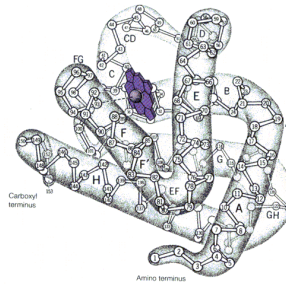


BIOQUÍMICA
1º ano de Medicina
Ensino teórico
2007/2008



10ª aula teórica

23 Outubro 2007

Princípios gerais de enzimologia

Conceitos a relembrar: modo de acção das enzimas; cinética enzimática (Eq. Michaelis-Menten; K_M e V)

As enzimas como alvo terapêutico e utilização em meios de diagnóstico.

Inibição enzimática: reversível e irreversível; competitiva e não-competitiva.

Exemplos: intoxicação por organofosforados; inibidores como agentes terapêuticos.

Conceito de isoenzima: creatina fosfocinase (CPK) e a lactato desidrogenase (LDH) no diagnóstico do enfarte do miocárdio. Inibição enzimática

ENZIMAS

Enzimas - são catalizadores biológicos

Favorecem as reacções químicas; não alteram o equilíbrio químico

A reacção processa-se mais rapidamente

As enzimas regulam as reacções químicas nas células e organismos

As enzimas celulares são catalizadores invulgares:

A sua eficiência pode ser modulada em resposta às necessidades celulares (→ **REGULAÇÃO**)

As enzimas apresentam:

- * elevado poder catalítico
- * elevada selectividade

Reacção normal: $A \rightleftharpoons B$

Reacção catalizada:



A E é altamente específica

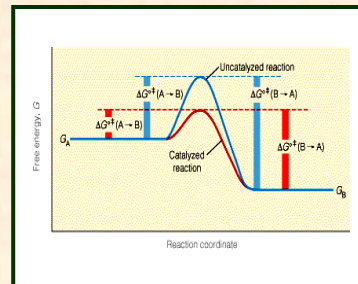
As enzimas não o equilíbrio químico, mas favorecem a probabilidade de uma reacção ocorrer baixando a energia de activação reaccional

As enzimas, como catalizadores, alteram as constantes de velocidade, ie, alteram a velocidade de processamento das reacções

As enzimas baixam a energia de activação (G_A)

- Facilitam o encontro mútuo das moléculas e orientação
- Baixam a energia necessária para alterar a estabilidade das moléculas

ΔG_A – Energia que é necessário fornecer a uma molécula de uma substância para se atingir o **Estádio Activado**



Uma redução da energia de activação subentende uma maior velocidade de reacção

Acção das Enzimas

- 1. Local activo:** ocupa uma pequena parte do volume total da enzima
 - * A maior parte dos aa na enzima não contactam com o substrato
- 2. O local activo é tridimensional**
 - * Formado por grupos situados em diferentes partes da seq linear de aa.
- 3. O substrato liga-se à enzima por forças fracas, mas múltiplas:**
 - * interacções electrostáticas
 - * ligações hidrogénio
 - * forças de Van der Waals
 - * interacções hidrofobas

Interacção reversível entre as biomoléculas
- * Cria-se um microambiente em que os resíduos adquirem **propriedades especiais para a catálise enzimática**
- 5. A especificidade da ligação depende do arranjo precisamente definido dos átomos no local activo**
 - * Teoria da Chave e Fechadura
 - * Teoria da Conformação Induzida ou "Induced-Fit"

Acção das Enzimas

As enzimas são *altamente selectivas*



Reconhecem um determinado substrato

Alteração de um grupo químico do substrato



As enzimas deixam de reconhecer esse substrato

O local de interacção E - S possui:

* Afinidade geométrica

* Afinidade de ligação química

Nesse local reside a *actividade funcional da enzima*:



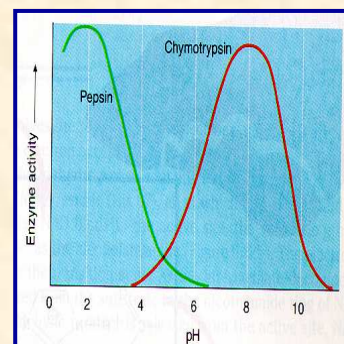
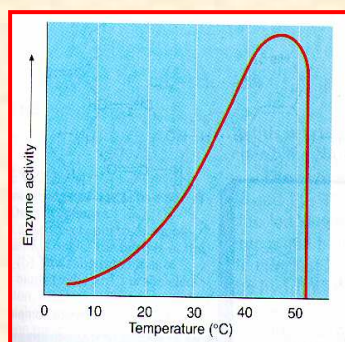
1 só substrato (ou classe de substratos) é aceite pela enzima

. Teoria da Conformação Induzida ("Induced-Fit")

Interacção E - S → Alteração da Conformação → S ligado "quebra-se"

A actividade das enzimas depende do pH e da temperatura

A maior parte das enzimas são **proteínas**



Exemplo: A PFK é inibida pelo ↓ pH

Logo, a acidose favorece a formação de glucose e ↓ da formação de piruvato e lactato

Natureza química das enzimas

A maior parte das enzimas são **proteínas**

Componente proteico► **Apoenzima**
 +
 Componente não-proteico► **Holoenzima**

- * Grupo prostético (heme da Hb)
- * Cofactor (ião)
- * Coenzima (moléc orgânica, vitaminas)

As enzimas são renovadas (“turnover”)

A dieta deve incluir: a.a essenciais, metais, vitaminas

Algumas enzimas requerem elementos inorgânicos como Cofactores

Fe ²⁺ ou Fe ³⁺	Citocromo oxidase Catalase Peroxidase
Cu ²⁺	Citocromo oxidase
Zn ²⁺	Anidrase carbónica Desidrogenase alcoólica
Mg ²⁺	Hexocinase Glucose-6-fosfatase Piruvato cinase
Mn ²⁺	Arginase Ribonucleótido redutase
K ⁺	Piruvato cinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Dinitrogenase
Se	Glutationa peroxidase

Algumas Coenzimas servem para a transferência de átomos específicos ou grupos funcionais

Coenzimas	Ex transferência grupos químicos	Precusores provenientes da dieta
Tiamina pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B ₁)
Flavina adenina dinucleótido (FAD)	Electrões	Riboflavina (vitamina B ₂)
Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)	lão hidrido (:H-)	Ácido nicotínico (niacina)
Coenzima A (CoA)	Grupos acil	Ácido pantoténico e outras moléculas
Piridoxal fosfato	Grupos amina	Piridoxina (vitamina B ₆)
5'Deoxiadenosilcobalamina (coenzima B ₁₂)	Átomos H e grupos alquil	Vitamina B ₁₂
Biotina	CO ₂	Biotina
Tetrahidrofolato	Grupos de 1 C	Folato
Lipoato	Electrões e grupos acil	

Exemplos das classes de enzimas mais importantes

Class	Example (reaction type)	Reaction Catalyzed
1. Oxidoreductases	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (oxidation with NAD ⁺)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{NAD}^+} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H} + \text{NADH} + \text{H}^+$ <p style="text-align: center;">Ethanol Acetaldehyde</p>
2. Transferases	Hexokinase (EC 2.7.1.2) (phosphorylation)	<p style="text-align: center;">D-Glucose D-Glucose-6-phosphate</p>
3. Hydrolases	Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) (peptide bond cleavage)	<p style="text-align: center;">C-terminus of polypeptide Shortened polypeptide + C-terminal residue</p>
4. Lyases	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) (decarboxylation)	$\text{Pyruvate} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Acetaldehyde} + \text{CO}_2$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Acetaldehyde</p>
5. Isomerases	Maleate isomerase (EC 5.2.1.1) (cis-trans isomerization)	<p style="text-align: center;">Maleate Fumarate</p>
6. Ligases	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) (carboxylation)	$\text{Pyruvate} + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP}} \text{Oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Oxaloacetate</p>

Cinética enzimática

A primeira fase da catálise é a formação do complexo ES

A existência do complexo ES demonstrada por:

1. Aumento da velocidade de reacção com aumento da [S] com [E] constante



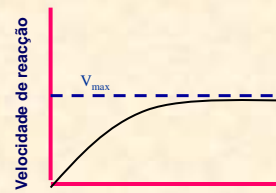
V_{max} – saturação dos locais catalíticos

2. Visualização dos complexos ES

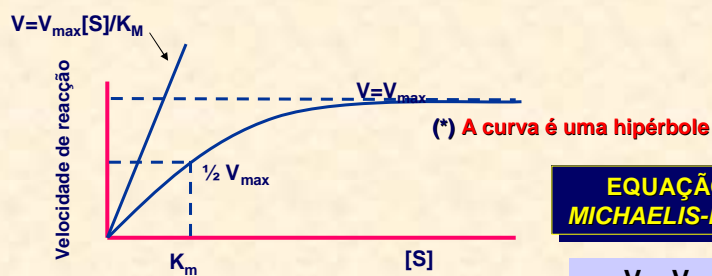
- *microscopia electrónica*
- *cristalografia de raios X*

3. Alteração das características espectroscópicas da enzima e do substrato após formação do complexo ES

- Espectro de absorção
- Espectro de fluorescência
- RMN, ressonância magnética nuclear



Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reacção enzimática



EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

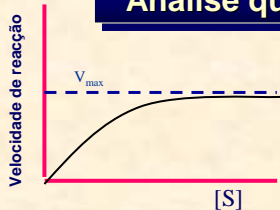
$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

1. Se [S] é baixa, $K_M \gg [S]$, então $V = V_{max} [S] / K_M$ e V aumenta linearmente com [S]
2. Se [S] é alta, $[S] \gg K_M$, então $V = V_{max}$

K_M - a [S] correspondente a $\frac{1}{2} V_{max}$, é a **constante de Michaelis-Menten**

V_{max} - corresponde à **densidade de actividade enzimática**

Análise quantitativa da cinética enzimática



$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

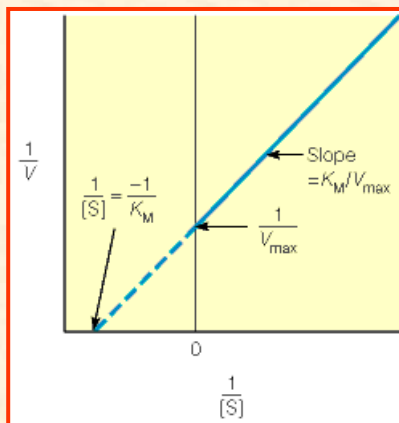
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

$(y = ax + b)$



INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Inibição reversível

1. Inibidores Competitivos ($K_M \uparrow$)

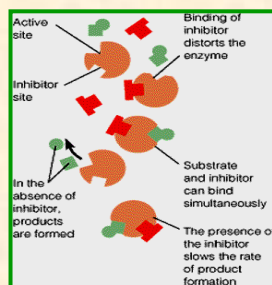
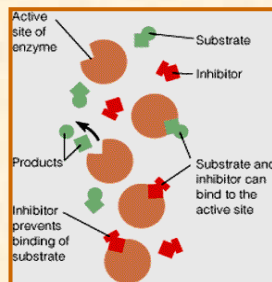
- Moléculas muito semelhantes ao substrato
- Podem ligar-se como o "substrato" no local ativo
- Interpretado como uma competição entre o substrato e inibidor pela ligação ao local ativo

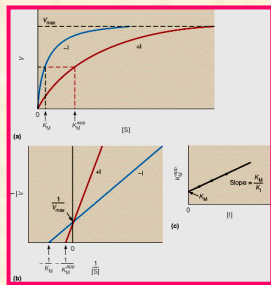
⇒ Este efeito desfaz-se aumentando a $[S]$

2. Inibidores Não-Competitivos ($\downarrow V_{max}$)

- A intensidade da inibição depende da concentração do inibidor e da sua afinidade para a E e/ou para ES
- Interpretado como uma ligação à proteína que condicionando a plasticidade do local ativo

⇒ Este efeito não se desfaz por aumento da $[S]$

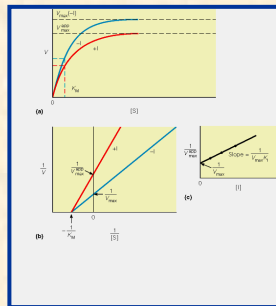
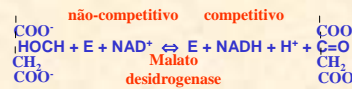




Efeito da inibição competitiva na cinética enzimática

Aumento do K_M !

EX. Inibição da succinato desidrogenase pelo malonato
EX. Inibição da malato desidrogenase pelo hidroximalonato



Efeito da inibição não-competitiva na cinética enzimática

Diminuição de V_{max} !

EX. Os metais pesados: Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e o CO e cianeto (que complexa Fe^{2+} ou Fe^{3+}) são inibidores não-competitivos de enzimas
Combinam-se com grupos -SH activos das enzimas

Alteram a estrutura da enzima

INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Inibidores irreversíveis

-O inibidor reage irreversivelmente com a enzima

Ex.:

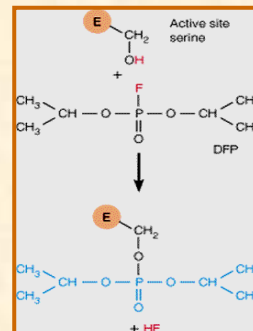
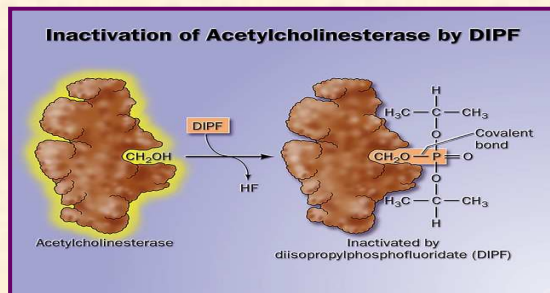
-**Insecticidas Organofosforados**, inibem enzimas com Ser no local activo da enzima, como a Acetilcolinesterase;

-**Penicilina**, inibe uma transpeptidase necessária para a síntese da parede celular bacteriana.

Inibidores irreversíveis

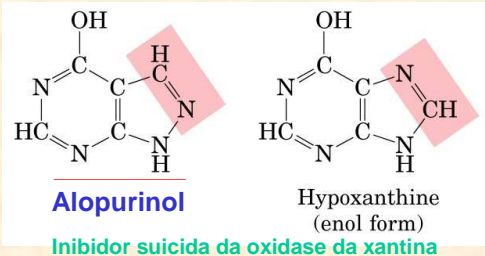
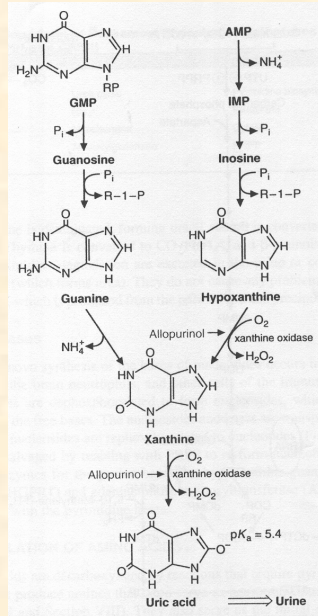
Afectam a estrutura enzimática

Apresentam uma alta toxicidade



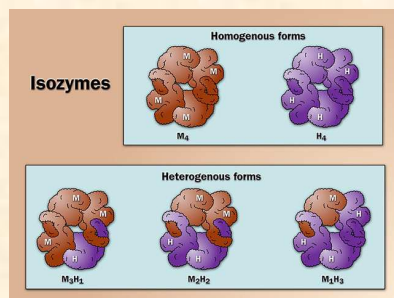
Utilização terapêutica de inibidores enzimáticos

Gota – reacção inflamatória por deposição de ácido úrico, resultante da sua excessiva produção



Isoenzimas

Formas moleculares diferentes de certas enzimas



LDH – Lactato desidrogenase

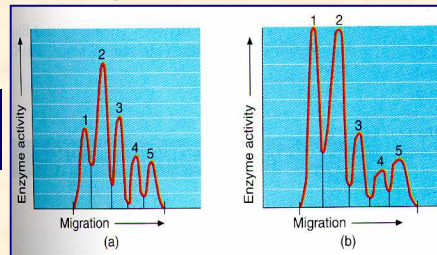
5 isoenzimas

M - Músculo e fígado (+)

H - Coração (-)

Distinguidas por electroforese

D.D. doenças do músculo e miocárdio
Monitorização da doença

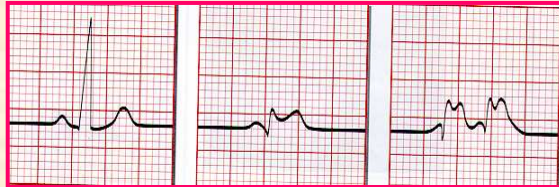


Izoenzimas - Diagnóstico de doenças

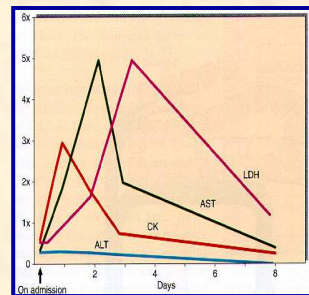
Caso clínico:

- ◆ Doente com dor torácica à esquerda que irradia para o pescoço e braço do mesmo lado
- ◆ Diagnóstico confirmado pelo doseamento de izoenzimas

Enfarte do miocárdio



- CK** - BB (cérebro)
 - MM (Músculo)
 - MB (coração)
- LDH** - H4 (coração)
 - H3M
 - H2M2 (g.v.)
 - HM3
 - M4 (músculo, fígado)



Regulação da actividade enzimática

'The evocation of a conformational change when a ligand binds reversibly to a protein underlies the whole of metabolic and physiological regulation' (Ottaway, 1988)

- Regulação por feedback
- Regulação por feedforward
- Modificação covalente reversível
- Activação por clivagem proteolítica (caspases, coagulação)
- Ciclos de substrato
- Compartimentalização ('channeling')