

Enzima

Como surgiu o primeiro conceito da palavra enzima? Os primeiros bioquímicos por volta do século XIX perceberam que quando se colocava proteínas com suco gástrico perceberam a quebra das estruturas maiores – proteínas – em estruturas menores – peptídeos. Também verificaram isso com a quebra do amido em monossacarídeos.

Pasteur estudou especificamente a oxidação dos carboidratos à álcool e percebeu que essa reação ocorria graças às estruturas no interior das leveduras: em - dentro – ezima – levedura.

Características das enzimas:

- Constituição: A grande maioria das enzimas é constituída de proteínas. Algumas poucas são fragmentos de RNA com ação catalítica. Por ser uma proteína e apresentar as 4 estruturas, sua atividade vai depender da sua estrutura: é necessário uma estrutura íntegra.
- São estruturas altamente especializadas e específicas: aumenta em muito a velocidade de uma reação.
- São catalisadores
- Possui alto grau de especificidade
- A maioria opera em soluções aquosas, com temperatura (suave) e pH (aproximadamente neutro) controladas.
- Importância prática: lesão dos hepatócitos libera certas enzimas no sangue que podem ser utilizadas para diagnosticar doenças. Pode-se também por alterações genéticas superexpressar ou não expressar determinada enzima.
- Agem em seqüência: formam as vezes os complexos multienzimáticos. Para economizar energia porque seria necessário outro meio que transportasse a substância formada para dar seqüência à reação. Também o tempo de meia vida ser pequeno.
- Estão quase sempre dentro da célula, e compartimentalizadas. A não ser as enzimas digestivas que são liberadas para o meio extracelular.
- Atuam em concentrações muito baixas: a concentração da enzima é muito inferior à do substrato.
- Possuem todas as características das proteínas
- **Podem ter sua atividade regulada**
- Alterações enzimáticas geram algumas doenças: fibrose cística (secreção anormal de pulmão, pâncreas e etc) graças à alteração de canal de cloreto, gota primária (produção exagerada de ácido úrico resultando em ataques recorrentes de artrite aguda e também problemas renais) em que a enzima afetada é uma relacionada com a síntese de bases nitrogenadas e ácidos nucleicos e seu metabolismo, anemia falciforme que é causada por uma alteração da hemoglobina.
- São estruturas com alto peso molecular
- Holoenzima = coenzima + apoenzima (parte protéica)
- Coenzima: um ou mais íons orgânicos (co-fator) ou molécula orgânica (ex. vitaminas).
- Ex de enzimas: Citocromo oxidase (íons cobre e ferroso). Glutathione Peroxidase (íon selênio): funciona como uma proteção a fim de eliminar o excesso de radicais livres produzidos pelo organismo. Glicose-6-fosfatase: íon magnésio funciona adicionando fosfato na glicose para evitar a saída desta da célula.

Nomenclatura das Enzimas

- Recomendada, usual e Sistemática
- Recomendada: Sufixo ase ao nome do substrato: amilase, DNA polimerase, peptidase e uréase
- Usual: serve para diferenciar as enzimas que agem sobre o mesmo substrato: Ex: tripsina (degrada proteínas no intestino delgado), pepsina (degrada proteínas no estômago).
- Sistemática: Sistema para nomear e classificar as enzimas: de acordo com onde ela atua, em que atua, etc. Usam-se 4 algarismos:

Primeiro: Oxidase; transferase, hidrolases, liases, isomerases, ligase. OBS: sintetase ocorre com gasto de ATP e sintase também sintetiza substâncias mas sem gasto energético (por exemplo a síntese de NO). NO é um vasodilatador liberado pelo endotélio vascular.

L-Arginina catalisada pelo NOS → NO + L-Citrulina. A L-Name bloqueia o NOS e causa hipertensão no animal.

Segundo: O segundo algarismo define onde está atuando.

O terceiro e quarto algarismo são utilizados para dizer quem são os receptores e os doadores dos grupamentos.

A substância que transfere grupamento fosfato é chamada de quinase ou cinase.

Reações não catalisadas → Lenta. As reações onde as enzimas atuam são normalmente lentas porque as moléculas biológicas – grandes – são estáveis num ambiente fisiológico – aquoso e pH neutro e temperatura moderada.

Utilizadas nas reações para digestão, envio de sinais elétricos, contração de um músculo.

Enzima: fornece um ambiente para ocorrer a reação.

Sítio ativo: estrutura molecular onde ocorre a reação na enzima. A substância que se liga a esse sítio é chamada de substrato.

Características do sítio ativo

- O centro ativo é uma fenda tridimensional formada por grupamentos que vêm de diferentes partes da seqüência linear de aminoácidos. Ou seja, os aminoácidos não devem estar um ao lado do outro porque aí não ocorre uma interação tão forte. Ex no quadro: Lisozima: degrada as paredes celulares de bactérias.
- O centro ativo ocupa uma parte relativamente pequena do volume total da enzima: os aminoácidos restantes servem como molde, um andaime para os aminoácidos do sítio ativo se ajustar no lugar exato. Ou, as outras regiões servem como ancoramento/ligação com outra enzima ou estrutura celular (membrana/organela). Ou, porque outra região serve como regulação da atividade enzimática.
- São fendas ou frestas. Alguns sítios podem ter estruturas apolares para retirar possíveis entradas de água. Locais pequenos para encaixe somente do substrato.
- Os substratos são ligados a enzima por múltiplas atrações fracas e distâncias curtas: a quebra da ligação peptídica requer muito energia (em média 100 kcal/mol); a quebra de ponte de hidrogênio (requer 8 kcal por ponte de hidrogênio) que por serem várias pontes de hidrogênio utilizadas para a quebra.
- A especificidade de ligação depende do arranjo precisamente definido de átomos no centro ativo.

Modelo tridimensional de uma enzima

Princípio de Funcionamento das Enzimas: destaca-se a diferença das velocidades de reação com enzima e sem enzima.

Diagrama de coordenada de reação para uma reação química/ A energia livre do sistema é lançada em gráfico contra o progresso da reação. Um diagrama desta natureza é a descrição do curso energético da reação, no eixo horizontal (coordenada da reação) não lançadas sucessivas

mudanças químicas (por exemplo, formação e quebra de ligações) à medida que progride a conversão de S em P. Os símbolos S e P marcam os níveis básicos de energia livre do substrato e do produto. O estado de transição está indicado pelo símbolo ...

Mecanismo Geral da Catálise:

- As enzimas aceleram a velocidade de uma reação por diminuir a Energia de Ativação da mesma, sem alterar a termodinâmica da reação, ou seja: a energia dos reagentes e produtos da reação enzimática e de sua equivalente não enzimática são idênticas.
- Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário representado por ES.
- Nas reações enzimáticas, este composto de transição não pode ser isolado, uma vez que é liberado...

As enzimas além de acelerar a reação também controlam a energia liberada nesse processo porque se uma célula oxidasse a glicose sem enzimas poderia haver combustão da célula.

Modelo chave fechadura para a enzima:

- Emil Fischer (1894): enzimas eram estruturalmente complementares ao substrato.
- Prevê um encaixe perfeito do substrato no sítio de ligação, que seria rígido como uma fechadura.
- Não é o modelo ideal de representação.

Modelo do ajuste induzido(ver no Lehninger o exemplo do Bastão): Prevê um sítio de ligação não totalmente pré-formado, mas sim moldável à molécula do substrato; a enzima se ajustaria à molécula do substrato na sua presença.

- Evidências experimentais sugerem esse modelo que combina o ajuste induzido a uma torção da molécula do substrato, que o ativaria e o prepararia para a sua transformação em produto.
- Alguns chamam de modelo mão-luva: apesar de se poder amassar a luva toda a mão sempre se encaixa nela.

Fatores que influenciam uma reação enzimática:

Temperatura: em menores temperaturas temos uma redução da atividade enzimática. Aumento da temperatura, aumenta a velocidade até certo ponto, quando a velocidade diminui. Essa curva é constituída por um gráfico cinético: uma reação para se processar precisa de colisões entre as moléculas; aumento da temperatura aumenta indefinidamente o número de colisões e a velocidade da reação. E também por um gráfico de desnaturação: em baixas temperaturas mantém-se estruturas estáveis e com o aumento da temperatura a enzima vai desnaturando. Existe um ponto onde há a velocidade máxima da reação: temperatura ótima.

pH: Vai depender de enzima para enzima. Há enzimas que vão atuar com maior eficácia em pH ácido, básico e neutro. Ex: em pH ácido há excesso de H e uma enzima que tem vários resíduos de grupamentos amino que vão ser protonados. Se houver, por exemplo, vários desses grupamentos amino próximos com carga positiva eles vão ser repelidos e alterar a estrutura da enzima. Em pH básico ocorre a mesma coisa, porém com cargas negativas.

Concentração de enzima: Gráfico linear. A medida que aumenta-se a concentração de enzima, aumenta-se a velocidade da reação.

Concentração do substrato: Pequenos aumentos na concentração do substrato geram drásticas alterações na velocidade. Mas chega em um momento em que grandes aumentos não vão alterar a velocidade da reação: a velocidade atingiu o máximo porque as enzimas estão saturadas, todas estão complexadas. Há duas fases: Fase I aumenta a cinética de primeira ordem. Período intermediário: mistura das reações de ordem zero e de primeira ordem. Segunda fase: alterações na concentração do substrato não vão alterar velocidade da reação.

Cálculo da Velocidade de uma reação enzimática: Espectrofotômetro.

$A = 2 - \log I$ (luz transmitida)

$A = kCd$

A=Absorbância

K=Natureza

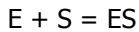
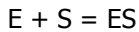
C=Concentração

D=Caminho ótico

Fator de calibração: $Fc=c/A$

Como esse aparelho é utilizado para fins de diagnóstico? Quantificar quantidade de glicose no sangue; o dosamento de enzima pelo método indireto (dosa a quantidade de substrato ou produto).

Outra maneira é através da reação de Leonor Michaelis e Maud Menten (1913): Constante de Michaelis-Menten (K_m)



$$V_0 = k[ES]$$

$$K_m = (k_2 + k_1)k_1$$

$$V_0 = V_m[S]/K_m + [S]$$

$$K_m = [S], \text{ quando } V_0 = V_m/2$$

[S] na qual metade dos centros ativos estão preenchidos.

Depende do substrato, pH e temperatura

Mede o grau de afinidade da enzima pelo substrato

Outra maneira de se obter o K_m e V_m mais simples é utilizando-se o gráfico linear (segundo Lineweaver e Burk)

- Método simples para obtenção de um valor aproximado para o K_m

- Gráfico duplo recíproco

$$y = 1/V_0$$

$$x = 1/[S]$$

$$1/V_0 = K_m/V_m[S] + 1/V_m$$

Representação de uma Reação Enzimática:

Deslocamento Sequencial ordenado: os substratos se ligam a enzima antes de qualquer produto ser liberado. Piruvato + NADH + H⁺ → Lactato + Nad⁺

Deslocamento Sequencial ao acaso: os substratos se ligam a enzima, sem ordem de adição, antes de qualquer produto ser liberado. Creatina + ATP → Fosfocreatina + ATP graças à creatina quinase. Não há ordem definida, podendo liberar qualquer um dos produtos.

Duplo deslocamento: Um dos produtos é liberado antes de todos os outros substratos se ligarem à enzima. Ex. Aspartato aminotransferase (AST-TGO).

Inibição Enzimática:

- Enzima → Processos metabólicos celulares.

- As substâncias inibidoras das enzimas são os mais importantes agentes farmacológicos. Ex. AAS. Vai atuar na enzima que converte o ácido aracdônico em mensageiros químicos da inflamação.

- Os inibidores enzimáticos são compostos que podem diminuir a atividade de uma enzima.

- A inibição enzimática pode ser reversível ou irreversível.

- Existem 2 tipos de inibição enzimática reversível:

+ Competitiva: Quando o inibidor se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação do substrato

- O inibidor concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima.

- Inibidor e substrato → estruturas semelhantes

- EI (complexo enzima-inibidor) → impede a ligação do substrato.

- O efeito é revertido aumentando-se a concentração de substrato.

- Este tipo de inibição depende das concentrações de substrato e de inibidor.

- Ex. Metatrexato compete com tetraidrofolato: coenzima da di-hidrofolato redutase (biossíntese de purinas e pirimídicas). Utilizado no tratamento do câncer e artrite devido a gota.

- Ex: tratamento de pacientes que ingeriram metanol. Etanol compete com o metanol como substrato para a álcool-desidrogenase.

- Metanol → Formaldeído (lesivo ao SNC, cegueira, etc).

- Já o etanol é metabolizado em outras substâncias menos tóxicas.
- $V_{máx}$ pode ser atingido
- K_m é alterado
- Necessidade uma maior $[S]$ para atingir $V_{máx}$ e $\frac{1}{2} V_{máx}$ (K_m)
- O efeito do inibidor é aumentar o valor aparente do K_m .

+ Não-competitiva: Quando o inibidor liga-se reversivelmente à enzima em um sítio próprio de ligação, podendo estar ligado à enzima ao mesmo tempo que o substrato.

- Sítio de ligação diferente
- A enzima é inativa quando o inibidor está ligado à enzima.
- Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor, não podendo ser anulada pelo aumento da concentração do substrato.
- É reversível porque você precisa consumir o inibidor para recuperar a enzima.
- O complexo ESI não vai adiante
- K_m não é alterado
- $V_{máx}$ diminui
- Diminui concentração de enzima funcional

- Inibição enzimática irreversível

- Há modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou no sítio catalítico da enzima.
- O inibidor se dissocia muito lentamente de sua enzima.
- Podem ser utilizados para mapear o centro ativo das enzimas. Basta conhecer a estrutura dos inibidores.
- Medicamentos importantes: Ex: aspirina e penicilina.
- Penicilina: Primeiro antibiótico a ser descoberto. Interfere na síntese da parede celular bacteriana. Peptidoglicano: constituído por cadeias glicídicas lineares que são interligadas por peptídeos pequenos. Confere apoio mecânico: impede as bactérias de romper sua membrana. Inibe uma transpeptidase através de uma ligação covalente.
- Gases neurotóxicos (SARIN): Inibe na placa motora a acetilcolinesterase que degrada acetilcolina na fenda sináptica o que altera as concentrações de neurotransmissores na região.

Regulação enzimática:

- Algumas enzimas podem ter suas atividades reguladas, atuando assim como moduladores do metabolismo celular.
 - Esta modulação é essencial na coordenação dos inúmeros processos metabólicos pela célula.
- Feedback negativo : inibe a enzima.
Feedback positivo: ativa a enzima.

Regulação alostérica: Explica o feedback. Ocorre nas enzimas que possuem um sítio de modulação ou alostérico...

Regulação por zimogênios: precursor inativo da enzima. Ativação de uma enzima por uma clivagem proteolítica.

Pode-se dosar a quantidade de peptídeo C que saberá a quantidade de insulina produzida pela própria pessoa e não injetada.

Enzimas na clínica

- As enzimas podem ser utilizadas nas análises clínicas de 2 formas principais:
 - 1) Como reagentes altamente específicos e sensíveis em reações colorimétricas quantitativas.
 - 2) Como indicadores de lesão celular e tecidual e o extravasamento de enzimas do meio intra para o meio extracelular leva a um aumento da atividade destas no sangue. Informação que pode ser medida.
- A distribuição órgão-específica de algumas destas enzimas permite a localização da lesão com bastante precisão. Ex: IAM dosa-se a creatina quinase, AST, LDH que indica o período em que ocorreu o infarto. Hepatites, pancreatite e doenças ósseas.