração muscular e, 180
 cAMP e, 181f
 fosforilase a, 180, 181f
 fosforilase b, 180, 181f
 hepática, 179-180
 deficiência de, 179t
 muscular, 179-180
 ausência de, 179t
 no metabolismo do glicogênio, 177f, 179-180
 regulação de, 180, 183f
- Fosforilase muscular
 ausência de, 179t
 fase de relaxamento da cálcio/contração muscular e, 180
 cAMP e, 181f
- Fosforilase-cinase
 deficiência de, 179t
 fosforilase-cinase a, 180, 181f
 fosforilase-cinase b, 180, 181f
 proteína-fosfatase 1 afetando, 180
 sensível a/à cálcio/calmodulina, na gliconeogênese, 180
- Fosforilase-cinase sensível a/à cálcio/
 calmodulina, na gliconeogênese, 180
- Fósforo. *Ver* Fosfatos/fósforo
- Fosfotriose-isomerase, 170
- Fotometria de chama, 594
- Fotossensibilidade, na porfiria, 329
- Fototerapia, câncer, porfirinas em, 327
- Fototerapia para o câncer, porfirinas na, 327
- FPA/FPB. *Ver* Fibrinopeptídeos A e B
- Fração albumina:globulina (fração A:G), 598
- Fração DIT:MIT, 510
- Frações, 26, 27f
- Fragmento Fc, 684
- Fragmentos de Okazaki, 382t, 383, 385, 385f
- Frutocinase, 202, 202f
 deficiência de, 205
- Frutose
 absorção de, 538, 538f
 absorção de ferro afetada pela, 541
 formas piranose e furanose da, 154f
 hepática
 hipertriacilglicerolemia/
 hipercolesterolemia/hiperuricemia e, 205
 metabolismo afetado pela, 202-203, 202f
 índice glicêmico da, 538
 metabolismo da, 202f
 defeitos no, 205
 na catarata por diabetes, 205
- Frutose hepática
 hipertriacilglicerolemia/hipercolesterolemia/
 hiperuricemia e, 205
 metabolismo afetado por, 202-203, 202f
- Frutose-1,6-bisfosfatase, 205
- Frutose-1,6-bisfosfato, 187
 na glicólise, 170, 170f
 na gliconeogênese, 186f, 198
- Frutose-2,6-bisfosfatase, 189, 190f
 na catálise covalente, 65
- Frutose-2,6-bisfosfato, 189, 190f
- Frutose-6-fosfato, 187
 energia livre de hidrólise da, 116t
 na glicólise, 170, 170f
 na gliconeogênese, 186f, 198
- Frutoseúria essencial, 196, 205
- Frutoseúria essencial, 196, 205
- Fucosil (Fuc)-transferase, 697
- Fumarase, 163f, 164
- Fumarato, 163f, 164
 na síntese de ureia, 294
 no catabolismo de tirosina, 305f
- Fumarato-hidratase. *Ver* Fumarase
- Fumarilacetato, no catabolismo de tirosina, 304, 305f
- Fumarilacetato-hidrolase, 300t
 defeito na tirosinemia, 304
- Função da energia potencial, 105
- Função gastrointestinal, marcadores de, 599
- Furina, 623
- Fusão celular, 685
- Fusão de membrana, 621
- Fusão de vesículas, 621
- FXR. *Ver* Receptor farnesoide X na regulação da síntese de ácidos biliares

G

- G6PD (glicose-6-fosfato-desidrogenase), 693-694
 deficiência de, 693t
 e anemia hemolítica, 693-694, 694f

- GAG. *Ver* Glicosaminoglicanos
- Galactocinase, 203, 203f
defeitos hereditários na, 205
- Galactosamina, 203
- Galactose, 152
absorção de, 538, 538f
D-galactose, 154f, 155t
índice glicêmico da, 538
metabolismo da, 203, 203f
deficiências enzimáticas e, 205
- Galactose-1-fosfato-uridil-transferase, 203, 203f
- Galactosemia, 152, 196, 205
- Galactosidases, 571
- Galactosídeo, 155
- Galactosilceramida, 218, 218f, 250, 251t, 479
- GalCer. *Ver* Galactosilceramida
- Gal-Gal-Xil-Ser trissacarídeo, 573
- GalNAc-Ser[Thr], 573
- GalNAc-transferase, 698
- Gal-transferase, 698
- Gangliosídeo GM₁, 218, 218f
- Gangliosídeo GM₃, 218
- Gangliosídeos, 218
ácidos siálicos em, 156
aminoácidos em, 156, 204f
síntese de, 250, 251f
- Gasto de energia, 541-542, 542f
- Gastropatia com perda de proteínas, 671
- Gastrulação retorcida 1 (TWSG1), 677
- GDH. *Ver* Glutamato-desidrogenase/
L-glutamato-desidrogenase
- GDP, 615. *Ver também* Difosfato de guanosina
- Gefitinibe, 740
- GEFs. *Ver* Fatores de troca de nucleotídeos de guanina
- GenBank, UniProt e Protein Database (PDB), 101
- Gene. *Ver* Genes: Genoma
- Gene A, 697-698
- Gene B, 697-698
- Gene codificador de mRNA, 459
- Gene *cro*, 434, 434f, 435f
- Gene *Entrez*, 102
- Gene induzível, 430
- Gene *lacA*, 430f, 431, 432f
- Gene *lacI*, 431, 432f
- Gene *lacY*, 430f, 431
- Gene *lacZ*, 430f, 431
- Gene *O*, 697-698
- Gene *POMC*, 514-515, 515f
- Genes
alteração de, 379-381, 380f
constitutivos, 430
de imunoglobulinas, rearranjo de DNA e, 380-381
de *knockout*, 464-465
induzíveis, 430
interrupção direcionada de, 464-465
previamente desconhecidos, 3
processados, 380
- Genes antiapoptóticos, superexpressão de, 734
- Genes codificadores, 630
- Genes constitutivos, 430
- Genes da imunoglobulina, 684
rearranjo do DNA e, 380-381
reparo da quebra da dupla-fita e, 390f
- Genes da resistência à ampicilina (Amp), 455
- Genes do envelhecimento
fatores de transcrição, 766
organismos-modelo para descobrir os, 765-766
- Genes humanos, localização de, 460t
- Genes *knockout*, 464-465
- Genes nucleares, proteínas codificadas por, 610
- Genes proteicos s36 e s38, corio, 448f
- Genes resistentes à tetraciclina (Tet), 455
- Genes supressores de tumor, 2-3
e oncogenes, diferença entre, 728t
funções de, 727-730
p53, 392
papel no desenvolvimento do câncer colorretal, 728-730, 729f
propriedades de, 728t
- Genética molecular, 451-468. *Ver também* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
- Genfibroblast, 275
- Genoma
e medicamentos, na bioinformática, 98-99
redundância no, 377-378
remoção de genes do (interrupção/*knockout* direcionado de genes), 464-465
- Genoma mitocondrial, 610
- Genômica, 98-99
possibilita proteínas, 30
sequenciamento de proteínas e, 30
- Geração de sinal, 519-520
- Geranyl-difosfato, na síntese de colesterol, 267, 268f
- Gestação
esteatose hepática da, 231
hipoglicemia durante, 193
necessidades de ferro durante, 676
- GGT. *Ver* γ -Glutamyltransferase
- GlcCer. *Ver* Glicosilceramida
- GlcN. *Ver* Glicosamina
- GlcNAc-fosforiltransferase, 581
- GlcNAc-transferase V, 736
- Glibenclamida. *Ver* Gliburida
- Gliburida, 231
- Glicação, 569
- Glicano (glicosana), 156
- Glicano-transferase, na glicogenólise, 177f, 178
- Glicemia. *Ver* Glicose, no sangue
- Gliceraldeído (glicerose), isômeros D e L de, 154f
- Gliceraldeído-3-fosfato
na glicólise, 170, 170f
oxidação do, 170, 171f
- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, 695t
na glicólise, 170, 170f
- Glicerofosfolípidos, 212
- Glicerol, 215
coeficiente de permeabilidade de, 481f
síntese de, 187
- Glicerol-3-fosfato
biossíntese de acilglicerol e, 246, 247f
energia livre da hidrólise de, 116t
esterificação do triacilglicerol e, 261-262, 262f
transferência de elétrons via, 128
- Glicerol-3-fosfato-desidrogenase mitocondrial, 121
- Glicerol-3-fosfato-aciltransferase, 246, 247f
- Glicerol-3-fosfato-desidrogenase, 246, 247f
- Glicerol-cinase, 246, 247f, 261
- Glicerolfosfato-aciltransferase, 127
- Glicerose (gliceraldeído), isômeros d e l de, 154f
- Glicina, 16t, 315
catabolismo da, formação do piruvato e, 301, 302f
na síntese de heme, 315, 325-327, 325f, 328f
síntese de, 283, 284f
- Glicina hidroximetiltransferase, 301, 302f
- Glicina N-metiltransferase, 300t
- Glicinúria, 301
- Glicobiologia, 569
- Glicocálice, 159, 218
- Glicocinase, 188t, 753
mutação gênica da, 753t
na biossíntese de glicogênio, 176, 177f, 188t
na glicólise, 170, 170f, 188t
na regulação da glicemia, 191-192, 192f
- Glicocinjugados, 569
glicanos de, 581
- Glicocorticoides, 528. *Ver também* tipo específico glicemia afetada por, 192
na lipólise, 263, 263f
regulação da expressão gênica por, 519f
síntese de, 504-505, 504f
transportados por globulina de ligação dos corticosteroides, 516
- Glicoforinas, 159, 573
glicoforinas A, B e C, 695t, 696
- Glicofomas, 570
- Glicogênese, 142, 178, 178f
regulação de
AMP cíclico na, 180, 181f, 182-183, 183f
enzimas na, 188t
glicogênio-sintase e fosforilase na, 182-183, 182f
- Glicogenina, 177, 177f
- Glicogênio, 156, 159f
AMP cíclico no, 181f, 183f
armazenamento de carboidratos e, 177t, 178
glicogênio-sintase e fosforilase no, 182, 182f
metabolismo do. *Ver também* Glicogênese:
Glicogenólise
aspectos clínicos do, 179t, 183
ramificação no, 178f
muscular, 148, 177t, 178
no metabolismo de carboidratos, 140, 141f, 187
papel do AMP cíclico na regulação do metabolismo do, 179-180, 181f
ramificação no, 178
síntese de, 148
- Glicogênio fosforilase, 177f, 178, 662, 663
piridoxal-fosfato como cofator para, 557
regulação da, 179-180, 182-183, 183f
- Glicogênio-sintase, no metabolismo do
glicogênio, 177, 177f, 187, 188t
glicogênio-sintase a, 182, 182f
glicogênio-sintase b, 182, 182f
regulação da, 182, 182f
- Glicogenólise, 143
AMP cíclico na regulação da, 181f, 182, 183f
enzimas de desramificação na, 178, 178f
glicogênio-sintase e fosforilase na regulação da, 182-183, 182f
independente de AMP cíclico, 180
regulação da glicemia e, 190-193, 191f, 192f
via da, 176-178, 177f
- Glicolípídeos, 212, 218, 218f, 569
aminoácidos em, 203, 204f
galactose na síntese de, 203, 203f
- Glicólise, 116, 140, 141f, 168-175, 170f
aeróbia, 171
anaeróbia, 168, 169f, 170f, 171
aspectos clínicos da, 174
ATP produzido por, 169t, 173
barreiras termodinâmicas para reversão da, 185-187
em hemácias, 172, 172f

- em nível subcelular, 144, 144f
 oxidação do piruvato e, 164, 166f, 169t, 172-174, 173f, 174f
 regulação da, 172
 enzimas na, 188t
 gliconeogênese e, 172, 187-190, 188t, 190f
 frutose-2,6-bifosfato na, 189, 190f
 utilização de glicose/gliconeogênese e, 169-172, 170f, 172f, 185-187, 186f. *Ver também* Gliconeogênese
 via da, 169-171, 170f, 171f
- Glicólise aeróbia, 172
 como fonte de ATP muscular, 662
 velocidade em células cancerosas, 739
- Glicólise anaeróbia, 168, 169f, 170f, 663
 como fonte de ATP muscular, 663
- Glicoma, 569
- Glicômica, 3
- Gliconeogênese, 140, 143, 185-194, 186f
 ciclo do ácido cítrico na, 164-165, 165f, 185-187, 186f
 custo energético da, 194
 na glicólise, 169-171, 170f, 172f, 186f, 187-190
 regulação da, 172
 regulação da, 187-190, 188t, 190f
 barreiras termodinâmicas à glicólise e, 185-187, 186f
 ciclos de substrato (fúteis) na, 190
 frutose-2,6-bifosfato na, 189, 190f
 indução/repressão enzimática na, 187-188, 188t
 modificação alostérica na, 188-189
 modificação covalente na, 188
 regulação da glicemia e, 190-193, 191f, 192f
- Gliconolactona-hidrolase, 198, 199f
- Glicoproteína IIb-IIIa, na ativação de plaquetas, 719f, 720
- Glicoproteínas, 37, 156, 156f, 204f, 502f, 569-582, 571t, 575, 669. *Ver também* Proteínas plasmáticas: tipo específico
 açúcares de nucleotídeos, 574
 açúcares em, 574
 alta manose, 574
 aminoácidos em, 156, 203, 204f
 ancoradas por glicosilfosfatidilinositol, 573
 anomalias na biossíntese de, 580t
 assimetria de membrana e, 482
 cadeias de oligossacarídeos de, 569-570, 570t, 574
 carboidratos em, 155t
 classes de, 573
 complexas, 576
 doenças associadas a anomalias de, 580-581
 espectroscopia por RMN de alta resolução, 570
 estrutura e função de, 571t
 extracelulares, pinocitose absorviva de, 493
 funções de, 569, 570t
 galactose na síntese de, 203, 203f
 glicoproteínas humanas, 571t
 híbridas, 574
 imunoglobulinas como, 681
 ligação, natureza anidrica de, 573
 na fertilização, 579
 na zona pelúcida, 579
 N-ligadas, 573
 O-ligadas, 574
 receptor de assialglicoproteína na depuração de, 572
 técnicas para estudo de, 570-571
 glicosidases em, 571
 lectinas em, 572
 receptor de assialglicoproteína em, 572
- Glicoproteínas glicosiltransferases, 574
- Glicoproteínas N-ligadas, 574-577
- Glicosamina (GlcN), 156f, 203, 204f, 637
- Glicosaminoglicanos, 156, 159f, 634-636, 634-640. *Ver também* tipo específico
 aminoácidos em, 156
 estruturas de, 636f
 funções de, 638t
 propriedades de, 637t
- Glicosano (glicano), 156
- Glicose, 152-160, 663
 absorção de, 538, 538f
 coeficiente de permeabilidade da, 481f
 como necessidade metabólica, 146
 como precursora de aminoácidos, 203, 204f
 consumo de, 148
 conversão de galactose em, 203, 203f
 epímeros da, 159, 159f
 estrutura da, 153, 154f
 formas de furanose da, 154, 154f
 formas de piranose da, 154, 154f
 índice glicêmico de, 538
 interconvertibilidade de, 145-146
 isômeros de, 153-154, 154f
 limiar renal para, 193
 na biossíntese de glicogênio, 176, 177f
 no sangue. *Ver* Glicose, sangue
 nos líquidos extracelular e intracelular, 478t
 secreção de insulina e, 192
 transporte de, 190, 192f, 491, 492f, 538
 insulina afetando, 491
- Glicose, sangue
 ácidos graxos livres e, 262
 ATP produzido por, 169t, 173
 fome e, 148, 148t, 149f
 hemácias e, 691
 insulina afetando, 192, 194
 no estado alimentado, 148
 normal, 176
 pela via das pentoses-fosfato, 140, 196, 197f, 199f, 200f
 regulação da
 aspectos clínicos da, 193-194, 193f
 dieta/gliconeogênese/glicogenólise na, 190-193, 191f, 192f
 glicocinase na, 191-192, 192f
 glicogênio na, 178
 glucagon na, 192
 insulina na, 192
 limites da, 190
 mecanismos metabólicos e hormonais na, 191, 192t
- Glicose-1-fosfato
 energia livre da hidrólise de, 116t
 na gliconeogênese, 186f, 187
- Glicose-6-fosfatase
 deficiência de, 179t, 355
 na glicogenólise, 178
 na gliconeogênese, 188t
- Glicose-6-fosfato, 178
 energia livre da hidrólise de, 116t
 na biossíntese de glicogênio, 176, 177f
 na glicólise, 170, 170f
 na gliconeogênese, 182, 186f
- Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), 693-694
 deficiência, 693t
 e anemia hemolítica, 693-694, 694f
 deficiência de, 196, 204-205
 na via das pentoses-fosfato, 196, 197f, 198, 199f
- Glicose-permease, 691t
- Glicosfingolípídeos, 212, 218, 218f, 250, 251f, 479, 624, 697
- Glicosidases, 571
- Glicosídeo, 155
- Glicosídeos, 155-156
- Glicosídeos cardíacos, 156
- Glicosilação, 569, 578
 cotraducional, 616
 distúrbios congênitos da, 580t, 674
 na modificação covalente, aumentos da massa e, 31t
- Glicosilação cotraducional, 615
- Glicosilceramida, 218, 250, 250f, 479
- Glicosilfosfatidilinositol, 573, 623
- Glicosúria, 193
- Glicosúria hiperglicêmica, 597t
- Glicosúria renal, 597t
- Glicuronato/ácido glicurônico, 200, 201f
 conjugação da bilirrubina com, 331-332, 331f
- Glicuronidação da bilirrubina, 331-332, 331f, 586
- Glicuronídeos, 196, 200
- Globina, 330
- Globulina aceleradora (Ac-) (fator V), 713t
- Globulina de ligação da tireoide, 672t
- Globulina de ligação da tiroxina, 516
- Globulina de ligação dos corticosteroides, 516, 672t
- Globulina de ligação dos hormônios sexuais, 517
 globulina de ligação da
 testosterona-estrogênio, 672t
- Globulinas, 669
- Glomérulo renal, 634
- Glomerulonefrite, 634
- Glucagon, 140, 179, 192
 na regulação da gliconeogênese, 188
 na regulação da lipogênese, 237, 237f
 no estado de jejum, 148
- GLUT 1-4. *Ver* Transportadores de glicose
- GLUT1 (transportador de glicose), 691, 691t
- Glutamato, 165
 carboxilação do, vitamina K como cofator para, 554-555
 catabolismo do, 298f, 299
 na biossíntese de ureia, 289f, 290-291, 291f
 na síntese de prolina, 284, 284f
 síntese de, 282-283, 283f
 transaminação e, 289f, 290-291, 291f
- Glutamato-aminotransferase, 291
- Glutamato-desidrogenase/
 L-glutamato-desidrogenase, 283, 283f
 no metabolismo do nitrogênio, 291, 291f, 292f
- Glutamato- γ -semialdeído, 19t, 284f
- Glutamil-amidotransferase, PRPP, regulação do, 350, 351, 351f
- γ -Glutamil-fosfato, 283
- γ -Glutamilttransferase, 586
- Glutamina, 17t, 165, 289
 catabolismo de, 299, 299f
 no catabolismo de nitrogênio de aminoácidos, 292
 síntese de, 283, 283f, 292f
- Glutaminase, no catabolismo do nitrogênio de aminoácidos, 292
- Glutamina-sintase, 283, 283f, 292, 292f
- Glutationa, 23, 23f, 748, 762
 efeito da acetilfenil-hidrazina na, 748t

- Glutaciona S-transferases, 70f, 586
 Glutaciona-peroxidase, 122, 200, 200f, 204
 Glutaciona-redutase, 748, 748f
 hemácia
 estado de riboflavina e, 556
 via das pentoses-fosfato e, 200, 200f, 205
 GMP, 341t
 cíclico, 343f, 344t
 como segundo mensageiro, 343
 conversão de IMP a, 348, 350f
 regulação por retroalimentação da, 351, 351f
 PRPP glutamil-amidotransferase regulada por, 350, 351
 GMP cíclico, 343, 343f, 501t
 como segundo mensageiro, 343
 como sinal intracelular, 524
 formação, 524
 papel no músculo liso, 660-661
 Gonadotrofina coriônica humana, 739t
 Gorduras, 212. *Ver também* Lipídeos
 metabolismo de, 140-141, 140f, 141f, 143
 Gota/artrite gotosa, 354
 Gotículas de lipídeos, 261, 263-264
 GPCRs. *Ver* Receptores acoplados à proteína G
 GPI. *Ver* Glicosilfosfatidilinositol
 GPIIb-IIIa, na ativação de plaquetas, 719f, 720
 Gráfico de Dixon, 83, 83f
 Gráfico de hidropatia, 481
 Gráfico de Lineweaver-Burk, 82f, 83f, 85f
 avaliação do inibidor e, 83
 K_m e V_{max} estimadas a partir de, 79-80
 Gráfico duplo recíproco e avaliação do inibidor, 82
 Grampo (*hairpin*), 363, 364f, 469, 616
 Granulócitos, 700, 703, 706
 Grânulos, 703
 Grupamentos prostéticos, 61-62
 na catálise, 61-62
 Grupo sanguíneo
 definição, 696-697
 sistemas, 696-698
 substâncias, 569
 Grupos funcionais
 importância fisiológica dos, 11-12
 meio afetando o pK dos, 13
 propriedades dos aminoácidos afetadas pelos, 20-22
 Grupos R, propriedades de aminoácidos afetadas por, 22-23
 Grupos α -R, propriedades dos aminoácidos afetados por, 22-23
 GSH. *Ver* Glutaciona
 GSLs. *Ver* Glicosíngolipídeos
 GTP, 343, 615, 621, 623
 ligado a proteínas, 269
 na fosforilação, 118
 GTPases, 612
 monoméricas pequenas, 613, 622
 GTPases monoméricas pequenas, 613, 622
 Guanina, 341t
 oxidada por EROs, 759f
 Guanosina, 340f, 341t
 na formação do ácido úrico, 354, 355f
 pareamento de bases de, no DNA, 360, 361f
- H**
- H2S. *Ver* Sulfeto de hidrogênio
 Haplótipo, 101
 Haptoglobina, 672-673, 672t
 HbA (hemoglobina A), P₅₀ da, 55
 HbA_{1C} (hemoglobina glicosilada), 58-59
 HbF (hemoglobina fetal), P₅₀ da, 55
 HbM (hemoglobina M), 58, 417
 HbS (hemoglobina S), 58, 417
 hCG. *Ver* Gonadotrofina coriônica humana
 HDL. *Ver* Lipoproteínas de alta densidade
 Hefaestina, 673
 Helicases, DNA, 382f
 Hélice
 dupla, da estrutura do DNA, 8, 360-361, 361f
 tripla, da estrutura do colágeno, 46-47, 46f
 Hélices anfipáticas, 39
 Hélice-volta-hélice, 444
Helicobacter pylori, 581
 estômago, células epiteliais do, 581
 úlceras associadas ao, 537
 Hemácias
 doenças afetando, 689, 693t
 duração da vida de, 692
 funções de, 690-692
 glicólise em, 172, 172f, 691
 glicose como necessidade metabólica para, 146-147
 hemólise e via das pentoses-fosfato/
 glutaciona-peroxidase, 200, 200f
 membrana de
 análise SDS-PAGE, 695, 695f
 informação bioquímica sobre, 695t
 proteínas integrais da, 695-696, 695f, 695t
 proteínas periféricas do citoesqueleto, 695t, 696
 metabolismo de, 150t, 691t
 produção de oxidantes, 694
 síntese de reticulócitos e proteínas, 692
 transporte de glicose, 691
 origem a partir de células-tronco
 hematopoiéticas, 689-690
 esquema de diferenciação, 690f
 produção de eritropoietina regulando, 692
 "sticky patch" da hemoglobina S afetando, 58
 transportador de glicose de, 691, 691t
 via do 2,3-bifosfoglicerato em, 172, 172f, 691
 Hemaglutinina, 581
 Hematúria, 597t
 Heme-oxigenase, 672
 Heme, 52, 52f
 catabolismo de, bilirrubina produzida por, 330-332, 330f
 distúrbios de, 328t, 329f
 síntese de, 325-327, 325f, 326f, 328f
 ALA-sintase, 326-327
 incorporação do ferro ferroso à
 protoporfirina, 326
 Heme-sintase (ferroquelatase), 326, 328f
 na porfiria, 328t
 Hemiacetal, 153
 Hemiconexina, 495f
 Hemina, 330, 330f
 Hemocromatose, 541
 hereditária, 693
 Hemocromatose hereditária, 679, 693
 Hemofilia A, 717-718
 Hemofilia B, 717-718
 Hemoglobina, 52-58, 670f
 afinidades do oxigênio, 57-58
 apoproteína, 55
 2,3-bifosfoglicerato estabilizando a, 57f
 adaptação à alta altitude e, 57
 curva de dissociação do oxigênio para, 53
 estrutura da, 54f
 estrutura tetramérica da, 52
 alterações na, durante o desenvolvimento, 55
 estruturas secundárias e terciárias, 54
 extracorpúscular, ligação de haptoglobina da, 672, 672t
 glicosilada. *Ver* HbA_{1C}
 hemoglobina A (HbA), P₅₀ da, 55
 hemoglobina F (hemoglobina fetal), P₅₀ da, 55
 hemoglobina Hikari, 417, 417f
 hemoglobina M, 57-58, 417
 hemoglobina S, 58, 417
 mutações, 57-58, 417
 no transporte de dióxido de carbono, 57f
 no transporte de oxigênio, 52-53
 no transporte de prótons, 56
 oxigenação e alterações de conformação, 55-56
 propriedades alostéricas da, 54
 síntese de bilirrubina e, 330, 330f
 Hemoglobina Chesapeake, 58
 Hemoglobina fetal, P₅₀ da, 55
 Hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}), 58-59
 Hemoglobinopatias, 57, 694
 Hemoglobinúria, 597t
 paroxística noturna, 496t
 Hemoglobinúria paroxística noturna, 496t, 580, 693t, 694
 Hemojuvelina (HJV), 677
 Hemólise, 693t
 α -Hemolisina, 490
 Hemolisinas, 694
 Hemopexina, 672t, 673
 Hemoproteínas, 120, 323, 325t
 Hemossiderina, 673
 Heparina, 159, 159f, 632, 637, 717
 atividade da antitrombina III afetada por, 717
 estrutura da, 638f
 lipoproteína e lipases hepáticas afetadas por, 257
 Heparina/sulfato de heparan, 634, 637-638
 Heparinas de baixo peso molecular, 717
 Hepatite, 161
 icterícia na, 333f, 334t
 Hepatócitos, síntese de heme em, 325
 ALA-sintase na regulação de, 326-327, 328f
 Hepcidina, 541, 676, 677f, 678f
 Heptoses, 152, 153t
 Heterocromatina, 374
 Heterocromatina constitutiva, 374
 Heterocromatina facultativa, 374
 Heterodímero, 41
 Hexapeptídeo, na síntese de albumina, 671
 Hexocinase, 188t, 753
 como reação geradora de fluxo, 145
 na biossíntese de glicogênio, 176, 188t
 na glicólise, 169, 170f, 188t
 na regulação da glicemia, 191, 192f
 no metabolismo de frutose, 202f, 203
 regulação e, 172
 Hexosaminas (aminoaçúcares), 156, 156f
 em glicosaminoglicanos, 156, 204f
 em glicosíngolipídeos, 203, 204f
 glicose como precursora de, 203, 204f
 inter-relações no metabolismo de, 204f
 Hexoses, 152, 153t, 154-155, 155t
 em glicoproteínas, 155t
 importância fisiológica das, 154-155, 155t
 metabolismo de, 196-206, 197f, 199f, 200f.
Ver também Via das pentoses-fosfato

- HhaI*, 452*t*
 Hialuronidase, 639
 Hibridização, 361, 456-457, 469
 Hibridização *in situ* por fluorescência, 459
 Hibridomas, 685
 Híbridos de RNA-RNA, 368
 Hidrocortisona. *Ver* Síntese de cortisol
 Hidrolase de éster de colesterol, 270-271
 Hidrolases, 61
 éster de colesterol, 270-271
 fumarilacetato, defeito no, na tirosinemia, 304
 gluconolactona, 198, 199*f*
 Hidrolases lisossomais de glicoproteínas, deficiências genéticas de, 581, 581*t*
 Hidrólise (reações hidrolíticas), 9. *Ver também* reação específica
 de triacilgliceróis, 246
 do GTP ligado ao GDP, 622
 energia livre de, 115-116, 116*t*
 na glicogenólise, 177*f*, 178
 Hidroperoxidases, 122
 Hidroperóxidos, 240, 243*f*
 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) na cetogênese, 226-227, 228*f*
 na síntese de mevalonato, 267, 268*f*
 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) liase
 deficiência de, 231
 na cetogênese, 227, 228*f*
 3-Hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase
 na síntese do mevalonato, 267, 267*f*
 síntese de colesterol controlada por, 267, 270*f*
 3-Hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase
 na cetogênese, 227, 228*f*
 na síntese do mevalonato, 267, 267*f*
 Hidroxianisol butilado, 220
 3-Hidroxiantranilato dioxigenase/oxigenase, 123
 3-Hidroxiantranilato oxidase, 307*f*
 24-Hidroxicaldiol (24,25-di-hidroxivitamina D₃), no metabolismo da vitamina D, 552*f*
 25-Hidroxicolecalciferol (calcidiol), no metabolismo da vitamina D, 552*f*
 4-Hidroxidicumarina (dicumarol), 554
 Hidroxilação, 583
 na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
 18-Hidroxilase, 503
 27-Hidroxilase, esterol, 273
 7 α -Hidroxilase, esterol, 273
 Hidroxilases, 123
 na síntese de cortisol, 504-505
 Hidroxilisina, síntese de, 285
 Hidroxilisinas da molécula de pró-colágeno, glicosilação das, 629
 5-Hidroximetilcitosina, 342, 342*f*
 Hidroxiprolina, 628, 631
 catabolismo de, 303-304, 304*f*
 síntese de, 285, 285*f*
 4-Hidroxiprolina desidrogenase, falha na, na hiper-hidroxiprolinemia, 303
 15-Hidroxiprostaglandina desidrogenase, 240
 Hidroxitolueno butilado, 220
 5-Hidroxitriptamina. *Ver* Serotonina
HindIII, 452*t*
 Hiperacidemia láctica, 261
 Hiperalfalipoproteinemia, hereditária, 275*t*
 Hiperamoniemia, 161, 167
 Hiperargininemia, 295-296
 Hiperbilirrubinemia, 332-333, 334*t*
 icterícia causada por, 332
 não conjugada e conjugada, causas de, 334*t*
 níveis elevados de bilirrubina não conjugada no sangue, 332
 Hiperbilirrubinemia conjugada, causas de, 332*t*, 333
 Hiperbilirrubinemia de retenção, 332
 Hiperbilirrubinemia não conjugada, 334*t*
 Hiperbilirrubinemia por regurgitação, 332
 Hiperbilirrubinemia tóxica, 332
 Hipercolesterolemia, 254, 258
 a partir da carga de frutose do fígado, 205
 Hiper Cromicidade da desnaturação, 361
 Hiperesplenismo, 694
 Hiperfenilalaninemia, 304
 Hiper glicemia, 185. *Ver também* Diabetes melito
 Hiper-hidroxiprolinemia, 303
 Hiper-homocisteinemia, suplementos de ácido fólico na prevenção de, 560
 Hiperlipidemia, niacina para, 557
 Hiperlipoproteinemias, 254, 275, 275*t*
 Hiperlisinemia, 306
 Hipermetabolismo, 168, 543
 Hipermetioninemia, 316
 Hiperossalúria primária, 301
 Hiperprolinemias, tipos I e II, 299, 300*t*, 301*f*
 Hipertermia maligna, 647, 654, 655*f*, 658*t*
 Hipertermia maligna, 654-655, 655*f*, 658*t*
 Hiperuricemia, 355
 Hipoglicemia, 185
 induzida por frutose, 205
 oxidação de ácidos graxos e, 223, 231
 Hipoglicina, 223, 231
 Hipolipoproteinemia, 254, 275, 275*t*
 Hipótese de sinal, de ligação de polirribossomos, 609*f*, 614-616, 614*t*
 Hipótese dos batimentos cardíacos, 764
 colesterol e, 274
 Hipotireoidismo, 217
 Hipoxantina, 342, 342*f*
 Hipóxia, 736
 Hipóxia, produção de lactato e, 168, 171-172
 Histamina, 701*f*, 703*t*, 706
 formação de, 315
 Histidase (histidina-amônia-liase), 299, 300*t*
 Histidina, 17*t*, 20, 315, 315*f*, 701*f*
 catabolismo de, 299, 302*f*
 descarboxilação de, 315, 315*f*
 na ligação de oxigênio, 53*f*
 necessidades para, 544
 resíduos conservados e, 66*t*
 Histidina 57, na catálise covalente, 64-65
 Histidina distal (histidina E7) na ligação do oxigênio, 52
 Histidina E7, na ligação do oxigênio, 52
 Histidina F8
 na ligação do oxigênio, 52
 substituição de, na hemoglobina M, 58
 Histidina proximal (histidina F8)
 na ligação com o oxigênio, 52
 substituição de, na hemoglobina M, 58
 Histidina-amônia-liase (histidase), 299, 300*t*
 Histidinemia, 299, 300*t*
 Histonas, 371-373, 371*f*, 373*t*
 acetilação de, 735
 Histonas H1, 371, 371*f*
 Histonas H2A, 371, 371*f*
 Histonas H2B, 371, 371*f*
 Histonas H3, 371, 371*f*
 Histonas H4, 371, 371*f*
 HMG-CoA. *Ver* 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
 HMM. *Ver* Meromiosina pesada
 HNPCC. *Ver* Câncer colorretal não poliposo hereditário
 Holocarboxilase-sintase, biotina como coenzima de, 561
 Homeostasia
 no RE, 618
 sangue na manutenção da, 669
 Homeostasia, 698, 711-721. *Ver também* Coagulação (sangue)
 exames laboratoriais na avaliação da, 721
 fases da, 711
 Homoarginina, 19*t*
 Homocarnosina, 315, 316*f*, 319
 Homocarnosinose, 319-320
 Homocisteína, 19*t*, 285*f*
 deficiência funcional de folato e, 560
 na síntese de cisteína e homoserina, 285
 Homocistinúrias, 302, 316
 deficiência de vitamina B₁₂/deficiência de folato funcional e, 560
 Homodímeros, 41
 Homogentisato, no catabolismo de tirosina, 304, 305*f*
 Homogentisato-dioxigenase/oxidase, 123
 Homogentisato-oxidase, 300*t*
 deficiência de, na alcaptonúria, 300*t*, 304, 305*f*
 Homologia, 102-103
 modelagem, 44
 na classificação de proteínas, 37
 resíduos conservados e, 66
 Homoserina, 19*t*
 síntese de, 285, 285*f*
 Hormônio adrenocorticotrófico e hipercortisolismo, 599
 Hormônio de crescimento, transporte de aminoácidos afetado por, 487
 Hormônio esteroide como molécula precursora, 501
 Hormônio estimulador da tireoide, medição do, 598, 598*t*
 Hormônio paratireoideo, 512-513
 biossíntese do, 512-513
 em vesículas de armazenamento, 515
 Hormônios, 569. *Ver também* hormônios específicos
 armazenamento e secreção de, 515
 características de, 501*t*
 como segundos mensageiros, 500, 501*t*
 definição, 498
 difusão facilitada regulada por, 487
 diversidade química de, 501-502, 502*f*
 estimulando a adenilato-ciclase, 521*t*
 hidrossolúveis, 500
 ligação a receptores de superfície da célula, 500, 501*t*
 ligação a receptores intracelulares, 500, 501*t*
 lipofílicos, 500
 metabolismo de lipídeos regulado por, 262-264, 263*f*
 modificados para atividade total, 502
 molécula precursora para, 501
 na regulação da glicemia, 191
 no controle metabólico, 145, 146*f*
 proteínas plasmáticas no transporte de, 516-517
 resposta coordenada a estímulos, 518-519, 519*f*

- síntese de, 502
 1,25(OH)₂-D₃, 507-509
 a partir da tirosina, 509-515
 angiotensina II, 513-514
 esteroidogênese ovariana, 505, 507
 esteroidogênese suprarrenal, 502-505
 esteroidogênese testicular, 505
 família POMC, 514-515, 515f
 insulina, 512
 metabolismo de iodo e, 510-511
 precursores peptídicos para, 511
 PTH, 512-513
 tetraiodotironina, 510
 tri-iodotironina, 510
 vitamina D como, 551-553
- Hormônios da adeno-hipófise, glicemia afetada por, 192
- Hormônios da hipófise. *Ver também* tipo específico
 glicemia afetada por, 192
- Hormônios da tireoide, 510
 na lipólise, 263, 263f
 regulação da expressão gênica por, 519f
- Hormônios hidrofílicos, 516
- Hormônios hidrossolúveis, 500
- Hormônios lipofílicos, 500
- Hp. *Ver* Haptoglobina
- HpaI*, 452t
- HPETE. *Ver* Hidroperóxidos
- HPLC. *Ver* Cromatografia líquida de alto desempenho
- HREs. *Ver* Elementos de resposta hormonal
- Hsp60/Hsp70, como chaperonas, 45
- 5-HT (5-hidroxitriptamina). *Ver* Serotonina
- ## I
- I. *Ver* Iodeto/iodo
- Ibuprofeno, 232, 240
- Ictericia, 323, 332, 334t, 598
- Ictericia, 332, 334t
- Ictericia acolúrica, 332
- Ictericia colestática, 333
- Ictericia colúrica, 333
- Ictericia fisiológica (neonatal), 332-333
- Ictericia não hemolítica congênita (síndrome de Crigler-Najjar tipo I), 333
- Ictericia neonatal (fisiológica), 332-333
- Ictericia pós-hepática, 333f
- Ictericia pré-hepática, 333f
- Idiótipos, 684
- IDL. *Ver* Lipoproteínas de densidade intermediária
- IEF. *Ver* Focalização isoeletrica
- IgA, 681t, 682t, 683f
- IgD, 681t, 682t
- IgE, 681t, 682t
- IgG, 681t, 682f, 682t, 684f
- IgM, 681t, 682t, 683f
- Ilhotas de Langerhans, insulina produzida por, 192
- Ilhotas pancreáticas, insulina produzida por, 192
- IM. *Ver* Infarto do miocárdio
- Imatinibe, 740, 740t
- IMP (monofosfato de inosina)
 conversão a AMP e GMP, 348, 349f
 regulação por retroalimentação de, 351, 351f
 síntese de, 348-350, 349f, 350f
- Importinas, 612, 612f
- Impressão digital, DNA, 469
- Impressão digital do DNA, 469
- Impulsos nervosos, 491
- Imunidade celular, 681
- Imunidade humoral, 707
- Imunidade inata, 681
- Imunoensaios, 595-596
- Imunogenicidade, redução, 685
- Imunoglobulina monoclonal, 739t
- Imunoglobulinas, 668, 672t, 680-685, 682t.
Ver também tipo específico em Ig
 classes de, 682t
 estrutura das, 683f, 684f
 funções das, 681, 682t
 genes para. *Ver* Genes da imunoglobulina
 híbridomas como fontes de, 685
 troca de classe e, 684
- Imunoprecipitação de cromatina (ChIP), 465
- Índice de massa corporal, 541
- Índice glicêmico, 156, 538
- Indol, coeficiente de permeabilidade do, 481f
- Indometacina, cicloxigenases afetadas por, 240
- Indução enzimática, 587
 citocromo P450 e, 330
 na regulação da gliconeogênese, 187-188, 188t
- Indutores
 gratuitos, 431
 na regulação da expressão gênica, 430
 síntese enzimática afetada por, 89
 na regulação da gliconeogênese, 187-188
- Indutores gratuitos, 431
- Infarto do miocárdio
 enzimas auxiliando no diagnóstico de, 69
 isoenzimas de lactato-desidrogenase no diagnóstico de, 68-69
 marcadores de, 599
- Infecção, perda de proteínas e, 544
- Infecção viral, 620
- Infecções parasíticas, 694
- Infecções recorrentes, 581
- Inflamação, 232
 complemento na, 685-686, 686f
 em relação ao câncer, 742
 prostaglandinas na, 232
 proteínas de fase aguda na, 671
- Inflamação aguda, biomoléculas com propriedades vasoativas envolvidas na, 703t
- Inflamação crônica, 742
- Influenza A*, vírus, 581
- Informação do transcriptoma, 465
- Inibição
 com base em mecanismo, 83
 competitiva vs. não competitiva, 81-84
 fortemente ligada, 83
 irreversível, 83
 por retroalimentação, na regulação alostérica, 90f, 91
- Inibição com base em mecanismo, 83-84
- Inibição competitiva, inibição não competitiva diferenciada da, 81-84
- Inibição irreversível, enzimática, 83
- Inibição não competitiva, competitiva, 81-84
- Inibição por retroalimentação na regulação alostérica, 90f, 91, 146f
- Inibidor 1, 180, 181f, 182, 183f
- Inibidor antiproteínase, 706
- Inibidor da via do fator tecidual, 713
- Inibidor de CDK-ciclina/CDKI, integridade de DNA/cromossomo e, 392
- Inibidor de panproteínase, 680
- Inibidor de serina-protease, 679
- Inibidores da ECA. *Ver* Inibidores da enzima conversora da angiotensina
- Inibidores da enzima conversora da angiotensina, 513
- Inibidores da transdução do sinal, 740t
- Inibidores de tirosina-cinase, 740
- Inibidores enzimáticos, fármacos como, 85
- Inibidores fortemente ligados, 83
- Inibir a fertilização, 579
- Iniciação
 na síntese de DNA, 384f, 386f
 na síntese de RNA, 396, 398
 na síntese proteica, 419, 420f
- Iniciação da cadeia. *Ver também* Iniciação no ciclo de transcrição, 396f, 399f
- Iniciativa de função enzimática, identificação de proteínas desconhecidas, 104-105
- Inositol-hexafosfato (ácido fítico), absorção de cálcio afetada por, 541
- Inositol-trifosfato, 216
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
 na quimiotaxia, 702
- Inr. *Ver* Sequência iniciadora
- Inserção cotraducional, 615f, 616, 618
- Inserção do potencializador, 726, 726t
- Inserção do promotor, 726, 726t, 727f
- Instabilidade cromossômica, 731, 731f
- Instabilidade dos microssatélites, 378, 731
- Instabilidade genômica das células neoplásicas, 731-732
- Insuficiência cardíaca, 217, 647
 na deficiência de tiamina, 555
- Insuficiência pancreática, na deficiência de vitamina B₁₂, 558
- Insulina, 140, 502, 623
 ácidos graxos livres afetados por, 254, 262
 armazenamento de, 515t
 deficiência de, 194. *Ver também* Diabetes melito
 ensaio biológico para medir, 746, 747t
 fosforilase b afetada por, 180
 início da síntese proteica afetado por, 422, 422f
 metabolismo do tecido adiposo afetado por, 262
 na glicólise, 169
 na regulação da glicemia, 192
 na regulação da lipogênese, 237
 na regulação da lipólise, 237, 262, 262f, 263f
 nas reservas de combustível metabólico, 148
 no transporte de glicose, 487
 radioimensaio para medir, 746, 747t
 secreção pelo pâncreas de coelho, 753t
 síntese, 512
 transmissão do sinal por cascatas de cinases, 526, 527f
- Integração cromossômica, 379-380, 380f
- Integração sítio-específica, 380
- Integrinas
 leucócitos, 702-703, 703t
 neutrófilos, 702-703, 703t
 plaquetas, 702-703, 703t
- Interação hormônio-receptor, 518
- Interações célula a célula, 477
- Interações celulares leucócito-endotélio, 579
- Interações DNA-proteína, bacteriófago lambda como paradigma para, 433-437, 433f, 436f
- Interações hidrofóbicas, 8, 360

- Interações proteína-DNA, bacteriófago lambda como paradigma para, 433-437, 433f, 436f
- Interferons, 706
- Interleucina 6 (IL-6), 677
- Interleucinas, 690, 706
- Intermediário do estado de transição tetraédrico, na catálise acidobásica, 64
- Interrupção do alongamento, 614
- Interrupção/*knockout* do gene-alvo, 464-465
- Interrupção/*knockout* gênico, direcionado, 464
- Intervalo QT, congenitamente longo, 496f
- Intestino delgado, digestão de monossacarídeos no, 538
- Intolerância à frutose, hereditária, 205
- Intolerância ao leite (lactose), 152, 537, 538
- Intoxicação por amônia, 291-292
- Intoxicação por chumbo, inibição da ALA-desidratase e, 325
- Intoxicação por cobre, 676. *Ver também* Doença de Wilson
- Íntrons (sequências intervenientes), 376, 376f, 380, 407, 413, 469
- remoção do transcrito primário, 407f
- Inulina, 156-157
- Invasão de células neoplásicas em vaso sanguíneo ou linfático, 736
- Iodeto/iodo, 562
- 5-Iodo-2'-desoxiuridina, 344f
- Iodopsina, 547
- 5-Iodouracila, 344
- Íon amônio, valor de pK/pK_a do, 13t
- Ionização por *electrospray*, 31, 32f
- na espectroscopia de massas, 33
- Ionóforos, 134, 489-490
- Íons mercúrio, metabolismo do piruvato afetado por, 174
- Íons metálicos, em reações enzimáticas, 62
- IP₃. *Ver* Inositol-trifosfato
- IPTG. *Ver* Isopropiltiogalactosídeo
- IRES. *Ver* Sítio interno de entrada no ribossomo
- Isoaspartil-metiltransferase, 763f
- Isocitrato-desidrogenase, 163, 163f
- na produção de NADPH, 234, 235f
- Isoenzimas. *Ver* Isozimas
- Isolantes, 443-444
- lipídeos apolares como, 212
- Isoleucina, 16t
- catabolismo de, 309, 310f, 311f
- interconversão de, 285
- necessidades para, 544
- Isomaltose, 157t
- Isomerases, 61
- Isomerismo
- de açúcares, 153-154, 154f
- geométrica, de ácidos graxos insaturados, 213, 215f
- Isomerismo d, 153, 154f
- Isomerismo de esteroides, 218-219, 218f
- Isomerismo geométrico, de ácidos graxos insaturados, 213, 215f
- Isomerismo l, 153, 154f
- Isopentenil-difosfato, na síntese de colesterol, 267, 268f
- Isoprenoides, síntese de, 267, 268f
- na síntese de colesterol, 269f
- Isopropiltiogalactosídeo, 431
- Isoprostanos (prostanoides), 213, 220
- via da cicloxigenase na síntese de, 240-241, 241f
- Isótopos, 684
- Isótopos. *Ver* tipos específicos
- Isovaleril-CoA-desidrogenase, 300t
- na acidemia isovalérica, 309
- Isozimas, 66
- Isquemia, 168, 496
- J**
- Janela de diagnóstico, 68
- Junção de extremidades não homólogas de DNA, 389, 390f
- Junções aderentes, 484
- Junções comunicantes, 494, 494f
- diagrama esquemático de, 494f
- Junções de oclusão, 484
- Juntar espontaneamente, 630
- K
- k. *Ver* Constante de velocidade
- K. *Ver* Potássio
- K_{cat} . *Ver* Constante catalítica
- K_{cat}/K_m . *Ver* Eficiência catalítica
- K_d . *Ver* Constante de dissociação
- K_{eq} . *Ver* Constante de equilíbrio
- Kernicterus, 332
- K_m . *Ver* Constante de Michaelis
- K_{pr} . *Ver* Produto iônico
- Kwashiorkor, 281, 541, 542-543
- L**
- l(+)-3-Hidroxiacil-CoA-desidrogenase, 225, 225f
- Lactação, cetose na, 149
- Lactase, 152, 538
- deficiência de (lactose/intolerância ao leite), 537
- Lactato
- glicólise anaeróbia e, 168, 170f, 171-172
- hipóxia e, 171-172
- Lactato-desidrogenase, 40, 42f, 321f
- na glicólise anaeróbia, 171
- isozimas, 69
- importância diagnóstica das, 68t, 69, 69f
- Lactoferrina, 704t
- Lactose, 152, 156, 157f, 157t, 203
- galactose na síntese de, 203, 203f
- intolerância à, 152, 537, 538
- metabolismo da, hipótese óperon e, 430-433, 430f
- Lactose-sintase, 203, 203f
- Lactulose, 157t
- LAD II (deficiência de adesão leucocitária II), 580
- Lâmina beta paralela, 39
- Lâmina β , 39
- Lâmina β antiparalela, 39, 39f
- Laminas, 666
- Lâminas basais, 634
- Lâminas de química seca, 596
- Laminina, 634
- célula interagindo, representação esquemática de, 634f
- L-Aminoácidos em proteínas, 19-20
- papéis metabólicos, 19
- Langerhans, insulina produzida pelas ilhotas de, 192
- Lanosterol, na síntese do colesterol, 267, 268, 269, 269f
- LBD. *Ver* Domínio de ligação ao ligante
- LCAT. *Ver* Lecitina:colesterol-aciltransferase
- LCR. *Ver* Regiões de controle do *locus*
- LDL. *Ver* Lipoproteínas de baixa densidade
- LEC. *Ver* Líquido extracelular
- Lecitina:colesterol-aciltransferase, 249, 258f, 259, 272
- deficiência hereditária de, 275t
- Lecitinas, 159, 215, 217f, 572. *Ver também* Fosfatidilcolinas (lecitinas)
- assimetria de membrana e, 482
- exemplos/comentários, 572f
- metabolismo de, 249f
- plantas, 572t
- síntese de, 246, 246f, 247f
- Lei de Coulomb, 7
- Leis da termodinâmica, 113-114
- interações hidrofóbicas e, 8
- Leitores de códigos, 437
- Lente do olho, frutose e sorbitol na, catarata diabética e, 205
- Leptina, 261
- Lesão celular (citotoxicidade), 587, 587t
- Lesão celular, papel de EROs na, 693
- Lesão redox mitocondrial, 760
- Lesões do DNA, 761
- Leucemias, 699, 700
- Leucina, 16t
- catabolismo de, 309, 310f
- interconversão de, 285
- necessidades para, 544
- Leucócitos, 579, 701-703
- comunicação através de efetores, 706
- polimorfonucleares, 701
- renovação, 757t
- Leucócitos, 700-707. *Ver também* tipo específico
- integrinas em, 702-703, 703t
- regulação, 701
- Leucócitos polimorfonucleares, 701
- Leucodistrofia, metacromática, 251t
- Leucodistrofia metacromática, 251t
- Leucopenia, 700
- Leucotrienos, 213, 214f, 239, 240, 242, 706
- leucotrieno A₄, 214f
- significado clínico de, 240
- via da lipoxigenase na formação de, 240, 241f, 243f
- Leucovorina, 559
- L-Glicose, 154f
- L-Glutamato-descarboxilase, 320, 321f
- L-Gulonolactona-oxidase, 200
- Liasas, 61
- LIC. *Ver* Líquido intracelular
- L-Iduronato, 154-155, 156f
- Ligação, 469
- Ligação ao molde, na transcrição, 397
- Ligação cooperativa
- equação de Hill descrevendo, 81
- hemoglobina, 55
- efeito Bohr na, 56
- Ligação da N-acetilgalactosamina à serina, 573f
- Ligação de extremidades adesivas/DNA de extremidades adesivas, 452, 453f
- Ligação de extremidades cegas/DNA de extremidade cega, 453
- Ligação heme, 673
- Ligação isoaspartil no esqueleto de polipeptídeos, 763f
- Ligação N-glicosídica, 573
- Ligação O-glicosídica, 573, 628
- Ligações. *Ver* tipos específicos

- Ligações covalentes, 7t
interação lipídeos-proteínas de membrana e, 481
moléculas biológicas estabilizadas por, 7-8
- Ligações Cro, 435
- Ligações cruzadas, 649, 652f, 660
- Ligações cruzadas covalentes, 628
- Ligações cruzadas proteína-proteína e glicação proteica, 762f
- Ligações de anidridos ácidos, 340
- Ligações de hidrogênio, 7, 7f
no DNA, 360, 361, 361f
velocidade da reação catalisada por enzimas afetada por, 78
- Ligações dissulfeto, nas quimiocinas, 702, 702f
- Ligações entre sais (eletrostáticas), 8
ligação com o oxigênio rompendo, prótons do efeito Bohr e, 56f
- Ligações fosfodiéster, 344-345
- Ligações peptídicas, 23. *Ver também* Peptídeos
formação de, 9, 422
hidrólise de, 756-757
nas conformações secundárias, 37-38, 37f
natureza de ligação dupla parcial das, 23, 23f
- Ligações/interações eletrostáticas, 8. *Ver também*
Ligações entre sais (eletrostáticas)
- Ligases, 61, 619
- Limiar renal para a glicose, 193
- LINE. *Ver* Sequências repetitivas intercaladas longas
- Linfócitos, 706-707. *Ver também* Linfócitos B:
Linfócitos T
- Linfócitos B, 706-707
- Linfócitos T, 681, 706
- Linfoma de Burkitt, translocação recíproca no, 727f
- Linha Z, 648, 649f
- Linhas, definição de, 469
- Lipase gástrica, 539
- Lipase hepática, 257
deficiência de, 275t
no consumo de quilomícrons remanescentes, 257, 257f
- Lipase lingual, 539
- Lipase pancreática, 539
- Lipase sensível a hormônios, 262, 262f
insulina afetando, 262
- Lipases
importância diagnóstica das, 68t
na digestão, 539
no metabolismo de triacilgliceróis, 246, 262, 262f, 539
- Lipídeos, 212-221. *Ver também* tipo específico
ácidos graxos, 212-215
anfipáticos, 220-221, 221f
assimetria de, organização da membrana e, 624, 624f
classificação de, 212
complexos, 212
derivados, 212
digestão e absorção de, 538-539, 540f
distúrbios associados a anomalias de, 496
em membranas, 479-481
esteroides, 218-219, 218f, 219f
fosfolipídeos, 212, 215-217, 216f
glicolipídeos, 212, 218, 218f
interconvertibilidade de, 148
metabolismo de, 140-141, 141f, 143, 143f.
Ver também Lipólise
no estado alimentado, 148
no fígado, 259-260, 260f
neutros, 212
peroxidação de, 219-220, 220f
precursores, 212
proporção de proteínas em relação a, na membrana, 478-479, 478f
simples, 212
taxa de reposição de, membranas e, 624-625
transporte e armazenamento de, 254-255
aspectos clínicos de, 260-261
como lipoproteínas, 254-255, 254t, 255f
deficiência de ácidos graxos e, 241
fígado no, 259-260, 260f
tecido adiposo e, 261, 262f
tecido adiposo marrom e, 264, 264f
triacilgliceróis (triglicerídeos), 215, 216f
- Lipídeos anfipáticos, 220-221, 221f
em lipoproteínas, 254-255, 255f
em membranas, 220-221, 221f, 479-480, 479f
- Lipídeos de membrana
esteróis, 479
formação de bicamada, 480-481, 480f, 481f
fosfolipídeos, 479
glicosíngolipídeos, 479
natureza anfipática dos, 479-480
- Lipídeos neutros, 212
- Lipidômica, 3
- Lipídoses (distúrbios do armazenamento de lipídeos), 251
- Lipogênese, 142, 143, 148, 232-236, 233f, 234f, 261, 264
acetil-CoA para, 234-235
complexo ácido graxo-sintase em, 233-234, 233f, 234f
NADPH para, 234, 235f
produção malonil-CoA em, 233, 233f
regulação da, 236-238, 237f
enzimas na, 188t, 233-234, 237
estado nutricional na, 236
mecanismos de curto e longo prazo na, 236-238
- Lipólise, 143, 143f, 261-264. *Ver também*
Lipídeos
hormônios afetando, 262-263, 263f
insulina afetando, 237
lipase sensível a hormônios na, 261-262, 262f
triacilglicerol, 246
- Lipoproteína lipase, 143, 143f, 257, 257f, 258f, 637
deficiência hereditária de, 275t
envolvimento na captação de remanescentes, 258
- Lipoproteínas, 37, 143, 253-265, 254t, 255f, 669, 672t. *Ver também* tipo específico
carboidratos em, 159
classificação das, 254, 254t
deficiência de, esteatose hepática e, 261
distúrbios das, 275-276, 275t
no transporte de colesterol, 271-272, 272f
remanescentes, 254t, 257f, 258
captação hepática de, 258
- Lipoproteínas de alta densidade, 254t, 255
apolipoproteínas de, 254t, 255
aterosclerose e, 259, 274
ciclos, 259
metabolismo de, 258-259, 258f
proporção em relação a lipoproteínas de baixa densidade, 274
receptor para, 258f, 259
- Lipoproteínas de baixa densidade, 254t, 255, 267, 271
apolipoproteínas de, 254t, 255
metabolismo de, 257f, 258
proporção em relação a lipoproteínas de alta densidade, e aterosclerose, 274
receptores para, 258
na inserção cotraducional, 616, 617f
no consumo de quilomícrons remanescentes, 257f, 258
- Lipoproteínas de densidade intermediária, 254t, 258, 272
- Lipoproteínas de densidade muito baixa, 143, 253-254, 254t, 272, 274
metabolismo de, 143, 143f, 255-258, 257f
no estado alimentado, 148
no transporte de triacilglicerol, 256f, 257f
secreção hepática de, estado dietético e hormonal e, 259-260, 260f
- Lipoproteínas plasmáticas. *Ver* Lipoproteínas
 α -Lipoproteínas. *Ver também* Lipoproteínas de alta densidade
deficiência familiar de, 275t
- β -Lipoproteínas, 255. *Ver também* Lipoproteínas de baixa densidade
- Lipossomos, 482
lipídeos anfipáticos formando, 220-221, 221f
membranas artificiais e, 482-483
- Lipoxigenase, 240, 243f
espécies reativas produzidas por, 220
- 5-Lipoxigenase, 240, 243f
- Lipoxinas, 213, 214f, 239, 240
significado clínico das, 242
via da lipoxigenase na formação de, 240, 241f, 243f
- Líquido extracelular, 478, 478t
- Líquido intracelular, 478, 478t
- Lise, complemento na célula, 685
- Lisil-hidroxilases, 638
deficiências de, 631
na síntese de hidroxilisina, 285
- Lisil-oxidase, 628, 631
- Lisina, 17t
catabolismo de, 306, 306f
necessidades para, 544
pI da, 20-21, 21f
- Lisina-hidroxilase, vitamina C como coenzima para, 562
- Lisinas-acetiltransferases, 94
- Lisofosfatidilcolina, 217, 217f
- Lisofosfolipase, 249, 249f
- Lisofosfolipídeos, 217, 217f
- Lisolecitina, 217, 217f, 249, 249f
- Lisossomos, 581
entrada de proteína nos, distúrbios associados a defeitos em, 619t, 625
na endocitose, 492
- Lisozima, 40f, 704t
- Lítio, 562t
- LMM. *Ver* Meromiosina leve
- LMWHs. *Ver* Heparinas de baixo peso molecular
- Locus operador, 430f, 431
- Lógica simbólica, em mapas de interação molecular, 107-108, 108f
- Longevidade vs. tempo de vida, 756
- LRP. *Ver* Proteína relacionada ao receptor de LDL
- L-Triptofano-dioxigenase (triptofano pirrolase), 123
- LTs. *Ver* Leucotrienos
- Lubrificar, 574
- Lúpus, 700

- Luz, fonte de energia no transporte ativo, 490
Luz do sol. *Ver* Luz ultravioleta
Luz ultravioleta
absorção por nucleotídeos de, 342-343
síntese de vitamina D e, 552
L-Xilulose, 155*t*
acúmulo de, na pentosúria essencial, 205
LXs. *Ver* Lipoxinas
- M**
- Macrófagos, 701, 706
 α_2 -Macroglobulina, 679-680, 706, 717
Macromoléculas, transporte celular de, 492-493, 492*f*, 495*f*
Magnésio, 562*t*
na clorofila, 323
nos líquidos extracelular e intracelular, 478, 478*t*
Malária, 581
Malato, 163*f*, 164
Malato-desidrogenase, 163*f*, 164
MALDI. *Ver* Dessorção e ionização à laser assistida por matriz (MALDI)
Maleilacetato, no catabolismo de tirosina, 304, 305*f*
Malonato
inibição da succinato-desidrogenase por, 82
na cadeia respiratória, 132, 132*f*
Malonil-CoA, na síntese de ácidos graxos, 233, 233*f*
Malonil-transacilase, 233, 233*f*, 234*f*
Maltase, 538
Maltose, 156, 157*f*, 157*t*
Manganês, 562*t*
Manosamina, 203, 204*f*
Mapa de restrição, 463
Mapa do haplótipo (HapMap), 102
Mapas de interação molecular (MIMs), 107-108, 108*f*
Mapeamento gênico, 376
MAPs. *Ver* Proteínas associadas aos microtúbulos
Marasmo, 113, 281, 541, 542-543
Marcação GST (glutathione S-transferase), no estudo de enzimas, 70*f*
Mastócitos, 700, 706
MAT. *Ver* Metionina-adenosiltransferase
Matriz
extracelular. *Ver* componente específico mitocondrial, 127, 162
Matriz extracelular. *Ver também* Matriz: componentes específicos
fibronectina, 633-634
papel na metástase, 736
processo de envelhecimento, 627
proteínas estruturais, 627
proteoglicanas, 627
tecido conectivo, 627
Matriz mitocondrial, 610, 611*f*
Maturação de cisternas, 623
MBP. *Ver* Proteína de ligação à manana
MEC. *Ver* Matriz extracelular
Mecanismo “pingue-pongue”, na difusão facilitada, 487, 488*f*
Mecanismo de alteração da ligação, 131
Mecanismos de reparo e de verificação para o DNA, 762-764
Mecanismos de reparo molecular, teoria do envelhecimento de uso e desgaste
dano proteico, 763
mecanismos de revisão e reparo, 762-763
mecanismos enzimáticos e químicos, 762
Mecanismos enzimáticos e espécies reativas de oxigênio (EROs), 762
Mecanismos epigenéticos
fatores envolvidos em, 735*f*
no câncer, 735-736
no controle da transcrição gênica, 438-439
Mecanismos especiais de translocação, 611
Mecanismos químicos e espécies reativas de oxigênio (EROs), 762
Medicamentos anticâncer
alvos dos, 741*f*
efeitos colaterais dos, 741
Medicamentos antifolato, síntese de nucleotídeos purínicos afetada por, 348
Medicamentos antimaláricos, inibidores de folato como, 559
Medicamentos hipolipidêmicos, 275
Medicina
preventiva, pesquisa bioquímica afetando, 3
relação com a bioquímica, 2-3, 2*f*
Medicina clínica. *Ver também* Exames laboratoriais
importância dos exames laboratoriais na, 589
Medicina forense
números variáveis de unidades repetidas em tandem na, 464
polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição na, 463
Medicina planejadora, desafios da, 99
Medicina preventiva, pesquisa bioquímica afetando, 3
Medula óssea, síntese do grupo heme na, 325
Meia-vida
enzima, 288
proteína, 288
proteína plasmática, 671
MELAS, 135
Melatonina, biossíntese e metabolismo de, 319*f*
Membrana celular. *Ver* Membrana plasmática
Membrana glomerular, 634
Membrana mitocondrial externa, 127, 610
inserção de proteínas na, 610
Membrana mitocondrial interna, 127, 610
inserção de proteínas na, 610
Membrana plasmática, 477-496, 624. *Ver também* Membranas
carboidratos na, 159
mutações na, doenças causadas por, 496, 496*t*
Membranas, 477-496
aparelho de Golgi na síntese de, 608
artificiais, 482-483
assimetria de, 479, 482
bicamadas de, 480*f*, 481
associação de proteínas de membrana e, 481
biogênese de, 624-625, 624*f*, 625*t*
colesterol em, 479
modelo do mosaico fluido e, 484
despolarização de, na transmissão do impulso nervoso, 491
esteróis em, 479
estrutura de, 478-482, 478*f*
assimetria e, 482
modelo do mosaico fluido de, 483-484, 483*f*
fluidez afetando, 484
fosfolípidos em, 215-217, 217*f*, 479, 479*f*
glicosíngolípídeos em, 479
intracelulares, 478
lípidos em, 220-221, 221*f*, 479-480, 480*f*. *Ver também* Lípidos de membrana
mutações afetando, doenças causadas por, 496, 496*t*
plasmáticas. *Ver* Membrana plasmática
proporção proteína:lípido em, 478-479, 478*f*
proteínas em, 481, 489*t*. *Ver também* Proteínas de membrana
seletividade de, 485-490, 485*f*, 485*t*, 488*f*, 489*t*
Membranas artificiais, 482-483
Membranas celulares, proteínas de, 569
Membranas intracelulares, 477
Membranas mitocondriais
enzimas como marcadores de compartimentos separados por, 127
estrutura de, 127, 127*f*
inserção de proteínas em, 616
Menadiol, 554, 554*f*
Menadiol diacetato, 554, 554*f*
Menadiona, 554. *Ver também* Vitamina K
Menaquinona, 554, 554*f*. *Ver também* Vitamina K
MEOS. *Ver* Sistema microsomal de oxidação do etanol dependente do citocromo P450
6-Mercaptopurina, 344, 344*f*
Meromiosina
leve, 650
pesada, 650
Meromiosina leve, 650
Meromiosina pesada, 650
Metabolismo, 114, 139-150, 150*t*. *Ver também* Catalise/reações catalíticas (enzimáticas): Via metabólica/fluxo de metabólitos: tipos específicos
circulação sanguínea e, 141*f*, 142-143, 143*f*
compartimentalização e, 88-89
controle de qualidade e, 89-90
de medicamentos, *in vivo*, 85
erros inatos do, 2, 297
integração do, combustíveis metabólicos e, 141-145
modificação covalente e, 90, 92, 93*f*
no nível subcelular, 144-145, 144*f*
nos níveis dos tecidos e órgãos, 141*f*, 142-143, 150*t*
reações de transferência de grupo no, 9
reações limitadoras de velocidade e, 89
regulação alostérica e, 90-91, 90*f*, 145, 146*f*
regulação de, 88*f*, 89, 145, 146*f*
enzimas na, 145, 146*f*
mecanismos alostéricos e hormonais na, 90-91, 90*f*, 145, 146*f*
Metabolismo da glicose, 140, 141*f*, 169-171, 170*f*, 172*f*, 190, 191*f*. *Ver também* Gliconeogênese: Glicólise
Metabolismo de aminoácidos, doenças metabólicas do, 300*t*
Metabolismo de fármacos, *in vivo*, 85
Metabolismo de fosfatidilinosítídeo e ação hormonal dependente de cálcio, 525-526
Metabolismo do acilglicerol, 245-252
aspectos clínicos do, 250-251
catabolismo, 246-250
síntese, 246-250, 246*f*
no retículo endoplasmático, 144*f*, 145
Metabolismo do cálcio, 524

- Metabolismo do iodo
 e síntese de hormônios, 510-511
 no folículo da tireoide, 510-511, 511f
- Metabolismo do α -aminobutirato, 320, 321f
- Metabolismo heme, distúrbios genéticos do, 329
- Metabólitos polares, 583
- Metabolômica, 3, 465
- Metacrilil-CoA, catabolismo de, 311f
- Metaloenzimas, 62
- Metalo flavoproteínas, 120
- Metaloproteínas, 37
- Metástase, 569, 738t
 anormalidades da membrana e, 496t
 e câncer, 736-738
 esquema simplificado de, 737f
 genes potencializando, 738
- Metemoglobina, 57-58, 417, 692
- Metemoglobinemia, 57, 692-693, 693t
- Metilação, 587
 na modificação covalente, aumentos de
 massa e, 31t
- Metilação de bases de citosina, 735
- β -Metilaminoalanina, 19t
- Metilases de DNA sítio-específicas, 452
- 5-Metilcitosina, 342, 342f
- Metileno tetra-hidrofolato, 559-560, 560f
 no sequestro do folato, 559-560
- 7-Metilguanina, 342f
- Metil-histidina na doença de Wilson, 315
- Metilmalonicacidúria, 187
- Metilmalonil-CoA, acúmulo de, na deficiência
 de vitamina B₁₂, 558
- Metilmalonil-CoA-isomerase (mutase), no
 metabolismo do propionato, 186f, 187,
 187f, 558
- Metilmalonil-CoA-mutase (isomerase), 187, 187f, 558
- Metilmalonil-CoA-racemase, no metabolismo
 do propionato, 187, 187f
- Metilpentose, em glicoproteínas, 159t
- Metiltetra-hidrofolato, no sequestro do folato,
 559-560
- Metionil-tRNA iniciador, 419
- Metionina, 17t, 315, 316f
 ativa (S-adenosilmetionina), 308, 308f,
 315-316, 316f, 343, 343f, 344t
 catabolismo de, 308, 308f, 309f
 necessidades para, 544
 no sequestro do folato, 558f
- Metionina-adenosiltransferase, 300t, 315-316, 316f
- Metionina-sintase, 558
- Método de Sanger para sequenciamento de
 polipeptídeos, 29
- Método enzimático manual, 457
- Metotrexato, 353-354, 559
 di-hidrofolato/di-hidrofolato-redutase afetada
 por, 353-354
- Mevalonato, síntese de, 267, 268f
 na síntese de colesterol, 267f, 268f
- Mg. *Ver* Magnésio
- Micelas, 480, 480f, 481
 lipídeos anfipáticos formando, 220-221, 221f,
 480, 480f
 na absorção de lipídeos, 539
- Microalbuminúria, 597
- Microfibrilas, 632
- Microfilamentos, 665
- β_2 -Microglobulina, 676-677
- Micronutrientes, 546-563. *Ver também*
 micronutrientes específicos
 vitaminas. *Ver* Vitaminas
- MicroRNAs (miRNAs), 368, 447-448
- Microscopia crioeletrônica, 44
- Microtúbulos, 622, 665
 representação esquemática de, 665f
- Microvesículas, 494
- Microvilosidades, 484
- Mielodisplasia, 692
- Mielofibrose, 700
- Mieloma, 685
- Mieloma múltiplo, 685
- Mieloperoxidase, 704t
 em neutrófilos, 705
- Migração celular, 634
- Minerais, 3, 546-563
 consumo de nutrientes de, 548t-549t
 digestão e absorção de, 541, 542f
- Mineralocorticoides, 503, 504f
- Miocardiopatia dilatada, 659
- Miocardiopatia hipertrófica hereditária,
 658-659, 659f
- Miocardiopatias, 647, 657-658
- Miocinase (adenilato-cinase), 117
 na regulação da gliconeogênese, 189
- Miofibrilas, 648, 648f
- Mioglobina, 58
 curva de dissociação do oxigênio para, 53
 oxigênio armazenado pela, 52
- Mioglobinúria, 58
- Miopatia, por defeitos mitocondriais
 hereditários, 127
- Miopatia mitocondrial infantil fatal e disfunção
 renal, 135
- Miosina, 648, 651
 estrutura e função da, 648
 na contração muscular, 648-649, 651-655
- Miotonia congênita, 658t
- Miristilação na modificação covalente, aumentos
 de massa e, 31t
- miRNAs e pequenos RNAs interferentes
 (siRNAs), 368
- MIT. *Ver* Monoiodotirosina
- Mitocôndrias
 apoptose em, 760-761
 cadeia respiratória nas. *Ver* Cadeia respiratória
 ciclo do ácido cítrico em, 140-141, 141f, 143f,
 144-145, 144f, 162, 166-167, 166f
 envolvimento no câncer, 738
 oxidação de ácidos graxos nas, 223-224, 224f
 síntese de ALA em, 324f, 325
 síntese proteica e importação por, 608t, 610
 transporte de fosfato de alta energia a partir
 de, 135, 135f
 transporte de íons nas, 134
- Mitocôndrias humanas, genes codificados pelo
 genoma de, 760t
- ML. *Ver* Mucopolidose
- MOAT. *Ver* Transportador de ânion orgânico
 multiespecífico
- Modelagem molecular, na análise da estrutura
 proteica, 44
- Modelo chave e fechadura, 64
- Modelo de encaixe induzido, 64, 64f
- Modelo de pontes cruzadas de filamento deslizante,
 da contração muscular, 648-649
- Modelo do mosaico fluido, 483-484, 483f
- Modificação covalente
 espectrometria de massas na detecção de, 31, 31t
 na regulação da catálise enzimática, 90,
 92, 93f. *Ver também* Fosforilação, de
 proteínas: Proteólise
- fluxo de metabólitos e, 92
 irreversível, 92, 93f
 regulação da gliconeogênese e, 188
 reversível, 92, 93f, 94t
- Modificação covalente de histonas, 437
- Modificações covalentes irreversíveis,
 92, 93f
- Modificações covalentes reversíveis, 93-94,
 93f, 94t. *Ver também* Fosforilação, de
 proteínas
- Modificações pós-traducionais, 16
 de aminoácidos, 18, 18f
 de histonas, 735
- Moléculas anfipáticas e dobramento, 8
- Moléculas de adesão celular, 736, 738t
- Moléculas do MHC de classe I, 620
- Moléculas pró-inflamatórias, 579
- Moléculas quiméricas, 452-454, 468
- Moléculas Rab, 622
- Molibdênio, 562t
- 2-Monoacilgliceróis, 247f
- Monoacilglicerol aciltransferase, 246, 247f
- Monócitos, 700, 701
- Monofosfato de adenosina. *Ver* AMP
- Monofosfato de citidina, 341t, 571
- Monofosfato de guanosina. *Ver* GMP
- Monofosfato de inosina (IMP)
 conversão em AMP e GMP, 348, 349f
 regulação por retroalimentação da, 351,
 351f
 síntese de, 348-350, 349f, 350f
- Monofosfato de orotidina (OMP), 353f
- Monofosfato de timidina (TMP), 341t
- Monofosfato de uridina (UMP), 341t, 342f
- Monoiodotirosina, 510
- Mononucleotídeos, 340
 reações de "salvamento" e, 349f, 350
- Monossacarídeos, 152-153, 153-154. *Ver também*
 tipo específico: Glicose
 absorção de, 537, 538
 importância fisiológica de, 154-155, 155t
- Monóxido de carbono
 catabolismo do grupo heme produzindo, 330
 na cadeia respiratória, 132, 132f
 na fosforilação oxidativa, 127
- Monoxigenases, 123. *Ver também* Sistema do
 citocromo P450
- Mortalidade e envelhecimento, 756
- Morte celular, 248, 250
- Motivo zíper de leucina, 445
- Motivos hélice-alça-hélice, 39
- Motivos ligadores de DNA e fatores de
 transcrição, 444-445, 444t
- Movimento de elétrons, no transporte ativo, 490
- Movimento de força, 652
- Movimento transverso, de lipídeos através
 da membrana, 482
- MPO. *Ver* Mieloperoxidase
- MPSs. *Ver* Mucopolissacarídeos
- mRNA. *Ver* RNA mensageiro
- mRNA de eucariotos, estrutura do, 449f
- mRNA policistrônico, 430
- MstII, 452t
 na anemia falciforme, 462f
- mtDNA. *Ver* DNA mitocondrial
- Mucinas, propriedades das, 574t
- Mucinas ligadas à membrana, 574
- Mucopolidose, 639
- Mucopolissacarídeos, 157, 159f
- Mucopolissacarídeos, 627, 638, 639t

- Mucoproteínas, 574. *Ver também* Glicoproteínas
- Mulheres, necessidades de ferro das, 673
- Músculo. *Ver também* *Músculo cardíaco*:
Músculo esquelético
 ATP no, 647-648, 657
 captação de glicose para, 148
 contração do. *Ver* *Contração muscular estriado*, 648
 fibras no, 648f
 fosforilase no, controle de, 179-180
 glicogênio no, 176-178, 177t
 no estado de jejum, 148-149
 metabolismo no, 141f, 143, 150t
 glicogênio, 176-178
 produção de lactato e, 171-172
 na transdução de energia, 647-649
 no estado de jejum, 148-149
 proteínas do. *Ver* *Actina*: *Miosina*: *Titina*
- Músculo cardíaco*, 653
 canais de cálcio no, 656-657
 semelhante ao músculo esquelético, 656-657
- Músculo esquelético*, 653, 663. *Ver também*
Músculo: *Contração muscular*
 assemelha-se ao músculo cardíaco, 656-657
 bioquímica, aspectos da, 663t, 664t
 características do, 663t
 glicogênio, suprimentos de, 662
 metabolismo no, 141f, 143
 produção de lactato e, 171-172
 reserva de proteína, 663-664
 reservas de glicogênio no, 662
- Músculo estriado*, 649f, 652-653. *Ver também*
Músculo cardíaco: *Músculo esquelético*
 interações actina-miosina no, 660t
- Músculo liso*, 653
 contração de
 cálcio na, 659
 fosforilação de cadeia leve de miosina na, 659
 regulação com base em miosina da, 659
 interações actina-miosina no, 660
 regulação da contração por cálcio, 659f
 relaxamento, cálcio em, 660
- Mutação constitutiva, 430
- Mutações, 57-58, 377, 381f, 614, 726t
 afetando ciclinas e CDKs, 731
 alterações na sequência de nucleotídeos do mRNA causando, 418f
 constitutivas, 430
 conversão gênica e, 380
 de mudança de fase, 418-419, 418f
 de proteínas de membrana, doenças causadas por, 496, 496t
 de transição, 416, 416f
 de transversão, 416, 416f
 de troca de sentido, 416-417, 417-418, 417f
 miocardiopatia hipertrófica hereditária causada por, 658, 659f
 espontâneas, 724
 integração e, 379-380, 380f
 recombinação e, 379, 379f
 sem sentido, 418-419
 substituição de bases, 416-417, 416f
 supressoras, 418-419
 transposição e, 380
 trocas entre cromátides-irmãs e, 380, 381f
- Mutações de mudança de fase, 417-418
- Mutações de transição, 416, 416f
- Mutações de transversão, 416, 416f
- Mutações de troca de sentido, 417-418, 417f
 miocardiopatia hipertrófica hereditária causada por, 658, 659f
- Mutações espontâneas, 724
- Mutações HFE, na hemocromatose, 676
- Mutações pontuais, 416, 460, 726
- Mutações sem sentido, 418-419
- Mutações silenciosas, 416
- Mutações supressoras, 418-419
- Mutagênese, sítio-dirigida, no estudo de enzimas, 71
- Mutagênese sítio-dirigida, no estudo de enzimas, 71
- MYC (oncogene), 728t
- N**
- Na. *Ver* *Sódio*
- Na⁺-K⁺-ATPase, 490-491, 491f
 no transporte de glicose, 492, 492f
- N-Acetilglutamato, na biossíntese da ureia, 293f, 295
- NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida adenina), 121, 553
 como coenzima, 121, 122f, 344t
 espectro de absorção de, 67-68, 67f
 no ciclo do ácido cítrico, 167
- NADH, 174f
 espectro de absorção de, 67-68, 67f
 na regulação da piruvato-desidrogenase, 173
 oxidação de ácidos graxos gerando, 225
 oxidação extramitocondrial de, transportes de substrato na, 134, 134f-135f
- NADH-desidrogenase, 121
- NADH-Q oxidorreductase, 127, 128, 128f
 como aceptor de elétrons, 127, 128f, 163f
- NADP⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida adenina-fosfato), 121, 555f
 como coenzima, 121, 122f, 344t
 na via das pentoses-fosfato, 197f, 198, 199f
- NADPH
 nas reações do citocromo P450, 124f
 papel em fornecer equivalentes redutores em células sanguíneas, 693
 para lipogênese, 234, 235f
 transidrogenase em, 134
 via das pentoses-fosfato e, 196, 197f, 200
- NADPH-oxidase, 704t
 componentes da, 704
 em células fagocíticas em repouso, 704
 mutações em genes para componentes de, 705
- Nanotecnologia, 3, 66
- Não edematoso. *Ver* *Marasmo*
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), 102
- NDPs. *Ver* *Ribonucleosídeos difosfatos*
- Nebulina, 655
- Necrose vs. apoptose, 733
- Neoplasma, 722
- NES. *Ver* *Sinais de exportação nuclear*
- NeuAc. *Ver* *Ácido N-acetilneuramínico*
- Neuraminidases, 571, 581
- Neurolatirismo, 19
- Neurônios, membranas de
 canais iônicos em, 488f
 impulsos transmitidos ao longo de, 491
- Neuropatia sensorial, no excesso de vitamina B₆, 558
- Neutrófilos, 700, 701
- adesão às células endoteliais, 702-703
- defesa corporal contra infecções bacterianas, 700-701
- enzimas e proteínas de, 703, 704t
- integrinas em, 702-703, 703t
- mieloperoxidase em, 705
- na captura de parasito, 705-706
- proteinases de, 704t, 706
- transmigração de, 579
- N-Glicosídeos, heterocíclicos, 340
- N-Glicosilação de glicoproteínas, 576t, 577
- β-N-Glutamilamino-propionitrila (BAPN), 19t
- Niacina, 556, 557f. *Ver também* *Nicotinamida*:
 Ácido nicotínico
 deficiência de, 557
 excesso/toxicidade de, 557
- Nicks/fechamento de nick, na replicação do DNA, 387, 387f
- Nicotinamida, 553
 coenzimas derivadas de, 62. *Ver também* *Niacina*
 desidrogenases e, 121, 122f
 excesso/toxicidade de, 556
- Níquel, 562t
- Nitrogênio de aminoácidos
 catabolismo do, 287-296
 L-aminoácido-oxidase, 120
 L-glutamato-desidrogenase no, 291, 292f
 no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 298-299, 298f, 299f, 301f
 no metabolismo do nitrogênio, 291, 291f
 produtos finais do, 290
 ureia como, 292-293, 293f
 transaminação do, 290-291, 290f, 291f
- Nitrogênio α-amino. *Ver* *Nitrogênio de aminoácidos*
- Nitroglicerina, 661
- Níveis de amônia no sangue e insuficiência hepática, 598, 598t
- Níveis séricos de tireoxina total, 598
- Nível do substrato, fosforilações no, 129f, 131
- NLS. *Ver* *Sinal de localização nuclear*
- NO. *Ver* *Óxido nítrico*
- Noradrenalina. *Ver também* *Catecolaminas*
 na termogênese, 264, 264f
 síntese de, 317, 320f
- Norepinefrina, biossíntese de, 509, 509f, 510
- NPCs. *Ver* *Complexos dos poros nucleares*
- NRAMP 1, 672
- NSF. *Ver* *Fator sensível à N-etilmaleimida*
- Nuclease dicer, 409
- Nuclease drosha-DGCR8, 409
- Nuclease S1, na tecnologia do DNA recombinante, 453t
- Nucleases, 9, 368
 bases de, 340, 341t
 cromatina ativa e, 374
 digestão de, 368
 não essenciais na dieta, 348
- Núcleo da célula, importinas e exportinas no, 609f, 612
- Núcleo esteroide, 218f, 219, 219f
- Núcleo lipídico, de lipoproteínas, 254-255
- Núcleo pentassacarídico, 575f
- Nucleófilo, água como, 9-10
- Nucleoplasma, 612f
- Nucleoproteínas, acondicionamento de, 375, 375t
- Nucleosídeos (fosforilases de nucleosídeos), purinas, deficiência de, 355

- Nucleosídeo difosfato-cinase, 118
 Nucleosídeos, 340-343, 341*t*
 Nucleosídeos difosfatos, 340, 341*f*
 Nucleosídeos trifosfatos
 análogos não hidrolisáveis de, 344, 345*f*
 na fosforilação, 118
 na transferência de fosfato de alta energia, 118
 potencial de transferência de grupo de, 343, 344*t*
 Nucleosídeos trifosfatos, 340, 341*f*
 Nucleossomos, 371-373, 372*f*, 403-404
 Nucleotídeos, 339-346, 340-343, 341*t*, 414, 414*t*
 adenilato-cinase na interconversão de, 118
 análogos sintéticos de, na quimioterapia, 343-344, 345*f*
 como ácidos polifuncionais, 342
 como coenzimas, 344*t*
 funções fisiológicas de, 343
 luz ultravioleta absorvida por, 342-343
 metabolismo de, 347-357
 mutações causadas por alterações em, 416*f*, 417-418, 417*f*, 418-419, 418*f*
 no mRNA. *Ver* Purina: Pirimidinas/
 nucleotídeos pirimidínicos
 polinucleotídeos, 344-345
 Números variáveis de unidades repetidas em *tandem*, 574
 na medicina forense, 464
 Nutrição, 537-544. *Ver também* Dieta lipogênese regulada por, 236
 pesquisa bioquímica afetando, 3
 Nutrientes antioxidantes, 564-568
 Nutrigenômica, 3
- O**
- Obesidade, 113, 140, 254, 537, 541
 em relação ao câncer, 742
 lipogênese e, 232
 Obstrução biliar, hiperbilirrubinemia/icterícia causada por, 333, 334*t*
 Octâmero de histonas, 371, 371*f*, 373
 Octâmeros, histona, 372*f*, 373
 O-Glicosilação, características de, 574*t*
 1,25(OH)₂-D₃. *Ver* Calcitriol (1,25[OH]₂-D₃)
 Olho, frutose e sorbitol no, catarata diabética e, 205
 O-Ligação, 573*f*
 Oligômeros, importação por peroxissomos, 612
 Oligomicina, na oxidação e fosforilação, 132, 132*f*
 Oligonucleotídeo
 definição de, 469
 na determinação da estrutura primária, 31
 Oligossacarídeos, 153
 envolvidos por membrana e circulantes, 574
 estruturas de, 575*f*
 O-ligados, estruturas de, 573*f*
 OMP (monofosfato de orotidina), 353*f*
 Oncogenes, 2-3
 ciclínas e, 389
 definição, 726
 e genes supressores de tumor, diferença entre, 728*t*
 mecanismos de ativação, 726, 726*t*
 papel dos produtos proteicos no desenvolvimento do câncer, 726-727, 728*f*
 papel no desenvolvimento do câncer colorretal, 728-730, 729*f*
 propriedades de, 728*t*
 vírus de tumor, 727
 Oncogenes virais. *Ver* Oncogenes
 Oncoproteínas, proteína Rb e, 389
 Oncovírus, ciclínas e, 389
 Operador da direita, 433-437, 436*f*
 Óperon *lac*, 430, 430*f*, 432*f*
 Óperon/hipótese óperon, 430-433, 430*f*
 Oponização, 703
 OR. *Ver* Operador da direita
 ORC. *Ver* Complexo de reconhecimento da origem
 ORE. *Ver* Elemento de origem da replicação
 Organismos autotróficos, 115
 Organismos heterotróficos, 115
 Organização da membrana, 614
 Origem da replicação (ori), 381-382, 382*f*, 468
 Ornitina, 19*t*, 314
 catabolismo de, 299, 301*f*
 metabolismo de, 317*f*
 na síntese de ureia, 292, 294
 Ornitina-δ-aminotransferase, 300*t*
 Ornitina-transcarbamoilase/L-ornitina deficiência de transcarbamoilase de, 295, 295*t*, 356
 na síntese de ureia, 294
 Orotato-fosforribosiltransferase, 353*f*, 354, 356
 Orotidinúria, 357
 Oscilação, 416
 Ossos
 distúrbios metabólicos/genéticos, afetados por, 642-643
 doenças metabólicas e genéticas, 642*t*
 proteínas principais, 640*t*
 tecido conectivo mineralizado, 640-642
 Ossos membranosos, 641*f*
 Osteoartrite, 627, 640
 Osteoblastos, 641*f*, 642
 Osteocalcina, 562
 Osteoclastos, 640
 na reabsorção óssea, 641*f*
 Osteogênese imperfeita (ossos de vidro), 282, 642
 Osteomalacia, 553
 Osteopetrose (doença dos ossos de mármore), 642-643
 Osteoporose, 553, 643
 Ouabaína, 156, 491
 Na⁺-K⁺-ATPase afetada por, 491
 Oxalacetato
 na síntese de aspartato, 283, 283*f*
 no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 298-299, 298*f*, 299*f*
 no ciclo do ácido cítrico, 144, 144*f*, 161-162, 162*f*, 165, 165*f*, 166
 Oxidação, 119
 ácidos graxos, 223-226. *Ver também*
 Cetogênese
 aspectos clínicos de, 231
 em mitocôndrias, 223-224, 224*f*
 hipoglicemia causada por deficiência de, 231
 liberação de acetil-CoA e, 141, 141*f*, 224-226, 224*f*, 225*f*
 definição de, 119
 desidrogenases na, 120-122, 122*f*
 hidroperoxidases na, 122
 oxidases na, 120, 120*f*, 122*f*
 oxigenases na, 123, 123*f*, 124*f*
 potencial redox e, 119, 120*t*
 toxicidade de oxigênio e, 124-125
 Oxidação biológica. *Ver* Oxidação
 β-Oxidação de ácidos graxos, 224-226, 224*f*, 225*f*
 modificada, 226, 227*f*
 regulação da cetogênese e, 229-230, 229*f*
 Oxidação de moléculas orgânicas por oxigênio molecular catalisada por enzimas, 758
 Oxidação mitocondrial de flavinas reduzidas, 566*f*
 Oxidantes, 694
 Oxidantes clorados, produção de, 705
 Oxidase de ácidos graxos, 225
 Oxidases, 120, 120*f*. *Ver também* tipo específico de função mista, 123. *Ver também* Sistema do citocromo P450
 flavoproteínas como, 120, 121*f*
 Oxidases de função mista, 123, 584. *Ver também* Sistema do citocromo P450
 Óxido nítrico, 647, 660-661, 662*t*, 721*t*
 coagulação/trombose afetada por, 720, 721*t*
 Óxido nítrico-sintase, 661, 661*t*
 reação catalisada por, 314*f*
 Oxidoesqualeno:lanosterol-ciclase, 268, 269*f*
 Oxidorredutase, 40, 127, 128*f*
 Oxidorredutases, 61, 120. *Ver também* tipo específico
 Oxigenação da hemoglobina
 adaptação à alta altitude e, 57
 alterações de conformação e, 55-56
 apoproteínas, 55
 2,3-bisfosfoglicerato estabilizando, 57*f*
 hemoglobinas mutantes e, 57-58
 Oxigenases, 119, 123-124
 Oxigênio
 afinidades de hemoglobina (P₅₀) para, 55
 débito, 172
 ligação, 53*f*, 55. *Ver também* Oxigenação da hemoglobina
 efeito Bohr e, 56, 57*f*
 histidinas F8 e E7 na, 52, 52*f*
 mioglobina no armazenamento de, 52-53
 transporte de, ferro ferroso no, 52-53
 Oxisteróis, 220
- P**
- P₅₀, afinidade da hemoglobina por oxigênio e, 55
 P53 (gene supressor de tumor), 728*t*
 p97, 619
 Pá, carregada, 488*f*, 489, 490*f*
 PAF. *Ver* Fator de ativação de plaquetas
 Palíndromo, 469
 Palmitato, 233
 Palmitoilação, na modificação covalente, aumentos de massa e, 31*t*
 Pancreatite aguda, 599
 Papaína, digestão de imunoglobulina por, 681
 Papel das células-tronco no câncer, 736
 PAPS. *Ver* Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfossulfato
 Paralisia periódica
 hipercalêmica, 658*t*
 hipocalêmica, 658*t*
 Paralisia periódica hipercalêmica, 658*t*
 Paralisia periódica hipocalêmica, 658*t*
 Paramécios, 703
 Pareamento de bases de Watson-Crick, 8, 360, 361*f*

- Pareamento de bases no DNA, 8, 360, 361f
 combinação para renaturação, 361-362
- Parede arterial, 640
- Partícula de reconhecimento de sinal, 614, 670
- Partículas de ribonucleoproteínas, 425, 449
- Parto prematuro, 417
- Pás carregadas do desfibrilador, 488f, 489, 490f
- Passeio de cromossomos, 463
- Patologia molecular, 625
- pBR322, 455, 456f
- PCR. *Ver* Reação em cadeia da polimerase
- PDGF. *Ver* Fator de crescimento derivado das plaquetas
- PDH. *Ver* Piruvato-desidrogenase
- Pectina, 157, 158f
- Pelagra, 546, 557
- Pele
 deficiência de ácidos graxos essenciais afetando, 241
 síntese de vitamina D₃ na, 552f
- Penicilamina, para doença de Wilson, 676
- Pentoses, 152, 153t, 154-155, 155t
 em glicoproteínas, 159t
- Pentosúria, essencial, 196, 205
 importância fisiológica da, 154-155, 155t
- Pentosúria alimentar, 205
- Pentosúria essencial, 196, 205
- PEPCK. *Ver* Fosfoenolpiruvato-carboxicinas
- Pepsina, 539
 na catálise acidobásica, 64
- Pepsinogênio, 539
- Peptidase sinalizadora, 615, 615f, 670
- Peptidases, na degradação de proteínas, 288-289, 288f
- Peptídeo sinalizador, 608, 614, 615
 albumina, 671
 em proteínas destinadas à membrana do aparelho de Golgi, 608
 na separação de proteínas, 608f, 610, 611f, 614, 615f
- Peptídeos, 23, 502f. *Ver também* Aminoácidos
- Peptídeos pequenos, presença de, 620
- Peptidilarginina-deiminase, 705-706, 705f
- Peptidilglicina -idroxilase, vitamina C como coenzima para, 562
- Peptidil-prolil-isomerase, 618
- Peptidiltransferase, 422, 423t
- Perda da proteína RB, 731
- Perda de massa muscular, 620
- Perfis de proteínas, transcrito de RNA e, 465
- Perilipina, 263-264
- Permutador de cálcio-sódio, 657
- Peroxidação
 de lipídeos insaturados, 759f
 lipídeos, radicais livres produzidos por, 219-220, 220f
- Peroxidação de lipídeos, 758
- Peroxidases, 122, 239
- Peróxido de hidrogênio, 760
 como substrato da hidroxiperoxidase, 122-123
- Peróxidos, 567
- Peroxinas, 614
- Peroxisomos, 123, 613
 ausência/anormalidades de, 614, 614t
 na síndrome de Zellweger, 231, 614
 biogênese de, 614
 na oxidação de ácidos graxos, 226
- PFK-1. *Ver* Fosfofrutocinase (fosfofrutocinase 1)
- PGH. *Ver* Projeto Genoma Humano
- PGHS. *Ver* Prostaglandina H-sintase
- PGIs. *Ver* Prostaciclina
- PGs. *Ver* Prostaglandinas
- pH, 10-13. *Ver também* Equilíbrio acidobásico
 carga final de aminoácidos e, 20-21, 21f
 definição de, 10
 velocidade da reação catalisada por enzimas afetada por, 77
 isoelétrico, carga final de aminoácidos e, 20-21
 cálculo do, 10-11
 tamponamento e, 12-13. *Ver também* Tampões
- pH isoelétrico (pI), carga final de aminoácidos e, 20-21
- p-Hidroxifenilpiruvato, no catabolismo de tirosina, 304, 305f
- p-Hidroxifenilpiruvato-hidroxilase, 300t
- Pi, 679
 na contração muscular, 652, 662f
 pI (pH isoelétrico), carga final de aminoácidos e, 20-21
- PIC. *Ver* Complexo de pré-iniciação
- PI-fosfolipase C (PI-PLC), 573
- Pigmentos biliares, 330-332. *Ver também* Bilirrubina
- Pinocitose, 492-493, 492f
- Pinocitose absorptiva, 493
- Pinocitose de fase líquida, 492f, 493, 493f
- Pinos SNARE, 623
- PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato), 216
 na ativação de plaquetas, 719f, 720
 na pinocitose absorptiva, 493
- Piridoxal-fosfato, 62, 557
 na biossíntese de ureia, 291
 na síntese de heme, 325
- Piridoxina/piridoxal/piridoxamina (vitamina B₆), 557-558, 557f
 deficiência de excreção de xanturenato na, 308, 308f
 excesso/toxicidade de, 558
- Pirimetamina, 559
- Pirimidinas, 340
- Pirimidinas/nucleotídeos pirimidínicos, 340f, 342f
 luz ultravioleta absorvida por, 342-343
 metabolismo de, 347-357, 355f
 doenças causadas pela superprodução de catabólitos e, 356-357, 356f
 metabólitos hidrossolúveis e, 355-356, 357f
 não essenciais na dieta, 348
 precursores de, deficiência de, 356
 síntese de, 340, 353f
 catalisadores na, 352
 regulação de, 352, 354f
 síntese de purinas coordenadas com, 354
- Pirofosfatase, inorgânica
 na ativação de ácidos graxos, 117, 224
 na biossíntese de glicogênio, 176, 177f
- Pirofosfatase inorgânica, na ativação de ácidos graxos, 117
- Pirofosfato
 energia livre da hidrólise do, 116t
 inorgânico, 117-118
- Pirrol, 52
- Piruvato, 133, 140
 formação de, no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 299f, 301, 303f
 na gliconeogênese, 146
 aspectos clínicos da, 174
 enzimas na, 188t
 gliconeogênese e, 185-186, 186f
 oxidação de, 164-165, 166f, 169t, 172-174, 173f, 174f. *Ver também* Acetil-CoA:
 Glicólise
- Piruvato-carboxilase, 164, 165f, 188t
 na regulação da gliconeogênese, 164, 165f, 185, 188t
- Piruvato-cinase (PK), 188t
 deficiência de, 174, 694
 na glicólise, 170f, 171, 188t
 regulação e, 172
 regulação da gliconeogênese e, 188
- Piruvato-desidrogenase, 165, 166f, 167, 172, 173f, 188t
 deficiência de, 174
 regulação da, 173-174, 174f
 acetil-CoA na, 172-174
 acil-CoA na, 174f, 237
 tiamina-difosfato como coenzima para, 555
- pK/pK_a, 20-21
 de ácidos fracos, 11-12, 20
 de aminoácidos, 16t-17t, 20, 20f
 ambiente afetando, 21
 meio afetando, 13
- PKA. *Ver* Proteína-cinase A
- PKU. *Ver* Fenilcetonúria
- Plaquetas
 agregação, 721
 ativação/agregação de, 711, 719-720, 719f
 ácido acetilsalicílico afetando, 720-721
 contém mitocôndrias, sem núcleo, 698
 distúrbios de, 698
 integrinas em, 702-703, 703t
- Plasma, 669
 análise de enzimas no, 68-69
- Plasma sanguíneo. *Ver* Plasma
- Plasmalogênios, 217, 217f, 248, 248f
 biossíntese de, 248f
- Plasmídeos, 455, 456f, 469
- Plasmídeos bacterianos, 455
- Plasmina, coágulos de fibrina dissolvidos por, 718, 718f
- Plasminogênio, 718
 ativadores de, 69, 718f, 721t
- PLC (fosfolipase C)
 ativação e interações do receptor hormonal, 525f
 clivagem de PIP₂ por, 526f
- Plecstrina, na ativação de plaquetas, 720
- PLP. *Ver* Piridoxal-fosfato
- pOH, no cálculo do pH, 10
- Polaridade, DNA, 360
- Polaridade da síntese proteica, 419
- Poli(A)-polimerase, 409
- Poliaminas, síntese de, 316, 318f
- Poliânions, 636
- Policitemia, 58
- Polieletrólitos, peptídeos como, 23
- Poli-isoprenoides, na síntese de colesterol, 268f, 269
- Polimerase
 DNA, 381, 382f, 383
 de procariotos e eucariotos, 383t
 na tecnologia do DNA recombinante, 453t
 RNA, dependente de DNA, na síntese de RNA, 395-396
- Polimorfismos
 comprimento dos fragmentos de restrição. *Ver* Restrição
 de microssatélites, 378
 DNA dependente de DNA, 463-464
 proteínas plasmáticas, 670-671

- Polimorfismos de microssatélites (DNA), 378, 463-464, 469
- Polimorfismos de nucleotídeo único, 101, 460, 470
- Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição, 70, 463
- Polinucleotídeo-cinase, na tecnologia do DNA recombinante, 453*t*
- Polinucleotídeos, 344-345
modificação pós-traducional de, 345
- Polipeptídeos
determinação de Sanger de, 29
síntese proteica em, 26*f*
- Poliprenoides, 219, 220*f*
- Polirribossomos, 424-425, 608
hipótese do sinal de ligação de, 609*f*, 614-616, 614*t*
síntese proteica em, 608*f*, 609*f*, 610, 614
- Polirribossomos ligados à membrana, 614
- Polirribossomos livres, síntese proteica em, 607-608, 618. *Ver também* Polirribossomos
- Polissacarídeos, 153, 156-159, 159*f*. *Ver também* tipo específico
- Polissomos, 367. *Ver também* Polirribossomos
- POMC. *Ver* Família de peptídeos da pró-opiomelanocortina (POMC)
- Ponto de ramificação, 178
- Ponto de solubilidade, de aminoácidos, 21-22, 22*f*
- Porção glicerol, de triacilgliceróis, 140
- Porção hidrofílica da molécula de lipídeos, 220, 221*f*
- Porção hidrofóbica da molécula de lipídeos, 220, 221*f*
- Porfirias, 323, 329-330, 329*f*
causas químicas de sinais e sintomas de, 329*f*
principais descobertas em, 328*t*
- Porfirinas, 323-335, 324*f*
espectrofotometria para detecção de, 327-329
espectros de absorção de, 327, 328*f*
reduzidas, 326
síntese de heme e, 324*f*, 325-327, 326*f*, 328*f*
- Porfirinas férricas, 323
- Porfirinas reduzidas, 326
- Porfirinogênios, 326
acúmulo na porfíria, 329
- Porfobilinogênio, 325, 325*f*, 326*f*
- Potássio, 562*t*
coeficiente de permeabilidade do, 481*f*
nos líquidos extracelular e intracelular, 478, 478*t*
- Potencial de oxidação-redução, 119, 120*t*
- Potencial de transferência de grupo, 115
de nucleosídeos trifosfatos, 343, 344*t*
- Potencial redox (oxidação-redução), 119-120, 120*t*
- Potencializador de GAL1, 446
- Potencializador do gene do interferon β humano, 442*f*
- Potencializadores, propriedades de, 441*t*
- Potencializadores/elementos potencializadores, 439-441
- PPI. *Ver* Peptidil-prolil-isomerase
- PP_i. *Ver* Pirofosfato
- PR. *Ver* Progesterona
- Prasugrel, 721
- Pravastatina, 275
- Pré-caliceína, 712*f*, 713
- Precisão, exames laboratoriais, 591, 591*f*
- Precusores de peptídeos, síntese de hormônios a partir de, 511
- Pregnenolona em testosterona, conversão de, 505
- Prenilação de proteínas, 270
- Pré-pró-colágeno, 629
- Pré-pró-hormônio, 512
- Pré-pró-paratormônio bovino, 513*f*
- Pré-pró-proteína, albumina sintetizada como, 671
- Pré-pró-PTH, 512
- Pré-proteínas, 608
- Pré-sequência. *Ver* Peptídeo sinalizador
- Pré-sequências internas, 610
- Pressão hidrostática, 669
- Pressão oncótica (osmótica), 669
- Pressão osmótica (oncótica), 669
- Prevenção da agregação, 616
- Primaquina, 694, 747-748
- Primases, DNA, 382*f*
- Primer de RNA, na síntese de DNA, 385*f*
- pri-miRNAs. *Ver* Transcritos primários
- Primossomo, 383, 469
- Prions, 45-46
- Proacelerina (fator V), 712*f*, 713*t*, 714, 714*t*
- Pró-albumina, 623
- Proaminopeptidase, 539
- Pró-carcinógenos, 584
- Pró-caspases, 733
- Procedimento de transferência de *Southern blot*, 362, 470
- Procedimento de transferência de *Southwestern blot*, 470
- Procedimento de transferência *Northern blot*, 362
- Procedimento de transfusão sanguínea, 456, 457*f*
- Processamento de oligossacarídeos, 577, 608
aparelho de Golgi no, 608
- Processamento de RNA, alternativo, 448-449
- Processamento de RNA nuclear, 447-448
- Processamento nucleolítico, de RNA, 409
- Processamento pós-traducional, 46-47, 426
na organização de membranas, 616, 616*f*
- Processos estocásticos, mortalidade e envelhecimento como, 756
- Processos não determinantes, mortalidade e envelhecimento como, 756
- Pró-colágeno, 426, 562
- Pró-colágeno aminoproteinase, 630
- Pró-colágeno carboxiproteinase, 630
- Proconvertina (fator VII), 712, 712*f*, 713*t*, 714*t*
fármacos cumarínicos afetando, 717
- Produto iônico, 10
- Produtos de Amadori, 761
- Produtos finais da glicação avançada, 578-579, 761-762
formação de, 578-579, 578*f*-579*f*
- Proelastase, 539
- Proenzimas, 92-93
- Profármacos, 85, 584
transformação metabólica de, 85
- Progenitor do linfóide comum, 701
- Progenitor do mielóide comum, 701
- Progesterona, 508*f*
- Programa apoptótico de morte celular, 760
- Programas de ancoragem, molecular, 44
- Programas de ancoragem molecular, 44, 105
- Pró-hormônios, 426
- Proinsulina, 512
estrutura da, 512*f*
- Projeção Haworth, 153, 153*f*
- Projeto ENCODE, 102
- Projeto Genoma Humano, 3-4
áreas de interesse atual, 4*f*
genômica e, 98
implicações, 3-4
- Prolil-hidroxilase, 628, 631
- Prolina, 17*t*
acúmulo de, 299, 300*t*, 301*f*
catabolismo de, 299
hidroxilação de, 628
metabolismo de, 314*f*
síntese de, 284, 284*f*
- Prolina-*cis*, *trans*-isomerase, dobramento proteico e, 45, 45*f*
- Prolina-desidrogenase, 300*t*
bloqueio do catabolismo de prolina na, 299
- Prolina-hidroxilase, vitamina C como coenzima para, 562
- Promoters, na transcrição, 396, 399*f*
em eucariotos, 400*f*
- Promotores bacterianos, na transcrição, 399*f*
- Promotores em eucariotos na transcrição, 400-403
- Pró-oxidantes, 568-569, 568*t*, 694. *Ver também* Radicais livres
- Propil galato, como antioxidante/conservante de alimentos, 221
- Propionato
glicemia e, 190
metabolismo de, 185, 750*t*
na gliconeogênese, 186*f*
- Propionil-CoA
metionina na formação de, 308, 309*f*
oxidação de ácidos graxos produzindo, 225
- Propionil-CoA-carboxilase, 187, 187*f*
- Proporção colesterol LDL:HDL, 274
- Proporção insulina/glucagon, na regulação da cetogênese, 230
- Proporções axiais, 37
- Propriedades alostéricas da hemoglobina, 54
- Pró-proteínas, 46, 92, 426
- Pró-PTH, 512
- Pró-quimiotripsina, ativação de, 93, 93*f*
- Prostaciclina, 213
coagulação/trombose afetada por, 719*f*, 720, 721*t*
significado clínico de, 242
- Prostaglandina E₂, 213, 214*f*
- Prostaglandina H-sintase, 239
- Prostaglandinas, 213, 214*f*, 232, 239, 706
via da cicloxigenase na síntese de, 240-241, 241*f*, 242*f*
- Prostanoides, 213
significado clínico de, 242
via da cicloxigenase na síntese de, 240-241, 241*f*, 242*f*
- Protamina, 717
- Protease do HIV, na catálise acidobásica, 64, 64*f*
- Protease processadora de matriz, 610
- Proteases lisossomais, na degradação de proteínas, 620
- Proteases/proteinases, 9, 288*f*, 289*f*, 539, 574. *Ver também* tipo específico
derivadas de fagócitos, 706
na degradação de proteínas, 288-289
renina, 60-61
sinaptobrevina de clivagem, 623
- Protein Database, 101

- Proteína 1 tipo Niemann-Pick C, 275
- Proteína associada à haptoglobina, 673
- Proteína ativadora da proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), 523
- Proteína ativadora do catabolismo, 431
- Proteína C, na coagulação sanguínea, 714*t*, 717
- Proteína C ativada, na coagulação sanguínea, 717
- Proteína C ligada à miosina, 658
- Proteína C-reativa, 590, 671, 672*t*
- Proteína Cro, estrutura 3D da, 445*f*
- Proteína da cadeia de translocação associada à membrana (TRAM), 614
- Proteína de ancoragem, 621, 622*f*
- Proteína de ligação à manana (MBP), 686, 687*f*
- Proteína de ligação à manose, 580
- Proteína de ligação da CREB, 531
- Proteína de ligação da imunoglobulina, 616
- Proteína de ligação de ácidos graxos, 223, 255
- Proteína de ligação de TATA, 400
- Proteína de ligação do retinol, 672*t*
- Proteína de membrana passagem múltipla, 696
- Proteína de membrana transportadora de ácidos graxos, 255
- Proteína de transferência do éster de colesterol, 272, 272*f*, 274
- Proteína desacopladora, 132
- Proteína dissulfeto isomerase, dobramento de proteínas e, 45
- Proteína do retinoblastoma, 388
- Proteína Gla da matriz óssea, 550*t*
- Proteína p53, 392, 731, 733
- Proteína permutadora de ânions (banda 3), 695-696
- Proteína Rb. *Ver* Proteína do retinoblastoma
- Proteína reguladora aguda da esteroidogênese, 503
- Proteína reguladora de catabólitos, 522
- Proteína reguladora do AMP cíclico (proteína ativadora do catabolismo), 431
- Proteína relacionada a príons, 46
- Proteína relacionada ao receptor de LDL, 255 no consumo de quilomícrons remanescentes, 257*f*, 258
- Proteína repressora cI/gene repressor cI, 434, 435*f*
- Proteína Rieske Fe-S, 128
- Proteína S, na coagulação do sangue, 714*t*, 717
- Proteína secretada, 614
- Proteína TRAM (cadeia de translocação associada à membrana), 614
- Proteína transportadora de ácidos graxos, membrana, 255
- Proteína transportadora de grupos acil, 233, 233*f*, 561 síntese da, a partir do ácido pantotênico, 233
- Proteína transportadora de triglicérido microsomal (MTP), 259
- Proteína transportadora SGLT 1, 538
- Proteína/gene repressor, lambda (cI), 433-437, 433*f*, 434*f*, 436*f*
- Proteína-cinase A, 522-523
- Proteína-cinase C, 719*f*, 720
- Proteína-cinase dependente de AMP cíclico, 42*f*. *Ver também* Proteínas-cinase
- Proteína-cinase dependente de DNA, 390
- Proteína-fosfatase 1, 181*f*, 183*f* glicogênio fosforilase e, 182
- Proteína-fosfatase de cadeia leve, 660
- Proteínas, 421*f*. *Ver também* Peptídeos: tipo específico
- absorção de, 539, 541
- aminoácidos em, 23*f*
- assimetria de, organização de membrana e, 624, 624*f*
- auxiliares, no dobramento, 45
- canais iônicos como transmembrana, 487-489, 488*f*, 489*t*
- catabolismo de, 287-296
- ciclo de vida de, 26*f*
- como polieletrólitos, 23
- configuração de, 36
- conformação de, 36
- ligações peptídicas afetando, 23
- de neutrófilos, 703
- degradação de
- a aminoácidos, 288-289, 288*f*, 289*f*
- redobramento de proteínas e, 45
- temperatura e, 77-78
- desconhecidas, identificação de, 103-105
- diméricas, 41
- direcionadas, à matriz, 610
- domínios de, 41, 42*f*
- em membranas, 481, 489*t*. *Ver também*
- Glicoproteínas: Proteínas de membrana
- proporção em relação a lipídeos, 478*f*
- estrutura de, 37-41
- cristalografia de raios X na análise de, 41-43
- dobramento e, 44-45
- doenças de príons associadas à alteração da, 45-46
- microscopia crioeletrônica, 44
- modelagem molecular e, 44
- níveis superiores da, 36-47
- primária, 25-34, 37
- quaternária, 37
- secundária, 37-41
- supersecundária, 39
- terciária, 39-41
- estrutura tridimensional relacionada à função, 103-104, 104*f*
- fase aguda, 671, 672*t*
- negativa, vitamina A como, 551
- fibrosas, 37, 46
- colágeno como, 46
- fosforilação de, 92-93, 93*f*, 94*t*. *Ver também*
- Fosforilação, de proteínas
- função de, bioinformática na identificação de, 34
- fusão, no estudo enzimático, 70
- globulares, 37
- identificação, por homologia, 102-103
- importação de, pelas mitocôndrias, 610, 611*t*
- L-aminoácidos em, 19
- modificação pós-traducional de, 46, 426
- monoméricas, 41
- na dieta
- digestão e absorção de, 539
- metabolismo de, no estado alimentado, 148
- necessidades para, 543-544
- nos líquidos extracelular e intracelular, 478, 478*t*
- ordem da estrutura, 37
- perda de, no trauma/infecção, 544
- prenilação, 270
- princípios modulares na construção de, 37
- proporção em relação a lipídeos na membrana, 478-479
- purificação de, 26-29
- reações com EROs, 759*f*
- receptores como, 493
- seqüências ou moléculas direcionando, 608*t*
- síntese de, 148, 413-427. *Ver também*
- Separação de proteínas
- alongamento na, 423*f*
- ameaças ambientais afetando, 425
- código genético/RNA e, 363-364, 413-415. *Ver também* Código genético
- em ribossomos, 144*f*, 145
- inibição da, por antibióticos, 426-427, 427*f*
- iniciação da, 419, 420*f*, 422*f*
- no estado alimentado, 148
- polissomos na, 424-425, 608, 608*f*
- por mitocôndrias, 608*t*, 610
- princípios modulares na, 37
- processamento pós-traducional e, 426
- reconhecimento e ligação na, 416*f*
- término da, 423
- translocação e, 422-423
- vírus afetando, 425, 426*f*
- solúveis, 37
- translocação de, 26*f*
- Proteínas adaptadoras, na pinocitose absorviva, 493
- Proteínas adicionais no músculo, 655, 655*t*
- Proteínas agregadas, efeitos tóxicos de, 764
- Proteínas amiloides precursoras, na doença de Alzheimer, 46
- Proteínas apicais, 623
- Proteínas argonautas, 409
- Proteínas associadas aos microtúbulos, 665
- Proteínas basolaterais, 623
- Proteínas contendo KDEL, 608*t*, 618
- Proteínas correguladoras de mamíferos, 532*t*
- Proteínas de ancoragem à cinase A, 523
- Proteínas de choque térmico, como chaperonas, 45, 610
- Proteínas de fase aguda, 544, 671, 672*t*
- negativas, vitamina A como, 546, 551
- Proteínas de fusão recombinantes, no estudo de enzimas, 70
- Proteínas de fusão recombinante, no estudo de enzimas, 70
- Proteínas de ligação, 672*t*
- Proteínas de ligação de cálcio, vitamina K e carboxilação do glutamato e modificação pós-sintética e, 554-555 síntese e, 555*f*
- Proteínas de ligação de carboidratos, 572
- Proteínas de ligação de DNA de fita simples, 382*f*
- Proteínas de ligação do potencializador, 440
- Proteínas de matriz, 610, 614
- doenças causadas por defeitos na importação de, 614
- Proteínas de membrana, 481, 489*t*, 614. *Ver também* Glicoproteínas
- associadas à bicamada lipídica, 481
- estrutura de, dinâmica, 481
- integrais, 37, 482, 483*f*
- mutações afetando, doenças causadas por, 496, 496*t*
- periféricas, 482, 483*f*
- Proteínas de revestimento
- função de, 621-622
- recrutamento de, 621-622, 622*f*
- Proteínas de transporte, 672*t*
- Proteínas diméricas, 41
- Proteínas do citoesqueleto/citoesqueléticas, 647

- Proteínas do fator de fixação de NSF solúvel (SNAP), 622f, 623
- Proteínas efetoras Rab, 621, 623
- Proteínas ferro-enxofre, nos complexos da cadeia respiratória, 127-128, 129f
- Proteínas fibrosas, 37, 46
- Proteínas G, 522t
classes e funções das, 522t
- Proteínas globulares, 37
- Proteínas heme, 323, 325t. *Ver também*
Hemoglobina: Mioglobina
catabolismo de heme a partir de, 330
- Proteínas integrais, 37, 482, 483f
como receptores, 496
da membrana de hemácias, 695-696, 695f, 695t
interações de proteínas do citoesqueleto com, 695f
- Proteínas intermediárias e moléculas de carga, 622
- Proteínas ligadas à GPI, 577-578, 577t
- Proteínas lisossomais, 625
- Proteínas monoméricas, 41
- Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), 677
- Proteínas não dobradas, acúmulo no retículo endoplasmático, 620
- Proteínas não histonas, 371
- Proteínas nucleares, 573
- Proteínas periféricas, 482, 483f
- Proteínas periféricas do citoesqueleto, 695t, 696
- Proteínas plasmáticas, 569, 668-687, 672t. *Ver também* Glicoproteínas: tipo específico
concentração de, 674
eletroforese para análise de, 669
funções das, 672t
meia-vida das, 671
polimorfismo das, 670-671
síntese no fígado, 143, 670
transporte, 672t
- Proteínas Rab, 621
- Proteínas Ran, 612, 621t
- Proteínas receptoras de manose-6-fosfato, 581
- Proteínas secretoras, 615
- Proteínas SNAP (fator de fixação de NSF solúvel), 622f, 623
- Proteínas SNARE, 621-623, 622f, 623
- Proteínas solúveis, 615
- Proteínas transativadoras, 439-440
- Proteínas transmembrana, 67f
canais iônicos como, 487-489, 488f, 489t
- Proteínas t-SNARE, 621, 623
- Proteínas v-SNARE, 621-623
- Proteínas/moléculas de carga, 622
na exportação, 612
na importação, 612, 612f
- Proteínas/sistemas carreadores, 487
- Proteínas-alvo poliubiquitinadas, 620
- Proteínas-cinase, 92-93
dependentes de cAMP/independentes de cAMP, 522-523
na fosforilação de proteínas, 93, 93f, 95f
na iniciação da síntese proteica, 419
na regulação hormonal da lipólise, 263, 263f
no metabolismo do glicogênio, 179-180, 181f, 182-183, 183f
proteína-cinase A (PKA) e cAMP, 522-523
proteína-cinase C (PKC) na ativação de plaquetas, 719f, 720
- Proteínas-cinase dependentes de ciclina, 388, 388f, 388t
inibição de, integridade do DNA/cromossomo e, 392
- Proteinases
de neutrófilos, 704t, 706
e MEC, 736
- Proteínas-fosfatase, 95f. *Ver também* Fosfatases
- Proteinúria, 597
- Proteinúria glomerular, 597t
- Proteinúria por transbordamento, 597t
- Proteinúria pós-renal, 597t
- Proteinúria tubular, 597t
- Proteoglicanas, 157, 569, 573, 634, 638, 643. *Ver também* Glicosaminoglicanos
funções de, 638t
galactose na síntese de, 203, 203f
heparano sulfato, 630
- Proteoglicanas agreganos
micrografia eletrônica de campo escuro de, 635f
representação esquemática de, 635f
- Proteólise, 623
na ativação da pró-quimiotripsina, 93, 93f
na modificação covalente, 92-93, 93f
- Proteoma, 33
- Proteômica, 3, 465
objetivo da, 33
- Proteossomos, 288, 289f, 616
degradação em, 619
proteínas dobradas erroneamente em, 620
ubiquitinação em, 620, 620f
- Proto-heme, 122
- Prótons, transporte de, por hemoglobina, 52-58
- Proto-oncogenes, 726
inserção de promotor ativando, 727f
- Protoporfirina, 324f, 326
incorporação de ferro ao heme, 326
incorporação de ferro em, 324f
- Protoporfirina III, 326, 328f
- Protoporfirinogênio III, 326, 328f
- Protoporfirinogênio-oxidase, 326, 326f, 328f, 328t
- Protrombina (fator II), 713f, 714, 714t
ativação de, 714
fármacos cumarínicos afetando, 717
na deficiência de vitamina K, 555
- Proximidade, catálise por, 63
- PrP. *Ver* Proteína relacionada a príons
- PRPP glutamil-amidotransferase
defeito, gota causada por, 354
na síntese de pirimidinas, 352, 353f
na síntese de purinas, 350-351, 351f
- PSA. *Ver* Antígeno prostático específico
- Pseudogenes, 380
- Pseudouridina, 356, 357f
- Psicose de Korsakoff, 556
- PstI, 452t
- PTA. *Ver* Antecedente da tromboplastina plasmática
- PTC. *Ver* Componente da tromboplastina plasmática
- PTH. *Ver* Hormônio paratireoideo
- PTS1 e PTS2, 614
- PTSs. *Ver* Sequências de direcionamento da matriz peroxissomal
- PubMed, 99
- Puffs, cromossomos politênicos, 374, 374f
- Purificação, proteínas/peptídeos, 26-29
- Purinas/nucleotídeos purínicos, 340, 340f, 342f
biossíntese de, 348, 348f, 349f, 350f, 351f
catalisadores na, 348
gota como, 354
luz ultravioleta absorvida por, 342-343
metabolismo de, 347-357
distúrbios de, 354-355, 356t
não essenciais na dieta, 348
- Puromicina, 426, 427f
- Púrpura trombocitopênica imune, 698
- Putrescina, na síntese de poliamina, 317f
- ## Q
- Q₁₀ (coeficiente de temperatura), reações catalisadas por enzimas e, 77-78
- Quebra de proteína tecidual, 663
- Quenodossicolil-CoA, 273, 273f
- Queratan sulfato I, 637
- Queratinas, 666
- Quilo, 255
- Quilomícrons, 143, 148, 253, 254, 254t
apolipoproteínas de, 254t, 255
metabolismo de, 143, 147f, 255-258, 257f
no transporte de triacilgliceróis, 255-257, 256f, 257f
- Química clínica
enzimas na, 594-595, 595f
técnicas utilizadas na, 593-596
- Química combinatória, 67
- Química sintética, 570
- Quimiocinas, 702, 702f, 706
- Quimiotaxia, 706
por receptores acoplados à proteína G, 702
- Quimioterapia para o câncer
análogos dos nucleotídeos sintéticos na, 343-344, 344f, 345f
inibidores do folato na, 559
- Quimioterapia para o tratamento do câncer
análogos sintéticos de nucleotídeos na, 343-344, 344f, 345f
inibidores do folato na, 559
- Quimiotripsina, 65f, 539
na catálise covalente, 64-65
na digestão, 539
resíduos conservados e, 66t
- Quimiotripsinogênio, 539
- Quininogênio de alto peso molecular, 712f, 713
- Quinurenina-formilase, 307f, 308
- Quinurenina-hidroxilase, 307f
- Quinureninase, 307f, 308
- Quitina, 157, 158f
- ## R
- Radiação, reparo por excisão de nucleotídeos do dano ao DNA causado por, 389t
- Radiação ionizante, reparo de nucleotídeos por excisão de dano de DNA causada por, 389t
- Radiação ultravioleta (UV), 761, 761f
carcinogenicidade, 724
- Radicais livres, 564-568, 760. *Ver também*
Antioxidantes
como reações em cadeia autoperpetuantes, 564
doença causando, 564
e teoria mitocondrial do envelhecimento, 760
mecanismos de proteção contra danos, 567, 567f

- múltiplas fontes de oxigênio, 566-567, 566f
na toxicidade do oxigênio, 124
no kwashiorkor, 543
peroxidação de lipídeos produzindo, 219-220, 220f
provocando danos, 564-565, 565f
- Radioimunensaio, 596
- Raio de Stokes, na cromatografia de exclusão por tamanho, 27
- Ramo citosólico, para separação de proteínas, 608f, 610-614
- Ranço, peroxidação causando, 219
- RAS (oncogene), 728t
- RB (gene supressor de tumores), 728t
- Reação acrossomal, 579
- Reação da glutaminase, 292f
- Reação da prolil-hidroxilase, 285, 285f
- Reação de deslocamento duplo, 84
- Reação de Edman, para sequenciamento de peptídeos/proteínas, 29-30, 30f
- Reação de Maillard, 578
- Reação em cadeia da polimerase, 70, 458-459, 459f
na detecção de seqüências repetitivas de microsatélites, 378
- Reação endergônica, 114-115
acoplamento e, 114-115
ATP em, 115
- Reação exergônica, 114-115
acoplamento e, 114-115
ATP em, 115
- Reação geradora de fluxo, 145
- Reação limitadora de velocidade, metabolismo regulado por, 89
- Reações "pingue-pongue", 84, 85f
- Reações alérgicas, absorção de peptídeos provocando, 537
- Reações anapleróticas, no ciclo do ácido cítrico, 164
- Reações Bi-Bi, 84, 84f
cinética de Michaelis-Menten e, 84
- Reações de "salvamento"
na síntese de pirimidinas, 352-351
na síntese de purinas, 349f, 350, 351f
- Reações de conjugação, metabolismo de xenobióticos
acetilação, 586-587
glicuronidação da bilirrubina, 586
metilação, 587
sulfatação, 586
- Reações de deslocamento
duplas, 84
sequenciais (isoladas), 84
- Reações de deslocamento sequencial, 84
- Reações de deslocamento simples, 84
- Reações de não equilíbrio, 145
regulação da glicólise e, 172, 185-187
regulação do ciclo do ácido cítrico e, 167
- Reações de transferência de grupo, 9, 63
- Reagente de Edman (fenilisotiocianato), no sequenciamento de proteínas, 30, 30f
- Reagente de Sanger
(1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno), para sequenciamento de polipeptídeos, 29
- Rearranjo de Amadori, 578
- Rearranjos, DNA, 434f
na diversidade de anticorpos, 684
recA, 435
- Receptor cognato, 520
- Receptor de apo B-100 no metabolismo de LDL, 258
- Receptor de apo E
na captação de vestígios de quilomícrons, 257f, 258
no metabolismo de LDL, 258, 259, 260f
- Receptor de assialoglicoproteína em mamíferos, 572
- Receptor de di-hidropiridina, 654, 656
- Receptor de ferritina, 674
- Receptor de fibronectina, 633
- Receptor de insulina, 500
- Receptor de lipoproteínas de densidade muito baixa, 255, 257
- Receptor de retinoide X, 551
- Receptor de rianodina, 653-654
doenças causadas por mutações no gene para, 654-655
- Receptor de transferrina, 674-675, 678
- Receptor farnesoide X na regulação da síntese de ácidos biliares, 274
- Receptor *scavenger* B1, 258f, 259
- Receptor *scavenger* B1 classe B, 258f, 259
- Receptores, 493. *Ver também* tipo específico
- Receptores acoplados à proteína G, 521, 521f, 702
- Receptores adrenérgicos, na glicogenólise, 180
- Receptores com proteínas de transporte, comparação de, 516, 516f
- Receptores de assialoglicoproteínas na inserção cotraducional, 615f, 616
- Receptores de hormônios da tireoide, 500
- Receptores de hormônios peptídicos, 500
- Receptores do fator de crescimento dos fibroblastos, 645
- Receptores esteroides, 500
- Receptores hormonais
classificação, 500
especificidade e seletividade de, 499, 499f
proteínas como, 500
reconhecimento e acoplamento a, 499-500
- Receptores nucleares, 500
com ligantes especiais, 531t
- Receptores para fragmentos Fc de IgGs, 704t
- Receptores α -adrenérgicos, na glicogenólise, 180
- Reciclagem, 623
- Recombinação cromossômica, 379, 379f, 380f
- Recombinação homóloga de DNA, 389, 390f
- Reconhecimento celular, glicosíngolipídeos no, 250
- Rede de *charge-relay*, 65
- Rede *trans*-Golgi, 608
- Redução, definição de, 119
- Região anticódon do tRNA, 414-415, 416f
- Região de junção, gene para, 684
- Região Fab, 681
- Regiões codificadoras, 376, 376f
- Regiões de controle do *locus*, 443-444
- Regiões determinantes da complementaridade, 683
- Regiões estruturais, 683
- Regiões hipervariáveis, 683
- Regiões não codificadoras, na tecnologia do DNA recombinante, 460
- Regiões/segmentos C. *Ver* Regiões/segmentos constantes
- Regiões/segmentos constantes, 681
gene para, 684
- Regiões/segmentos V. *Ver* Regiões/segmentos variáveis
- Regiões/segmentos variáveis, 683
cadeia leve da imunoglobulina, 683, 684
cadeia pesada da imunoglobulina, 683
- de imunoglobulinas, 684
gene para, 684
- Regulação alostérica, da catálise enzimática, 90-91, 90f, 146f
regulação da gliconeogênese e, 188-189
- Regulação hormonal da lipólise, 262-264
- Regulação hormonal de processos celulares, 523f
- Regulador transmembrana da fibrose cística, 496
degradação de, 620
- Reguladores negativos, da expressão gênica, 429, 429t, 435
- Reguladores positivos, da expressão gênica, 429, 429t, 433, 435
- Relações estrutura-atividade, 107
- Relatos de casos bioquímicos, 746-754
alcooolismo, 747
diabetes melito, 746-747, 753-754
- Remodelagem de cromatina, 735
- Renaturação, DNA, combinação de pares de bases e, 361-362
- Renovação celular, 757t
- Reparo de malpareamentos do DNA, 389, 389t, 390f, 390t
- Reparo do DNA por excisão de bases, 389, 390f, 390t
- Reparo do DNA por excisão de nucleotídeos, 390f
- Replicação/síntese. *Ver* DNA: RNA
- Repressão, de enzimas, 89
controle da síntese enzimática e, 89
na regulação da gliconeogênese, 187-188
- Repressor lac, 431, 432f
- Repressores na expressão gênica, 429, 430
- Reprodução, prostaglandinas na, 232
- Resíduos, peptídeos, 22
- Resíduos aminoácido, 22
estrutura de peptídeos e, 22
- Resíduos catalíticos, conservados, 64f, 66
- Resíduos conservados, 66
- Resíduos de desoxicitidina, metilação de, 438
- Resíduos de GlcNAc, 571
- Resíduos de glicina, 628
- Resistência a fármacos, 448
- Resistência da proteína C ativada, 717
- Respiração, oxigênio para, 119
- Respiração aeróbia e ciclo do ácido cítrico, 161-162
- Resposta autoimune, 687
- Resposta de proteínas não dobradas, 619
- Resposta imune, troca de classe/isótipo e, 684
- Resposta inflamatória aguda, 700
- Resposta tipo A, na expressão gênica, 429-430, 429f
- Resposta tipo B, na expressão gênica, 429f, 430
- Resposta tipo C, na expressão gênica, 429f, 430
- Reticulo endoplasmático (RE), 425, 576-577.
Ver também Estrogênios
- acúmulo de proteínas dobradas erroneamente no, 618-620
- alongamento da cadeia de ácidos graxos no, 236, 237f
- hipótese de sinal de ligação de polirribossomos ao, 609f, 614-616, 614t
- rugoso
na seleção de proteínas, 614, 615f, 619f
síntese proteica e, 425
vias de inserção de proteínas no, 615f, 616-618
síntese de acilglicerol e, 144f, 145

- Retículo endoplasmático rugoso
 ligação ao, 609f, 614-616, 614t
 na separação de proteínas, 608, 608f
 ramificação do RE rugoso, 614
 síntese proteica e, 425
 vias de inserção proteica no, 609f, 616-618
- Retículo sarcoplasmático, níveis de cálcio no músculo esquelético e, 654
- Reticulócitos e síntese proteica, 692
- Retina
 atrofia girata da, 299
 retinaldeído na, 547
- Retinal. *Ver* Retinol
- Retinaldeído, 547
- Retinite pigmentosa, deficiência de ácidos graxos essenciais e, 239
- Retinoides, 547. *Ver também* Retinol
- Retinol, 547. *Ver também* Vitamina A
- Retropósons/retrotranspósons, 377
- Retrotranslocação, 619
- Retrovírus, transcriptases reversas em, 364
- Reunião de partículas, na pinocitose absorviva, 493
- Revestimento, vesícula
 brefeldina A afetando, 622f, 623
- Revolução genômica, 98
- RFLPs. *Ver* Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição
- RFs. *Ver* Fatores de liberação
- Rianodina, 653
- Riboflavina (vitamina B₂), 556, 556f
 coenzimas derivadas da, 62, 556
 deficiência de, 556
 no ciclo do ácido cítrico, 164
- Ribomiopatias, 692
 desidrogenases dependentes de, 121
- Ribonucleases, 368
- Ribonucleosídeos, 340, 340f
- Ribonucleosídeos difosfatos, 352, 352f
- Ribose, 152
 em nucleosídeos, 340, 340f
 via das pentoses-fosfato na produção de, 140, 198, 200
- Ribose-5-fosfato, na síntese de purinas, 348-351, 349f, 351f
- Ribose-5-fosfato-cetoisomerase, 198, 199f
- Ribose-fosfato, via das pentoses-fosfato na produção de, 196, 197f
- Ribosilação de ADP, 556
- Ribossomopatias, 692
- Ribossomos, 366, 367t
 bacterianos, 426-427
 síntese proteica em, 26f, 144f, 145
 dissociação e, 419
- Ribozimas, 71, 363, 411
 catalizadores enzimáticos, participação de, 71
 hipótese do mundo de RNA, 71
 ribossomo, 71
- Ribulose-5-fosfato-3-epimerase, 198, 199f
- Ricina, 427
- Rigor mortis, 652, 654
- Rim
 membrana basal do, 638
 metabolismo da vitamina D no, 552
 metabolismo no, 150t
 no estado de jejum, 149
- Riquetsias, 553
- RMN. *Ver* Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)
- RNA, 360, 362-368
 classes/espécies de, 364-368, 394
 como catalisador, 411
 complementaridade de, 363, 364f, 366
 estrutura do, 362-368, 364f, 366f, 367f
 heterogêneo nuclear (hnRNA), 368
 mensageiro (mRNA), 365, 366f, 394, 395t, 413
 designações dos códons no, 414t, 415
 sequência de nucleotídeos do, 414
 splicing alternativo e, 408
 micro (mi) e pequeno interferente (si), 368
 mutações causadas por alterações no, 416f, 417-418, 418f, 430
 tecnologia do DNA recombinante, 460
 na cromatina, 371
 na síntese proteica, 363-364
 nuclear pequeno (snRNA), 367, 394, 395t, 470
 pequeno, 367-368
 processamento do, 406-407
 relação com o DNA cromossômico, 376f
 ribossomal (rRNA), 366-367, 394, 395t
 como peptidiltransferase, 422, 423t
 síntese de, 360, 395-398
 iniciação/alongamento/terminação em, 397
 splicing, 408
 transportador (tRNA), 365-366, 367f, 394, 395t, 415-416, 416f
 aminoacil, na síntese proteica, 422
 processamento e modificação do, 411
 região do anticódon do, 414-415
 supressor, 418
- RNA longo não codificador, 394
- RNA mensageiro, 365, 366f, 394, 413, 421f, 449.
 Ver também RNA
 designação dos códons no, 413, 414t
 edição do, 409-411
 exportador, 613
 iniciação da transcrição e, 396
 modificação do, 409-411
 moléculas, 612
 não tradutor, 425
 policistrônico, 430
 relação com o DNA cromossômico, 376f
 sequência de nucleotídeos do, 414
 mutações causadas por alterações na, 417-418, 418f
- RNA nuclear pequeno, 365t, 367, 394, 395t, 470
- RNA pequeno, 367-368
- RNA ribossomal, 366-367, 394. *Ver também* RNA
 como peptidiltransferase, 422, 423t
- RNA silenciador, 470
- RNA transportador, 365-366, 394, 395t, 415-416, 416f. *Ver também* RNA
 aminoacil, na síntese proteica, 422
 processamento e modificação de, 411
 precursores para, 409
 região de anticódon do, 414-415
 supressor, 418
- RNAP. *Ver* RNA-polimerase
- RNA-polimerase dependente de DNA, 395-396
- RNA-polimerase dependente de DNA, na síntese de RNA, 397
- RNA-polimerase dependente de DNA bacteriano, 397
- RNAs pequenos de interferência (si), 368
- RNase. *Ver* Ribonucleases
- RNPs. *Ver* Partículas de ribonucleoproteínas
- Rodopsina, 547, 551f
- rRNA. *Ver* RNA ribossomal
- RT-PCR, 470
- RXR. *Ver* Receptor de retinoide X
- RYR. *Ver* Receptor de rianodina
- S**
- S₅₀, 81
- SAA. *Ver* Amiloide sérico A
- Sacaropina, no catabolismo de lisina, 306, 306f
- Sacaropina-desidrogenase, 300t
- Sacarose, 156, 157f, 157t
 índice glicêmico de, 538
- S-Adenosil-homocisteína-hidrolase, 300t
- S-Adosilmethionina, 308, 308f, 315, 316f, 343, 343f, 344t
 biossíntese de, 316f
- Sais (ácidos biliares), 273-274
 circulação entero-hepática de, 274
 na digestão e absorção de lipídeos, 539
 secundários, 273f, 274
 síntese de, 273-274, 273f
 regulação de, 273f, 274
- Sangue, funções do, 669t
- Sarcolema, 647
- Sarcômero, 648
- Sarcoplasma, 647-648
- Sarcosina (N-metilglicina), 318
- SARs. *Ver* Relações estrutura-atividade
- Saúde, processos bioquímicos normais como base da, 3-4
- Scrapie, 45
- SDS-PAGE. *Ver* Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- Sec12p, 621
- Secreção constitutiva, 608
- Secreção regulada, 608
- Segundos mensageiros, 91-92, 500, 520. *Ver também* tipo específico
 cAMP como, 179
 cGMP como, 343
 precursores de
 fosfatidilinositol como, 216, 216f
 fosfolipídeos como, 245
- Selectinas, 579-580
- Selênio, 562
 na glutationa-peroxidase, 122, 200
- Selenocisteína, 16, 18
 síntese de, 285-286, 286f
- Selenofosfato-sintase, 285-286, 286f
- Seletividade/permeabilidade seletiva, membrana, 477, 485-490, 485t, 488f, 489t
- Senescência replicativa, 765
- Sensibilidade de testes de laboratório, 592, 592t
- Separação de proteínas
 aparelho de Golgi na, 608, 608f, 618
 arranjo de membrana e, 624-625
 chaperonas e, 619
 distúrbios, mutações em genes que codificam, 625
 hipótese de sinal de ligação de polirribossomos e, 609f, 614-616, 614t
 importinas e exportinas na, 612, 612f
 inserção cotraducional e, 615f, 616, 618
 mitocôndrias na, 609f, 610
 peroxissomos/distúrbios de peroxissomos e, 614, 614t
 resposta de proteínas não dobradas em, 619

- sequência de aminoácidos KDEL e, 608t, 618
 sequências sinalizadoras e, 607-610, 615f
 transporte retrógrado e, 618
 vesículas de transporte e, 620-624, 621t, 622f
- Sequência de DNA repetitiva, 377
- Sequência iniciadora, 401
- Sequência sinalizadora, 614, 622, 670. *Ver também* Peptídeo sinalizador
- Sequência-líder. *Ver* Peptídeo sinalizador
- Sequenciamento de proteínas
 biologia molecular no, 30
 espectrometria de massas no, 31, 31t, 32f
 genômica e, 33
 proteômica e, 33-34
 purificação de peptídeos para, 26-29
 purificação para, 26-29, 29f
 reação de Edman no, 29-30, 30f
 método de Sanger de, 29
- Sequenciamento do exoma, 99
- Sequências de aminoácidos. *Ver também*
 Sequenciamento de proteínas
 estrutura primária determinada por, 22
- Sequências de direcionamento da matriz
 peroxissomal, 608t, 613, 613f
- Sequências de inserção não clivadas, 616
- Sequências de replicação autônoma, 381, 468
- Sequências intervenientes. *Ver* Íntons
 (sequências intervenientes)
- Sequências repetitivas de microssatélites,
 377-378, 469
- Sequências repetitivas intercaladas curtas, 377,
 470
- Sequências repetitivas intercaladas longas, 377
- Sequências topogênicas, 616
- Sequências-consenso, 403, 407f
 de Kozak, 421
- Sequências-consenso de Kozak, 421
- Sequestro do folato, 558f
- Serina, 16t, 316
 catabolismo de, formação de piruvato e, 301,
 302f
 fosforilada, 317-318
 na síntese de cisteína e homosserina, 284-285,
 285f
 na síntese de glicina, 283, 284f
 resíduos conservados e, 66, 66t
 síntese de, 283, 284f
 tetra-hidrolato e, 559
- Serina 195, na catálise covalente, 64-65
- Serina-hidroximetiltransferase, 559
- Serinas-protease. *Ver também* tipo específico
 na catálise covalente, 64-65
 resíduos conservados e, 64-65, 66
 zimogênios de, na coagulação sanguínea, 712,
 714t
- Serotonina, 316, 703t
 biossíntese e metabolismo de, 319f
- Serpina, 679
- SGOT. *Ver* Aspartato-aminotransferase
- SGPT. *Ver* Alanina-aminotransferase
- SHA. *Ver* Ácido hidroxâmico suberoilânilida
- SHBG. *Ver* Globulina de ligação dos hormônios
 sexuais
- Shunt da hexose-monofosfato. *Ver* Via das
 pentoses-fosfato
- Silenciador, da expressão gênica, 429
- Silício, 562t
- Sinais de exportação nuclear, 612
- Sinais de terminação, 414
 ou transcrição bacteriana, 403
- Sinais epigenéticos, transmissão e propagação
 de, 440f
- Sinais epigenéticos *cis/trans*, 438, 439f
- Sinais intracelulares, 520
- Sinal. *Ver também* Peptídeo sinalizador
 transmissão de, 478t. *Ver também* Transdução
 de sinal
- Sinal de localização nuclear, 608t, 611-612, 612f
- Sinal de manose-6-fosfato/manose-6-P no fluxo
 de proteínas, 608t
- Sinal de manose-6-P, 581
- Sinal de término de transferência, 616
- Sinal transitório de inserção. *Ver* Peptídeo
 sinalizador
- Sinalização autócrina, 706
- Sinalização parácrina, 706
- Sinalização transmembrana, 477, 494, 720-721
 na ativação de plaquetas, 719f, 720-721
- Sinaptobrevina, 623
- Síndrome carcinóide, 557
- Síndrome cérebro-hepatorrenal (Zellweger), 231,
 614, 614t
- Síndrome congênita do QT longo, 496t
- Síndrome coronária aguda, 698
- Síndrome da insuficiência respiratória,
 deficiência de surfactante causando,
 216, 250
- Síndrome de 5q, 692
- Síndrome de Alport, 631
- Síndrome de Angelman, 289
- Síndrome de Chédiak-Higashi, 619t
- Síndrome de Crigler-Najjar
 tipo I (icterícia não hemolítica congênita),
 333
 tipo II, 333
- Síndrome de Crigler-Najjar tipo I (icterícia não
 hemolítica congênita), 333
- Síndrome de Dubin-Johnson, 333
- Síndrome de Ehlers-Danlos, 47, 282, 627, 630,
 631t
- Síndrome de Gilbert, 333
- Síndrome de Hermansky-Pudlak, 619t
- Síndrome de hiperornitinemia, hiperamoniemia
 e homocitrulinúria, 295
- Síndrome de hiperornitinemia-hiperamoniemia,
 299
- Síndrome de Kartagener, 665
- Síndrome de Lesch-Nyhan, 354-355
- Síndrome de Marfan, 632, 632f
- Síndrome de Menkes, 47, 281-282
 deficiência de cobre, 631
- Síndrome de Reye, acidúria orótica na, 356
- Síndrome de Richner-Hanhart, 304
- Síndrome de Stickler, 643
- Síndrome de von Hippel-Lindau, 289
- Síndrome de Wernicke-Korsakoff, 550t
- Síndrome de Williams-Beuren, 632
- Síndrome de Zellweger (cérebro-hepatorrenal),
 231, 614, 614t
- Síndrome do estresse porcino, 654
- Síndrome HHH. *Ver* Síndrome de
 hiperornitinemia, hiperamoniemia e
 homocitrulinúria
- Síndrome oculocerebrorrenal, 619t
- Síndrome pré-menstrual, vitamina B₆ no
 tratamento da, neuropatia sensitiva e,
 558
- Síndrome rotora, 332t
- Síndromes de Hunter, 638
- Síndromes de Hurler, 638
- SINEs. *Ver* Sequências repetitivas intercaladas
 curtas
- Síntese de ácidos graxos, carboidratos na,
 145-146
- Síntese de androgênios, 504f, 505
- Síntese de cortisol, 504
- Síntese de Fourier, 43
- Síntese de glicose, ácidos graxos e, 145-146
- Síntese de oligonucleotídeos, 457-458
- Síntese proteica
 aminoácidos na, 141, 141f
 em ribossomos, 26f
 reticulócitos e, 692
- Sinvastatina, 275
- siRNAs, 368
- Sirtuínas, 94
- Sistema ABO
 importância na transfusão sanguínea, 697
 substâncias ABO e, 696-698
- Sistema carnitina, 132
- Sistema circulatório, 632
- Sistema da elongase de ácidos graxos, 236,
 237f
 na síntese de ácidos graxos poli-insaturados,
 239, 239f
- Sistema da elongase microsomal, 236, 237f
- Sistema de Genebra, para nomenclatura de
 ácidos graxos, 212
- Sistema de numeração estereoquímico (-sn),
 215, 216f
- Sistema de transporte/difusão facilitada, 485f,
 485t, 486-487, 488f
 e transportadores, 486-487
 hormônios na regulação do, 487
 modelo "pingue-pongue" de, 487, 488f
 para a bilirrubina, 331
 para a glicose. *Ver também* Transportadores
 de glicose
 insulina afetando, 491
- Sistema do citocromo P450, 119, 123-124, 123f,
 124f, 584-585, 618
 ALA-sintase afetada por, 327, 330
 famílias do, 584t
 indução de enzimas e, 330
 inserção na membrana, 616
 isoformas do, 584-585
 em tecidos, 584
 no RE do fígado humano, 584-585
 nomenclatura para, 584
 mitocondrial, 123-124
 polimorfismo do, 585
 propriedades do, 585t
 reação catalisada pelo, 584
 superfamília de enzimas contendo heme, 584
- Sistema do complemento (cascata), 685-686,
 686f
- Sistema efetor do receptor hormonal-proteína
 G, 521, 521f
- Sistema endócrino. *Ver também* Hormônios
 diversidade do, 498-517
 regulação neural do, 498
- Sistema esquelético, 632
- Sistema extramitocondrial, síntese de ácidos
 graxos no, 232
- Sistema heme-oxigenase, 330, 330f
- Sistema imune
 adaptativo, 706
 disfunções do, 686-687
- Sistema imune adaptativo, 685, 706
- Sistema imune inato, 685

- Sistema microsomal de oxidação do etanol dependente do citocromo P450, 261
- Sistema nervoso
deficiência de tiamina afetando, 555-556
glicose como necessidade metabólica para, 146-147
- Sistema nervoso central, glicose como necessidade metabólica para, 146-147
- Sistema porta hepático, 190
na circulação de metabólitos, 142, 143f
- Sistemas antiporta, 486f, 487, 572
- Sistemas de cotransporte, 486f
- Sistemas de troca por difusão, 133
- Sistemas isotérmicos, sistemas biológicos como, 113
- Sistemas livres de célula, vesículas estudadas em, 621
- Sistemas simporte, 487
- Sistemas transportadores/de transporte, 481, 616. *Ver também* tipo específico
ativos, 485, 485f, 485t, 487
cassete de ligação do ATP, 258f, 259
comparação com canais iônicos, 486t
difusão facilitada, 485f, 485t, 486, 487, 488f
difusão passiva envolvendo, 485-486
genes codificando, 625
glicose. *Ver* Transportadores de glicose
membrana, 487
na inserção cotraducional, 616, 617f
transporte ativo envolvendo, 486-487
- Sistemas uniporte, 485f, 487
- Sítio A (aminoacil/aceptor), ligação ao aminoacil-tRNA, 422, 423f
- Sítio acceptor (A/aminoacil), ligação ao aminoacil-tRNA, 422, 423f
- Sítio alostérico, 91
- Sítio aminoacil (A/aceptor), ligação ao aminoacil-tRNA, 422, 423f
- Sítio ativo, 62-63, 63f. *Ver também* Sítio catalítico
- Sítio catalítico, 91. *Ver também* Sítio ativo
- Sítio de saída (E), na síntese proteica, 422, 423f
- Sítio E (de saída), na síntese proteica, 422, 423f
- Sítio interno de entrada no ribossomo, 425, 426f
- Sítio promotor, no modelo óperon, 430f, 431
- Sítio *PstI*, inserção de DNA no, 456f
- Sítios Cos, 455
- Sítios de contato, 610
- Sítios hipersensíveis, cromatina, 374
- SK. *Ver* Estreptocinase
- α -SNAP, 623
- SNPs. *Ver* Polimorfismos de nucleotídeo único
- snRNA. *Ver* RNA nuclear pequeno
- Sobrecarga de ferro, 541
- Sódio, 562
coeficiente de permeabilidade do, 481f
nos líquidos extracelular e intracelular, 478, 478t
- Soluções, aquosas, K_w de, 10
- Solvente, água como, 6-7, 7f
- Sono, prostaglandinas no, 232
- Sorbitol
intolerância, 205
na catarata diabética, 205
- Sorbitol-desidrogenase, 202f, 203
- SPCA. *Ver* Acelerador de conversão da protrombina sérica
- Spliceossomo, 470
- SR, 614, 614t
- SR-B1. *Ver* Receptor scavenger B1
- SRP. *Ver* Partícula de reconhecimento de sinal
- SRS-A. *Ver* Substância de reação lenta da anafilaxia
- SSBs. *Ver* Proteínas de ligação de DNA de fita simples
- ssDNA. *Ver* DNA de fita simples
- StAR. *Ver* Proteína reguladora aguda da esteroidogênese
- Sticky patch*, na hemoglobina S, 58
- Subnutrição, 537, 541-543
- Substância de reação lenta da anafilaxia, 242
- Substâncias do grupo sanguíneo A, 697-698, 697f
- Substâncias do grupo sanguíneo B, 697-698, 697f
- Substâncias do grupo sanguíneo H, 697-698, 697f
- Substituição assimétrica, em porfirinas, 323, 324f
- Substituição de bases, mutações ocorrendo por, 416-417, 416f
- Substituição molecular, 43
- Substratos, 64
alterações de conformação em enzimas causadas por, 64, 64f
concentração de, velocidade de reação catalisada por enzimas afetada por, 78-79
modelo de Hill de, 79-81
modelo de Michaelis-Menten de, 81
inibidores competitivos semelhantes a, 82
subunidade β , 615
- Subunidade β do SRP-R, 615
- Succinato, 163f
- Succinato Q redutase, 127, 128, 128f
- Succinato-desidrogenase, 121, 163f, 164
inibição de, 82
- Succinato-semialdeído, 320, 321f
- Succinato-tiocinase (succinil-CoA-sintase), 163f, 164
- Succinil-CoA, na síntese de heme, 325-327, 325f, 328f
- Succinil-CoA-acetato-CoA-transferase (tioforase), 164, 227
- Succinil-CoA-sintase (succinato-tiocinase), 163f, 164
- Suco celular. *Ver* Citosol
- Sulco maior, no DNA, 361f, 362
modelo óperon e, 431
- Sulco menor, no DNA, 361f, 362
- Sulfação, 586
- Sulfatídeo, 218
- Sulfato, 571
ativo (adenosina-3'-fosfato-5'-fosfossulfato), 343, 343f
- Sulfato ativo (adenosina-3'-fosfato-5'-fosfossulfato), 343f, 344
- Sulfato de condroitina, 159, 159f, 637, 640
- Sulfato de dermatan, 638
- Sulfato de heparan, coagulação/trombose afetada por, 720
- Sulfatos de esteroides, 250
- Sulfeto de hidrogênio, 132f
- Sulfo(galacto)-glicerolípideos, 250
- Sulfogalactosilceramida, 250
acúmulo de, 251
- Sulfonamidas, 694
- Sulfotransferases, 636
- Superespirais negativas, DNA, 362
- Superfamília de receptores nucleares, 530, 531f
características estruturais, 530
- Super-hélice para a direita, 628
- Super-hélices, DNA, 362, 387, 387f
- Superóxido, 124, 567, 693. *Ver também* Radicais livres
- Superóxido dismutase, 124-125, 220, 693
- Surfactante, 245
deficiência de, 216, 250
- Surfactante pulmonar, 245
deficiência de, 216, 250
- T**
- $t_{1/2}$. *Ver* Meia-vida
- T_3 . *Ver* Tri-iodotironina
- T_4 . *Ver* Tireoxina
- Tabagismo na metionina, 679
- Tabelas de utilização de códons, 415
- TAFs. *Ver* Fatores associados à TBP
- Tag SNPs, 101
- Talassemias, 58
- β -Talassemias, 58, 460, 693t
alterações estruturais das, 461f
- Tamoxifeno, 740t
- Tampões
equação de Henderson-Hasselbalch descrevendo o comportamento de, 12
ácidos fracos e seus sais como, 12-13
- Tandem, 470
- TaqI, 452t
- TATA box, no controle da transcrição, 400, 403
- Taxa de reposição do epitélio intestinal, 757t
- Taxa de reposição proteica, 89, 287-288
membranas afetando, 624-625
taxa de degradação enzimática e, 89-90
- Taxa metabólica basal, 542
- TBG. *Ver* Globulina de ligação da tireoxina
- tblastn, 103
- tblastx, 103
- TBP. *Ver* Proteína de ligação de TATA
- Tecido adiposo, 140, 212, 261, 262f, 663
ADP, 341f
captação de glicose para, 148
captura da energia livre do catabolismo por, 132
marrom, 264, 264f
metabolismo no, 147f, 150t, 261, 262f
no estado de jejum, 148, 149
- Tecido adiposo marrom, 264, 264f
- Tecido gorduroso. *Ver* Tecido adiposo
- Técnicas de coagulação, 456-457
- Técnicas de transfusão sanguínea, 452
- Tecnologia de microarranjo de alta densidade, 465
- Tecnologia genômica, 451-468. *Ver também* DNA recombinante/tecnologia do DNA recombinante
- Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT), 34
- Telomerase, 374, 765
atividade em células de câncer, 732
- Telômeros, 374, 375f
composição, 765
funções de, 765
na replicação, 765f
- Temperatura
no modelo do mosaico fluido da estrutura da membrana, 483
velocidade de reação catalisada por enzimas afetada por, 77-78
velocidade de reação química afetada por, 74
- Temperatura de fusão/temperatura de transição, 361, 483

- Temperatura de transição/temperatura de fusão (T_m), 361, 483
- Tempo de protrombina (TP), 598, 598t
- Tempo de sangramento da pele, 721
- Tempo de vida
evolução e, 766
vs. longevidade, 756
- Tempo de vida vs. massa corporal para mamíferos, 764, 764t
- Tenofovir-disoproxil-fumarato, 85
- Teobromina, 342, 342f
- Teofilina, 342, 343f
- Teoria cinética (colisão), 75
- Teoria da colisão (cinética), 75
- Teoria do envelhecimento das mutações somáticas, 763
- Teoria do envelhecimento por radicais livres, 760
- Teoria mitocondrial do envelhecimento e radicais livres, 760
- Teoria quimiosmótica, 132-133
no controle respiratório, 130, 131f, 132-133
- Teoria quimiosmótica de Mitchell. *Ver* Teoria quimiosmótica
- Teorias do envelhecimento de uso e desgaste, 756-762
espécies reativas de oxigênio, 758-760, 758f, 759f
glicação proteica, 761-762, 762f
mecanismos de reparo molecular e, 762-764
mitocôndrias, 760-761
radiação ultravioleta, 761, 761f
radicais livres, 760
reações hidrolíticas, 756-758, 757f
- Teorias metabólicas do envelhecimento, 764-765
- Terapia gênica, 3, 464, 625
para defeitos na biossíntese de ureia, 296
- Terminação
cadeia, no ciclo de transcrição, 397
da síntese de RNA, 396
da síntese proteica, 423, 424f
- Terminação da cadeia. *Ver também* Terminação no ciclo de transcrição, 396f
- Terminal-transferase, 453t, 470
- Termodinâmica
bioquímica (bioenergética), 113-116.
Ver também ATP
leis da, 113-114
interações hidrofóbicas e, 8
reversão da glicólise e, 185-187
- Termogênese, 264, 264f
induzida por dieta, 264, 542, 543
- Termogênese induzida por dieta, 264, 542
- Termogenina, 132, 264, 264f
- Teste de estímulo Synacthen, 599
- Teste de lise, multinuclearidade eritroblástica hereditária com, 580
- Teste de supressão da dexametasona, 599
- Testes de depuração, 597
- Testes de diagnóstico molecular, 3
- Testes de função da tireoide, 598-599, 598t
hormônio estimulante da tireoide, 598
níveis séricos de tiroxina total, 598
- Testes de função de órgão
testes de função da tireoide, 598-599
testes de função hepática, 596t, 597-598, 598t
testes de função renal, 596-597, 596t
testes de função suprarrenal, 599
- Testes de função hepática, 597-598, 598t
- Testes de função renal, 596-597, 596t
- Testes de função suprarrenal, 599
- Testes diagnósticos. *Ver* Exames laboratoriais
- Testosterona, 501
metabolismo, 505
produto metabólico da, 505
via de biossíntese, 506f
- Tetra-hidrobiopterina, 285f
- Tetra-hidrofolato, 559, 559f, 560f
- Tetraiodotironina (tiroxina: T_4), 510
armazenamento de, 515t
no plasma, 516t
síntese, 510
- Tetrâmero de histonas, 371, 373
- Tetrâmeros
hemoglobina como, 54
histona, 371, 373
- Tetroses, 152, 153t
- Tf. *Ver* Transferrina
- TFIIA, 403
- TFIIB, 403
- TFIID, 403, 404
- TFIIE, 403
- TFIIF, 403
- TFPI. *Ver* Inibidor da via do fator tecidual
- TfR. *Ver* Receptor de transferrina
- TGN. *Ver* Rede *trans*-Golgi
- Tiamina (vitamina B_1), 555-556, 555f
coenzimas derivadas de, 62
metabolismo do piruvato afetado por, 173, 174, 555-556
no ciclo do ácido cítrico, 164
- Tiamina-difosfato, 172, 198, 555, 555f
- Tiamina-pirofosfato, 62
- Tiamina-trifosfato, 555
- Ticagrelor, 721
- Tigllil-CoA, catabolismo de, 311f
- TIM. *Ver* Translocase da membrana interna
- Timidilato, 359
- Timidina, 341t
pareamento de bases no DNA, 360, 361f
- Timina, 341t
- Tiocinase (acil-CoA-sintase)
na ativação de ácidos graxos, 224, 224f
na síntese de triacilgliceróis, 246, 262f, 264
- Tioesterase, 233, 233f, 234
- Tioforase (succinil-CoA-acetacetato-CoA-transferase), 164, 227
- 6-Tioguanina, 344, 344f
- Tiolase, 224f, 225, 225f, 227
na síntese de mevalonato, 267, 267f
- Tiorredoxina, 352
- Tiorredoxina-reductase, 352, 352f
- Tipo sanguíneo, 697
- Tireoglobulina, 510
- Tiroxina (T_4), 501, 510, 598
- Tirosina, 17t, 317, 320f, 501
catabolismo de, 304, 305f
epinefrina e norepinefrina formadas a partir de, 320f
fosforilada, 317-318
na hemoglobina M, 58
necessidades para, 544
síntese de, 285, 285f
síntese de hormônios a partir de, 509-515
- Tirosina-aminotransferase, 300t
defeito na tirosinemia, 304
- Tirosina-hidroxilase na biossíntese de catecolamina, 509
- Tirosinemia, 304
- Tirosinemia neonatal, 304
- Tirosinose, 304
- Titina, 655
- T_m . *Ver* Temperatura de fusão/temperatura de transição
- TMB. *Ver* Taxa metabólica basal
- TMP (monofosfato de timidina), 341t, 342f
- Tocoferol, 550t, 553f. *Ver também* Vitamina E como antioxidante, 125, 220, 553
 α -tocoferol, 567
- Tocotrienol, 553, 553f. *Ver também* Vitamina E
- Tolbutamida, 231
- Tolerância à glicose, 193f, 194
- TOM. *Ver* Translocase da membrana externa
- Topoisomerases, DNA, 362, 386, 387f
- Toxemia da gravidez em ovelhas
cetose em, 231
esteatose hepática e, 261
- Toxicidade, vitamina, 546
- Toxicidade do oxigênio, radical livre superóxido e, 124. *Ver também* Radicais livres
- Toxina botulínica B, 623
- Toxina diftérica, 426-427, 490
- Toxinas microbianas, 490
- tPA. *Ver* Ativador de plasminogênio tecidual
- TpC. *Ver* Troponina C
- TpI. *Ver* Troponina I
- TpT. *Ver* Troponina T
- Tradução, 414
- Tradução de *nick*, 469
- Tráfego intracelular, 607-626. *Ver também*
Separação de proteínas
distúrbios devidos a mutações nos genes codificadores, 614t, 625
vesículas de transporte no, 620-624
- Transaldolase, 198, 199f
- Transaminação, 141, 141f
ciclo do ácido cítrico na, 164, 165f
na biossíntese de ureia, 290-291, 290f
no catabolismo do esqueleto de carbono de aminoácidos, 298-299, 298f
- Transaminases. *Ver* Aminotransferases
- Transcetolase, 198, 199f
hemácias, na avaliação do estado nutricional da tiamina, 556
tiamina-difosfato em reações envolvendo, 198, 556
- Transcitose, 623
- Transcortina. *Ver* Globulina de ligação dos corticosteroides
- Transcrição, 362-363, 465
ácido retinoico na regulação da, 547
ativadores e coativadores, no controle de, 404-405
em eucariotos 403-405
iniciação da, 396
na regulação da expressão gênica, 433-437.
Ver também Expressão gênica na síntese de RNA, 360
promotores bacterianos na, 399
promotores de eucariotos na, 400-403
reverso em retrovírus, 364, 387
- Transcrição em células eucarióticas, expressão gênica em, 447t
- Transcriptase reversa/transcrição reversa, 364, 380, 470
na tecnologia do DNA recombinante, 453t
- Transcriptômica, 3
- Transcrito de RNA, e perfis de proteína, 465
- Transcritos primários, 396, 409
- Transdução de sinal
ao longo de membranas, 494

- mensageiros intracelulares em. *Ver* tipo específico
na ativação de plaquetas, 719f, 720-721
- Transfecção de DNA, endocitose na, 492
- Transferases, 61
- Transferência de energia, 116
- Transferrina, 541, 668, 672t, 673-674, 676
- Transfusão sanguínea, importância do sistema ABO na, 697
- Transglutaminase, na coagulação sanguínea, 712, 714t, 716f
- Transição do mesênquima epitelial, 738
- Transidrogenase, translocadora de prótons, 134
- Transidrogenase translocadora de prótons, 134
- Translocação
de proteína, 26f, 610
para o lúmen, 614
- Translocação cromossômica, 726, 726t
- Translocação pós-traducional, 616, 616f
- Translocase da membrana externa, 610
- Translocase da membrana interna, 610
- Translócon, 615
- Transportador 1 com cassete de ligação ao ATP, 258f, 259
- Transportador de ânion orgânico multiespecífico, 331
- Transportador de cetoglutarato, 134, 135f
- Transportador de creatina-fosfato, 135, 135f
- Transportador de fosfato, 134, 134f
- Transportador de glicerofosfato, 134, 134f
- Transportador de glutamato/aspartato, 134, 135f
- Transportador de metais divalentes, 673
- Transportador de nucleotídeo de adenina, 132f, 134
- Transportador de prótons, 65
- Transportadores de elétrons, coenzimas flavinas como, 556
- Transportadores de glicose, 191, 191t, 691, 691t
insulina afetando, 491
na regulação da glicemia, 191, 191t, 192, 262
- Transportadores de substratos, 134, 134f, 135f
coenzimas como, 62
- Transportadores de troca, 133-135, 135f
- Transporte anterógrado (COPII), 621, 622f
- Transporte ativo, 331f, 485, 485f, 485t, 486, 486f, 486t
na secreção de bilirrubina, 331
- Transporte de malato, 134, 135f
- Transporte de membrana, 485f, 485t, 486f, 487, 488f. *Ver também* mecanismos específicos
- Transporte inverso de colesterol, 258f, 259, 267, 271f, 274
- Transporte retrógrado, 618, 621
a partir do aparelho de Golgi, 618
de proteínas dobradas erroneamente, 618
- Transposição, 380
retroposons/retrotransposons e, 377
- Transposição cromossômica, 380
- Transtirretina, 680
- Trastuzumabe, 740t
- Trauma, perda de proteínas e, 544
- Trealase, 538
- Trealose, 157t
- Treonina, 16t
catabolismo da, 303
fosforilada, 317-318
necessidades para, 544
- Triacilgliceróis (triglicerídeos), 215, 216f, 254, 263-264
digestão e absorção de, 538-539, 540f
interconvertibilidade de, 145-146
metabolismo de, 140, 141f, 143, 143f
esteatose hepática e, 260-261, 260f
hepático, 259-260
hidrólise no, 246
lipoproteínas de alta densidade no, 258-259, 258f
no tecido adiposo, 261, 262f
no núcleo de lipoproteínas, 254-255, 255f
no tecido adiposo, 140
redução dos níveis séricos de, medicamentos para, 274, 275
síntese de, 246-250, 247f
transporte de, 255-257, 256f, 257f
- Triagem de "alto débito", 66-67
- Trifosfato de adenosina. *Ver* ATP
- Trifosfato de citidina, 343
na fosforilação, 118
- Trifosfato de uridina (UTP), na biossíntese de glicogênio, 176, 177f
- Triglicerídeos. *Ver* Triacilgliceróis (triglicerídeos)
- Tri-iodotironina (T₃), 510
armazenamento de, 515t
no plasma, 516t
síntese, 510
- Trimetoprima, 559
- Triocinase, 202, 202f
- Triose-fosfato-isomerase, 40f
- Trioses, 152, 153t
- Trioses-fosfatos, acilação de, 140
- Tripsina, 539
na digestão, 539
resíduos conservados e, 66t
- Tripsinogênio, 539
- Triptofano, 17t, 316, 547
catabolismo do, 306-308, 307f
coeficiente de permeabilidade do, 481f
deficiência do, 557
necessidades para, 544
niacina sintetizada a partir do, 557
- Triptofano-oxigenase/L-triptofano oxigenase (triptofano pirrolase), 123, 307f, 308
- tRNA. *Ver* RNA transportador
- tRNA supressor, 418
- Troca de classe (isótipo), 684
- Troca de cromátides-irmãs, 380
- Troca de isótipo (classe), 684
- Trocador de Ca²⁺-Na⁺, 657
- Trocas moleculares, 621
- Trombina, 712, 712f, 716f
a partir de protrombina, ativação do fator Xa da, 714-715
antitrombina III afetando, 717
formação de fibrina e, 715-717, 716f
na ativação de plaquetas, 719f, 720
níveis de controle da circulação da, 717
- Trombo branco, 712
- Trombo vermelho, 712
- Trombocitopenia, 698
- Trombólise
exames de laboratório na avaliação de, 721
tPA e estreptocinase na, 718-719, 718f
- Trombomodulina, na coagulação sanguínea, 714t, 717, 721t
- Trombopoietina, 690
- Trombose, 711-721. *Ver também* Coagulação (sangue)
antitrombina III na prevenção de, 717
- fases da, 711
hiper-homocisteinemia e, suplementos de ácido fólico na prevenção de, 560
na deficiência de proteína C ou proteína S, 717
níveis de trombina circulantes e, 717
produtos das células endoteliais na, 720, 721t
tipos de trombos e, 712
tPA e estreptocinase no tratamento de, 718-719, 718f
- Tromboxano A₂, 214f
na ativação de plaquetas, 719f, 720
- Tromboxanos, 213, 214f, 232, 239
significado clínico de, 242
via da cicloxigenase na formação de, 239, 241f
- Tropocolágeno, 46, 630
- Tropoelastina, 631
- Tropomiosina, 648, 650f, 652, 695t
como inibidor de músculo estriado, 653
- Troponina, no diagnóstico de infarto do miocárdio, 69
- Troponina C, 653
- Troponina I, 652-653
- Troponina T, 652
- Troponina/complexo de troponina, 648, 650f, 652-653
como inibidor do músculo estriado, 653
- Troponinas cardíacas, 69
- TSEs. *Ver* Encefalopatias espongiiformes transmissíveis
- TSH. *Ver* Hormônio estimulador da tireoide
- α-Tubulina, 665
- β-Tubulina, 665
- γ-Tubulina, 665
- Tumores, 722
imunologia de, 741-742
pH e tensão de oxigênio em, 739
- TXs. *Ver* Tromboxanos
- U**
- Ubiquinona (Q/coenzima Q), 219
na cadeia respiratória, 127, 128f, 129f
na síntese de colesterol, 268f, 269
- Ubiquitina e degradação de proteínas, 288-289, 620, 620f
- Ubiquitinação, 26f
de proteínas dobradas erroneamente, 620, 620f
- Ubiquitinação, 90, 288
- UDPGal. *Ver* Uridina-difosfato-galactose (UDPGal)
- UDPGlc. *Ver* Uridina-difosfato-glicose (UDPGlc)
- UDPGlc-pirofosforilase, 571f
- UDP-glicose. *Ver* Uridina-difosfato-glicose (UDPGlc)
- Úlceras, 537
- Úlceras pépticas, 581, 599
- UMP (monofosfato de uridina), 341t, 342f
- Unidade de transcrição, 396
- Unidade de transcrição de resposta hormonal, 530f
- Unidades de isopreno, poliprenoides sintetizados a partir de, 219, 220f
- Unidades de N-acetil-lactosamina, 575
- UniProtKB, 101
- Uracila, 341t
- Uracilúria-timinúria, 347, 356

- Urato, como antioxidante, 220
- Ureia
 catabolismo de nitrogênio produzindo, 292-293
 coeficiente de permeabilidade da, 481f
 metabolismo de aminoácidos e, 141, 141f
 síntese de, 290-291, 290f, 291f
 distúrbios metabólicos associados à, 294-296, 295t
 enzimas ativas, 750t
 terapia gênica para, 296
- Ureia sérica como marcador da função renal, 597
- Uridina, 340f, 341t
- Uridina-difosfato-galactose (UDPGal), 203, 571
- Uridina-difosfato-galactose-4-epimerase, 203, 203f
- Uridina-difosfato-galactose-desidrogenase, 201f
- Uridina-difosfato-glicose (UDPGlc), 176, 177f, 571
 na biossíntese de glicogênio, 176, 177f
- Uridina-difosfato-glicose-pirofosforilase, 200, 201f
 na biossíntese do glicogênio, 176, 177f
- Uridina-difosfato-glicuronato/ácido glicurônico, 200, 201f
- Urina, componentes anormais da, 596-597, 597t
- Urobilinogênios, 334t
 bilirrubina conjugada reduzida a, 332
 na icterícia, 333-334
 valores normais para, 334t
- Urocinase, 718, 718f
- Uroporfirinas, 324f
 espectrofotometria para detecção de, 327-329
- Uroporfirinogênio I, 326, 326f, 328f
- Uroporfirinogênio III, 326, 326f, 328f
- Uroporfirinogênio sintase I, na porfiria, 328t
- Uroporfirinogênio-descarboxilase, 325f, 326, 326f, 328f, 328t
 na porfiria, 328t
- UTP, na fosforilação, 118
- V**
- Valina, 16t
 catabolismo de, 309, 310f, 311f
 interconversão de, 285
 necessidades para, 544
- Valinomicina, 134
- Valor preditivo de exames laboratoriais, 593
- Vanádio, 562t
- Varfarina, 554, 555, 717
 vitamina K afetada por, 554
- Varição diurna, na síntese de colesterol, 270
- Varição no número de cópias, 460, 731
- Vasodilatadores, 647
 óxido nítrico como, 660-661
- Vasos sanguíneos, óxido nítrico afetando, 660-661
- VEGF. *Ver* Fator de crescimento do endotélio vascular
- Velocidade
 inicial, 78
 inibidores afetando, 82
 máxima ($V_{máx}$)
 concentração de substrato e, 78-79
 efeitos alostéricos na, 91
 equação de Michaelis-Menten na determinação da, 79
 inibidores afetando, 79
- Velocidade inicial, 78
 inibidores afetando, 82
- Velocidade máxima
 efeitos alostéricos na, 91
 inibidores afetando, 82-83
- Vesículas
 abordagens genéticas ao estudo, em leveduras, 621
 comunicação célula a célula, 494-496
 de transporte, 608, 620-624, 620f, 621t
 direcionadas, 620f
 revestimento, 621, 622f
 brefeldina A afetando, 623
 secretoras, 608, 609f
 tipos e funções, 621t
- Vesículas COPI, 618, 621, 621t
- Vesículas COPII, 618, 621, 621t
- Vesículas de transporte, 608, 616, 621-623, 621t, 622f
 definição, 621
 no revestimento de vesículas, 621
 no tráfego intracelular, 620-624
- Vesículas não revestidas de clatrina, 621
- Vesículas revestidas por clatrina, 621
- Vesículas secretoras, 608, 609f
- Vesículas sem clatrina, 621
- Vesículas sinápticas, 623
- Vestígios de quilomícrons, 254t, 255, 257f
 captação hepática de, 258
- Vetor de *E. coli* com base no bacteriófago P1 (PAC), 455
- Vetor de *Escherichia coli* com base no bacteriófago P1 (PAC), 455
- Vetor do BAC. *Ver* Vetor do cromossomo artificial bacteriano (BAC)
- Vetor do cromossomo artificial bacteriano (BAC), 455
- Vetor do cromossomo artificial de leveduras (YAC), 455
- Vetor PAC (com base em P1), 455
- Vetores de clonagem, 454-455, 455t
 tamanho da inserção de DNA, 455t
- v_i . *Ver* Velocidade inicial
- Via alternativa, 686
- Via clássica de ativação do complemento, 685
- Via da ciclooxigenase, 240-241, 241f, 242f, 720-721
- Via da lectina, 686
- Via da lipoxigenase, 239, 240, 241f, 243f
- Via da quinurenina-antranilato para o catabolismo do triptofano, 306, 307f
- Via das pentoses-fosfato, 140, 196-206, 197f, 199f, 200f
 citosol como local para reações da, 198-200
 enzimas da, 188t
 falha da, 204-205
 fase não oxidativa da, 198
 fase oxidativa da, 197f, 198, 199f
 hemólise de hemácias e, 204-205
 NADPH produzida por, 196, 197f, 199f
 para lipogênese, 234, 234f, 235f
 ribose produzida por, 197f, 200
- Via de degradação lisossomal, falha em lipídioses, 251
- Via de informação, 520f
- Via de polifosfoinositídeo, ativação de plaquetas e, 720
- Via de secreção (exocitótica), 608
- Via do ácido fosfatídico, 539
- Via do ácido urônico, 196, 200, 201f
 interrupção da, 205
- Via do glicerol-fosfato, 247f
- Via do monoacilglicerol, 246, 247f, 539
- Via do polioli (sorbitol), 205
- Via do receptor da morte, 733
- Via do sorbitol (polioli), 205
- Via excitotóxica (secretora), 608
- Via extrínseca de coagulação sanguínea, 712-713, 712f, 733
- Via intrínseca da coagulação sanguínea, 712f, 713-714
- Via Jak/STAT, 526, 528, 528f
- Via lisogênica, 433, 433f
- Via lítica, 433, 433f
- Via metabólica/fluxo de metabólitos, 141-145.
Ver também tipos específicos:
 Metabolismo
 natureza unidirecional de, 88
 reações de não equilíbrio em, 145
 reações geradoras de fluxo em, 145
 regulação de, 88-89, 88f, 145, 146f
 modificação covalente em, 92
- Via NF- κ B
 mecanismo de inibição, 528
 regulação, 528, 529f
- Vias anabólicas/anabolismo, 114, 139.
Ver também Reação endergônica:
 Metabolismo
- Vias catabólicas/catabolismo, 114, 139.
Ver também Reação exergônica:
 Metabolismo: substâncias específicas
 energia capturada nas, a partir da cadeia respiratória, 131-132, 131f
- Vias de transdução de sinais, 578
 e CBP/p300, 532f
- Vias/processos anfíóicos, 139
 ciclo do ácido cítrico e, 164
- Vimentinas, 666
- Vírus
 câncer causado por, 725, 726t
 síntese proteica da célula hospedeira afetada por, 425, 426f
- Vírus associado ao adenovírus, 455
- Vírus da gripe aviária (H5N1), 581
 representação esquemática do, 581
- Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), 581
- Vírus de DNA, 725
- Vírus de RNA, 725
- Vírus Epstein-Barr, 700
- Vírus oncogênicos, 724, 724f
- Vírus tumorais, 725
 oncogenes, 727-728
- Visão, vitamina A na, 547, 551f
- Vitamina A, 547, 551f
 deficiência de, 551
 excesso/toxicidade da, 551
 funções da, 547
 na visão, 547, 551f
- Vitamina B₁ (tiamina), 555-556, 555f
 coenzimas derivadas da, 62
 deficiência de, 555-556
 metabolismo do piruvato afetado por, 173, 174, 555-556
 no ciclo do ácido cítrico, 164
- Vitamina B₁₂ (cobalamina), 558-559, 558f
 absorção de, 558
 fator intrínseco na, 541
 deficiência de, 559
 na acidúria metilmalônica, 187
- Vitamina B₂ (riboflavina), 556, 556f
 coenzimas derivadas da, 62, 556

- deficiência de, 556
- desidrogenases dependentes de, 121
- no ciclo do ácido cítrico, 164
- Vitamina B₆ (piridoxina/piridoxal/
piridoxamina), 557-558, 557f
- deficiência de, 308f, 557
- excreção de xanturenato na, 308
- excesso/toxicidade da, 558
- Vitamina C (ácido ascórbico), 196, 561-562,
561f, 568t
- absorção de ferro e, 541, 562
- benefícios da, 562
- coenzima, 561-562
- como antioxidante, 220
- deficiência de, 562
- colágeno afetado na, 47
- na síntese de colágeno, 47, 562
- Vitamina D, 551-553
- deficiência de, 553
- ergosterol como precursor para, 219,
219f
- excesso/toxicidade de, 553
- metabolismo da, 552-553
- na absorção de cálcio, 541, 552
- Vitamina D₃ (colecalfiferol), 552
- como antioxidante, 124, 219
- formação e hidroxilação de, 508f
- Vitamina E, 553, 553f, 564, 567
- Vitamina H. *Ver* Biotina
- Vitamina K, 553-555, 554f
- deficiência de, 555
- na coagulação, 554
- proteínas de ligação de cálcio e, 554-555
- Vitamina K, hidroquinona da, 554, 555f
- Vitaminas, 3, 546-563, 550t
- consumo de nutrientes de, 548t-549t
- digestão e absorção de, 541, 542f
- funções metabólicas de, 547
- hidrossolúveis, 550t, 555-562
- lipossolúveis, 547-555, 550t
- no ciclo do ácido cítrico, 164
- Vitaminas B. *Ver* Complexo de vitaminas B
- VLDLs. *Ver* Lipoproteínas de densidade muito
baixa
- V_{máx}. *Ver* Velocidade máxima
- VNTRs. *Ver* Números variáveis de unidades
repetidas em *tandem*
- X**
- Xantina, 342, 342f
- Xantina-oxidase, 120
- deficiência de, hipouricemia e, 355
- Xanturenato, excreção de, na deficiência de
vitamina B₆, 308, 308f
- Xenobióticos
- classes principais de, 583
- definição, 583
- metabolismo de, 583-584
- enzimas envolvidas no, 583
- fases do, 583-584, 584-585
- para excreção pelo corpo, 583-584,
586-587
- reações de conjugação, 586-587
- respostas a
- antigenicidade, 587
- carcinogênicas, 587-588
- farmacológicas, 587-588
- imunológicas, 587-588
- tóxicas, 587-588, 587t
- Xeroftalmia, deficiência de vitamina A na, 550t,
551
- Z**
- Zimogênios, 92-93, 539, 668
- na coagulação sanguínea, 712, 713f, 714t
- resposta rápida à demanda fisiológica e, 92-93
- Zinco, 562
- Zíper de leucina, 444
- Zona pelúcida, 579
- ZP. *Ver* Zona pelúcida
- Zwitteríons, 20

