



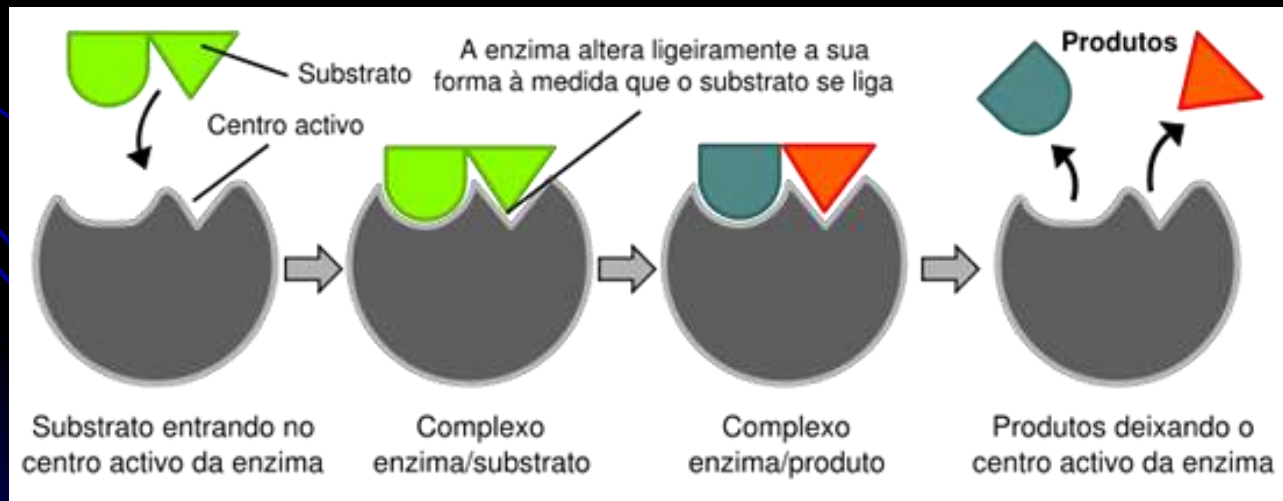
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN
Faculdade de Ciências da Saúde – FACS
Disciplina de Citologia e Organização Biomolecular

ENZIMAS

Paula Moreira

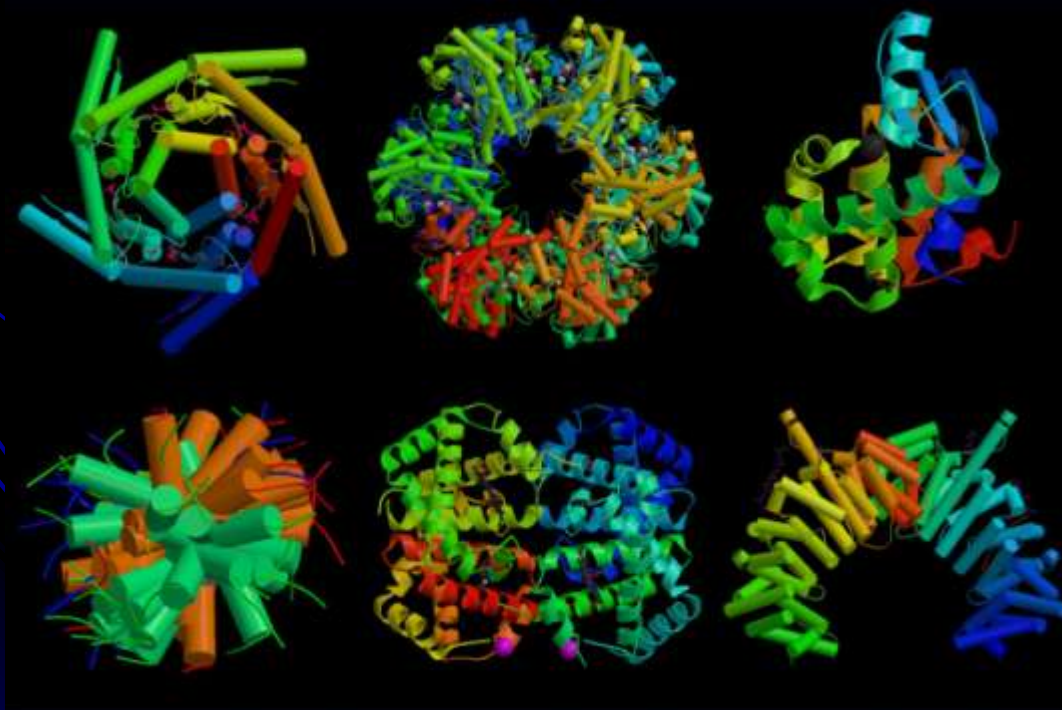
Introdução - Enzimas

- Condições fundamentais da célula:
 - Autorreplicar
 - Catalizar reações químicas com eficiência e seletividade
- São as proteínas mais notáveis e altamente especializadas
- Apresentam alto grau de especificidade e alto poder catalítico
 - São altamente eficientes, acelerando a velocidade das reações (10^8 a 10^{11})

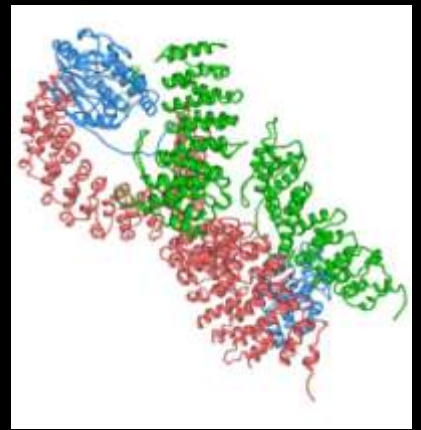


Introdução - Enzimas

- Atuam em soluções aquosas e necessitam de condições favoráveis de pH, temperatura, polaridade do solvente e força iônica
- Proporcionam um ambiente específico adequado para que uma determinada reação seja energeticamente mais favorável (estabilidade das biomoléculas)



- Definição:
 - Catalisadores biológicos;
 - Longas cadeias de aminoácidos

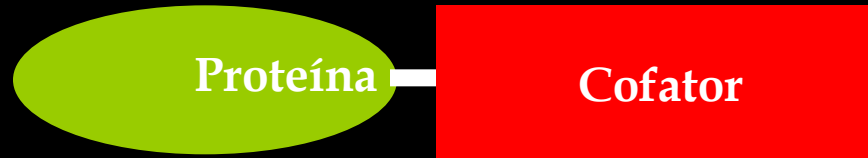


- Função:
 - Viabilizar a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos de forma rápida e eficiente
- Todas as **enzimas** são **PROTEÍNAS**
 - Globulares
 - **Exceção: RIBOZIMAS**
 - RNA c/ propriedades catalíticas
 - Presentes na subunidade maior do ribossomo
 - Participam do processamento do mRNA (remoção de introns); ligação peptídica
 - Ex: peptidil transferase

Estrutura Enzimática



Holoenzima



Apoenzima ou
Apoproteína

Pode ser:

- íon inorgânico
- molécula orgânica (coenzima)

Ribozimas

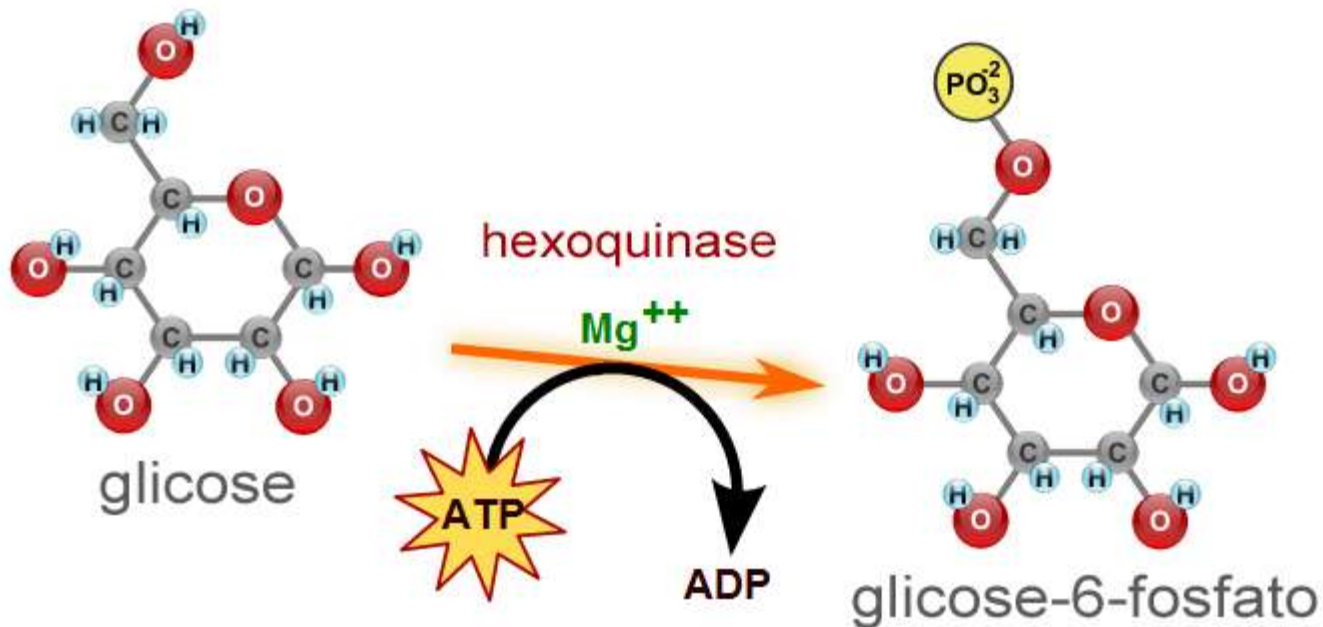


RNA

Modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos

Enzimas - Cofatores

Íons inorgânicos



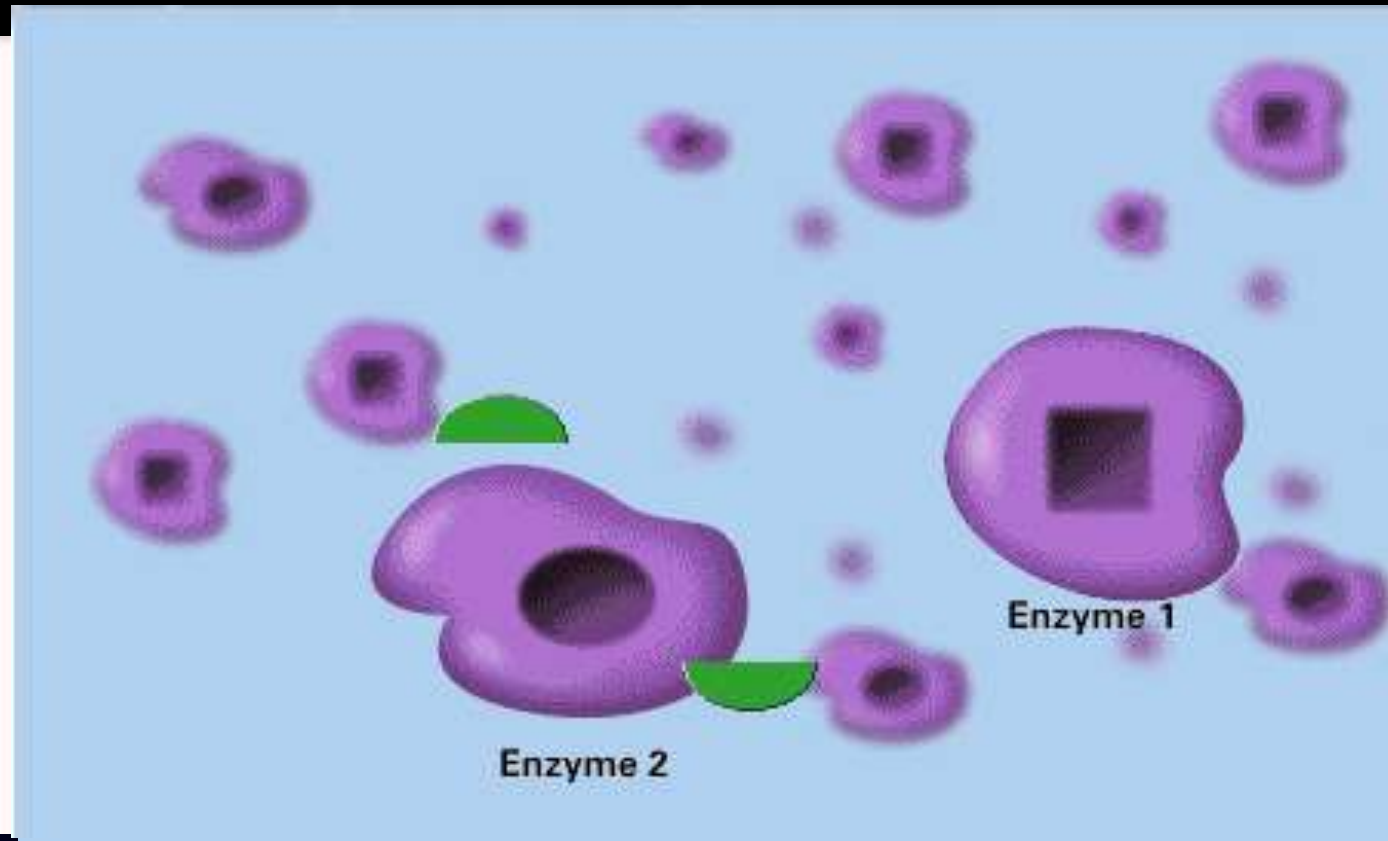
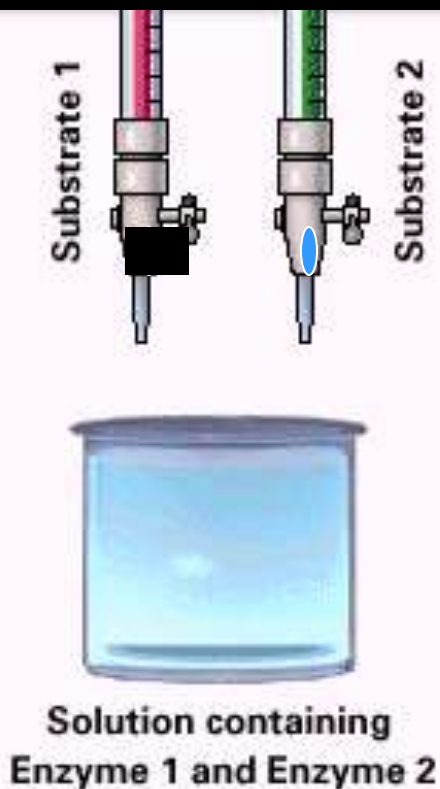
Enzimas - Coenzimas

- Carreadores transitórios de grupos funcionais
- Maioria deriva de vitaminas hidrossolúveis

Vitamina	Coenzima	Exemplo de grupos químicos transferidos
Biotina (B ₇)	Biotina	CO ₂ / Carboxilação
Ácido pantotênico (B ₅)	Coenzima A	Grupos acil
Riboflavina (B ₂)	FAD, FMN FADH₂, FMNH₂	H ⁺ /Oxidação H ⁺ /Redução
Niacina (B ₃)	NAD⁺, NADP⁺ NADH, NADPH	H ⁺ /Oxidação H ⁺ /Redução
Piridoxina (B ₆)	Piridoxal fosfato	amino/descarboxilação
Ácido fólico (B ₉)	Tetrahydrofolato	Grupos monocarbônicos
Tiamina (B ₁)	Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeídos (transf. 2 C)
Ácido lipóico	Lipoato	H ⁺ /Oxidação

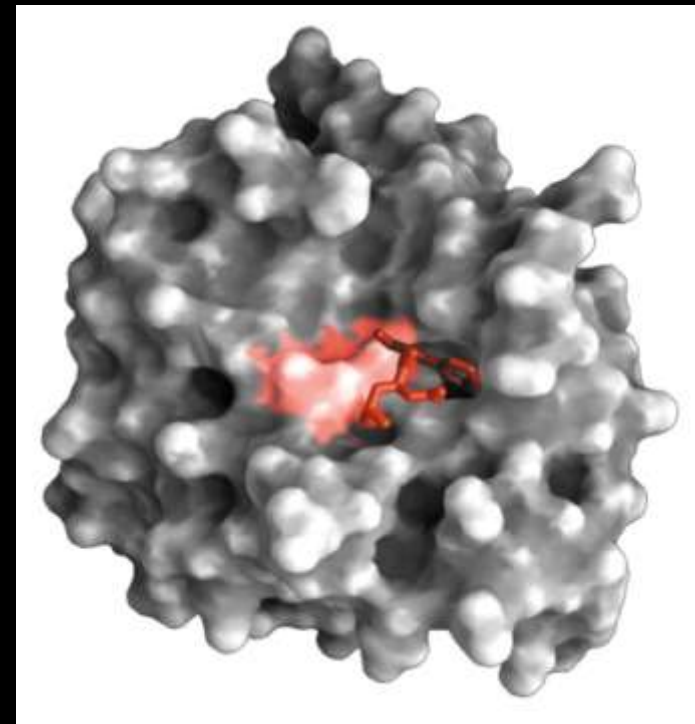
Especificidade Estereoquímica

Altamente seletiva
(discrimina substratos com estruturas muito semelhantes)



Sítio Ativo

- Local onde ocorre a ação enzimática sobre o substrato
- SA engloba o substrato sequestrando-o da solução
- Ligação específica de moléculas (substratos)
- Superfície do SA delimitada por cadeias laterais dos resíduos de aa
- Rearranjos e interações covalentes durante a catálise entre substrato e enzima



Binding of a substrate to an enzyme at the active site.

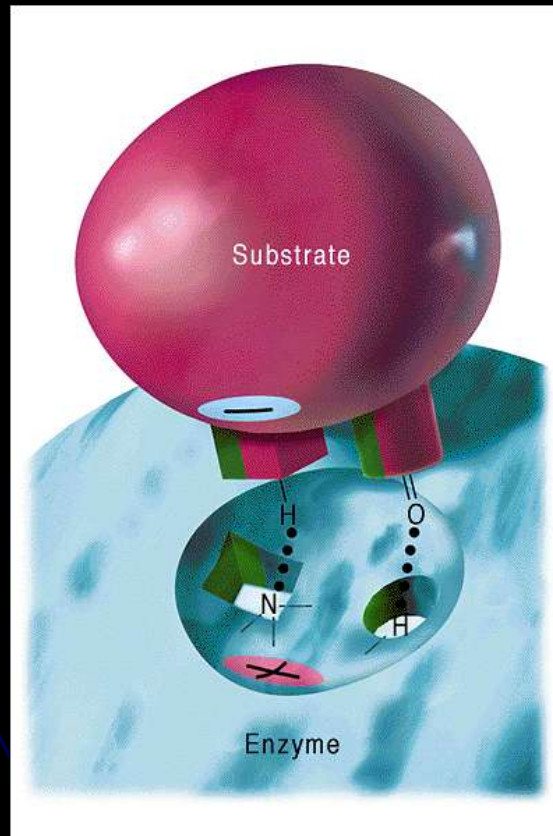
Enzimas

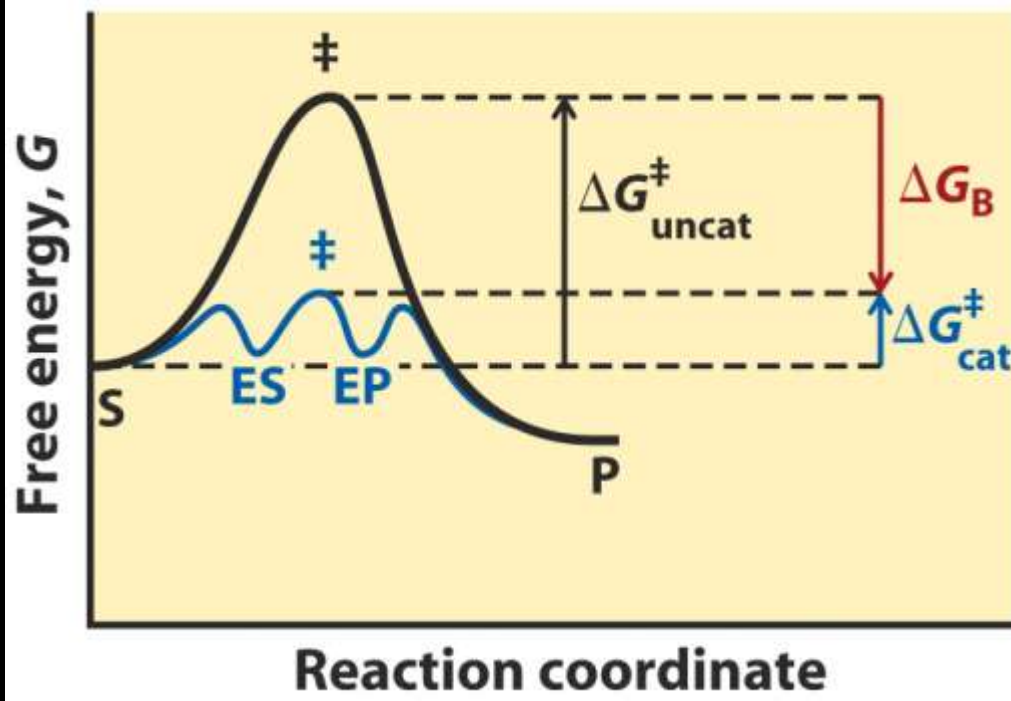
Ligação da Enzima ao Substrato

✓ 2 modelos propostos:

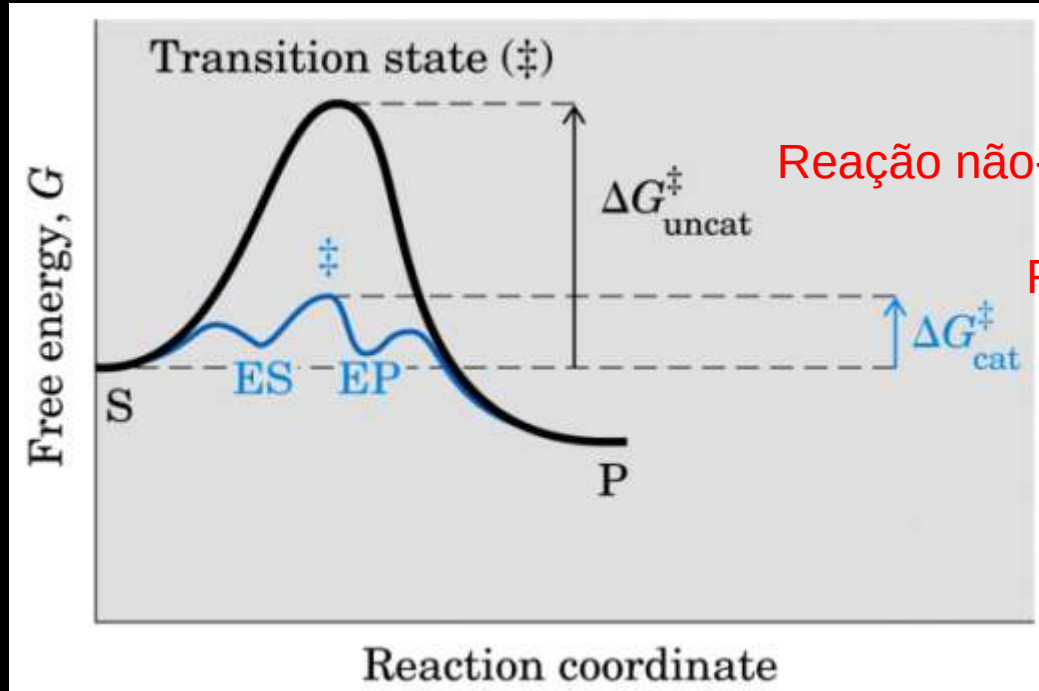
- Chave-Fechadura 
- Encaixe Induzido 

- Emil Fischer (1894):
 - Propôs que as enzimas seriam estruturalmente complementares aos seus substratos
→ **Chave-Fechadura** 🔑





- Koshland (1958): **Encaixe Induzido**: enzima e o substrato sofrem mudança de conformação para o encaixe exatamente complementar. O substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição
 - No complexo ES há formação de interações fracas
 - A completa complementaridade ES ocorre no estado de transição
- Princípio: interações c/ ligações fracas entre ES fornecem uma força propulsora p/ catálise enzimática

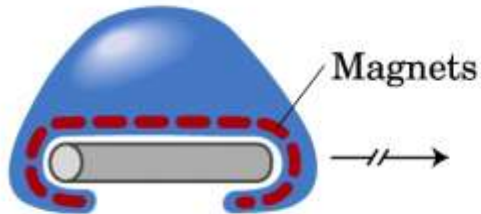


- Enzimas desenvolveram-se p/ $\downarrow$ seletivamente as energias de ativação das reações necessárias p/ sobrevivência celular
- Interações fracas não covalentes e ligações covalentes transitórias entre ES estabilizam a interação e liberam energia livre de ligação p/ $\downarrow$ a energia de ativação

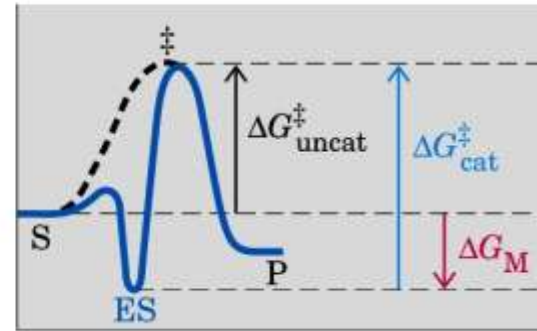
A soma da energia de ativação desfavorável $\Delta G^{\ddagger}$ (positiva) e a energia de ligação favorável ΔG_B (negativa) resulta na redução líquida da energia de ativação

- Encaixe complementar ES estabiliza o substrato ao invés de desestabilizá-lo (enzima complementar ao substrato)
- Substrato impedido de atingir o estado de transição da reação

(b) Enzyme complementary to substrate



Free energy, G



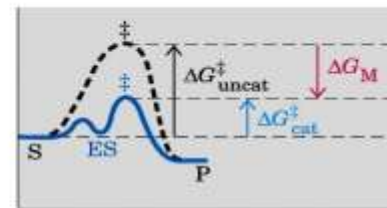
ES é mais estável e possui menos energia livre em relação ao substrato sozinho. Portanto maior energia de ativação

- Noção moderna da catálise enzimática
 - A enzima é complementar ao estado de transição da reação, ajudando a desestabilizar o substrato e contribuindo p/ catálise da reação

(c) Enzyme complementary to transition state



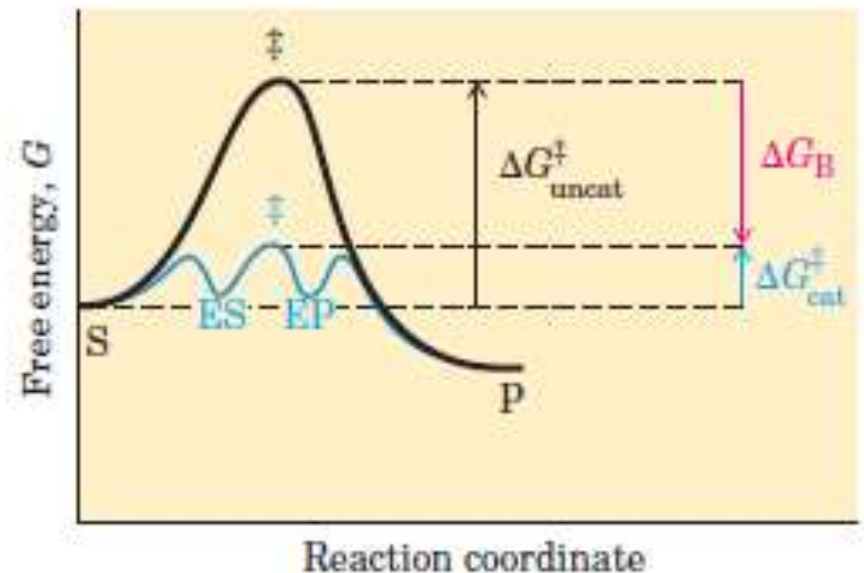
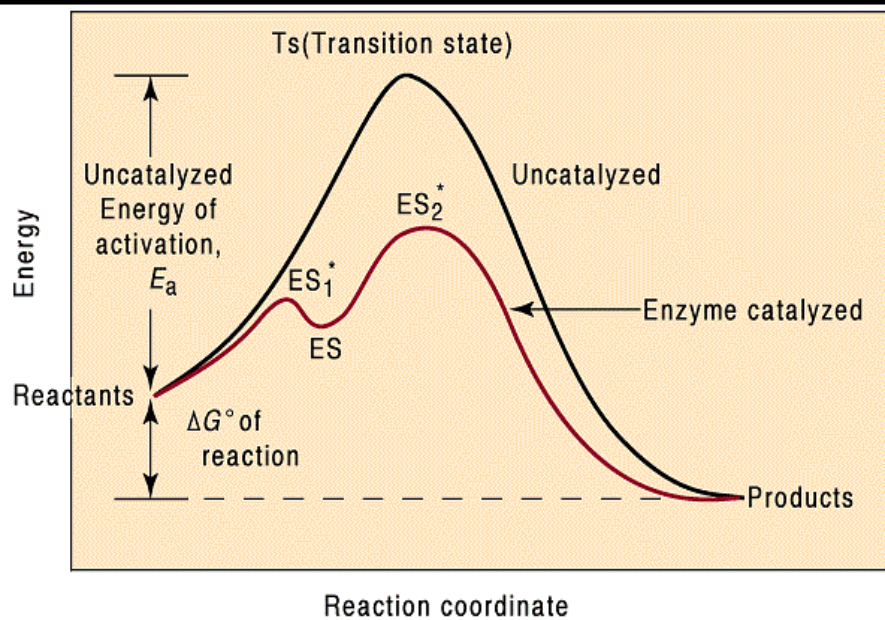
Free energy, G



Reaction coordinate

ES libera energia equivalente ao valor da diminuição de ΔG^{++}

- Para que a reação ocorra as moléculas do substrato devem atingir um nível de energia mais alto
 - Energia de Ativação
 - Diferença entre os níveis de energia do estado basal e de transição
 - Quanto menor a EA mais rápida a reação
 - EA é a barreira energética p/ reações químicas
 - EA é diminuída pela adição de um catalisador



- Aceleram reações químicas



Ex: Decomposição do H_2O_2

Condições da Reação	Energia livre de Ativação		Velocidade Relativa
	KJ/mol	Kcal/mol	
Sem catalisador	75,2	18,0	1
Enzima Catalase	23,0	5,5	$6,51 \times 10^8$

- Não são consumidas na reação

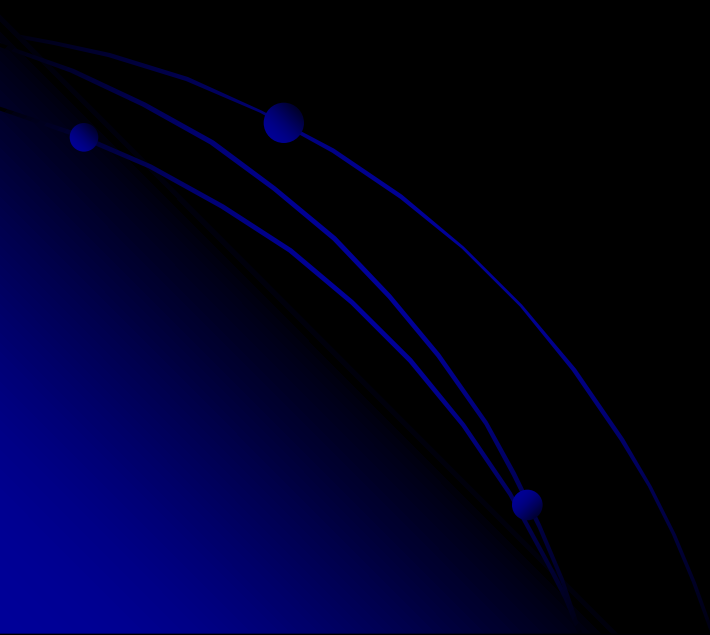


- Atuam em pequenas concentrações

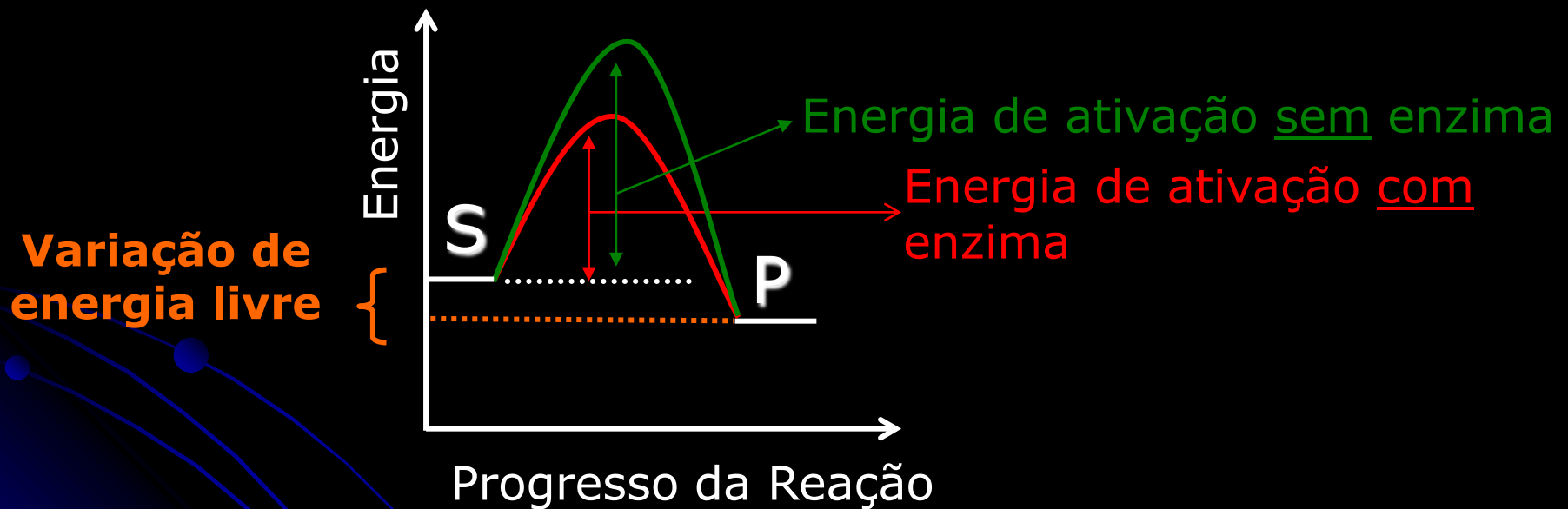
1 molécula de Catalase



decompõe
5 000 000 de moléculas de H_2O_2
pH = 6,8 em 1 min



- Não alteram o estado de equilíbrio
 - K_{eq} não é afetado pela enzima
 - Diminuem a energia de ativação



Nomenclatura das enzimas

- Século XIX - poucas enzimas identificadas
- Adição do sufixo **“ASE”** ao nome do substrato:

Ex:

- gorduras (lipo - grego) – LIPASE
- amido (amylon - grego) – AMILASE

- Nomes arbitrários:
 - Tripsina e pepsina – proteases

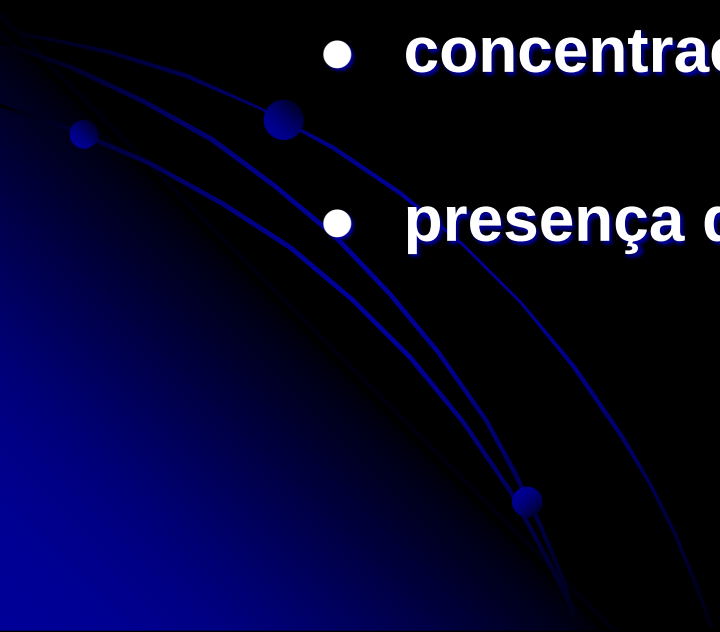
Nomenclatura e classificação das enzimas

- 1955 - Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) → nomear e classificar.

Número	Classificação	Propriedades Bioquímicas
1.	Oxidoredutases	Agem em muitos grupos químicos, adicionando ou removendo hidrogênio.
2.	Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas doadoras e moléculasceptoras.
3.	Hidrolases	Adicionam água a uma ligação, hidrolizando-a.
4.	Liases	Adicionam água, amônia ou dióxido de carbono a duplas ligações, ou removem estes elementos para produzirem duplas ligações.
5.	Isomerases	Catalisam uma variedade de reações de isomerização: do tipo L para D, reações de mutação (troca de grupos químicos) entre outras.
6.	Ligases	Catalisam reações em que dois grupos químicos são unidos utilizando energia fornecida pelo ATP.

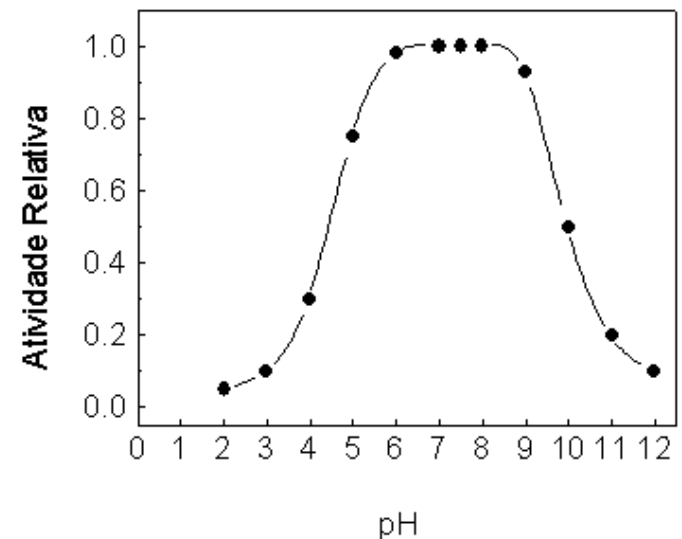
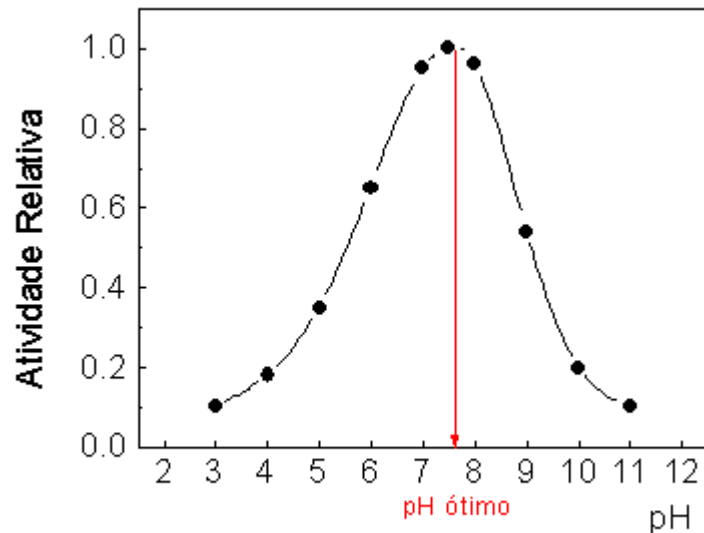
Fatores que influenciam a atividade enzimática

- pH;
- temperatura;
- concentração das enzimas;
- concentração dos substratos;
- presença de inibidores.



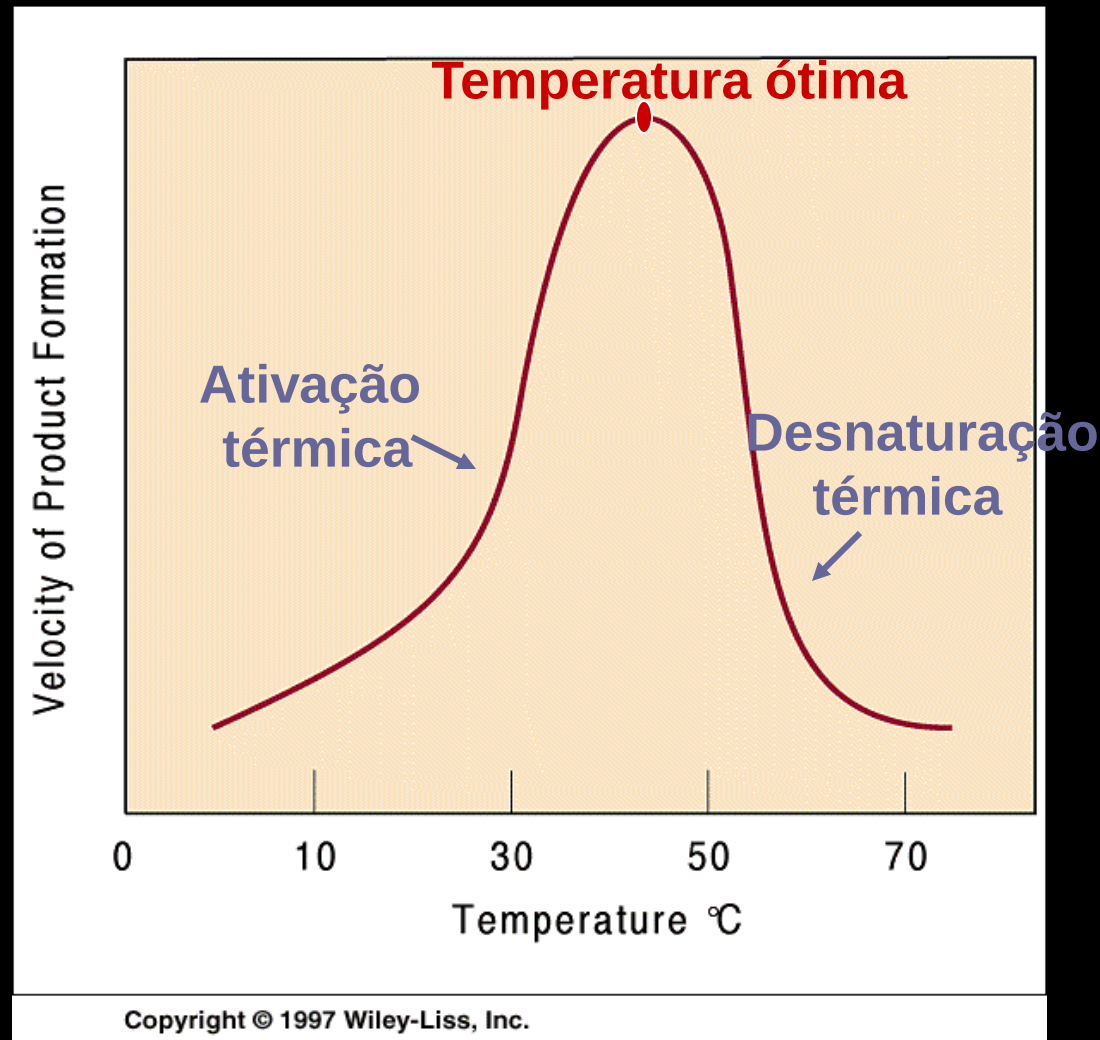
pH

- Mudanças de pH podem alterar a estrutura enzimática (influencia os grupos ionizáveis do sítio ativo)
- Dissociação (redução da atividade)
- Inativação (perda da função)



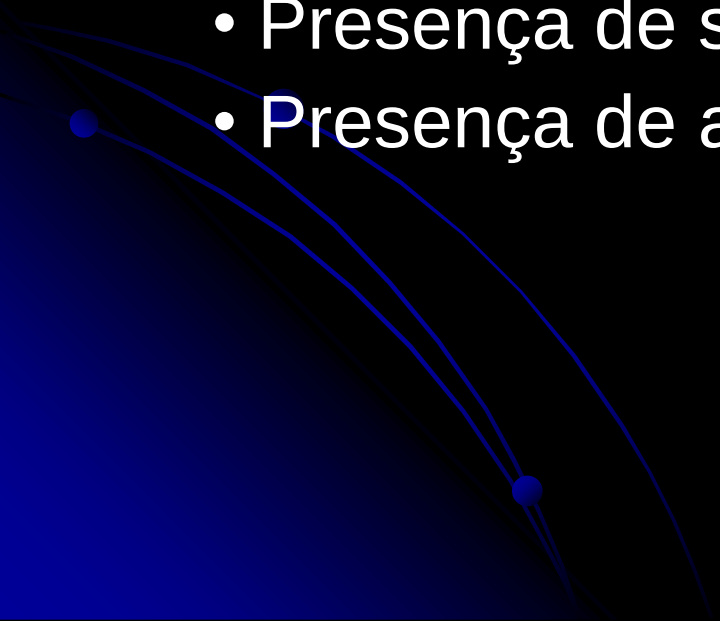
Influência da temperatura do meio sobre a atividade enzimática

- Mantidas fixas as condições de:
 - pH ótimo
 - concentração de substrato
 - concentração de enzima



CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS

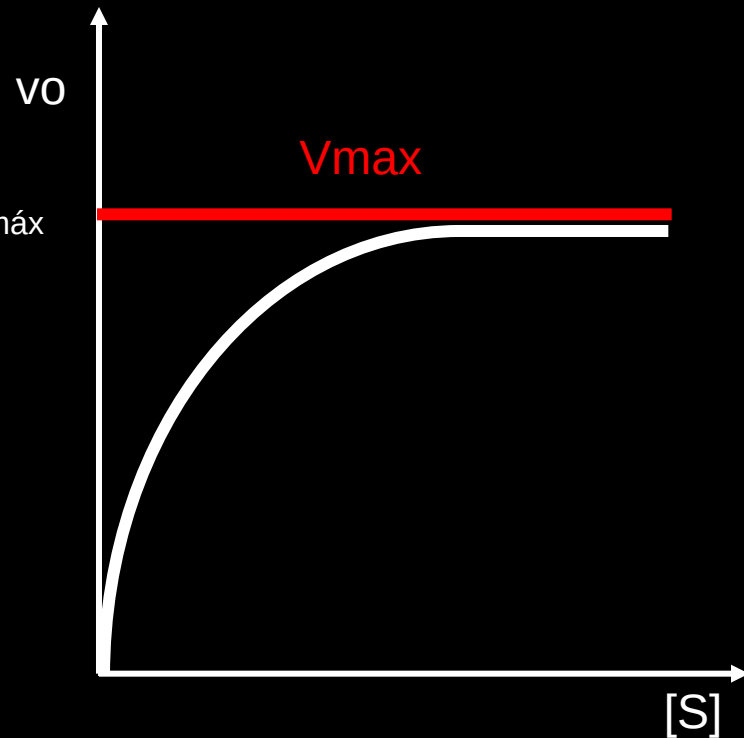
- Velocidade de transformação do S em P depende da quantidade de enzima
- Desvios ocorrem:
 - Presença de inibidores;
 - Presença de substâncias tóxicas;
 - Presença de ativadores (dissocia a enzima);



CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS

- $[S]$ varia durante o curso da reação à medida que S é convertido em P.
- Mantidas fixas as condições de
 - temperatura ótima
 - pH ótimo
 - [enzima]

Região platô: V_o próx $V_{máx}$



- $[S]$ pequenas $\rightarrow V_o \uparrow$ linearmente conforme $[S]$.
- $[S]$ maiores $\rightarrow V_o \uparrow$ por incrementos cada vez menores.

PRESENÇA DE INIBIDORES

- Inibidor é qualquer substância que reduz ou interrompe uma reação enzimática.
- Ex: Aspirina (acetilsalicilato)
Inibe a cicloxigenase (COX) na 1ª etapa da síntese das prostaglandinas



Cinética Enzimática

- Conhecer as condições ótimas da catálise;
- Ajudar a elucidar os mecanismos de reação;
- Determinar a função das enzimas em rotas metabólicas.
- Determinar as constantes de afinidade do S e dos inibidores;



Leonor Michaelis
1875–1949



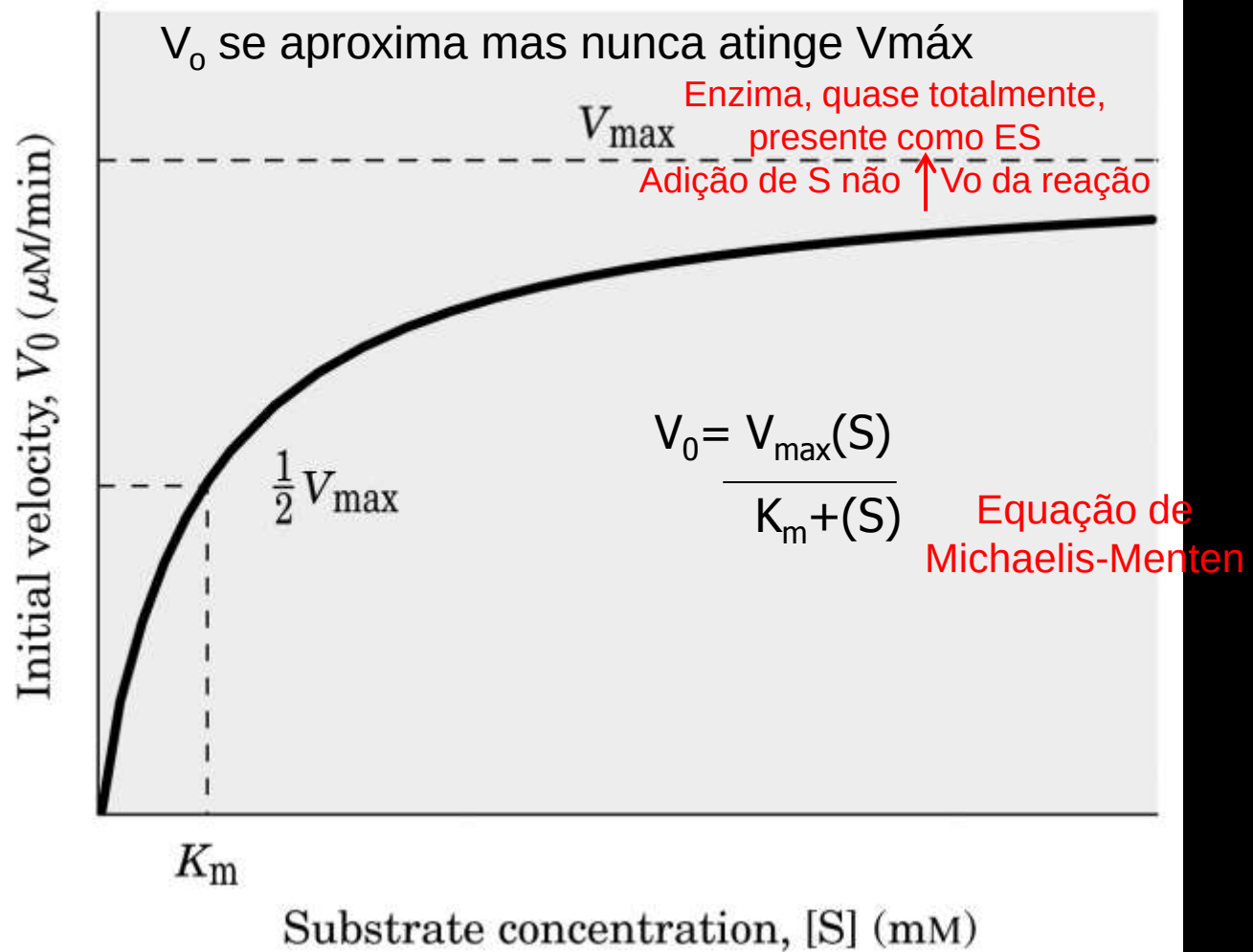
Maud Menten
1879–1960

Teoria geral de ação de enzimas (1913)



Estado pré-estacionário
Etapa rápida e reversível

Estado estacionário (quebra
complexo ES)
Etapa lenta e limitante da
velocidade



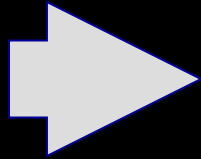
Hipérbole expressa relação entre $[S]$ e V_0
 K_m equivale à $[S]$ onde V_0 é metade de V_{max}

Características de K_m e V_{max} .

- K_m expressa a $[S]$ necessária para que a velocidade da reação seja metade da velocidade máxima
 - Não tem valor fixo, pois varia com $[S]$, pH e temperatura
- Para as enzimas que possuem mais de um substrato, cada um destes exibem um K_m característico.
- A velocidade máxima (V_{max}) varia amplamente de uma enzima para outra, dependendo do substrato, do pH e da temperatura.

Conclusões sobre K_m

 K_m

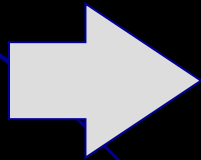


Pequena $[S]$ é necessária p/ a reação atingir metade da V_{max}



Afinidade da enzima pelo substrato

 K_m



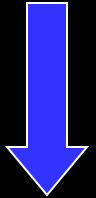
Grande $[S]$ é necessária p/ a reação atingir metade da V_{max}



Afinidade da enzima pelo substrato

Saúde

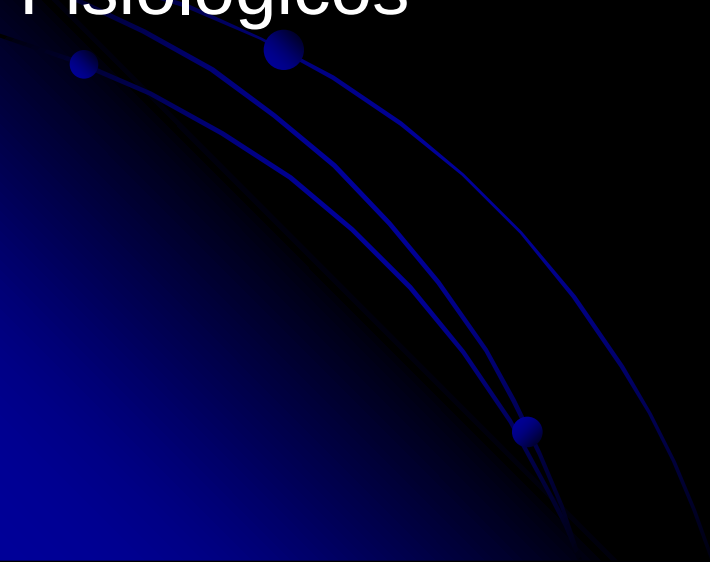
Enzimas



Processos Fisiológicos

Atuam de modo ordenado

Homeostasia



Aplicações clínicas

Lesão tecidual grave
Cirrose Hepática



Prejudica a síntese de enzimas pelo tecido



Enzimas do ciclo da uréia



Amônia
(tóxica para o organismo)



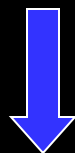
Uréia
(não tóxica)



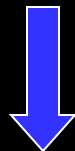
COMA HEPÁTICO

Aplicações clínicas

Doenças Genéticas



Incapacidade ou capacidade parcial
de sintetizar enzimas



Sintomatologia variada

Aplicações clínicas

Infarto do miocárdio



Lesão cardíaca grave



Extravasamento de enzimas intracelulares



Determinação da atividade de enzimas específicas
no plasma proporciona ao clínico informações importantes
para o diagnóstico

Importância Biomédica

Farmacologia e Toxicologia

Drogas terapeuticamente importantes



Inibir a atividade de enzimas



Utilizadas no tratamento de inúmeras patologias

Mecanismos de Regulação da Atividade Enzimática

Nos processos metabólicos existem 1 ou mais enzimas regulatórias das vias

A atividade das enzimas regulatórias pode ser modulada através de:

- Enzimas alostéricas
- Modificação covalente
- Clivagem proteolítica de pró-enzimas
- Controle à nível gênico
 - indução
 - repressão

Regulação da Atividade Enzimática

Enzimas Alostéricas

- Reguladas por efetores ou moduladores alostéricos (substrato, produto, cofatores)



fora do sítio ativo
(sítio alostérico)



modo não covalente
(induz mudanças conformacionais)



positivos

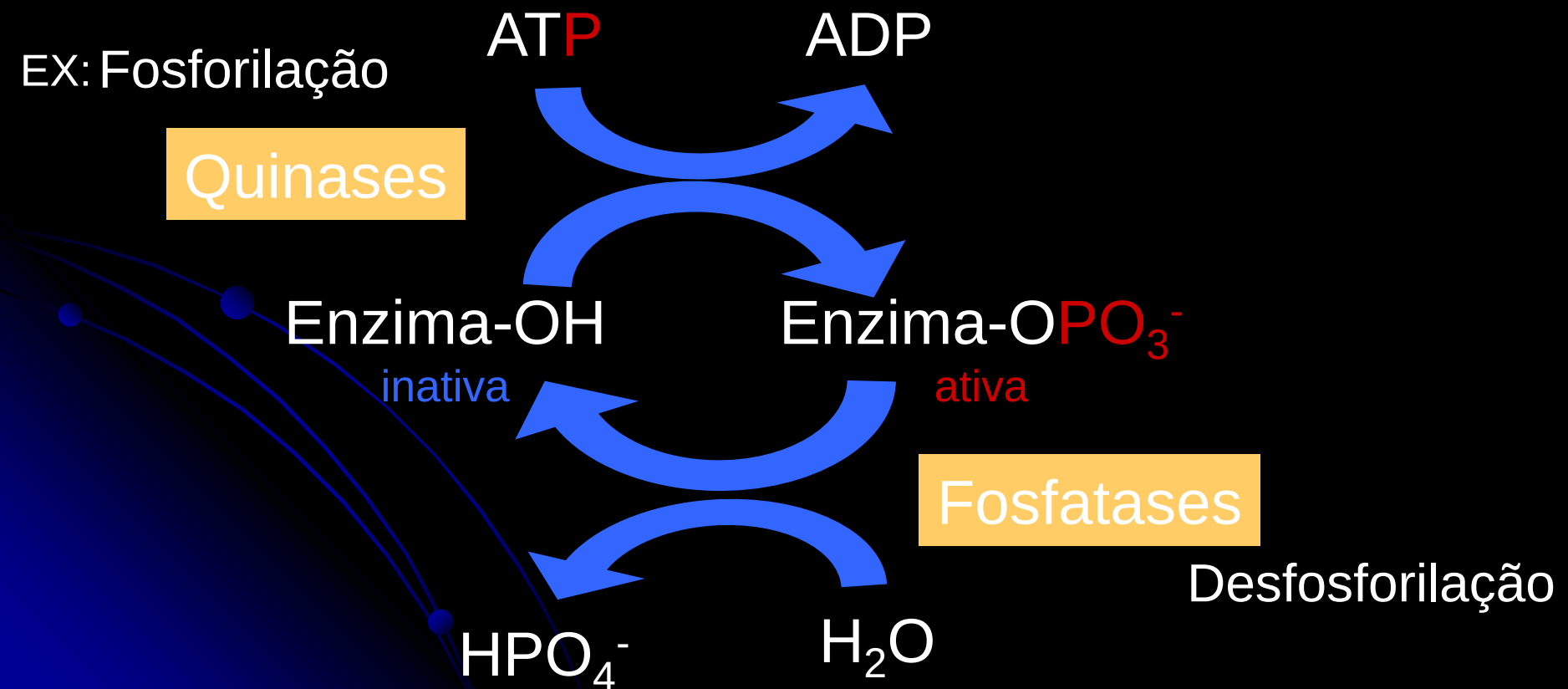


negativos

Regulação da Atividade Enzimática

Modificação Covalente

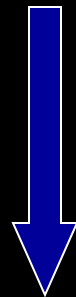
Grupos (fosforil, acetil, metil, amida, carboxil, hidroxil, sulfato) são ligados covalentemente as enzimas regulatórias



Regulação da Atividade Enzimática

Clivagem Proteolítica

Pró-Enzimas
Zimogênios



Clivagem Proteolítica

Enzima Ativa

Ex: tripsina e quimotripsina

Regulação da Atividade Enzimática

Controle à Nível Gênico

Mensagem genética



RNA_m



PROTEÍNA
(ENZIMA)

Algumas enzimas não são sintetizadas continuamente pelas células

Regulação da Atividade Enzimática

Controle à Nível Gênico

Sua produção é induzida pela presença de uma substância adequada



INDUTOR

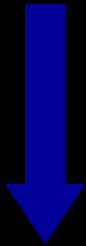


Induzir a transcrição dos genes da proteína
(enzima)

Regulação da Atividade Enzimática

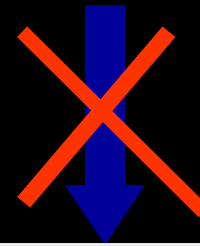
Controle à Nível Gênico

INDUTOR
presente



Síntese da
proteína

INDUTOR
ausente

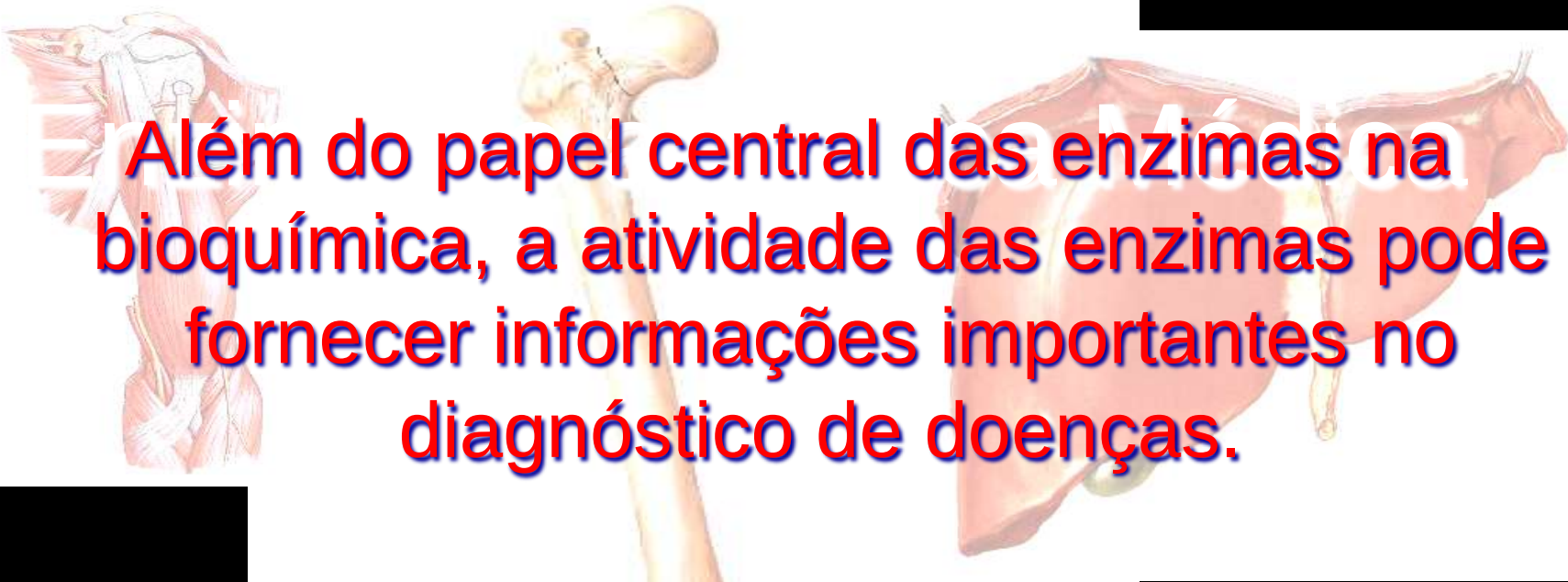


NÃO ocorre
a síntese da
proteína

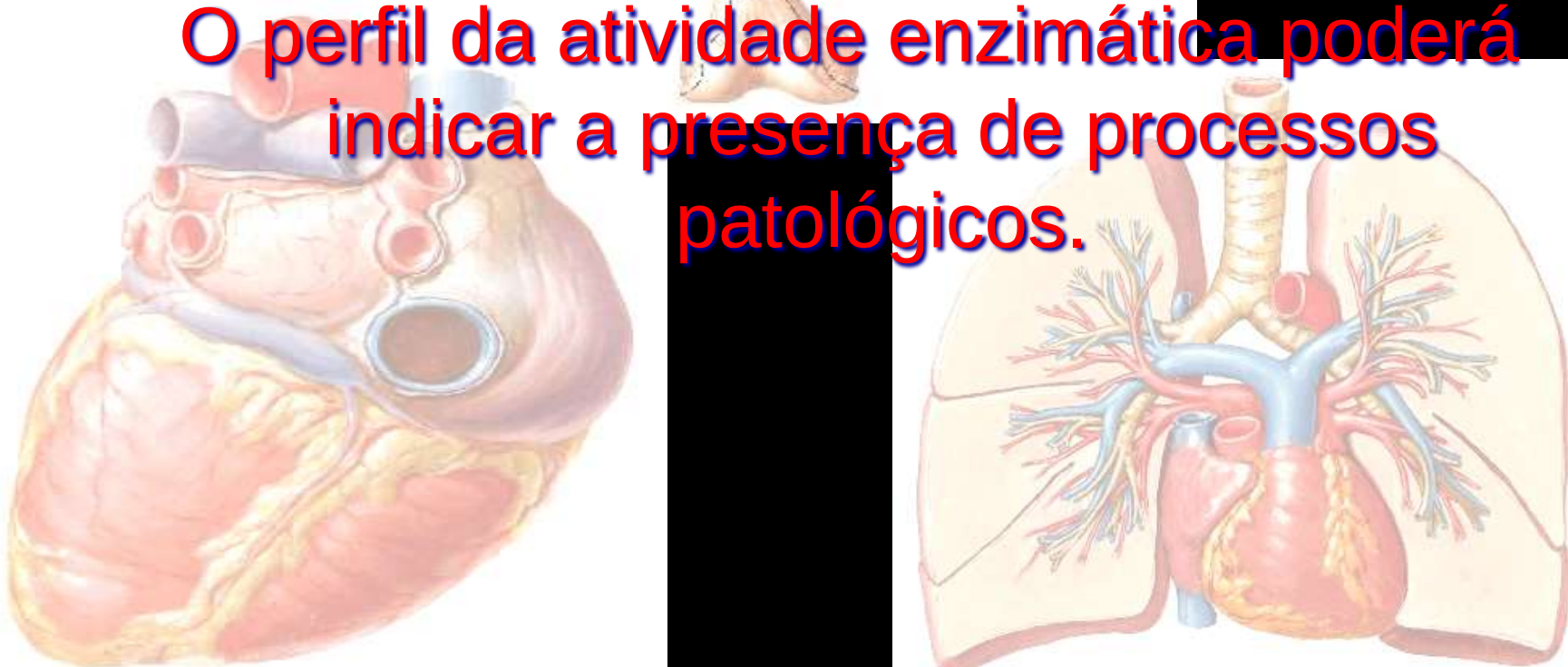
Exemplo: *lac* operon (*E. coli*)

- Operon *lac* - Unidade regulatória completa
 - Inclui 3 genes p/ codificar enzimas distintas e regiões promotoras, finalizadoras, reguladoras e operadoras
 - Encontrado no cromossomo bacteriano e transcrito como mRNA único policistrônico
 - Permite o transporte e digestão da lactose apenas na ausência de glicose





Além do papel central das enzimas na bioquímica, a atividade das enzimas pode fornecer informações importantes no diagnóstico de doenças.



O perfil da atividade enzimática poderá indicar a presença de processos patológicos.

Enzimas e a Clínica Médica

As enzimas podem ser classificadas em dois grupos:

Plasma-específicas

secretadas ativamente no plasma por certos órgãos, tendo papel funcional no plasma

Não-plasma específicas

produzidas pelas células durante o metabolismo celular normal. São enzimas intracelulares, sem função fisiológica no plasma.

Enzimas não-plasma específicas

↑ Presença de enzimas intracelulares no plasma

Extravazamento
por lesão
tecidual

Extravazamento
por alteração de
permeabilidade
da membrana

Estado patológico

A determinação das atividades de muitas enzimas no plasma é utilizada para fins diagnósticos em várias doenças.

O grau de elevação da atividade enzimática no plasma pode auxiliar na avaliação do prognóstico do paciente.

Enzimas não-plasma específicas

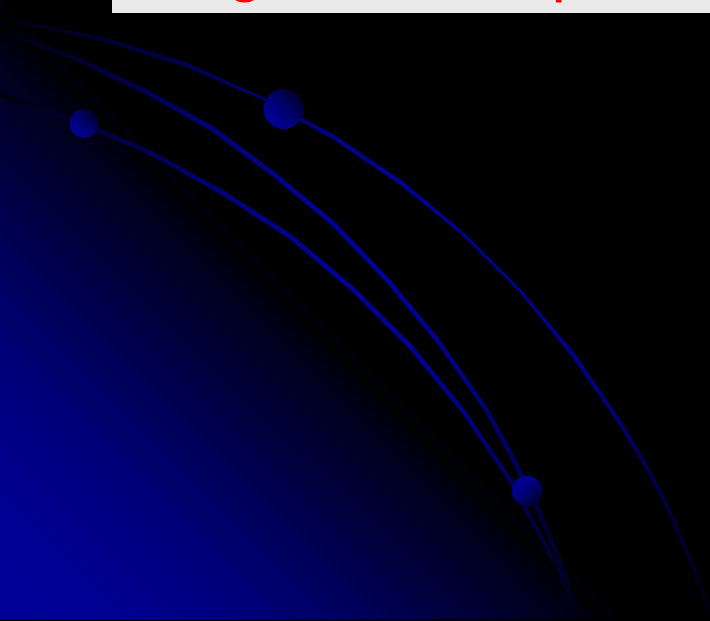
Distribuição tecidual
restrita a um ou a
poucos tecidos

Distribuição tecidual ampla

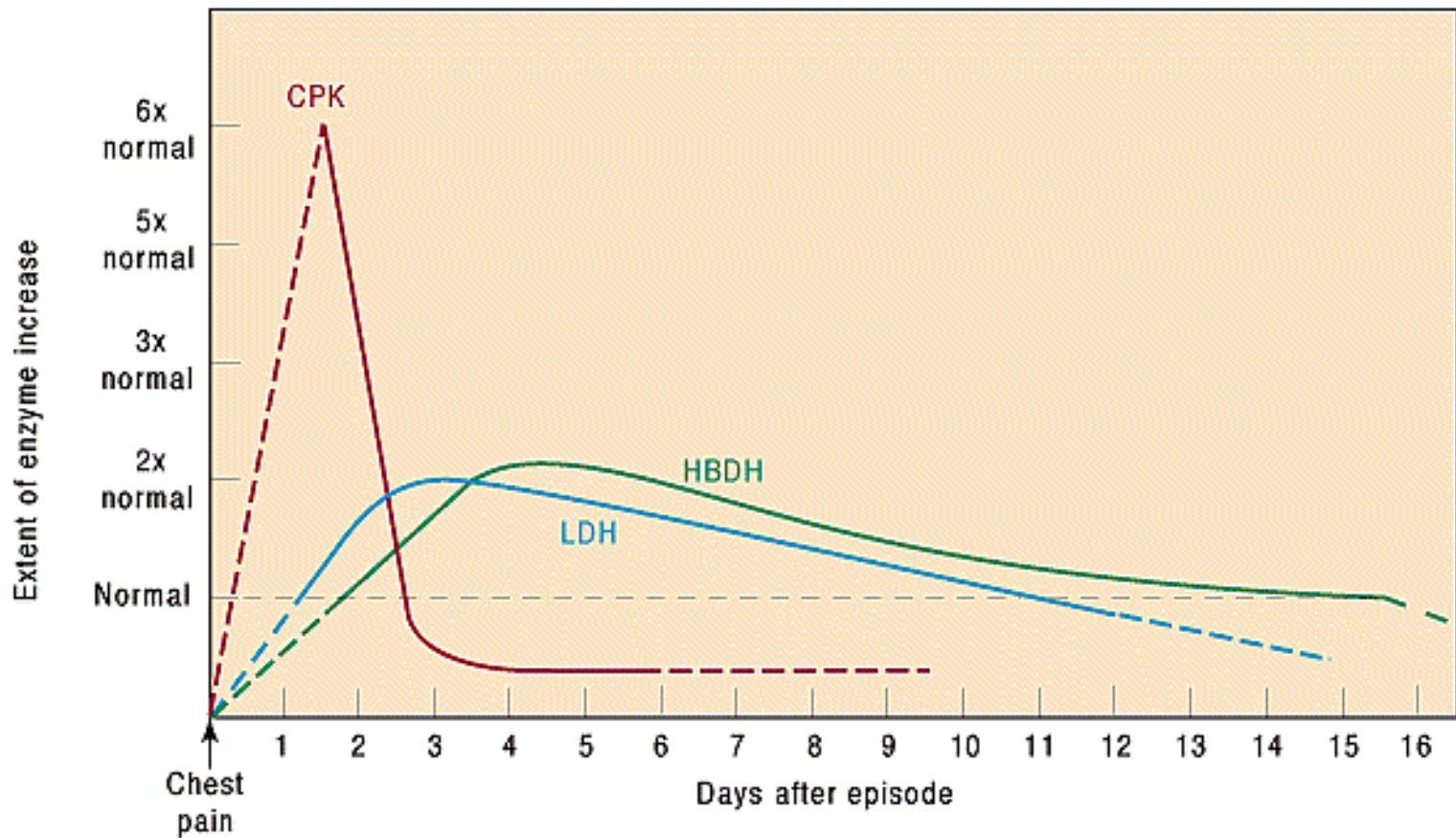
↑ Concentração no plasma

Diagnóstico específico

Valor diagnóstico
limitado



Cinética de liberação de enzimas cardíacas no soro após um IAM



CPK – creatina quinase

LDH – Lactato desidrogenase

HBDH - α -hidroxibutírico desidrogenase

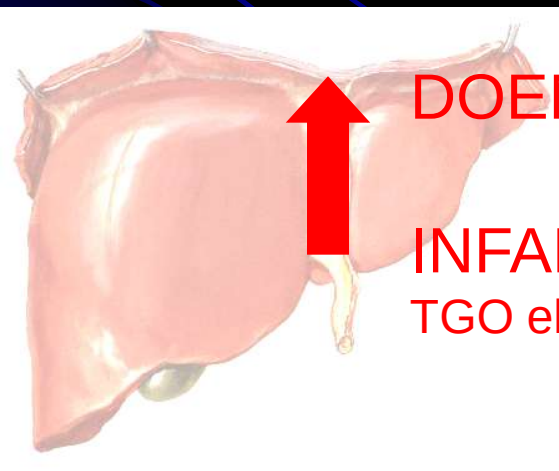
Outras enzimas importantes em diagnóstico

Transaminases

TGO - Transaminase glutâmico oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico pirúvica

Presentes nas células do fígado, coração, músculo esquelético, rins e pâncreas.



DOENÇA HEPÁTICA

INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

TGO eleva-se após 12 horas, atingindo seu pico após 24-36 horas.



Outras enzimas importantes em diagnóstico

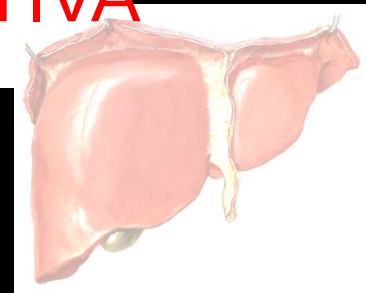
Fosfatases

Fosfatase Alcalina

Presente em muitos tecidos, principalmente no fígado e nos ossos. O aumento fisiológico é observado na GRAVIDEZ e na INFÂNCIA.



DISTÚRBIOS ÓSSEOS
DOENÇA HEPÁTICA OBSTRUTIVA



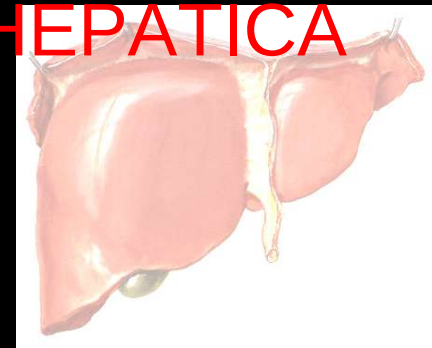
Outras enzimas importantes em diagnóstico

Transferases

GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE



INDICADOR DE DOENÇA HEPÁTICA
ALCOOLISMO



Outras enzimas importantes em diagnóstico

Amilase

Produzida pelo pâncreas e pelas glândulas salivares



PANCREATITE
CAXUMBA



A atividade metabólica das células é regulada pelo controle da atividade enzimática

