Universidade Federal de Minas Gerais
Educação a Distância
2011

Bases Moleculares II:
Bioquímica, Genética e Biofísica



Audrey Heloisa Ivanenko Salgado
Carlos Renato Machado
Mônica Bucciarelli Rodriguez

Bases Moleculares II: Bioquímica, Genética e Biofísica

Audrey Heloisa Ivanenko Salgado
Carlos Renato Machado
Mônica Bucciarelli Rodriguez

Bases Moleculares II: Bioquímica, Genética e Biofísica

Belo Horizonte
CAED-UFMG
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Prof. Clélio Campolina Diniz
Reitor
Profª. Rocksane de Carvalho Norton
Vice-Reitora
Profª. Antônia Vitória Soares Aranha
Pró-Reitora de Graduação
Prof. André Luiz dos Santos Cabral
Pró-Reitor Adjunto de Graduação

CENTRO DE APOIO À EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA
Prof. Fernando Selmar Rocha Fidalgo
Diretor de Educação a Distância
Prof. Wagner José Corradi Barbosa
Coordenador da UAB/UFMF
Prof. Hormindo Pereira de Souza Junior
Coordenador Adjunto da UAB/UFMG

EDITOR
Prof. Fernando Selmar Rocha Fidalgo

CONSELHO EDITORIAL
Profª. Ângela Imaculada Loureiro de Freitas Dalben
Prof. Dan Avritzer
Profª. Eliane Novato Silva
Prof. Hormindo Pereira de Souza
Profª. Paulina Maria Maia Barbosa
Profª. Simone de Fátima Barbosa Tófani
Profª. Vilma Lúcia Macagnan Carvalho
Prof. Vito Modesto de Bellis
Prof. Wagner José Corradi Barbosa

COLEÇÃO EAD – BIOLOGIA
Coordenadora: Gleydes Gambogi Parreira
LIVRO: Bases moleculares II : bioquímica, genética e biofísica
Autores: Audrey Heloisa Ivanenko Salgado, Carlos Renato Machado, Mônica Bucciarelli Rodriguez
Revisão: Jussara Maria Frizzera
Projeto Gráfico: Laboratório de Arte e Tecnologia para Educação/EBA/UFMG
Este livro recebeu apoio financeiro do Pró-licenciatura (SEED-MEC) e da UAB/CAPES.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Escola de Belas Artes da UFMG, MG, Brasil)

S164b Salgado, Audrey Heloisa Ivanenko
Bases moleculares II : bioquímica, genética e biofísica / Audrey Heloisa Ivanenko Salgado, Carlos Renato Machado, Mônica Bucciarelli Rodriguez. – Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2011.
191 p. : il. (algumas color.) ; 27 cm.

ISBN: 978-85-64724-01-3

1. Biologia molecular. 2. Genética molecular. 3. Código genético. 4. Biofísica. 5. Bioquímica. 6. Ensino a distancia. I. Machado, Carlos Renato. II. Rodriguez, Mônica Bucciarelli. III. Título. IV. Universidade Federal de Minas Gerais.

CDD: 574.87328
CDU: 577.2

Ficha catalográfica elaborada por Luciana de Oliveira M. Cunha, CRB-6/2725

Este livro recebeu apoio financeiro do Pró-licenciatura (SEED-MEC) e da UAB/CAPES.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **09**

Nota do Editor 09

Coordenadora 10

Autores 11

AULA 1: COMPARTIMENTOS LÍQUIDOS DO CORPO **12**

Autora: Audrey Heloisa Ivanenko Salgado

1.1 Introdução 13

1.2 Distribuindo a água nos compartimentos do corpo 14

1.3 Ciclo da água 17

1.4 Como medir a quantidade de líquido em cada compartimento 20

1.5 O compartimento intracelular 21

1.6 O compartimento extracelular 22

1.7 O sangue 23

1.8 A linfa 24

1.9 Alterações no conteúdo de água 26

AULA 2: GÊNESE DO POTENCIAL DE MEMBRANA **30**

Autora: Audrey Heloisa Ivanenko Salgado

2.1 Introdução 32

2.2 Difusão e a Lei de Fick 32

2.3 A membrana atuando como um capacitor 35

2.4 Forças no entorno da membrana: influência da composição do meio externo e do meio interno 36

2.5 Potencial de equilíbrio de um íon: A Equação de Nernst 38

2.6 A seletividade da membrana e outras influências sobre a diferença de potencial 39

2. 7 Utilizando as equações de Nernst e de G-H-K 43

2.8 Compreendendo melhor a assimetria de distribuição iônica: Equilíbrio de Donnan 47

AULA 3: POTENCIAL DE AÇÃO **52**

Autora: Audrey Heloisa Ivanenko Salgado

3.1 Introdução 53

3.2 Descrevendo um pouco a célula nervosa 55

3.3 Estimulando a célula nervosa 57

3.4 O potencial de ação 58

3.4.1. A barreira inicial 59

3.4.2. Vencida a barreira inicial do potencial limiar vem a despolarização 61

3.4.3. A resposta à despolarização é dada pelo íon potássio: repolarização 62

3.4.4. Ação dos canais de potássio e da Na^+- K^+ Atpase - da hiperpolarização ao potencial de repouso 63

AULA 4: PROPAGAÇÃO DO IMPULSO NERVOSO - A NEUROTRANSMISSÃO SINÁPTICA 68
Autora: Audrey Heloisa Ivanenko Salgado

4.1 Mecanismos de condução do impulso nervoso 69
4.2 A sinapse 71
4.3 A transmissão neuromuscular 77

AULA 5: METABOLISMO DE LIPÍDEOS 82
Autor: Carlos Renato Machado

5.1. Como obtemos os ácidos graxos? 84
5.2. Ativação dos ácidos graxos 85
5.3. Oxidação de ácido graxo 87
5.3.1. Entrando na mitocôndria 87
5.3.2. A beta oxidação de ácidos graxos 87
5.3.3. Os ácidos graxos queimam na fogueira dos carbohidratos 89
5.3.4. Formação de corpos cetônicos 89
5.4. Síntese de ácidos graxos 91
5.4.1. Síntese de ácidos graxos maiores que 16 carbonos e insaturados 95
5.5. Síntese de triacilglicerol 96
5.6. Regulação da degradação e síntese de ácidos graxos 96
5.7. Síntese de colesterol 97
5.8. Regulação da síntese de colesterol 99
5.9. As apolipoproteínas 100

AULA 6: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E NUCLEOTÍDEOS 104
Autor: Carlos Renato Machado

6.1. A oxidação de aminoácidos 105
6.1.1. O processo de transaminação 105
6.1.2. O processo de desaminação 109
6.1.3. O Ciclo da uréia 109
6.1.3.1. A bicicleta de Krebs 111
6.1.3.2. A formação da uréia 111
6.1.4. Os aminoácidos cetogênicos e glicogênicos 112
6.1.5. Erros do metabolismo de aminoácidos 113
6.1.6. Aminoácidos essenciais e não essenciais 114
6.2. Os nucleotídeos 114
6.2.1. Síntese dos nucleotídeos 117
6.2.1.1. Síntese de novo das purinas 117
6.2.1.2. Regulação da síntese de novo das purinas 122
6.2.2. A via de salvação de purinas 123
6.2.3. A via de síntese de pirimidinas 123
6.2.4. A síntese de desoxiribonucleotídeos 125
6.2.5. A síntese da desoxtimidilato 126
6.2.6. A síntese de nucleotídeos como alvo da quimioterapia 127

AULA 7: A NATUREZA DO MATERIAL GENÉTICO - HISTÓRIA DA DESCOBERTA DO DNA **130**
Autor: Carlos Renato Machado

7.1. Os primórdios do estudo sobre o DNA 131
7.2. Na primeira metade do século XX, novos passos são dados na história da pesquisa do DNA 132
7.2.1. O princípio transformante 134
7.3. Como a estrutura do DNA foi desvendada 137
7.4. A Biologia Molecular após a dupla hélice do DNA 142
7.5. A descoberta de diversas ferramentas utilizadas na Biologia Molecular 144
7.5.1. Os plasmídeos 144
7.5.2. As enzimas de restrição e as ligases 146
7.5.3. O primeiro experimento de clonagem 147

AULA 8: FLUXO DA INFORMAÇÃO - REPLICAÇÃO DO DNA, TRANSCRIÇÃO E PROCESSAMENTO DE RNA **150**
Autora: Mônica Bucciarelli Rodriguez

8.1. Replicação de DNA 151
8.1.1. A replicação é semi-conservativa 152
8.1.2. A replicação pode ter vários inícios 154
8.1.3. A replicação é contínua e descontínua 155
8.2. Transcrição 158
8.2.1. A RNA polimerase liga-se ao promotor para começar a transcrição 160
8.2.2. Estrutura de genes de procariotos 162
8.2.3. Controle de transcrição em bactérias 163
8.2.4.Estrutura de genes de eucariotos 167
8.3 Processamento do mRNA em eucariotos 168
8.3.1 Adição de “cap” 169
8.3.2 Remoção de introns 169
8.3.3 Adição de cauda de poli(A) 172

AULA 9: FLUXO DA INFORMAÇÃO - TRADUÇÃO, MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS E EFEITOS FENOTÍPICOS DE MUDANÇA DE SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS **174**
Autora: Mônica Bucciarelli Rodriguez

9.1. Tradução 175
9.1.1. Participantes da tradução: RNAs mensageiros (mRNAs), ribossomos e RNAs de transferência ou transportadores (tRNAs) 175
9.1.2. O código genético 178
9.1.3. O processo da tradução 180
9.2. Modificação e endereçamento de proteínas 184
9.3. Efeito de mutações 186
9.3.1 Classificações de mutações 186
9.3.2. Mutações em regiões codificantes 186
9.3.3. Mutações supressoras 188

NOTA DO EDITOR

A Universidade Federal de Minas Gerais atua em diversos projetos de Educação a Distância, que incluem atividades de ensino, pesquisa e extensão. Dentre elas, destacam-se as ações vinculadas ao Centro de Apoio à Educação a Distância (CAED), que iniciou suas atividades em 2003, credenciando a UFMG junto ao Ministério da Educação para a oferta de cursos a distância.

O CAED-UFMG (Centro de Apoio à Educação a Distância da Universidade Federal de Minas Gerais), Unidade Administrativa da Pró-Reitoria de Graduação, tem por objetivo administrar, coordenar e assessorar o desenvolvimento de cursos de graduação, de pós-graduação e de extensão na modalidade a distância, desenvolver estudos e pesquisas sobre educação a distância, promover a articulação da UFMG com os polos de apoio presencial, como também produzir e editar livros acadêmicos e/ou didáticos, impressos e digitais, bem como a produção de outros materiais pedagógicos sobre EAD.

Em 2007, diante do objetivo de formação inicial de professores em serviço, foi criado o Programa Pró-Licenciatura com a criação dos cursos de graduação a distância e, em 2008, com a necessidade de expansão da educação superior pública, foi criado pelo Ministério da Educação o Sistema Universidade Aberta do Brasil – UAB. A UFMG integrou-se a esses programas, visando apoiar a formação de professores em Minas Gerais, além de desenvolver um ensino superior de qualidade em municípios brasileiros desprovidos de instituições de ensino superior.

Atualmente, a UFMG oferece, através do Pró-licenciatura e da UAB, cinco cursos de graduação, quatro cursos de pós-graduação *lato sensu*, sete cursos de aperfeiçoamento e um de atualização.

Como um passo importante e decisivo, o CAED-UFMG decidiu, neste ano de 2011, criar a Editora CAED-UFMG como forma de potencializar a produção do material didático a ser disponibilizado para os cursos em funcionamento.

O primeiro desafio foi a publicação dos livros da coleção Educação a Distância, série Biologia. Agradecemos aos autores e à equipe de produção pela competência e dedicação que garantiram, com certeza, o nível de excelência desta obra apresentada à comunidade acadêmica.

Fernando Selmar Rocha Fidalgo
Editor

ENSINO A DISTÂNCIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA MODALIDADE "EDUCAÇÃO À DISTÂNCIA"?
Formação de um Biólogo, e com Licenciatura? *IMPOSSÍVEL*! Sim, foi esta a minha reação inicial, Bióloga e também licenciada em Ciências. E, para aumentar minha surpresa, fui designada para coordenar a produção dos fascículos, que deveriam ser escritos em uma linguagem em que os alunos não prescindissem da presença física do professor em sala de aula, ou seja, *DESAFIADOR*! Sim, foi esta a incumbência que a UFMG recebeu do MEC e que nós, professores do Instituto de Ciências Biológicas, abraçamos, com nossas limitações sim, mas acima de tudo com a certeza de que envidaríamos todos os nossos esforços para que os fascículos fossem produzidos.

Na minha primeira reunião com os redatores, me fizeram a seguinte pergunta: "Como se escreve para alunos que estão à distância, sem os recursos acadêmicos?" Minha resposta "... não sei!" Mas, imediatamente me ocorreu que, na verdade, os escritores fazem isto o tempo todo e conseguem, com magnitude, atingir centenas de milhares de leitores.

E no caso do conteúdo da Biologia não seria diferente, pois o nosso "tema" está ao nosso redor, nas plantas, nos animais visíveis a "olho nu" e, se invisíveis, nos levando a outra dimensão do conhecimento. E, acima de tudo, "nós" somos um dos temas da biologia, concordam? Ou será que a *CÉLULA* está presente somente no título do livro? Enquanto lemos, falamos, andamos e entendemos o que nos está sendo ensinado, são elas, as células, é que estão funcionando! E se sofremos a invasão de microorganismos, são eles que as invadem e que provocam sua reação e acionam seu metabolismo celular.

E a amplitude que propusemos atingir viaja também entre os conhecimentos macroscópicos desde o estudo do corpo humano como um todo até organismos que habitam o entorno do mesmo, como parasitas, visíveis ou não a olho nu; insetos, benéficos ou causadores de doenças, plantas, desde aquelas que nos encantam o olhar e acariciam nossa alma até aquelas de que necessitamos para nos alimentar ou para produzir medicamentos que devem combater doenças adquiridas por nosso corpo, no contexto da nossa vida integrada com a natureza.

E neste pensamento, descobrimos que escrever um fascículo para alunos que não estejam próximos de nós é muito mais interessante do que pensávamos, pois o nosso leitor é o nosso parceiro, o nosso co-autor!

Bem vindos ao Ensino à Distância!

Dra. Gleydes Gambogi Parreira
Coordenadora da Produção de Fascículos de Biologia

APRESENTAÇÃO

Dando continuidade às nossas aulas de Bases Moleculares I, prosseguimos nossa jornada, abordando agora os mecanismos moleculares que regem o funcionamento celular. Nessa segunda etapa começaremos estudando as propriedades da água, das soluções e das membranas sobre a compartimentalização celular. Veremos como a célula é capaz de gerar trabalho a partir da permeabilidade seletiva e da diferença de concentração iônica entre esses diversos compartimentos, e prosseguiremos estudando o metabolismo celular, principalmente de como somos capazes de obter energia de gorduras e proteínas, além de entender a síntese de nucleotídeos. Finalmente, discutiremos os mecanismos moleculares da transmissão de informação genética.

Esperamos que vocês possam partilhar de nosso entusiasmo pelo entendimento dos processos celulares!

Audrey H. Ivanenko Salgado
Carlos Renato Machado
Mônica Bucciarelli Rodriguez
Autores

1 Compartimentos líquidos do corpo

AULA 1: COMPARTIMENTOS LÍQUIDOS DO CORPO

Ao final desta aula o aluno deverá ser capaz de:

- Definir homeostasia
- Caracterizar os compartimentos do corpo
- Definir a relação entre os compartimentos do corpo
- Descrever o ciclo da água e o balanço hídrico no organismo
- Descrever as quantidades de líquido em cada compartimento
- Descrever a composição dos diferentes compartimentos
- Descrever a composição do sangue e da linfa
- Descrever as alterações no conteúdo de água

1.1. INTRODUÇÃO

> *"O corpo vivo, embora necessite do ambiente que o circunda, é, apesar disso, relativamente independente do mesmo. Esta independência do organismo com relação ao seu ambiente externo deriva do fato de que, nos seres vivos, os tecidos são, de fato, removidos das influências externas diretas, e são protegidos por um verdadeiro ambiente interno, que é constituído, particularmente, pelos fluidos que circulam no corpo."*
> ***Claude Bernard***

Claude Bernard, que viveu entre os anos de 1813 a 1878 foi o criador da medicina experimental. Vem dele a expressão "meio interno" quando percebeu que, mesmo sob fortes variações do meio externo, um organismo vivo sempre tende a manter uma constância. Mais tarde, este conceito foi utilizado para definir outro termo: homeostasia, que significa um estado de permanência fixa, isto é, a manutenção da composição do meio, mantendo sua composição química estável, mesmo com as constantes trocas e transformações do metabolismo. A homeostasia garante, por exemplo, a manutenção dos seguintes parâmetros: pH sanguíneo em valores próximos de 7,4; a temperatura em 37 graus Celsius; glicose sanguínea 90 mg/100 mL de sangue; pressão sanguínea em 120/80. Quando a homeostasia é perturbada, pode resultar na doença. Toda vez que o organismo sofre alterações nestas condições se afastando do ideal ou do normal, há sofrimento celular. Se o nosso ambiente interno mudar muito, as reações químicas podem parar e o organismo morrer.

A homeostase é o mecanismo que o organismo lança mão para manter a vida. Na verdade a estabilidade completa é impossível, uma vez que o organismo

humano é um sistema aberto, e assim troca matéria e energia com o meio ambiente. A constância ou estabilidade é diferente de equilíbrio. O estado de equilíbrio deve ser considerado como sendo estático, pois uma vez atingido não há possibilidade de progressão, equivalendo então à morte celular. A estabilidade da célula viva é dinâmica e resulta do balanço entre síntese, destruição e reparação. O corpo humano possui um mecanismo, extremamente sensível, auto-regulador e auto-conservador que procura manter constante o seu meio interior, apesar das variações no meio externo.

O controle rigoroso das funções corporais, incluindo a manutenção do estado interno, ou seja, a homeostasia, é exercido pelo sistema nervoso e pelos sistemas hormonais de regulação. O sistema sensorial detecta o estado do corpo e do ambiente, reconhece estes estímulos, recebendo e encaminhando sinais que serão processados no sistema nervoso central. Uma vez processados, outros estímulos são enviados aos órgãos efetores e regulados metabolicamente pelos hormônios.

A água exerce um papel fundamental na garantia destes parâmetros. Um exemplo muito simples: quando faz calor, o corpo começa a perder água através do suor; a água evapora, refrigerando o sangue abaixo da pele, o que ajuda a manter a temperatura do corpo; a perda de água é compensada quando sentimos sede e ingerimos água e se bebermos muita água, o excesso é eliminado pela urina; a homeostasia foi garantida através de mecanismos simples, mantendo constante a temperatura, a quantidade de água no organismo e a concentração de diversas substâncias que estão diluídas na água.

Todo o nosso organismo contribui para a homeostasia. Veja outro exemplo de um componente fundamental no processo: o sangue permite o fluxo de substâncias nele contidas através do organismo, onde as trocas metabólicas irão ocorrer; o sangue flui pelos vasos sanguíneos, segue pelos capilares até as células; a permeabilidade dos capilares sanguíneos permite a troca, ou seja, a difusão de grande parte dos constituintes dissolvidos no sangue à exceção de grandes moléculas.

1.2. DISTRIBUINDO A ÁGUA NOS COMPARTIMENTOS DO CORPO

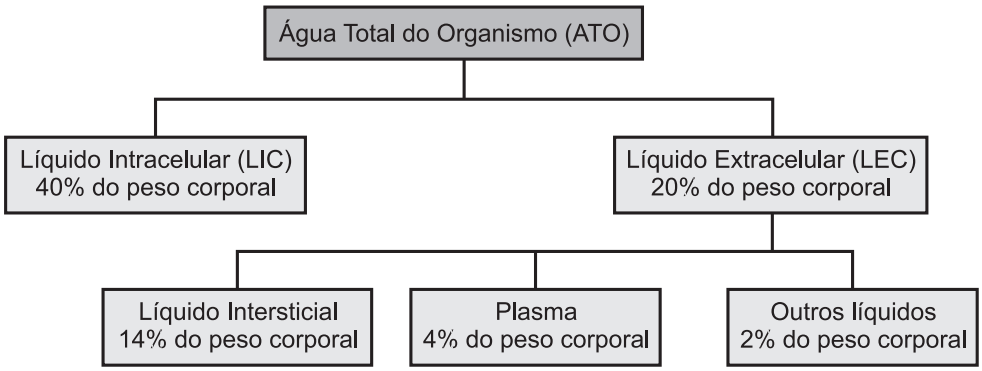
A quantidade de água do corpo humano é expressa por peso ou por volume e é denominada de água total do organismo. A água está subdividida em diferentes ambientes ou compartimentos, e estes são separados, uns dos outros, por membranas, às vezes paredes celulares semi-permeáveis. A água flui facilmente de um meio a outro, em um constante fluxo, em equilíbrio dinâmico. Estes ambientes diferem entre si pela composição e concentração. A distribuição de solutos e a habilidade de cada membrana em restringir o movimento desses solutos para dentro e para fora das estruturas que formam estes ambientes (como os capilares, interstício e células) resulta na compartimentalização.

Vamos considerar que o corpo humano é composto de 70 trilhões de células mergulhadas num fluido. Desta maneira já delimitamos dois compartimentos, o de dentro e o de fora das células. São os meios intracelular e extracelular respectivamente. O líquido que banha as células sofre constante renovação feita pelo sangue que circula. A variação que ocorrer na composição do sangue leva consequentemente a variações na composição do líquido extracelular. É importante, portanto, garantir a composição constante do líquido extracelular e assim proteger a célula de grandes variações que ocorrem no meio externo.

A composição dos compartimentos líquidos apresenta algumas diferenças. Entretanto, qualquer que seja o compartimento, a eletroneutralidade é mantida, já que a concentração de ânions iguala-se à de cátions em cada um dos compartimentos. A unidade para expressar a quantidade de soluto presente nestes meios é o equivalente grama /volume. Outra qualidade marcante é a iso-osmolaridade entre os meios. Mesmo com composições diferentes, os meios intra e extracelular mostram a mesma concentração em mols de partículas, ou seja, há equilíbrio osmótico entre eles. Esta qualidade é mantida devido à permeabilidade das membranas à água, que flui entre eles, buscando a iso-osmolaridade.

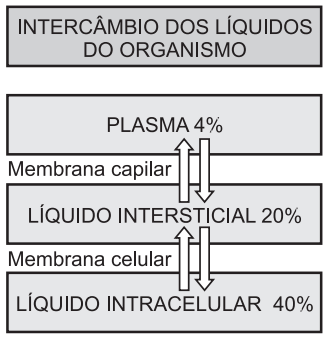
Há uma regra simples para definirmos a relação entre os compartimentos do corpo: a regra do **60-40-20** onde 60% do peso corporal é água; 40% do peso corporal é líquido intracelular; e 20% do peso corporal é líquido extracelular. O líquido extracelular pode ser subdividido em líquido intersticial, plasma e líquido transcelular. O plasma é o líquido que circula pelos vasos sanguíneos e o líquido intersticial é o líquido que banha as células. No plasma estão suspensas as células sanguíneas e as plaquetas. A água contida no plasma corresponde a quarta parte do líquido extracelular, ou seja, aproximadamente 3,5 litros em um adulto de 70kg. O Quadro 1 ilustra a distribuição de água no organismo.

Devemos fazer diferenças entre o conteúdo de água presente em função do gênero, da idade, da massa muscular e do conteúdo de gordura presente numa pessoa. Para um adulto masculino, a quantidade de água total do organismo oscila em torno de 60% do peso corporal. Este valor pode variar entre 50 a 75% se consideráramos uma pessoa baixa e gorda até um atleta musculoso e alto. Nas mulheres o conteúdo varia entre 40 a 50%. Quanto maior a quantidade de gordura menor a quantidade de água, o que explica a diferença encontrada quanto se compara um adulto gordo e um atleta, que às vezes apresentam a mesma massa em quilograma, mas diferente conteúdo de massa muscular. Os recém-nascidos apresentam aproximadamente 70 a 85% do peso corporal de conteúdo líquido, e a perda de água ocorre ao longo da vida, chegando a 50% nos idosos, como consequência da perda de massa muscular e diminuição da atividade metabólica.



Quadro 1: Distribuição de água no organismo

O Quadro 2 mostra o intercâmbio líquido entre os diferentes compartimentos do organismo. A água atravessa as membranas capilar e celular para promover as trocas. O plasma e o espaço intersticial trocam água através das membranas capilares. O interstício e o interior das células trocam água através das membranas celulares.



Quadro 2: Troca entre os compartimentos

A tabela 1 resume a distribuição de água em diferentes tecidos corporais, em um homem de 75 kg [1]e a tabela 2 relaciona o conteúdo hídrico corporal total entre compartimentos em um homem adulto.

Tecido Corporal	Conteúdo Hídrico	Participação no Peso Corporal Total	Litros de Água para o peso corporal de75 kg	Participação no Conteúdo Hídrico Corporal Total
Músculos	76%	43%	24 L	55%
Ossos	22%	15%	2,47 L	5%
Tecido adiposo	10%	12%	0,90 L	2%
Pele	72%	18%	9,72 L	22%
Órgãos	76%	7%	3,99 L	9%
Sangue	83%	5%	3,11 L	7%

Tabela 1 - Conteúdo hídrico em diferentes tecidos corporais, em um homem de 75 kg [1]

1 - (Adaptado de MARQUEZI, M.L. & LANCHA JUNIOR, A.H. in *Rev. paul. Educ. Fís., São Paulo, **12**(2): 219-27, jul./dez. 1998*).

	Participação no Peso Corporal Total	Participação na Massa Corporal Isenta de Gordura	Participação no Conteúdo Hídrico Corporal Total
Conteúdo Hídrico Corporal Total	60%	72%	100%
Conteúdo Hídrico Extracelular	20%	24%	33%
Plasma	5%	6%	8%
Interstício	15%	18%	25%
Conteúdo Hídrico Intracelular	40%	48%	67%

Tabela 2 - Distribuição do conteúdo hídrico corporal total entre compartimentos em um homem adulto.[1]

Como dito anteriormente, o líquido extracelular pode ser subdividido em líquido intersticial, plasma e líquido transcelular. O líquido intersticial e a linfa são considerados como sendo um só volume e representam 75% do líquido extracelular. A linfa é encontrada apenas nos vasos linfáticos enquanto que o líquido intersticial banha a maioria das células. O líquido intersticial é um ultrafiltrado do plasma e não contem proteínas, pois é resultante da ação da filtração feita pelas paredes dos capilares que é impermeável a proteínas. O líquido transcelular corresponde a apenas 1% a 3% do peso corporal e é separado do plasma sanguíneo por células epiteliais além do endotélio capilar. A composição do líquido transcelular é diferente daquela do plasma e está sempre sendo renovada, sofrendo modificações de acordo com as células epiteliais. Vejam os exemplos de líquidos transcelulares: o líquido cérebro-espinhal, o humor aquoso dos olhos, secreções do trato digestivo, saliva, bile, suco pancreático, urina, suor, lágrimas.

1.3. CICLO DA ÁGUA

O ciclo da água no organismo pode ser interpretado como um balanço entre o ganho, o uso e a perda de água. O equilíbrio é estabelecido quando a quantidade do ganho se iguala ao da perda, ou seja, o balanço é zero, indicando o estado de equilíbrio hídrico do organismo. Há as perdas obrigatórias realizadas para a regulação térmica e controle dos produtos de excreção. Pulmão, pele, rim e trato gastrointestinal são os responsáveis pela perda obrigatória. Vômitos, diarréias, sudorese visível são exemplos de perdas aditivas, ou seja, aquelas que podem ocorrer além da obrigatória.

A manutenção do volume de água no organismo depende do que foi perdido através da urina, fezes, respiração, transpiração. A perda obrigatória pode ser dividida entre perda insensível (não aparente e feita pela vaporização – pele e pulmão) e perda sensível (aparente como a urina e fezes). Essas perdas são dependentes das atividades voluntárias e involuntárias, são afetadas pela temperatura e umidade do ambiente, composição da dieta e alterações no

funcionamento normal do corpo quando na presença de doenças. O ganho deve ser aumentado quando fatores como temperatura ambiente elevada associada à baixa umidade do ar, aumento da taxa metabólica decorrente de doenças ou do estresse pelo exercício, provocam um aumento de perdas evaporativas insensíveis. A dieta rica em componentes minerais e sais podem afetar o equilíbrio hidroeletrolítico. Quanto maior o teor destes solutos, maior é a necessidade de ingestão de água para garantir a excreção pela urina e suor, que irão garantir o equilíbrio e a homeostase.

O ganho de água é feito através da ingestão de água ou obtida de alimentos pastosos. A quantidade de água a ser reposta deve ser aquela necessária para fazer a osmolaridade do plasma e seu volume permanecerem nos valores da normalidade fisiológica. A privação de água é percebida por sensores osmóticos, denominados osmorreceptores, que irão provocar a sensação de sede, a principal defesa do organismo contra o aumento da tonicidade do líquido extracelular. Outra maneira do organismo obter água através dos alimentos é denominada "água metabólica" ou "água endógena". É a água produzida pela oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas, pela retração celular e pela destruição de células. Veja que fantástica formação de água: a reação de oxidação de um mol de glicose fornece 6 mols de água, e se fizermos os cálculos em gramas, esta reação mostra que 100g de glicose produzem 60g de água, ou seja, 60% de rendimento em água.

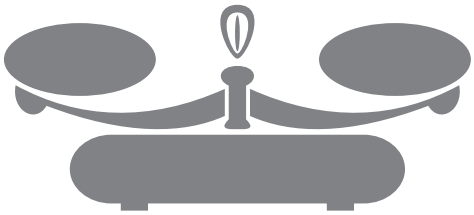
As perdas de água ocorrem pela urina, fezes, perda livre de água, por evaporação cutânea e pela respiração.

A perda urinária corresponde à água necessária para excretar os solutos. Há um valor máximo de osmolaridade urinária que pode ser atingido pelo organismo. Quando há disponibilidade de água, os solutos não necessitam de uma osmolaridade máxima para serem excretados e, do contrário, na ausência de água ou com pouca água, a urina fica extremamente rica em solutos indicando uma alta osmolaridade. O Hormônio Antidiurético, ADH, tem o papel de conservar a água corporal e regular a tonicidade dos líquidos corporais. A perda de água livre, sem solutos, na urina, é uma resposta a este hormônio, que controla a perda ou o ganho de água em condições de hipotonicidade ou hipertonicidade. A diminuição de 1% a 2% na osmolaridade inibe a secreção de ADH e inibe a sede em humanos, um aumento de 1 a 2% na osmolaridade são suficientes para provocar secreção máxima de ADH; e a partir de 3% provoca o mecanismo da sede.

Há uma pequena perda diária obrigatória de água fecal que pode estar elevada, nos caso de diarréia, ou diminuída, quando há muita absorção de água provocada por ganhos baixos e variações na dieta. A perda por evaporação cutânea pela pele é mínima (200 mL) e participa dos processos de termorregulação; já a perda pela respiração (600 mL) é provocada uma vez que o ar inspirado, normalmente, tem menos água do que o ar expirado. Isto acontece porque o ar que entra é aquecido e saturado com água antes da expiração. A perda de água por essa via sob condições moderadas é constante, mas quando o organismo é exposto a um ambiente quente, a evaporação de água do trato respiratório aumenta (até 2000 mL). Nota-se que em um indivíduo em estado febril (acima de 37^0C),

para cada grau centígrado aumentado, as perdas insensíveis através da pele aumentam em torno de 10%. Durante o período febril, cada grau de elevação na temperatura acima de 37^0C produzirá a vaporização de aproximadamente 1000 mL de água em 24 horas. O Quadro 2 sintetiza o balanço entre ganhos e perdas de água diária em condições de normalidade.

GANHOS	PERDAS
2,2 L Alimentação e bebida	1,15,L Pele e Pulmão
0,3L Metabolismo	1,25 L Urina
	0,1L fezes
Total de ganho: 2,2 + 0,3 = 2,5 L	**Total de perdas:** 1,15 + 1,25 + 0,1 = 2,5 L



Quadro 2: Balanço hídrico

A quantidade de água presente no organismo varia em função da idade, do sexo, da quantidade de tecido adiposo. Os recém nascidos podem ter 80% do seu peso em água, razão pela qual a perda de fluidos nesta idade é preocupante. Esta porcentagem decresce gradativamente nos primeiros seis meses de vida. Em certas situações especiais, como durante a gestação, a quantidade de água corporal também está aumentada devido à presença de água no feto, na placenta e no fluido amniótico, à expansão do volume sangüíneo e ao aumento do tamanho das glândulas mamárias. Outra situação especial é a distribuição diferenciada da massa corpórea em adultos. Nos indivíduos adultos do sexo masculino, os valores médios representam cerca de 60% do peso corporal e no sexo feminino, aproximadamente 50%, com variação de 15%. Os exemplos opostos: atleta e obesos.

A proporção entre o tecido adiposo e o tecido muscular, diferenciada nestes exemplos, distingue a quantidade de água em cada um destes indivíduos. Em relação ao tecido muscular, o tecido adiposo tem menor conteúdo de água. De modo geral, as mulheres apresentam maior percentagem de gordura corporal e os mais velhos apresentam menor volume de água. O idoso apresenta menor porcentagem de água, pois o processo de envelhecimento é acompanhado de perda de água, podendo chegar a 52% nos homens e 47% nas mulheres. O Quadro 3 resume as alterações da quantidade de água em função da idade.

Um adulto requer 35 mL de água por quilograma/dia; uma criança precisa de 50 a 60 mL/kg/dia e um lactente requer até 150 mL/kg/dia.

IDADE	% DE ÁGUA
0-2 ANOS	75 a 80
2-5 ANOS	70 a 75
5-10 ANOS	65 a 70
10-15 ANOS	63 a 65
15-20 ANOS	60 a 63
20-40 ANOS	58 a 60
40-60 ANOS	50 a 58
+ DE 60 ANOS	Menor que 58

Quadro 3: Porcentagem corporal de água em função da idade

1.4. COMO MEDIR A QUANTIDADE DE LÍQUIDO EM CADA COMPARTIMENTO

A água total do organismo pode ser determinada pela técnica de introdução de uma quantidade conhecida de substâncias, denominadas indicadores. Exemplos de indicadores são: antipirina, ureia, tioureia, água radioativa, D_2O, também conhecida como "água pesada" (pois a letra D significa o isótopo do hidrogênio, deutério, que é mais pesado que o hidrogênio). Posteriormente avalia-se a concentração dos indicadores no organismo através de cálculos de fator de diluição. Esta técnica é denominada método de diluição de indicadores. Assemelha-se a colocar uma gota de tinta num conteúdo de água e observar o quanto desta tinta se espalha no volume. Sabendo-se a concentração inicial da tinta colocada e através de uma amostra obtida após a sua diluição, é possível determinar o volume no qual a tinta de espalhou, pois a concentração diminui ao se distribuir no novo volume. Uma característica importante do indicador é ficar retido num determinado compartimento. Introduzido o indicador no organismo, espera-se um tempo necessário para que ele se distribua por todo o corpo e, posteriormente, faz-se a coleta de uma amostra. A concentração do indicador estando em equilíbrio pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$V = Q/C$$

onde V é o volume de distribuição, Q a quantidade do indicador inicial e C a concentração final do indicador. Deve-se levar em consideração a perda gerada pelo metabolismo ou excretada:

$$V = (Q - mL\ excretado)/C$$

É importante que o material utilizado como indicador não seja tóxico, que se

distribua uniformemente no compartimento, que não interfira na distribuição de água, que não seja modificado pelo organismo e que seja fácil de ser medido.

Para a medida de compartimentos específicos como, por exemplo, medida do volume sanguíneo, a escolha do indicador deve considerar que esta substância se distribua somente no sangue e aí permaneça o tempo necessário para obtenção da medida do volume. Dois grupos principais de substâncias são utilizados e que satisfazem estas condições: substâncias que combinam com as hemáceas e substâncias que combinem com as proteínas plasmáticas. Ferro, cromo e fósforo radioativos são as opções para as hemáceas e iodo radioativo e corantes vitais, como o azul de evans para as proteínas plasmáticas. Os corantes vitais não entram nas hemáceas e por isso este indicador não mede o volume total de sangue, e sim o volume plasmático. O que se faz então é somar os valores encontrados para as hemáceas e para o volume plasmático e assim termos o volume de sangue total.

1.5. O COMPARTIMENTO INTRACELULAR

A dimensão dos compartimentos líquidos do corpo, como visto anteriormente pela regra dos 60:40:20, nos diz que 60% do peso corporal é água; estes 60% são divididos em 40% no líquido intracelular e 20% do peso corporal em líquido extracelular.

O meio interno celular – meio intracelular – é limitado pela membrana plasmática. Corresponde, em termos muito gerais, ao citoplasma da célula. O meio intracelular é constituído essencialmente por água e solutos dissolvidos, filamentos citoplasmáticos e organelas. A preservação das características do meio interno e as diferenças com outros compartimentos são conseguidas através da membrana plasmática, que tem um papel fundamental, pois é ela que permite a troca seletiva entre os compartimentos. A composição exata dos eletrólitos contidos na água do interior das células não pode ser definida, pois não há técnicas que permitam sua determinação de modo direto.

A composição do líquido intracelular difere daquela do líquido extracelular. Embora existam variações de um tecido para outro, há características comuns à maioria dos líquidos intracelulares: as partículas presentes no líquido intracelulares em maiores concentrações, se comparadas com o líquido extracelular, são os cátions potássio (K+) e o magnésio (Mg 2+), e os ânions dos ésteres orgânicos do fosfato (ATP, ADP, fosfolipídeos, fosfato de creatina) e proteínas. A presença de uma maior concentração de proteínas no interior celular origina um efeito denominado de Gibbs-Donnan entre os líquidos intracelular e extracelular, o qual será discutido em outro capítulo. A presença de cálcio é quatro vezes mais baixa no líquido intracelular do que no líquido extracelular. Outra característica do líquido intracelular é o pH ligeiramente mais ácido do que o do meio extracelular. A tabela 3 mostra a composição em mEq/L do líquido intracelular.

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO^{3-}	SO_4^{2} PO_4^{2-}	Ác . Org.	Proteínas
mEq/L	10	150	-	40	-	10	150	-	40

Tabela 3: Composição eletrolítica dos líquidos intracelular (mEq/L)

Equivalente-grama de uma substância é a massa dessa substância capaz de reagir com1g de hidrogênio.

Regras práticas

a) Para o elemento:

E = massa molar/Valência

Exemplo: Para o sódio – Na^+ E = 23g / 1 = 23g

b) Para a substância:

E = massa molar/ k

O valor de k é interpretado de acordo com o comportamento químico da substância:

b1) Ácido: k é igual ao número de hidrogênios ionizáveis (H^+).

$E_{ácido}$ = massa molar/nº de H^+

Para o ácido sulfúrico - H_2SO_4 E = 98g / 2 = 49g

b2) Base: k é igual ao número de hidroxilas (OH^-).

E_{base} = massa molar/nº de OH^-

Para o hidróxido de alumínio - $Al(OH)_3$ E = 78g / 3 = 26g

b3) Sal: k é igual à valência total do cátion ou do ânion considerado.

E_{sal} = massa molar/ valência total

Para o sulfato de alumínio - $Al_2(SO_4)_3$ E = 342g / 6 = 57g

1.6. O COMPARTIMENTO EXTRACELULAR

Os 20% do peso corporal atribuídos ao líquido extracelular podem ser divididos

em líquido presente no plasma e líquido fora dos vasos, sendo assim distribuídos: 25% do líquido extracelular, que correspondem então a 5% do peso corporal formam o plasma; e 75% do líquido extracelular formam o líquido intersticial, o que corresponde a 15% do peso corporal. O compartimento extracelular representa todos os líquidos existentes fora das células e por este motivo tem limites pouco definido. Num adulto de 70 kg perfazem, em média, 15 litros.O líquido extracelular tem composição particular em cada ambiente onde é encontrado: plasma, líquor, líquido intra-ocular, líquidos do trato gastrintestinal, cavidades peritonial e pericárdica, pleuras pulmonares etc. O líquido intersticial situa-se nos espaços entre as células. Uma pequena porção se encontra sob a forma livre circulante, mas a maior parte se acha aprisionada, seja absorvida pelo colágeno ou ligada a estruturas de sustentação. Em um adulto de 70 kg, corresponde a 10,5litros.

O plasma é a porção não celular do sangue e está sempre em contato com o líquido intersticial através de poros. Corresponde a 5% do peso corporal o que significa 3,5 litros em um adulto de 70 kg.

A concentração total de proteínas no plasma é bem superior em relação ao líquido intersticial. Tal predominância se deve ao fato de a parede capilar impedir a saída da maioria das proteínas do espaço intravascular para o líquido intersticial. Este impedimento irá promover um fenômeno interessante para que o princípio da eletroneutralidade seja mantido, uma vez que as proteínas apresentam carga negativa. Devido a esse impedimento, a concentração de sódio torna-se maior no plasma, enquanto, de forma inversa, a concentração de cloretos é maior no líquido intersticial. Essa distribuição torna-se muito importante para que haja um equilíbrio na concentração iônica dos compartimentos e, com isso, manter-se a eletroneutralidade.

mEq/L	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO^{3-}	SO_4^{2} PO_4^{2-}	Ác . Org.	Proteínas
Plasma	142	4	5	-	103	27	3	5	16
Líquido intersticial	144	4	3	2	114	30	3	5	1

Tabela 4: Composição eletrolítica do líquido extracelular (mEq/L)

1.7. O SANGUE

Ao fazer o seu percurso no organismo, o sangue passa pelos pulmões e capta o oxigênio nos alvéolos, passando também pelos capilares do trato gastrintestinal, onde tem contato com as substâncias que participam do processo de digestão. O processamento feito pelo fígado, os rins, as células gordurosas, a mucosa intestinal e as glândulas endócrinas, irão modificar a estrutura química de muitas destas substâncias, tornando-as utilizáveis para os demais tecidos e sendo transportadas pelo sangue, agora que foram processadas, ou melhor, metabolizadas.

O sangue também retira materiais indesejados que circulam pelo organismo. Ao

passar pelos pulmões, captando oxigênio, os componentes do sangue também fazem o processamento com produção e liberação de dióxido de carbono, produto tóxico para o organismo. Outras substâncias tóxicas também são produzidas nos diferentes tecidos, como a ureia, o ácido úrico, e estas serão eliminadas, juntamente com a água e íons, após a filtração do plasma sanguíneo feita pelos rins.

O sangue contem tanto líquido intracelular presente no plasma quanto líquido intracelular presente nas hemáceas. O volume médio de sangue é de 5 litros, sendo 3 litros de plasma e 2 litros de hemáceas. Sabe-se que o volume sanguíneo, ou volemia, varia com o peso: quanto mais pesado o indivíduo, menor a relação do volume sanguíneo por quilograma. A explicação para este fenômeno é dada à quantidade de tecido adiposo. Nos indivíduos portadores de pequena quantidade de tecido adiposo, o volume sanguíneo varia quase que em proporção direta com o peso do corpo, numa média de 75 mL /kg ± 10%. No entanto, na presença de tecido adiposo, pouco vascularizado, menor será o volume sanguíneo/kg.

Podemos definir a percentagem de hemáceas no sangue como hematócrito. Este valor corresponde a 40% do volume sanguíneo para os homens e 36% para as mulheres. Sendo assim, se para um adulto masculino o volume sanguíneo é de 5L, 40% serão atribuídos às hemáceas, o que corresponde a 2L. A quantidade de hemáceas presentes no sangue pode vir a modificar a sua viscosidade. O sangue muito viscoso, dado a um valor alto de hematócrito, pode gerar múltiplos coágulos nos leitos vasculares levando inclusive à morte, se não tratado a tempo.

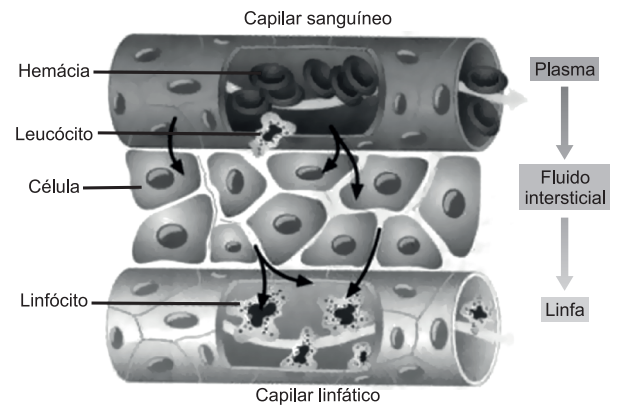
1.8. A LINFA

A linfa é formada pela filtração contínua da parte fluida do sangue, através das paredes dos capilares sangüíneos, para o espaço intersticial. É uma via acessória pela qual líquidos podem fluir dos espaços intersticiais para o sangue. O sistema linfático ajuda a transportar substâncias – células, proteínas, nutrientes, produtos residuais – pelo corpo. A composição da linfa varia de acordo com o local em que é produzida, mas tem a água como solvente. Apresenta proteínas, lipídeos, glicídios, ureia, ácido úrico, eletrólitos (cloretos, fosfatos e bicarbonatos) e pH ligeiramente alcalino. É na linfa que encontramos os glóbulos brancos. A formação de edema está ligada ao acúmulo de linfa nos tecidos o qual pode ocorrer quando há excesso de transporte dos vasos para o interstício; quando há obstrução dos vasos linfáticos; na desnutrição por falta de proteína; em traumatismos sobre uma região do corpo, entre outros exemplos.

	Plasma	Linfa
Proteínas	6,9 g/100 mL	2,6 g/100 mL
Cloretos	392,0 mg/100 mL	413,0 mg/100 mL

Quadro 4: Comparação entre a composição da linfa e o plasma sanguíneo.

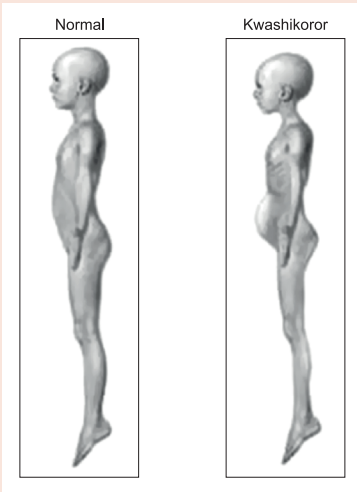
Líquido Intersticial E Edema



Sangue e linfa, que são líquidos extracelulares, não entram em contato direto com as células, sendo estas banhadas pelo líquido intersticial. As trocas de substâncias entre o sangue e o líquido intersticial são feitas pelos capilares sanguíneos que possuem uma parede fina que facilita as trocas Nos capilares a pressão sanguínea força o plasma e outras moléculas a passarem para os tecidos juntando-se ao líquido intersticial. As macromoléculas , como as proteínas, dificilmente passam pelas paredes dos capilares.

Quando há aumento do volume de líquido intersticial este recebe o nome de Edema ou inchaço. Como o líquido intersticial tem composição variada, o edema também tem. O edema pode ser restrito a uma determinada região do corpo ou generalizado e pode ser acompanhado de retenção de sódio. Alguns processos inflamatórios, alérgicos, traumáticos, insuficiência cardíaca e algumas doenças renais ou nutricionais são situações clínicas que podem provocar o edema.

Os edemas podem aparecer sob duas formas: localizado, como é o caso do edema inflamatório que aparece após um trauma de torção, queda, batida ou excesso de esforço. Há aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos para permitir que o processo de defesa tenha início com a chegada de células e proteínas do sangue especializadas no combate aos agentes agressores e promover o reparo do tecido danificado. A evolução do edema pode ser rápida ou levar horas e até dias. Normalmente está associado ao aumento da sensibilidade da região afetada, à dor e à menor mobilidade. Já a outra forma é o edema sistêmico, que é formado por líquido com constituição pobre em proteínas, como exemplo, o edema pulmonar. Clinicamente, os edemas sistêmicos podem originar infecções e complicações maiores para o local afetado, como é o caso para os edemas pulmonares que podem evoluir e originar pneumonias e insuficiência respiratória. Outra causa de edema importante, e também de hipoproteinemia, é por desnutrição protéica, como ocorre em uma doença chamada Kwashiorkor, na qual a criança desnutrida fica edemaciada.



1.9. ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO DE ÁGUA

Há um equilíbrio de proporções no conteúdo de água e de eletrólitos no organismo. Um dos íons utilizados como indicador da quantidade de água é o sódio, isso por que o aumento da concentração de sódio leva a uma resposta de retenção de água para diluir o sódio em excesso. Desta maneira, é possível manter a proporção entre os conteúdos de água e sal. Um bom mecanismo de retenção leva também ao aumento da sensação de sede e retenção ou formação de urina mais concentrada. Se a concentração de sódio for diminuída em excesso, os rins excretam mais água para fazer com que a concentração de sódio retorne ao equilíbrio. Trabalhando assim, o organismo pode manter constante o nível de água total e, consequentemente, manter também constante a concentração dos eletrólitos, em especial a de sódio no sangue

As alterações no conteúdo de água consistem, principalmente, de hipo-hidratação, quando há redução do conteúdo de líquidos do organismo ou, ao contrário, hiper-hidratação, quando há oferta excessiva de líquidos ao organismo gerando um volume de água no corpo acima do normal. Quando o organismo apresenta níveis adequados de água, diz-se que se encontra num estado de euhidratação ou normo-hidratado. O termo desidratação define uma redução relativamente rápida da água corporal, levando o organismo de um estado de normo-hidratado para hipo-hidratado. Por exemplo, um maratonista, que não pode repor os líquidos perdidos durante a corrida, gradualmente vai entrando no estágio de desidratação.

Sempre que há variação da temperatura corporal, que pode ser medida em calorias/min, mecanismos termorreguladores são ativados. A variação de temperatura poderá ocorrer entre 1 kcal/min, quando em repouso, indo até 20 kcal/min quando em exercício. Mesmo a água tendo um alto valor de calor de vaporização, o que permite transferir calor em quantidades mínimas de água na forma de suor, o volume necessário para dissipar uma grande quantidade de calor pode resultar em grande perda de água, associada a eletrólitos. O processo da desidratação pode ser assim iniciado. A evaporação de um litro de água a partir da pele remove 580 kcal de calor do corpo. Como parte da água perdida através do suor vem do plasma, podem ocorrer perdas de até 18% no volume plasmático em casos de atletas maratonistas, por exemplo. A perda de água varia com a temperatura do ambiente e com a atividade física Se o exercício for intenso em ambiente temperado, a perda pode ser de 1 litro/h, chegando a 2 litros se o ambiente estiver quente. Vimos assim que a resposta do sistema cardiovascular, a termorregulação e, por conseqüência, o bem estar e desempenho de um indivíduo é determinado também pelo balanço hídrico corporal.

Toda a troca de nutrientes, excretas e dejetos feita entre o sangue e os tecidos acontece numa área de 700 m^2 de uma rede de capilares. A manutenção da água nos diferentes compartimentos do organismo é garantida pelo princípio da iso-osmolaridade que garante a variação da concentração dos eletrólitos entre os compartimentos, mantendo a mesma pressão osmótica entre eles. Sempre que

houver alguma alteração da composição e/ou da concentração, a busca por uma situação de equilíbrio é feita inicialmente pela movimentação de água.

As alterações da distribuição da água e dos eletrólitos são bastante comuns e podem levar a complicações de extrema gravidade, ou mesmo determinar a morte do indivíduo. O excesso de água, ou seja a hiper-hidratação acontece em diferentes situações como em indivíduos cujos rins não conseguem excretar a água normalmente, em indivíduos com quantidades de proteínas abaixo do normal ou na desnutrição. A barriga d'água observada em desnutridos e na doença Kwashiorkor é um exemplo de hiper-hidratação, por deficiência protéica. Na hiper-hidratação o excesso de água provoca uma diluição do íon sódio presente na corrente sanguínea, o que acarretará em distúrbios hidroeletrolíticos. Este excesso de água é observado tanto no interior como ao redor das células. Os sintomas da hiper-hidratação, quando esta ocorre rapidamente, vão da confusão mental, crises convulsivas, delírio, outras manifestações neurológicas e coma.

Algumas situações podem levar a grande perda de água que chegam até 3-4 litros como o uso de medicamentos diuréticos, temperaturas altas, alterações intestinais com diarreia grave, vômitos prolongados ou mesmo doenças crônicas como o diabetes. Se a reposição de água não for feita com urgência a perda excessiva provocará a desidratação. Com a perda de água há aumento na concentração de sódio extracelular, os tecidos começam a secar, as células começam a contrair, uma vez que a água sairá do líquido intracelular indo para a corrente sanguínea e assim ficam com a sua função comprometida. O cérebro sofre e um dos sintomas da desidratação é a confusão mental que pode evoluir para o coma. A diminuição da sudorese e da produção de urina é uma resposta à desidratação. Os sintomas da desidratação vão da queda da pressão arterial e tontura, até lesões graves de órgãos internos em especial dos rins, fígado e cérebro.

Em um indivíduo de 70 kg, 42 litros de água total, sendo 28L intracelular e 14L extracelular, a osmolaridade dos dois compartimentos é de 300mOsm/L. A quantidade de soluto osmoticamente ativo será de:

Intracelular = 28L X 300 mOsm/L = 8.400 mOsm

Extracelular = 14L X 300 mOsm/L = 4.200 mOsm

TOTAL= 12.600 mOsm. Em caso de desidratação com perda de 3 litros de água, sem perda de eletrólitos, o volume extracelular se reduzirá para 11 litros e neste estado, a osmolaridade aumenta para: Extracelular = 4.200mOsm/11 litros = 382 mOsm/L.

Será criada uma diferença de osmolaridade entre os compartimentos e para compensar, a água fluíra do compartimento intracelular para o extracelular, provocando uma contração dos compartimentos, com aumento da concentração de sódio extracelular.

O líquido perdido deve ser reposto com o cuidado de recompor o que o organismo realmente precisa, observando-se os aspectos de composição e osmolaridade. Deve-se administrar uma solução à base de água, com moléculas pequenas, às quais a membrana capilar seja permeável e capazes de entrar em todos os

compartimentos do corpo. As soluções de reposição são utilizadas para corrigir deficiências específicas na concentração plasmática ou na quantidade total de eletrólitos (sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, cálcio e fósforo). Apesar de apresentarem composição de eletrólitos similar à do plasma, têm o sódio como base da sua constituição, sendo também soluções isotônicas.

Atividades:

1- Discuta com seus colegas se é possível ou não haver intoxicação por excesso de ingestão de água.

2- Descrever as variações que ocorrem nos volumes e na pressão osmótica dos compartimentos intracelular, extracelular e intersticial nas seguintes situações:

a) Uso de soluto que não atravessa o capilar;

b) Uso de soluto que atravessa o capilar, mas não atravessa a membrana celular;

c) Uso de soluto que atravessa todas as membranas;

d) Indivíduo com baixa de sódio no sangue (hiponatreinemia);

e) Indivíduo com sudorese intensa.

Para resolução da atividade considere as informações descritas no Quadro 2. Tente se lembrar dos conceitos vistos anteriormente: osmolaridade, tonicidade e aplique a esta atividade.

2 Gênese do potencial de membrana

AULA 2: GÊNESE DO POTENCIAL DE MEMBRANA

Ao final desta aula o aluno deverá ser capaz de:

- Enunciar a Lei de Fick e associar ao processo de difusão;
- Identificar os fatores que alteram a difusão;
- Mostrar a alteração na Lei de Fick quando o processo ocorre em sistemas separados por membrana;
- Descrever e identificar a natureza de capacitor da membrana biológica;
- Associar a esta natureza a presença de uma diferença de potencial;
- Definir o termo bioeletrogênese;
- Descrever a composição dos meios intra e extracelular;
- Descrever o fluxo passivo a favor do gradiente de concentração;
- Descrever o fluxo de íons quando em membranas seletivamente permeáveis, identificando a direção e as forças resultantes;
- Descrever as forças que geram a assimetria na distribuição iônica;
- Enunciar a equação de Nernst e identificar os seus termos;
- Descrever as diferentes contribuições para a negatividade interna;
- Descrever as contribuições das permeabilidades de cada íon no potencial de membrana;
- Definir e diferenciar os termos permeabilidade e condutância;
- Descrever os mecanismos de abertura e fechamento de canais por comportas;
- Citar as propriedades que definem a condutância;
- Utilizar a equação de Nernst para calcular o potencial de equilíbrio de um íon;
- Interpretar o resultado encontrado utilizando a equação de Nernst;
- Definir, enunciar e aplicar a equação de Goldman- Hodgkin e Katz;
- Descrever as forças que determinam o Potencial de Repouso;
- Compreender a assimetria de distribuição iônica associada ao Fenômeno de Donnan;
- Associar o fenômeno de Donnan ao Potencial de Repouso.

2.1. INTRODUÇÃO

> "*Fazer pesquisa em neurofisiologia é semelhante a remar uma pequena canoa em um rio de montanha. O rio, que é alimentado por muitas nascentes distantes, leva você ao longo do seu curso, embora muitas vezes em uma direção inesperada. Você tem que remar firme para se manter à tona. E mais cedo ou mais tarde algumas das suas ideias serão derrubadas e levadas rio abaixo como uma canoa virada.*" **Alan L. Hodgkin**

Vimos que há diferença na composição dos meios intracelular e extracelular, mas o princípio da iso-osmolaridade e da eletroneutralidade é mantido. A permeabilidade da membrana garante as trocas entre os meios através das estruturas especializadas, o que foi denominado de permeabilidade seletiva. A difusão a favor do gradiente de concentração – transporte passivo – e contra o gradiente eletroquímico – transporte ativo – são exemplos destas trocas. No caso de um soluto não carregado, a diferença de concentração é a força propulsora do processo. Quando, além da concentração, existir carga associada, como nos íons Na^+, K^+, Cl^- e H^+ , haverá alteração no conteúdo elétrico da célula.

Vimos também que o potencial químico expressa a potencialidade de um trabalho ser gerado a partir da diferença de concentração existente entre dois meios. A difusão é, portanto, potencialmente, um primeiro mecanismo de transporte a ser considerado onde a ENERGIA ou a FORÇA PROPULSORA do processo é o gradiente de concentração, bem definido pela Lei de Fick.

Correntes são geradas pelo movimento de íons em solução. Assim podemos associar o surgimento de um potencial elétrico quando houver meios separados por membranas seletivas e que separam íons. Nesta aula vamos descrever o movimento de íons por difusão simples através de uma membrana celular quando há uma diferença de concentração iônica entre os dois lados da membrana, gerando uma diferença de potencial elétrico através dela. A primeira parte trata da teoria macroscópica da difusão, que foi mencionada anteriormente como a Lei de Fick, e a segunda trata do fenômeno que será descrito pela equação de Nernst.

2.2. DIFUSÃO E A LEI DE FICK

Adolph Fick (1829- 1901) foi um fisiologista com vocação para matemática e para a física. Aos 26 anos de idade fez a sua primeira contribuição para a fisiologia, quando descreveu matematicamente o fenômeno da difusão, o qual só foi comprovado experimentalmente 25 anos mais tarde. O conceito descrito por ele, baseado na teoria do equilíbrio, afirma que o processo da difusão é proporcional ao gradiente de concentração. Em outras palavras, a Lei de Fick

estabelece que o fluxo da massa de solutos cruzando uma área A, por unidade de tempo Δt em uma determinada distância, por exemplo, X, é proporcional ao gradiente de concentração naquela direção.

O que Fick demonstrou pode ser percebido por qualquer pessoa quando sentimos o aroma rapidamente em um recinto fechado logo, (Δt), que um frasco de perfume ou de qualquer outro líquido volátil é aberto. Isso por que as moléculas do líquido, (gradiente de concentração), depois de evaporar-se, se difundem pelo ar, distribuindo-se em todo o espaço (X metros). Ao colocarmos açúcar em um copo com água, as moléculas do soluto (açúcar) se difundem por toda a água. Estes e outros exemplos nos mostram que para que aconteça o fenômeno da difusão, a distribuição espacial de moléculas não deve ser homogênea, devendo existir uma diferença ou gradiente de concentração entre dois pontos do meio.

A diferença de concentração entre os dois meios mostra que há energia associada à concentração, energia que denominamos de potencial químico, responsável pela movimentação até que o equilíbrio seja atingindo, ou seja, a concentração se iguale nos dois meios. Relembrando:

Potencial químico de uma molécula ou partícula s (μs) é uma grandeza que expressa o conteúdo de energia livre ou útil que potencialmente poderá ser utilizada para realizar trabalho, isto é, nesse caso, o movimento que depende apenas da concentração molar da substância ou partícula:

Potencial químico:

$\mu s = \mu_{0s} + RT\ln C$ ou

$\mu s = \mu_{0s} + 2{,}3RT\log C$

Onde:

μ_{0s} = potencial químico de referência

R = a constante dos gases (8,31 $J.K^{-1}.mol^{-1}$)

T = a temperatura absoluta

C = a concentração molar.

O potencial químico também pode ser representado pela letra **G** e a diferença gerada pelo potencial químico como **ΔG** ou **Δμ**.

A facilidade com a qual a molécula do soluto poderá se movimentar é denominada de difusibilidade do soluto. Vários fatores interferem na difusibilidade, como, por exemplo, a forma, o tamanho, a polaridade da molécula, a viscosidade do líquido e a temperatura. A difusibilidade do soluto em um determinado fluído depende da facilidade com a qual a molécula pode mover-se, especificamente a que distância ΔX uma molécula pode percorrer em um determinado intervalo de tempo Δt. Esta difusibilidade ou constante de proporcionalidade é denominada coeficiente de difusão *D* e é característica tanto do soluto como do meio no

qual ocorre o fluxo ou difusão.

Considere o modelo da figura 1 onde uma membrana semipermeável separa dois compartimentos contendo uma solução eletroneutra. A membrana tem uma espessura *d* e o soluto se encontra entre os dois lados da membrana, mas com concentrações diferentes, ou seja, há um gradiente de concentração para o soluto *S* entre os lados da membrana:

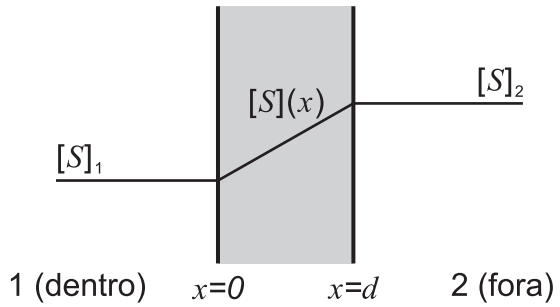


Figura 1: Membrana com espessura ***d*** separando dois meios com concentrações diferentes do soluto (***S***) permeável

A quantidade efetiva de soluto que atravessa na unidade de tempo uma área unitária perpendicular à direção na qual tem lugar a difusão, pode ser determinada pela Lei de Fick, a qual afirma que a densidade de fluxo de soluto (Js) é proporcional ao gradiente de concentração:

$$Js = - D A \frac{\Delta C}{\Delta X}$$

Onde:

J= intensidade do fluxo do soluto ***S*** em mmols/s

D= Coeficiente de difusão em cm^2/s

A= Área da superfície para a difusão em cm^2

ΔC= Variação ou gradiente de concentração do soluto em mM/L

ΔX= espessura da membrana em cm

O sinal negativo na Lei de Fick indica que o fluxo se dá de uma região de maior concentração para uma de menor concentração. Duas características da Lei de Fick devem ser notadas: primeira, é uma lei linear: por maior que a diferença de concentração entre os dois lados da membrana se torne, o fluxo permanece proporcional ao gradiente, ou seja, não existe um processo de saturação; segunda, a lei implica uma independência de fluxos, isto é, o fluxo de um soluto S é independente do fluxo de outros solutos *Z* e *Y*.

Vimos que a permeabilidade seletiva da membrana celular determina quais são os solutos que podem permear a célula livremente, ou seja, sem a necessidade

de nenhum mecanismo especializado de transporte. A permeação livre ocorre para solutos sem carga, com massa molecular pequena, com é o caso da ureia e dos gases O_2, CO_2. Para outros solutos, a membrana criou mecanismos de transportes que permitem a passagem de solutos, quais sejam, as proteínas transportadoras e as proteínas canais, que através de sensores localizados na superfície interna ou externa, identificam o soluto e promovem o transporte, seja por alteração conformacional, seja por canais existentes na estrutura da proteína. Nesta situação específica, onde a difusão do soluto é determinada pela presença e eficiência das proteínas específicas pelo transporte, a Lei de Fick sofre uma pequena alteração, pois a força determinante do processo passa a ser a permeabilidade da membrana ao soluto, além da diferença de concentração:

$$J = - P \Delta C$$

Onde P é a permeabilidade medida em μm/s. O fluxo através da membrana pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles: a espessura da membrana; a lipossolubilidade do soluto; o número de canais protéicos pelas quais o soluto pode passar; a temperatura; a massa molecular do soluto e a área da membrana.

2.3. A MEMBRANA ATUANDO COMO UM CAPACITOR

A membrana das células excitáveis é uma estrutura lipoprotéica que apresenta como característica básica a permeabilidade seletiva aos diversos íons presentes no organismo. Sua superfície é coberta por proteínas que irão promover a passagem dos íons. As proteínas canais e as bombas iônicas mantêm a diferença de concentração dos íons, em especial, dos íons sódio, potássio e cloreto, entre os dois lados da membrana. Esta diferença de concentração também permite a existência de uma diferença de cargas entre os dois lados da membrana, mantendo o lado interno mais negativo do que o lado extracelular, próximo à membrana. Esta característica da membrana nos permite compará-la a um capacitor. Um capacitor é um componente usado em quase todo tipo de dispositivo eletrônico. Ele permite armazenar cargas elétricas na forma de um campo eletrostático e mantê-la durante certo período.

A atividade elétrica nos seres vivos é decorrente de um fenômeno celular que depende da natureza da membrana. Cada íon, individualmente, contribui com uma carga potencial na composição deste capacitor, conforme sua concentração de equilíbrio. A membrana atuando como um capacitor armazena energia dos íons que são carregados eletricamente, mantendo a diferença entre os dois lados da membrana. A energia armazenada estará disponível para uso imediato e estabiliza a membrana de maneira que esta não sofra ativação com pequenos distúrbios ao seu redor. A presença de proteínas canais e de bombas permite a manutenção da diferença de concentração dos íons entre os dois lados da membrana. A diferença de concentração provoca também a diferença de

cargas, sendo o lado interno mais negativo do que o externo. Sendo assim, há uma diferença de potencial, ddp, através da membrana. Nas células nervosas, esta diferença de potencial é de aproximadamente -70 mV. Este valor está na escala de milivolts, pequeno portanto; mas vale lembrar que a espessura da membrana, o Δ X, está na faixa do nanômetros, (1/1.000.000.000), o que indica nesta relação um campo elétrico de acima de 1000 volts/m, o que agora nos parece grande!

Alguns processos biológicos ocorrem graças a esta diferença de potencial. Podemos citar, como exemplo, a entrada de aminoácidos ou de glicose contra o gradiente de concentração, o que permite a entrada de nutrientes na célula. Para ilustrar este exemplo, recorde-se dos mecanismos de entrada de glicose juntamente com o íon sódio vistos anteriormente.

A bioeletrogênese e a bioeletricidade referem-se à geração ou à ação da corrente, vista também como alteração da voltagem em ambientes biológicos. Estes fenômenos estão relacionados aos sinais elétricos nas células nervosas e ao desenvolvimento de processos físicos nos músculos, nos tecidos e nos órgãos.

2.4. FORÇAS NO ENTORNO DA MEMBRANA: INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO EXTERNO E DO MEIO INTERNO

A composição iônica dos meio interno e externo é diferente, mas, lembrando, são neutros eletricamente. As contribuições iônicas mais significativas são aquelas dos íons sódio, potássio e cloreto. As proteínas, carregadas eletricamente negativas são encontradas no meio interno. A distribuição, considerando apenas alguns íons, pode ser vista no Quadro 1. A figura 1 representa a direção de fluxo se apenas a concentração for a força propulsora do processo de movimentação, e que a célula permita a passagem destes íons através de canais seletivos.

Íon	Intracelular (mM)	Extracelular (mM)
K+	**150**	5
Na+	10	**140**
Cl-	10	**105**
Ânions Orgânicos	**65**	0

Quadro 1: Distribuição de íons nos compartimentos intracelular e extracelular (mmol/L)

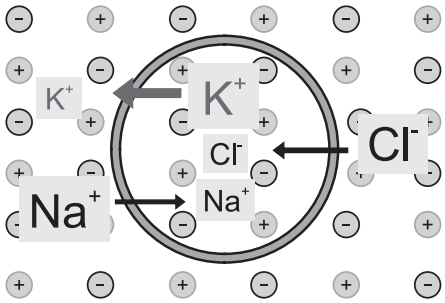
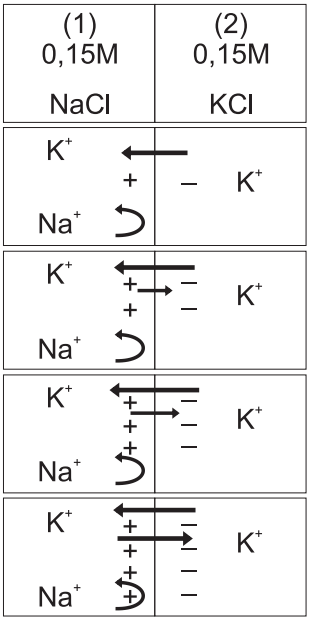


Figura 2: Os meios neutros eletricamente e a direção de fluxo iônico obedecendo apenas ao gradiente de concentração.

Na figura 2 vemos que a direção de fluxo passivo a favor do gradiente de concentração é de entrada dos íons sódio e cloreto e saída de íons potássio.

Vamos imaginar uma situação na qual uma membrana seja permeável apenas ao cátion potássio e separa dois compartimentos. Um compartimento contendo solução de NaCl e o outro contendo solução de KCL, na mesma concentração, como ilustrado na figura 3. Os compartimentos são iso-osmolares e neutros. A força de concentração inicialmente direciona o fluxo de K^+ para o compartimento 1. O sódio não pode atravessar a membrana e fica confinado no compartimento 1. A movimentação do potássio leva também as cargas positivas, que se concentram agora no compartimento 1, deixando o compartimento 2 com deficiência de carga positiva, ou seja, com excesso de carga negativa. Próximo à membrana, as cargas em excesso irão atrair cargas opostas e repelir cargas iguais: o potássio ficará impedido de sair do compartimento 2, pois será atraído pelas cargas negativas deste lado e repelido pelas cargas positivas do outro lado, mesmo que ainda exista a força proveniente da diferença de concentração; as cargas positivas do potássio que migraram para o compartimento 1 serão atraídas de volta para o compartimento 2.



Inicialmente temos os compartimentos com as mesmas concentrações, 0,15M de NaCl em 1 e 0,15 M de KCl em 2.

Como a membrana é permeável apenas ao potássio, haverá fluxo deste íon de 2 para 1, seguindo o seu gradiente de concentração.

No compartimento 1 começará a surgir um excesso de cargas positivas, decorrentes deste fluxo. E, por sua vez, no compartimento 2, surgirá um excesso de cargas negativas. Estas cargas condensam-se próximas à membrana.

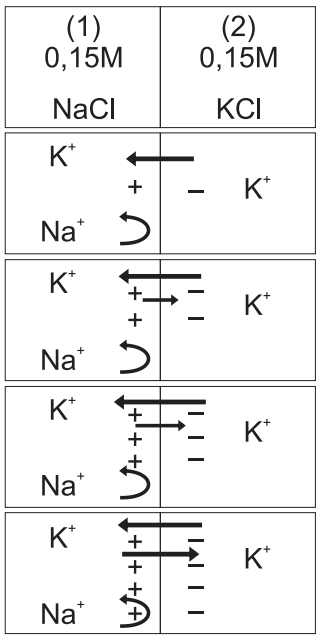
Essas cargas negativas em excesso em 2 atrairão as cargas positivas do K+, de volta, para o compartimento 2, dificultando o fluxo a favor do gradiente de concentração.

Figura 3: Fluxo e estabelecimento da condição de equilíbrio eletroquímico em membrana permeável apenas ao cátion K^+.

Vejam que situação foi gerada: inicialmente iso-osmolaridade e neutralidade e, no estado final, distribuição assimétrica de íons, tanto de concentração quanto de carga! É a célula gerando trabalho. Temos uma energia proveniente do gradiente de concentração que a célula utilizou para gerar uma diferença de potencial, ddp, através da membrana.

2.5. POTENCIAL DE EQUILÍBRIO DE UM ÍON: A EQUAÇÃO DE NERNST

Podemos determinar as equações matemáticas que quantificaram cada etapa do processo ilustrado na figura 3, desde que identifiquemos as forças passo a passo. Isso não é difícil. Inicialmente a força era a diferença de concentração e depois surgiu uma força contrária a esta movimentação, gerada pelas cargas iônicas em movimento.



Inicialmente temos os compartimentos com as mesmas concentrações, 0,15M de NaCl em 1 e KCl em 2.

Força de concentração: $\Delta Gc = RT \ln C2 - RT \ln C1$ (Potencial químico)

Força Elétrica dificultando o fluxo a favor do gradiente de concentração.

Força Elétrica: $\Delta Ge = ZFV$ (Potencial elétrico)

Equilíbrio: A força elétrica se iguala a força de concentração:

$RT \ln C2 - RT \ln C1 = ZFV$ e rearranjando:

$$V = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{C2}{C1}$$ (Potencial eletroquímico)

Figura 4: Descrição matemática das forças presentes em uma membrana permeável apenas a uma espécie iônica difusível.

As equações descritas na figura 4 representam quantitativamente a influência da concentração e da força elétrica nos fluxos de difusão e de migração respectivamente. A constante universal dos gases, R, tem valor de (8,31 J/mol.K ou 0,082 atm. L/mol.K), a de Faraday (F) tem o valor de 96.500 C.mol^{-1} . Z indica a valência do íon em movimento, no caso do sódio e do potássio tem o valor de 1.

Se quisermos escrever a expressão $V = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{C2}{C1}$ utilizando a base 10 para o logaritmo, usando o valor de temperatura de 20^0 C, e considerando o Z sempre igual a 1, a equação toma a seguinte forma: $V = 58 \log \frac{C2}{C1}$ e tem o seguinte

significado: se quisermos interromper o fluxo de uma espécie iônica, que ocorre a favor do seu gradiente de concentração, devemos criar uma força elétrica, igual e contrária a este movimento. Esta força elétrica terá o valor proporcional ao logaritmo das concentrações presentes. Em outras palavras, essa equação quantifica e determina a condição de equilíbrio, onde nenhuma das forças predomina, nem a de concentração e nem a elétrica. Por este motivo, a equação é denominada de **potencial de equilíbrio de um íon**, conhecida também por Equação de Nernst.

É denominado potencial de difusão à diferença de potencial gerada através de uma membrana devido à diferença de concentração de um íon. É claro que esta diferença de potencial somente poderá ser gerada se a membrana for permeável ao íon. A quantidade de íon que se movimenta é muito pequena, mas é suficiente para gerar uma diferença, a ddp de difusão, não resultando em grandes mudanças nas concentrações nos dois lados da membrana do íon que está se difundindo. O potencial de migração está relacionado à movimentação de cargas, no caso, íons. O equilíbrio eletroquímico é estabelecido quando estas duas forças se equivalem: a força de difusão e a força de migração. A força de migração se opõe à tendência do íon de se difundir em consequência da sua diferença de concentração. No novo equilíbrio, o equilíbrio eletroquímico, as forças moventes, química (diferença de concentração) e elétrica, que agem sobre o íon, são iguais e opostas, e não há mais difusão resultante do íon.

2.6. A SELETIVIDADE DA MEMBRANA E OUTRAS INFLUÊNCIAS SOBRE A DIFERENÇA DE POTENCIAL

Afirmamos que as proteínas carregadas eletricamente negativas são encontradas no meio interno e são impedidas de sair devido a sua natureza iônica e tamanho. Estas proteínas atuam atraindo cargas positivas para dentro da célula e mesmo assim os dois meios, interno e externo, são neutros,

Uma proteína presente no interior celular é a bomba de sódio e potássio - Na^+-K^+-ATPase – responsável, em parte, pela distribuição desigual destes íons entre os dois lados da membrana. Esta proteína transportadora promove um antiporte que transfere 3 íons sódio para fora da célula, e traz para o citoplasma 2 íons potássio. Vejam outra consequência da ATPase: ao promover uma troca desigual entre os meios, para cada três íons sódio transportados, ela tira três cargas positivas e, em contrapartida, ela coloca no meio interno duas cargas positivas provenientes do íon potássio. Dito de outra maneira, o meio interno fica deficitário em carga positiva ou, ainda, fica com excesso de carga negativa. Por este motivo, podemos dizer que a Na^+- K^+ATPase é eletrogênica. Não que ela gere elétrons, mas que gera um déficit de carga positiva, deixando o meio interno mais negativo do que o meio externo. A Na^+ - K^+ ATPase mantém a concentração de Na^+ no citossol cerca de 10 a 30 vezes menor do que no líquido extracelular, e a concentração de K^+ cerca de 10 a 30 vezes maior.

Além destas duas contribuições para a negatividade interna, próxima a membrana, proteínas carregadas negativamente e a ATPase, o potencial estabelecido entre as duas faces da membrana é determinado por outros fatores, dentre eles, o gradiente de concentração dos íons e a permeabilidade diferenciada da membrana para estes íons. As permeabilidades, em cm/s, para os íons sódio, potássio e cloreto podem ser vistas no Quadro 2, para uma célula de mamífero:

Íon	Permeabilidade (cm/s)
Potássio	5×10^{-7}
Cloreto	1×10^{-8}
Sódio	5×10^{-9}
X (macromoléculas negativas)	0

Quadro 2: Permeabilidade para uma célula de mamífero

As membranas apresentam vários tipos de canais seletivos, alguns constantemente abertos e outros que só se abrem após alterações conformacionais específicas (estes últimos possuem comportas que podem ser controladas). Os canais que estão constantemente abertos aumentam drasticamente a permeabilidade da membrana aos íons. Se a membrana fosse completamente impermeável aos íons, não haveria movimentação destes através da membrana e nenhum potencial poderia surgir. Como a membrana apresenta permeabilidade diferente para íons diferentes, uma diferença de potencial elétrico através da membrana será estabelecida.

Diferente do modelo apresentado na figura 2, sabemos que numa célula excitável, neurônios, miócitos e células musculares, ou seja, células capazes de reconhecer e responder aos estímulos, a membrana apresenta proteínas canais que permitem o fluxo transmembrana de vários íons. Se os íons podem atravessar a membrana, de acordo com a permeabilidade seletiva, cada íon contribuirá de forma proporcional à grandeza da permeabilidade, para a diferença de potencial gerada através da membrana. As proteínas canais, quando abertas, permitem a passagem de íons específicos. Lembre-se que o potencial de membrana existe mesmo na ausência de estímulos ou pulsos elétricos externos, ou seja, ele é mantido por mecanismos próprios da célula.

Os canais iônicos controlados por comportas são seletivos e, como vimos anteriormente, podem se apresentar abertos ou fechados. Alguns ainda apresentam uma terceira conformação que é conhecida como canal inativado, ilustrado na figura 3. Somente quando o canal se abre é que os íons para os quais ele é seletivo podem fluir. Alguns fatores determinam a condição na qual o canal se encontra.

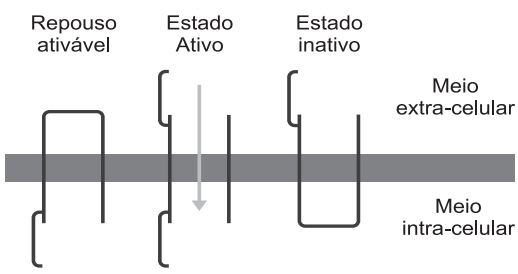


Figura 5: Três possíveis estados para o canal de sódio, onde somente o estado aberto é ativo na promoção do transporte de íons.

Dizer que uma membrana é permeável a determinado íon nos diz que a membrana possui estruturas que permitem a passagem do íon. Entretanto, não afirma como e se este íon será transportado de fato! Ao termo permeabilidade deve ser acrescido outro – a condutância. Condutância brevemente nos diz se o íon ao qual a membrana apresenta canais está sendo conduzido, transportado. A condutância pode ser interpretada como o inverso da resistência à passagem de uma espécie iônica. A condutância de um canal depende de alguns fatores, entre eles, da probabilidade de abertura do mesmo. Quanto maior a probabilidade de o canal estar aberto, maior sua condutância. A probabilidade de abertura e fechamento de um canal é controlada por "comportas":

- Canais com comportas dependentes de voltagem. Ex.: Canal para Na+ em nervos; alterações nas condições eletroquímicas da membrana alteram as condições que promovem a abertura do canal.

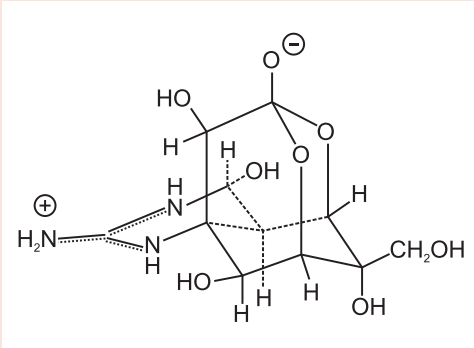
- Canais com comportas dependente de um ligante, que pode ser hormônio, segundo mensageiro, como AMPc, ou neurotransmissores.

Um canal não pode ser visto apenas como um poro. Um poro largo pode admitir qualquer íon que se encaixe neste espaço. Assim, é necessário estabelecer um "filtro de seletividade" do canal, que determinará qual íon poderá passar. A taxa de transporte feito pelo canal é mais alta do que aquele processada por uma proteína transportadora, que necessita de alterar a sua conformação para efetivar o transporte. Este filtro de seletividade atua como uma peneira: o íon que o atravessa deverá perder a maior parte da água de hidratação que o rodeia e deverá interagir especificamente com os aminoácidos da região que forma o poro. Esta interação é transitória e não pode ser forte, uma vez que o íon não poderá ficar preso ao poro e sim passar através deste.

A condutância ao íon indica se o canal está disponível para promover a passagem do íon e diz também quantos canais existem para fazer o transporte. Eficiência, eficácia, quantidade e disponibilidade são propriedades que definem a condutância de um canal. Às vezes, a membrana, mesmo que permeável, apresenta canais para o transporte de um íon e este canal está fechado, bloqueado ou inativo. Se não houver alteração nos meios que modifiquem adequadamente as condições eletroquímicas da membrana, pode não alterar as condições que promovem a abertura do canal. O que isso quer dizer? Não há fluxo para aquele íon, mesmo que existam canais e estes não conduzem o íon (baixa condutância ou nenhuma condutância). O inverso também pode ocorrer, em condições que alteram drasticamente o meio, impedindo, por exemplo, de o canal fechar! Desta forma, o íon irá fluir pelo canal, a favor do gradiente de concentração ininterruptamente ou até que o fator que desencadeou o fenômeno seja removido. Veja no Boxe 1 um exemplo do que acontece com o canal de sódio, sensível à voltagem quando bloqueado por uma toxina.

Os peixes e o canal de sódio

A Tetrodotoxina, TTX, é uma toxina com ação neuronal, por isso, uma neurotoxina. É encontrada em animais e o seu nome é derivado da espécie do peixe do qual ela foi descrita, o *Tetraodon*. No Japão uma espécie é conhecida como fugu e no Brasil, como baiacu. A TTX foi isolada de outros animais como polvos-de-aneis-azuis australianos (*Hapaloclaena maculosa*), peixes-estrela (*Astropecten scoparius*), moluscos (*Nassarius spp.*), caranguejos (*Eriphia spp.*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Zosimus aeneus*, *Atergatis floridus*), sapos arlequim (*Atelopus*), salamandras (*Taricha torosa, Tariturus spp., Bombia variegota*).



A TTX bloqueia os canais de sódio dependentes da voltagem presentes nas membranas das células nervosas, seja no sistema periférico ou central. Devido a este bloqueio, os íons Na^+ ficam impossibilitados de atravessar o canal.

A ligação da TTX se dá devido às interações entre os resíduos de aminoácidos do canal na porção extracelular e os grupos funcionais da TTX. Mesmo sendo uma molécula maior do que o Na+, ocorre a interação da carga positiva do NH_2 com o glutamato da cadeia peptídica. Numa segunda fase, há alteração na conformação, o que fortalece ainda mais a interação eletrostática da TTX à proteína.

Enquanto os íons Na^+ se ligam reversivelmente numa escala de nanossegundos, a TTX demora dezenas de segundos, em consequência, o transporte do Na+ é afetado, alterando várias respostas celulares que dependem da entrada doste íon na célula. Há interferência na transmissão neuromuscular, vasodilatação periférica e hipotensão, alterações no potencial de ação, que veremos numa próxima aula. Os anestésicos locais, anti-epilépticos e anti-arrítmicos atuam pelo mesmo mecanismo de ação da TTX.

O perigo de intoxicação por esta toxina é muito elevado, uma vez que basta apenas um miligrama para matar uma pessoa adulta, em consequência da paralisia muscular e falência respiratória que provoca. A ação da TTX ocorre num espaço de 4 a 6 horas, mas há relatos de morte apenas 20 minutos após a ingestão da toxina.

Geralmente, as intoxicações por TTX surgem devido à ingestão do peixe (fugu ou o baiacu) quando não preparados adequadamente pois as outras espécies não são habitualmente consumidas por humanos.

A importância da TTX revela-se sobretudo ao nível científico: É utilizada para o estudo dos canais de sódio dependentes da voltagem. Existem estudos que relacionam os canais de sódio resistentes à TTX com a sensação de dor e também se sabe que alguns fármacos eficazes no controle da dor são bloqueadores dos canais de sódio. Por este motivo, este conhecimento permitirá, no futuro, desenvolver novas terapias mais eficazes no tratamento dos estados de dor patológicos.

2.7. UTILIZANDO AS EQUAÇÕES DE NERNST E DE G-H-K

Nas condições celulares, tomamos como referência o meio externo (C2) em relação ao meio interno (C1). Se utilizarmos as concentrações indicadas no Quadro 1 é possível calcularmos qual é o potencial de equilíbrio de cada íon. Vamos fazer estes cálculos:

Para o Sódio: $V_{Na^+} = 58 \log \frac{140}{10}$, donde V_{Na^+} = 66,48 mV.

Para o Potássio: $V_{K^+} = 58 \log \frac{5}{150}$, donde V_{K^+} = - 85,67 mV.

Para o Cloreto: $V_{Cl^-} = \frac{58}{-1} \log \frac{105}{10}$, donde V_{Cl^-} = - 59,23 mV.

Aqui foi necessário considerar a carga negativa -1 que o cloreto carrega. Poderíamos ter usado uma propriedade de logaritmos, ou seja, um artifício matemático para lidar com esta carga, qual seria? $V_{Cl^-} = 58 \log \frac{10}{105}$, e o resultado seria o mesmo, V_{Cl^-} = - 59,23 mV. Para lembrar-se destas propriedades de logaritmos, veja o Boxe 2.

Como poderemos interpretar estes dados?

Lembrando: A equação de Nernst determina o potencial de equilíbrio de uma espécie iônica. É a força necessária que devemos colocar no sistema, ou desenvolvida pelo próprio sistema, para que o íon não se movimente a favor do seu gradiente de concentração. Considerando:

a) que a natureza da membrana de atuar como um capacitor, separando e condensando cargas de natureza opostas entre os dois meios que por ela são separados;

b) que a membrana possua canais sensíveis à voltagem por onde estes íons possam fluir, poderemos indicar a direção de fluxo difusional para cada íon, determinado pelo gradiente de concentração; a direção de fluxo difusional para o íon sódio e para o cloreto é do meio externo para o meio interno; já o potássio, acompanhando o seu gradiente, pode se mover em direção ao meio extracelular, a favor do seu gradiente de concentração;

c) e que devido à presença de proteínas fixas há uma densidade de cargas negativas que se condensam próximo à membrana no meio interno, temos a seguinte situação, mostrada na Figura 6:

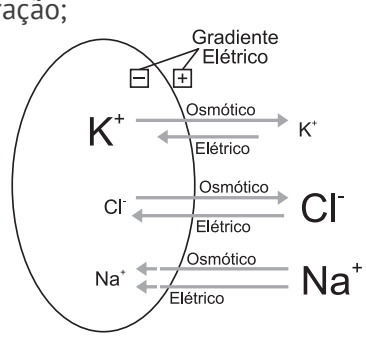


Figura 6: Esquema de uma célula mostrando os gradientes osmótico e elétrico para os íons Na^+, Cl^- e K^+.

Vejamos cada íon individualmente: se o íon sódio se movimenta para o meio intracelular, este meio estará recebendo, além da massa equivalente de sódio,

as cargas positivas que este carrega. O meio intracelular vai se positivando com este ganho. Já sabemos que carga positiva repele carga positiva. Sendo assim, no meio intracelular há alteração elétrica, gerando uma diferença de potencial de valor positivo com a migração do Na^+. Os íons se movimentam e a grandeza desta força contrária positiva vai aumentando até que atinja o potencial de equilíbrio para o íon movente, Na^+. Quando este valor for atingido, as forças químicas (concentração) e elétricas (carga) se igualam e não haverá fluxo líquido de sódio. Para igualarmos à força de concentração, essa força deveria ser igual a 66,48mV, valor este encontrado ao aplicarmos a equação de Nernst. Se atingido este valor, não haverá mais movimentação de íon sódio a favor do seu gradiente de concentração. Este fluxo cessará, pois foi atingido o potencial de equilíbrio para o íon sódio.

Propriedades de logaritmos

A definição de logaritmo pode ser extremamente simplificada se observarmos apenas um aspecto, o seu cálculo e deixarmos de lado as implicações geométricas e de função.

Na verdade, a ideia de logaritmo é muito simples, e pode-se dizer que o nome logaritmo é uma nova denominação para expoente. A função inversa do logaritmo é denominada função exponencial

Vejamos um exemplo: $5^2 = 25$, onde 5 é a base, 2 o expoente e 25 a potência, na linguagem dos logaritmos, diremos que 2 é o logaritmo de 25 na base 5. Nestas condições, escrevemos simbolicamente: $\log_5 25 = 2$. Viram a função e o inverso da função?

Quando a base do sistema de logaritmos é igual a 10 , usamos a expressão logaritmo decimal e na representação simbólica escrevemos somente logN ao invés de $\log_{10} N$. Assim é que quando escrevemos logN = x , devemos concluir pelo que foi exposto, que $10^x = N$.

Existe também um sistema de logaritmos chamado neperiano, cuja base é o número irracional e = 2,7183... e indicamos este logaritmo pelo símbolo ln. Assim, $\log_e M = \ln M$. Este sistema de logaritmos, também conhecido como sistema de logaritmos naturais, tem grande aplicação no estudo de diversos fenômenos da natureza.

Exemplos:
a) log100 = 2 porque $10^2 = 100$.
b) log2 = 0,3010 porque $10^{0,3010} = 2$.
c) ln e = 1 porque $e^1 = e = 2,7183...$

Resumindo: $\log_a X = b$ donde $a^b = X$

Podemos transformar um número da base dos números naturais (n) para a base10 utilizando a expressão: **$\ln X = 2.3 \log X$**

Exemplos: ln3 = 2,3log3

Querem ver: sabendo que ln3= 1,09 e que log3= 0,477 comprovamos que :

0,477 x 2,3= 1,09

Propriedades operatórias dos logaritmos

Logaritmo de um produto

O logaritmo de um produto é igual à soma dos logaritmos dos fatores, ou seja:
$\log_a(A.B) = \log_a A + \log_a B$

Exemplo: log20 =log(2.10) = log2 + log10 = 0,3010 + 1 = 1,3010. Observe que como a base não foi especificada, sabemos que ela é igual a 10.

Logaritmo de um quociente

O logaritmo de uma fração ordinária é igual à diferença entre os logaritmos do numerador da fração e do denominador, ou seja:
$\log_a(A/B) = \log_a A - \log_a B$

Exemplo: log0,02 = log(2/100) = log2 - log100 = 0,3010 - 2,0000 = -1,6990. Do exposto anteriormente, podemos concluir que, sendo log0,02 = -1,6990 então $10^{-1,6990}$ = 0,02.

Da mesma forma podemos exemplificar: log5 = log(10/2) = log10 - log2 = 1 - 0,3010 = 0,6990.

Façamos o mesmo raciocínio para outra carga positiva em movimento, o potássio. Vejam que aqui essa carga se movimenta para fora, deixando o meio interno menos positivo ou, dito de outra maneira, mais negativo. Esta movimentação é permitida, pois está a favor do gradiente de concentração. A sua saída vai negativando o meio intracelular, o que é uma condição que atrai eletricamente uma carga positiva, a saída o potássio se torna dificultada por esta força gerada. Se esta força atingir o valor do potencial de equilíbrio deste íon, que calculamos igual a -85,67 mV, o íon estará impedido de se movimentar. Para valores de -40mV, por exemplo, o íon ainda se movimenta, pois não há ainda força negativa grande o suficiente para impedir o fluxo. Esta força aumentando para -45mV, -50mV, ainda haverá fluxo. Mas se esta força for crescendo, negativamente, para 85,67mV, não haverá fluxo.

Apliquem este raciocínio para o íon cloreto, que é negativo e se move para dentro da célula. Sendo assim, a sua movimentação irá contribui para negativar o meio interno. Se esta contribuição atingir o valor de equilíbrio determinado pela equação de Nernst para o cloreto, que foi de - 59,23 mV, o cloreto não mais se movimentará a favor do gradiente de concentração.

Sabendo que a membrana é seletivamente permeável, apresentando mecanismos diferenciados de transporte, aqueles íons passíveis de se movimentarem irão promover uma diferença de potencial (que será o somatório das contribuições individuais relativas às estas permeabilidades), pois a membrana celular apresenta permeabilidade distinta para cada íon, devido aos diferentes tipos de canais presentes na membrana celular. Essa diferença de potencial, que não é mais de um único íon, será a diferença de potencial gerada pela célula e que é também denominado de potencial de repouso da membrana. A equação de Nernst é aplicada ao equilíbrio de uma espécie iônica, sendo inadequada para determinar o potencial de repouso devido à movimentação de diversos íons.

A análise da permeabilidade levou a uma equação mais realística, como a

desenvolvida por Goldman (1941) e Hodgkin & Katz (1949). Na equação os termos P_{Na}, P_K e P_{Cl} são as permeabilidades dos íons de Na^+, K^+ e Cl^- respectivamente. As permeabilidades para os outros íons são desprezíveis se comparadas às do Na^+, K^+ e Cl^-e, por este motivo, para as condições do potencial de repouso, os termos referentes aos outros íons não são incluídos na equação de Goldman-Hodgkin e Katz, (GHK), escrita abaixo, considerando íons monovalente:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_{ex} + P_{Na}[Na]_{ex} + P_{Cl}[CL]_{ic}}{P_K[K]_{ic} + P_{Na}[Na]_{ic} + P_{Cl}[CL]_{ex}}$$

Fazendo as substituições anteriormente feitas para a equação de Nernst, a equação de GHK pode ser expressa da seguinte forma:

$$V_m = 0{,}058 \log \frac{P_K[K]_{ex} + P_{Na}[Na]_{ex} + P_{Cl}[CL]_{ic}}{P_K[K]_{ic} + P_{Na}[Na]_{ic} + P_{Cl}[CL]_{ex}}$$

Essa é a expressão que define a diferença de potencial elétrico, em volts, através da membrana plasmática de células em repouso, a temperatura de 20^0 C, também denominado de potencial de repouso da membrana.

A excitabilidade das células nervosas e musculares é caracterizada pela manutenção deste potencial de repouso da membrana e no desafio de sair desta condição de repouso, provocada por agentes externos e que geram respostas celulares. A modificação desse potencial, a qual veremos na próxima aula, resulta em diversas alterações nas células vivas e são decorrentes de um fenômeno denominado potencial de ação.

Para alguns íons, como o Na^+, os gradientes de concentração e voltagem atuam na mesma direção. O Na^+ é o íon positivamente carregado mais abundante fora da célula, logo tende a entrar nas células se houver mecanismos apropriados. Já para o íon K^+, o gradiente de concentração direciona o fluxo de dentro para fora e de voltagem tende a manter o potássio dentro da célula, o que mostra efeitos opostos das forças química e elétrica.

Só existe corrente líquida de uma dada espécie iônica, cruzando a membrana se o potencial de membrana Vm for diferente do potencial de Nernst para essa espécie.

Se o potencial de membrana Vm for maior que o potencial de Nernst do íon, isto irá implicar em uma corrente líquida do íon numa dada direção, como vimos acima, para dentro ou para fora da célula, dependendo do íon. Se o potencial de membrana for menor que o potencial de Nernst, haverá uma corrente líquida do íon cuja direção será oposta à do caso anterior. Desta forma, a direção da corrente do íon é invertida quando Vm passa pelo potencial de equilíbrio do íon *(Vion*). Por este motivo, *Víon* também é chamado de potencial de reversão do íon.

Resumindo o Potencial de Repouso da Membrana:

- É a diferença de potencial medida através da membrana celular em milivolts (mV).

- É, por convenção, expressa como o potencial intracelular relativo ao potencial extracelular; assim, um potencial de membrana de –70 mV significa 70 mV, tendo a natureza negativa dentro da célula.
- O potencial de repouso da membrana é estabelecido pelos potenciais de difusão que resultam das diferenças de concentração dos íons permeantes.
- Cada íon permeável tende a mover o potencial da membrana em direção ao seu potencial de equilíbrio; íons com maiores permeabilidades ou condutâncias maiores, terão uma contribuição maior para o potencial da membrana, e aqueles com menores permeabilidades terão pouca ou nenhuma contribuição para o potencial.
- A bomba de Na^+/K^+ contribui indiretamente para o potencial de repouso da membrana, mantendo os gradientes de concentração de Na^+ e de K^+; os gradientes de concentração geram os potenciais de difusão, os verdadeiros responsáveis pelo potencial de membrana.

2.8. COMPREENDENDO MELHOR A ASSIMETRIA DE DISTRIBUIÇÃO IÔNICA: EQUILÍBRIO DE DONNAN

A lei de Fick para a difusão nos diz que havendo diferença de concentração entre dois meios, haverá movimentação dos solutos até que o equilíbrio seja estabelecido, ou seja, haverá fluxo a favor do gradiente de concentração até que não exista nenhuma diferença de concentração entres os meios.

Nas células, vimos que há diferença de concentração entre os meios separados pela membrana, mostrando uma distribuição diferenciada, assimétrica. A ATPase, que transporta íons contra o gradiente de concentração, contribui para a manutenção desta assimetria. Outro fenômeno muito importante que contribui para a distribuição assimétrica dos íons entre os dois lados da membrana está relacionado à força de atração exercida pelas cargas opostas, dada pelas proteínas de carga fixa, conhecido como fenômeno ou o equilíbrio de Donnan.

Vamos imaginar um sistema, separado por membrana no qual no compartimento 1 há uma solução de KCl 10mM e no compartimento 2, KCl a 20mM. Os íons K^+ e Cl^- são difusíveis. A princípio nenhum encontra-se em equilíbrio e haverá movimentação a favor do gradiente de concentração, do compartimento 2 para o compartimento 1.

Compartimento 1		Compartimento 2
KCl 10 mM K+ Cl -	⇄	KCl 20 mM K+ Cl -

Quadro3: Sistema separado por membrana permeável aos íons contendo solução de KCl 10mM e KCl 20mM

Lembrando que o potencial de equilíbrio de um íon, μ, pode ser escrito como sendo: $\mu i = \mu_0 + RTlnC_i$, e que no equilíbrio as concentrações dos íons que podem se mover através da membrana, ou seja, os íons difusíveis, K^+ e Cl^- tendem a se igualar entre os dois lados da membrana, poderemos reescrever a equação, considerando os dois meios:

Compartimento 1	Compartimento 2
$\mu_{KCl1} = \mu_{0K} + RTlnC_{K1} + \mu_{0Cl} + RTlnC_{Cl1}$	$\mu_{KCl2} = \mu_{0K} + RTlnC_{K2} + \mu_{0K} + RTlnC_{Cl2}$

No equilíbrio: $\mu_{KCl1} = \mu_{KCl2}$

$\mu_{0K} + RTlnC_{K1} + \mu_{0Cl} + RTlnC_{Cl1} = \mu_{0K} + RTlnC_{K2} + \mu_{0Cl} + RTlnC_{Cl2}$

Simplificando:

$RTlnC_{K1} + RTlnC_{Cl1} = RTlnC_{K2} + RTlnC_{Cl2}$

Agrupando:

$RT(lnC_{K1} + lnC_{Cl1}) = RT(lnC_{K2} + lnC_{Cl2})$

Aplicando propriedade de logaritmo:

Equação no equilíbrio: $lnC_{K1}xC_{Cl1} = lnC_{K2}xC_{Cl2}$ ou [K]1 x [Cl]1 = [K]2 x [Cl]2

Quadro 4: Equações do potencial químico no equilíbrio

A equação deduzida para o equilíbrio, $\mathbf{[K]_1x[Cl]_1 = [K]_2x[Cl]_2}$, pode ser assim traduzida: no equilíbrio, o produto das concentrações dos íons moventes de um lado é igual ao produto das concentrações do outro lado da membrana.

Entretanto, se colocarmos no sistema uma proteína carregada negativamente e que não poderá se movimentar, por não ser permeável, qual será a consequência sobre o a situação de equilíbrio?

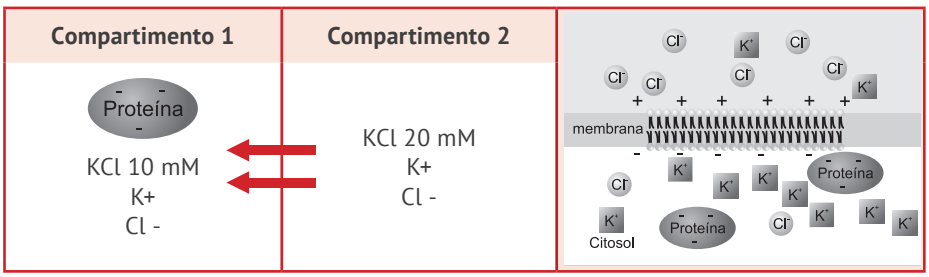


Figura 7: A presença da carga fixa da proteína em 1 dificulta o trânsito da carga semelhante que se dirige a favor do gradiente de concentração e favorece a movimentação de carga oposta. A membrana separando dois meios. No citossol há proteínas carregadas negativamente, onde $[K^+]_{cit} > [K^+]_{ext}$ e $[Cl^-]_{ext} > [Cl^-]_{cit}$.

Quando existem moléculas carregadas e que não se difundem através da membrana semipermeável, como é o caso das proteínas, esta presença altera a distribuição das partículas iônicas. A carga negativa da proteína intracelular atrai os íons de carga oposta (no exemplo, o potássio) e repele cargas iguais (neste exemplo, cloreto), produzindo um gradiente elétrico. Ao mesmo tempo, no compartimento 1 a carga negativa da proteína tende a manter o potássio e expulsar o cloreto, mesmo que, para este último, contra o gradiente de concentração. Sabendo que os meios devem ser eletricamente neutros, temos

que a soma das cargas positivas de um lado devem ser iguais a soma das cargas positivas do mesmo lado. Sendo assim, será necessário levar mais carga positiva para contrabalancear a presença das cargas negativas da proteína. O potássio se encontrará em maior quantidade do lado onde há proteínas, para fazer valer a neutralidade elétrica.

Fazendo o balanço das cargas	
Compartimento 1 q+ = [K+] q- = [Cl-]+ [proteína-] Neutralidade: q+ = q- [K+] = [Cl-]+ [proteína-]	**Compartimento 2** q+ =[K+] q- = [Cl-] Neutralidade: q+ = q- [K+] = [Cl-]

Quadro 5: Fazendo o balanço das cargas em função da presença de cargas fixas de um lado da membrana.

As células têm uma composição interna muito diferente daquela do meio extracelular, como mostrado no Quadro 1. Uma das diferenças mais importantes é que no citoplasma há moléculas protéicas de grande peso molecular dotadas de carga negativa. Essas moléculas são impermeantes e afetam a distribuição de íons que buscam o equilíbrio eletroquímico. A presença de cargas negativas, presas no citoplasma, cria uma assimetria de concentrações de íons e uma diferença de potencial através da membrana. O lado citoplasmático da membrana apresenta um potencial negativo e tende a puxar os solutos positivamente carregados para o interior da célula e impelir os negativos para fora. Dessa forma haverá uma redistribuição iônica, que recebe o nome de Fenômeno de Donnan.

As diferenças estabelecidas entre os gradientes osmótico e elétrico fazem com que, nas células, os íons e em especial o Na^+ e o K^+, não estejam em equilíbrio eletroquímico. Há mecanismos, como a bomba Na^+ - K^+ - ATPase, que contribui para a regulação hidroeletrolítica da célula, sendo responsável pela manutenção das concentrações iônicas do sódio e do potássio, lembrando que estes íons não são transportados na mesma proporção. O equilíbrio de Donnan, a ATPase, os mecanismos seletivos de transporte da membrana, gerando o potencial de equilíbrio de cada íon e o potencial de repouso das células, são fundamentais para o funcionamento das células nervosas e musculares, ditas células excitáveis. É a partir do fluxo iônico que os neurônios se comunicam, regulando todos os processos biológicos. Além disso, a contração muscular, que será assunto de uma próxima aula, também é dependente do correto funcionamento desses mecanismos.

Atividades:

1. Estabeleça qual é a relação entre o fluxo e: a) temperatura; b) tamanho da molécula; c) viscosidade do meio.
2. Toda a vez que a resistência (R) aumenta, o fluxo diminui. Na circulação sanguínea, a resistência ao fluxo (F) é qualquer fator que possa dificultar o movimento do sangue (podemos indicar a equação R= Pressão/F). Toda vez que a resistência aumenta, a pressão também aumenta e o fluxo diminui. Discuta a influência da diminuição da elasticidade das artérias provocada pela arteriosclerose sobre os parâmetros R, F e P.
3. Como o gradiente de íons é estabelecido?
4. Como a distribuição transmembrana dos íons contribui para o potencial de membrana?
5. Como o potencial eletroquímico de repouso e a distribuição dos íons são mantidos?

3 Potencial de ação

AULA 3: POTENCIAL DE AÇÃO

Ao final desta aula o aluno deverá ser capaz de:

- Descrever os componentes principais do sistema nervoso.
- Descrever a fibra nervosa e a função da bainha de mielina.
- Caracterizar um estímulo.
- Descrever os fenômenos envolvidos no processamento do impulso nervoso: elétrico e químico.
- Definir o potencial limiar e potencial local.
- Definir os fenômenos : soma espacial e somação temporal.
- Caracterizar o potencial de ação como um "fenômeno tudo ou nada".
- Associar as permeabilidades e condutâncias das diferentes proteínas e os canais ao curso do potencial de ação.
- Descrever as configurações dos canais associados ao curso do potencial de ação.
- Caracterizar e associar ao curso temporal do potencial de ação os períodos refratários absoluto e relativo.
- Caracterizar a ação dos canais de potássio e da Na^+- K^+ - ATPase na fase de hiperpolarização até o restabelecimento do potencial de repouso.
- Descrever as fases do potencial de ação.

3.1. INTRODUÇÃO

O axônio gigante de lula, que tem quase um milímetro de diâmetro, permitiu obter várias informações sobre a célula nervosa. Utilizando um microeletrodo e substâncias radioativas foi possível acompanhar o trânsito das substâncias para dentro e para fora da célula. Vimos nas aulas passadas que a membrana separa dois compartimentos contendo soluções iônicas, ou seja, eletrólitos, soluções então capazes de conduzir eletricidade. Estas soluções são iso-osmóticas mas apresentam composição diferentes. No axônio isto também acontece: na solução que banha a célula, o líquido extracelular, há predominância de íons sódio e cloreto. No interior celular, o cátion principal é o potássio que é neutralizado por uma variedade de ânions, em especial, de proteínas sintetizadas pela célula.

Ao inserir cuidadosamente o microeletrodo nas regiões próximas à membranas, em contato com os líquidos intra e extracelular, é possível registrar uma diferença de potencial entre estes dois meios, mostrando valores negativos entre -70 a -90 mV. Este valor é o estado de repouso, ou potencial de repouso

dessa célula e permanecerá estável se nenhuma perturbação ocorrer na vizinhança da membrana. O valor do potencial de membrana pode variar de célula para célula, mas o potencial no interior será em repouso mais negativo que o potencial do líquido externo.

Vimos na aula anterior que os fatores importantes para o estabelecimento do potencial de membrana em repouso são a permeabilidade diferenciada para os íons sódio, potássio e cloro. As proteínas canais são cerca de 100 vezes mais permeáveis ao potássio que ao sódio, o que contribui para a determinação do valor do potencial de repouso ser em grande parte devido ao íon potássio. A distribuição assimétrica dos íons, onde a proporção entre os íons sódio do interior e do exterior é de 1 para 10, enquanto que a proporção para o íon potássio é de 35 para 1, também é um indicador de que a difusão do íon potássio terá contribuição maior para o potencial de membrana do que a difusão de íon sódio. Associado a esta contribuição, temos a ATPase –Na^+-K^+. A bomba de sódio-potássio promove os gradientes de concentração para os íons sódio e potássio. Essa proteína promove o bombeamento contínuo de três íons sódio para o exterior, e dois íons potássio para o interior da membrana. O fato de serem bombeados mais íons sódio para o exterior que potássio para o interior resulta em perda continuada de cargas positivas pelo interior da membrana, o que contribui para a negatividade interna, uma adição de cerca de -4mV. Com todos os fatores atuando ao mesmo tempo, o potencial de repouso encontrado nas células é algo em torno de -90mV nas grandes fibras musculares esqueléticas e nas fibras nervosas mais calibrosas, chegando até -40mV, valores estes encontrados nas fibras nervosas mais delgadas e nas fibras musculares de músculo liso e de neurônios do sistema nervoso central.

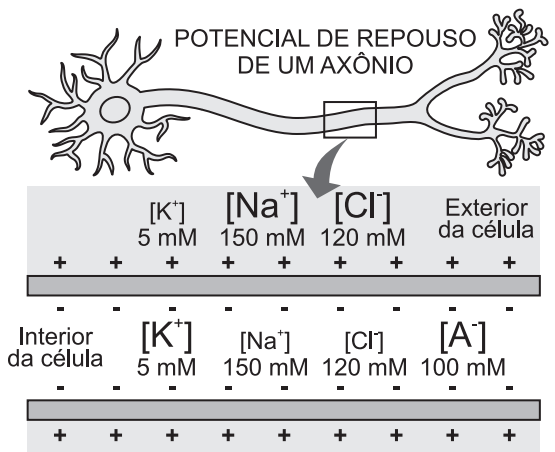


Figura 1: O potencial de repouso de um axônio é determinado pela assimetria na composição iônica, pela permeabilidade aos íons e pela presença de proteínas no meio intracelular. Alterações externas podem perturbar esta condição de repouso.

A base de todos os fenômenos da bioeletricidade, que é a geração e uso de energia elétrica por células excitáveis, a exemplo do que ocorre no neurônio, é a diferença de potencial que existe entre o lado interno e o lado externo da membrana. As células utilizam esta bioeletricidade para produzir trabalho, executar suas funções de armazenamento e transmissão de informação.

3.2. DESCREVENDO UM POUCO A CÉLULA NERVOSA

O sistema nervoso apresenta três componentes principais: os neurônios, a neuroglia e as fibras nervosas. Os neurônios podem ser divididos em duas classes funcionais: Os neurônios motores e os neurônios sensoriais. Glândulas e músculos são controlados pelos neurônios motores. Já os neurônios sensoriais recebem e enviam os estímulos sensoriais do ambiente para o sistema nervoso central, onde serão processados e retornam como resposta pelos neurônios motores.

Os neurônios são compostos por um corpo central celular, também chamado de soma ou pericário. O corpo celular dá origem aos dendritos e ao axônio. Do corpo celular, saem numerosas ramificações denominadas dendritos, que formam a principal superfície receptora do neurônio, responsável por receber impulsos dos neurônios adjacentes. As conexões entre neurônios vizinhos e os músculos são feitas pelos dendritos. Assim, embora os neurônios sejam células independentes, estão conectados uns aos outros por estes prolongamentos. Um destes prolongamentos é denominado axônio que é a unidade de condução do neurônio o qual transmite e conduz o estímulo na forma de um impulso elétrico de seu segmento inicial próximo ao corpo celular até o término do axônio. Na membrana do axônio estão localizadas as proteínas canais que exercem um papel importante na transmissão da informação codificada na forma de corrente iônica. Na porção terminal do axônio estão presentes vesículas que são preenchidas por substâncias, dentre elas, os neurotransmissores, que fazem parte da cadeia de transmissão da informação. Estes neurotransmissores são responsáveis por transmitir a informação de um neurônio para outro ou para promover a excitação de outras estruturas do corpo, por exemplo, glândulas e músculos. A placa motora é uma região de contato especializada formada por prolongamentos do axônio. Quando uma célula muscular faz contato com a porção terminal do axônio forma uma placa motora ou junção neuromuscular. Esta estrutura merece ser estudada com mais detalhes e é o que faremos na próxima aula.

O axônio passa a ser denominado de fibra nervosa quando recebe uma cobertura lipoproteica, a bainha de mielina. Esta é muitas vezes, bem maior que o próprio axônio. A substância lipídica presente na bainha de mielina é a esfingomielina, que atua como um meio isolante, capaz de diminuir a resistência ao fluxo iônico através da membrana por cerca de 5000 vezes. Este envoltório pode ser único ou múltiplo e pode não estar presente em algumas regiões, apresentando-se assim de maneira descontínua. Entre as descontinuidades formam-se espaços que são os nódulos ou nodos de Ranvier, uma pequena região de 2 a 3 mm de extensão, onde os íons têm mais facilidade de fluir do líquido extracelular para o interior do axônio. Uma fibra mielinizada é aquela que recebeu vários envoltórios de mielina e apresenta nos espaços não cobertos os nodos. Quando os axônios estão envolvidos por uma única dobra ou envoltório, são denominadas fibras nervosas amielínicas. A velocidade de condução dos íons através das fibras depende da presença dos nodos de Ranvier. As fibras mielinizadas conduzem a informação muito mais rapidamente, pois os íons ao se movimentaram pela fibra

promovem "saltos' entre os nodos, e por este motivo a condução é dita saltatória. A velocidade de condução de um impulso nervoso de um axônio mielinizado pode atingir 120m/s e cai para 2m/s em um axônio sem bainha de mielina.

Figura 2: Visão geral dos componentes de uma célula nervosa e detalhe da bainha de mielina.

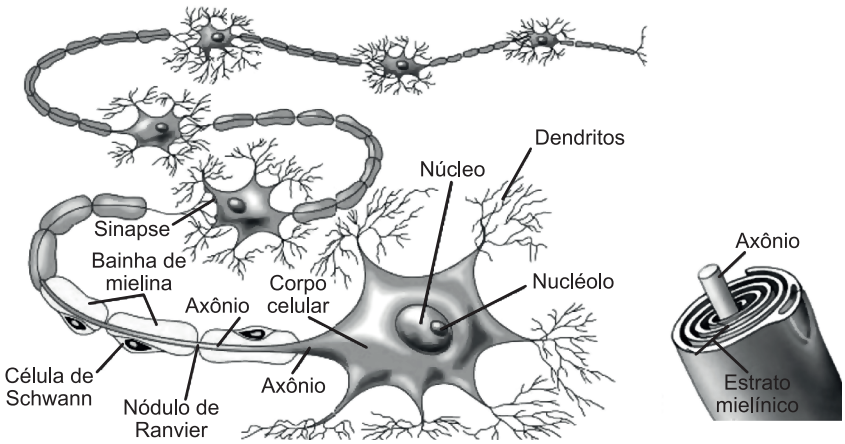
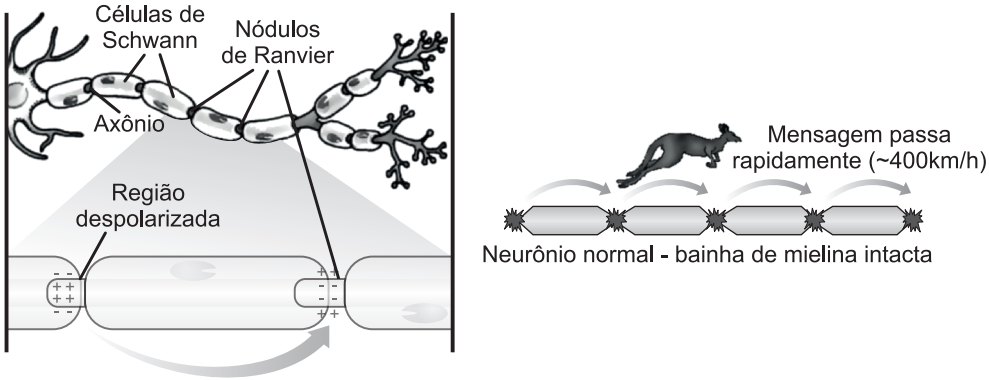


Figura 3: Condução da informação na forma de passagem dos íons em saltos entre os subsequentes nodos de Ranvier. Fonte: Modificada de http://www.sobiologia.com.br



Há uma variedade de tamanhos e formas dos neurônios, assim como seus axônios e dendritos. Por exemplo: o comprimento de um axônio pode variar de poucos milímetros a metros, como aqueles pertencentes a neurônios motores que saem da medula espinhal até os músculos que eles enervam. Os neurônios desempenham funções específicas dentro do sistema nervoso. Há neurônios encarregados da coleta de informações ou estímulos do meio ambiente (visão, olfato, gustação, tato, audição) para encaminhá-los à medula. Na medula, outra classe de neurônios recebe a informação e então as encaminha às principais regiões do cérebro. A chegada do estímulo ao cérebro provocará uma reação, que se converterá em uma resposta motora ou psíquica.

3.3. ESTIMULANDO A CÉLULA NERVOSA

O que mantém um organismo vivo é a capacidade de reagir aos desafios e às modificações do meio externo, garantindo a estabilidade e o equilíbrio do meio interno. As modificações do meio externo são captadas pelo sistema nervoso através de informações sensoriais. Uma vez captadas, as informações são processadas e reenviadas para os órgãos que promovem a resposta. A captação, o processamento e a resposta são processos de conversão de energia. Os estímulos sensoriais são transformados em eletricidade iônica, que é convertida em informação química e novamente em informação elétrica, seguindo esta cadeia de transformação e conversão de energia elétrico-química. Um exemplo: no estímulo sensorial, a energia luminosa (luz) é captada por uma proteína que converte este sinal luminoso em sinal elétrico. A retina é responsável por converter o raio de luz em sinal elétrico que segue pelo nervo óptico até o cérebro aonde a imagem é formada e gera a resposta. Na resposta motora há a mesma sequência de conversão, onde após a tomada de conhecimento da informação pelo cérebro, o processo se sucede até atingir o órgão alvo, onde se converte em energia motora.

A presença de células especializadas em diversas funções é fundamental em cada etapa do processo, desde o reconhecimento, o processamento e a ação desencadeados por um determinado estímulo ou sinal que será interpretado como dor, pressão, temperatura, contração, liberação hormonal e outras ações. Não é possível gerar uma resposta se o sinal não for reconhecido por uma célula específica. A célula visual reconhece o estímulo luz, e não é capaz de interpretar um sinal gerado por uma onda mecânica, por exemplo. A geração dos impulsos nervosos ocorre nas células receptoras do estímulo por meio da alteração no potencial de repouso. Algumas células, denominadas células autoexcitáveis, são capazes de desenvolver uma alteração no seu potencial de repouso, desencadeando o processo de resposta sem a necessidade de receberem estímulos, devido a uma alta excitabilidade que as mesmas apresentam. Os potenciais por elas gerados são denominados de potenciais espontâneos.

A permeabilidade diferenciada aos íons sódio e potássio determina a diferença de potencial (ddp) e de voltagem através da membrana. A permeabilidade da membrana aos íons sofre influência a cada valor da ddp apresentada. O potencial de repouso internamente negativo indica uma condição de estabilidade. Alterações no meio podem levar a uma instabilidade temporária, com alterações na voltagem e uma série de alterações na permeabilidade. A membrana sofre alterações quando um estímulo é percebido por uma proteína inserida na membrana e gera uma instabilidade local. Quando o neurônio é estimulado, altera a estabilidade em um ponto, afetando a condição elétrica celular da área da membrana afetada. A transferência de uma mensagem do axônio de um neurônio para o dendrito de outro é conhecida como neurotransmissão. A transmissão da mensagem não ocorre por contato direto entre os axônios e dendritos mesmo considerando que estas estruturas estejam muito próximas umas das outras. A mensagem é encaminhada inicialmente como impulso elétrico movendo-se ao longo do axônio, ocorrendo posteriormente a comunicação. Esta comunicação pode ser feita através da liberação de substâncias químicas, os neurotransmissores. Os neurotransmissores são mensageiros químicos

que levam a informação quando se difundem no espaço entre os axônios e dendritos, denominado sinapse, e se ligam aos receptores localizados nas membranas celulares dos dendritos da célula nervosa adjacente.

Veremos a seguir a descrição do fenômeno do Potencial de Ação, fenômeno elétrico que se propaga ao longo da célula, na forma de um impulso nervoso, e em apenas uma direção, através da membrana e à medida que caminha.

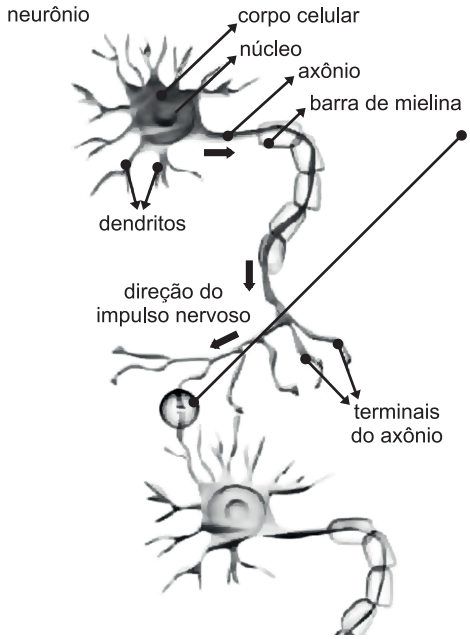


Figura 4: Direção do impulso nervoso (fonte: http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/neurotrans)

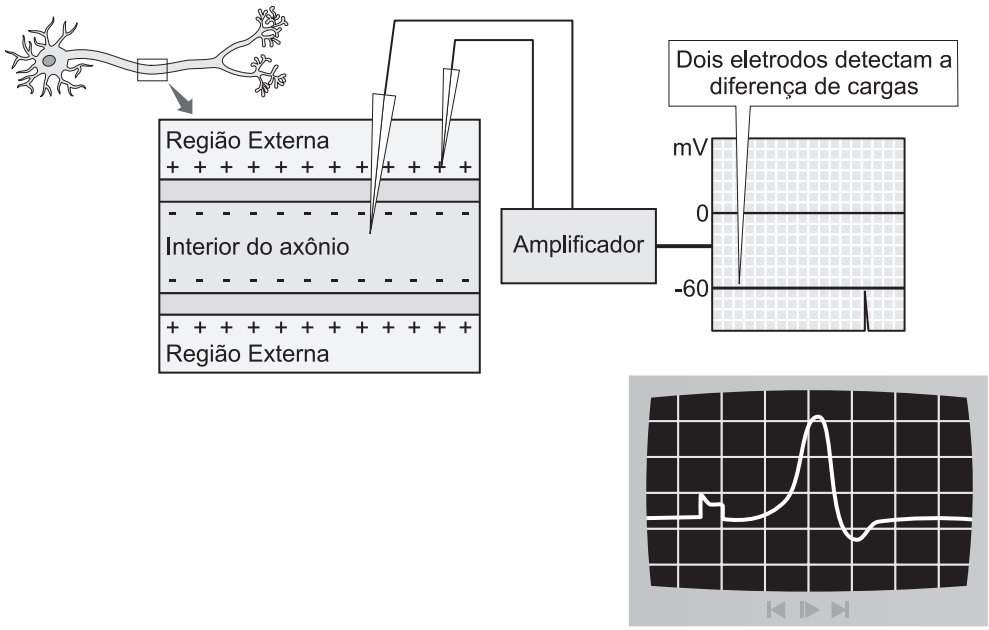
3.4. O POTENCIAL DE AÇÃO

Sabemos que a fibra nervosa, o axônio, é revestida pela membrana celular, que é eletricamente polarizada, onde o interior da célula é negativo em relação ao exterior. Esta diferença de potencial foi denominada de potencial da membrana. Se houver um estímulo, o potencial da membrana pode ser alterado momentaneamente, neste local onde foi detectado o estímulo, uma sequência de reações dá origem a um impulso nervoso que se propaga por toda a extensão do axônio. As respostas desencadeadas por diferentes estímulos – luz, som, posição, substâncias químicas e elétricas – seguem inicialmente um padrão sequencial de resposta que é o potencial de ação. O estímulo traz informações básicas, tais como modalidade, intensidade, duração e localização. O processo inicializado pelos receptores que consiste em transformar a energia do estímulo em energia eletroquímica é denominado de transdução do estímulo. Cada receptor só reconhece um tipo de estímulo especifico, mas todos os receptores ao serem excitados, criam uma diferença de potencial na membrana que, se atingir um valor mínimo, desencadeia a resposta na forma de um potencial de ação. Estes potenciais de ação são enviados ao cérebro, onde atuarão em regiões específicas, determinando o envio de respostas ao estímulo.

A figura 5 mostra um esquema de como é feito o registro do potencial de ação. Ao colocarmos um eletrodo em um neurônio pode-se acompanhar as alterações elétricas que ocorrem na presença de um estímulo. Este traçado é o curso do potencial de ação, amplitude (mV) versus tempo (ms). A linha reta inicial corresponde à voltagem do potencial de repouso da membrana. A primeira alteração é um artefato promovido pela chegada de uma estimulação elétrica. Após certo tempo, o potencial começa a subir e, depois, a descer. Descendo excessivamente, além do potencial de repouso inicial, retorna ao

valor de potencial de membrana anterior à estimulação. No total, todos esses fenômenos duram pouco mais de 1 milissegundo.

Figura 5: O registro do potencial de ação numa tela de osciloscópio onde vemos inicialmente um artefato e a seguir o registro de uma onda que representa um pulso.



3.4.1. A BARREIRA INICIAL

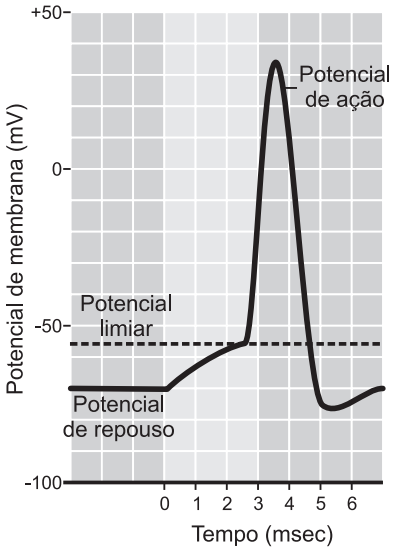
Sabemos que na ausência de perturbações externas os potenciais de membranas permanecem constantes. Um estímulo externo às células nervosas e musculares pode ser capaz de gerar uma modificação no ambiente próximo à membrana, produzir uma perturbação suficiente para alterar o potencial de repouso, saindo do valor definido de voltagem e gerar uma ação celular. Essa variação rápida na voltagem e que se propaga ao longo dessas células é denominada potencial de ação. Como afirmado anteriormente, quando um estímulo é aplicado à membrana, ocorre um desequilíbrio temporário entre as cargas elétricas da membrana e as concentrações de vários íons de um lado e de outro da mesma, que é chamado de potencial local. O neurônio só consegue enviar a mensagem, na forma de pulso elétrico, se a intensidade inicial do estímulo for acima de um determinado valor, fazendo com que a sua membrana responda a este estímulo de maneira sequencial e organizada.

Este valor mínimo que permite a transmissão da mensagem é conhecido como potencial limiar. Os valores abaixo do potencial limiar são conhecidos como sublimiares, e cada célula apresenta um valor característico de potencial limiar. Quando um estímulo chega à membrana há uma perturbação localizada, o potencial local, gerando uma despolarização local. O potencial de repouso da membrana, que é negativo internamente, assume aos poucos valores mais

positivos, saindo de -90mv e registrando valores mais positivos do que este, -85, -80mv, por exemplo. A magnitude destas perturbações locais é que desencadeia ou não o potencial de ação. Para produzir um sinal neural, o potencial se desloca, ao longo da fibra nervosa, até atingir o seu término. Um neurônio pode receber simultaneamente muitos estímulos vindos de outros neurônios ou de fontes externas de estimulação, em vários pontos dos dendritos e do corpo celular. Cada estímulo geralmente provoca uma pequena alteração do potencial local. Estas alterações locais podem ocorrer em posições próximas, espacialmente e fisicamente e duas situações podem acontecer: os potenciais podem ser somados ou podem se anular; a somação ocorre quando os estímulos estão na mesma direção e se anulam quando estão em direções opostas. A isso chamamos de "soma espacial". Pode ocorrer também dois estímulos sucessivos, separados um do outro pelo tempo, frações de segundos entre si, mas ocorrendo no mesmo ponto da membrana. Então, antes que o potencial local causado pelo primeiro estímulo volte ao normal, o segundo vai se somar (ou subtrair) a ele. A isso denominamos "somação temporal" e tornaremos a falar desse fenômeno na próxima aula. Diversos tipos de estímulos podem chegar à superfície da célula ou a um dendrito. Dependendo de como a célula processará a mensagem, a resposta poderá ser excitatória, despolarizante ou inibitória, hiperpolarizante. Quando o somatório, espacial ou temporal, de estímulos de ambos os tipos altera o potencial da membrana, existe um determinado nível de polarização, variável para cada tipo de célula, a partir do qual se desencadeia um processo de despolarização total da membrana. Esse potencial crítico é chamado de limiar de despolarização. Atingido o potencial limiar, o processo não pode mais voltar ou ser revertido, ocorrendo a inversão da polarização da membrana e desencadeando um potencial de ação, vindo a ocorrer uma amplitude e uma duração fixas. Por isso, afirma-se que o potencial de ação é um "fenômeno tudo ou nada": ou há estímulo suficiente para ele ocorrer, que ultrapassa o valor limite do limiar, ou não. O ciclo do potencial de ação só acaba quando é restabelecido o potencial de repouso. É um processo sempre da mesma intensidade e que independe do tipo de estímulo que o provocou ou de qualquer outra situação simultânea.

Dois termos são utilizados em relação à intensidade e ao tempo, necessários para que um estímulo provoque um potencial de ação: reobase e cronaxia. A intensidade mínima de estímulo capaz de causar um potencial de ação é denominada reobase e o tempo necessário para sua aplicação, tempo de utilização. A duração que equivale ao dobro da reobase é denominada de cronaxia. A despolarização rápida (ou seja, que precisa de pouco tempo para causar um potencial de ação) é obtida quando um estímulo forte atinge o limiar da membrana. Mais tempo é requerido para atingir a densidade de corrente quando este estímulo é fraco.

Figura 6: Curva demonstrativa de um potencial de ação. Veja o aumento progressivo do potencial de repouso até chegar ao limiar de disparo. A sequência, a partir do desenvolvimento do potencial limiar, no qual o potencial de membrana atinge valores positivos e retorna ao potencial de repouso é o ***potencial de ação***.



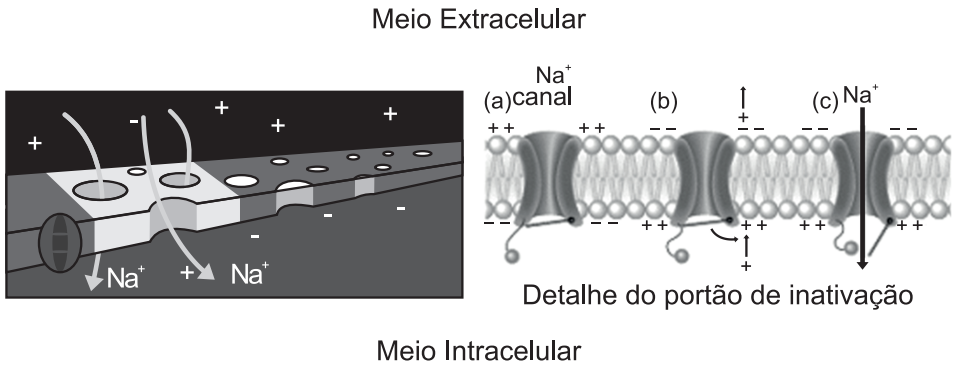
3.4.2. VENCIDA A BARREIRA INICIAL DO POTENCIAL LIMIAR VEM A DESPOLARIZAÇÃO

Se atingir o valor limiar, o estímulo vai gerar uma despolarização de grande amplitude, que é uma das fases do potencial de ação. Os sinais são transmitidos, começando por uma modificação abrupta do potencial de repouso normal, para um potencial positivo e, em seguida, retorna rapidamente para o potencial negativo. Esta sequência é o potencial de ação, que pode ser interpretado como variações muito rápidas do potencial de membrana. Quando alcançado o limiar, na maioria dos neurônios, o valor do potencial limiar é de cerca de -30mV produz-se a abertura de proteínas canais sensíveis à variação de voltagem.

O canal de sódio é o primeiro a responder a esta variação de voltagem diferente do repouso, que foi provocada pelo estímulo. O canal de sódio apresenta um sensor na superfície externa capaz de reconhecer as pequenas variações de voltagem e, quando atinge um valor, esta proteína se abre, expondo um canal no qual os íons sódio têm acesso e passam para o interior celular. Esse acesso é favorecido energeticamente, uma vez que há mais sódio do lado externo, o que faz a passagem acontecer a favor do gradiente de concentração, como já era esperado para processos de difusão os quais ocorrem via proteínas canais. Essa é a primeira fase do potencial de ação, onde os íons sódio com a sua carga positiva modificam o ambiente intracelular, que tinha, no repouso, natureza negativa e agora passa a apresentar um valor positivo. Observe a alteração na polaridade interna: passa de negativa para positiva, fase esta denominada de DESPOLARIZAÇÃO por esta inversão que ocorre na polaridade. A despolarização provoca um efeito autoalimentador positivo: os íons sódio ao passarem pelos canais aumentam a permeabilidade ainda mais. Em todos os potenciais de ação medidos, partindo do potencial de repouso, o potencial se eleva rapidamente a um valor positivo onde o valor máximo atingido fica em torno de +30 a +45 mV.

Figura 7a: Despolarização - o estímulo provoca a abertura de canais de sódio dependentes de voltagem

e a entrada de cargas positivas deste íon modifica o meio interno, provocando uma despolarização nesta região.



A positividade interna atinge valores que provocam alterações na superfície interna do canal de sódio, mais precisamente no portão de inativação. Assumindo esta posição, de inativado, os canais de sódio não responderão a um novo estímulo, ou seja, não permitem a entrada de íons sódio. Simultaneamente, porém mais lentamente, os canais de K^+ estão se abrindo, tornando-se ativos e garantindo a saída de íons K^+. Isso leva à repolarização da membrana, que será discutida no próximo item.

3.4.3. A RESPOSTA À DESPOLARIZAÇÃO É DADA PELO ÍON POTÁSSIO: REPOLARIZAÇÃO

A fase de despolarização dura frações de milissegundos, e é termodinamicamente favorecida e a alteração provocada no meio interno rapidamente desencadeia uma resposta intracelular. Como recuperar a situação inicial de equilíbrio estável e de repouso onde o meio interno era negativo? A saída de carga positiva é o caminho encontrado. O potássio carrega uma carga positiva que pode se movimentar a favor do seu gradiente de concentração. Essa movimentação vai recuperar a negatividade interna, pois cargas positivas estarão saindo da célula, e o que é melhor, sem gasto de energia. Para que isso aconteça, canais de potássio presentes na membrana são sensibilizados pela alteração no potencial provocada pela movimentação de sódio. Temporalmente, os canais de sódio também sofrem com esta saída de potássio, pois há nova alteração no valor do potencial. Em cerca de 1 milissegundo depois de serem abertos, os canais de sódio assumem a configuração inativada e o sódio não entra mais.

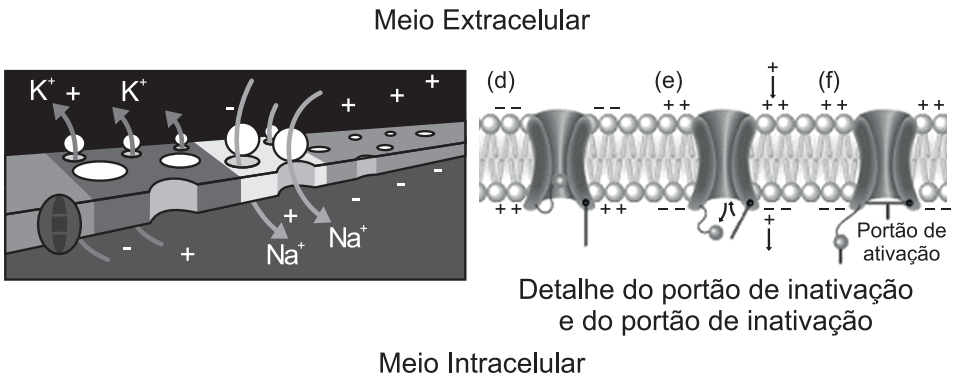
Sendo assim, o curso temporal do potencial de ação nos mostra uma curva ascendente, saindo de um valor negativo do potencial de repouso indo a valores próximos do potencial de equilíbrio do íon sódio. Entretanto, este valor não é atingido, pois antes disso os íons potássio deixam a célula, tornando-a novamente negativa, o que dá início à fase descendente da curva, também denominada de REPOLARIZAÇÃO.

Após o disparo de um potencial de ação, a célula necessita de um tempo antes de disparar um próximo potencial de ação. Esse tempo chama-se **período refratário**. O período refratário ABSOLUTO **não** depende da intensidade do

estímulo. O período refratário RELATIVO **depende** da intensidade do estímulo. Por este motivo, durante a fase de repolarização (que é a recuperação das condições de repouso), o neurônio fica insensível a novos estímulos, e mesmo com um estímulo acima do limiar de excitação não haverá despolarização. Este intervalo de tempo é denominado período refratário absoluto.

Quando a membrana está totalmente repolarizada, os canais de Na^+ voltam a poder ser estimulados. É necessário haver um número suficiente de canais de Na^+ disponíveis e capazes de responder ao estímulo. Assim é possível estimular o neurônio, mas ele responderá somente se a intensidade for bem maior, pois o número de canais de sódio em condições de transportar o íon é ainda pequeno. Um estímulo acima do limiar de excitação desencadeará um potencial de ação já que os canais passaram do estado inativado para o estado fechado, podendo responder a um estímulo bem acima do habitual. Este período de tempo é denominamos de período refratário relativo.

Figura 7b: Repolarização - a saída dos íons potássio altera a voltagem levando a uma modificação na estrutura do canal de sódio e permite restaurar a negatividade no interior celular.



3.4.4. AÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO E DA NA^+ - K^+ ATPASE - DA HIPERPOLARIZAÇÃO AO POTENCIAL DE REPOUSO

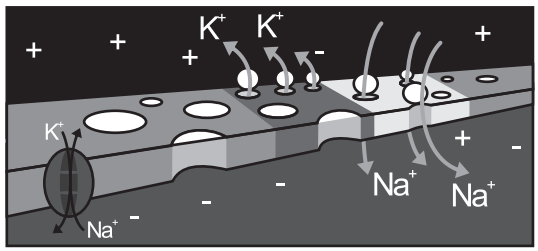
Devido à movimentação dos íons K^+ para o exterior da célula há a reversão da polaridade, retornando ao valor negativo. Esta situação restaura progressivamente a polarização inicial. O potencial de membrana pode atingir um valor ligeiramente mais negativo do que o potencial de membrana em estado de repouso da célula. Nesta fase, pode-se afirmar que há uma hiperpolarização, pois o valor de voltagem atingido é mais negativo do que aquele no estado de repouso. A situação de repouso só será atingida quando entrar em ação a bomba de Na^+-K^+, a permeabilidade aos íons potássio retornar ao normal e a célula voltar às suas condições normais restabelecendo as condições do início do processo.

A hiperpolarização acontece porque os canais de K^+ dependentes de voltagem só ficam inativos quando o potencial de membrana chega a níveis bem abaixo dos níveis normais de repouso. Desta forma, a condutância ao K^+ permanece alta e esses íons continuam saindo até que o potencial da membrana chegue a um

nível baixo, menor do que o potencial de repouso, o que leva ao fechamento dos canais de K^+ e interrompe o fluxo deste íon e, consequentemente, a interrupção da queda do potencial de membrana.

O potencial de membrana volta aos níveis do repouso devido aos fluxos passivos de íons pelos canais permanentemente abertos. Esses fluxos são os mesmos que acontecem no repouso e são os responsáveis pelo ajuste do potencial de membrana Os canais de K^+ permanentemente abertos permitem a saída de K^+ durante todo o potencial de ação. O que ocorre durante a despolarização é um fluxo predominante de Na^+ para dentro da célula. Os canais de Na^+ permanentemente abertos permitem a entrada de Na^+.

Figura 7c: Na fase de hiperpolarização e retorno ao potencial de repouso, a regeneração é alcançada



devido a participação da Na^+K^+-ATPase

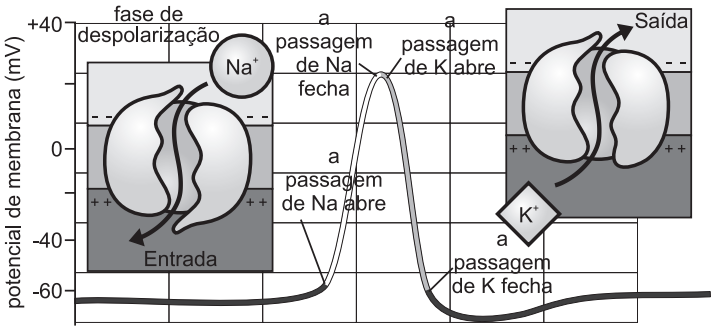


Figura 8: Conformação dos canais de sódio e de potássio durante o curso do potencial de ação. (Fonte: modificado de saude.hsw.uol.com.br/nervo4.htm)

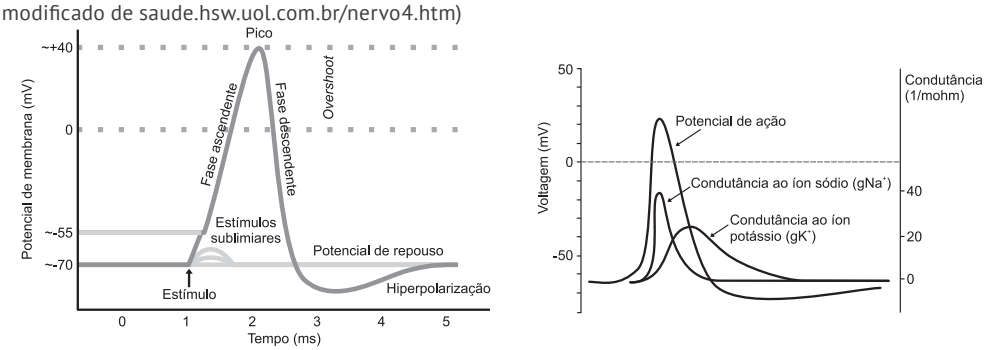


Figura 9: Visão esquemática do potencial de ação mostrando as fases sequencias em função do tempo e as condutâncias aos íons. (Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Potencial_de_ação)

É importante salientar que a quantidade de sódio e de potássio que atravessa

a membrana durante o curso do potencial de ação não causa alteração drástica na concentração desses íons nos dois lados da membrana.

A duração do potencial de ação é de aproximadamente 2 a 3 milésimos de segundo na maioria das células excitáveis. É possível encontrar algumas células excitáveis que apresentam um potencial mais prolongado; células musculares cardíacas, por exemplo, apresentam potenciais de ação que chegam a durar 0,15 a 0,3 segundos. Tais potenciais mais longos apresentam um período bastante prolongado durante o qual a membrana celular permanece despolarizada. Estes potenciais são denominados **potenciais em platô**.

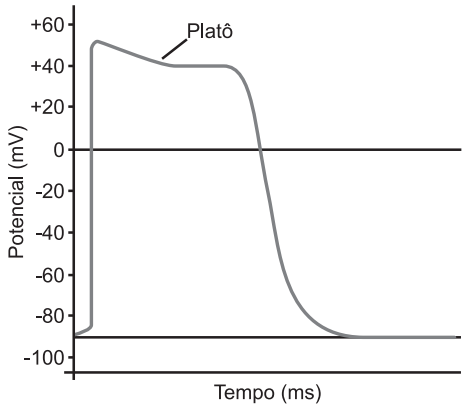


Figura 10: Potencial em platô encontrado em células cardíacas

Atividades

1 - Traçar o curso do potencial de ação registrando:

a) Os estados aberto, inativado e fechado dos canais de sódio e potássio em cada fase.

b) Os períodos refratários: absoluto e relativo.

c) As condutâncias aos íons sódio e potássio em cada fase.

2 - Nesta aula destacamos o papel dos íons sódio e potássio no curso do potencial de ação. Pesquise o papel dos íons cloreto e cálcio neste evento.

3 - Sabe-se que o mecanismo de ação de diversos fármacos envolve a interação com proteínas da membrana das células. Um exemplo são os anestésicos, como a Lidocaína, que interagem com proteínas do tipo canal, responsáveis pelo transporte de Na^+. Indique qual(is) fase(s) do potencial de ação é(são) alvo(s) dos anestésicos.

4 - Elabore hipótese(s) para explicar as diferenças de potencial elétrico de repouso de um fenótipo celular para outro. Por exemplo, células musculares esqueléticas podem ter potenciais de -90mV, neurônios de -65 mV e algumas células epiteliais tem potenciais de -40 mV.

4 *Propagação do impulso nervoso: a neurotransmissão sináptica*

AULA 4: PROPAGAÇÃO DO IMPULSO NERVOSO – A NEUROTRANSMISSÃO SINÁPTICA

Ao final desta aula o aluno deverá ser capaz de descrever:

- O mecanismo de condução do impulso nervoso.
- A condução saltatória.
- A transmissão sináptica e neurotransmissores.
- As sinapses Inibitórias e Excitatórias.
- A sinapse Elétrica.
- A sinapse química.

4.1. MECANISMOS DE CONDUÇÃO DO IMPULSO NERVOSO

Para que serve um potencial de ação?

- *Estimular a contração muscular;*
- *Estimular a liberação de neurotransmissores;*
- *Estimular a secreção de outras substâncias por células neurais e neuroendócrinas.*

Um impulso nervoso é gerado em resposta a um estímulo produzido em um segmento da membrana. A polaridade da membrana sofre uma inversão provocada pelas correntes locais dos íons. Este estímulo foi capaz de desencadear um potencial de ação, gerando um impulso nervoso. A informação só será transferida de um local a outro do sistema nervoso quando o potencial de ação for conduzido ao longo do axônio. A despolarização das porções adjacentes da membrana ocorre em seguida, saindo da situação de repouso original. O processo ocorre de maneira passiva: assim, quando ocorre a entrada de íons Na^+ durante o potencial de ação, estes íons levam à movimentação passiva dos íons negativos da região adjacente para a superfície externa da membrana, provocando a despolarização; se atingido o limiar, a resposta local ativa canais iônicos vizinhos de Na^+ e de K^+, voltagem dependentes, gerando novo potencial de ação (PA) e, assim, sucessivamente.

A propagação da corrente pode acontecer nos dois sentidos do axônio, considerando que o estímulo venha a ocorrer num ponto central, o que não acontece *in vivo*. Na realidade, os potenciais de ação são gerados no segmento

inicial ou cone de implantação do axônio e, à medida que o impulso nervoso caminha, seu retorno é impedido pelo período refratário absoluto. Sendo assim, um potencial de ação que teve início numa extremidade do axônio irá se propagar em uma direção, uma vez que o período refratário absoluto no segmento por onde o potencial de ação acabou de passar impede que este retorne. Por este motivo afirma-se que os potenciais de ação são **unidirecionais.** O termo **condução ortodrômica** (orto => certa; dromos=> pista) é utilizado para descrever esta direcionalidade e **condução antidrômica** (anti => contra) é aplicado para a propagação em sentido contrário. Um potencial de ação serve de estímulo para o potencial de ação seguinte, sem depender de novo estimulo, sem perdas, mantendo a sua amplitude e duração. A propagação então do PA se dá de maneira autoregenerativa e sem qualquer custo de energia metabólica. O diâmetro do axônio e a presença ou não da bainha de mielina são exemplos de fatores que podem alterar a velocidade de condução do potencial de ação. Vimos na aula anterior que a presença de bainha de mielina acelera a velocidade da condução do impulso nervoso, uma vez que nas regiões onde há os nódulos de Ranvier a onda de despolarização ocorre na forma de **condução saltatória** e, com isso, há um considerável aumento da velocidade do impulso nervoso.

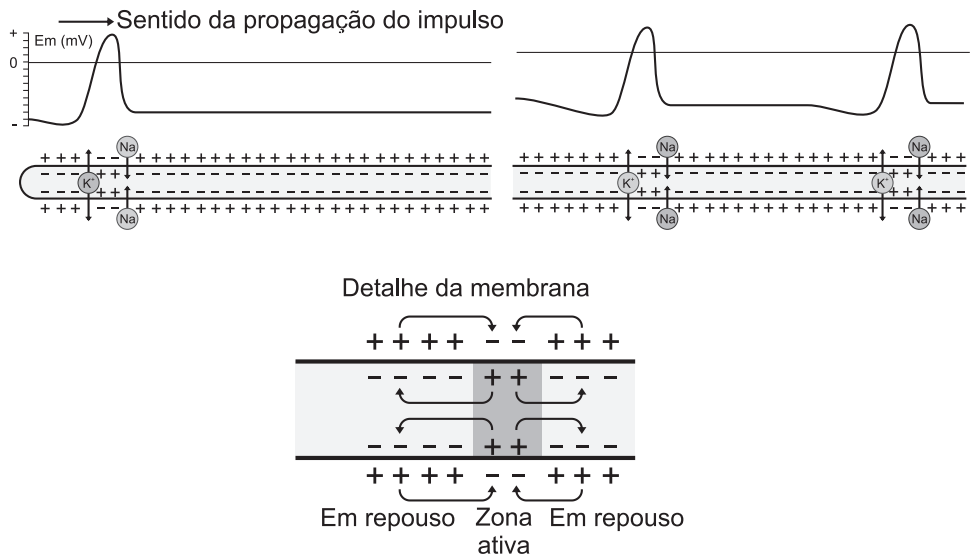


Figura 1: Sentido da condução do potencial de ação - o potencial de ação é conduzido sempre do segmento inicial para o terminal do axônio, anterogradamente, e isto não é devido a uma propriedade inerente à membrana ou ao mecanismo de propagação. O sentido da condução não é revertido porque a membrana do axônio, onde o potencial de ação acabou de ocorrer, se torna refratária. Outro mecanismo natural para impedir a condução antidrômica são as sinapses.

A descontinuidade da bainha de mielina faz com que os íons saltem de um nodo a outro e, assim, os potenciais de ação são conduzidos. A condução saltatória é importante por duas razões: primeira, dita anteriormente, por aumentar em muito a velocidade da transmissão, cerca de 5 a 50 vezes; e segundo, por impedir a perda de energia, pois a polarização ocorre localmente nos nodos com pronto restabelecimento das diferenças de concentração de sódio e potássio.

4.2. A SINAPSE

No processamento do impulso nervoso, dois tipos de eventos estão envolvidos: um de natureza elétrica e o outro de natureza química. A propagação do sinal dentro de um neurônio é de natureza elétrica, e a transmissão do sinal de um neurônio a outro ou a uma célula muscular é de natureza química. A direção de propagação do impulso nervoso é dos dendritos para o corpo celular e deste para o axônio. Ao chegar à extremidade do axônio, o impulso é transmitido para o próximo neurônio e, como os axônios não se tocam uns aos outros, eles são separados por terminações conhecidas como sinapses.

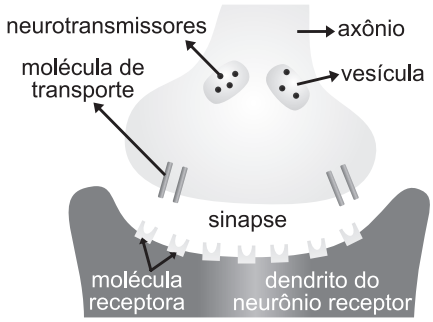


Figura 2: A região delimitada pela sinapse onde estão representados o axônio pré-sináptico, o pós-sináptico e algumas estruturas importantes para a neurotransmissão.

Portanto, uma sinapse é o local onde o impulso é transmitido de uma célula a outra. Existem dois tipos de sinapse: sinapse elétrica e sinapse química

Sinapses elétricas - Este tipo de sinapse é raramente encontrado em vertebrados, mas pode ser encontrada, por exemplo, no miocárdio, musculatura lisa do intestino, hepatócitos e células epiteliais do cristalino. Estruturalmente são mais simples, mas promovem a passagem direta da corrente iônica de uma célula para outra. A onda de despolarização passa diretamente do axônio de um neurônio a um dêndrito do neurônio seguinte, graças à presença de junções abertas ou junções comunicantes (tradução livre para o termo em inglês, *gap junctions*). Essas junções apresentam aberturas muito pequenas, de menos de 30 ângstrons, de baixa resistência elétrica, por onde flui uma corrente de uma célula a outra. Nelas forma-se uma estrutura protéica que permite a passagem da corrente elétrica, denominadas de conexinas. Quando reunidas em um conjunto de seis conexinas, um canal é formado, o **conexon**, o qual permite que íons passem diretamente do citoplasma de uma célula para outra. A concentração de cálcio e íons H^+ podem controlar a abertura e fechamento do conexon, que permanece fechado com o aumento do Ca^{++} ou H^+ intracelular, em uma das duas células. A transmissão é muito rápida nas sinapses elétricas. Ao contrário das sinapses químicas, estas não são polarizadas, ou seja, a comunicação se faz nos dois sentidos, o que não ocorre com a sinapse química, que é na maioria das vezes unidirecional.

Resumindo, as características das sinapses elétricas:

a) podem conduzir o impulso bidirecionalmente, embora algumas, quando retificadas, irão conduzir o impulso num só sentido;

b) são sensíveis às concentrações de cálcio ou próton e pode fechar-se em resposta a um aumento de Ca^{2+} ou H^{+} intracelulares;

c) não sofrem atraso sináptico pelo que são particularmente úteis quando é necessária uma resposta rápida.

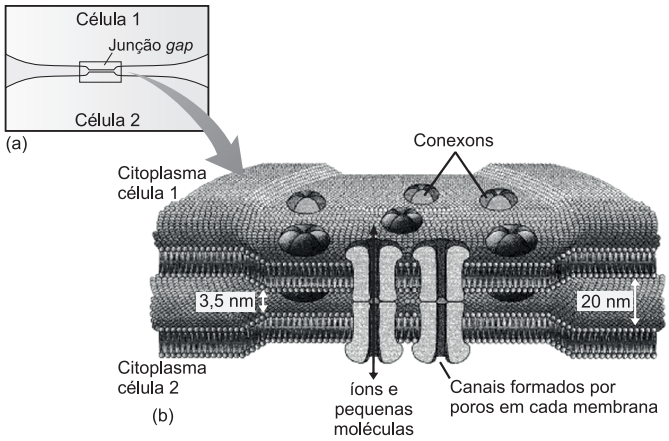


Figura 3: Em (a) junção comunicante entre duas células e ampliado em (b) mostrando os conexons formados por 6 unidades de conexinas, formando o canal

Sinapse química - É a sinapse que ocorre quando há participação de mediadores químicos na transmissão dos impulsos nervosos. O axônio de um neurônio pré-sináptico, presente na região anterior, encontra-se com o neurônio pós-sináptico. Na sinapse química, o sinal elétrico que chega ao terminal provoca a liberação de neurotransmissores até então aprisionados em vesículas. Os neurotransmissores ou mediadores químicos são liberados nas extremidades do axônio da célula pré-sináptica e a seguir, podem se combinar com receptores específicos, localizados na membrana pós-sináptica; isso provoca uma alteração elétrica na membrana, desencadeando o impulso nervoso. Um mesmo neurotransmissor poderá causar efeitos bem diferentes dependendo do tipo de receptor presente no tecido.

Nas sinapses químicas, encontramos algumas estruturas bem definidas:

a) o terminal pré-sináptico formado por botões sinápticos, o qual aumenta em muito a superfície de contato, que pode ser feito nos dendritos, no corpo celular ou nos axônios. O botão sináptico é rico em estruturas que participam ativamente da transmissão do impulso nervoso; em especial nota-se a presença de vesículas que podem ser preenchidas pelos neurotransmissores e mitocôndrias. É no terminal que se encontram as zonas ativas, locais da membrana onde preferencialmente se dá a liberação dos neurotransmissores;

b) a fenda sináptica que contem proteínas responsáveis pela interação estável entre as duas células;

c) e a densidade pós-sináptica, que se caracteriza por uma região da membrana pós-sináptica, aposta ao terminal pós-sináptico, onde se localizam receptores, proteínas e enzimas ativados pelos neurotransmissores; esta região é denominada de *eletrodensa*, pois, quando observada por microscopia eletrônica,

as membranas pré e pós-sinápticas apresentam uma alta densidade de elétrons, o que demonstra a alta atividade elétrica nesta região e também a presença de vesículas carregadas de neurotransmissores.

A sinapse é classificada como excitatória ou inibitória de acordo com as respostas geradas, que, por sua vez, são determinadas pelas substâncias diferentes liberadas nestes dois tipos de sinapses. Podemos definir cinco classes de substâncias neurotransmissoras:

a) moléculas de baixo peso, como a acetilcolina;
b) aminas, como a dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina;
c) aminoácidos que podem ser excitatórios (glutamato e aspartato) ou inibitórios (ácido gama-aminobutírico, GABA e glicina);
d) gases: NO e CO;
e) peptídeos.

Todos os neurotransmissores, com exceção dos peptídicos, são sintetizados e armazenados em vesículas no terminal pré-sináptico. O Quadro 1 exemplifica cada uma destas classes.

Classe	Exemplo de Neurotransmissor	Exemplo de Ação Associada
Peptídeos	Substância P e os peptídeos opióides como as encefalinas e endorfinas.	Bloqueio da dor, analgésicos. Ação inflamatória e peristaltismo.
Aminas	Dopamina (derivada da tirosina), noradrenalina, adrenalina, serotonina (derivada do triptofano) e histamina	Sensações de satisfação e prazer; situações de estresse; secreção gástrica A doença de Parkinson está associada a neurônios sensíveis a dopamina. A Serotonina regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano. Medicamentos antidepressivos, aumentam a disponibilidade da serotonina.
Aminoácidos	Excitatórios (glutamato e aspartato). Inibitórios (ácido gama-aminobutírico, GABA e glicina).	O GABA está envolvido com os processos de ansiedade e sua inibição à processos convulsivos. A ativação do glutamato aumenta a sensibilidade aos estímulos dos outros neurotransmissores.
Gases	NO e CO	O óxido nitroso parece atuar no processo de aquisição de memória no SNC.
Moléculas de baixo peso	Acetilcolina (ACh)	Atua na junção neuromuscular. A paralisia muscular (miastenia grave) e a doença de Alzheimer estão associadas a este neurotransmissor.

Quadro1: Classes e ações associadas a neurotransmissores.

A transmissão do impulso através de uma sinapse química envolve resumidamente quatro passos principais: 1-Síntese e armazenamento do neurotransmissor; 2-Liberação do neurotransmissor; 3-Ligação do neurotransmissor aos receptores e 4-Inativação do neurotransmissor.

As vesículas sinápticas sintetizam e armazenam os neurotransmissores, com exceção dos neurotransmissores peptídicos, como dito anteriormente. O aspecto destas vesículas, quando observadas ao microscópico eletrônico , reflete o conteúdo aí armazenado, apresentando-se pequenas e claras quando o neurotransmissor for ACh, glutamato, GABA ou glicina; pequenas e densas quando contêm dopaminas; e densas e grandes quando o conteúdo é de peptídeos.

As vesículas cheias de neurotransmissores são sensíveis à concentração de cálcio intracelular. Quando da chegada do potencial de ação ao terminal pré-sináptico, canais de cálcio sensíveis a voltagem permitem a passagem deste íon ao meio intracelular. A concentração de cálcio intracelular aumentada é um sinal químico que será interpretado pela célula que aciona mais de 25 tipos de proteínas, responsáveis pelo processo de fusão das vesículas à membrana pré-sináptica, e que culmina com a liberação por exocitose do neurotransmissor na fenda sináptica. A toxina botulínica atua neste processo, causando a destruição de um tipo de proteína, o que em parte explica a sua propriedade de relaxante muscular. Após a liberação do neurotransmissor, a vesícula vazia é internalizada por um processo de endocitose. Na membrana pós-sináptica, o neurotransmissor liga-se aos receptores e, na sequência, uma série de alterações na permeabilidade da membrana aos íons irá provocar uma resposta celular. Desta maneira, a mensagem levada pelo neurotransmissor é recebida e processada pela célula receptora.

Os receptores de membrana podem ser classificados em dois tipos: receptores ionotrópicos ou receptores metabotrópicos. Os primeiros são canais iônicos e promovem a alteração da permeabilidade em resposta direta à ligação do neurotransmissor. Já os receptores metabotrópicos influenciam a permeabilidade através de interação com os sistemas de segundos mensageiros. Os efeitos dos receptores ionotrópicos são normalmente rápidos e transitórios e aqueles dos receptores metabotrópicos são mais lentos e duradouros.

Geralmente, cada neurotransmissor se liga somente a um receptor específico. Portanto, quando um neurotransmissor acopla-se a um receptor é como se fosse "chave na fechadura". Este acoplamento dispara uma cascata de eventos na superfície do dendrito do neurônio receptor e dentro da célula. Uma vez reconhecido no receptor específico e gerado uma resposta, o próximo evento da neurotransmissão é a inativação do neurotransmissor.

Três mecanismos isoladamente ou em conjunto podem então acontecer: difusão, degradação e recaptação.

a) a difusão no espaço extracelular diminui a concentração do neurotransmissor;
b) a degradação por enzimas específicas retira a parte ativa incapacitando a ação do neurotransmissor;

c) a recaptação é realizada por moléculas transportadoras e ocorre utilizando mecanismos de transporte ativo secundário no qual o neurotransmissor é recaptado por simporte com Na^+ e Cl^- ou simporte com Na^+ e antiporte com K^+.

As moléculas transportadoras estão presentes nas membranas celulares dos axônios que liberaram os neurotransmissores. Estes transportadores recolhem os neurotransmissores na sinapse, atravessando a membrana celular no interior do axônio. Os neurotransmissores ficam então disponíveis para serem reutilizados.

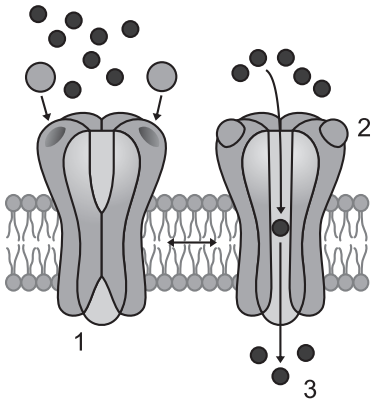


Figura 4: Receptores ionotrópicos são responsáveis pela resposta rápida. Abrem canais iônicos na membrana pós-sináptica. Na sequência:

1. a ligação dos neurotransmissores;
2. a passagem dos íons pelo canal;
3. a entrada dos íons se faz a favor do gradiente eletroquímico; geralmente os íons que promovem resposta excitatórios são catiônicos e os inibitórios são aniônicos (permeáveis aos ânions - Cl-).

Anteriormente, classificamos os neurotransmissores como excitatórios ou inibitórios. Esta classificação também se estende às alterações do potencial de membrana da célula pós-sináptica, denominado de potencial pós-sináptico, que pode ser potencial excitatório ou inibitório. O primeiro corresponde a uma deslocação do potencial de membrana no sentido de valores menos negativos (despolarização), tornando a célula mais excitável provocado pelo aumento da permeabilidade ao Na^+ e/ou Ca^{2+}: A liberação do neurotransmissor, ao final, resultará em aumento da permeabilidade da membrana pós-sináptica a íons sódio e a entrada dos íons sódio despolariza a membrana pós-sináptica que ao atingir um valor limiar , inicia um potencial de ação. No segundo, na sinapse inibitória o processo é semelhante, mas o neurotransmissor liberado aumenta a permeabilidade especialmente ao íon cloro, Cl^- , que penetra na membrana pós-sináptica, provocando uma hiperpolarização: o interior fica mais negativo, o exterior mais positivo. A sinapse inibitória torna a célula menos excitável e resulta de um aumento da permeabilidade ao Cl^- ou K^+ ou da diminuição da permeabilidade ao Na^+ ou Ca^{2+}.

Os canais de cálcio envolvidos no processo de transmissão química são responsáveis pela velocidade da transmissão um pouco mais lenta nas sinapses químicas, se comparadas às sinapses elétricas. Outro fator que contribui para o retardo do aparecimento da resposta pós-sináptica é o tempo necessário para que o neurotransmissor seja liberado da célula pré-sináptica. Somados este dois fatores, a latência pode chegar a 1,5ms, tendo um tempo mínimo de 0,5ms para saltar da fibra pré para a fibra pós-sinaptica.

Há transformação de energia no processo da neurotransmissão: Na sinapse química o evento iniciado no terminal pré-sináptico libera uma substância transmissora que se espalha na junção sináptica entre os neurônios e provoca um processo pós-sináptico. Dessa forma, um sinal elétrico pré-sináptico é

convertido na sinapse em uma reação química que, por sua vez, novamente produz um impulso elétrico.

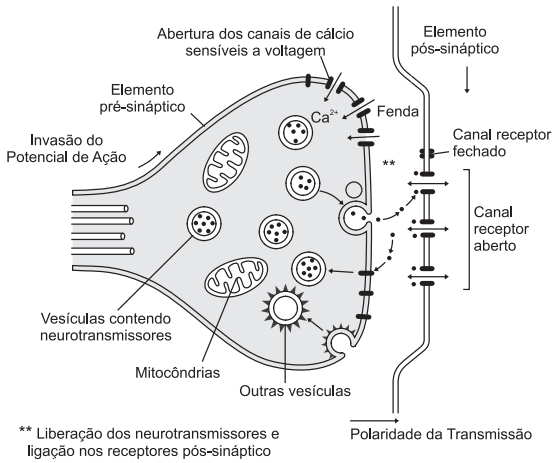


Figura 5: Figura esquemática da sinapse e detalhes do botão terminal mostrando as estruturas que participam da neurotransmissão sináptica química e a sequência de eventos – invasão do potencial de ação, ativação dos canais de cálcio sensíveis a voltagem; posicionamento das vesículas no terminal e liberação dos neurotransmissores na fenda; reconhecimento do neurotransmissor pelo receptor pós-sináptico; e, por fim, a recaptação do neurotransmissor.

A resposta do tipo "tudo ou nada" vista para o potencial de ação não acontece para o potencial pós-sináptico. Seguindo o princípio do "tudo ou nada", a célula nervosa responde de forma máxima a estímulos limiares e supralimiares. Qualquer valor de estimulação que for sublimiar só provocará uma resposta local que não será propagada. Em outras palavras, se houver aumento na intensidade de estimulação não haverá aumento nem da amplitude e nem da velocidade de condução. O potencial pós-sináptico apresenta intensidade variável de acordo com a frequência e número de estímulos, daí ser classificado como potencial gradativo. Este tipo de potencial apresenta variação da amplitude em função do número e com a frequência do impulso, ou seja, simultaneamente quanto maior for o número de impulsos que chegam a uma célula ou maior frequência com que um impulso atinge uma célula, maior será a amplitude do potencial pós-sináptico.

Aqui acontece o fenômeno da somação, a somação temporal e a somação espacial. O fenômeno da somação temporal é quando dois ou mais estímulos sublimiares forem aplicados num intervalo menor que 1 ms, podendo esses estímulos se somar e desencadear um potencial de ação. Neste caso, o estímulo subliminar aplicado em alta freqüência pode somar-se ao anterior antes que ele volte ao potencial de membrana e assim sucessivamente até que alcance o limiar de ação e desencadeie o potencial de ação. Na somação espacial, quando dois ou mais estímulos sublimiares forem aplicados simultaneamente e bem próximos, eles podem se somar e desencadear um potencial de ação. Neste fenômeno, estímulos subliminares de diferentes origens são gerados ao mesmo tempo e, se somados, alcançam o limiar de ação e geram um potencial de ação. Entretanto, ao longo da condução, o potencial sofrerá diminuição da intensidade, significando que a amplitude do potencial pós-sináptico vai diminuindo à

medida que é conduzido pela membrana celular, sendo consequência da condução passiva ao longo da membrana, o que é denominado de condução eletrotônica. Este potencial não poderá ser conduzido por longas distâncias, pois apresenta baixa amplitude e diminuição da velocidade de condução.

Um fenômeno que ocorre na célula quando esta sofre estimulação excessiva é a fadiga sináptica. Uma sinapse quando é estimulada frequentemente e excessivamente poderá atingir um ponto a partir do qual estímulos subsequentes provocam respostas pós-sinápticas menores. Na fadiga, há uma diminuição da concentração citoplasmática de Ca^{2+} com consequente diminuição da liberação pré-sináptica de neurotransmissor.

4.3. A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

A junção neuromuscular (JNM) foi a primeira sinapse a ser estudada fisiologicamente e ocorre quando um axônio se liga a uma fibra do músculo esquelético, em uma estrutura especializada, a qual é chamada de junção neuromuscular ou placa motora. Um potencial de ação que ocorre nesse local é conhecido como transmissão neuromuscular. Cada fibra muscular esquelética possui apenas uma placa motora e cada neurônio motor inerva um número variado de fibras musculares que se encontram espalhadas ao longo do músculo; o conjunto de fibras inervado por uma única fibra nervosa motora recebe o nome de unidade motora.

A acetilcolina é o neurotransmissor utilizado na junção neuromuscular que se combina com um receptor para desencadear o potencial de placa terminal no músculo. Receptores nicotínicos são receptores específicos para a ACh, os quais são canais iônicos que, quando abertos, permitem a passagem de cátions, provocando a despolarização do músculo. Na junção neuromuscular um potencial de ação pré-sináptico provoca um potencial de ação muscular. Uma característica desse tipo de sinapse é que a transmissão do impulso é unidirecional, ou seja, o impulso somente irá do motoneurônio para a célula muscular e nunca ao contrário. É através desse potencial de ação que o músculo irá contrair e assim gerar trabalho mecânico.

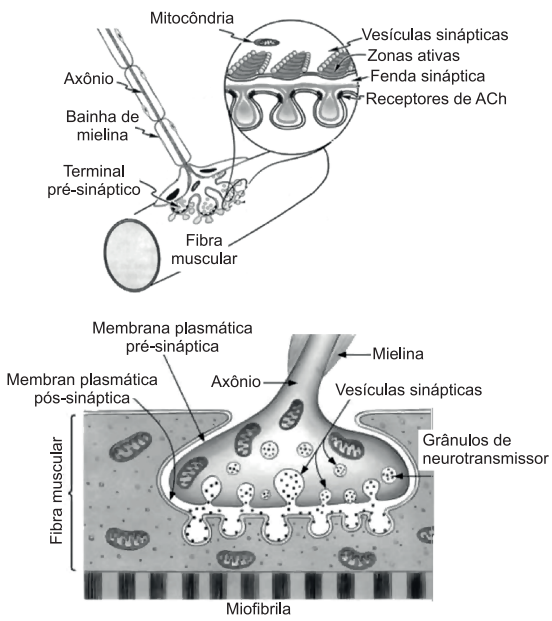


Figura 6: A junção neuromuscular – quando o impulso nervoso alcança a junção neuromuscular, centenas de vesículas contendo o neurotransmissor acetilcolina são liberadas pela fenda sináptica; em média são liberadas 10.000 moléculas de acetilcolina por vesícula.

Na musculatura esquelética dos vertebrados, o receptor nicotínico é um pentâmero. Esse receptor é do tipo canal iônico regulado por ligante que, no caso, é a acetilcolina. A estrutura pentamérica possui dois sítios de ligação da acetilcolina, cada um situado na interface entre uma das duas subunidades α e sua vizinha. Ambos devem ligar moléculas de acetilcolina para que o receptor seja ativado. Os receptores ionotrópicos controlam os eventos sinápticos rápidos, permitindo em sua maioria aumento da permeabilidade ao Na^+ e K^+. A corrente interna efetiva, transportada principalmente pelo Na^+, irá despolarizar a célula e aumentar a probabilidade de gerar um potencial de ação.

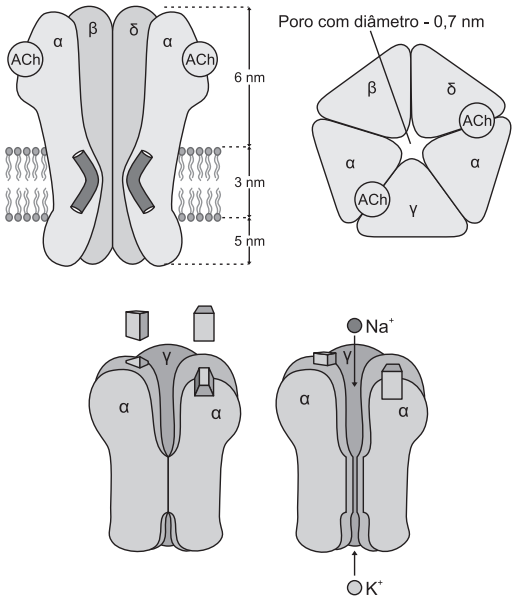
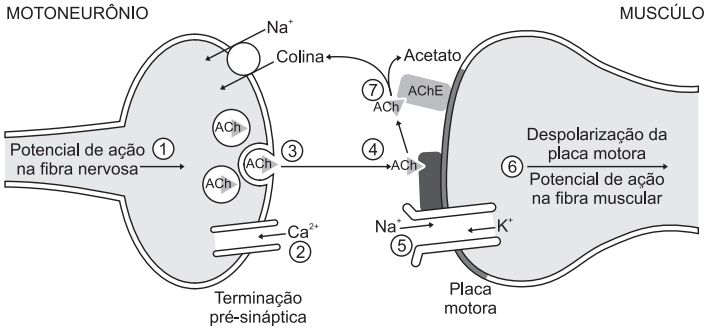


Figura 7 – Estrutura do receptor nicotínico - a ligação de duas moléculas de acetilcolina ativa o canal, abrindo o poro por onde passam os íons Na^+ e K^+.

A neurotransmissão feita na junção neuromuscular segue todos os passos da transmissão química, a saber:



1 - Potencial de ação na célula pré-sináptica;
2 - Despolarização da membrana plasmática da terminação pré-sináptica;
3 - Entrada de cálcio na terminação pré-sináptica;
4 - Liberação do neurotransmissor;
5 - Combinação química do neurotransmissor com receptores específicos na célula pós-sináptica;
6 - Alteração transiente da condutância da membrana pós-sináptica a íons específicos;
7 - Alteração transiente do potencial de membrana da célula pós-sináptica.

Figura 8: As etapas que ocorrem durante a transmissão na junção neuromuscular.

A acetilcolina presente na fenda sináptica é degradada pela enzima acetilcolinesterase, gerando acetato e colina. Essa última é captada para ser reutilizada. Dessa forma a resposta contrátil do músculo não é uma atividade constante e é necessário que um novo impulso nervoso chegue a essa junção neuromuscular para, assim, gerar uma nova contração.

A entrada de íons sódio provocada pela abertura de canais promove uma variação no potencial interno da membrana na área local da Placa Motora. Normalmente, um potencial de ação num axônio motor, libera uma quantidade suficiente de acetilcolina, a partir das vesículas sinápticas, para induzir um potencial excitatório de placa motora com amplitude de cerca de 70 a 80 mV. Já que o limiar para a geração de um potencial de ação na placa motora é em torno de -45 mV, o potencial de placa motora é maior que o limiar necessário para iniciar um potencial de ação. O potencial de repouso que é -80mV aumenta até -20 mV.

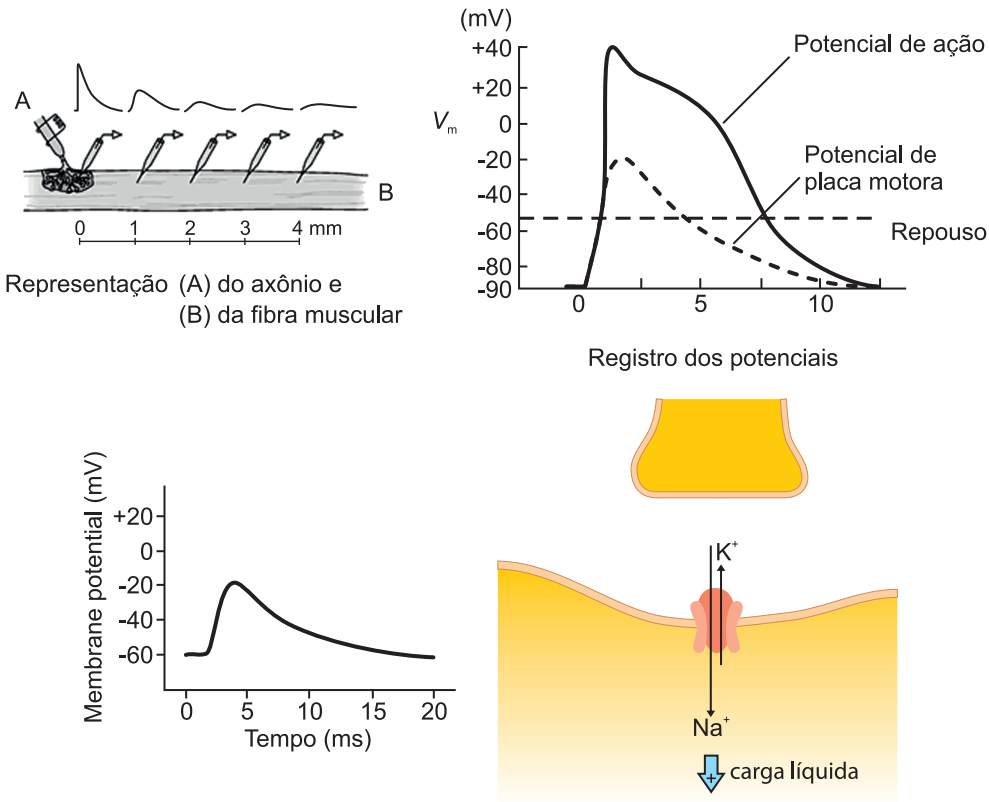


Figura 9: Potencial da placa motora provocado pela entrada de sódio desencadeada pela acetilcolina.

Em 1672, o médico inglês Thomas Willis descreveu um caso de uma mulher que temporariamente perdeu sua voz e tornou-se "muda como um peixe". Esta tem sido interpretada como a primeira descrição da miastenia grave na literatura. A fadiga e fraqueza dos músculos esqueléticos são sintomas desta doença autoimune, rara, mas chega a atingir 15 mil pessoas no Brasil e que acompanha a pessoa ao longo de sua vida. Doenças autoimunes são aquelas em que os sintomas são provocados por um comportamento anormal do sistema

imunológico onde os anticorpos atuam contra tecidos do próprio organismo são ou autoanticorpos.

Na miastenia, os autoanticorpos se ligam aos receptores de acetilcolina situados na membrana da fibra muscular. Na junção miastênica há um reduzido número de receptores de acetilcolina, as fendas sinápticas são mais simples e o espaço sináptico é alargado. As anormalidades resultantes no número e na função do receptor dificultam ou bloqueiam a transmissão do impulso nervoso através da junção neuromuscular e, com isso, não há acetilcolina suficiente para disparar o estímulo necessário para a contração muscular. Quando o número de receptores de ACh é reduzido, como na miastenia, uma molécula de ACh será provavelmente hidrolisada antes de encontrar um receptor. As drogas que inibem a acetilcolinesterase revertem parcialmente tanto a anormalidade fisiológica quanto os sintomas clínicos, porque quanto mais tempo as moléculas de ACh liberadas puderem ficar na fenda sináptica sem serem hidrolisadas, maior é a probabilidade de interagirem com receptores.

Como tratamento da miastenia grave são utilizados inibidores da colinesterase, agentes anticolinesterase que atuam promovendo o retardo na hidrólise enzimática da acetilcolina e promovem liberação de mais acetilcolina que acumulam na junção neuromuscular. Isto aumenta as chances de serem ativados os receptores, de forma que os nervos e os músculos terão uma melhor comunicação e os músculos não irão enfraquecer tão depressa.

Atividades:

Busque informações nos livros textos de Fisiologia e Biofísica ou em sites de educação sobre:

1 - Os mecanismos de ação dos agentes toxina botulínica e curare e descreva os efeitos sobre a transmissão neuromuscular.

2 - Liberação quantal de neurotransmissor.

5 Metabolismo de lipídeos

AULA 5: METABOLISMO DE LIPÍDEOS

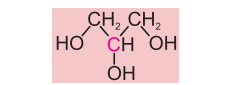
Ao final desta aula você deverá:

- Conhecer os mecanismos de síntese dos ácidos graxos.
- Conhecer os mecanismos de degradação dos ácidos graxos.
- Conhecer os mecanismos de síntese do colesterol.
- Entender o papel das apolipoproteínas no transporte dos lipídeos

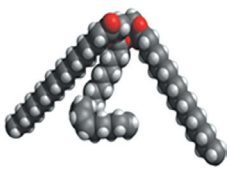
Diferente dos aminoácidos e carboidratos, os lipídeos são um grupo de moléculas que não apresentam uma fórmula química comum. Eles são agrupados pelo fato de não serem capazes de interagir com a água. Nesse grupo de moléculas encontramos os:

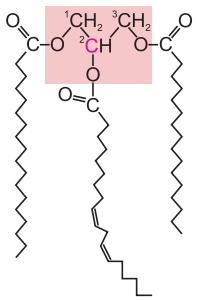
- ácidos graxos
- lipídeos de membrana
- colesterol
- vitaminas liposolúveis

Na disciplina Bases Moleculares I, vocês já foram apresentados aos ácidos graxos, colesterol e lipídeos de membrana. Nessa aula, vamos nos ater de como o organismo é capaz de utilizar os ácidos graxos como fonte de energia e como será capaz de sintetizar ácido graxo e colesterol.



Glicerol





Triaglicerol contendo moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados.

O ácido graxo é a principal reserva energética do homem. Por exemplo, um indivíduo de 70 Kg apresentará cerca de 15 Kg de ácido graxo, já em uma pessoa com 140 Kg os ácidos graxos irão contribuir com aproximadamente 80 Kg. Na estrutura do ácido graxo encontramos um carbono carboxila (HO-C=O) e um número variado de carbonos reduzidos (ligados a hidrogênio) ligados ao carbono do grupamento carboxila. A água é capaz de fazer pontes de hidrogênio com os oxigênios do grupamento carboxila e se armazenássemos o ácido graxo como reserva de energia, teríamos algumas moléculas de água associadas aos ácidos graxos. Com o intuito de diminuir a quantidade de água no armazenamento dos ácidos graxos como reserva, o mesmo é ligado a uma molécula de glicerol. Assim, o armazenamento do ácido graxo é feito na forma de triacilglicerol (figura 1), ou seja, três

Figura 1 – Estrutura de uma molécula de glicerol e uma molécula de triacilglicerol que é a forma de armazenamento de áciddos graxos.

moléculas de ácido graxo ligados a uma molécula de glicerol, o que permite o armazenamento de moléculas energéticas com uma menor quantidade de água.

O colesterol é essencial para o ser humano, pois é importante na membrana biológica e na síntese de hormônios, tais como os hormônios sexuais. Dessa maneira, se ele não é obtido na dieta, ele será sintetizado pelo fígado.

5.1. COMO OBTEMOS OS ÁCIDOS GRAXOS?

Os ácidos graxos podem ser obtidos da dieta ou serem disponibilizados da reserva presente nos adipócitos. Como dito acima, os ácidos graxos não são capazes de interagir com a água: mas então como eles podem ser transportados na corrente sanguínea? A forma que o organismo adota para transportar o ácido graxo depende da sua origem.

Quando ingerimos uma alimentação rica em gordura, como uma porção de torresmo, estamos ingerindo colesterol, lipídeos de membrana e triacilglicerol. O triacilglicerol não é capaz de passar pela membrana celular e, assim, faz parte do processo de digestão a quebra do triacilglicerol em três ácidos graxos e uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos e o glicerol são absorvidos pelas células intestinais e dentro das células intestinais o triacilglicerol é novamente sintetizado. Mas como o triacilglicerol é transportado das células intestinais para as outras células? Esse transporte é feito pelo quilomicron, uma apolipoproteína.

As apolipoproteínas são micelas que possuem lipídeos de membrana na sua superfície (parte polar voltada para o exterior e parte apolar voltada para o interior); dessa maneira ela é capaz de interagir com a água e ao mesmo tempo armazenar moléculas apolares em seu interior. Portanto, todos os lipídeos obtidos na dieta podem ser transportados por essa apolipoproteína, ou seja, os lipídeos de membrana no exterior, os triglicerídeos no interior junto com os ésteres de colesterol. Nessa micela também estão presentes algumas proteínas que terão diversas funções como veremos adiante.

O quilomicron é liberado na corrente sanguínea e irá distribuir os triacilglicerois para as outras células. Mas do mesmo modo que as células do intestino não são capazes de absorver o triacilglicerol, as outras células do organismo também não são. O primeiro passo, então, é clivar o triacilglicerol em três ácidos graxos e uma molécula de glicerol, os quais podem ser absorvidos pelas células. As enzimas responsáveis pela quebra do triacilglicerol são conhecidas como lípases. Essas enzimas estão presentes na parede dos vasos sanguíneos e são ativadas por uma proteína que está presente no quilomicron. A proteína ApoCII é capaz de ativar as lípases presentes no endotélio que irão clivar o triacilglicerol liberando, assim, os ácidos graxos que são absorvidos pelas células. Esses ácidos graxos podem ser oxidados para obtenção de energia ou são armazenados.

Quando os quilomicrons liberam os triacilglicerois que eles carregam, eles

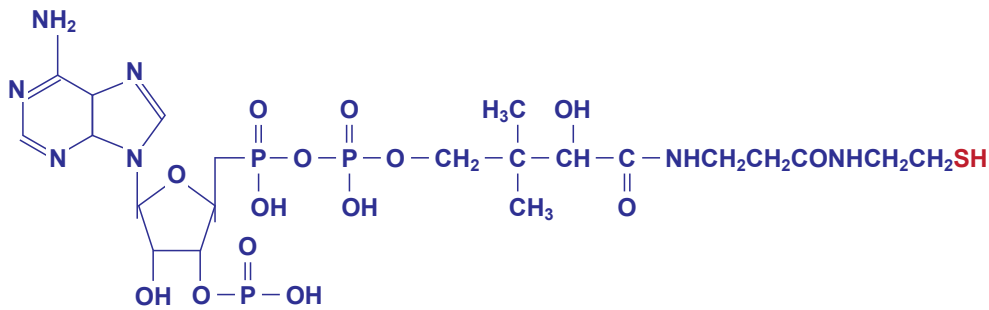
vão diminuindo, mas ainda sim estão transportando lipídeos de membrana e colesterol. Esse quilomicron, denominado quilomicron remanescente, é absorvido pelo fígado que continuará a metabolização desses lipídeos como veremos adiante.

Um indivíduo em jejum não estará obtendo os ácidos graxos da dieta, mas precisará disponibilizá-los para obtenção de energia. Qual é a fonte desses ácidos graxos? Os adipocitos são células que fazem o armazenamento de triacilglicerois que poderão ser disponibilizados para que outras células possam obter energia em condições de carência. Como vimos no curso Bases Moleculares I, quando o nível de glicose diminuí no organismo é liberado o hormônio glucagon. O glucagon informará às células que possuem receptor para ele (principalmente, as células do fígado) que é preciso sintetizar glicose para disponibilizá-la para as células que utilizam preferencialmente essa molécula como fonte de energia. Se a glicose está pouca e precisa ser racionada é necessário que se providencie uma outra molécula geradora de energia para ser utilizada pelas células que não terão glicose a sua disposição. Os ácidos graxos servem bem a esse papel e uma das células alvos da ação do glucagon são exatamente os adipócitos. A ligação do glucagon a um receptor no adipócito irá disparar uma cascata de sinais que irá ativar, via fosforilação, lípases. Os adipócitos possuem grande quantidade de triacilglicerois, mas estes não conseguem sair da célula e, por isso, as lípases irão quebrar o triacilglicerol e liberar os ácidos graxos.

Diferente das células intestinais que utilizam os lipídeos de membrana obtidos na dieta para formar uma micela, os adipócitos não podem utilizar os seus lipídeos de membrana para fazerem uma micela. Mas como, então, os ácidos graxos são transportados? No sangue está presente a proteína soroalbumina que tem a capacidade de se ligar aos ácidos graxos e transportá-los pelo sangue e permite que as células absorvam esses ácidos graxos.

5.2. ATIVAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Quando os ácidos graxos entram na célula eles irão ser ativados como a glicose também é ativada, ou seja, ocorre uma ligação rica em energia. No caso dos ácidos graxos, ao invés de se ligar ao fosfato, ele se liga ao enxofre em uma ligação tioester rica em energia. O ácido graxo se liga a Coenzima A que apresenta em sua estrutura um enxofre, como pode ser visto abaixo:



Como vimos em Bases Moleculares I, a ligação da glicose ao fosfato necessita de energia, pois glicose-6-fosfato tem mais energia que glicose e fosfato livres. Essa energia é fornecida pela quebra de um ATP que libera energia que permite a ligação do fosfato. A ligação do ácido graxo com a Coenzima A também necessita de energia e esta será fornecida também pela quebra do ATP.

A quebra do ATP libera aproximadamente 30,5 kJ de energia, o mesmo que é consumido com a ligação do enxofre com o ácido graxo. Portanto, se ocorrer apenas a quebra de um ATP, a energia livre dessa reação seria próximo a zero e a direção que essa reação toma dependerá das concentrações dos reagentes e produtos. Como fazer para garantir que essa reação seja irreversível dentro da célula no sentido de ligar a Coenzima A ao ácido graxo? O esquema adotado é o mesmo que ocorre em várias reações do metabolismo e consiste no seguinte: no ATP estão presentes três fosfatos e na reação de ligação de Coenzima A ao ácido graxo é o fosfato gama que se liga ao carbono carboxila; dessa maneira temos o composto intermediário AMP-ácido graxo. Quando ocorre essa ligação é liberado o pirofosfato, ou seja dois fosfatos ligados. Até esse ponto da reação , uma ligação rica em energia foi clivada (entre os fosfatos do ATP) e uma ligação rica em energia foi realizada (entre o fosfato do AMP e o ácido graxo). A quebra da ligação fosfato entre o AMP e o ácido graxo libera energia suficiente para a ligação do enxofre da Coenzima A. Portanto, a quebra de uma ligação rica em energia permite a formação de outra, mas ainda não foi garantida a direção da reação, uma vez que uma ligação rica em energia foi desfeita e outra feita. A reação se torna irreversível dentro da célula, pois existe a enzima pirofosfatase inorgânica que, assim que o pirofosfato é formado, ele é clivado e outra ligação rica em energia é clivada. O resultado final dessa reação é que ocorreu a quebra de duas ligações ricas em energia e uma é feita; portanto a reação é irreversível dentro da célula e o ácido graxo ativado não é capaz de sair da célula. Veja essa reação na figura 2.

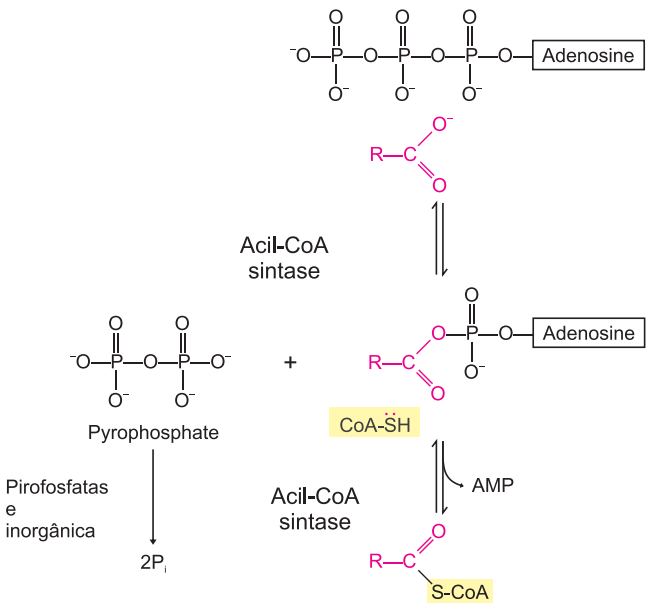


Figura 2- Mecanismo de ação da enzima acil-CoA sintase

5.3. OXIDAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO

5.3.1. ENTRANDO NA MITOCÔNDRIA

O ácido graxo é ativado no citoplasma e ele será oxidado dentro da mitocôndria. Surge aí um problema, pois o ácido graxo está ligado a Coenzima A, o que impede a entrada na mitocôndria, já que a população de Coenzima A do citosol não entra na mitocôndria nem o inverso ocorre.

A Coenzima A foi utilizada para ativar o ácido graxo, mas como fazer para entrar na mitocôndria sem que ele perca essa ativação? Para resolver esse problema existe um sistema de lançadeira realizado pela carnitina[1] (figura 3). Uma enzima (carnitina acil transferase I) presente na membrana interna da mitocôndria catalisa a quebra da ligação entre o ácido graxo e a Coenzima A, liberando-a no citosol. A liberação de energia ocorrida permite a ligação do ácido graxo à carnitina e o composto ácido graxo-carnitina entra na mitocôndria, onde uma segunda enzima (carnitina acil transferase II) catalisa a reação de transferência do ácido graxo ligado a carnitina para a ligação com uma Coenzima A mitocondrial e com a liberação de carnitina. Assim, o ácido graxo ligado a Coenzima A está dentro da mitocôndria onde ele será obrigatoriamente oxidado.

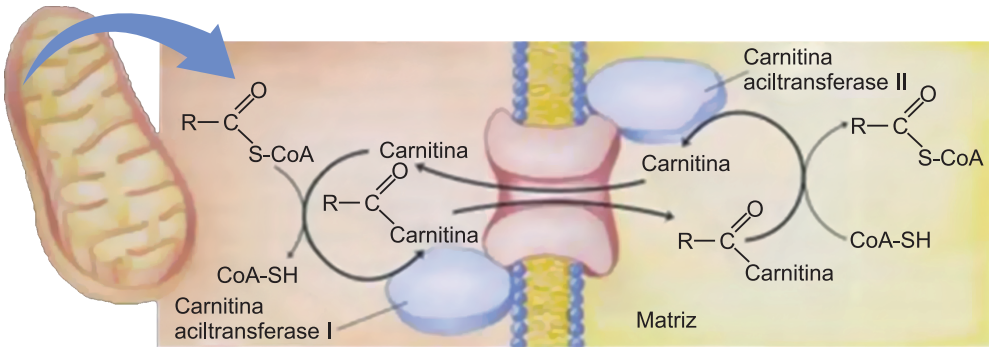


Figura 3 – Sistemama de lançadeira da Carnitia que permite a entrada do ácido graxo na mitocôndria.

5.3.2. A BETA OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

O processo de oxidação de ácidos graxos pode ser dividido em três fases: beta-oxidação, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. O ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa já foram estudados em Bases Moleculares I, portanto, iremos focalizar nessa aula o processo de beta-oxidação. Como vimos com a oxidação da glicose, o processo de obtenção de energia requer a retirada de elétrons do carbono e a transferência desses para aceptores finais o que leva a formação de CO_2. Os aceptores finais de elétrons podem ser o piruvato o que leva a formação de lactato, em um processo conhecido como fermentação; outro aceptor final é o oxigênio o que leva a formação de água. O aceptor final de elétrons na oxidação dos ácidos graxos é sempre o oxigênio e nunca ocorre

1 - ver em seu livro texto a fórmula da carnitina.

fermentação com os ácidos graxos.

Como vimos na aula 9 de Bases Moleculares I, a primeira reação do ciclo do ácido cítrico é a ligação do acetil-CoA (um molécula de dois carbonos associados a Coenzima A) com o oxalacetato o que leva a formação de citrato e a liberação de Coenzima A.

Um ácido graxo de 16 carbonos é capaz de gerar 8 moléculas de acetil-CoA se quebrássemos essa molécula de dois em dois carbonos. O problema é que nos ácidos graxos os carbonos estão ligados a hidrogênios e essa ligação é muito estável. Como podemos então facilitar essa quebra? No processo de beta oxidação ocorrerá a troca de uma ligação carbono hidrogênio por uma ligação C=O, o que torna o carbono instável e suscetível a ataques nucleofílicos que permitirão a quebra da molécula. Vamos ver passo a passo como isso ocorre (ver figura 4).

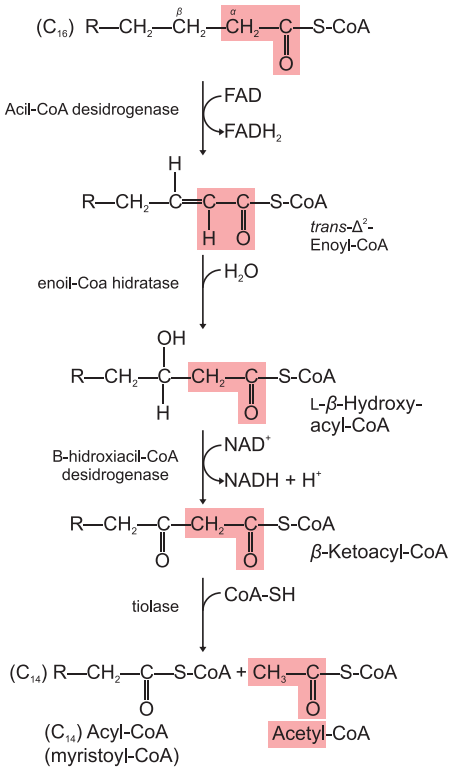


Figura 4 – reações de um ciclo da beta-oxidação.

Uma primeira reação é uma desidrogenação (oxidação) no qual dois hidrogênios são retirados de carbonos adjacentes. Dessa maneira, os carbonos realizam uma ligação dupla. Os hidrogênios retirados do ácido graxo são passados para o FAD que os levará para a cadeia transportadora de elétrons, onde eles serão levados até o oxigênio.

A segunda reação da beta-oxidação é uma hidratação, ou seja, uma molécula de água é inserida e dessa maneira a dupla ligação C=C é transformada em uma ligação H-C-C-O-H.

O penúltimo passo da beta-oxidação é uma nova desidrogenação em que dois hidrogênios são retirados o que leva a formação de uma dupla ligação C=O. Os hidrogênios retirados são passados para o NAD na forma de íon hidreto (hidrogênio com dois elétrons) e um próton H+ é liberado no meio. O NADH formado será regenerado na cadeia de transporte de elétrons, local onde o oxigênio é o receptor final dos elétrons.

Ao final desses três passos, o Carbono beta está fazendo uma dupla ligação com o oxigênio; assim, como o oxigênio é mais eletronegativo, o carbono fica deficiente em elétrons que estarão mais perto do núcleo do oxigênio. Como o carbono fica carente de elétrons, ele é susceptível ao ataque de moléculas que possuem elétrons desemparelhados. O enxofre presente na Coenzima A é capaz de atacar essa ligação e, assim, forma um ácido graxo de 14 carbonos ligado à Coenzima A e uma molécula de acetil-CoA (uma molécula de dois carbonos ligados à CoenzimaA). O acetil-CoA poderá ser oxidado completamente no ciclo

do ácido cítrico.

Um volta no processo de beta-oxidação formará um $FADH_2$, um NADH, um acetil-CoA e um ácido graxo menor em dois carbonos. A completa beta-oxidação de um ácido graxo de 16 carbonos ocorrerá após sete voltas desse ciclo de desidrogenação, hidratação, desidrogenação e clivagem feita por uma Coenzima A. No final desse processo, teremos a formação de 7 $FADH_2$, 7 NADH e 8 Acetil-CoA. Como vemos, nesse processo não houve a formação de ATP, mas onde está a energia do processo de oxidação de ácidos graxos? A energia desse processo está armazenada nos transportadores de elétrons e os ATPs serão formados na cadeia de transporte de elétrons. Como cada NADH forma 2,5 ATPs na cadeia de transporte de elétrons e o $FADH_2$ forma 1,5 ATPs, temos que, ao final, são formados 28 ATPs (17,5 pelos 7 NADH e 10,5 com os 7 $FADH_2$). Assim, a quantidade de ATPs formadas na beta oxidação é similar ao tanto que é produzido na oxidação completa da glicose.

As oitos moléculas de acetil-Coa poderão, ainda, serem oxidadas no ciclo do ácido cítrico o que levará a produção de mais 80 ATPs (faça as contas de onde esses ATPs são produzidos) em um total de 108 ATps. Como dois ATPs foram gastos para ativar o ácido graxo, quando este se liga a Coenzima A o saldo final é de 106 ATPs. Se dividirmos a quantidade de ATPs por carbono nas moléculas de ácido graxo e glicose vemos que o ácido graxo produz 6,6 ATPs por carbono (106/16), enquanto a glicose produz 5 ATps por carbono (30/6). Essa diferença existe porque o ácido graxo é mais reduzido que a glicose e, assim, pode ser mais oxidado que a glicose.

5.3.3. OS ÁCIDOS GRAXOS QUEIMAM NA FOGUEIRA DOS CARBOHIDRATOS

Como vimos acima, a oxidação dos ácidos graxos é feita em três etapas: a primeira é a beta-oxidação; a segunda é o ciclo do ácido cítrico; e a terceira é a cadeia de transporte de elétrons. A beta-oxidação irá produzir os NADH e $FADH_2$ que irão formar ATPs (28) na cadeia de transporte de elétrons, além disso, são formados 8 acetil-CoA que poderão ser oxidados no ciclo do ácido cítrico. Dessa maneira, a oxidação completa dos ácidos graxos irá depender do ciclo do ácido cítrico estar funcionando normalmente. Como vimos na aula 8 de Bases Moleculares I, o oxalacetato do ciclo do ácido cítrico poderá ser utilizado nas células do fígado para a produção de glicose, na via da gliconeogênese. Dessa maneira, na ausência da glicose, o acetil-CoA não é capaz de entrar no ciclo do ácido cítrico e ser oxidado, o que justifica a frase: “os ácidos graxos queimam na fogueira dos carbohidratos”.

5.3.4. FORMAÇÃO DE CORPOS CETÔNICOS

Se o ciclo do ácido cítrico não esta funcionando, o actil-CoA não será capaz de entrar no ciclo ao se ligar ao oxalacetato formando citrato e liberando a

coenzima A. Se essa reação não ocorre e a Coenzima A não é regenerada, o processo de beta-oxidação terá problema para prosseguir. O último passo da beta-oxidação é a clivagem que é feita pelo enxofre da Coenzima A. Como o número de Coenzima A é finito e se a mesma não é regenerada na primeira reação do ciclo do ácido cítrico, nas células que estão fazendo a gliconeogênese (como as do fígado, por exemplo) a beta oxidação seria interrompida pela falta de Coenzima A.

Mas se as células estão fazendo gliconeogenênese, qual é a fonte de energia que elas poderão usar para obter ATP? Nesse ponto, os ácidos graxos serão a fonte primária de energia através do processo de beta-oxidação. Se a Coenzima A não for regenerada, as células do fígado não terão como obter energia, então, o que acontece? Nessas condições, as células do fígado irão produzir os corpos cetônicos como forma de regenerar a Coenzima A e, assim, poder continuar a oxidar o ácido graxo.

Caso o acetil-CoA acumule dentro da célula, ocorrerá a reversão da última reação da beta-oxidação, ou seja, em vez de ocorrer uma clivagem ocorre uma condensação de dois acetil-CoA com a formação de acetoacetil-CoA (4 carbonos ligados a Coenzima A) e a liberação de uma molécula de Coenzima A. A próxima reação é catalisada pela enzima hidroximetilglutaril-CoA sintetase que une mais um acetil-CoA ao acetoacetil-CoA; dessa forma ocorrerá a formação de uma molécula de 6 carbonos (hidroximetilglutaril-CoA) e a liberação de mais uma Coenzima A. Por fim, a enzima hidroximetilglutaril-CoA liase irá quebrar a molécula formando acetoacetato (4 carbonos) e acetil-CoA (2 carbonos). Nesse processo ocorrerá a liberação de duas Coenzimas A que poderão voltar a serem utilizadas na beta oxidação.

O acetoacetato formado ainda contém energia que poderá ser utilizada por células nas quais o ciclo do ácido cítrico esteja funcionando. Assim, os corpos cetônicos serão liberados pelas células do fígado e serão utilizados pelas outras células. Os corpos cetônicos também têm que serem ativados e ao entrar na célula, os corpos cetônicos entram dentro da mitocôndria e lá serão ativados com a ligação de uma Coenzima A. Essa reação consiste na transferência da Coenzima A do succinil-CoA para o acetoacetato, o que forma acetoacetil-CoA e succinato. Essa transferência não consome componentes do ciclo do ácido cítrico, pois tanto o succinil-CoA quanto o succinato fazem parte dessa via. Essa transferência tem o gasto indireto de um ATP, uma vez que a reação de succinil-CoA a succinato leva a formação de um GTP (que depois formará um ATP), sendo que esse ATP não é sintetizado na transferência da Coenzima A do succinil-CoA para o acetoacetato. O acetoacetil-CoA será clivado em dois acetil-CoA que poderá entrar no ciclo do ácido cítrico e gerar energia nas células.

É muito comum em diabéticos não tratados a formação de corpos cetônicos, uma vez que essas pessoas terão a informação que não tem glicose e precisarão sintetizá-la. Dessa maneira, o fígado estará realizando a gliconeogênese e para obter energia é necessário que ele faça a beta-oxidação de ácidos graxos. Como o ciclo do ácido cítrico está bloqueado, pois está direcionado para a gliconeogênese, no fígado ocorrerá a formação dos corpos cetônicos que serão liberados na corrente sanguínea. Um processo espontâneo que ocorre com o

acetoacetato é a descarboxilação do mesmo, o que leva a formação de acetona e CO_2. Como a acetona é volátil, é muito comum que diabéticos não tratados possuem um cheiro *sui generis* devido à liberação da acetona.

5.4. SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

Até o momento, vimos como podemos obter energia dos ácidos graxos, a partir de agora iremos ver como o ácido graxo pode ser sintetizado em uma célula para ser armazenado como reserva.

A via de síntese de ácidos graxos será a reversão do processo de beta-oxidação, ou seja, teremos uma condensação, redução, desidratação e redução. Mas veremos abaixo que existem algumas diferenças que são importantes para o processo de síntese.

As células irão produzir ácidos graxos quando estiverem bem energeticamente e não estiverem mais precisando fazer a síntese de ATP. Por exemplo, quando um indivíduo come cinco pratos de macarrão, ele estará obtendo um excesso de glicose. Essa glicose entrará na via glicolítica, produzindo ATP e piruvato. O piruvato formará acetil-CoA que entrará no ciclo do ácido cítrico formando moléculas de NADH e $FADH_2$. Os carreadores de elétrons são levados para cadeia de transporte de elétrons e produzirá ATPs. Quando o nível de ATP está alto, isso impede a regeneração do NADH e do $FADH_2$ o que bloqueia o ciclo do ácido cítrico. O acetil-CoA formado reagirá com o oxalacetato e formará o citrato liberando a Coenzima A que permitirá a formação de mais acetil-CoA. Como o ciclo do ácido cítrico está bloqueado pela falta de NAD^+ e FAD, o citrato acumulado será exportado da mitocôndria e irá para o citosol.

O papel do citrato é muito importante para a síntese de ácidos graxos. Um dos precursores da síntese é o Acetil-CoA que é sintetizado na mitocôndria. Como vimos acima, temos dois grupos de Coenzima A, uma citosólica e uma mitocondrial, que não podem ser trocadas; portanto, o acetil-CoA formado na mitocôndria não pode ser exportado para o citosol. O citrato quando exportado para o citosol estará levando o acetil para o citosol. No citosol, a enzima citrato liase irá quebrar o citrato em oxalacetato e acetil-CoA com o gasto de um ATP.

Nesse momento, o precursor da síntese de ácido graxo (acetil-CoA) já está presente no citosol. Já vimos que a reação de condensação de dois acetil-CoA é factível, pois é o primeiro passo para a síntese de corpos cetônicos. Mas essa reação é reversível e não garante que a síntese de ácidos graxos irá mesmo ocorrer. Para garantir a síntese é realizado o mesmo processo que ocorre na gliconeogênese, ou seja, um passo de carboxilação seguido de descarboxilação com gasto de ATP garante o sentido de reação na direção da síntese.

A enzima malonil-CoA sintetase catalisa a reação de carboxilação do acetil-CoA a malonil-CoA com gasto de um ATP. Essa enzima também apresenta como cofator a biotina e ela é a responsável em se ligar ao CO_2 (na forma de bicarbonato) e transferi-lo para o acetil-CoA. Outro papel do citrato na síntese

dos ácidos graxos é o de ativador alostérico da enzima malonil-CoA sintetase. Este fato é interessante, pois a presença do citrato é um indicativo da presença do acetil-CoA no citosol e de que a síntese de ácidos graxos pode ocorrer.

A enzima ácido graxo sintase (ACP) é a responsável pela síntese de ácido graxo. Essa enzima é constituída por diferentes subunidades que farão o processo de condensação, redução, desidratação e redução. O primeiro passo é a transferência do malonil para a enzima. A ligação tio-ester entre a Coenzima A e o malonil é rompida e uma nova ligação tio-ester é realizada entre a enzima ACP e o malonil, sendo que na enzima está presente o ácido pantotéico que é a mesma molécula presente na Coenzima A, mas não apresenta o nucleotídeo Adenina.

O segundo passo da reação é a transferência do grupo acetil para a enzima com a liberação da Coenzima A. O acetil é transferido para uma cisteína que contém um enxofre no radical. Essas reações liberam a Coenzimas A que poderão participar na quebra do citrato e continuar a produção de acetil-CoA no citosol.

O passo seguinte é a ligação do malonil ao grupo acetil com a liberação de CO_2 e a formação de uma molécula de 4 carbonos. Após essa etapa de condensação, a molécula formada será reduzida, desidratada e reduzida novamente. Após esses passos, a molécula de 4 carbonos é transferida para o mesmo local que se encontrava o grupo acetil; dessa maneira o ácido pantotéico ligado a enzima fica livre e permite a ligação de uma nova molécula de malonil. Esta molécula de malonil irá se ligar à molécula de 4 carbonos com a liberação de CO_2 e a formação de uma molécula de 6 carbonos que irá ser reduzida, desidratada e reduzida. Esses passos irão se repetir algumas vezes até que uma molécula de água é capaz de desligar o ácido graxo da enzima. Todas essas reações são catalisadas pela mesma enzima que possui diferentes sítios catalíticos e o ácido pantotéico funciona como um braço que é capaz de levar o ácido graxo em formação aos diferentes sítios catliticos da enzima. (figura 5)

Os ácidos graxos são sintetizados no citosol, mesmo lugar em que a glicólise ocorre. Mas como um processo de redução (síntese de ácido graxo) pode ocorrer no mesmo lugar de um processo de oxidação (glicólise)? Vimos na aula 8 de Bases Moleculares I que para que a glicólise possa ocorrer é necessário a presença no citosol de uma molécula e que seja capaz de receber elétrons. Quem tem esse papel é o NAD^+ e a importância dessa molécula para a glicólise é reforçada pela fermentação, pois esta ocorre para que se possa regenerar o NAD^+ e para que a glicólise possa continuar. Portanto, a concentração de NAD^+ é alta no citosol para que possa ocorrer a oxidação da glicólise. Mas se não é o NADH que irá fornecer elétrons para redução dos ácidos graxos, quem o fará? No citosol também encontramos a presença das moléculas $NADP^+$/NADPH, sendo que a diferença entre essas moléculas e o NAD^+/NADH é a presença de um fosfato. Esse fosfato, que apresenta carga negativa, permitirá que as enzimas façam a distinção entre esses dois grupos de moléculas e, dessa maneira, é possível que no citosol tenhamos moléculas que permitem a oxidação (receber elétrons), o NAD^+, e moléculas que permitem a redução (doar elétrons), o NADPH.

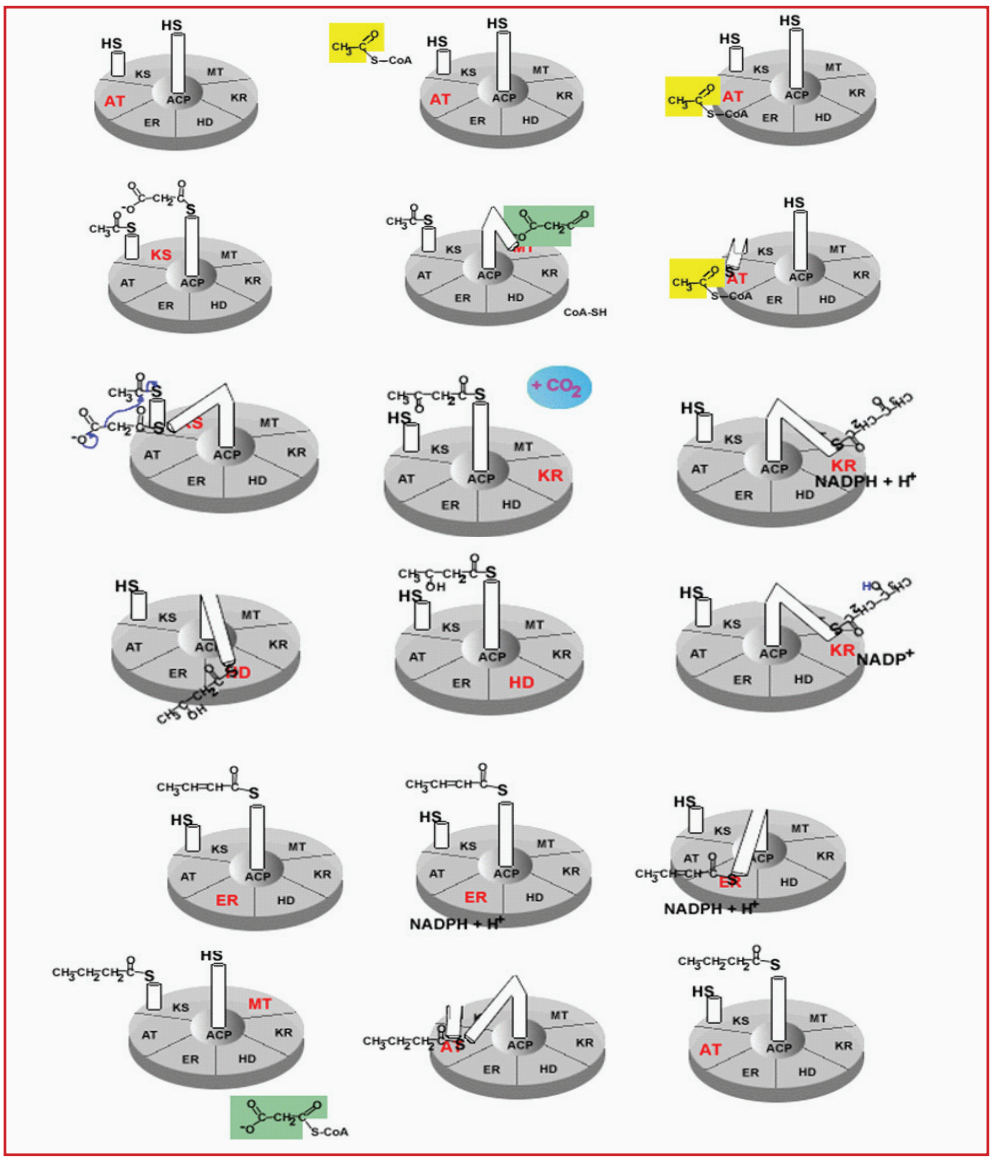


Figura 5 – Passos da síntese de ácidos graxos catalisados pela enzima ACP sintase.

O NADPH pode ser produzido no citosol por duas maneiras distintas. Na presença de glicose pode ocorrer a via das pentoses que levará a formação de NADPH. Nessa via a glicose é oxidada com a formação de duas moléculas de NADPH, além da formação de ribose (carboidrato de 5 carbonos) e liberação de uma molécula de CO_2. A ribose pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos, como veremos na próxima aula. Mas caso seja necessário a formação de mais moléculas de NADPH, a ribose pode ser convertida novamente em glicose[2]. A glicose gerada poderá passar novamente na via das pentoses e formar mais moléculas de NADPH, além de ribose e uma molécula de CO_2. Uma molécula de glicose poderá ser oxidada por seis vezes na via das pentoses, quando todos os seus carbonos serão oxidados a CO_2. Esse processo permitirá a formação de 12 moléculas de NADPH que poderão ser utilizadas na síntese de ácidos graxos.

2 - veja em seu livro base quantas riboses são necessárias para formar a glicose e como isso é feito.

O processo descrito acima irá ocorrer se o indivíduo tiver presente em sua dieta uma boa quantidade de carboidratos, mas o que pode ocorrer se a dieta do indivíduo for baseada em grande quantidade de proteínas? Veremos na próxima aula que os aminoácidos podem ser utilizados como fonte de energia e se ingeridos em excesso poderão levar a formação de ácidos graxos como forma de reserva energética. Os aminoácidos não podem passar pela via das pentoses; portanto, como pode ser sintetizado o NADPH que será utilizado para a síntese de ácido graxos?

O citrato que é levado para o citosol é clivado em acetil-CoA e oxalacetato. O acetil-CoA será utilizado para a síntese de ácidos graxos, mas o oxalacetato tem de retornar para a mitocôndria para que se possa continuar a formar mais citrato a partir dos acetil-CoAs, que são formados pela oxidação de carboidratos ou aminoácidos. O oxalacetato não consegue nem entrar nem sair da mitocôndria, pois não possui uma proteína de membrana que o reconheça e permita que se faça esse transporte. Como ele irá retornar? A volta do oxalacetato poderá ser feita de duas maneiras e dependerá da concentração de NADPH no citosol.

A primeiração reação que ocorre com o oxalacetato é a formação de malato. Essa reação é o inverso do que ocorre no ciclo do ácido cítrico e é muita favorecida quando o oxalacetato está em quantidade maior, pois é uma reação exorgânica que levará a liberação de energia. Ela só ocorre no sentido inverso na mitocôndria (de malato para oxalacetato) porque a concentração de oxalacetato é muito baixa no interior da mitocôndria. A reação de oxalacetato para malato é um processo de redução e, dessa forma, é necessário a presença de uma molécula que seja capaz de doar elétrons. Quem exerce esse papel é o NADH formado no citosol que normalmente está presente em boa quantidade em uma célula que está realizando a síntese de ácidos graxos (essa síntese só ocorre quando a célula está plena de energia).

Se a célula está cheia de NADPH no citosol que foi gerado na via das pentoses, o malato gerado no citosol será transportado para dentro da mitocôndria, onde será convertido a oxalacetato. O oxalacetato se unirá ao acetil-CoA para formar citrato, o qual será direcionado para o citosol onde formará acetil-CoA e oxalacetato. Esse ciclo continuará, o que permite o envio de acetil-CoA para o citosol para que possa ocorrer a síntese de ácido graxo. Mas quando o nível de NADPH esta baixo no citosol, o que ocorrerá?

Na ausência de NADPH citosólico, o malato gerado após a redução do oxalacetato será transformado em piruvato. Nessa reação de oxidação, catalisada pela enzima málica, ocorre a descarboxilação (saída de CO_2) do malato com a formação de piruvato e os elétrons retirados do malato são transferidos para o $NADP^+$, o que leva a formação do NADPH que será utilizado na síntese de ácidos graxos. O piruvato será transportado para dentro da mitocôndria e levará a formação de oxalacetato que irá se unir ao acetil-CoA para formação de citrato que sairá da mitocôndria. Esse ciclo irá continuar enquanto estiver ocorrendo a síntese de ácidos graxos. Os processos descritos acima são designados de lançadeiras e podem ser visualizados na figura a seguir.

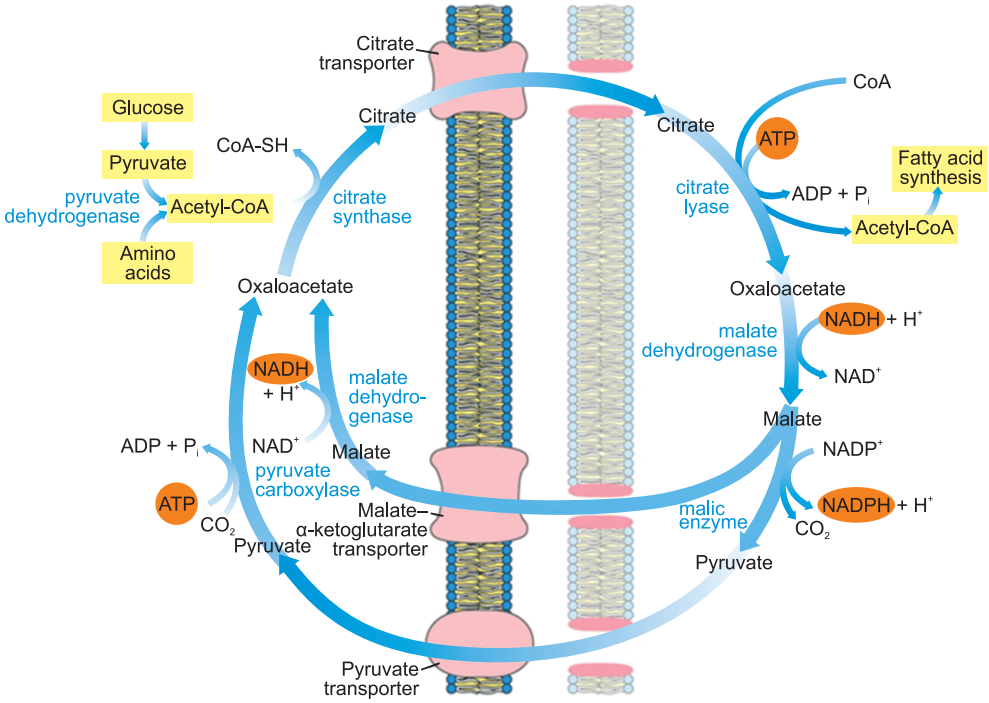


Figura 6 – Sistema de lançadeira oxalacetato-malato-piruvato que permite a formação de NADPH.

5.4.1. SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS MAIORES QUE 16 CARBONOS E INSATURADOS

A enzima ácido graxo sintase irá sintetizar na maioria das vezes ácidos graxos saturados com até 16 carbonos. Entretanto, existem ácidos graxos com maior número de carbonos e, também, ácidos graxos que possuem insaturações, ou seja, que apresentam ligações duplas entre os seus carbonos. Como estes são sintetizados?

A síntese de ácidos graxos com mais de 16 carbonos é realizada por uma enzima que possui os mesmos sítios catalíticos da ACP sintase; entretanto, elas só fazem um único ciclo de condensação, redução, desidratação e redução. A enzima reconhece o malonil e o liga a um ácido graxo de 16 carbonos. Após a ligação do malonil à molécula de 16 carbonos há a formação de uma molécula de 18 carbonos e a liberação de uma molécula de CO_2. Os NADPH são utilizados para reduzir a molécula e a enzima está presente no retículo endoplasmático rugoso. Outras enzimas similares irão fazer o alongamento das moléculas da mesma maneira que a anterior, ou seja, um ciclo por vez.

A dessaturação dos ácidos graxos é realizada pelas enzimas dessaturases e permitirá a formação de ácidos graxos com ligações duplas entre os carbonos. Essas enzimas são conhecidas como oxidases de função mista. O processo de dessaturação consiste na retirada de dois hidrogênios de carbonos adjacentes que irão fazer a ligação dupla. Qual o destino dos hidrogênios? Nas enzimas oxidases de função mista, o receptor para os hidrogênios é o oxigênio (O_2) o que levará a formação de água. O que acontece com o outro oxigênio da molécula?

Ele também tem que ser transformado em água, pois se não, poderá formar espécies ativas de oxigênio que poderão causar lesões na célula. Para evitar este problema, no processo de dessaturação são formadas duas moléculas de água. A primeira é formada pela união dos dois hidrogênios que foram retirados do ácido graxo, enquanto que a outra molécula de água é formada com hidrogênios que são doados por uma molécula de NADPH. Esses hidrogênios irão passar por uma cadeia de transporte de elétrons similar a que é verificada na mitocôndria, porém mais simples. As células humanas são capazes de realizar apenas uma dessaturação, entretanto, utilizamos ácidos graxos poliinsaturados para síntese de alguns compostos. Dessa maneira, é essencial a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados na dieta. As plantas são as fontes desse tipo de ácido graxo, pois elas possuem enzimas que são capazes de realizar a poli-insaturação.

5.5. SÍNTESE DE TRIACILGLICEROL

Os ácidos graxos sintetizados poderão ser utilizados para armazenamento nos triacilglicerois. Logo após a síntese, os ácidos graxos são ativados pela ligação com a Coenzima A, assim como descrito acima para os ácidos graxos que entram na célula. A enzima que catalisa a ativação dos ácidos graxos não distingue aqueles formados na célula daqueles que são obtidos a partir do sangue.

Os ácidos graxos ativados serão ligados a uma molécula de glicerol, sendo que esta está ativada com um fosfato formando glicerol-3-fosfato. O primeiro passo da síntese do triacilglicerol é a ligação de uma molécula de acil-CoA ao carbono 1 do glicerol-3-fosfato com a liberação da Coenzima A. O segundo passo é a ligação de uma outra molécula de ácido graxo ao carbono 2 do glicerol 3 fosfato com a liberação de Coenzima A. O composto formado é o fosfodidato que poderá seguir duas vias distintas, pois ele participa tanto da síntese de lipídeos de membrana quanto da síntese de triacilglicerol.

Para formar o triacilglicerol, o fosfato do carbono três do fosfadidato é clivado o que leva a formação do diacilglicerol. O final da síntese do triacilglicerol é a ligação de um terceiro ácido graxo no carbono três do diacilglicerol com a liberação de mais uma Coenzima A. O triacilglicerol formado poderá ser armazenado.

5.6. REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO E SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

Será que vale a pena degradar ácidos graxos em uma célula que está os sintetizando? A célula só irá sintetizar ácidos graxos quando estiver bem energeticamente, ou seja, com níveis altos de ATP, NADH, $FADH_2$ e NADPH;

portanto, nesse momento, não há a necessidade degradar ácidos graxos. Como a célula controla esses processos?

Um dos precursores da síntese dos ácidos graxos é o malonil-CoA e este composto é capaz de inibir a enzima carnitina-acil transferase I. Essa enzima é fundamental para a transferência do ácido graxo do citosol para a mitocôndria, onde este será degradado. Portanto, enquanto estiver ocorrendo a síntese de ácido graxo estará ocorrendo a formação de malonil-CoA que irá impedir a transferência de ácidos graxos para a mitocôndria, impedindo, assim, a degradação dos mesmos. Na ausência de síntese de ácidos graxos, não ocorrerá a formação de malonil-CoA e, assim, a enzima carnitina-acil transferase I estará ativa e permitirá a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria e a conseqüente oxidação dos mesmos.

A síntese dos ácidos graxos é regulada ou podemos fazer o acúmulo de reserva infinitamente? A síntese de ácido graxo só é possível enquanto somos capazes de utilizá-los, seja para a síntese de lipídeos de membrana, seja para a síntese de triacilglicerol. Quando estamos saturados destes compostos começará a ocorrer o acúmulo de ácidos graxos ligados a Coenzima A (acil-CoA) e estes irão regular a atividade da enzima aceti-CoA carboxilase que irá catalisar a formação de malonil-CoA.

Se o indivíduo comeu cinco pratos de macarrão, as células desse indivíduo irão absorver muita glicose que irá ser oxidada a acetil-CoA e que permitirá a formação de ácidos graxos. Quando a quantidade de ácidos graxos já for o suficiente e este processo for inibido, irá ocorrer o acúmulo de citrato no citosol. O citrato irá inibir a quebra da glicose e, assim, irá sobrar glicose na célula e, dessa forma, a célula não será mais capaz de absorver glicose.

A síntese de ácido graxo também é regulada pelos hormônios glucagon e insulina. O glucagon, como vimos na aula 10 de Bases Moleculares I, atua em uma cascata de sinais que irá levar a fosforilação das enzimas alvos. A presença de glucagon indica que há a necessidade de síntese de glicose e, portanto, não é conveniente que a célula gaste energia com a síntese de ácidos graxos. Dessa forma, a cascata de sinais induzida pelo glucagon irá fosforilar a enzima acetil-CoA carboxilase e, assim, irá inibir a síntese de ácidos graxos. Com a ausência da síntese de ácidos graxos não ocorrerá a formação de malonil-CoA e, assim, a degradação de ácidos graxos poderá fornecer os ATPs necessários para a síntese de glicose.

Por outro lado, a presença de insulina indica o excesso de glicose e, portanto, é uma indicação que a célula poderá fazer a síntese de ácidos graxos. A cascata de sinais induzida pela insulina irá levar a desfosforilação da acetil-CoA carboxilase com a conseqüente ativação da síntese de ácidos graxos.

5.7. SÍNTESE DE COLESTEROL

O colesterol é um lipídeo essencial para os seres humanos e se ele não é obtido na dieta será sintetizado pelas células do fígado. O colesterol é encontrado

nas membranas biológicas e é precursor de hormônios esteróides, como a testosterona. Além disso, o colesterol é importante para a síntese de vitamina D e sais biliares.

A síntese do colesterol pode ser dividida em grandes etapas: no primeiro momento temos a síntese de mevalonato a partir de acetil-CoA; no segundo passo, temos a transformação de mevalonato em isopropenóides ativados que permitirão a síntese do escaleno. Essas etapas estão presentes em diferentes organismos e a partir do escaleno diversas reações ocorrem para a formação do colesterol nos animais.

Como vimos acima, a síntese do colesterol inicia-se a partir do acetil-CoA e, dessa maneira, uma alimentação rica em carboidratos, lipídeos ou aminoácidos permitirá a formação de acetil-CoA que poderá levar a formação de colesterol. Como veremos, o custo para a síntese de colesterol é alto e dessa maneira a célula só sintetizará essa molécula quando estiver bem energeticamente. Igual na síntese de corpos cetônicos, o acúmulo de acetil-CoA permitirá a formação de acetoacetil-CoA com a liberação de uma Coenzima A. Após essa etapa, a enzima hidroximetilglutaril-CoA sintase irá catalisar a formação do hidroximetilglutaril-CoA que é a adição de mais uma molécula de acetil-CoA ao acetoacetil-CoA com a liberação de uma Coenzima A. Até esse ponto a via de formação de corpos cetônicos e colesterol são idênticas e é a partir desse ponto que elas se diferenciam.

Na via de formação do colesterol o hidroximetilglutaril-CoA é reduzido a mevalonato com o gasto de duas moléculas de NADPH. Essa reação é catalisada pela enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase e é o ponto chave da regulação da via da síntese de colesterol (veja no boxe 1 o papel dessa enzima no tratamento de pessoas com colesterol alto).

A partir do mevalonato ocorrerá a formação dos isopropenos ativados. A primeira reação é a fosforilação do mevalonato com o gasto de um ATP. O cinco-fosfomevalonato é novamente fosforilado com o gasto de mais um ATP para a formação do 5-pirofosfomevalonato. Por fim, um terceiro ATP é gasto para formar o 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato. Esse intermediário é instável e rapidamente ocorre a saída do grupamento fosfato com a concomitante saída de um grupo carboxila. Dessa maneira, obtemos uma molécula com cinco carbonos ativada pela presença de duas ligações fosfato rica em energia (pirofosfato) que é o isopetenil pirofosfato.

A partir dos isopropenóides ativados passamos a síntese do escaleno que consistirá na junção de 6 moléculas de isopropenóides ativados. Inicialmente, uma reação de isomerização ocorre e transforma o isopetenil pirofosfato em um dimetilalilpirofosfato. O próximo passo é a união de um dimetilalilpirofosfato com um isopetenil pirofosfato; essa reação gera geranil pirofosfato (10 carbonos) e um prifosfato é liberado que será rapidamente clivado pela enzima pirofosfatase inorgânica. Uma molécula de 15 carbonos (farnesil pirofosfato) será formada com a união do geranil pirofosfato com uma molécula de isopetenil pirofosfato. Essa união é feita com a ligação cabeça de uma molécula com a cauda de outra; dessa maneira um pirofosfato é liberado e é imediatamente clivado pela pirofosfatase inorgânica. A formação do escaleno é um processo

de redução que utiliza o NADPH e leva a ligação cabeça com cabeça de duas moléculas de farnesil pirofosfato. Como a ligação para síntese de escaleno é realizada cabeça-cabeça, duas moléculas de pirofosfato são liberadas e clivadas, o que torna a reação exorgânica.

Uma reação importante que ocorre com o escaleno é a inserção de um oxigênio na molécula. Essa reação é catalisada por uma enzima com atividade de oxidase de função mista similar ao que vimos no processo de dessaturação de ácidos graxos. Nessa reação um oxigênio é inserido na molécula e o outro é transformado em água através de uma cadeia de transporte de elétrons na qual o NADPH é o doador de elétrons.

O escaleno oxidado é a base para a síntese de diferentes compostos. Em plantas, várias reações levarão a transformação do escaleno no estigmasterol, o correspondente vegetal para o colesterol. Em fungos, diversas reações irão transformar o escaleno no ergosterol e, por fim, nos animais o escaleno é transformado em colesterol. São mais de 27 reações que ocorrem em animais para formação do colesterol, entre estas reações ocorrem várias para o fechamento dos anéis encontrados nessa molécula.

5.8. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE COLESTEROL

Como vimos a produção de colesterol é muito custosa, pois para a síntese de cada isopreponide ativado são gastos três moléculas de ATP. Como são gastos seis isopropenóides para a formação do escaleno, o total de ATPs gasto até esse estágio é de dezoito ATPs. Devido a seu alto custo energético, a síntese de colesterol é regulada e só ocorrerá quando houver necessidade. Por exemplo, se a alimentação do indivíduo for rica em colesterol, a síntese dessa molécula será inibida. A enzima chave nesse processo é a hidroximetilglutaril-CoA redutase que é regulada tanto alostericamente quanto por ação hormonal. Um intermediário da síntese do colesterol e o próprio colesterol são capazes de se ligar a enzima e diminuir sua atividade. Além da regulação alostérica, a enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase também responde a ação dos hormônios insulina e glucagon. Na ausência de glicose no organismo, o glucagon é liberado e indicará a necessidade de síntese dessa molécula. Dessa maneira, a célula irá evitar o gasto energético de síntese de outras moléculas e a presença do glucagon irá disparar uma cascata de sinais que levará a fosforilação de diferentes enzimas. Uma das enzimas alvos é a hidroximetilglutaril-CoA redutase que ficará inativa quando fosforilada. Por outro lado, a presença da insulina é um indicativo da presença de glicose que poderá fornecer energia e precursores para a síntese de diferentes compostos. A presença da insulina disparará uma cascata de sinais que levará a desfosforilação de enzimas alvo, entre as quais encontramos a hidroximetilglutaril-CoA redutase. Essa enzima quando desfosforilada estará ativa e promoverá a síntese de colesterol.

5.9. AS APOLIPOPROTEÍNAS

O colesterol é sintetizado principalmente no fígado e tem de ser utilizado por diferentes células; portanto, como ele será transportado uma vez que ele não é solúvel no sangue? A estratégia adotada será similar ao que é realizada no intestino quando os lipídeos obtidos na dieta são transportados em uma micela que é o quilomicron. As células do fígado produzem vários tipos de lipídeos, tais como: lipídeos de membrana, triacilglicerol e colesterol. Todos esses lipídeos têm de ser transportados para as outras células e isso será feito através de micelas, as apolipoproteínas.

A primeira apolipoproteína é o VLDL (do inglês *very low density lipoprotein* – lipoproteína de muito baixa densidade) que transporta o triacilglicerol, colesterol e lipídeos de membrana. Na VLDL, o triacilglicerol é o lipídeo mais presente. Assim como o quilomicron, esta micela possui a proteína apoCII que é capaz de ativar lípases que estão presentes no endotélio. Essas lípases irão clivar os triacilglicerois em ácidos graxos e glicerol que poderão ser absorvidos pelas células do organismo.

Com a liberação do triacilglicerol, essas micelas vão aumentando a quantidade proporcional de colesterol e passam a serem denominadas de IDL (do inglês *intermediary density lipoprotein* – lipoproteína de densidade intermediária). As IDLs serão transformadas em LDL (do inglês *low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade) quando as proteínas apoCII e apoCIII são retiradas da micela. A LDL apresenta um aumento na quantidade proporcional de colesterol quando comparada a VLDL, uma vez que essa última quando saí do fígado é rica em triacilglicerol. O VLDL liberará o triacilglicerol para as células e dessa maneira essas micelas irão diminuindo e a quantidade de colesterol, apesar de ser a mesma daquela que saiu do fígado, estará proporcionalmente maior no LDL (com pouco triacilglicerol) do que no VLDL.

O LDL é o transportador de colesterol para as células. Essa micela, além de possuir colesterol e lipídeos de membrana, possui a proteína ApoB100 que é importante para manter a integridade da micela e também terá papel fundamental para o transporte do colesterol. As células que necessitam de colesterol terão em suas membranas um receptor para o LDL e esse receptor é capaz de interagir e reconhecer a proteína ApoB100. Quando ocorre o reconhecimento da LDL pelo receptor, a apoliproteína sofre endocitose. Os receptores são então reenviados para a membrana celular e o endossomo contendo o LDL é associado com um lisossomo que irá degradar a apolipoproteína com a liberação de aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos de membrana e o colesterol. Quando a célula está com um nível adequado de colesterol, ela para de expor o receptor de LDL na superfície e, dessa maneira, a célula não mais irá capturar LDLs.

Quando existe um excesso de LDL no sangue, estes poderão ser absorvidos por macrófagos que estão presentes na parede do endotélio. O acúmulo de colesterol nessas células pode levar ao entupimento das artérias causando problemas cardíacos. O excesso de LDL pode ter diferentes causas, tais como: excesso de alimentação, obesidade, síndrome metabólica ou deficiência no receptor de LDL. Um caso extremo de problemas no receptor de LDL é

a doença hipercolosteremia familiar que está relacionada com a ausência do receptor. As pessoas portadoras dessa doença apresentam acúmulo de LDL que serão capturados pelos macrófagos (usam receptores diferentes) da parede do endotélio. Esse processo levará ao desenvolvimento de doenças coronárias e, normalmente, indivíduos portadores dessa doença falecem precocemente (ao redor de 25 anos) devido a problemas cardíacos.

Outra apolipopreteína importante é a HDL que terá papel fundamental na regulação do nível de colesterol e das próprias apolipoproteínas. O HDL é sintetizado pelo fígado e sai como uma micela vazia que terá a missão de capturar o excesso de colesterol. O HDL irá até os macrófagos presentes na parede do endotélio e serão capazes de absorver o colesterol que está presente nessas células. O HDL levará este colesterol para o fígado, onde este poderá ser transformado em sais biliares que serão mandados para o intestino onde auxiliarão na digestão dos lipídeos. Por essa sua função o HDL é conhecido como bom colesterol, enquanto o LDL é considerado o mau colesterol. Além de atuar na regulação do nível de colesterol, o HDL tem função importante de regular o nível das apolipoproteínas. O LDL é importante para transportar o colesterol para as células e, por essa razão, o nível de LDL não pode ser muito baixo. O HDL é o responsável por manter um nível adequado de LDL, pois ele é capaz de interferir nos níveis das apolipoproteínas. Por exemplo, se existe um nível elevado de VLDL e um nível baixo de LDL, o HDL será capaz de retirar os triacilglicerois do VLDL e ao mesmo tempo passa colesterol para essa molécula. Por fim, para transformar VLDL em LDL, o HDL irá retirar algumas proteínas presentes no VLDL (apoCII, apoCIII e apoE) e, assim, o VLDL é transformado em LDL.

Portanto, nessa aula vimos como a célula é capaz de sintetizar e degradar diferentes lipídeos, tais como ácidos graxos e colesterol. Além disso, vimos como é regulado esse processo e qual o papel das apoliproteínas e da soroalbumina no transporte dos lipídeos.

O tratamento da hipercolorolostemia

O nível de colesterol está intimamente associado com diversos problemas coronários e, em virtude disso, o tratamento da hipercolorostemia é um grande problema de saúde pública. O nível de colesterol pode ser controlado adequadamente com uma dieta balanceada. Entretanto, em alguns casos a dieta não é suficiente para diminuir os níveis de colesterol. Por exemplo, pessoas que não apresentam níveis adequados de receptores de LDL não serão capaz de diminuir a quantidade dessa apoliproteína no sangue e, portanto, uma dieta não será o suficiente para diminuir o nível de colesterol. Para essas pessoas, além da dieta, é recomendado o uso de medicamentos que inibem a síntese de colesterol. Esses medicamentos têm como alvo a enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase que é a enzima chave na síntese de colesterol. A maioria dos medicamentos utilizados hoje são inibidores competitivos dessa enzima, mas curiosamente esses inibidores são parecidos com o produto dessa reação (mevalonato) e não com o substrato (hidroximetilglutaril-CoA). Isso ocorre devido ao fato do hidroximetilglutaril-CoA ser substrato tanto para a síntese do colesterol como para a síntese de corpos cetônicos e, portanto, se fosse utilizado inibidor similar ao substrato estaríamos interferindo em dois processos distintos que levaria o medicamento a ter muitos efeitos colaterais. O uso de um inibidor similar ao produto faz que com esse só seja capaz de interagir com a enzima da síntese de colesterol sem interferir com a síntese de corpos cetônicos.

Complemento da aula:

- No moodle vocês encontrarão algumas animações sobre os temas discutidos nessa aula.
- Além disso, diferentes figuras estão a disposição para maior compreensão da aula.

Autoavaliação:

1) Por que o ácido graxo é ativado com CoA no citosol, se assim ele não pode entrar na mitocôndria? Como é garantida a irreversibilidade dessa reação?
2) Por que o fígado não é capaz de utilizar os corpos cetônicos?
3) Quais as diferenças entre a síntese e a degradação dos ácidos graxos?
4) Quais os papeis do citrato na síntese dos ácidos graxos?
5) Qual o papel do CO_2 na síntese do ácidos graxos? Onde ocorre algo semelhante?
6) Como pode ser formado os NADPH utilizados na síntese de ácidos graxos?
7) Como é feita a insaturação dos ácidos graxos?
8) Como é sintetizado o triacilglicerol?
9) Como ocorre a regulação na síntese e degradação dos ácidos graxos?
10) Como é sintetizado o colesterol?
11) Onde atua a lovastantina que é utilizada para diminuir o colesterol?
12) Discuta os diferentes tipos de transportadores de lipídeos.

6 Metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos

AULA 6: METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E NUCLEOTÍDEOS

Ao final desta aula você deverá:

- Conhecer os mecanismos de degradação de aminoácidos e o ciclo da uréia.
- Conhecer o que são aminoácidos glicogênicos, cetogênicos, essenciais e não essenciais.
- Conhecer as funções e propriedades dos nucleotídeos.
- Entender os mecanismos de sínteses das purinas, pirimidinas e desoxiribonucleotídeos.

Na primeira parte dessa aula iremos discutir como a célula é capaz de obter energia a partir dos aminoácidos. E como o processo de obtenção de energia depende da oxidação de carbonos. Veremos, também, o que ocorre com os nitrogênios que estão presentes nos aminoácidos.

6.1. A OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos podem ser obtidos da dieta ou são frutos da degradação de proteínas. Como a função dos aminoácidos primários é a formação de proteínas, estes só serão usados para obtenção de energia quando todas as proteínas necessárias já tiverem sido sintetizadas e ainda ocorrer sobra de aminoácidos. É importante verificarmos que diferente do que ocorre com carboidratos e lipídeos, não existe reserva de aminoácidos, ou seja, não existe uma proteína que sirva para armazenar aminoácidos para serem utilizados como fonte de energia. Caso exista excesso de aminoácidos em uma célula, eles serão oxidados e poderão ser armazenados na forma de glicose ou lipídeos como veremos adiante.

6.1.1. O PROCESSO DE TRANSAMINAÇÃO

Como nos lembramos da aula sobre aminoácidos de bases moleculares I, estas moléculas são compostas por um carbono alfa, um grupo carboxila, um grupo amina, um hidrogênio e um radical. Até agora, vimos como as células são capazes de obter energia de lipídeos e carboidratos e nos dois casos ocorre a oxidação dos carbonos até a formação de CO_2 e água. Tanto para oxidar a glicose, como os ácidos graxos, ocorre a formação de acetil-CoA que será oxidado no ciclo do ácido cítrico. O mesmo processo é utilizado para obter energia dos aminoácidos,

pois o metabolismo desses irá formar aceti-CoA ou componentes do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, na estrutura dos aminoácidos existe a presença de pelo menos uma molécula de nitrogênio que não pode ser oxidada. Mas o que acontece com o nitrogênio?

Como só oxidamos os carbonos presentes nos aminoácidos, o nitrogênio presente nessas moléculas tem de ser retirado. Nesse ponto surge um problema sério, pois quando a ligação do grupamento amina é rompida existe a formação de amônia (NH_4^+) que é tóxica para a célula. As razões da toxidade da amônia não estão plenamente estabelecidas, mas acredita-se que o acúmulo de amônia pode interferir no balanço adequado dos níveis de aminoácidos.

Devido à toxidade da amônia, os organismos desenvolveram mecanismos de descarte deste composto que está relacionado com o ambiente em que estes vivem. Por exemplo, organismos que vivem na água podem excretar diretamente a amônia, pois esta acaba diluída no meio aquoso e não traz danos ao organismo. Entretanto, os organismos terrestres desenvolveram mecanismos de excreção que dependem da quantidade de água que eles têm à disposição. Alguns animais excretam a amônia na forma de uréia que é eliminada com a água na urina; entretanto, alguns animais não podem ter perda de água e para evitar isso eles eliminam a amônia na forma de ácido úrico, o qual é eliminado em uma forma pastosa com mínima quantidade de água. Mas independente da forma de excreção, todos os organismos irão eliminar a amônia.

Mas se a amônia é tóxica como podemos controlar o processo de desaminação (processo de retirada de grupamentos aminas dos aminoácidos)? Como temos vinte aminoácidos primários, poderíamos pensar em vinte enzimas que fossem capazes de fazer esse processo, cada uma reconhecendo um aminoácido específico. Esta abordagem traria um grande problema para a célula, uma vez que essas teriam de regular vinte enzimas diferentes para controlar o nível de amônia. Qualquer problema nessas enzimas poderia trazer sérios problemas para a célula relacionado ao nível de amônia presente. Para diminuir os riscos presentes no processo de desaminação, as células adotam o processo de transdesaminação que consiste em uma primeira etapa de transaminação (transferência de grupos aminas), seguida de uma etapa de desaminação (retirada do grupo amina com formação de amônia). Dessa forma, as células irão canalizar os grupamentos amina para poucos aminoácidos e só estes sofreram o processo de desaminação.

A enzima envolvida no processo de tramsaminação levará a transferência do aminoácido para um alfa-cetoácido o que formará outro aminoácido e um alfa-cetoácido. Esse fato nos mostra que um alfa-cetoácido é um aminoácido desaminado. Por exemplo, a alanima aminotransferase irá tirar o grupo amina da alanina o que forma o piruvato e depois transfere o grupamento amina para o alfa-cetoglutarato formando o glutamato. A enzima aspartato aminotransferase irá tirar o grupo amina do aspartato formando o oxalacetato e, depois, o grupamento amina é transferido para o alfa-ceglutarato formando glutamato.

Portanto, todas as enzimas aminotransferases atuam da seguinte forma: na primeira reação, o aminoácido será desaminado e formará um alfa-cetoácido;

depois, o grupo amina que ficou ligado a enzima é transferido para um alfa-cetoácido que é sempre o alfa-cetoglutarato, o que forma o aminoácido glutamato. Este tipo de reação é denominado de ping-pong, pois pode ser dividida em duas etapas distintas.

O cofator das transaminases é o pirodoxal fosfato e é neste cofator que ficará ligado o grupamento amina. O maior problema para retirar o grupamento amina é que, durante esse processo, desfazemos uma das ligações que o carbono está fazendo e, dessa maneira, este carbono fica com um elétron sobrando (carbonion), que será muito instável, o que o levaria a ligar ao grupamento amina novamente. O papel do pirodoxalfosfato é estabilizar o carbonion e permitir que a reação ocorra (veja na figura 1 como atua o pirodoxal fosfato nas enzimas transaminases). O primeiro passo da reação é a ligação do aminoácido, via grupamento amina, ao pirodoxal fosfato. Após essa etapa, o hidrogênio ligado ao carbono alfa é liberado, o que forma um carbonion, o qual é estabilizado pela migração do elétron para o anel do pirodoxal fosfato que tem carga positiva. Dessa maneira, podemos ter dois estados presentes na enzima:

1. O aminoácido pode estar ligado ao pirodoxal fosfato com o carbono alfa com um elétron sobrando e,

2. O carbono alfa fazendo uma dupla ligação com o grupamento amina que está ligado ao pirodoxal fosfato.

O próximo passo da reação é a estabilização do estado 2 da enzima, ou seja, o carbono alfa fazendo uma dupla ligação ao grupamento amina que está ligado ao pirodoxal fosfato. Essa estabilização ocorre pela ligação de um próton H^+ ao pirodoxal fosfato que estabiliza o elétron que migrou para essa molécula. O último passo da primeira etapa é a liberação do alfa-cetoácido com o grupamento amina ficando preso na enzima. Isso ocorre com a participação de uma molécula de água que irá se ligar ao carbono alfa ficando o grupamento amina ligado ao pirodoxal fosfato e, assim, o alfacetoácido é liberado.

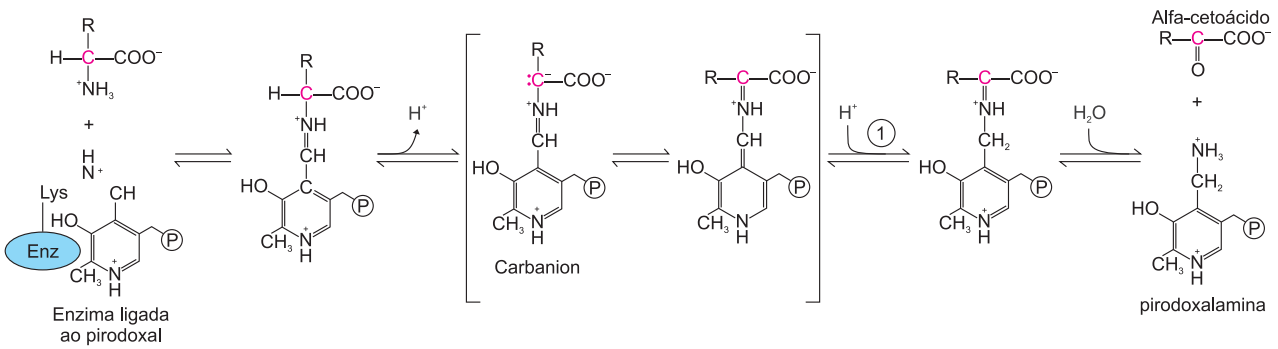


Figura 1 – mecanismo de ação das enzimas transaminases

Os próximos passos dessa reação é a transferência do grupamento amina para uma alfa-cetoácido, no caso o alfa-cetoglutarato. As reações são exatamente o inverso do que ocorreu até este momento. O alfa-cetoglutarato se liga ao grupamento amina que está preso no pirodoxal fosfato com a liberação de

uma molécula de água. Depois ocorre a saída de um próton H^+, o que permitirá que a ressonância volte a acontecer. Essa ressonância permitirá a formação do carbonion que irá se ligar a um próton H^+. O último passo dessa reação é a liberação do aminoácido formado (glutamato).

Após o processo de transaminação teremos todos os grupamentos amina concentrados no glutamato e os diferentes alfa-cetoácidos gerados poderão ser utilizados para obtenção de energia. Por exemplo, quando a alanina sofre transaminação irá formar o piruvato que pode formar o acetil-CoA que será oxidado no ciclo do ácido cítrico. Quando o aspartato é transaminado, irá formar o oxalacetato componente do ciclo do ácido cítrico onde ele será oxidado.

O processo de transaminação ocorrerá em todas as células e, dessa maneira, todas as células terão capacidade de obter energia da oxidação de aminoácidos. Entretanto, o processo de desaminação ocorre apenas no fígado e, portanto, o glutamato gerado nas células deverá ser encaminhado para as células do fígado. O glutamato apresenta no seu radical um grupo carboxila (COO^-) com carga negativa e moléculas com carga não conseguem sair da célula sem que haja um transportador. Então, como o glutamato será transferido para as células do fígado? Esse processo pode ser feito de duas formas distintas e que dependerá do tipo de célula e dos compostos disponíveis.

O primeiro processo ocorre na maioria das células e consiste na formação de um outro aminoácido, a glutamina. Com o acúmulo de glutamato teremos a formação de glutamamina, uma reação que será catalisada pela glutamina sintase. Nessa reação um glutamato é ativado com uma ligação fosfato que formará o intermediário glutamil-fosfato. Essa fosforilação ocorrerá com o gasto de uma molécula de ATP que será quem transferirá um grupamento fosfato para o glutamato com a formação de ADP (adenosina difosfato). A partir do glutamil-fosfato será formado a glutamina, uma vez que ocorre a transferência de um grupo amima de um glutamato para o glutamil-fosfato, formando a glutamina e liberando fosfato e o alfa-cetoglutarato. O alfa-cetoglutarato gerado poderá voltar a participar dos processos de transaminação.

A necessidade de fosforilar uma molécula antes de ocorrer o processo de ligação de um grupo amina será recorrente como poderemos ver ao longo dessa aula. Isso ocorre, pois a ligação carbono-nitrogênio tem mais energia que a ligação carbono-oxigênio e, portanto, para que essa troca possa ocorrer é necessário o gasto de energia que virá pela ligação fosfato rica em energia.

A glutamina gerada nesse processo poderá ser enviada para as células do fígado para que possa ocorrer o processo de desaminação. A glutamina é um bom transportador de amina, pois ela carrega dois grupos aminas, uma no radical e outra ligada ao carbono alfa.

O segundo mecanismo de transporte de grupamentos aminas ocorre nas células musculares. As células musculares podem produzir uma grande quantidade de piruvato caso esteja em atividade e podem estar utilizando os aminoácidos para tanto. Dessa maneira, iremos acumular nas células musculares glutamato e piruvato, os quais em excesso farão com que ocorra a reação inversa da trasaminação da alanina (reação catalisada pela alanina aminotransferase), ou

seja, o grupamento amina do glutamato é transferido para o piruvato formando alanina e alfa-cetoglutarato. O alfa-cetoglutarato gerado poderá continuar a atuar no processo de transaminações de outros aminoácidos. Por outro lado, a alanina gerada poderá ser encaminhada para o fígado, para onde irá transportar o grupamento amina e o piruvato. O piruvato no fígado entrará na gliconeogênese e a glicose gerada poderá ser enviada para o músculo para geração de energia.

6.1.2. O PROCESSO DE DESAMINAÇÃO

Os aminoácidos alanina e glutamina chegarão ao fígado trazendo os grupamentos aminas das diferentes células. A alanina nas células do fígado irá acumular o que levará a formação de glutamato e piruvato na reação que é catalisada pela alanina aminotransferase.

O glutamato e a glutamina irão sofrer o processo de desaminação na célula do fígado, mais especificamente nas mitocôndrias dos hepatócitos. A glutamina no fígado sofrerá um processo de desaminação, ou seja, a perda de um grupamento amina com a liberação de amônia e do glutamato e essa reação é catalisada pela enzima glutaminase.

O glutamato gerado nas diferentes aminotransferases e pela desaminação da glutamina entra na mitocôndria e sofrerá uma desaminação. A reação de desaminação é um processo oxidativo que levará a liberação de amônia, alfa-cetoglutarato e a formação de NAD(P)H. O NAD(P)H obtido pode ser regenerado na cadeia de transporte de elétrons que permitirá a formação de energia na forma de ATP.

6.1.3. O CICLO DA URÉIA

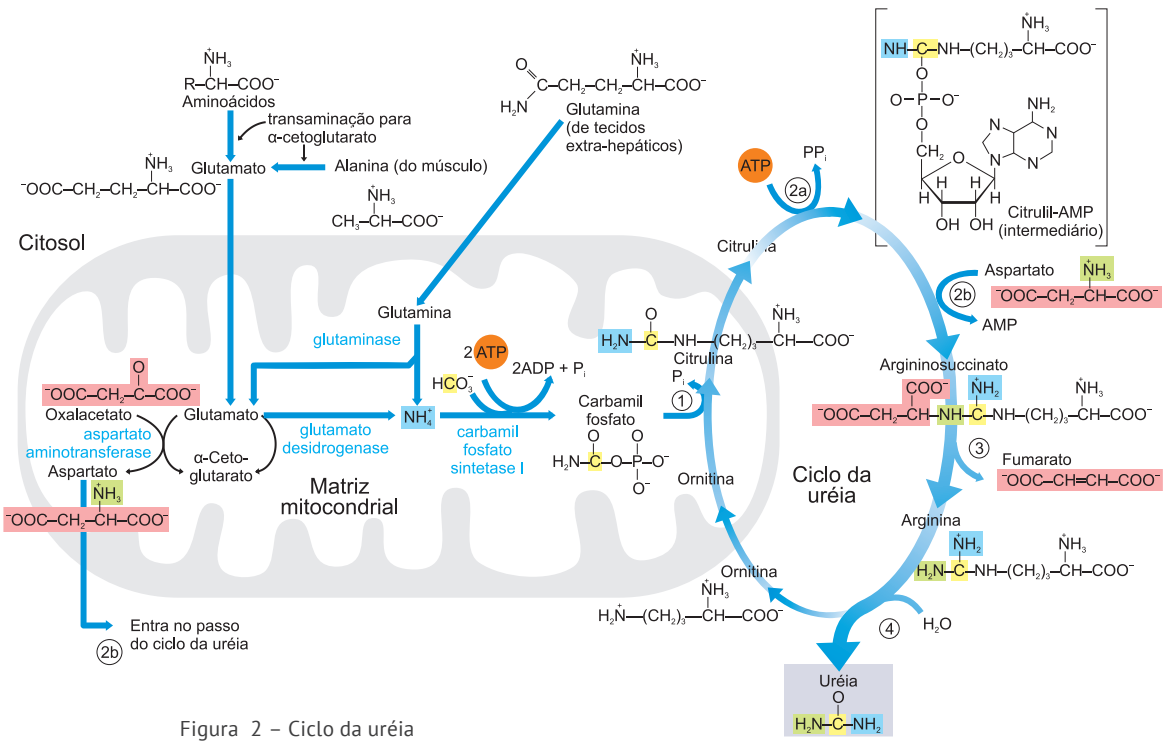


Figura 2 – Ciclo da uréia

A amônia gerada na mitocôndria das células hepáticas terá de ser metabolizada para permitir a formação de uréia, a qual será eliminada na urina. A amônia não pode sair da mitocôndria, e como vemos na figura 2, o ciclo da uréia ocorre parte na mitocôndria e parte no citosol, mas a amônia é metabolizada só dentro da mitocôndria.

Como já discutido acima, sempre que trocamos uma ligação C-O (carbono-oxigênio) por uma ligação C-N (carbono-nitrogênio) existe a necessidade de gasto de energia e esta feita pelo consumo de ATP, que permitirá a ligação de um fosfato com o carbono e que permitirá a ligação do carbono com o nitrogênio.

A primeira reação do ciclo da uréia é a formação do carbomil fosfato que é gerado pela ligação de um bicarbonato com a amônia e o gasto de duas moléculas de ATP. A enzima carbomil fosfato sintase irá catalisar a reação em que primeiro temos a ligação de um fosfato (oriundo de uma molécula de ATP) ao bicarbonato formando ácido carbônico-fosfato. Dessa maneira, o carbono do bicarbonato está ativado e permite a ligação da amônia nessa molécula formando o carbamato. A amônia já não está mais livre quando ligada ao carbamato e para formamos uréia é necessária a ligação de uma outra molécula de amônia ao carbamato. Para que isso ocorra é necessária a ativação do carbamato, o que ocorre com a ligação de outra molécula de fosfato (oriundo de uma segunda molécula de ATP) ao carbamato formando o carbomil-fosfato.

O próximo passo do ciclo da uréia é a ligação do aminoácido ornitina ao carbomil-fosfato com a liberação de fosfato e formação do aminoácido citrulina. Tanto a ornitina e citrulina são aminoácidos secundários, pois não estão presentes em proteínas. Mas sabemos que eles são aminoácidos porque possuem um carbono alfa ligado a uma carboxila, um hidrogênio, um grupamento amina e um radical. No caso da ornitina o radical contém um grupamento amina, na citrulina o radical contém o grupamento amina da ornitina ligado ao carbamato. Dessa maneira, encontramos no radical da citrulina um carbono que faz uma dupla ligação com o oxigênio e duas ligações simples com grupamentos aminas que é exatamente a fórmula da uréia. Poderíamos pensar que a uréia seria formada com a clivagem desse radical, mas dessa forma não ocorreria a regeneração do aminoácido ornitina, o que impedia a contínua formação de citrulina. Portanto, o ciclo da uréia irá continuar para permitir que formemos a uréia e ao mesmo tempo a célula seja capaz de regenerar a ornitina.

A citrulina irá sair da mitocôndria e no citosol será ativado com uma ligação fosfato no carbono do radical que esta fazendo uma dupla ligação com o oxigênio. Essa ligação é feita entre o fosfato gama (fosfato que esta ligado a ribose no nucleotídeo) e a citrulina e, assim, temos a formação do intermediário citrulil-AMP. Nessa ligação ocorre a liberação de dois fosfatos do ATP que formarão o pirofosfato que será imediatamente clivado pela enzima pirofosfatase inorgânica.

O citruil-AMP está no citosol e para formar a uréia é necessária a ligação de outra molécula de amônia, mas como isso pode ocorrer se a amônia é gerada na mitocôndria e de lá ela não pode sair? O grupamento necessário para esse processo virá da mitocôndria, mas na forma de um aminoácido. Quando

o glutamato se acumula na mitocôndria poderá ocorrer o inverso da reação de desaminação do aspartato, uma vez que a concentração de oxalacetato é pequena dentro da mitocôndria. O glutamato doa o seu grupo amina e forma alfa-cetoglutarato que poderá continuar participando nas reações de desaminações. O grupamento amina que está preso na enzima é transferido para o oxalacetato formando o aspartato. O aspartato poderá sair da mitocôndria levando o grupamento amina que poderá participar do ciclo da uréia.

O aspartato se ligará ao citruil-AMP e formará o arginosuccinato com a liberação do AMP. O papel do aspartato nessa reação é a doação do grupamento amina que permitirá a formação da uréia. Portanto, o esqueleto carbônico do aspartato não é necessário e poderá ser retirado.

6.1.3.1. A BICICLETA DE KREBS

A quebra do arginosuccinato levará a formação de arginina e fumarato. Em várias reações que o aspartato atua como doador de grupamento amina ocorre o mesmo processo, ou seja, o grupamento amina é mantido na molécula e o esqueleto carbônico é liberado na forma de fumarato. A arginina é um aminoácido que pode ser utilizado na síntese de proteínas. Já o fumarato poderá retornar à mitocôndria, local onde ele seguirá os passos do ciclo do ácido cítrico até formar o oxalacetato. Esse ciclo permitirá a contínua formação de aspartato a partir do oxalacetato e glutamato, sendo que a união do ciclo da uréia e do ciclo do ácido cítrico é denominada de bicicleta de Krebs[1].

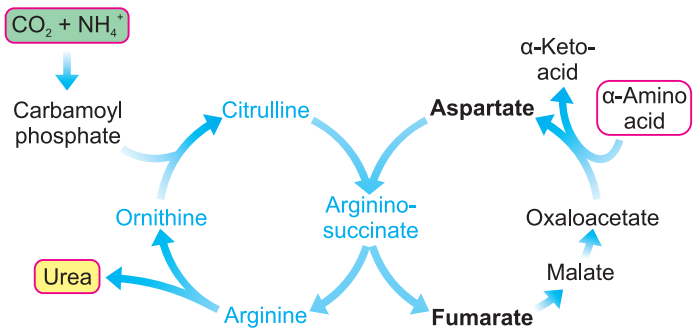


Figura 3 – Bicicleta de Krebs

O arginosucinato é a molécula que faz a união entre os dois ciclos, pois a partir dele é gerado o fumarato que irá para o ciclo do ácido cítrico e a arginina que irá seguir o ciclo da uréia.

6.1.3.2. A FORMAÇÃO DA URÉIA

O último passo do ciclo da uréia é a formação dessa molécula e a regeneração do aminoácido ornitina para que este possa continuar a participar do ciclo da uréia. A molécula da uréia é um carbono associado a dois grupamentos aminas e com uma dupla ligação com o oxigênio. No ciclo da uréia, o bicarbonato irá fornecer

1 - pesquisador que identificou os dois ciclos e determinou a união entre eles.

o carbono e na primeira reação do ciclo ocorre a formação do carbomil fosfato, ou seja, um grupamento amina proveniente da amônia gerada na mitocôndria e no bicarbonato. Essa molécula é ligada ao aminoácido ornitina para formar a citrulina. No radical da citrulina encontramos o carbono do bicarbonato associado a dois grupamentos amina (um proveniente da amônia e outro do radical da ornitina) e fazendo uma dupla ligação com o oxigênio. Nesse radical já encontramos a uréia, mas se essa molécula fosse clivada a ornitina não seria regenerada e o ciclo da uréia seria interrompido. Por essa razão é formado o aminoácido arginina, no qual existe a troca da dupla ligação do carbono com o oxigênio por uma dupla ligação do carbono com um grupo amina que é doado pelo aspartato. Portanto, o último passo para formação da uréia é a quebra do radical da argina que irá liberar a uréia e a ornitina; para tanto, a enzima arginase catalisa a reação em que uma molécula de água ataca a ligação que está sendo feita pelo carbono (proveniente do bicarbonato) com o gruapamento amina do radical da ornitina. Dessa forma, ocorrerá uma dupla ligação do carbono com o oxigênio (proveniente da água) e este continuará ligado ao grupamento amina que foi proveniente da amônia mitocondrial e do aspartato que foi formado na mitocôndria pelo processo de transaminação. Além da uréia que será excretada na urina, temos a regeneração da ornitina que entrará na mitocôndria e continuará o ciclo da uréia.

6.1.4. OS AMINOÁCIDOS CETOGÊNICOS E GLICOGÊNICOS

Quando o grupamento amina é retirado de um aminoácido, o esqueleto carbônico do mesmo poderá ser utilizado para obtenção de energia. Como pode ser visto na figura 4, o esqueleto carbônico dos aminoácidos podem formar diferentes compostos, tais como: piruvato, oxalacetato, alfa-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, acetil-CoA e acetoacetil-CoA.

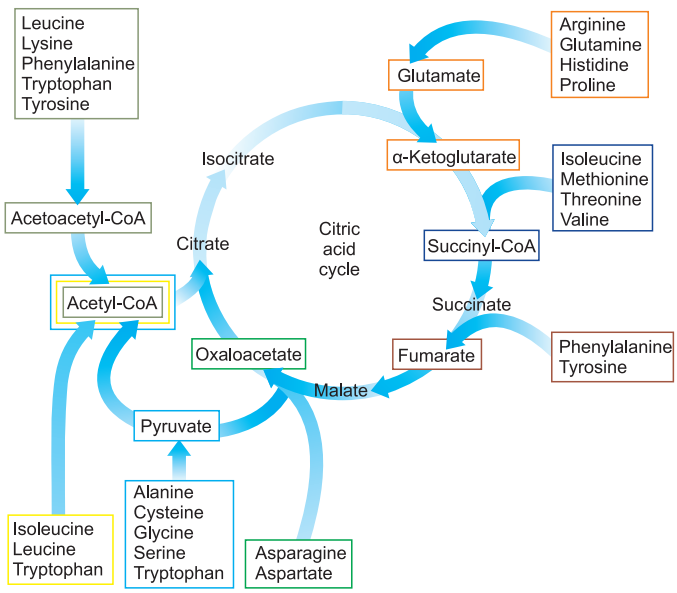


Figura 4 – Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos

Todas essas moléculas poderão ser oxidadas no ciclo do ácido cítrico, onde os carbonos serão transformados em CO_2. Os NADH e FADH2 gerados no ciclo do ácido cítrico serão regenerados na cadeia de transporte de elétrons com a conseqüente formação de ATPs. Portanto, como descrito, a obtenção de energia a partir de aminoácidos só será realizada na presença de oxigênio.

Após o consumo de uma grande quantidade de proteínas, os aminoácidos que não foram utilizados para a síntese de novas proteínas poderão ser utilizados para a obtenção de energia como descrito acima. Mas se a célula já está com excesso de energia, o que acontece com o excesso de aminoácidos? Não existe nenhuma proteína que funcione como um reservatório de aminoácidos que seriam utilizados como fonte de energia em momentos de falta. O excesso de aminoácidos será transformado em carboidratos ou lipídeos e, assim temos os aminoácidos glicogênicos ou cetogênicos. Nos aminoácidos que o esqueleto carbônico forma piruvato ou componentes do ciclo do ácido cítrico que poderão formar glicose pela gliconeogênese (aula 8 de Bases Moleculares I). Esses são os aminoácidos glicogênicos. Já os aminoácidos nos quais os esqueletos carbônicos formam acetil-CoA e acetoaceti-CoA irão permitir a formação de ácidos graxos e por isso são denominados de cetogênicos. Apenas os aminoácidos leucina e isoleucinas são aminoácidos exclusivamente cetogênicos, ou seja, só permite a formação de lipídeos.

Os aminoácidos glicogênicos têm um papel importante no metabolismo de carboidratos em uma pessoa que está em jejum. Se a glicose não for obtida na dieta ela terá de ser fornecida pelo organismo para que as células possam utilizá-la. Por exemplo, os eritrócitos que não possuem mitocôndria só são capazes de obter energia fazendo o processo de fermentação que só é possível com carboidratos. A primeira fonte de glicose para o organismo é o glicogênio que é um polímero de glicose. Quando o nível de glicose diminuí no sangue, o hormônio glucagon é liberado e este irá estimular as células do fígado a alterar o seu metabolismo que começa a degradar o glicogênio para liberar glicose para a corrente sanguinea. Aproximadamente após 12 horas de jejum, o glicogênio já foi quase completamente mobilizado e outra fonte de glicose tem de ser obtida. Nesse contexto, as proteínas musculares sofrem degradação e os aminoácidos glicogênicos são enviados para o fígado onde eles serão transformados em glicose e mandados para a corrente sanguínea.

6.1.5. ERROS DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

No metabolismo de aminoácidos a deficiência de algumas enzimas poderão causar doenças. Por exemplo, a deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase poderá levar a fenilcetonúria, a qual pode levar ao retardo mental. Nessa doença, a ausência de uma enzima impede o metabolismo normal do aminoácido fenilalanina. Normalmente a fenilalanina é hidroxilada e forma o aminoácido tirosina que continuará a ser metabolizado. Na ausência da enzima, a fenilalanina acumula no sangue e pode impedir a entrada correta de todos os aminoácidos nas células nervosas, o que lavaria a um problema de

desenvolvimento do cérebro com o conseqüente retardo mental. A descoberta precoce da deficiência da enzima é importante para o tratamento da doença, que consiste em uma alimentação balanceada evitando a presença do aminoácido fenilalanina

Outra doença relacionada ao metabolismo dos aminoácidos é o albinismo, doença na qual as pessoas não apresentam pigmentação no corpo. Essa doença é decorrente da deficiência na enzima tirosinase que atua no aminoácido tirosina para favorecer a formação do pigmento melanina.

6.1.6. AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS

Uma bactéria é capaz de crescer na presença apenas de glicose e de uma fonte de nitrogênio. Isso ocorre pelo fato dessa bactéria ser capaz de sintetizar todos os aminoácidos primários que são necessários para a síntese de proteínas. Alguns aminoácidos são simples de serem sintetizados, por exemplo, a síntese da alanina ocorre com a aminação do piruvato, utilizando como fonte de amina o aminoácido glutamato. O mesmo ocorre com o aspartato que é sintetizado em único passo pela aminação do oxalacetato. Porém, a síntese de alguns aminoácidos são mais complexas e precisarão de vários passos para que possam ocorrer.

Os seres humanos não são capazes, como as bactérias, de sintetizar todos os aminoácidos. Os aminoácidos de síntese mais simples não são essenciais, ou seja, o ser humano é capaz de produzi-los e não precisa obtê-los da dieta. Por outro lado, os aminoácidos que apresentam uma síntese mais complexa são essenciais na dieta humana, pois não somos capazes de sintetizá-los uma vez que perdemos algumas das enzimas necessárias para essa síntese[2].

6.2. OS NUCLEOTÍDEOS

Nessa parte da aula iremos discutir sobre os nucleotídeos, a estrutura dessas moléculas, suas funções e como somos capazes de sintetizá-los. Por fim, veremos como o metabolismo dos nucleotídeos pode servir como alvo para quimioterápicos no tratamento do câncer.

Os nucleotídeos são compostos por bases nitrogenadas, carboidratos e fosfatos. As bases nitrogenadas como o próprio nome diz são anéis ricos em nitrogênio que podem ser divididas em purinas (com dois anéis) e pirimidinas (com um único anel). As purinas são as bases adenina e guanina, enquanto as pirimidinas são as bases citosina, uracila e timina.

2 - Vejam em seu livro base quais são os aminoácidos essenciais e não essenciais

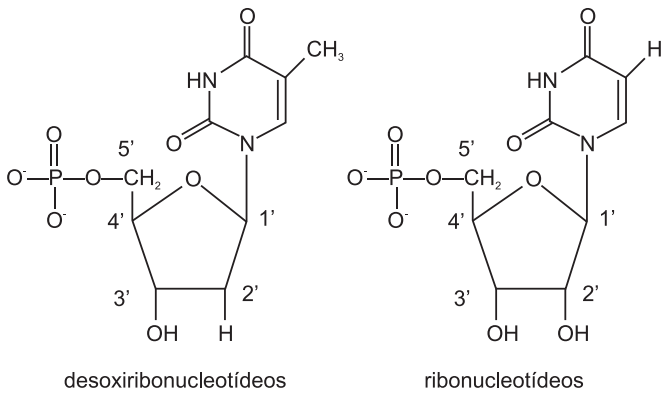


Figura 5 – Estrutura dos desoxiribonucleotídeos e ribobonucleotídeos

Quando as bases nitrogenadas estão associadas a uma ribose temos o nucleosídeo que se transforma em nucleotídeo quando o fosfato está unido à ribose. A base nitrogenada está ligada ao carbono 1 da ribose enquanto o fosfato está ligado ao carbono 5. Como vimos na figura 5, a ribose presente nos nucleotídeos podem ser de dois tipos diferentes, a ribose e a desoxiribose. A desoxiribose tem como diferencial a presença de um hidrogênio no lugar de uma hidroxila ligada ao carbono 2. Essa troca é muito importante para a estabilidade da molécula, uma vez que quando o carbono esta ligado a um oxigênio os elétrons são mais atraídos pelo oxigênio. Dessa forma, o carbono fica deficiente em elétrons e suscetível ao ataque de átomos que tem elétrons para oferecer. Quando o hidrogênio está ligado ao carbono, esses átomos compartilham igualmente os elétrons e, assim, o carbono fica estável e não é susceptível ao ataque de moléculas com elétrons sobrando. Iremos encontrar os desoxiribonucleotídeos apenas na molécula do DNA, pois durante a evolução estes foram selecionados por serem mais estáveis e são importantes para manter a estabilidade da informação genética como veremos na próxima aula.

Quais são as funções dos nucleotídeos? A primeira função dos nucleotídeos que vem à lembrança é o papel dessas moléculas na transferência da informação genética. Os nucleotídeos estão presentes no DNA e no RNA e são capazes de passar a informação genética, o que permite a uma célula replicar e manter a sua identidade. A função dos nucleotídeos na transferência da informação genética será discutida em detalhes na próxima aula.

Mas os nucleotídeos estão envolvidos apenas na transferência da informação genética? Não. Essas moléculas apresentam diferentes funções em uma célula. Os nucleotídeos são a molécula energética em uma célula. Como já vimos nas aulas anteriores, a oxidação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos libera energia que é armazenada na célula na forma do ATP (Adenosina trifosfato). A energia do ATP está armazenada na ligação fosfato que ao ser quebrada é capaz de liberar energia (veja por que o ATP tem energia na aula de bioenergética de Bases Moleculares I). Além do ATP, o GTP (guanilato trifosfato) também é utilizado como moeda energética em uma célula, inclusive o GTP que é formado no ciclo do ácido cítrico. Entretanto, o ATP é a principal moeda energética da célula.

Além de serem utilizados como moeda energética, os nucleotídeos estão presentes em diferentes coenzimas. Por exemplo, encontramos a adenina presente na Coenzima A. Essa coenzima apresenta um enxofre que será importante para ativar algumas moléculas como acetil com uma ligação tioester. O enxofre está ligado a uma cadeia rica em carbonos que se liga ao nucleotídeo adenina.

Outra coenzima que contém a Adenina é o NAD (nicotinaamida dinucleotídeo) que como já vimos em vários momentos é muito importante nas reações de oxidoredução, uma vez que é capaz de atuar como transportador de elétrons. O NAD é formado por dois nucleotídeos: a nicotinamida e a adenina. Os elétrons são transportados pela nicotinamida que é capaz de receber dois elétrons na forma de um íon hidreto (um hidrogênio com dois elétrons).

Outra coenzima que atua no transporte de elétrons e possui um nucleotídeo em sua estrutura é o FAD (flavina dinucleotídeo). Os elétrons são transportados na forma de dois hidrogênios que são absorvidos pelos anéis da flavina.

Como vimos, os nucleotídeos estão presentes em diferentes moléculas que possuem diferentes funções, mas em nenhuma delas a adenina está participando diretamente na função. Como moeda energética o importante é a ligação entre os fosfatos. Na Coenzima A o papel importante é exercido pelo átomo de enxofre que participa da ligação tioester. Nos transportadores de elétrons, a adenina está presente nos dois (NAD e FAD), mas em nenhum dos dois é o responsável pelo transporte de elétrons feito pela nicotinamida e flavina.

Por que a Adenina está presente em todas essas moléculas se ela não participa diretamente da função delas? O papel da adenina é permitir um maior número de interações o que facilita o reconhecimento das moléculas. Por exemplo, o pirofosfato (dois fosfatos unidos) poderia ser a molécula energética da célula, mas esta é uma molécula pequena o que poderia dificultar o reconhecimento dela pelas enzimas. Temos que lembrar que o reconhecimento é feito pelas interações fracas como as interações de hidrogênio, iônicas, hidrofóbicas e Van der Waals. Assim, a presença da ribose e da base nitrogenada adenina permite uma área maior de interações o que facilita o reconhecimento molecular.

Mas por que a adenina foi escolhida para estar presente em todas as moléculas e não a guanina? Da mesma forma que só temos L-aminoácidos, durante a evolução pode ter ocorrido o que chamamos de congelamento evolutivo, ou seja, em um determinado momento da evolução uma célula que reconhecia a adenina foi selecionada e, a partir dessa, todas as células evoluíram e, por isso, em todas as moléculas encontramos a adenina.

Em todas as moléculas em que os nucleotídeos estão presentes, nós encontramos os ribonucleotídeos o que é uma forte indicação de que estes existiram antes dos desoxiribonucleotídeos, os quais surgem com o aparecimento do DNA. A teoria do mundo RNA coloca que o mundo primordial era formado por moléculas de RNA que eram capazes de realizar catálise e de passar a informação genética. O fato de os ribonucleotídeos estarem envolvidos com as diferentes funções

descritas acima reforça a teoria do mundo RNA. O processo de síntese dos nucleotídeos que veremos a seguir é mais uma evidência que corrobora a teoria do mundo RNA.

6.2.1. SÍNTESE DOS NUCLEOTÍDEOS

Os nucleotídeos são essenciais para a vida e, portanto, todas as células têm que ter a capacidade para sintetizá-los e não podem ficar dependente de obtê-los na dieta. Os nucleotídeos não são utilizados para obter energia, pois possuem muitos nitrogênios e como vimos na oxidação de aminoácidos, o grupamento amina tem de ser excretado na forma de uréia. O ciclo da uréia é custoso energeticamente e como nas bases nitrogenadas a quantidade de carbonos é similar à de nitrogênios, o saldo final de energia (diferença do que seria obtido com a oxidação dos carbonos menos do que seria gasto com a metabolização da amônia) não seria vantajoso para a célula.

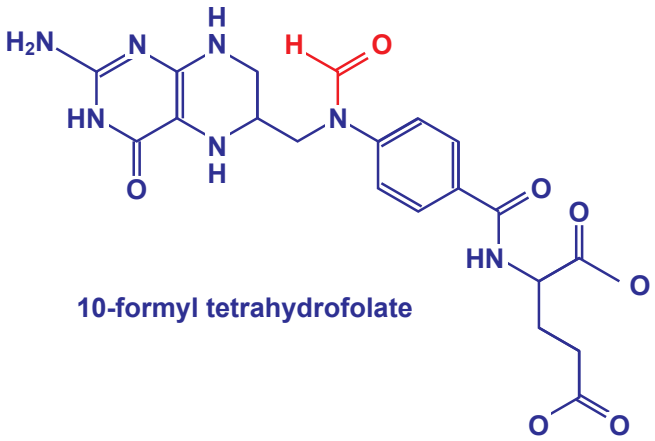
Como vimos no ciclo da uréia, a troca de uma ligação carbono-oxigênio para uma ligação carbono-nitrogênio consome energia e para que isso ocorra, normalmente, é utilizada a energia da quebra da ligação fosfato do ATP. Como as bases nitrogenadas, como o próprio nome diz, são ricas em nitrogênio a síntese delas é muito custosa energeticamente.

6.2.1.1. SÍNTESE DE NOVO DAS PURINAS

As purinas, guanina e adenina, apresentam dois anéis e o custo energético para a síntese das mesmas é maior que a das pirimidinas que contém apenas um anel. Como as bases nitrogenadas só terão função se estão presentes em nucleotídeos (base nitrogenada, ribose e fosfato) e como a síntese dos mesmos é bastante custosa não seria interessante para a célula que a síntese de purinas fosse feita antes de associá-las com a ribose. O processo de síntese das purinas só irá ocorrer na presença da ribose, uma vez que a ribose é um dos substratos da primeira reação da via. Para o processo de síntese de purinas vamos precisar ter uma ribose-fosfato e doadores dos átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio que farão parte da base nitrogenada.

Os principais doadores da síntese de purinas são os aminoácidos glutamina, aspartato e glicina. Além desses aminoácidos, o cofator tetrahidrofolato é responsável por doar carbonos parcialmente oxidados no processo de síntese.

O tetrahidrofolato é um cofator enzimático importante que atua na transferência de grupos carbônicos que não estão completamente oxidados (CO_2) e nem totalmente reduzidos (CH_3). Este cofator é capaz de transferir carbonos parcialmente reduzidos como o formil (HC=O) que é visto na estrutura a seguir:



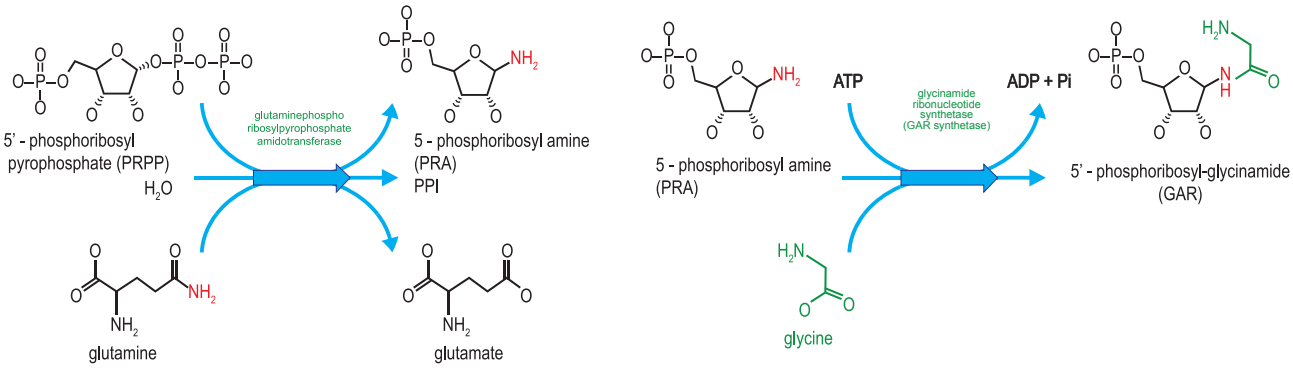
10-formyl tetrahydrofolate

O tetrahidrofolato transporta esses carbonos associados ao nitrogênio 5 e/ou ao nitrogênio 10 como mostrado no estrutura acima. O tetrahidrofolato é fundamental em organismos em crescimento, pois ele participa na biosíntese de aminoácidos e nucleotídeos. É por essa razão que se recomenda que as grávidas tenham a dieta complementada com o folato para que o feto tenha o desenvolvimento normal.

O primeiro passo da síntese de purinas é formação do PRPP (fosfo-ribosil-pirofosfato). A ribose para a síntese dos nucleotídeos é o proveniente da via das pentoses, a mesma via que vimos na aula passada que pode formar o NADPH utilizado na síntese de ácidos graxos e colesterol. Além dos NADPH, a via das pentoses forma a ribose-5-fosfato que poderá ser usado na síntese de nucleotídeos e aminoácidos.

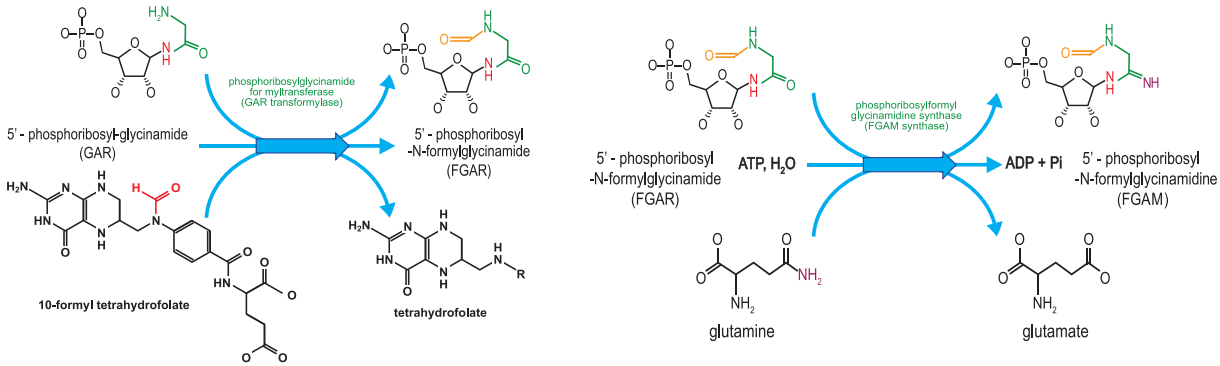
A ribose-5-fosfato é ativada com a ligação de um pirofosfato no carbono 1 e essa reação é catalisada pela enzima PRPP sintase. A primeira reação que é exclusiva da via da síntese de nucleotídeos é a ligação de um grupamento amina ao carbono 1 da ribose. Nessa reação o doador de amina é o aminoácido glutamina que após doar a amina é liberado na forma de glutamato. A enzima que catalisa a reação é a glutamina fosforibosil amino transferase e a troca de uma ligação carbono-oxigênio presente na ribose pela ligação carbono-nitrogênio realizada é favorecida pela presença do pirofosfato que libera energia suficiente para a troca. Após essa reação, o composto gerado só poderá seguir o caminho de síntese de purinas o que torna essa enzima um ponto chave para a regulação da síntese de purinas.

O segundo passo da síntese de purinas é a associação do aminoácido glicina. Nessa reação, o carbono do grupo carboxila da glicina se liga ao grupamento amina já presente. Como irá ocorrer uma troca de uma ligação carbono-oxigênio por uma carbono-nitrogênio, uma ligação rica em ATP será rompida para favorecer a reação. A glicina doa todos os seus átomos (H_2N-CH_2-C=O) para a síntese de purinas.



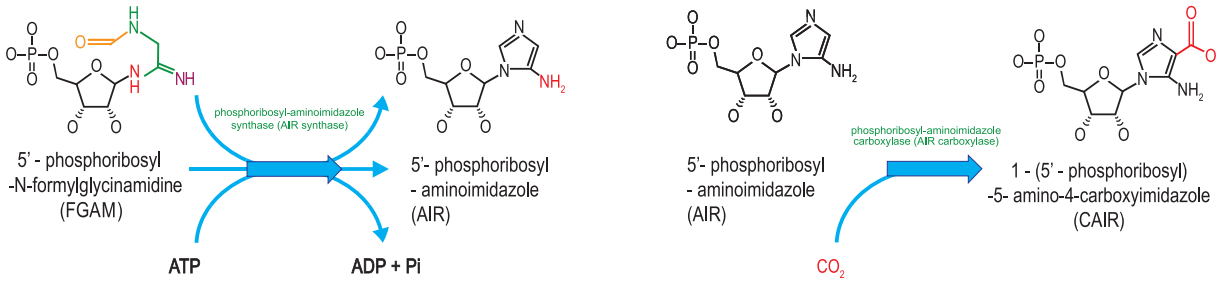
O próximo passo da síntese é a ligação de um grupamento formil (HC=O) que se liga ao grupamento amina que era proveniente da glicina. O grupamento formil é doado pelo N-10-formiltetrahidrofolato e como ele já está ligado a um nitrogênio no tetrahidrofolato, não há gasto de energia para se ligar o formil com o grupamento amina.

A glutamina irá doar mais um grupamento amina com a liberação do glutamato. O grupo amina se liga ao carboxila proveniente da glicina. Novamente, existe a troca de uma ligação carbono-oxigênio por uma ligação carbono-nitrogênio e, portanto, necessita o gasto de energia que é proveniente da quebra de um fosfato do ATP.

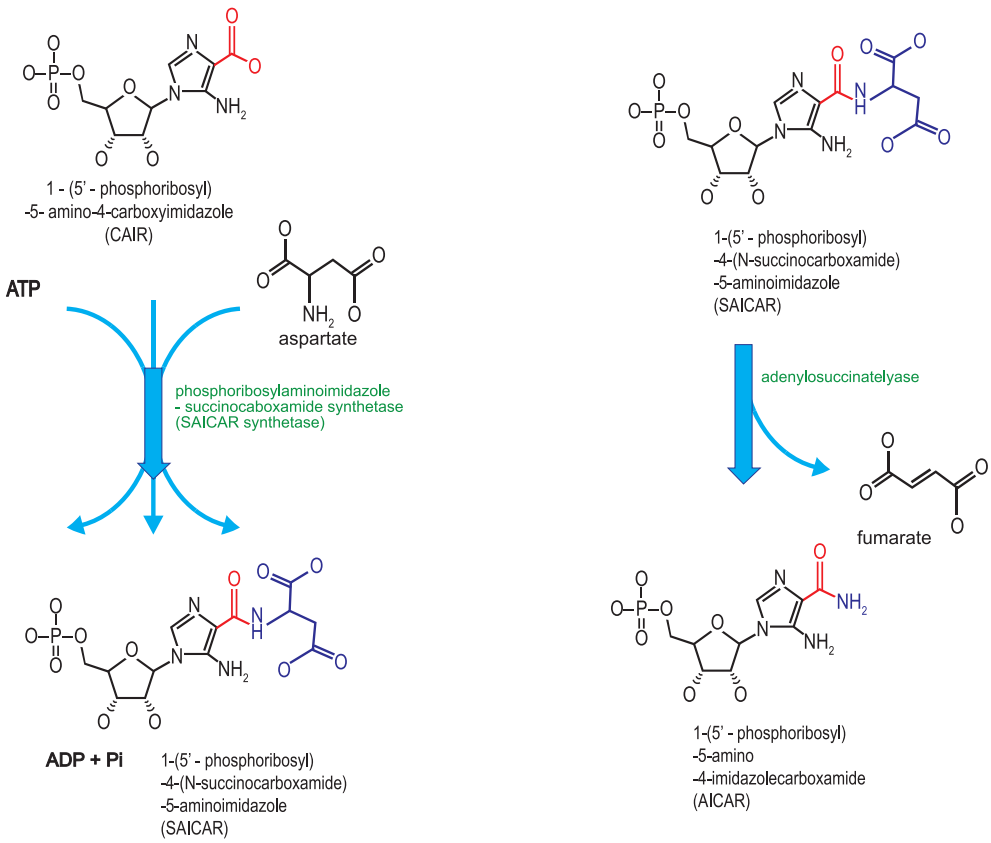


O próximo passo é o fechamento do primeiro anel das purinas. Nesse passo o carbono do grupo formil se liga ao grupamento amina oriundo da glutamina da primeira reação de síntese. Nesta etapa, novamente tem gasto de ATP para permitir a troca de uma ligação carbono-oxigênio para uma ligação carbono-nitrogênio.

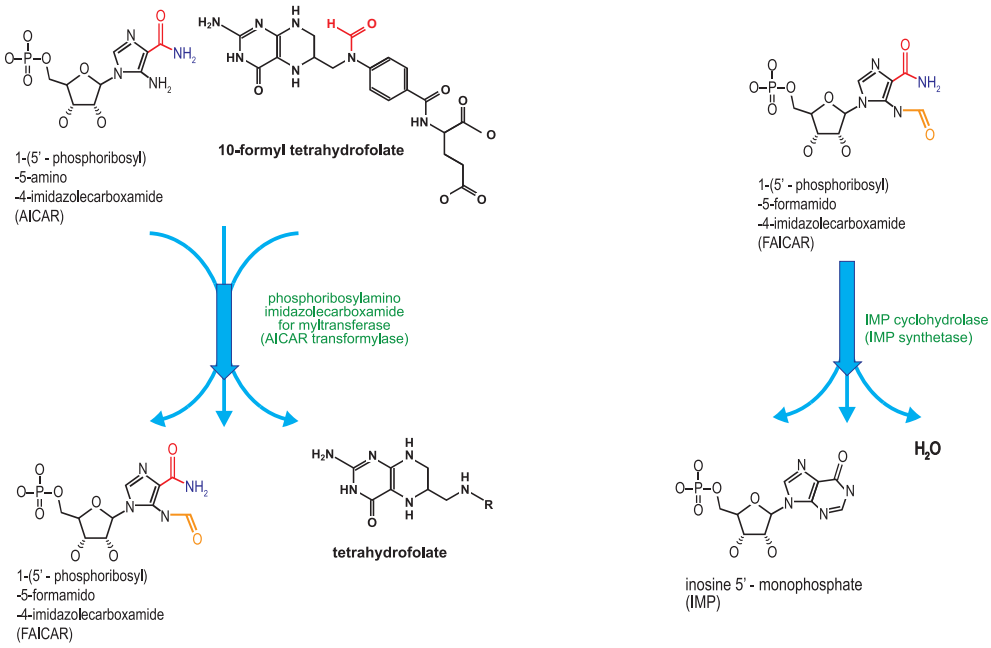
Uma molécula de CO_2 é ligada ao anel da purina que está sendo sintetizado. Essa ligação ocorre com um carbono (carbono alfa proveniente da glicina) e não há gasto de energia. A curiosidade dessa reação é que a enzima que a catalisa não utiliza a biotina como cofator, o que é verificado em todas as reações na qual ocorre a inserção de CO_2.



As próximas duas reações são muito similares ao que vimos no ciclo da uréia, pois o aspartato é o doador do grupo amina. Essa reação necessita do gasto de um ATP devido a troca da ligação de carbono-oxigênio por uma ligação carbono-nitrogênio. Igual o ciclo da uréia, uma segunda etapa da reação de doação do grupamento amina pelo aspartato é a saída do esqueleto carbônico do aminoácido que sai na forma de fumarato.



A continuação da síntese de purinas ocorre com a adição de outro grupamento formil que é proveniente do N-10-formiltetrahidrofolato. Temos, por fim, o fechamento do segundo anel das purinas e com isso temos a formação do primeiro nucleotídeo, o inosinato, que contém: o fosfato, ribose e uma base nitrogenada denominada hipoxantina.



O inosinato é o precursor tanto do adenilato quanto do guanilato e é muito importante que a síntese desses dois nucleotídeos seja balanceada, ou seja, o inosinato não pode ser deslocado somente para a síntese de guanilato, pois pode impedir que ocorra a síntese de adenilato. Como que as células fazem para produzir igualmente adenilato e guanilato? Os mecanismos adotados pelas células envolvem tanto como ocorrem as reações como a forma que elas são reguladas.

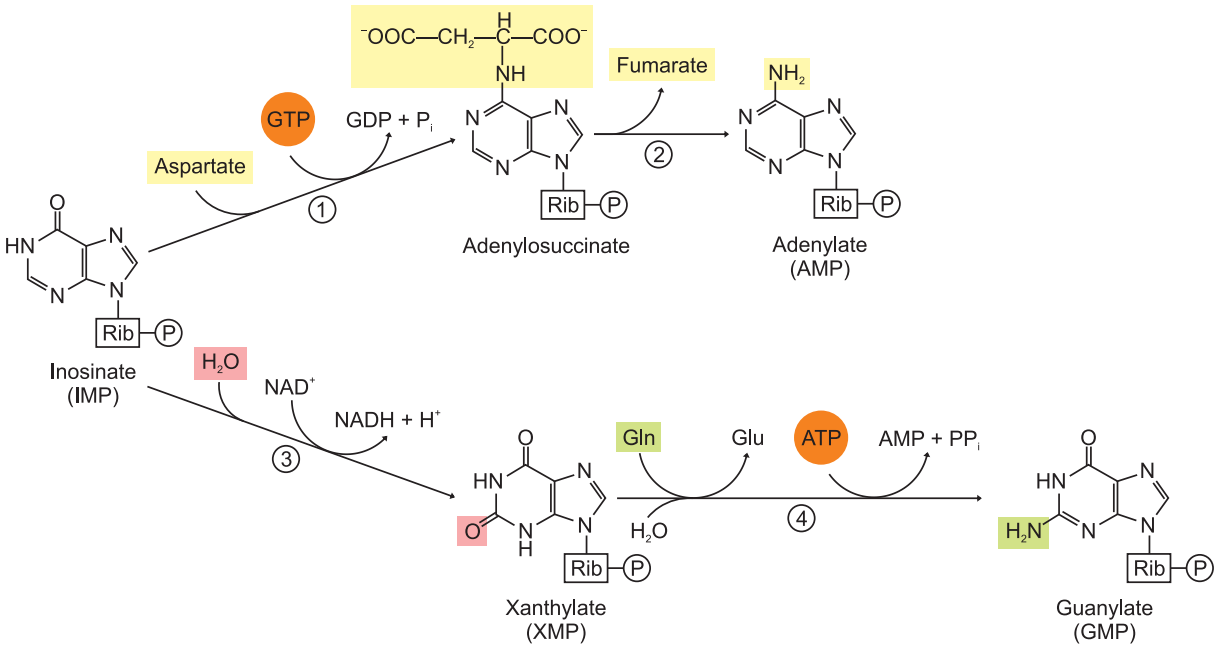


Figura 6 – Síntese das purinas: adenilato e guanilato.

Na figura 6, vemos que a diferença da base nitrogenada hipoxantina para a guanina e a adenina é que as últimas apresentam um grupo amina a mais do

que é verificado na hipoxantina. Como já discutimos em vários momentos nessa aula, a troca da ligação de carbono-oxigênio por uma carbono-nitrogênio depende da quebra de uma ligação rica em energia que vimos até o momento ser fornecida pelo ATP. Para a síntese do AMP (adenilato mono-fosfato), vemos que a reação tem como doador de grupamento amina o aminoácido aspartato e, como em todas as reações que o aspartato é o doador de grupamento amina, o esqueleto carbônico desse aminoácido sai na forma de fumarato em uma reação subseqüente. A adição do grupamento amina necessita de gasto de energia e esse é um ponto importante para controlar a produção equilibrada das duas purinas. Ao invés de utilizar o ATP como fonte de energia, para a reação de síntese de adenilato é utilizado o GTP. Assim, para que seja sintetizado o AMP é necessária a presença de GTP.

Para a síntese de guanilato um mecanismo similar é utilizado. O doador de grupamento amina para a síntese de guanilato é o aminoácido glutamina que após doar o seu grupamento amina é liberado na forma de glutamato. O problema da síntese de guanilato é que a região em que o grupamento amina é inserido, o carbono está fazendo uma ligação com hidrogênio. As ligações hidrogênio-carbono são mais estáveis o que impediria a ligação do grupamento amina. Para solucionar esse problema, um oxigênio é inserido antes na molécula na hipoxantina o que leva a formação de xantina. O grupamento amina da glutamina é inserido no local que o oxigênio foi inserido e, assim, o guanilato é formado. A inserção da amina necessita o gasto de energia e neste caso se utiliza o ATP nesse processo. Portanto, para que a síntese de guanilato seja possível é necessária a presença de ATP. Dessa maneira, a produção das purinas ocorrerá de maneira equilibrada, uma vez que para a síntese de adenilato é necessária a presença de guanilato e vice-versa.

6.2.1.2. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE NOVO DAS PURINAS

O custo energético da síntese de purinas é muito alto e ela só deve estar ativa quando existe a necessidade. A regulação dessa via também terá um papel importante para equilibrar a síntese das duas purinas a partir do inosinato. A forma de regulação da síntese de purinas é denominada de retroalimentação na qual o produto final é o responsável por regular a via Biosintética. Por exemplo, quando existe um excesso de adenilato (AMP), ele irá inibir a primeira reação que leva a formação de adenilato a partir do inosinato. Dessa maneira, o inosinato é deslocado para a síntese de guanilato. O excesso de adenilato também irá inibir a primeira reação de síntese de purinas na qual um grupo amina é incorporado ao PRPP. Essa inibição não pode ser total, pois se fosse ela iria impedir a síntese de guanilato. Quando o guanilato está em excesso, ele irá inibir a enzima responsável por catalisar a primeira reação da via de síntese de guanilato a partir de inosinato o que permite que o inosinato seja utilizado para a síntese de adenilato. O guanilato também irá inibir a enzima que catalisa a primeira reação da síntese de purinas. Essa enzima será mais inibida na presença conjunta de adenilato e guanilato que indicará que as purinas necessárias já estão em boa quantidade.

6.2.2. A VIA DE SALVAÇÃO DE PURINAS

O processo de síntese de purinas é custoso energeticamente e por essa razão ela é realizada já em cima de uma ribose fosfato. Como já vimos, a primeira reação é a inserção do grupamento amina no carbono 1 da ribose e esse processo é endorgânico, ou seja, demanda gasto de energia o qual é obtida na quebra da ligação do pirofosfato. Se a ligação do grupo amina é endorgânico, a quebra do mesmo com a ligação de um oxigênio (proveniente da água) é exogânica, ou seja, leva a liberação de energia e por isso ocorre espontaneamente na célula.

Esse fato pode ser muito danoso para a célula, uma vez que as bases nitrogenadas só terão função se estiverem associadas com a ribose-5-fosfato. A célula pode gastar grande quantidade de energia para sintetizar um nucleotídeo e o mesmo pode ser desfeito se ocorrer a quebra da ligação da base nitrogenada à ribose. Em virtude desse risco, as células possuem uma estratégia alternativa que busca reutilizar as bases nitrogenadas prontas que não estejam associadas à ribose-5-fosfato. Essa via recebe o nome de via de salvação.

Existem duas enzimas que atuam na via de salvação. Uma delas é a enzima adenina-fosforibosil-transferase que como o próprio nome diz catalisa a reação em que a base nitrogenada adenina é ligada ao PRPP (fosfo-ribosilpirofosfato). A quebra do pirofosfato fornece a energia necessária para fazer a ligação do nitrogênio da base nitrogenada com o carbono 1 da ribose.

A outra enzima envolvida na via de salvação é a hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase. O mecanismo de ação dessa enzima é similar a da enzima adenina-fosforibosil-transferase, entretanto, essa enzima reconhece como substratos a base nitrogenada hipoxantina ou a guanina. Portanto, essa enzima é capaz de sintetizar o inosinato e o guanilato. Deficiências na via de salvação pode ocasionar grandes problemas como é visto em algumas síndromes humanas[3].

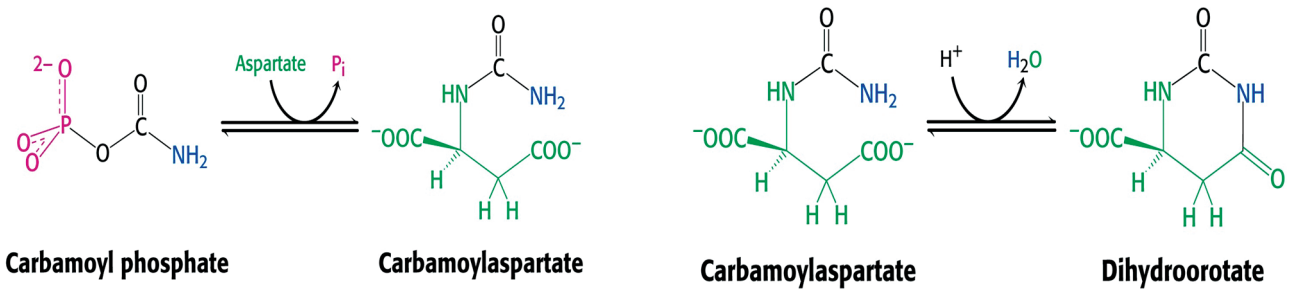
6.2.3. A VIA DE SÍNTESE DE PIRIMIDINAS

A síntese de pirimidinas é mais simples do que a síntese de purinas e devido a isso, a síntese é realizada sem a participação do PRPP. Duas moléculas são as responsáveis pela síntese das pirimidinas: carbomoil fosfato e aspartato. O carbomoil fosfato também é utilizado no ciclo da uréia, mas a maneira de como essas duas moléculas são sintetizadas (carbomoil fosfato do ciclo da uréia e da síntese de nucleotídeos) difere. O carbomoil fosfato utilizado no ciclo da uréia é sintetizado dentro da mitocôndria e utiliza a amônia como substrato. Para a síntese de pirimidinas, a síntese é feita no citosol e nesse caso não pode depender da concentração de amônia, pois esta é tóxica. Existem duas enzimas envolvidas na síntese do carbomoil fosfato e elas são denominadas como isoenzimas, pois são enzimas similares que catalisam reações similares,

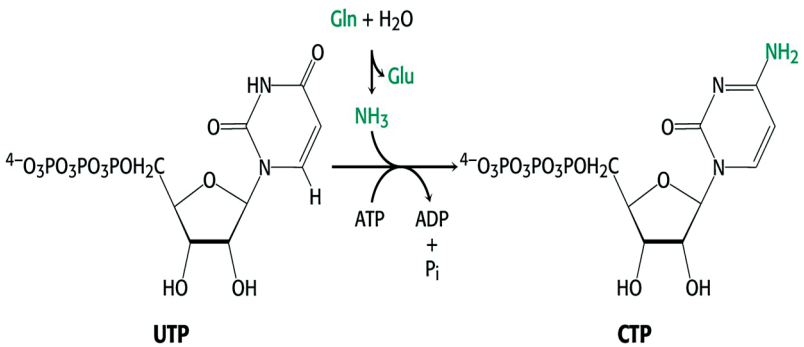
3 - veja no seu livro base as síndromes associadas com a via de salvação

mas apresentam diferenças. As duas diferenças entre essas enzimas são a localização das mesmas (uma mitocondrial e outra citosólica) e os substratos que elas reconhecem. Enquanto a enzima mitocondrial reconhece a amônia como doadora de amina, a enzima citosólica reconhece o aminoácido glutamina como doador de grupo amina.

O primeiro passo da síntese de pirimidinas é a união do carbomoil fosfato com o aspartato. Diferente do que observamos antes, o aspartato não entra apenas com o grupo amina na síntese de pirimidinas, mas sim com todos os seus átomos participando do processo. A base nitrogenada é gerada com o fechamento da cadeia do carbamoilaspartato e com a conseqüente geração do dihidrooratato.



Após a formação da base ela sofrerá diferentes reações e entre elas existe a ligação da base nitrogenada com o PRPP. A primeira pirimidina formada é o uridilato que contém a uridina como base nitrogenada. A diferença do citidilato para o uridilato é a presença de um grupamento amina no citidilato. A inserção do grupamento amina é feito com gasto de energia e usa como doador de grupo amina e o aminoácido glutamina com a conseqüente saída de glutamato.



Os nucleotídeos são sintetizados na forma de nucleotídeos monfosfatos, ou seja, com apenas um fosfato ligado ao carbono 5 da ribose. Os nucleotídeos são fosforilados pelo ATP em uma reação que ocorre a troca de fosfatos em uma reação como mostrado abaixo:

XMP + ATP ↔ XDP + ADP

A formação de um nucleotídeo trifosfato é realizada de forma similar, mas a enzima que catalisa a reação é capaz de reconhecer qualquer nucleotídeo

trifosfato e transferir um fosfato para qualquer dinucleotídeo fosfato. A reação realizada pode ser esquematizada como mostrado abaixo:

$$XDP + YTP \leftrightarrow XTP + YDP$$

6.2.4. A SÍNTESE DE DESOXIRIBONUCLEOTÍDEOS

Até o momento, vimos que os nucletideos sintetizados são todos os ribonucleotídeos, ou seja, o açúcar presente nessas moléculas é a ribose. Como são sintetizados os desoxiribonuleotídeos? A reação de síntese consiste na retirada de um oxigênio do carbono 2 da ribose.

A enzima ribonucleotideo redutase é a responsável pela catalise da reação que forma os desoxiribonucleotídeos. Essa enzima apresenta características interessantes tanto com relação ao mecanismo de catálise quanto à forma de reconhecimento do substrato.

Existe apenas uma enzima ribonucleotídeo redutase que terá de ser capaz de reconhecer todos os ribonucleotídeos, mas como ela faz para reconhecer os diferentes nucleotídeos em momentos distintos? A enzima apresenta dois tipos de regulação alostérica: uma envolvida com a atividade da enzima e outra envolvida com a especificidade do substrato. A regulação alostérica é quando uma molécula se liga em uma região de uma enzima e leva a uma mudança de conformação da enzima em outra região como, por exemplo, no sítio ativo da enzima.

A enzima ribonucleotídeo redutase estará ativa enquanto o ATP estiver ligado ao sítio de regulação da enzima. Se o ATP também estiver ligado ao sitio de regulação da especificidade do substrato, a enzima irá reconhecer pirimidinas e, portanto, estará formando desoxicitidilato difosfato (dCDP) e desoxiuridilato difosfato (dUDP). Como veremos adiante, o dUDP irá formar timidilato trifosfato (dTTP) e quando o dTTP acumula, ele irá competir com o ATP pelo sítio de regulação da especificidade do substrato. Quando o dTTP está ligado nessa região ocorre uma mudança de conformação na enzima que a fará parar de reconhecer pirimidinas e passe a reconhecer como substrato o guanilato difosfato (GDP) e, conseqüentemente, irá formar o desoxiguanilato difosfato (dGDP). Com o acúmulo de dGDP, este irá competir pela ligação ao sítio de regulação da especificidade do substrato e quando ocorre a ligação, a enzima muda a conformação e irá passar a reconhecer como substrato o adenilato difosfato (ADP) e, portanto formará o desoxiadenilato (dADP). Dessa maneira, os quatro desoxiribonucleotídeos foram sintetizados e poderão participar do processo de síntese de DNA. A enzima ribonucleotídeo redutase diminuirá sua atividade quando o dADP (último desoxiribonucleotídeo a ser sintetizado) competir com o ATP pela ligação ao sítio de regulação da enzima. Se o dADP acumula, isso serve como informação que a quantidade de desoxiribonucleotídeos está adequada e, portanto, a enzima pode diminuir a sua atividade.

O mecanismo de catalise da ribonucleotideo redutase é muito interessante. No sítio ativo da enzima encontramos duas cisteínas (aminoácidos com enxofre

no radical) e uma tirosina (aminoácido com uma hidroxila no seu radical). O primeiro passo da reação é a formação de um radical livre (molécula com elétron desemparelhado) com a saída de um próton H^+ da hidroxila da tirosina. Este radical será capaz de retirar um hidrogênio do carbono 3 da ribose. Uma cisteína irá doar um hidrogênio para a hidroxila do carbono 2 da ribose, o que permitirá uma saída de água. O carbono 2 e 3 estarão fazendo apenas 3 ligações, sendo que o carbono 3 perdeu um hidrogênio e o carbono 2 perdeu uma hidroxila. Os próximos passos são a reconstituição das ligações dos carbonos da ribose. O carbono 2 recebe um hidrogênio de uma outra cisteína do sítio ativo da enzima e, dessa maneira, as duas cisteínas fazem uma ligação tioester entre elas. O carbono 3 recebe o hidrogênio de volta do radical livre e dessa forma temos a produção do desoxiribonucleotídeo.

Para que a enzima possa continuar a funcionar é necessária que ela seja reduzida e, assim, as cisteínas recebam novamente os hidrogênios que irão participar da catalise. A redução dessa enzima é realizada por duas outras enzimas que sobrepõe suas funções, ou seja, na ausência de uma delas a outra poderá exercer a função. Tanto a tireoredoxina quanto a glutareodoxina retiram elétrons na forma de hidrogênio do NADPH e passam esses elétrons (na forma de hidrogênio) para as cisteínas da ribonucleotídeo redutase.

6.2.5. A SÍNTESE DA DESOXTIMIDILATO

Como vimos acima, a ribonucleotideo redutase irá formar os desoxiribonucleotídeos, mas o timidilato ainda não foi sintetizado. No mundo primitivo, no qual ocorreu a troca de RNA para DNA, devido ao fato do último ser mais estável, pois não apresentava um oxigênio ligado ao carbono 2, as bases nitrogenadas presentes no DNA deviam ser adenina, guanina, citosina e uracila. Essa hipótese é colocada devido ao fato da ribonucleotideo redudate formar desoxiuridilato difosfato (dUDT) e não timidilato difosfato (dTDP).

O surgimento de timina foi importante para estabilizar ainda mais a informação genética e diminuir a taxa de mutação dos organismos. A diferença da uracila e da citosina é a presença de um grupamento amina na citosina. Como vimos durante toda essa aula, a ligação de um grupamento amina necessita o importe de energia na reação que é realizada com a quebra de uma ligação fosfato do ATP. Se a ligação da amina necessita de energia, a quebra dessa ligação será espontânea e poderá ocorrer na presença de água. Portanto, a citosina é constantemente desaminada o que leva a formação de uracilas. Se a uracila fosse a base nitrogenada encontrada no DNA, não teríamos como diferenciar entre uma uracila normal presente no DNA daquela que fosse fruto da desaminação da citosina. Dessa maneira, poderíamos ter um genoma formado basicamente por adeninas e uracilas já que as citosinas com o tempo iriam se transformar em uracilas. Para evitar esse risco, a uracila não é uma base nitrogenada do DNA e sim a timina.

A diferença entre a timina e a uracila é a presença de um grupamento metil na timina. A enzima timidilato sintetase irá catalisar a reação de metilação

da uracila e, para tanto, ela utiliza como cofator o tetra hidrofolato. Como vimos antes nessa aula, o tetrahidrofolato transporta carbonos que não estão completamente reduzidos, ou seja, ele não transporta um grupamento metil. Mas como ele atua então? O N-5-N10-metileno tetrahidrofolato irá transferir um grupo metileno (CH_2) que ele transporta normalmente; mas além do metileno ele irá utilizar um hidrogênio da sua molécula para passar o grupamento metil (CH_3). Ao perder um hidrogênio de sua estrutura normal, o que forma o 7,8-dihidrofolato, a molécula tem que ser regenerada para voltar a ser utilizada em uma nova reação da timidilato sintase.

6.2.6. A SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS COMO ALVO DA QUIMIOTERAPIA

A síntese de nucleotídeos é um excelente alvo para o tratamento do câncer, pois as células cancerosas estão em multiplicação constante e necessitam de uma grande síntese de nucleotídeos. Um dos melhores alvos para a quimioterapia é a síntese do timidilato, pois a inibição dessa via irá afetar apenas células em replicação uma vez que a timina só é encontrada no DNA. Um dos medicamentos utilizados é a flúor-uracila que funciona como um inibidor suicida da timidilato sintetase[4]. Além do flúor-uracila, também é utilizado o metrotrexato que é um inibidor da enzima que regenera o tetrahidrofolato. O metrotrexato é um inibidor competitivo, ou seja, ele é similar ao substrato. Como vimos na aula de enzimas em bases moleculares I, um inibidor competitivo irá competir com o substrato pelo sítio catalítico da enzima e se a concentração do substrato aumenta, ele poderá deslocar o inibidor da enzima. É comum em tumores o surgimento de células resistentes ao metrotroxato e isso ocorre devido a amplificação do gene responsável pela síntese da enzima responsável pela regeneração do tetrahidrofolato. Com o aumento da quantidade de enzima, a quantidade de inibidor fica insuficiente para bloquear a enzima.

O processo de quimioterapia irá interferir no crescimento das células tumorais, mas também irá impedir a replicação de células normais. É por essa razão que ocorrem os efeitos colaterais da quimioterapia como queda de cabelo, diarréias e deficiência do sistema imune, pois as células do cabelo, do intestino e do sistema imune estão em constante multiplicação e serão bloqueadas com o tratamento.

Complemento da aula:

- No moodle vocês encontrarão algumas animações sobre os temas discutidos nessa aula.
- Além disso, diferentes figuras estão a disposição para maior compreensão da aula.

4 - veja em seu livro base como atua esse medicamento

Autoavaliação:

1) Como funciona o Piridoxal fosfato na oxidação dos aminoácidos?
2) Qual o papel do glutamato na oxidação dos aminoácidos?
3) Quais são os passos do ciclo da uréia?
4) O que é a bicicleta de Krebs?
5) O que são aminoácidos cetogênicos e glicogênicos?
6) Com relação à síntese de purinas e pirimidinas responda:
   a) quais são os passos da síntese?
   b) como elas são reguladas?
7) Qual o mecanismo de ação e a regulação da enzima ribonucleotídeo redutase?
8) A quimioterapia de tumores ataca diretamente a síntese de nucletídeos. Com relação a isso responda:
   a) Indique duas substâncias que podem ser utilizadas como quimioterapicos e como eles agem.
   b) Por que as células tumorais são sensíveis à quimioterapia?
   c) Por que ocorrem os efeitos colaterais da quimioterapia?

7 A natureza do material genético: história da descoberta do dna

AULA 7: A NATUREZA DO MATERIAL GENÉTICO – HISTÓRIA DA DESCOBERTA DO DNA

Ao final desta aula você deverá:

- Conhecer os pontos chaves da história da descoberta do DNA
- Entender como é a estrutura do DNA
- Conhecer como foram desenvolvidas algumas das ferramentas utilizadas na biologia molecular

Nessa aula iremos acompanhar os pontos chaves das pesquisas sobre o DNA e o papel dessa molécula na transferência da informação genética.

7.1. OS PRIMÓRDIOS DO ESTUDO SOBRE O DNA

Os estudos sobre a transferência da informação genética iniciam com os trabalhos de Mendel em 1866. Ele realizou estudos com ervilhas e verificou o que ocorria quando realizava cruzamentos entre plantas com características diferentes. Ele escolheu sete características que eram fáceis de serem distinguidas, tais como: cor de semente (verde ou amarela), tamanho da planta (alta ou baixa) e estilo da semente (lisa e rugosa).

Ao cruzar as plantas com sementes verdes ou amarelas, não encontrava plantas que tinham mistura das duas cores, mas sim plantas que só tinham sementes amarelas. Quando cruzava as plantas dessa primeira geração, ele obtinha 75% de plantas com sementes amarelas e 25% plantas com sementes verdes. Esses dados levaram Mendel a propor leis de hereditariedade, no qual os fenótipos observados (características da planta) são determinados pelo genótipo que pode ter alelos dominantes e recessivos (veja com mais detalhes as leis de Mendel na aula 11 de bases moleculares 1). Mas Mendel não tinha condições de mostrar quem compunha o genótipo que era o responsável pela transferência da informação genética.

Em 1869, Friedrich Miescher escreve o seu trabalho em que pela primeira vez era identificado o DNA, o qual ele denominou de nucleína. Ele procurava entender a química das células e, para tanto, ele estava trabalhando com as células brancas do sangue. Ele trabalhou com o pus que obtinha de curativos que eram descartados em hospitais, os quais são cheios de células do sistema imune. Primeiramente, ele tratou os curativos com uma solução salina para retirar as células e limpá-las, depois tratou o isolado com uma solução alcalina que rompia as células e levava a deposição de um precipitado que continha o núcleo das células. Do núcleo das células ele foi capaz de isolar um único

composto químico, o qual ele denominou de nucleína. Uma informação importante que ele obteve é que todas as células que ele estudava possuíam o mesmo composto químico no núcleo. A característica marcante da nucleína era a grande presença de fosfato nessa molécula e como naquela época ele não tinha informações que permitisse definir uma função para aquela molécula, ele supôs que a nucleína funcionasse como um reservatório de fosfato para a célula.

Portanto, já no final do século XIX os cientistas mostravam que as características fenotípicas de um indivíduo eram determinadas pelo seu genótipo e que o núcleo da célula continha uma molécula que era rica em fosfato, mas ainda não tinham informações que os permitissem associar aquela molécula encontrada no núcleo como a responsável por transferir as informações genéticas que levariam ao fenótipo de uma célula.

7.2. NA PRIMEIRA METADE DO SÉCULO XX, NOVOS PASSOS SÃO DADOS NA HISTÓRIA DA PESQUISA DO DNA

Em 1911, estudos realizados no laboratório de Thomas Hunt Morgan com drosofilas (mosca das frutas) comprovavam os dados obtidos por Mendel, mas acrescentaram um novo aspecto nas leis da hereditariedade que era a herança ligada ao sexo, o que Morgan chamou de herança limitada pelo sexo.

O estudo começou quando em seu laboratório eles descobriram uma mosca macho de drosófila que apresentava uma alteração: olho branco ao invés de olhos vermelhos que eram normalmente presentes nestes insetos. Imediatamente, eles fizeram o cruzamento desse macho com uma fêmea que apresentava olhos vermelhos e ele obteve na primeira geração de drosofilas todos os animais com olhos vermelhos. Quando ele cruzou fêmeas e machos da primeira geração, ele obteve uma proporção de 75 % de moscas com olhos vermelhos e 25% de moscas com olhos brancos na segunda geração. Os mesmos dados que tinham sidos obtidos por Mendel com as ervilhas, o que mostrava que o olho branco era um caractere recessivo e o olho vermelho era dominante. Entretanto, um dado curioso obtido por Morgan era que todos os animais de olhos brancos eram sempre machos. Como não surgiam fêmeas de olhos brancos, Morgan concluiu que esse caráter estaria limitado pelo sexo e, assim, estariam ligados a um fator X. Apesar de limitado pelo sexo, se cruzamentos adequados fossem realizados era possível obter fêmeas de olhos brancos. Em um trabalho posterior, Morgan postulou que os genes que levavam a informação para cor do olho estavam arranjados em linha com os genes responsáveis pela determinação do sexo. Apesar de ainda não falar em cromossomos, o conceito já estava implícito nos conceitos colocados por Morgan.

Um discípulo de Thomas Hunt Morgan, Hermann Muller continuou os trabalhos com drosofila e os mutantes. Ele sabia que as diferenças de fenótipos que eles

tinham observado (como olho branco nas moscas) eram devido a mutações em genes. Entretanto, nessa época eles não sabiam o que formavam os genes. O que Hermann Muller pretendia era aumentar a freqüência que os mutantes apareciam, uma vez que a freqüência natural era muito pequena. Para tentar aumentar esse número, ele utilizou raio-X que ele sabia ser capaz de causar mutações nos cromossomos. De fato, ele foi capaz de provar que os Raio-X eram capazes de acelerar o surgimento dos mutantes. Dessa maneira, comprovou-se que os genes poderiam ser modificados e que essas modificações podem levar a alterações dos fenótipos.

Um avanço importante no estudo sobre a relação dos genes com as enzimas foi realizado pelos pesquisadores George Beadle e Edward Tatum, que em 1941 mostraram a associação entre um gene e uma enzima. Eles tentavam provar a hipótese de Archibald Garrod de que as doenças hereditárias eram devido a erros inatos do metabolismo. Eles trabalharam com o fungo *Neurospora crassa* que apresentavam algumas propriedades importantes para os experimentos que eles iriam realizar, pois, o fungo é capaz de crescer em um meio mínimo sintético que é possível saber o que esta presente. Para crescer nesse meio, o fungo necessita possuir enzimas que sejam capazes de transformar os componentes do meio em aminoácidos, vitaminas e lipídeos essenciais para o crescimento. Além disso, o fungo apresenta um genoma haplóide, ou seja, tem apenas um alelo de cada gene e, assim, eles não teriam o problema de dominância que os experimentos de Mendel mostravam.

Beadle e Tatum postulavam que os genes iriam sintetizar as enzimas necessárias para o crescimento do fungo e caso eles sofressem alguma mutação poderiam perder a capacidade de crescer no meio mínimo. Para acelerar o processo eles submeteram o fungo ao raio-X, uma vez que Hermann Muller havia provado que os raio-X eram capazes de provocar mutações no cromossomo. Eles irradiaram diversas culturas de fungo e os colocaram para crescer em um meio completo, ou seja, com todos os aminoácidos, vitaminas, carboidratos, lipídeos e nucleotídeos. Eles esperavam que os fungos irradiados se sofressem alguma mutação em genes que codificavam enzimas envolvidas com o metabolismo perderiam a capacidade de crescer em um meio mínimo. Os fungos irradiados, após crescerem no meio completo, eram transferidos para um meio mínimo e se verificava o crescimento. Eles irradiaram diversas culturas e apenas a cultura 299 não foi capaz de crescer em um meio mínimo. De posse desse mutante, eles foram verificar qual a deficiência que ele apresentava e, para tanto, eles colocaram o mutante em um meio mínimo contendo aminoácidos ou vitaminas. O mutante 299 só foi capaz de crescer quando as vitaminas foram adicionadas ao meio, o que mostra que o mutante era capaz de sintetizar todos os aminoácidos, mas era incapaz de sintetizar uma das vitaminas. O próximo passo foi determinar qual vitamina era essencial para o crescimento do fungo. Eles cultivaram o fungo mutante no meio mínimo contendo diferentes vitaminas e verificaram que ele só foi capaz de crescer quando se adicionava a vitamina B_6, o que indicava que o mutante era incapaz de sintetizar essa vitamina, pois teve uma deficiência em um gene que sintetizava uma enzima envolvida no metabolismo da vitamina B_6.

Beadle e Tatum obtiveram diversos mutantes que permitiram estabelecer

diversas vias bioquímicas e comprovaram que cada enzima estava relacionada a um gene. Um exemplo desse estudo é a síntese do aminoácido arginina que vimos na aula passada. Para a síntese desse aminoácido temos como precursores os aminoácidos ornitina e citrulina. Como vimos no ciclo da uréia a ordem do processo de síntese é:

Ornitina → citrulina → arginina

Foram obtidos diferentes mutantes do fungo *Neurospora crassa* que só eram capazes de crescer quando o aminoácido arginina fosse acrescentado ao meio. Na postulação feita pelos autores, se cada enzima fosse sintetizada por um gene, poderíamos encontrar mutante que não fosse capaz de sintetizar a ornitina, outro que não fosse capaz de sintetizar a citrulina e, por fim, um terceiro mutante que não fosse capaz de sintetizar a arginina. Como provar isso? Os mutantes foram crescidos no meio mínimo suplementado com cada um dos aminoácidos mencionados acima. O mutante X não foi capaz de crescer quando era adicionado ao meio ornitina ou citrulina, mas era capaz de crescer quando a arginina era adicionada. O mutante Y foi capaz de crescer na presença de citrulina e arginina, mas não quando era acrescentado a ornitina. Já o mutante Z foi capaz de crescer quando era acrescentado qualquer um dos três aminoácidos. Esses dados mostraram que o gene X codifica a enzima responsável por sintetizar a arginina. A mutação do gene Y impedia a síntese da enzima que catalisa a reação de formação de citrulina e, assim, ele crescia na presença de citrulina. Como o mutante Y possuía a enzima codificada pelo gene X, ele era capaz de crescer na presença de citrulina, pois era capaz de transformar a citrulina em arginina. Uma vez que a arginina ó produto final da via, todos os mutantes são capazes de crescer quando ela é adicionada. O mutante Z era deficiente no gene que codificava a enzima responsável pela formação da ornitina e como esta era o primeiro passo da via bioquímica, o mutante Z era capaz de crescer na presença de qualquer um dos três aminoácidos. Se a ornitina fosse acrescentada, o mutante possuía os genes necessários para a síntese de arginina. O mesmo ocorre quando se adiciona a citrulina e arginina. Como vemos, o estudo com mutantes permitiu o esclarecimento de diversas vias bioquímicas e isso só é possível devido ao fato que um gene é responsável pela síntese de uma enzima.

7.2.1. O PRINCIPIO TRANSFORMANTE

Em 1928, Fred Griffith obteve dados muito interessantes trabalhando com a bactéria *Pneumococcus*. Essa bactéria é capaz de crescer no laboratório em um meio de cultura e, também, é capaz de crescer em camundongos onde pode causar uma pneumonia letal. Em seu trabalho, Griffith verificou que existiam dois tipos de bactérias que ele denominou de lisa e rugosa. As bactérias lisas possuem uma parede celular constituída basicamente de carboidratos, enquanto as rugosas não possuem essa parede.

Ao estudar esses dois tipos de bactérias, verificou-se que as bactérias lisas eram capazes de desenvolver uma infecção o que pode levar a morte do hospedeiro. Já as bactérias rugosas não eram capazes de desenvolver uma infecção letal. Essa diferença ocorre porque a parede bacteriana é importante para que esse organismo seja capaz de se defender da resposta imune do hospedeiro. Na ausência dessa parede, o sistema imune é capaz de atacar a bactéria e impedir que se desenvolva uma infecção que seja letal para o organismo.

Nos experimentos de Griffith, a bactéria lisa foi submetida a um tratamento com calor e verificou-se que essas bactérias já não eram mais capazes nem de crescer em meio de cultura no laboratório, nem de causar uma infecção letal em camundongos. Esse experimento mostrava que a replicação da bactéria era fundamental para a infecção e morte do hospedeiro.

De posse de duas bactérias que não eram capazes de levar a morte do hospedeiro (a bactéria rugosa, sem a parede bacteriana e bactéria lisa inativada pelo calor), Griffith resolveu infectar um camundongo com as duas bactérias não letais. Para a sua surpresa, após alguns dias, os camundongos infectados com as duas bactérias não letais morreram com os mesmos sintomas verificados quando a infecção era realizada com as bactérias lisas. Após a morte do camundongo foi possível coletar amostras das bactérias que foram as responsáveis pela morte e estas foram cultivadas em laboratório. Quando analisou essas bactérias, Griffith verificou que estas eram bactérias lisas e que quando estas eram utilizadas em infecções em camundongos levava a morte do hospedeiro. Esses dados levaram Griffith a postular a presença de um princípio transformante que era capaz de transformar bactérias rugosas em bactérias lisas que eram letais para o hospedeiro. Esse princípio transformante era estável e capaz de ser passado de geração para geração, pois as bactérias transformadas eram capazes de crescer em meio de cultura e se manter letais após o cultivo.

Em 1944, os trabalhos de Griffith sobre o princípio transformante levaram o pesquisador Oswald Avery tentar identificar qual molécula em uma célula era o principio transformante. Em vez de trabalhar com bactérias mortas pelo calor, ele resolveu trabalhar com um lisado celular. Para obter o lisado, Avery tratou as bactérias com um detergente que foi capaz de romper as bactérias e produzir um lisado bacteriano que possuía os componentes celulares. Para ver se o lisado era capaz de transformar a bactéria, ele colocou o lisado na presença de bactérias rugosas em um meio de cultura. Após um tempo ele pode ver o surgimento de bactérias lisas o que mostrou que o lisado bacteriano possuía o princípio transformante que era capaz de transformar bactérias rugosas em lisas.

Ele já sabia que no lisado celular ele tinha proteínas, carboidratos (parede celular), o ácido ribonucléico (RNA) e o ácido desoxiribonucléico (DNA). Para ver qual dessas moléculas eram o principio transformante, ele começou a tratar o lisado com diferentes enzimas. No primeiro momento, ele tratou o lisado com uma enzima capaz de degradar os carboidratos. Ao colocar o lisado sem os carboidratos na presença da bactéria rugosa, ainda sim se observa a transformação das bactérias o que mostrou que os carboidratos não era

os responsáveis pelo principio transformante, ou seja, a transformação da bactéria não devia unicamente a formação de uma nova parede celular com os carboidratos presentes.

Após retirar os carboidratos do lisado, o mesmo foi tratado com proteases que degradaram as proteínas presentes. Quando colocadas juntos, o lisado sem carboidratos e proteínas ainda foi capaz de transformar as bactérias rugosas em bactérias lisas, o que demonstrava que o principio transformante não eram as proteínas.

Um passo importante no trabalho de Avery foi quando ao trabalhar com o lisado, ele utilizou álcool para precipitar os componentes do lisado e, nesse processo, ele foi o primeiro capaz de purificar os ácidos nucléicos de *Pneumococcus*. Como as proteínas e os carboidratos não eram capazes de transformar a bactéria, Avery supôs que os ácidos nucléicos eram o principio transformante, mas qual dos dois: RNA ou DNA? Para responder a essa pergunta ele tratou os ácidos nucléicos purificados de Pneumococcus com uma enzima (RNAase) que era capaz de degradar os ribonucleotídeos mas não degradavam os desoxiribonucleotídeos. Após o tratamento com RNAse o lisado continuava sendo capaz de transformar bactérias rugosas quando colocados no mesmo tubo de ensaio. Esses dados indicavam que o DNA devia ser o principio transformante e isso foi confirmado quando após o tratamento com uma DNAse (enzima que degrada os desoxiribonucleotídeos) o lisado perdeu a capacidade de transformar bactérias rugosas. Com esses resultados, Avery demonstrou que o DNA era o principio transformante.

Os dados de Avery foram confirmados pelo trabalho de Martha Chase e Alfred Hershey no início dos anos cinqüenta. Esses pesquisadores trabalhavam com bacteriófagos que são vírus que infectam bactérias. Eles sabiam que os bacteriófagos eram compostos por uma capa protéica que no seu interior continha a molécula de DNA. Eles também sabiam que os fagos interagiam com as bactérias e colocavam para dentro da bactéria os seus genes que fariam com que a bactéria se tornasse uma fábrica de produção de fagos. Eles resolveram testar com os fagos se as ideias de Avery estavam corretas e se o DNA era o responsável em transformar as bactérias em uma fábrica de produção de fagos. Experimentos anteriores tinham mostrado que o DNA continha fósforo, mas não possuía átomos de enxofre em sua estrutura. Já as proteínas possuíam o átomo enxofre, mas não continha nenhum átomo de fósforo. Assim, eles eram capazes de diferenciar as proteínas do DNA utilizando fósforo radioativo (P^{32}) que estaria presente no DNA, e enxofre radioativo (S^{35}) que marcaria as proteínas.

Os fagos radioativos foram utilizados para infectar bactérias não radioativas em tubos separados. Após deixar as bactérias expostas aos fagos tempo suficiente para que eles pudessem se ligar as bactérias e introduzir o principio transformante que permitirá a produção de novos fagos, os tubos foram chacoalhados para permitir a separação dos fagos das bactérias. Após isso, eles centrifugaram as amostras o que permitiu a separação das bactérias (mais pesadas) dos fagos (mais leves). Eles, então, analisaram a radioatividade presente nos fagos e nas bactérias. Quando eles analisaram o tubo contendo o

enxofre radioativo, eles não verificaram a presença de radioatividade junto com a bactéria e os fagos novos que foram gerados por essas bactérias também não continham radioatividade. Por outro lado, quando eles analisaram o tubo que continha o fósforo radioativo foi possível verificar que tanto as bactérias como os novos fagos produzidos por essas bactérias possuíam fósforo radioativo. Esses dados mostravam que o envelope protéico só serve para a proteção do DNA que contém todas as informações necessárias para a produção de novos fagos. Assim ficou provado que o DNA era o material genético.

7.3. COMO A ESTRUTURA DO DNA FOI DESVENDADA

A partir do momento que o DNA foi claramente identificado como a molécula que possuía as informações genéticas, os cientistas procuraram desvendar como era a estrutura da molécula que permitia que ela passasse as informações necessárias para a formação de um organismo.

O primeiro passo para desvendar a estrutura do DNA foi dada por Phoebus Levene que desvendou a estrutura dos nucleotídeos e acreditou que os mesmos estavam presente como uma estrutura de tetranucleotídeos (uma guanina, uma citosina, uma adenina e uma timina) que se uniam por uma ligação covalente entre o oxigênio do carbono 3 da desoxiribose com o fosfato ligado ao carbono 5 da desoxiribose formando uma estrutura em anel, como vemos na figura 1.

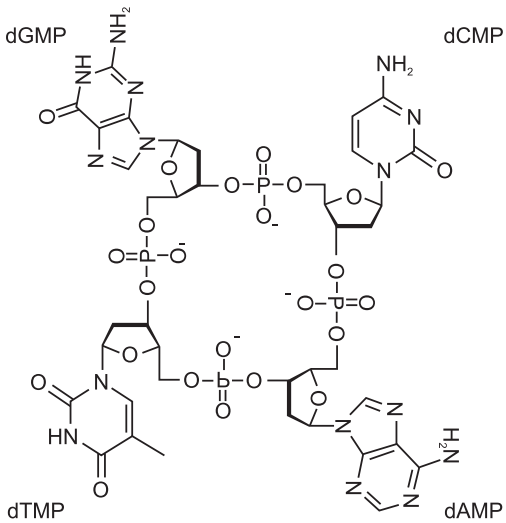


Figura 1: Modelo proposto por Levene sobre a estrutra do DNA. O DNA seria uma repetição dos quatro nucleotídeos que se uniriam por ligações fosfodiester.

A teoria de Phoebus Levene presumia que as quantidades de adenina, guanina, timina e citosina seriam similares em um organismo. Erwin Chargaff, no início dos anos 50, acreditava que o DNA era mais que um bloco repetitivo de tetranucleotideos e para provar isso ele purificou o DNA de diferentes organismos e mediu a quantidade das diferentes bases nitrogenadas presentes. Seus resultados mostraram que a concentração das bases não era similar nos diferentes organismos, mas o que mais chamava atenção nos dados de Chargaff era que a proporção de adeninas e timinas era sempre similar, o mesmo acontecendo com a proporção de citosina e guanina. Por exemplo, em leveduras existia a quantidade 1,8 de adenina e de 1,9 de timina, enquanto que as quantidades de citosina e guanina eram de 1. Já em células de timo de bezerro a proporção das bases era de 1,7 de adenina, 1,6 de timina, 1,2 de guanina e

1,0 de citosina. Os dados obtidos mostraram a Chargaff que a teoria de Levene estava equivocada e que ocorria nas células é que existia uma proporção entre as quantidades de adenina e timina (A=T) e na proporção de guaninas e citosinas (G=C) o que ficou conhecido como regra de Chargaff.

O ano de 1953 é um ano chave na história do DNA, pois é o ano no qual Watson e Crick publicam o seu trabalho em que descrevem a estrutura do DNA. Utilizando todas as informações disponíveis sobre a química do DNA, os dois pretendiam estabelecer qual seria a estrutura da molécula responsável pela transferência da informação genética.

De acordo com o trabalho de Levene, eles já sabiam qual era a constituição de um nucleotídeo, ou seja, um fosfato ligado a uma desoxiribose que se liga a uma base nitrogenada. Sendo que existiam quatro bases nitrogenadas, a adenina e guanina (purinas), além da citosina e timina (pirimidinas). Levene também tinha mostrado que ocorria uma ligação covalente em série entre o fosfato e o um açúcar adjacente com o próximo fosfato que se ligava ao próximo açúcar e assim por diante. Eles de imediato perceberam que apesar de acertar nas ligações químicas feitas pelo DNA, a teoria de Levene de uma estrutura de tetranucleotídeos não seria compatível com uma molécula que teria de ser "inteligente" para transferir uma informação, o que não é o caso de uma repetição de tetranucleotídeos. Portanto, a sequência do DNA não poderia ser fixa e, sim, ser variável para que fosse possível passar diferentes informações.

Na década de 40, Linus Pauling tinha utilizado da técnica de difração de raios X para desvendar a estrutura secundária de proteínas como a alfa-hélice. Nessa técnica usa-se um cristal (material que precipita de forma organizada e repetitiva), o qual é irradiado com raios-X. Como o cristal é uma estrutura organizada, os raio X irão colidir com os átomos presentes na estrutura do cristal e serão desviados de acordo com a posição desses átomos. Os raios-X desviados irão ser absorvidos em um filme fotográfico que irá mostrar uma figura que representa a disposição dos átomos na molécula que se esta estudando. No início dos anos 50, alguns grupos estavam tentando obter o padrão de difração de raios-X da molécula de DNA. Além do próprio Linus Pauling, a obtenção do padrão de difração dos raios-X da molécula do DNA estava sendo realizada por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins. Naquela época, apesar do DNA ainda não poder ser cristalizado, era possível a obtenção de duas fibras de DNA que produziam um padrão de difração de Raios-X como mostrado na figura 2. Podemos ver que um padrão era mais complexo e possui mais pontos que o outro padrão. Rosalind Franklin acreditava que o padrão mais complexo poderia trazer mais informações sobre a estrutura do DNA e estudou esse padrão de difração de raios-X.

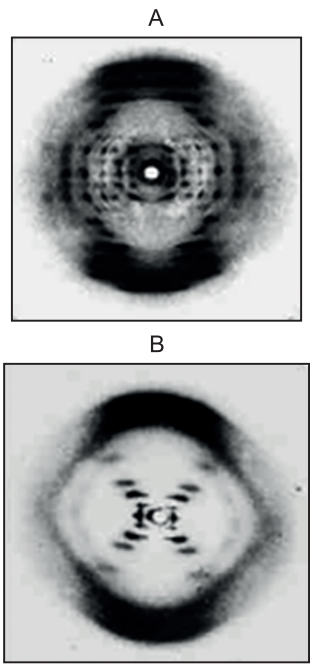


Figura 2- Padrão de difração de Raio-X obtidas por Rosalind Franklin. O padrão A foi estudado por Rosalind Franklin, enquanto que o padrão B foi estudado por Watson e Crick.

Enquanto Rosalind Franklin se concentrava no padrão mais complexo de difração de Raios-X do DNA, Crick se surpreendeu com a simplicidade do padrão simetria do outro padrão de difração de Raios-X e concluiu que ali estavam todas as informações necessárias para desvendar a estrutura do DNA. O X presente na fotografia de Raios-X era um indicador da estrutura de uma hélice. Em uma difração de Raios-X, quanto mais perto os pontos, mais distantes estão os átomos. Por essa razão, eles acreditavam que as barras verticais presente nas imagens representavam a altura da volta da hélice. Como eles sabiam que a altura da volta da hélice era 34 A e que a distância de cada nucleotídeo empilhado é por volta de 3.4 A, eles postularam que teria 10 nucleotídeos por volta de hélice no DNA. Este padrão de Raios-X levou Crick a postular que a estrutura do DNA era uma dupla hélice com os fosfatos voltados para o exterior da hélice e as bases presentes no interior (veja como ele obteve essas informações na figura 3). Esta proposição era o oposto do que Linus Pauling havia feito em seu modelo de tríplice hélice do DNA, no qual os fosfatos estavam presentes no interior da hélice e as bases nitrogenadas para fora. O que Pauling não levou em consideração em seu modelo era o fato que os oxigênios associados aos fosfatos possuem carga negativa e estando eles dispostos um em cima do outro levaria a uma repulsão de cargas que não permitia que o modelo fosse viável.

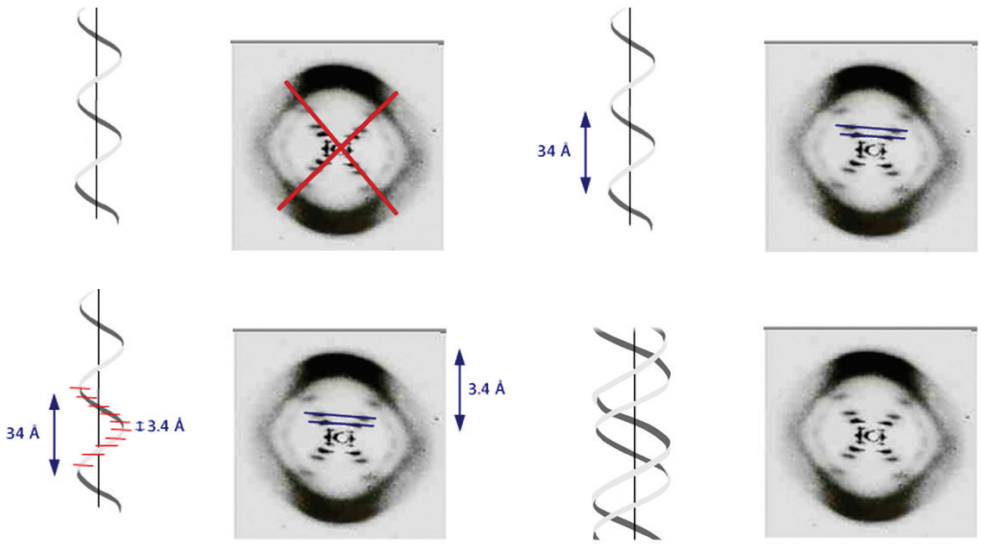


Figura 3 – Análises do padrão de difração de Raio-X obtidas por Rosalind Franklin que levaram Crick a postular a dupla hélice do DNA.

Apesar do grande avanço proporcionado pelas análises realizadas com a difração de Raios-X, algumas questões permaneciam em aberto, tais como: o que mantinha as hélices unidas? Como estavam dispostas as bases nitrogenadas? Usando bases nitrogenadas cortadas em papel, Watson começou a trabalhar com elas. Ele sabia que as bases nitrogenadas deviam estar unidas por pontes de hidrogênio e não ligações covalentes como acontecia com as ligações fosfato-ribose de uma fita de DNA. Ele emparelhava as bases de acordo com as pontes de hidrogênio que elas poderiam realizar e verificava o tamanho que

o pareamento de base formava. Por exemplo, o pareamento de base adenina com guanina era maior do que aquele formado por timina e citosina. Se esse fosse o pareamento correto presente no DNA, a estrutura do mesmo não seria uniforme e a hélice deveria apresentar protuberâncias, o que não era o caso. Em um momento de inspiração, ele deduziu que o pareamento de base deveria ser entre uma purina com uma pirimidina (adenina com timina e guanina com citosina) que produziria um pareamento de comprimento similar e, além do mais, estaria de acordo com a regra de Chargaff de que as quantidades de adeninas eram similares as de timinas, e as de guaninas eram similares as de citosinas. A adenina é capaz de realizar duas pontes de hidrogênio com a timina e a guanina realiza três pontes de hidrogênio com a citosina. Neste ponto, Watson verificou que esse pareamento de bases era a chave para a estrutura do DNA com o que Crick concordou. A análise dos ângulos que eram realizados e a proximidade das bases levaram Crick a concluir que esse pareamento de bases só era possível se as fitas da dupla hélice do DNA fossem antiparelas, ou seja, corressem em sentidos opostos.

Com todas as informações acima, Watson e Crick montaram uma estrutura tridimensional do DNA com sucata de metal de 1 metro e oitenta e todos que viram o modelo, incluindo a Rosalind Franklin, concordaram que aquele modelo estava correto. Eles escreveram um artigo para revista Nature de 900 palavras nas quais eles descreviam a estrutura do DNA. Além de descrever como era a estrutura do DNA, eles postulavam como poderia ocorrer a duplicação do DNA de acordo com a estrutura do mesmo.

Vamos ver quais são todas as características do modelo de Watson e Crick para a estrutura do DNA. Podemos pensar no modelo com uma escada em espiral, essa escada pode ser dividida em duas partes que se juntam. O corrimão da escada é formado pelo esqueleto ribose-fosfato que estão unidos por ligações covalentes. A ligação é feita entre a hidroxila do carbono 3 com o fosfato que esta ligado ao carbono 5 da ribose, dessa maneira, teremos em uma ponta desse corrimão a hidroxila do carbono 3 livre, sem fazer nenhuma ligação, e na outra ponta o fosfato do carbono 5 não faz nenhuma ligação. Por essa razão, é que se diz que existe uma extremidade 5′ (aquela que contém o fosfato associado ao carbono 5 sem fazer ligação) e uma extremidade 3′ (aquela que contém a hidroxila associada ao carbono 3 sem fazer ligação). Associado a um corrimão esta presente metade dos degraus da escada que é formado pelas bases nitrogenadas. A união da escada é feita pelos degraus, ou seja, a base nitrogenada que esta associada a um corrimão irá se unir a outra base nitrogenada que esta presa no outro corrimão. A adenina se ligará por duas pontes de hidrogênio com a timina e a citosina se unirá através de três pontes de hidrogênio com a guanina (esta estrutura do DNA pode ser vista na figura 4). Um aspecto importante dessa estrutura esta relacionada com a direção que os dois corrimões apresentam na escada. Vamos imaginar que o corrimão seja uma cobra, ou seja, apresenta uma cauda e uma cabeça, A cabeça corresponde a parte que apresenta o fosfato livre (5`) e a cauda a parte que apresenta a hidroxila livre (3′). No modelo de dupla hélice do DNA, os corrimões correm em direções opostas no qual um esta com a cabeça (5`) para baixo e a cauda para cima (3′), enquanto o outro corrimão corre em direção oposta, ou seja, com a cabeça para cima (5′) e a cauda para baixo (3′).

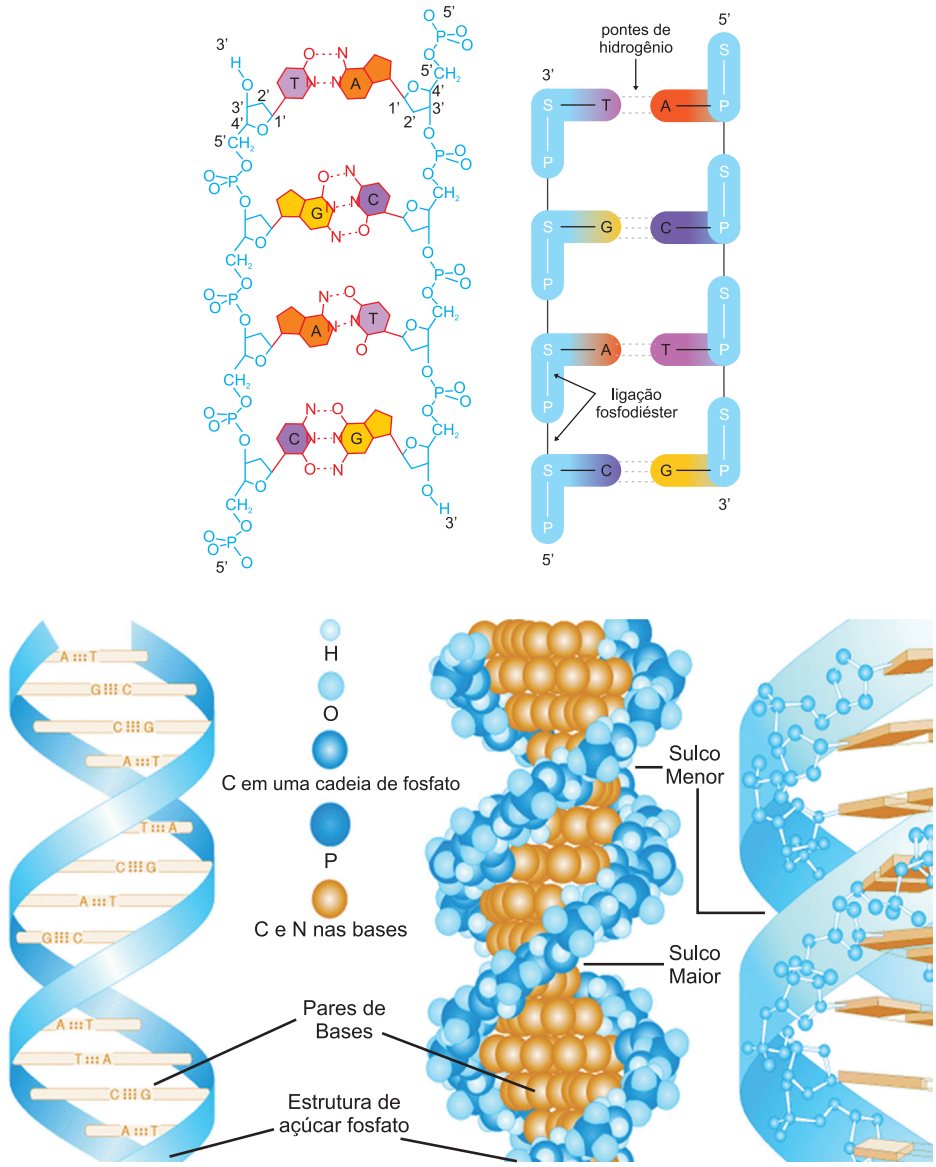


Figura 4 – Diferentes visões do modelo de dupla hélice do DNA proposto por Watson e Crick.

O pareamento de bases indicou para Watson e Crick qual seria o modelo de replicação do DNA, pois se sempre a adenina pareia com a timina e a citosina com a guanina, para refazer a molécula é só usar como molde uma das partes da escada. As ligações entre as duas hélices são realizadas pelas pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e, como as interações de hidrogênio não são fortes, elas podem ser desfeitas. Assim, a dupla hélice pode ser separada em duas fitas simples. Vamos imaginar a seguinte sequência de bases do DNA (sendo Adenina indicada por A, Citosina por C, Guanina por G e Timina por T): 5´ - ACTGTTATGT – 3´ . Essa sequência estará pareada com a seguinte sequência do DNA formando uma dupla fita: 3´ - TGACAATACA – 5´ (nessa dupla fita do DNA podemos ver que as fitas ocorrem em direções opostas e elas são mantidas unidas pelas as pontes de hidrogênio entre as bases).

Vemos no esquema abaixo como o pareamento de bases permite duplicar essa molécula:

5' A - T 3' C - G T - A G - C T - A T - A A - T T - A G - C 3' T - A 5'	As pontes de hidrogênios são desfeitas e as fitas são separadas	5' A C T G T T A T G 3' T	T 3' G A C A A T A C A 5'	Na duplicação do DNA, uma fita serve de molde para síntese de uma nova. Isso ocorre por quer o pareamento de bases permite isso.	5' A - T 3' C - G T - A G - C T - A T - A A - T T - A G - C 3' T - A 5'	5' A - T 3' C - G T - A G - C T - A T - A A - T T - A G - C 3' T - A 5'

O trabalho de Watson e Crick foi o marco do surgimento da biologia molecular e como veremos a seguir este trabalho permitiu uma grande revolução.

7.4. A BIOLOGIA MOLECULAR APÓS A DUPLA HÉLICE DO DNA

A dedução da estrutura do DNA foi um grande avanço para o desenvolvimento da biologia e permitiu que várias hipóteses fossem testadas e comprovadas.

Um experimento importante foi realizado por Seymour Benzer no ano de 1954. Até a metade do século passado, acreditava-se que os genes fossem como contas em um colar e que não seria possível ocorrer recombinação dentro dos genes, mas que ela só ocorreria no espaço entre os genes.

Com a estrutura do DNA desvendada, ficou claro para Benzer que como os genes eram formados pela sequência de nucleotídeos, o DNA poderia ser divisível em qualquer região seja dentro do gene ou não. Para provar sua colocação, Benzer se utilizou de fagos mutantes. Ele possuía fagos que eram mutantes para uma mesma característica, sendo que as mutações poderiam ocorrer em regiões diferentes do gene. Se a sua proposição estivesse correta, dois fagos com mutações em locais diferentes do gene poderiam sofrer recombinação e produzir um fago que tivesse a característica selvagem. E, de fato, quando ele infectou uma bactéria com fagos contendo diferentes mutações em um mesmo gene foi capaz de obter fagos que apresentavam características similares ao de fagos selvagens o que mostrou que a recombinação poderia ocorrer dentro do gene.

Na publicação do artigo na revista Nature, Watson e Crick tinham postulado que a replicação do DNA era semi-conservativa, ou seja, a dupla fita do DNA serve como molde para síntese de uma nova molécula de DNA. Dessa maneira, no DNA duplicado devemos encontrar uma fita correspondente à fita antiga (fita molde ou mãe) e uma fita nova que foi sintetizada (fita nova ou filha). A proposição deles foi baseada na estrutura do DNA, mas eles não tinham nenhum experimento que comprovasse essa teoria. Em 1957, Mesensol e Stahl

bolaram um experimento que permitiu comprovar que a duplicação do DNA ocorria de modo semi-conservativo.

Eles cresceram uma bactéria em um meio contendo nitrogênio 15 que é uma forma de nitrogênio mais pesada que o nitrogênio 14, o qual é a forma normalmente encontrada na natureza. As bactérias cultivadas nesse meio continham no seu DNA apenas bases nitrogenadas contendo nitrogênio 15, o que tornava essa molécula mais pesada que o DNA de uma bactéria cultivada em um meio de cultura normal. Depois, eles colocaram a bactéria que estava crescendo em um meio com nitrogênio 14 e deixaram nesse meio por tempo suficiente para que a bactéria duplicasse. Após esse tempo, uma amostra da bactéria foi retirada. Depois de deixar a bactéria no meio com nitrogênio 14 o tempo necessário para mais uma duplicação, uma nova alíquota foi retirada. Dessa maneira, eles tinham quatro amostras de bactérias: uma crescida em meio contendo nitrogênio quinze, uma crescida em meio contendo nitrogênio quatorze no tempo necessário para uma duplicação, outra que ficou no meio com nitrogênio quatorze pelo tempo necessário para duas duplicações e, por fim, uma bactéria crescida em meio contendo só o nitrogênio quatorze. O DNA das quatro amostras foi extraído e foi feita uma centrifugação em um tubo. Os dados que eles obtiveram foram os seguintes: no tubo com DNA de bactéria crescido em nitrogênio 15 obteve-se uma banda de DNA que migrou mais. A banda de DNA da bactéria que cresceu em meio contendo nitrogênio quatorze foi a que apresentou a menor migração. A amostra de DNA da bactéria que cresceu pelo tempo de uma duplicação apresentou uma banda intermediária entre as duas anteriores. Já o DNA da bactéria que cresceu pelo tempo de duas duplicações em meio com nitrogênio quatorze, apresentou duas bandas: uma similar ao DNA da bactéria crescida em meio com nitrogênio quatorze e a outra similar a verificada ao DNA da bactéria que cresceu pelo tempo de uma duplicação.

Mesensol e Stahl deduziram que esses dados corroboravam a hipótese da replicação semi-conservativa postulada por Watson e Crick. A banda intermediária verificada com a amostra de DNA crescida pelo tempo de uma duplicação correspondia a uma fita pesada e a uma fita leve o que mostrava a semi-conservação da replicação. Quando esse DNA era duplicado gerava um DNA com uma fita leve e uma pesada (banda intermediária) e também um DNA com as duas fitas leves (banda do tamanho da amostra crescida na presença de nitrogênio quatorze). Apesar de eles confirmarem que a replicação era semi-conservativa, eles não tinham ideia de como esse processo ocorria.

O mecanismo de replicação do DNA começou a ser desvendado por Arthur Kornberg no mesmo ano que Mesensol e Stahl realizavam os seus experimentos. Kornberg purificou a DNA polimerase de *Escherichia coli* e foi capaz de fazer experimentos de polimerização *in vitro*. Nesses experimentos ele colocava em um tubo com uma solução salina: a enzima, um DNA, os quatro desoxiribonucleotídeos, sendo que a timina utilizada era radioativa, o que permitia monitorar a síntese da nova molécula de DNA. Após um tempo de incubação, a timina era incorporada em polinucleotideos indicando a formação de uma nova molécula de DNA. Ele verificou que a omissão de qualquer um dos desoxinucleotídeos impedia a replicação do DNA. Além dos desoxiribonucleotídeos era essencial a presença da molécula de DNA, uma vez

que se utilizasse a DNAse (enzima que quebra o DNA) antes do processo de polimerização não se verificava a formação de moléculas radioativas no tubo de ensaio. Com esses dados, Kornberg mostrava que a polimerização do DNA dependia de um molde como havia previsto Watson e Crick e que a enzima DNA polimerase era a responsável pelo processo.

Além de desvendar a estrutura do DNA, Crick teve papel importante em vários outros momentos da história do DNA. Ainda na década de cinqüenta, ele postula o dogma central da Biologia. Já era de conhecimento de todos que o DNA era responsável pela transferência da informação genética e que as proteínas executam as funções celulares. Crick acreditava que o DNA funcionava como um código que permitia a síntese de proteína. Entretanto, ele via que o DNA estava presente no núcleo da célula e a síntese de proteína ocorria no citosol da célula, então, como o código presente no DNA poderia ser descodificado para proteína? Para responder esse problema, ele propôs o dogma central da biologia que diz que a informação do DNA é transformada em proteínas via uma molécula carreadora. Ele acreditava que o RNA poderia exercer essa função, pois ele estava presente tanto no núcleo quanto no citoplasma. Portanto, o dogma central da biologia pode ser mostrado da seguinte maneira:

DNA → RNA → Proteína

7.5. A DESCOBERTA DE DIVERSAS FERRAMENTAS UTILIZADAS NA BIOLOGIA MOLECULAR

As técnicas de biologia molecular que são utilizadas hoje tiveram um grande incremento com os experimentos que permitiram a clonagem de genes e a transferência dos mesmos para os organismos. Nessa parte final da aula discutiremos os plasmídeos, enzimas de restrição e o primeiro experimento de clonagem.

7.5.1. OS PLASMÍDEOS

Após os trabalhos de Avery que mostrou que o DNA era o responsável pela transformação de bactérias, Joshua Lederberg e Edward Tatum procuraram entender como o DNA de uma bactéria era capaz de passar para outra bactéria. Tatum, em seu laboratório, dispunha de uma série de mutantes bacterianos que apresentavam deficiência para crescer em meio de cultura que não contava com alguns aminoácidos e vitaminas. Ele obteve esses mutantes do mesmo jeito que ele obteve os mutantes do fungo *Neurospora*. Eles estavam trabalhando com dois mutantes, o mutante 1 que era incapaz de crescer na ausência dos aminoácidos prolina e treonina, enquanto o mutante 2 era incapaz de crescer

na ausência do aminoácido metionina e da vitamina biotina. Se os mutantes fossem capazes de trocar o DNA seria possível gerar uma bactéria que não teria nenhuma deficiência e que, portanto, seria capaz de crescer em um meio sem os quatro compostos: metionina, prolina, treonina e biotina.

Para testar essa hipótese, Lederberg colocou as duas bactérias para crescer em um meio de cultura completo com todos nutrientes necessários. Após deixar as duas bactérias crescerem juntas, ele colocou essas bactérias para crescerem em um meio sólido sem metionna, treonina, prolina e biotina. Nesse meio, os mutantes 1 e 2 não seriam capazes de crescer e formar colônias. Só bactérias que tivessem a capacidade de produzir esses quatro compostos conseguiriam crescer e formar colônias. Após um tempo de incubação, Lederberg e Tatum verificaram que houve crescimento bacteriano na placa o que evidenciava a troca de material genético entre as duas bactérias mutantes. Eles denominaram esse fenômeno de conjugação e postularam que isso ocorria devido ao fator F (fertilidade) que era responsável por transferir o DNA de uma bactéria para a outra.

Em 1952, Lederberg cunhou o termo plasmídeo. Esse termo referia a um DNA que não fazia parte do cromossomo bacteriano. Esse DNA extra é capaz de replicar, pois possui uma origem de replicação e utiliza a maquinaria celular para duplicar o seu DNA. Existem vários tipos de plasmídeos com tamanhos diversos e funções distintas. Os plasmídeos F são capazes de realizar a transferência gênica e passar de uma bactéria para outra. Esses plasmídeos possuem genes que codificam proteínas que permitem a mobilização do DNA o que favorece a transferência gênica.

Outro grupo de plasmídeos muito importantes são os plasmídeos R (resistência) que possuem genes que codificam proteínas envolvidas na resistência a diferentes tipos de antibióticos. Esses plasmídeos estão presentes naturalmente em diversas bactérias e são problemas sérios para a saúde humana. Apesar de serem problemas para saúde pública, os plasmídeos R são de grande utilidade para estudos de biologia molecular, pois esses plasmídeos possuem marcadores que permitem selecionar células que os possuem. Por exemplo, existem plasmídeos que possuem genes que conferem resistência a diferentes antibióticos, como ampicilina, tetraciclina e canamicina. Bactérias que são sensíveis ao tratamento com a ampicilina se tornarão resistentes a esse antibiótico caso venha a importar um plasmídeo contendo o gene de resistência a ampicilina. Este fato permite selecionar as células que receberam o DNA de interesse.

Em 1971, o uso dos plasmídeos como ferramenta para as técnicas de biologia molecular tiveram um grande incremento quando Stanley Cohen, que trabalhava com plasmídeos, desenvolveu uma metodologia que permitia a transferência de DNA para bactéria *in vitro*. O que ele fez foi similar ao experimento de Griffith que transformou uma bactéria com o DNA de uma bactéria morta. Cohen fez experimento similar, mas trabalhou com um plasmídeo, e facilitou o processo de trasnformação tratando as bactérias com uma solução de cloreto de cálcio e dando um choque térmico. Esse tratamento permeabiliza a membrana bacteriana e facilita a importação de DNA nessa célula. Ao usar

um plasmídeo do tipo R, Cohen pode selecionar as bactérias que receberam o DNA, pois só aquela que recebeu o plasmídeo era capaz de crescer na presença de antibiótico. A transformação é estável uma vez que o plasmídeo é capaz de replicar e se manter dentro da célula.

7.5.2. AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E AS LIGASES

Na década de 60, o Suíço Werner Aber estava interessado em entender por que alguns fagos (vírus de bactéria) eram capazes de crescer em algumas bactérias e em outras não. Ele procurava entender como as bactérias eram capazes de se proteger do ataque dos vírus. Ele verificou que as bactérias eram capazes de reconhecer o DNA do vírus e destruí-lo, impedindo que o vírus se reproduzisse.

Mas como uma bactéria é capaz de reconhecer o DNA do vírus e diferenciá-lo do seu próprio DNA? Abner foi capaz de isolar uma enzima que era capaz de reconhecer o DNA e clivá-lo, sendo que essa enzima foi denominada de enzima de restrição.

As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica do DNA e quebram a ligação covalente entre o fosfato associado com o carbono 5 da ribose com a hidroxila associada ao carbono 3 da ribose. Portanto, essas enzimas quebram o "corrimão" da dupla hélice do DNA, na verdade, ela é capaz de quebrar os dois "corrimãos" separando dois fragmentos do DNA.

Por que as enzimas de Restrição não são capazes de quebrar o DNA da própria bactéria? As bactérias se protegem da ação das enzimas de restrição modificando o seu DNA. Por exemplo, se uma enzima de restrição reconhece e cliva uma sequência especifica de DNA como a mostrada abaixo que é reconhecida pela *Eco*RI:

5′ G-C 3′
A-T
A-T
T-A
T-A
3′ C-G 5′

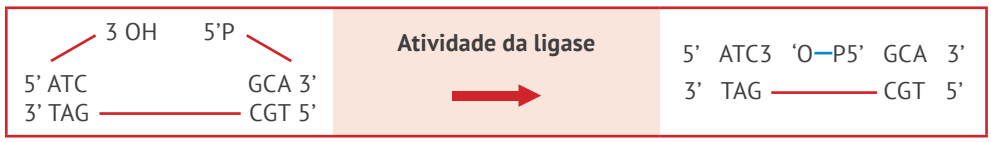
A mesma bactéria que produz essa enzima irá produzir outra enzima que será capaz de modificar as bases nitrogenadas presentes nessa sequência. Isso é feito pela adição de um grupamento metil às bases nitrogenadas. Dessa forma, a enzima de restrição é incapaz de reconhecer o DNA metilado da própria bactéria, mas irá clivar o DNA não metilado dos vírus.

Atualmente, existem diversas enzimas de restrição que foram isoladas de bactérias diferentes e que reconhecem sequências distintas de DNA. A nomenclatura das enzimas de restrição esta relacionada com a origem das

mesmas. Por exemplo, a enzima *Eco*RI tem este nome por ter sido a primeira enzima de restrição purificada da bactéria *Escherichia coli*. As três primeiras letras de um nome de uma enzima de restrição são provenientes do nome da bactéria de onde ela foi isolada e por essa razão eles sempre aparecem em itálico.

As enzimas de restrição permitiam cortar o DNA e gerar fragmentos de genes de interesse, mas como seria possível fazer a ligação desses DNAs? Vamos lembrar que as enzimas de restrição quebram a ligação entre o fosfato e oxigênio que fazem parte do corrimão e mantém a fita do DNA unida. No final de 1967, Martin Gellerte e Bob Lehman, trabalhando em locais diferentes, foram capazes de isolar uma enzima que era capaz de "colar" o DNA, essa enzima recebeu a denominação de ligase.

As ligases são capazes de catalisar a reação que permite a ligação entre um fosfato associado ao carbono 5 com uma hidroxila associada ao carbono 3, o que cola a fita (corrimão) do DNA. Veja no esquema abaixo a atuação de uma ligase:



Essas duas enzimas foram muito importantes para o desenvolvimento da biologia molecular e permitiram grandes avanços no estudo da Biologia, tais como veremos no próximo item que é o primeiro experimento de clonagem.

7.5.3. O PRIMEIRO EXPERIMENTO DE CLONAGEM

No início da década de 70, todas as ferramentas necessárias para fazer um DNA recombinante já estavam à disposição dos pesquisadores. Já se conheciam as enzimas de restrição que permitiria clivar o DNA em fragmentos e selecionar o de interesse. As ligases permitiriam "colar" este DNA em outro DNA que poderia ser o veículo para a transferência do DNA de interesse. Este veículo poderia ser um plasmídeo a ser utilizado para transformar uma bactériae que tem também continha a informação que permitiria selecionar a bactéria que recebeu o DNA, pois ele possuía um gene de resistência a um antibiótico, o que serviria como marcador do processo de transformação. A Bactéria serviria como uma fábrica para replicar o plasmídeo, o qual conteria o gene de interesse.

Em um congresso em Honolulu (1972) dois pesquisadores envolvidos com Biologia Molecular se encontraram pela primeira vez e resolveram reunir forças para fazer a primeira clonagem gênica. Stanley Cohen, como vimos acima, estava trabalhando com plasmídeos, enquanto Herb Boyer desenvolvia o trabalho com enzimas de restrição, sendo que ele tinha acabado de determinar qual a sequência do DNA que era reconhecida pela enzima *Eco*R1. A colaboração entre estes dois pesquisadores que trabalhavam na Califórnia nasceu em um restaurante perto de Waikiki. Enquanto comiam um sanduiche, eles rabiscavam

em um guardanapo os experimentos que iriam permitir a clonagem gênica.

O primeiro experimento de clonagem consistiu em gerar um super plasmídeo que possuísse genes que permitissem a resistência a dois antibióticos. Eles partiram de dois plasmídeos, um que continha um gene que codificava uma proteína que permitia a resistência à tetraciclina, enquanto o outro plasmídeo tinha um gene de resistência a canamicina. Eles cortaram os dois plasmídeos com a mesma enzima de restrição e os colocaram em tubo de ensaio na presença da enzima ligase. As extremidades cortadas poderiam se aproximar e a enzima ligase poderia uni-las, o que poderia simplesmente fechar o plasmideo clivado regenerando-o, ou então, a ligase poderia unir o pedaço de um plasmídeo com o outro gerando um DNA recombinante.

Esses DNAs, obtidos após a ligação, foram utilizados para transformar bactérias de acordo com a técnica estabelecida por Cohen. As bactérias transfotmadas foram semeadas em um meio de cultura contendo os antibióticos tetraciclina e canamicina. As bactérias que importaram o plasmídeo recombinante que continha genes que conferia resistência aos dois antibióticos foram capazes de crescer no meio e, assim, foi selecionada a primeira bactéria transformada com um DNA que foi gerado pelo Homem. Para confirmar que a bactéria continha um plasmídeo recombinante e que não tinha incorporado os dois plasmídeos separadamente, eles extraíram o DNA e fizeram a digestão com enzimas de restrição. O padrão dos fragmentos gerados comprovou a existência de um plasmídeo recombinante.

O segundo experimento realizado por Boyer e Cohen foi a clonagem de um fragmento de DNA eucarioto em um plasmídeo. Eles escolheram um fragmento de DNA de sapo e utilizando os métodos descritos acima eles foram capazes de inserir o fragmento do DNA de sapo em um plasmídeo. Esse plasmídeo foi utilizado para transformar uma bactéria e foi possível obter uma célula procariótica com um gene eucarioto. O mais interessante foi que eles conseguiram detectar a presença de RNA sintetizado a partir do DNA de sapo.

A partir desse ponto, a evolução técnica da biologia molecular permitiu diversos avanços que culminaram na clonagem de organismo inteiros e na sequência completa do DNA de diferentes organismos

Portanto, nessa aula acompanhamos a história sobre os estudos do DNA e como eles permitiram diversos avanços sobre o entendimento da Biologia.

Complemento da aula:

- No moodle vocês encontrarão diferentes figuras que estão a disposição para maior compreensão da aula.

Autoavaliação:

1) Como o DNA foi isolado?
2) Quais os experimentos mostraram que o DNA é que carrega a informação genética.
3) Como Watson e Crick desvendaram a estrutura do DNA?
4) Como ocorre a replicação do DNA?
5) Como foi feito o primeiro DNA recombinante?

8

Fluxo da informação: replicação do dna, transcrição e processamento de rna

AULA 8: FLUXO DA INFORMAÇÃO: REPLICAÇÃO DO DNA, TRANSCRIÇÃO E PROCESSAMENTO DE RNA

Ao final desta aula o aluno deverá:

- compreender o mecanismo de replicação do DNA.
- compreender o processo de transcrição e os princípios básicos de sua regulação.
- compreender o processamento em mRNAs eucarióticos.

Agora que temos uma boa ideia da estrutura de ácidos nucléicos podemos passar a entender como, quando e porque eles são sintetizados. Quando pensamos em ácidos nucléicos, especialmente no DNA, relacionamos sua existência à transmissão e perpetuação de informações importantes para a constituição dos indivíduos de uma espécie, já que sabemos que o DNA é a molécula da hereditariedade para a maioria dos organismos. Em Bases Moleculares I (aula 12) vimos que a duplicação do material genético acontece em uma fase importante do ciclo celular (fase S) que sempre antecede a divisão celular, seja mitose ou meiose, pois essas moléculas serão distribuídas nos produtos da divisão de modo a garantir que as novas células ou a nova geração de indivíduos contenham material genético na mesma quantidade e com o mesmo número de loci de seus antecessores.

8.1. REPLICAÇÃO DE DNA

O segredo da capacidade de transmitir informações dos ácidos nucléicos está intimamente ligado à sua estrutura básica de polímeros de nucleotídeos, cujas bases conseguem formar ligações de hidrogênio com bases complementares que estejam em direção contrária. A própria estrutura do DNA, muito bem descrita na aula anterior, já sugeria a seus proponentes, Watson e Crick, uma maneira de replicação que mantivesse a informação, porque uma fita da molécula era complementar à outra. Portanto, seria fácil imaginar que cada fita seria usada como molde para a formação da fita complementar, que seria então formada de maneira semiconservativa, ou seja, cada nova molécula de DNA seria formada de uma fita pré-existente (velha) e uma fita recém sintetizada (nova), como esquematizado na figura 1 (a seguir).

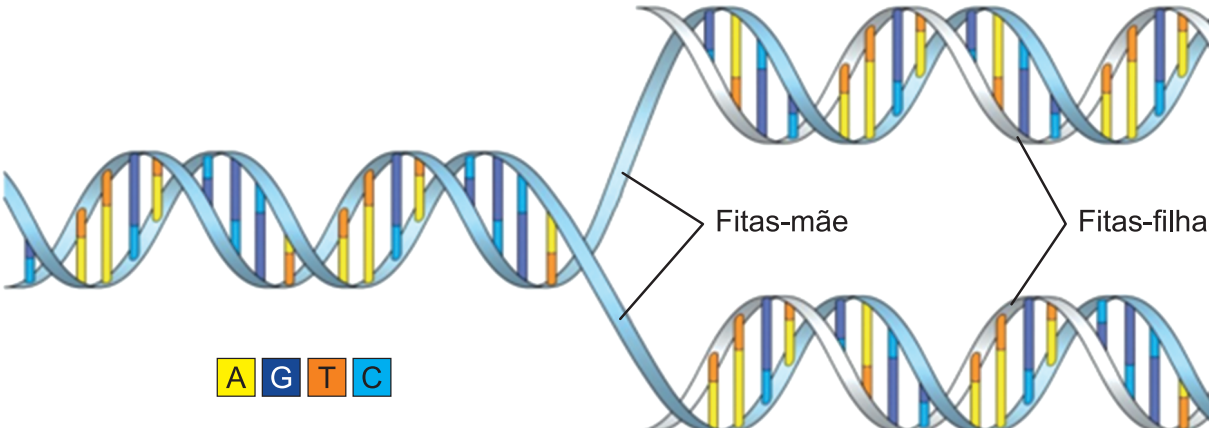


Figura 1. Esquema simplificado da estrutura da molécula de DNA durante a replicação, de modo semiconservativo. As bases nitrogenadas estão representadas por cores: amarelo para adenina (A), roxo para guanina (G), alaranjado para timina (T) e azul para citosina (C), de modo a ressaltar o pareamento específico. Uma molécula de DNA pré-existente, constituída de fitas-mãe, origina duas moléculas de DNA, sendo que cada uma delas possui uma fita antiga (fita-mãe) e uma recém sintetizada (fita-filha). Modificado de http://www-math.mit.edu/~lippert/18.417/lectures/01_Intro/Pictures/100000000000057800000020EA7A805B2.jpg

8.1.1. A REPLICAÇÃO É SEMI-CONSERVATIVA

Embora a hipótese de replicação semiconservativa fosse bastante plausível, havia também a possibilidade de replicação conservativa e replicação dispersiva. A figura 2 ilustra as três hipóteses, mostrando as moléculas de DNA resultantes após ciclos de replicação.

A hipótese da replicação semiconservativa foi definitivamente aceita após a publicação dos resultados de Meselson e Stahl, cujos experimentos serão descritos a seguir.

Inicialmente, é necessário que se abra um parêntesis para explicar um pouco das técnicas usadas. Um gradiente de cloreto de césio é um gradiente de densidade, e é obtido após centrifugação intensa (chamada de ultracentrifugação) da solução de cloreto de césio, sendo que a final da centrifugação o fundo do tubo tem densidade muito maior que o topo. Uma solução cloreto de césio contendo DNA e brometo de etídio (corante fluorescente intercalante, que se posiciona entre as fitas do DNA), após sofrer ultracentrifugação, produz bandas de DNA que fluorescem quando irradiadas com luz UV (por causa do corante) cuja posição no tubo vai variar conforme a densidade da molécula.

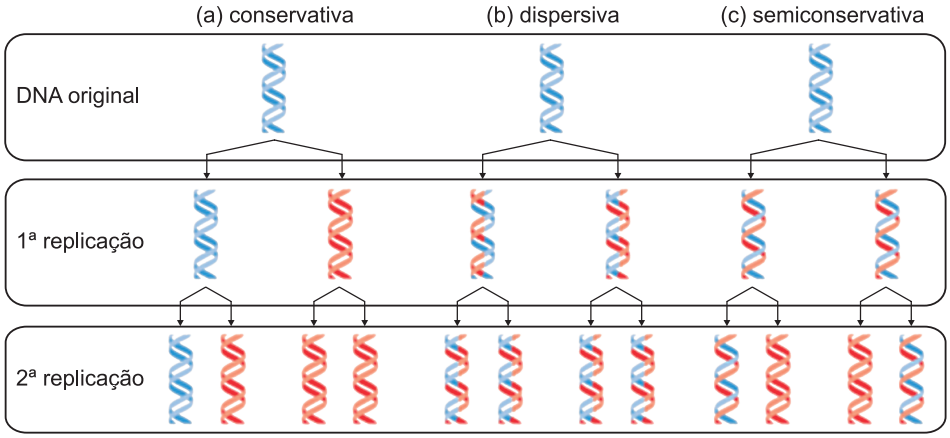


Figura 2. Esquema de replicação de DNA, conforme três hipóteses alternativas: replicação conservativa, dispersiva ou semiconservativa. As porções de DNA pré-existente estão representadas em azul, enquanto as porções recém sintetizadas estão representadas em vermelho, ressaltando, portanto, as diferenças das moléculas resultantes do processo de replicação suposto. Figura modificada de http://www.nature.com/scitable/nated/content/3812/pierce_12_1_large_2.jpg

Meselson e Stahl cultivaram a bactéria *Escherichia coli* por um número muito grande de gerações em meio de cultura contendo o isótopo pesado de nitrogênio ^{15}N (o isótopo normal é ^{14}N). Dessa maneira, quando o DNA era extraído dessas células ele tinha maior densidade que o DNA normal, pois as bases nitrogenadas estavam repletas do isótopo pesado (maior massa no mesmo volume). O experimento consistiu em retirar duas alíquotas de bactérias dessa cultura em nitrogênio pesado. Uma alíquota foi usada para extração de DNA e outra para inocular meio de cultura com nitrogênio normal. Essa nova cultura foi incubada pelo tempo suficiente de ocorrer uma replicação de DNA para então ser recolhida mais uma alíquota cujo DNA foi extraído. A cultura voltou a ser incubada pelo tempo necessário a mais uma replicação e outra amostra foi retirada para extração de DNA. O DNA extraído de cada uma das amostras foi misturado a cloreto de césio e submetido à ultracentrifugação. A figura 3 relaciona as três hipóteses de modo de replicação com o padrão esperado de densidade do DNA após a replicação para cada uma delas.

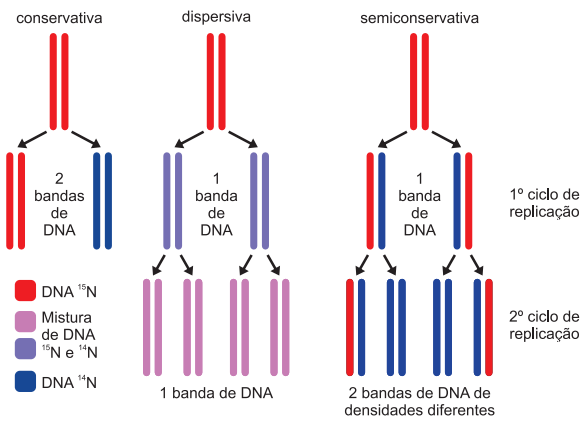
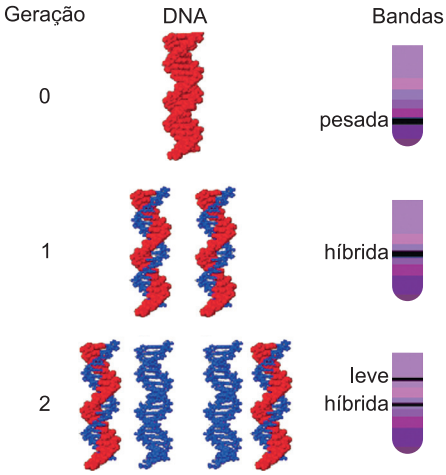


Figura 3. Representação esquemática de DNA marcado com ^{15}N e das moléculas resultantes de sua replicação em bactérias incubadas em meio com ^{14}N esperadas pelas três hipóteses de replicação: conservativa, dispersiva e semiconservativa. As fitas de DNA com densidade máxima (marcadas com ^{15}N) estão representadas em vermelho. As fitas de DNA com densidade mínima (portadoras de ^{14}N) estão representadas em azul. As fitas de DNA com densidades intermediárias estão representadas em roxo e rosa. Modificado de http://staff.jccc.net/PDECELL/proteinsynthesis/meselson.gif



Os resultados obtidos por Meselson e Stahl, que claramente apontaram para a hipótese de replicação conservativa, estão representados na figura 4.

Figura 4. Esquema dos resultados obtidos por Meselson e Stahl que apontam para a replicação semiconservativa do DNA. As fitas marcadas com ^{15}N estão em vermelho e as fitas contendo ^{14}N estão em azul. Os tubos apresentam a posição das bandas contendo moléculas pesadas (duas fitas com ^{15}N), híbridas (cada fita com um isótopo) e leves (duas fitas com ^{14}N). Modificado de http://www.steve.gb.com/images/science/meselson_stahl.png

8.1.2. A REPLICAÇÃO PODE TER VÁRIOS INÍCIOS

O local na molécula de DNA onde a replicação começa consiste em uma sequência de nucleotídeos que é reconhecida por proteínas responsáveis pela abertura da dupla fita de DNA (desnaturação) e é chamado de **origem de replicação**. O cromossomo bacteriano, que é circular, e plasmídios (relembre seu significado, consultando a aula anterior) possuem apenas uma origem de replicação, enquanto cromossomos eucarióticos possuem muitas origens (inclusive há mais sequências passíveis de serem reconhecidas como origem de replicação do que as que efetivamente o são). Quando a origem de replicação é reconhecida e as duas fitas do DNA são separadas forma-se uma estrutura chamada de "olho de replicação" (veja a figura 5). Se o DNA for circular, o aumento da abertura do olho de replicação forma uma estrutura chamada de θ (pronuncia-se téta), como ilustrado na figura 5A. Tanto em bactérias como em eucariotos a síntese de DNA ocorre de maneira **bidirecional**, ou seja, os dois lados do olho de replicação são abertos e replicados concomitantemente. Quando bactérias estão em crescimento exponencial, antes que o cromossomo circular seja completamente replicado, novos olhos de replicação são formados (veja figura 5B).

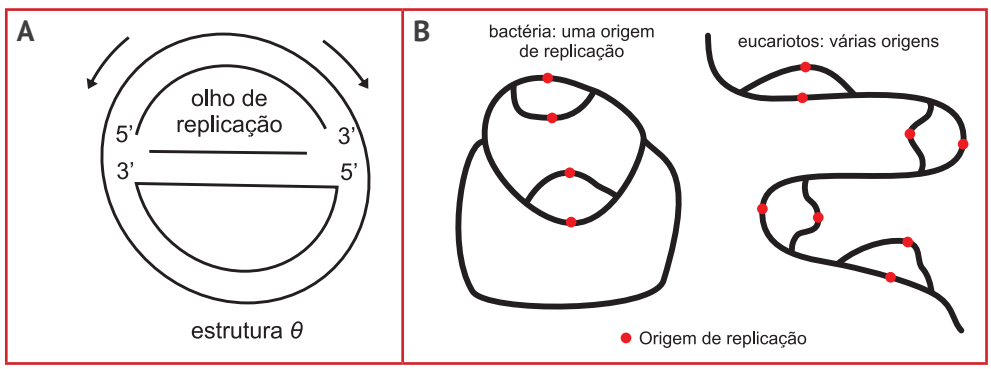


Figura 5. Abertura de olhos de replicação pela desnaturação do DNA a partir de origens de replicação (marcadas em vermelho em B). Em A está esquematizada um olho de replicação de cromossomo bacteriano

circular (já dupla fita), evidenciando a estrutura θ e a replicação bidirecional. B apresenta comparação entre um única origem de replicação em bactérias com as múltiplas origens de replicação eucarióticas. Modificado de http://www.studentsguide.in/biochemistry-biotehnology-bionformatics-dictionary/images/replication-eye.jpg e http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap02/dna-ori.gif.

O processo de abertura progressiva do olho de replicação necessita da atuação de uma enzima para a desnaturação da dupla fita de DNA, chamada de **helicase**, e a manutenção dessa desnaturação, que é feita por **proteínas ligadoras de DNA simples fita (SSB)** até a formação das novas duplas-fitas de DNA pela replicação.

8.1.3. A REPLICAÇÃO É CONTÍNUA E DESCONTÍNUA

Para o melhor entendimento do processo de replicação temos que lembrar que as fitas pareadas de DNA (cada qual com suas extremidades 5' e 3') têm orientações opostas (veja figura 6). Assim como no ácido nucléico, seja DNA ou RNA, a posição 5' de cada nucleotídeo possui o átomo de fósforo (P) e a posição 3' possui uma hidroxila (OH). A ligação entre a hidroxila na extremidade 3' do último nucleotídeo de uma cadeia nascente com o próximo nucleotídeo a ser incorporado é catalisada por uma enzima chamada de **DNA polimerase**. A polimerização de nucleotídeos para formar ácidos nucléicos **sempre** ocorre por ligação do fosfato 5' do próximo nucleotídeo a ser adicionado a uma hidroxila 3' da molécula em crescimento. Por isso afirma-se que a síntese biológica de ácidos nucléicos ocorre no sentido de **5' para 3'** (5' -> 3'), sendo que a extremidade 5' de qualquer ácido nucléico é sempre mais antiga (foi sintetizada antes) que a extremidade 3'. Essa ligação entre os nucleotídeos é uma ligação **fosfodiester** (o ácido fosfórico é esterificado em duas posições). E é claro que, se a informação contida no ácido nucléico deve ser preservada, a escolha do próximo nucleotídeo a fazer parte na fita nascente é dada por sua capacidade de formar ligações de hidrogênio (parear) com a fita pré-existente que está sendo usada como molde. A figura 6 esquematiza o processo de síntese de DNA.

A característica das DNA polimerases de só sintetizar de 5' para 3' traz um problema sério para o processo de replicação. Se você olhar novamente para a figura 5A pode notar que com a ampliação do olho de replicação pela desnaturação de mais um trecho do DNA pré-existente de cada lado vai permitir o crescimento da fita filha em uma extremidade (a 3') mas não na outra (a 5'). Rabisque num papel essa situação para entender melhor. Para que efetivamente haja a replicação do lado em que a adição de nucleotídeos não é possível (extremidade 5') é necessário que a polimerização comece novamente de um ponto mais a frente. Assim, em cada um dos lados do olho de replicação uma fita nova terá **síntese contínua** e a outra terá **síntese descontínua**, formando fragmentos de DNA (figuras 7 e 8). Esses trechos da síntese descontínua são chamados de **fragmentos de Okazaki** (o nome do pesquisador). Na maioria dos esquemas de replicação de DNA representa-se apenas a metade de um olho de replicação, que é então chamada de **forquilha de replicação**, devido a sua forma de "Y" deitado (englobada por um quadrado na figura 7, e representada na figura 8).

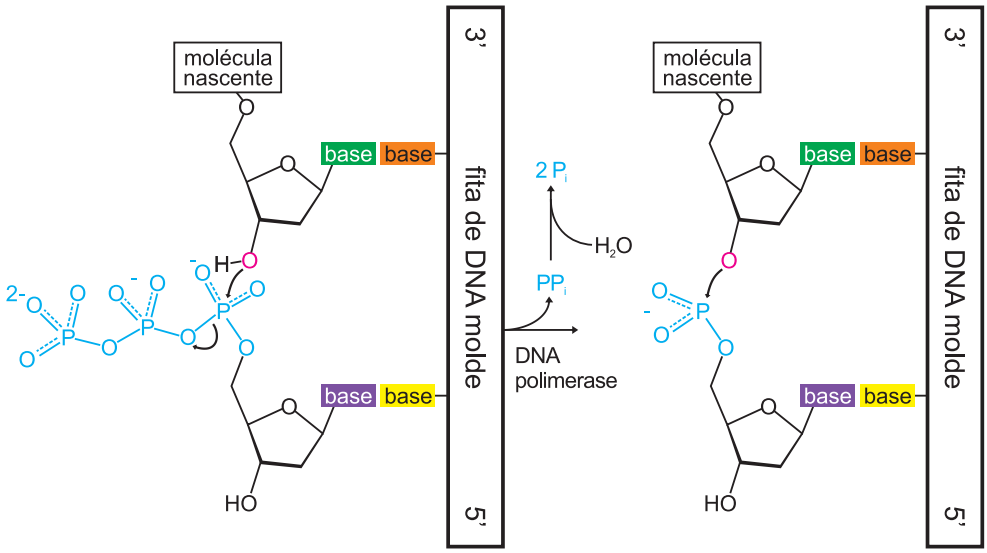


Figura 6. A formação de ligações fosfodiester entre o DNA nascente e o novo nucleotídeo a ser incorporado, que se encontra pareado com a fita molde de DNA, é catalisada pela DNA polimerase, que sempre acrescenta o novo nucleotídeo a extremidade 3' da cadeia em crescimento. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=DNA%20replication&rid=stryer.figgrp.660

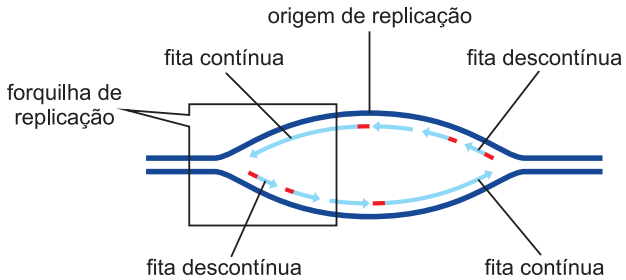


Figura 7. Esquema geral do processo de replicação de DNA. A figura representa um olho de replicação e, em destaque, uma forquilha de replicação. As fitas de DNA pré-existentes estão representadas em indigo e as fitas nascentes em azul claro. Os iniciadores de RNA estão representados em vermelho. As extremidades (5', fundo da seta, ou 3', cabeça da seta) estão indicadas assim com as fitas de síntese contínua e descontínua. Modificado de http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/replication_overview.jpg

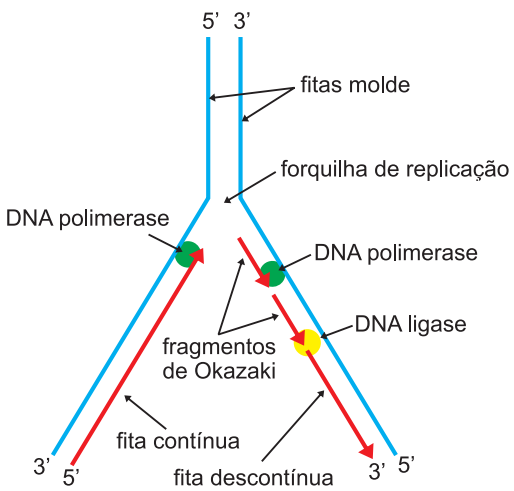


Figura 8. Esquema de forquilha de replicação com representação das fitas-molde de DNA (em azul), das fitas de síntese contínua e de síntese descontínua (em vermelho), dos fragmentos de Okazaki, e das enzimas DNA polimerase (em verde) e DNA ligase (em amarelo). Modificado de http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/ReplicationFork.gif

Os fragmentos de Okazaki serão unidos pela formação de uma ligação fosfodiester entre desoxirribonucleotídeos adjacentes, que é catalizada pela enzima chamada de **DNA ligase** (observe sua representação na figura 8).

Além da síntese descontínua da fita cuja extremidade 5' está próxima à porção ainda pareada do DNA molde, existe uma outra característica das DNA polimerases que complica mais um pouco o processo: as DNA polimerases **não conseguem iniciar** a síntese de DNA, apenas conseguem acrescentar nucleotídeos a uma molécula em crescimento. Como então o DNA pode ser sintetizado, se a enzima responsável por essa reação não consegue iniciar a replicação? Existe uma RNA polimerase (que catalisa a polimerização de ribonucleotídeos) especial, chamada de **primase**, que produz pequenas moléculas de RNA para fornecer a hidroxila 3' necessária para a atividade da DNA polimerase (figura 9). Esses pequenos trechos de RNA são chamados de **iniciadores** ("primers" em inglês, de onde se origina o nome da enzima primase). Os iniciadores de RNA são obrigatoriamente retirados antes da ação da ligase, ou seja, quando o fragmento posterior (sintetizado posteriormente) já foi completamente polimerizado, fornecendo uma extremidade 3' OH para o acréscimo de nucleotídeos que preencherão o espaço anteriormente ocupado pelo iniciador de RNA. Após o preenchimento desta lacuna existirão dois desoxirribonucleotídeos adjacentes que serão ligados pela ação da ligase (figura 10).

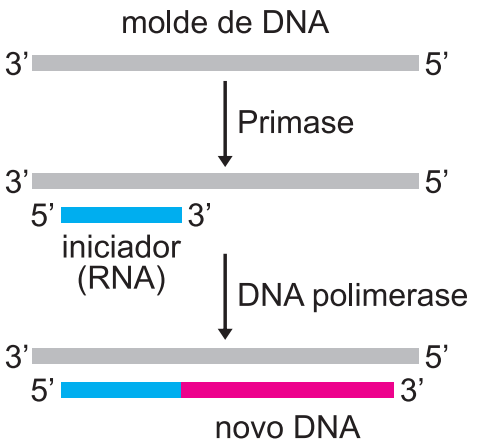


Figura 9. A replicação de DNA é iniciada por um pequeno trecho de RNA que é sintetizado pela primase, uma RNA polimerase. O iniciador de RNA sera retirado posteriormente no processo de replicação. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=DNA%20replication&rid=stryer.figgrp.3797

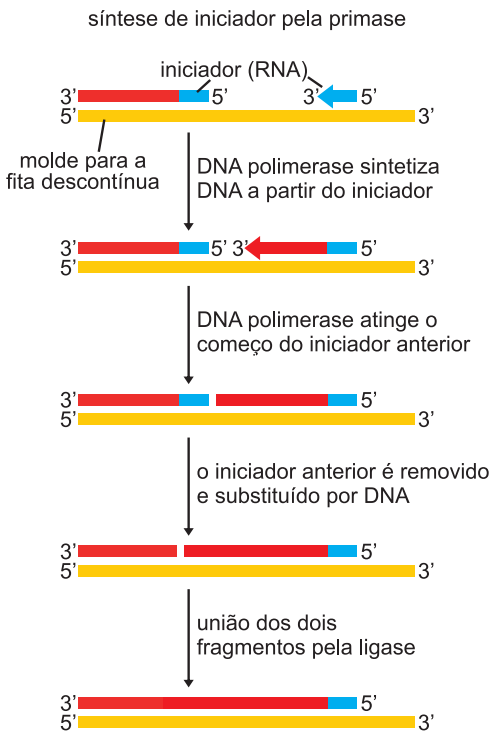


Figura 10. Retirada de iniciadores de RNA do DNA nascente, preenchimento das lacunas e ligação dos fragmentos de Okazaki. Modificado de http://www.uic.edu/classes/phar/phar331/lecture4/primase.jpg

Em moléculas circulares de DNA a necessidade de iniciadores de RNA que são posteriormente retirados não acarreta consequência alguma nas moléculas resultantes da replicação. Mas o que acontece com moléculas lineares de DNA, como as que fazem parte de nossos cromossomos? Você pode esquematizar a replicação nas pontas dos cromossomos lineares (as quais são chamadas de **telômeros**) e verificar que para a replicação da fita com extremidade 3' haverá um iniciador de RNA na fita complementar recém sintetizada que deverá ser

removido e deixará uma porção da molécula de fita simples. Isso levará ao encurtamento progressivo dos cromossomos a cada ciclo de replicação de DNA e divisão celular (a relação entre replicação de DNA e duplicação de cromossomos está esquematizada na figura 11), a não ser que os telômeros sejam reconstituídos pela ação da telomerase. A telomerase mostra-se ativa em células-tronco e cancerosas. Procure na literatura recomendada como essa enzima funciona.

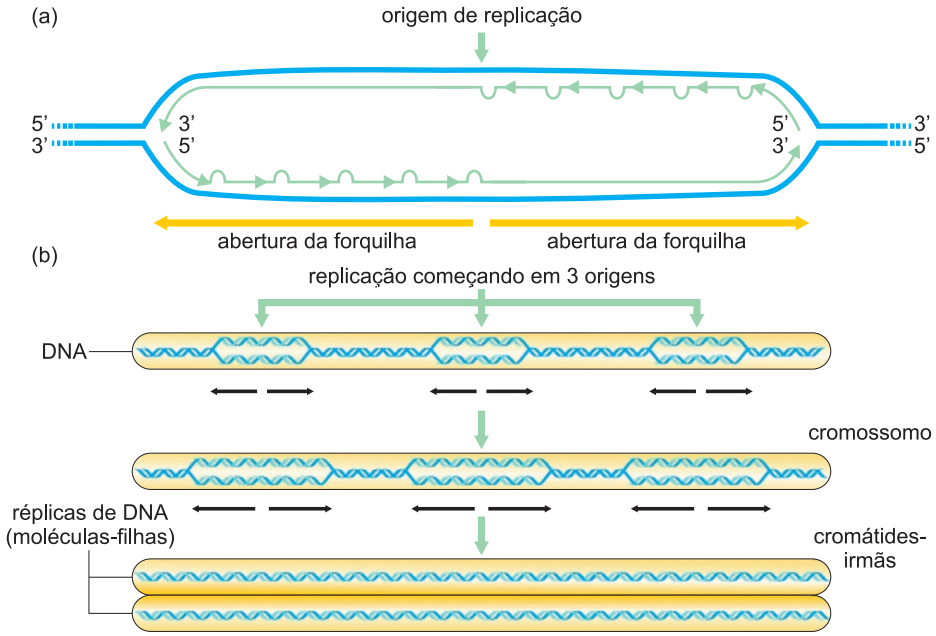


Figura 11. Relação entre replicação de DNA e duplicação de cromossomos. Em (a) está esquematizado um olho de replicação e a síntese contínua e descontínua de DNA. Em (b) está esquematizado um cromossomo (embora nesse estágio o cromossomo encontre-se descondensado na célula está representado como se estivesse condensado) em processo de divisão, mostrando o progresso da replicação a partir de três origens e as cromátides irmãs, cada qual com sua molécula de DNA como resultantes do processo. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=DNA%20replication&rid=mga.figgrp.458

8.2. TRANSCRIÇÃO

Muito bem, acabamos de ver como a informação é transmitida de células-mãe para células-filhas, pelo processo semiconservativo de síntese de DNA. Mas o DNA é uma molécula inerte, cuja função é existir para ser reconhecido. Como a informação presente no DNA é convertida em formas que possam atuar nas funções celulares?

A maioria das funções celulares é exercida por proteínas, como as aulas anteriores já ilustraram. Mesmo moléculas celulares não protéicas necessitam de enzimas para sua síntese. Vamos então nos concentrar nas regiões do DNA que trazem as informações para a síntese de polipeptídeos, que constituem as proteínas, sejam enzimas ou não. O primeiro passo para a transmissão das informações para a síntese de polipeptídeos é a síntese de um RNA correspondente ao

gene, que pode ser o RNA mensageiro (**mRNA**) se o organismo for a bactéria *Escherichia coli* (organismo modelo para procariotos), ou um RNA precursor do mRNA, como ocorre geralmente em eucariotos. Discutiremos essas diferenças posteriormente. O RNA é sintetizado pela enzima **RNA polimerase**, que usa apenas uma das fitas do DNA como molde (chamada então de **fita molde**). Como DNA e RNA são moléculas muito parecidas esse processo recebeu o nome de **transcrição**[1]. A síntese do RNA, assim como ocorre com a síntese do DNA, é sempre feita **de 5' para 3'**, e a ligação entre os ribonucleotídeos é feita de maneira similar a que ocorre entre os desoxirribonucleotídeos (figura 6). Em geral, apenas uma das fitas de DNA é transcrita. Assim, o sentido da fita molde será sempre de 3' para 5'. A fita de DNA complementar à fita molde da transcrição é chamada de **fita codificante** ou **fita codificadora** ou **fita com sentido**, porque sua sequência é idêntica à sequência do RNA transcrito, com exceção da presença de timina (T) no lugar de uracila (U), como esquematizado na figura 12. A fita codificante, embora não tenha papel na transcrição propriamente dita, é essencial para que a fita molde seja duplicada na replicação do DNA. Além disso, sempre que representamos a sequência de nucleotídeos de um gene representamos a fita codificante e não a fita molde, porque ela fornece as informações presentes no mRNA.

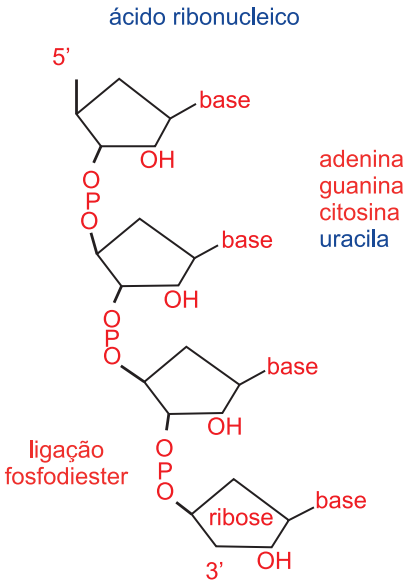


Figura 12. Estrutura esquemática do RNA. As bases nitrogenadas escritas em vermelho estão presentes tanto no RNA quanto no DNA, enquanto uracila, escrita em azul, é presente apenas no RNA. Modificado de http://2.bp.blogspot.com/_35sjGT3NVUo/SN0Ja2ovCUI/AAAAAAAAADo/jcVLs_26Hpw/s400/rna-structure.jpg

A figura 13 mostra um esquema de transcrição de DNA. Existe a formação de uma pequena bolha de transcrição que vai sendo aberta a 5' da fita molde e sendo fechada a 3' da fita molde assim que há a ruptura do pareamento do RNA nascente da fita molde. Uma pequena porção do RNA fica pareado com a fita molde de DNA de maneira a fornecer a extremidade 3' da molécula nascente para a ligação do próximo nucleotídeo a ser acrescentado.

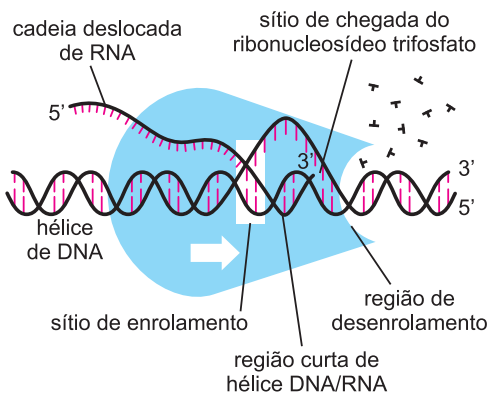


Figura 13. Representação esquemática da transcrição de DNA, evidenciando o sentido da síntese (de 5' para 3'), a formação de uma bolha de transcrição e sua movimentação em direção ao final do gene. Retirado de: http://guia.bio.br/imagens/biocel/transcricao.JPG.

1 - Procure o sentido da palavra transcrição em um dicionário.

8.2.1. A RNA POLIMERASE LIGA-SE AO PROMOTOR PARA COMEÇAR A TRANSCRIÇÃO

Será que a transcrição pode começar em qualquer ponto do cromossomo? Se isso fosse possível teria algum sentido biológico? Parece bastante óbvio que a resposta para essas duas perguntas deve ser não. Apenas faz sentido que a transcrição produza um RNA com alguma função biológica, sendo portando sintetizado desde seu início. Portanto, a RNA polimerase deve reconhecer onde se ligar para iniciar a transcrição, sendo essa região chamada de **promotor**. Após a ligação da RNA polimerase com o promotor (complexo fechado) há a abertura da bolha de transcrição (complexo aberto). A seguir há o pareamento do primeiro nucleotídeo do RNA nascente na posição de início de transcrição, chamada de **+1**. A figura 14 ilustra vários momentos do processo de transcrição.

Os promotores possuem sequências específicas para seu reconhecimento, sendo a mais frequente nos genes que codificam proteínas, tanto de procariotos como de eucariotos, uma região rica em AT que é conhecida como **caixa TATA** ou **TATA box**.

Uma única RNA polimerase bacteriana transcreve todos os genes bacterianos. Ela é composta por cinco subunidades, sendo que quatro permanecem sempre associadas (α, β, β' e γ, pronuncia-se alfa, beta, beta linha e gama), configurando o cerne ("*core*" em inglês) da enzima, e uma subunidade σ (pronuncia-se sigma) que só encontra-se associada, formando a **holoenzima** (cerne + σ), para o reconhecimento específico da sequência promotora. Há um fator σ principal, responsável pelo reconhecimento da maioria dos promotores. Existem também alguns fatores σ alternativos, que são ativos apenas em situações especiais como estresse térmico ou processo de esporulação, e promovem a transcrição de genes específicos por determinar o reconhecimento de seus promotores. Como a subunidade σ é a responsável pela grande afinidade da RNA polimerase pelo promotor enquanto ela estiver associada à enzima o complexo fica preso no mesmo ponto. É necessário, portanto, o desligamento do fator σ para que a transcrição prossiga até o final do gene.

Em *Escherichia coli* a TATA box que localiza-se a -10 (nucleotídeo central) e tem como sequência consenso (pequeno trecho de DNA com função sinalizadora cuja sequência é bastante conservada) TATAAT. Existe um outro hexâmero consenso centralizado a -35. Os números que indicam a posição dessas regiões consenso são negativos porque são anteriores ao ponto de início da transcrição (+1). Não existe nucleotídeo 0, sendo que o nucleotídeo imediatamente anterior ao +1 é chamado de -1.

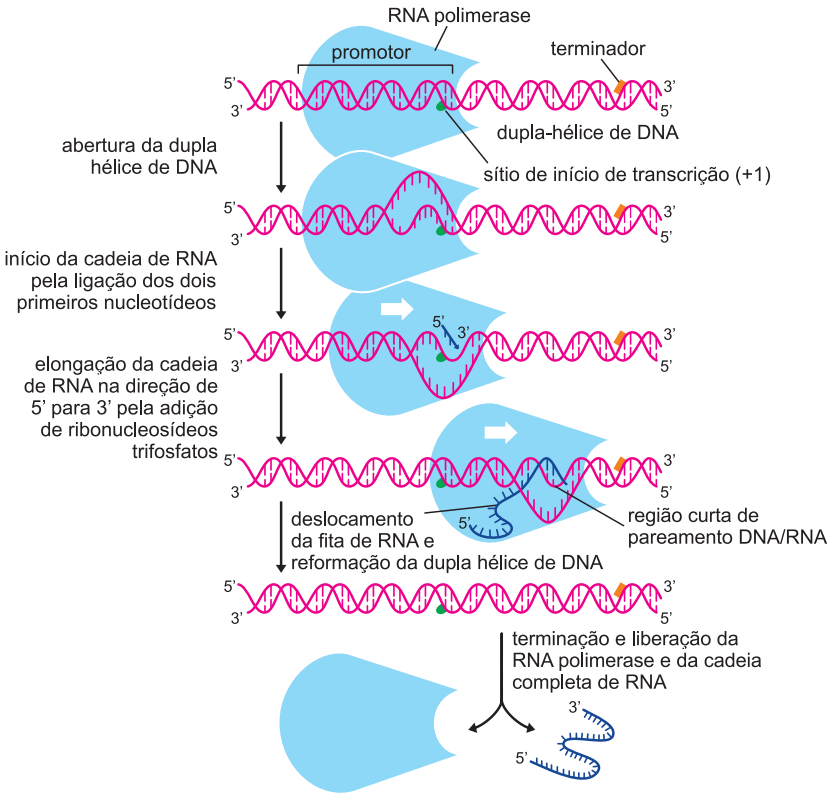


Figura 14. Representação esquemática dos diversos momentos do processo de transcrição, comuns a eucariotos e procariotos. O sítio de início de transcrição está marcado em verde e a região terminadora em amarelo. Essas marcas são apenas didáticas, para assinalar as posições, pois não há qualquer modificação estrutural dos nucleotídeos. Modificado de http://www.icb.ufmg.br/prodabi/prodabi3/grupos/grupo1/images/sinteseRNA.gif

Em eucariotos existem três tipos de RNA polimerase, bem maiores que a RNA polimerase bacteriana, possuindo aproximadamente 12 subunidades. A RNA polimerase I é responsável pela transcrição de RNAs ribossômicos (rRNAs), e a RNA polimerase III transcreve RNA de transferência (ou transportadores, tRNAs) e outros pequenos RNAs. Os promotores que são reconhecidos por essas polimerases têm uma estrutura característica, que não será discutida nessa aula. Nosso interesse se restringirá na RNA polimerase II, responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas em eucariotos.

A ligação da RNA polimerase II ao promotor requer a participação de um grande número de proteínas, conhecidas como fatores basais ou gerais de transcrição, que constituem o **aparato basal de transcrição**, cuja montagem tem ordem definida. A montagem do aparato basal de transcrição ocorre principalmente após a ligação a sítios específicos do DNA, que podem estar localizados a grandes distâncias, de proteínas **ativadoras de transcrição**, também chamados de **fatores de transcrição**. A atuação dos fatores de transcrição e de proteínas repressoras de transcrição (**repressores**) é importante para o controle de início de transcrição de genes específicos, embora modificações na cromatina tenham também um papel relevante. Em um sistema *in vitro*, sem a presença dos fatores basais de transcrição, a RNA polimerase II é capaz de sintetizar

RNA usando um molde de DNA, mas o início da síntese é inespecífico. Vários promotores (aproximadamente 50%) possuem TATA box bastante parecida com a bacteriana, em geral localizada a -25. A maior subunidade da RNA polimerase II possui um domínio na extremidade carboxi (domínio CTD ou DCT, domínio carboxiterminal) com múltiplas repetições de um motivo de sete aminoácidos que devem ser fosforilados para permitir o deslocamento da enzima pelo molde de DNA, à semelhança da saída do fator σ na RNA polimerase bacteriana.

Uma **unidade de transcrição** é definida como um segmento de DNA expresso pela produção de uma molécula única de RNA, que pode conter a informação de um ou mais genes. A unidade de transcrição começa no promotor e acaba no **terminador**, sequência que sinaliza a finalização de transcrição. Em bactérias a terminação de transcrição pode exigir a ligação de uma proteína, conhecida como ρ (lê-se rho) ou não. Existem, portanto, **terminadores dependentes** e **terminadores independentes de** ρ. Nestes últimos o RNA nascente tem sequências complementares que o faz assumir uma determinada estrutura secundária dentro do complexo aberto, o que sinaliza o término da transcrição.

8.2.2. ESTRUTURA DE GENES DE PROCARIOTOS

Vimos acima algumas diferenças importantes entre a transcrição em procariotos e eucariotos. Mas as diferenças não se restringem ao exposto. Em bactérias, um gene constitue uma **fase** (ou janela ou quadro, conforme a tradução do termo inglês "*frame*") **aberta de leitura** (ORF), que significa que o RNA apresentará (no caso, imediatamente após sua síntese) os sinais para início (ATG) e término de síntese de proteínas (**tradução**), separados por um número apropriado de códons (trincas de nucleotídeos que determinam os aminoácidos a serem incorporados na proteína nascente, mais detalhes serão discutidos na aula 9). Imediatamente antes do códon que sinaliza o início da tradução existe uma pequena sequência consenso, chamada de **Shine-Dalgarno** ou **rbs** ("*ribosome binding site*", que significa sítio de ligação do ribossomo), como esquematizado na figura 15A. O RNA será transcrito a partir do +1 até o ponto de terminação de transcrição, constituindo uma molécula de RNA mensageiro (mRNA). O mRNA possui, na maioria das vezes, um trecho anterior ao sinal de início de tradução, chamado de **5' não codificante** ou **5' UTR** (5' "*untranslated region*", que significa região não traduzida). De modo semelhante, existe uma região após o códon de terminação, na extremidade 3', chamada de **3' não codificante** ou **3' UTR** (veja esquema na figura 15B).

Grande parte dos genes bacterianos, especialmente aqueles com funções relacionadas, estão dispostos em arranjos chamados de **operon**, que consiste em um único promotor sendo usado para a síntese de mRNA que contêm informação para a síntese de proteínas codificadas por mais de um gene em uma única molécula (veja figura 15C). Por codificar várias proteínas, esses mRNAs são chamados de **policistrônicos** ou **poligênicos**. O mRNA policistrônico contêm, portanto, mais de uma ORF, cada qual sendo definida pelos códons de iniciação e término de tradução, precedida por uma RBS.

Uma grande vantagem da disposição de genes correlacionados em um operon é a possibilidade da existência de um controle de transcrição único para todos os componentes do operon. Se todos os genes do mesmo mRNA forem traduzidos na mesma freqüência, essa é uma forma de propiciar quantidades equivalentes de todos os polipeptídeos codificados por um mesmo operon, o que pode ser importante na formação de proteínas multiméricas.

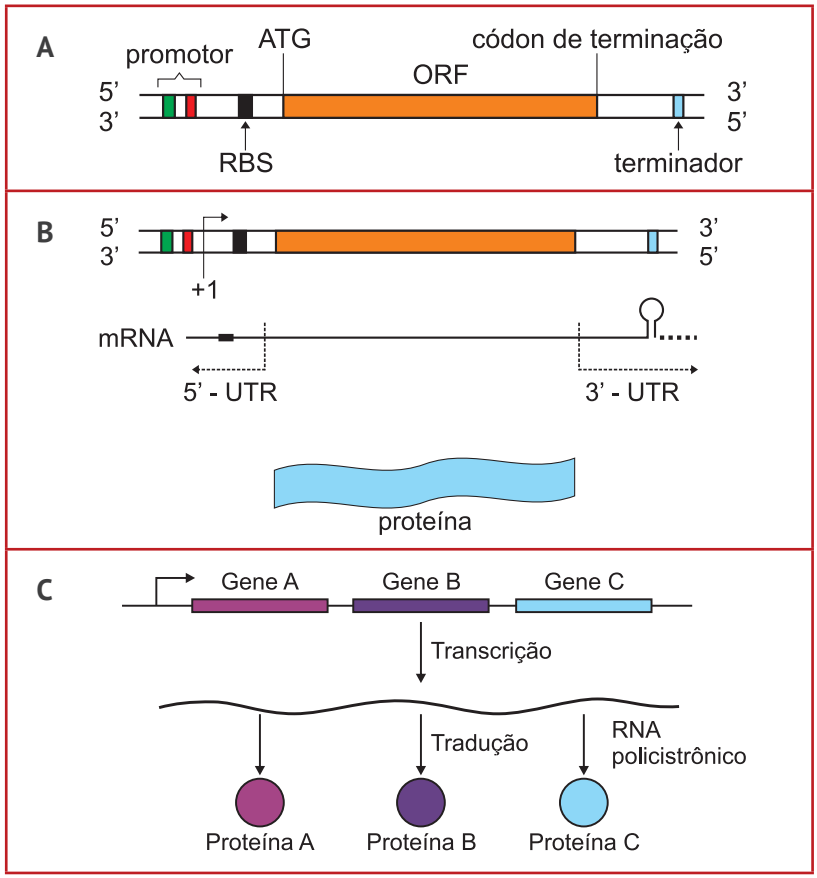


Figura 15. (A) Estrutura típica de um gene bacteriano, evidenciando duas sequências consenso no promotor (em verde, -35, e em vermelho, TATA box) e a sinalização para ligação de ribossomos no mRNA (RBS), início (códon ATG) e término da síntese protéica, delimitando a ORF (fase aberta de leitura). Reproduzido de http://www.canoadetolda.org.br/biolmol/Genetica-Medicina/geneprocarioto1.gif (B) Esquema mostrando o início da transcrição (flecha a partir de +1) e o mRNA transcrito do gene. Na região 5'-UTR do mRNA encontra-se o RBS, enquanto a região 3'-UTR apresenta o grampo de terminação independente de ρ. Reproduzido de http://www.canoadetolda.org.br/biolmol/Genetica-Medicina/geneprocarioto2.gif (C) Estrutura básica de um operon procariótico. Vários genes são transcritos em um mesmo mRNA, chamado de policistrônico ou poligênico, a partir de um único promotor. O mRNA esquematizado possui três ORFs, cada qual com seu códon de iniciação e terminação de tradução, que permitem a síntese de três proteínas diferentes. Modificado de http://genomebiology.com/content/figures/gb-2003-4-9-r59-1-l.jpg

8.2.3. CONTROLE DE TRANSCRIÇÃO EM BACTÉRIAS

Quando falamos em controle de expressão gênica em geral estamos nos referindo ao controle do início da transcrição, já que deixar de transcrever genes

cujas proteínas não são necessárias no momento é energeticamente muito mais econômico do que transcrever e traduzir para que o produto final não seja usado. Isso não quer dizer que as células apenas regulem o início da transcrição. Todas as etapas (transcrição, processamento, tradução, modificações pós-traducionais e atividade) podem apresentar mecanismos de regulação, assim como a vida média dos RNAs e proteínas. A regulação em etapas posteriores à transcrição permite reversão do estado (de ativo em inativo ou vice-versa) muito mais rápida. Isso pode ser essencial em determinados processos.

Qualquer tipo de controle pode ser classificado em duas categorias: controle negativo e controle positivo. O controle negativo está atuante quando é necessária a repressão (e quando não está atuante a repressão não ocorre) e o controle positivo atua como estimulador (e na ausência de sua atividade a estimulação não ocorre). Portanto, se um processo for regulado por um controle positivo, quando o ativador não estiver funcionando o processo não ocorre. Se o processo for regulado por um controle negativo, se o repressor não estiver funcionando o processo ocorre. Veja na figura 16 um esquema geral de controle de início de transcrição de um operon. Na figura 16 (a) está esquematizado o controle negativo, formado pela presença de uma proteína repressora (**repressor**), que quando ativa liga-se a uma sequência de DNA imediatamente a jusante[2] do promotor, chamada de **operador**. Quando o repressor está ligado ao operador a RNA polimerase não consegue iniciar a transcrição, e as proteínas codificadas pelo operon não podem ser sintetizadas. Ou seja, quando o repressor está ativo há a repressão da transcrição (controle negativo). É claro que deve haver uma situação em que a transcrição desses genes seja desejável. No controle negativo de operons geralmente há uma molécula indutora (**indutor**) capaz de se ligar ao repressor. Quando o repressor se liga ao indutor há uma mudança na conformação do repressor, semelhante à regulação alostérica de enzimas, que tende a se desligar do operador, uma vez que sua afinidade por essa sequência torna-se bastante diminuída.

Na figura 16 (b) está esquematizado o controle positivo, formado pela presença de uma proteína ativadora de transcrição (**ativador**, equivalente aos fatores de transcrição de eucariotos) e por um sítio muito próximo ou dentro do promotor (anterior ao ponto de início da transcrição) que será reconhecido pelo ativador (equivalente ao *enhancer* de eucariotos). Quando o ativador está ativo liga-se ao promotor e estimula a ligação da RNA polimerase. O ativador no estado inativo não se liga ao promotor e a ausência dessa ligação reduz substancialmente a freqüência de ligação da RNA polimerase ao promotor, de modo que a transcrição seja praticamente indetectável. O controle positivo existirá, portanto, em operons cujo promotor não é reconhecido eficientemente pela RNA polimerase. Esse tipo de promotor é chamado de promotor fraco, em contraposição a promotores reconhecidos frequentemente pela RNA polimerase que, portanto, garantem síntese de grandes quantidades de seus RNAs, e são chamados promotores fortes[3].

2 - A expressão "a jusante" significa literalmente que está corrente (rio) abaixo (em direção à foz). Aqui o significado é após, no sentido 3' da fita codificante.

3 - Atividade sugerida: O operon triptofano possui um promotor forte. Procure na literatura sugerida a descrição da regulação do operon triptofano.

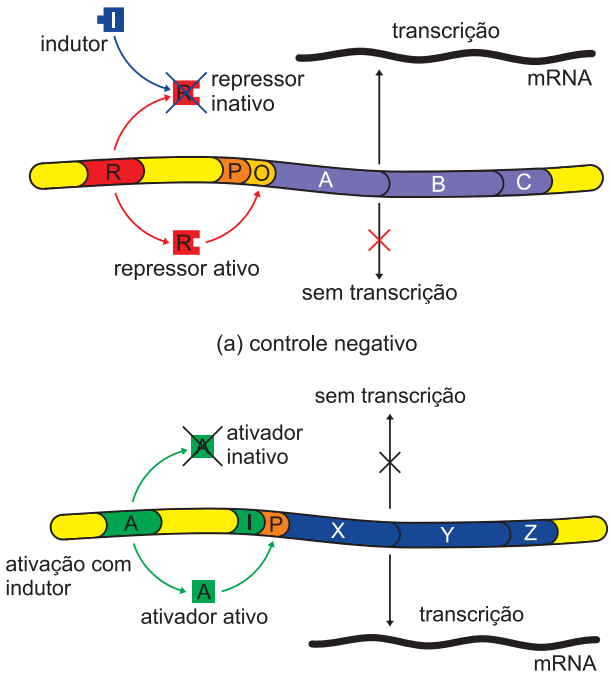


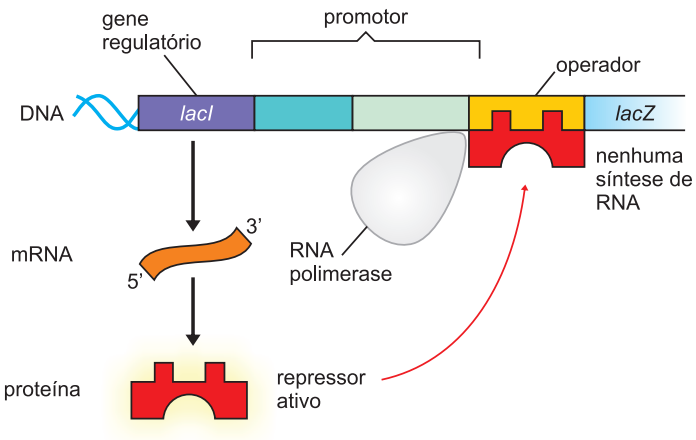
Figura 16. (a) Controle negativo bacteriano. O repressor liga-se ao operador e impede a transcrição do operon, a não ser que esteja associado ao indutor, cuja associação reduz a afinidade do repressor pelo operador. (b) Controle positivo bacteriano. A ligação do ativador ao seu sítio de reconhecimento no promotor estimula a transcrição. A inativação do ativador impede sua ligação ao DNA e o nível de transcrição cai. http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupo7/iniciar/aulaexp/LAC7.GIF

O controle negativo de bactéria foi inicialmente descrito pelos pesquisadores franceses François Jacob e Jacques Monod, que estudaram o operon responsável pela utilização de lactose em *Escherichia coli*, chamado de operon *lac*. A proposição do mecanismo de regulação deste operon foi pioneira no estudo da expressão gênica e propiciou aos dois pesquisadores o prêmio Nobel de 1965. A lactose é um dissacarídeo constituído da ligação de uma molécula de glicose com uma molécula de galactose. O operon *lac*, cuja representação encontra-se na figura 17, é constituído de um promotor, um operador e três genes **estruturais**[4]: o gene *lacZ*, que codifica a enzima beta-galactosidade (enzima que degrada lactose em galactose e glicose); o gene *lac Y*, que codifica a Lac permease (proteína transportadora de lactose para o interior bacteriano), e *lac A*, que codifica a enzima transacetilase (cuja função ainda não é muito clara). À montante[5] do promotor do operon *lac* existe o gene *lacI*, com seu próprio promotor, que codifica o repressor Lac. A expressão de *lac I* é baixa, mas **constitutiva**[6], de modo que há sempre uma concentração de repressor no interior da célula que é baixa, mas suficiente para a ligação com o operador

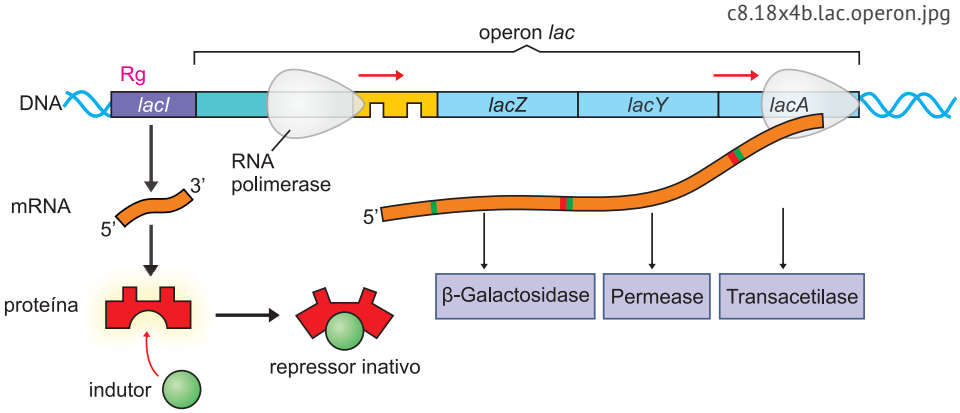
4 - Gene estrutural significa que o gene não codifica proteínas regulatórias (envolvidas no controle da expressão).
5 - A expressão "a montante" significa literalmente que está corrente (rio) acima (em direção à nascente). Aqui o significado é antes, no sentido 5' da fita codificante.
6 - Expressão constitutiva significa que está sendo feita sempre, sem regulação.

quando não há lactose no meio. Afinal, quando não há lactose disponível não há razão para sintetizar proteínas importantes em sua degradação. Se houver a adição de lactose ao meio de cultura a bactéria será capaz de captá-la devido à existência de um pequeno número de permeases, resultantes da baixíssima transcrição basal do operon. A lactose incorporada é transformada em alolactose que se liga ao repressor, em um sítio distinto do sítio de ligação ao DNA (especificamente ao operador). A ligação da alolactose com o repressor promove a mudança conformacional deste, que diminui sua afinidade pelo operador, desligando-se do DNA. Sem a presença do repressor ligado ao DNA, se a RNA polimerase se ligar ao promotor será capaz de prosseguir com a transcrição e consequentemente as proteínas serão traduzidas. A figura 17 (a) esquematiza o operon *lac* inativo, por consequência do repressor ativo, e a figura 17 (b) representa a ativação da transcrição pela presença de lactose.

Posteriormente à descrição do controle negativo do operon *lac*, foi descrito seu controle positivo, que não é exclusivo desse operon, sendo partilhado por vários operons relacionados à degradação de açúcares. Apesar de ser um sistema de controle positivo, e, portanto, possuir um ativador de transcrição, essa regulação recebeu o nome de "**repressão catabólica**" porque é caracterizada pelo uso preferencial de glicose, se estiver presente no meio, em detrimento de qualquer outro açúcar.



(a) ausência de lactose, repressor ativo, operon desligado



(b) presença de lactose, repressor inativo, operon ligado

Figura 17. Controle negativo do operon *lac*. (a) Operon desligado. A transcrição não pode ocorrer devido à ligação do repressor ao operador. (b) Operon ligado. A transcrição pode ocorrer porque o repressor desligou-se do operador após associação ao indutor (alolactose). Modificado de http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c8.18x4a.lac.operon.jpg e e http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c8.18x4b.lac.operon.jpg

E como a presença de glicose pode interferir com a utilização de outros açúcares? O promotor do operon lac, assim como os promotores dos demais operons de degradação de açúcares, não é reconhecido frequentemente pela RNA polimerase. Portanto, se não houver ativação de transcrição o nível de RNA produzido será baixo, mesmo que o controle negativo esteja desligado pela interação do indutor com o repressor (isto é, na presença de lactose, em nosso exemplo). O ativador de transcrição do operon lac (e demais operons de degradação de açúcar) é a proteína CAP. A proteína CAP tem síntese constitutiva mas só consegue reconhecer eficientemente seu sítio de ligação no promotor dos operons se estiver associada a cAMP (AMP cíclico). A concentração de cAMP intracelular é regulada pela glicose, que inibe a atividade da enzima formadora de cAMP, chamada de **adenilato ciclase**. Uma concentração de glicose alta implica em baixa concentração de cAMP, e com isso a proteína CAP não é capaz de se ligar ao DNA para ativar a transcrição do operon *lac*. Com uma concentração de glicose baixa forma-se grande quantidade de cAMP, suficiente para a associação com a proteína CAP de modo a capacitá-la à ativação de transcrição. Veja a representação dessas situações na figura 18.

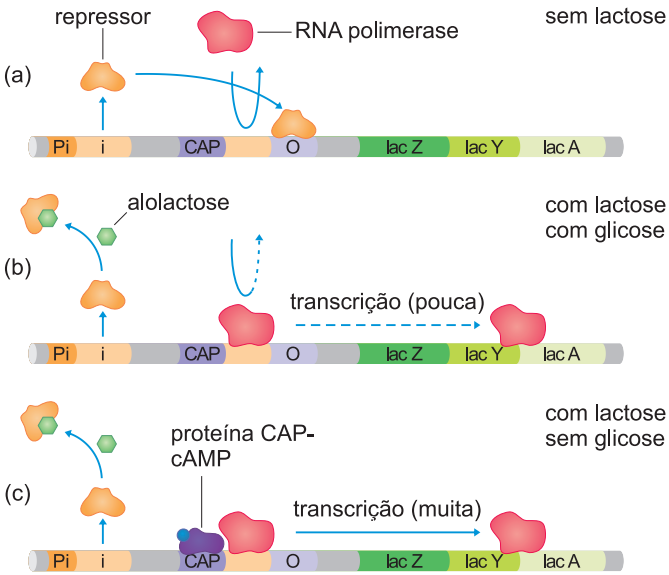


Figura 18. Funcionamento do operon *lac* em situações nutricionais distintas. (a) Quando não há lactose o repressor liga-se ao operador e bloqueia a iniciação da transcrição. (b) Quando há lactose no meio, mas também há glicose, o nível de transcrição será bastante baixo porque, apesar da ausência de ligação do repressor ao operador, o promotor não é reconhecido frequentemente pela RNA polimerase. (c) Quando há lactose no meio de cultura e não há glicose, CAP associa-se a cAMP e liga-se ao promotor, ativando a transcrição.

8.2.4. ESTRUTURA DE GENES DE EUCARIOTOS

Operons são estruturas típicas de procariotos e nunca foram observadas em eucariotos. Cada gene eucariótico tem seu próprio promotor.

A característica mais marcante de genes da maioria dos eucariotos é não apresentar uma ORF contínua. A região codificadora é interrompida por sequências intervenientes ou intercalares, chamadas de **introns**, que serão obrigatoriamente removidas do RNA transcrito para formar um mRNA normal. Os trechos de sequências codificantes são chamados de **exons**. Veja o esquema geral de um gene eucariótico na figura 19. Nesse esquema não estão representadas as regiões de DNA que contêm sequências reconhecidas

por ativadores de transcrição, e elas podem estar posicionadas a uma grande distância do gene que regulam, mas sempre na mesma molécula de DNA. Essas sequências são chamadas de **acentuadores** ou **intensificadores**, como tradução da palavra inglesa "enhancer", que muitas vezes é usada mesmo em textos em português.

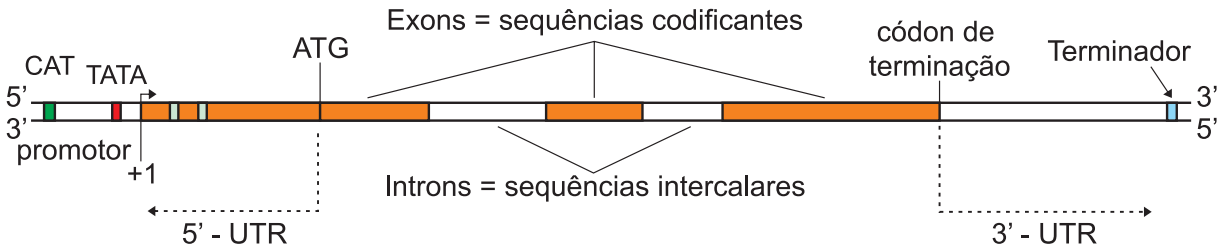


Figura 19. Esquema geral de um gene eucariótico. O RNA transcrito a partir do +1 possui 5' e 3' UTRs, códon de iniciação e de terminação de tradução e terminador de transcrição, assim com os RNAs procarióticos. Entretanto a ORF é dividida em exons (regiões codificantes) e introns (regiões intercalares). Reproduzido de http://www.canoadetolda.org.br/biolmol/Genetica-Medicina/geneeucarioto1.gif

Nas figuras 15 e 16, para simplificar a visualização, o DNA não está representado por uma dupla hélice, e sim por duas linhas paralelas, sendo que cada uma representa uma das fitas do DNA. Por convenção, para padronização, os genes são representados da esquerda para a direita (com promotor à esquerda), sendo essa também a direção da transcrição. A fita superior (representada em cima) é a fita codificante (5' para 3') e a fita inferior (representada em baixo) é a fita molde. Lembre-se que a sequência do RNA transcrito é igual à sequência da fita codificante, substituindo-se timina por uracila.

8.3 PROCESSAMENTO DO RNA EM EUCARIOTOS

Agora que sabemos que o RNA transcrito a partir de genes eucarióticos que codificam proteínas, em geral contêm introns, é fácil entender porque esses RNAs não são chamados de mensageiros assim que são transcritos, pois pelo menos a retirada dos introns é necessária para que sejam mRNAs. De fato, a retirada de introns e mais duas modificações, adição de "*cap*" e adição da cauda de poli(A) formam o processo de maturação de mRNAs eucarióticos, também chamado de processamento, que ocorre no núcleo antes do transporte dos mRNAs para o citoplasma. A figura 20 representa o processo de maturação de mRNA.

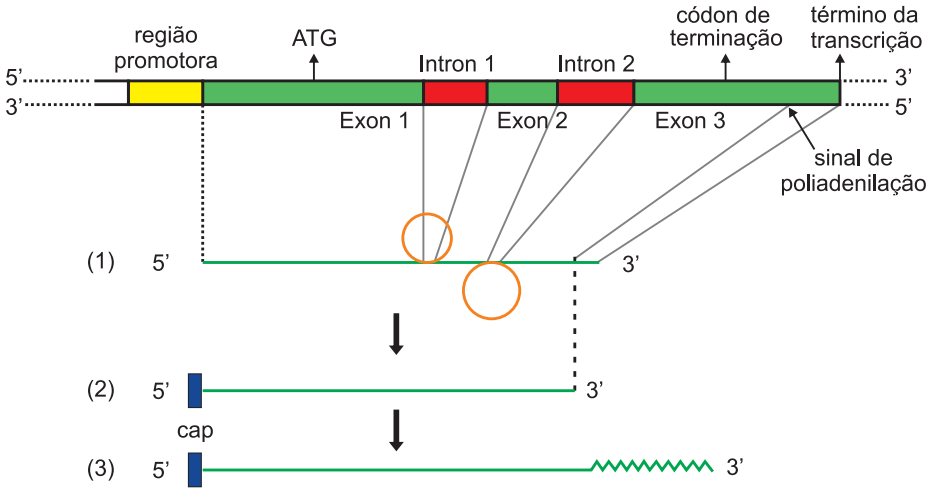


Figura 20. Etapas do processamento de mRNA. Em (1) está representado o transcrito primário, que contêm os introns. Em (2) houve a adição de "*cap*" (representado pelo retângulo azul), os introns já foram removidos e parte-se para a adição da cauda de poli(A). Em (3) está representada uma molécula de mRNA. Modificado de http://www.canoadetolda.org.br/biolmol/Genetica-Medicina/splicing1.gif

8.3.1 ADIÇÃO DE "*CAP*"

Antes do término da transcrição, assim que a extremidade 5' torna-se disponível, acontece sua modificação, pela ligação de um nucleotídeo de guanina, chamado então (em inglês) de "***cap***" (que já foi traduzido para o português como boné ou quepe, mas aqui será usada a palavra inglesa). A adição do *cap* é catalisada pela guanilil-transferase e tem como característica inusitada a ligação 5'-5', que não é reconhecida pelas nucleases (veja o esquema da ligação na figura 21). A seguir o cap (na posição 7 da guanina) e, em eucariotos pluricelulares, o primeiro nucleotídeo (e às vezes o segundo nucleotídeo) do RNA são metilados. A presença do *cap* está relacionada com a tradução e estabilidade do mRNA.

8.3.2 REMOÇÃO DE INTRONS

A próxima modificação a ser feita no pré-mRNA é a retirada dos introns e consequente união dos exons. Esse processo é chamado em inglês de "***splicing***", que consiste na edição de películas de filmes especificamente pelo corte e reunião das cenas desejadas (não é qualquer tipo de edição). Na falta de um bom termo em português usaremos a palavra inglesa. A figura 22 mostra um esquema geral do resultado do splicing.

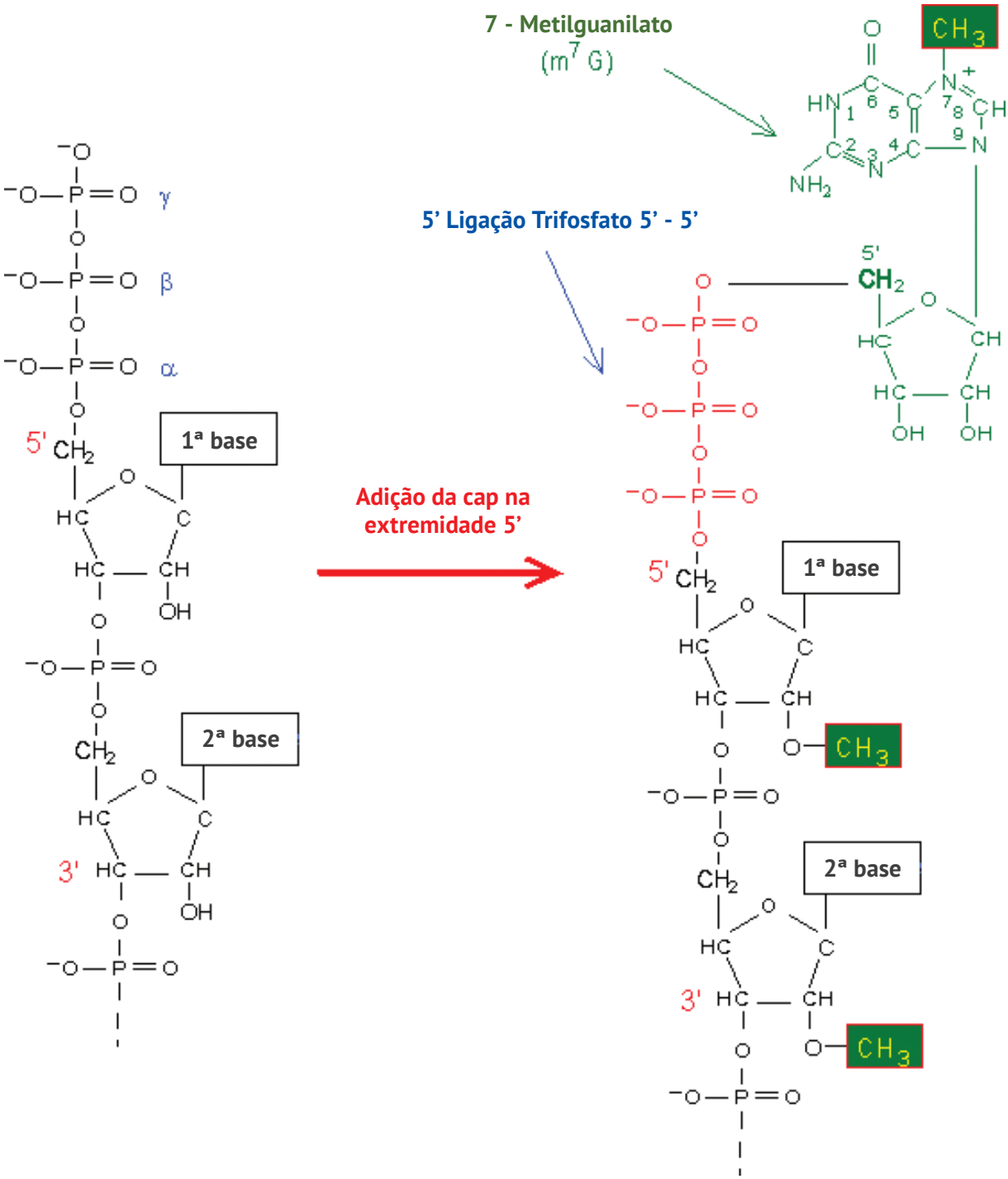


Figura 21. Esquema geral da modificação da extremidade 5' durante a maturação de mRNA. O resultado é a presença do cap (7 metil guanidina) em ligação 5'-5' com o primeiro nucleotídeo e possível metilação dos primeiros nucleotídeos. Modificado de http://www.web-books.com/MoBio/Free/images/Ch5A2.gif

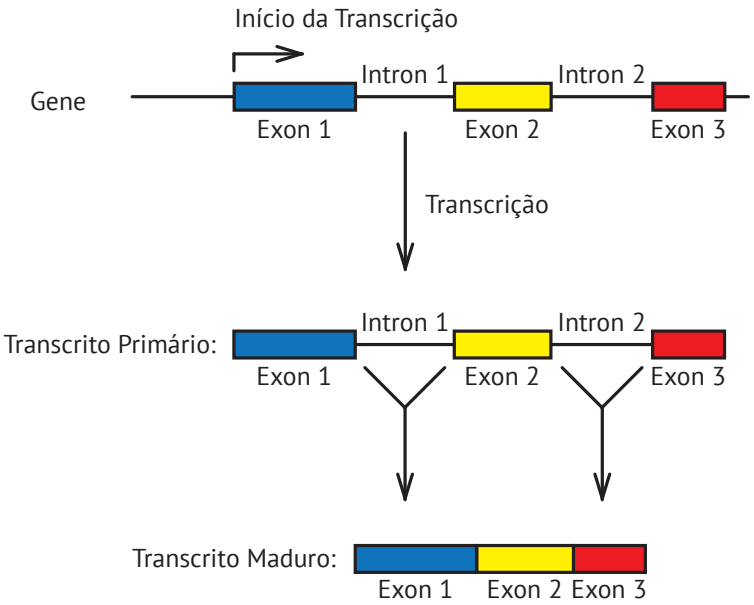


Figura 22. Esquema de maturação de mRNA, ressaltando a retirada de introns. Modificado de http://faculty.uca.edu/johnc/RNA%20splicing.gif

O *splicing* exige o reconhecimento do término dos introns e início dos exons, pois o corte e união devem ser exatos para não modificar a informação do mRNA. O processo mais generalizado de *splicing* requer um complexo chamado de ***spliceossomo***, que reconhece pequenas sequências nas extremidades de exons e introns e algumas sequências internas dos introns para catalisar a excisão, como esquematizado na figura 23. O spliceossomo é constituído de proteínas e pequenos RNAs nucleares, chamados de **snRNA** ("*small nuclear RNA*", que significa RNA nuclear pequeno). O conjunto de RNAs nucleares precursores de mRNA, que estão em diferentes fases do processamento é chamado de **hnRNA** ("*heterogeneous nuclear RNA*", RNA nuclear heterogêneo).

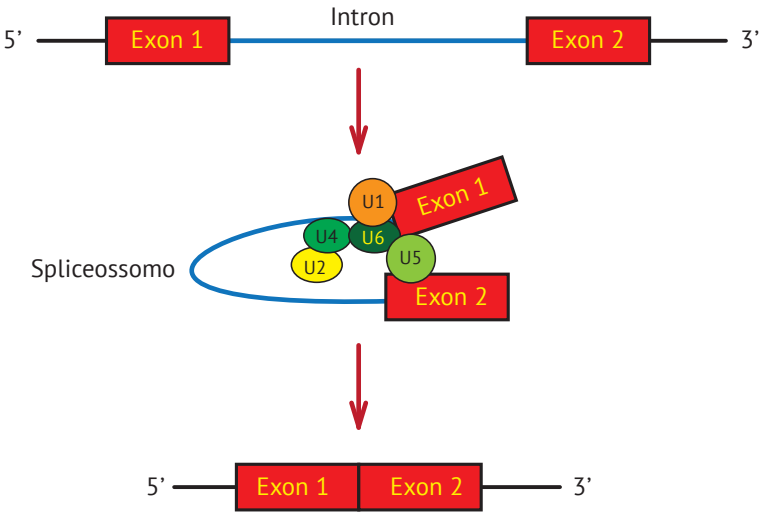


Figura 23. Esquema simplificado do processo de retirada de intron com a ação de spliceossomo, constituído de partículas nucleoprotéicas (U1 a U6). Modificado de http://www.web-books.com/MoBio/Free/images/Ch5A5.gif

Nas últimas décadas, com o estudo sistemático dos genomas e seus transcritos (**transcriptoma**), percebeu-se que o processo de *splicing* poderia explicar o paradoxo entre um número pelo menos três vezes maior de proteínas do que de genes humanos. Isso devido à possibilidade, em certos genes, de ocorrência de *splicing* retirando alguns exons juntamente com introns, o que proporciona a produção de diferentes mRNAs a partir da transcrição de um único gene. Esse mecanismo foi chamado de ***splicing* alternativo**, e a figura 24 ilustra um exemplo, mostrando o efeito da geração de diferentes mRNAs nas proteínas sintetizadas. Essas proteínas apresentam domínios em comum entre si, mas pode ter funções completamente diferentes, algumas vezes mesmo antagônicas. Os mRNAs diferentes resultantes de splicing alternativo podem ocorrer na mesma célula, ou cada um em uma célula diferente do mesmo tecido, ou cada um em células de tecidos diferentes, ou ainda, um determinado mRNA é sintetizado apenas em um período do desenvolvimento. Fica evidente, então, que o reconhecimento das sequências a serem retiradas deve sofrer algum tipo de regulação.

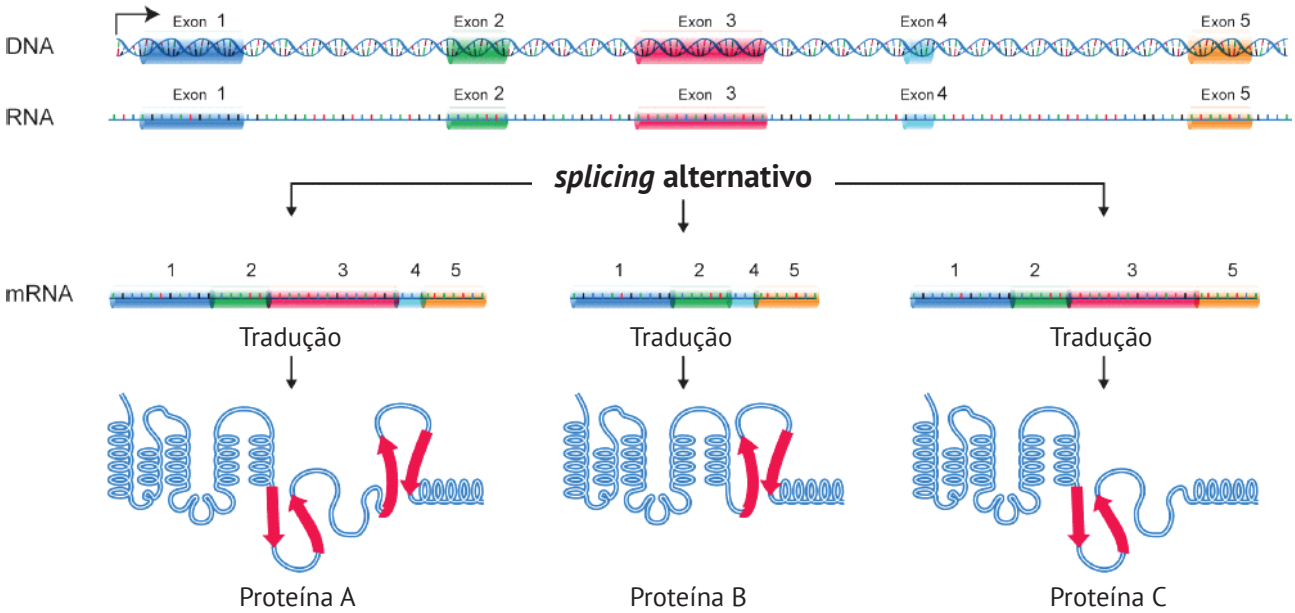


Figura 24. Esquema de splicing alternativo, com a produção de 3 mRNAs e consequentemente 3 proteínas diferentes a partir da transcrição de um único gene. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/DNA_alternative_splicing.gif

8.3.3. ADIÇÃO DE CAUDA DE POLI(A)

Finalmente, para a completa maturação do mRNA, já completamente transcrito, sua extremidade 3' deve ser modificada pela adição de aproximadamente 200 nucleotídeos de adenina, chamada de **cauda de poli(A)**. A cauda de poli(A), cuja presença é associada com estabilidade e tradução do mRNA, tem sua síntese catalisada pela enzima poli(A) polimerase, após o reconhecimento de uma sequência consenso no RNA precursor, que sinaliza o corte do RNA após sua

ocorrência e a síntese do poli(A). Essa sequência consenso (AAUAAA) é chamada de sinal de poliadenilação.

Agora o produto resultante, um mRNA maduro como o esquematizado na figura 25, pode ser transportado para o citoplasma e seu utilizado para a produção da proteína correspondente.

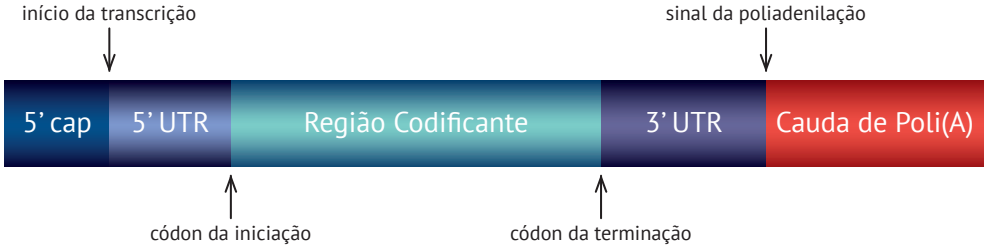


Figura 25. Esquema de mRNA eucariótico evidenciando as regiões não codificantes (5' e 3' UTRs), a posição dos códons de iniciação e terminação, e as modificações nas extremidades, *cap* e cauda de poli(A). Modificado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/d3/Mature_mRNA.png

Autoavaliação:

Como acontece a replicação do DNA? Quais suas peculiaridades?

Como acontece a transcrição do DNA? Como a RNA polimerase sabe onde começar a copiar?

Como as células decidem que genes serão transcritos em um determinado momento? A regulação gênica é igual em procariotos e em eucariotos?

Quais as diferenças entre o RNA transcrito em eucariotos e o mRNA? Como esse processamento ocorre?

Bibliografia indicada:

Genética – Um enfoque conceitual. Pierce, B.A. 2004. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

Memória Hoje: Fatos que mudaram nossa forma de ver a natureza. Vol. 1 Ciências Biológicas e Ambientais. Ivanissevich, A. e A.A.P. Videira (orgs.). 2008. Instituto Ciência Hoje, Rio de Janeiro, R.J.

Introdução à Genética. Griffiths, A.J.F; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C. e Carroll, S.B.. Nona edição (2009). Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

Genes IX. Benjamin Lewis. Nona edição (2009). Ed. Artmed, Porto Alegre, RS.

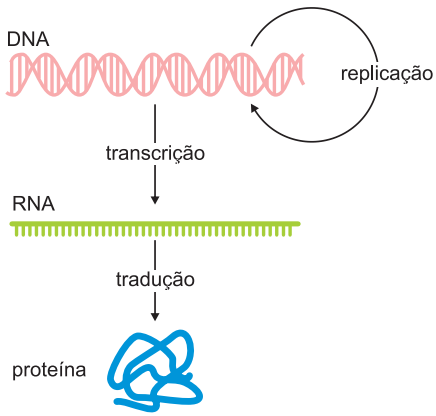
Fundamentos de Genética. Snustad, D.P. e M.J. Simmons. Quarta edição (2008). E. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

9 Fluxo da informação: tradução, modificações pós-traducionais e efeitos fenotípicos de mudança de seqüência de nucleotídeos

AULA 9: FLUXO DA INFORMAÇÃO: TRADUÇÃO, MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS E EFEITOS FENOTÍPICOS DE MUDANÇA DE SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS

Ao final desta aula o aluno deverá:

- compreender o mecanismo de tradução.
- saber que proteínas podem necessitar modificações para funcionar.
- compreender os efeitos de alterações no DNA codificante.



Estamos agora chegando ao final da discussão do conhecido "dogma central da Biologia", cuja representação encontra-se na figura 1. Sabemos como a informação se mantém e difunde entre as gerações pela replicação do DNA, e como a informação contida no DNA é enviada ao citoplasma para coordenar a síntese de proteína, pela transcrição e processamento de mRNAs. Então, vamos ver como as proteínas são produzidas.

Figura 1. Dogma central da Biologia. A informação está depositada no DNA, e é transmitida para coordenar a tradução pela síntese de RNA.Modificado de http://usuarios.lycos.es/biologiacelular3/Nucleo/DNA-RNA.jpg

9.1 TRADUÇÃO

O processo de síntese biológica de proteínas é chamado de tradução, pois a informação codificada em sequências de nucleotídeos deve ser interpretada para ser convertida, de maneira exata, em sequência de aminoácidos, de forma similar à conversão de um texto de uma linguagem para outro idioma.

9.1.1. PARTICIPANTES DA TRADUÇÃO: RNAS MENSAGEIROS (mRNAs), RIBOSSOMOS E RNAS DE TRANSFERÊNCIA OU TRANSPORTADORES (tRNAs)

O processo de tradução ocorre no citoplasma e necessita da participação de três tipos distintos de RNAs: RNAs mensageiros (mRNAs), que carregam a

receita da proteína a ser sintetizada; RNAs de transferência ou transportadores (tRNAs), responsáveis pela decodificação da mensagem trazida pelo mRNA; e RNAs ribossômicos, que formam, juntamente com proteínas ribossômicas, as duas subunidades dos ribossomos, que, por sua vez, criam o ambiente propício para a síntese de proteínas. Tanto em procariotos como em eucariotos, a transcrição dos rRNAs corresponde entre 80 a 90% do RNA produzido na célula. Os ribossomos ativos são isolados em associação com o mRNA. Em geral há muitos ribossomos associados a uma molécula de mRNA, formando os chamados polirribossomos ou polissomos.

Os ribossomos procarióticos e eucarióticos são bastante semelhantes em forma e, principalmente, em função, mas diferem em tamanho e composição. O tamanho de ribossomos, assim com das subunidades ribossômicas é representado em função de sua velocidade de sedimentação, medida em Svedbergs (S). Os ribossomos bacterianos apresentam 70S, sendo que a subunidade menor tem 30S e a maior 50S. O tamanho do ribossomo é menor do que a soma das subunidades porque a interação entre as duas cria uma superfície diferente e menor do que a soma das superfícies das duas subunidades. A subunidade maior do ribossomo bacteriano contêm os rRNAs 23S (que tem 2.904 nucleotídeos em *Escherichia coli*) e 5S (120 nucleotídeos), constituindo 66% de sua massa, e 31 proteínas ribossômicas. A subunidade pequena possui 21 proteínas e apenas o rRNA 16S (1542 nucleotídeos em *E. coli*), cuja sequência é bastante usada para identificação, classificação e análises filogenéticas em bactéria.

Em *E. coli* existem 7 operons de genes de rRNA (o número de cópias de operons de rRNA varia entre diferentes espécies bacterianas). Todos eles têm aproximadamente a mesma organização: promotor - rRNA 16S - gene espaçador (um ou mais genes de tRNA) – rRNA 23S – rRNA 5S – outro(s) gene(s) de tRNA. Quatro desses operons contêm o gene de $tRNA^{Glu}$ (que será ligado a ácido glutâmico) e três contêm o gene de $tRNA^{Ala}$ mais o gene de RNA^{Ile} (serão ligados a alanina e isoleucina, respectivamente) na região espaçadora. O(s) gene(s) de tRNA no final do operon varia(m) bastante.

Os ribossomos eucarióticos são constituídos de uma subunidade menor de 40S e uma subunidade maior de 60S, que formam uma estrutura de 80S. A subunidade 60S de mamíferos possui 49 proteínas ribossômicas e três rRNAs: 28S (4.718 nucleotídeos), 5,8S (160 nucleotídeos) e 5S (120 nucleotídeos). A subunidade 40S possui o rRNA 18S (1.874 nucleotídeos) e 33 proteínas. Os genes da maioria dos rRNAs encontram-se em uma única unidade transcricional (há a síntese de uma molécula de RNA que é clivada para produzir os rRNAs 18S, 5,8S e 28S) com grande número de repetições em tandem (um após o outro, na mesma direção), em apenas um ou em vários cromossomos, conforme a espécie. Mesmo estando em cromossomos diferentes essas regiões cromossômicas são expressas na mesma região nuclear, formando o nucléolo, com coloração específica devido à grande quantidade de RNA gerado. O uso de inibidores da RNA polimerase I faz o nucléolo desaparecer. A figura 2 ilustra esquematicamente a formação dos ribossomos eucarióticos.

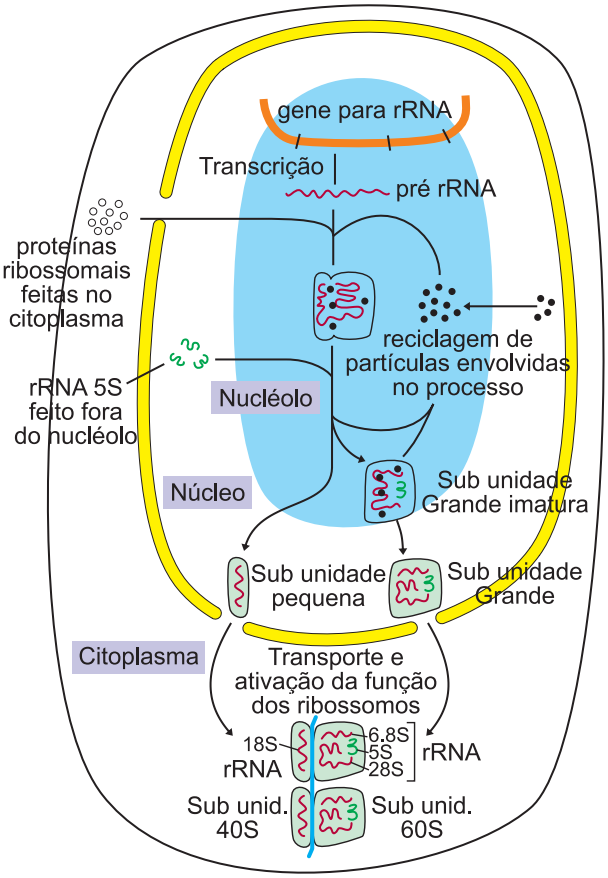


Figura 2. Esquema geral da formação de ribossomos eucarióticos e sua exportação para o citoplasma. Retirado de http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2000/fatores/figuras/transcricao.gif

Os ribossomos são geralmente representados por duas esferas (ou figuras ovais) ou duas hemiesferas, mas sua estrutura tridimensional parece ser bastante mais complicada. Existem pelo menos duas ranhuras principais, que abrangem as duas subunidades, que são conhecidas como sítio P (ou peptidil ou de ligação do peptídeo) e sítio A (ou aminoacil ou de ligação de aminoácidos). Quando estivermos analisando o processo de tradução em detalhe ficará evidente a importância desses sítios.

Finalmente chegamos ao RNA de transferência ou transportador (tRNA). Apesar de possuir uma única cadeia esse tipo de RNA assume uma conformação que pode lembrar um trevo, pelo pareamento de regiões da própria molécula, formando hastes pareadas e alças não pareadas (veja figura 3). Em uma dessas alças, em posição oposta à extremidade da molécula, existe uma trinca (três) de nucleotídeos que é específica para cada determinado tipo de molécula de tRNA: o anticódon. O anticódon é complementar ao códon presente no mRNA, que determina que aminoácido deve ser incorporado na proteína naquele momento. Para que o tRNA participe da tradução é necessário que ele esteja ativado (ou carregado), ou seja, tenha seu aminoácido específico ligado à hidroxila 3'.

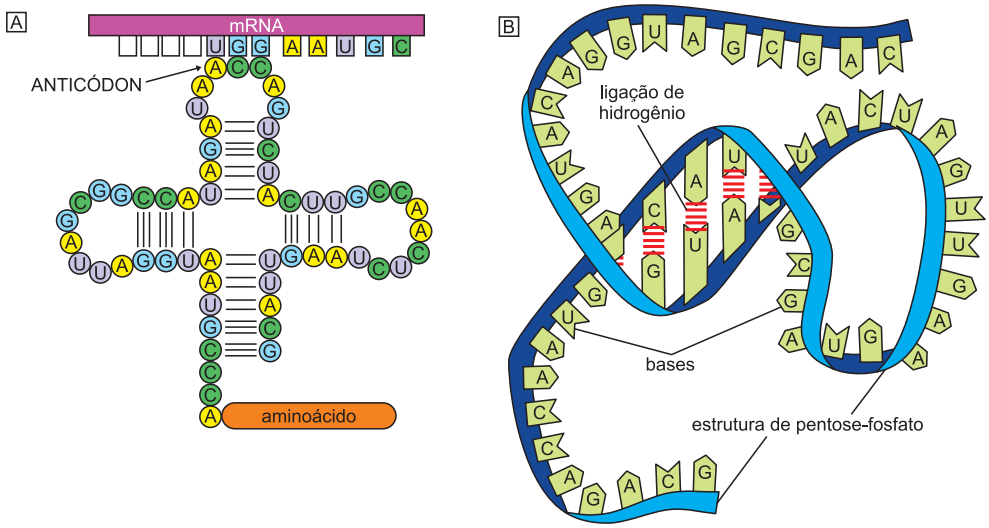


Figura 3. A. Esquema de estrutura de tRNA ilustrando as hastes pareadas e as alças, que sugerem a figura de um trevo e mostrando o pareamento do anticódon com o códon no mRNA e o aminoácido específico ligado covalentemente à extremidade 3'. B. Esquema de formação de estrutura secundária de RNA por pareamento intracadeia. Modificado de www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/images/TransferRNA.gif e www.uic.edu/classes/phys/phys461/phys450/ANJUM04/RNA_sstrand.jpg

A ativação dos tRNAs requer a atuação de enzimas chamadas genericamente de aminoacil-tRNA sintetases que reconhecem um tRNA específico por sua estrutura e anti-códon. Um tRNA que reconhece um códon específico de glicina será carregado pela ação da glicil-tRNA sintetase, e assim por diante. O conjunto dos tRNAs pode ser considerado como a base física do dicionário usado para traduzir a informação dada em sequência de nucleotídeos para a linguagem de polímero de aminoácidos. Esse dicionário, que relaciona trincas de nucleotídeos presentes no RNA (com informação anterior no DNA), os códons, com os aminoácidos que constituirão as proteínas, é chamado de **código genético**.

9.1.2. O CÓDIGO GENÉTICO

O código genético é geralmente representado por uma tabela de códons (mas pode ser representado como tabela de anticódons também), como mostrado na figura 4. A leitura dos códons é feita procurando-se a primeira base da trinca (5') em uma linha da coluna da esquerda, a segunda base é localizada em uma das quatro subdivisões da coluna central e, finalmente, respeitando a localização da dupla de bases previamente localizada, identifica-se a posição da terceira base do códon (3') na coluna à direita. No miolo da tabela, onde se encontra o ponto resultante do encontro das três coordenadas referentes às bases, aparece a abreviatura do aminoácido correspondente a esse códon. O código genético é chamado de universal, porque seu uso é observado basicamente em todos os organismos conhecidos, embora em alguns poucos organismos um ou poucos códons possam ter significado diferente.

Observe atentamente a figura 4. Veja que podem existir mais de um códon

sinalizando a utilização do mesmo aminoácido, embora alguns aminoácidos, como a metionina e o triptofano, sejam codificados por apenas uma trinca para cada um. Devido a isso o código genético é chamado de degenerado ou redundante. Existem três trincas, chamadas de códons de terminação ("*stop codons*") que não codificam aminoácido algum, não existindo qualquer tRNA que os reconheça. A falta de informação para a incorporação de aminoácidos torna esses códons sinalizadores de que a tradução da proteína codificada pelo mRNA chegou ao fim. Observe também que o códon para metionina está representado em negrito na figura 4, destacando-o dos demais. A razão desse destaque é a síntese da proteína em geral começa no primeiro códon de metionina do mRNA. O reconhecimento deste primeiro códon para metionina determina como a leitura do mRNA será feita, estabelecendo o que chamamos de fase (ou quadro ou janela) de leitura: os códons serão formados a cada três nucleotídeos adjacentes, iniciando-se do códon para metionina (sem pular nenhum nucleotídeo da sequência do mRNA).

1ª posição	2ª posição				3ª posição
term. 5'	U	A	C	G	term. 3'
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr **STOP** **STOP**	Cys Cys **STOP** Trp	**U** **C** **A** **G**
A	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	**U** **C** **A** **G**
C	lle lle lle Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	**U** **C** **A** **G**
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	**U** **C** **A** **G**

Figura 4. Tabela de códons que compõem o código genético. Os aminoácidos estão representados pela abreviatura em inglês de seus nomes. A maneira como a leitura da tabela deve ser feita está descrita no texto. Retirado de http://www.infoescola.com/Modules/Articles/Images/rna3.jpg

Vamos a um exemplo usando letras e pequenas palavras como se fossem, respectivamente, as bases dos nucleotídeos e os códons para aminoácidos. Considere a seguinte sequência de letras:

SAFUIPRORIOVERMEUTIO

Se começarmos a fase a leitura a partir da primeira letra, teríamos como mensagem:

SAF UIP ROR IOV ERM EUT IO

Faz algum sentido? Não, essa frase não tem sentido algum em português. Portanto, se considerarmos o exemplo como similar ao processo biológico, a proteína codificada não teria função alguma, sendo, portanto, um desperdício sintetizá-la. E se começarmos pela segunda letra?

S AFU IPR ORI OVE RME UTI O

Continua sem fazer sentido. Vamos tentar agora começar pela terceira letra:

SA FUI PRO RIO VER MEU TIO

Agora sim! Temos uma mensagem que faz sentido: "Fui pro Rio ver meu tio". Claro que tivemos que descartar as letras iniciais para a tradução, mas isso não importa, a mensagem foi transmitida. De maneira similar ao exemplo acima, quando nos deparamos com uma sequência de DNA que sabemos (ou supomos) que será transcrita, podemos analisar que proteínas podem ser codificadas nas três fases de leitura possíveis (a primeira fase de leitura começando da primeira base da sequência disponível, a segunda fase de leitura começando da segunda base e a terceira fase de leitura começando da terceira) considerando que essa sequência seja a sequência codificante. O mesmo tipo de análise pode ser feita supondo que a sequência de DNA disponível seja parte da fita molde, observando-se, portanto, os possíveis polipeptídeos codificados pela sequência complementar à que dispomos.

Se tivermos a informação que a mensagem do nosso exemplo com palavras começa com "Fui", o encontro dessa palavra já determinará como a frase deve ser lida, à semelhança do primeiro códon para metionina na tradução de um mRNA.

Para a célula o início da tradução de um mRNA deve ser especificamente marcado e o primeiro códon para metionina é precedido por uma sequência que sinaliza o início da tradução, por promover a ligação do ribossomo.

9.1.3. O PROCESSO DA TRADUÇÃO

Vamos ver o início da tradução com um pouco mais de detalhe. Essa etapa inicial apresenta algumas diferenças significativas entre procariotos e eucariotos, principalmente em relação ao reconhecimento do primeiro códon. Uma característica comum, entretanto, é que as duas subunidades ribossômicas encontram-se desassociadas no citoplasma, sendo que o ribossomo só é efetivamente formado quando associado ao mRNA.

Comecemos com a iniciação de tradução em procariotos. Como vimos na aula anterior, o mRNA de procariotos apresenta uma sequência (ou várias, se for um mRNA policistrônico) chamada de Shine-Dalgarno ou rbs ("*ribosome binding site*",

sítio de ligação do ribossomo) anterior ao códon de iniciação. Essa sequência é reconhecida pela subunidade pequena do ribossomo que se associa a ela devido ao seu pareamento com a extremidade 3' do rRNA 16S. Na sequência ocorre a ligação do tRNA iniciador, que é um tRNA especial, diferente do tRNA que é usado para introduzir metionina em posições posteriores da proteína. O tRNA iniciador vem carregado (ligação na hidroxila da extremidade 3') com metionina que foi modificada pela adição de um grupo formil (CH_3) em seu grupo NH_2 (é representado por $tRNA_f^{met}$) e seu anticódon pareia-se com o códon de iniciação (na regra AUG, com algumas exceções GUG ou UUG). A seguir há a ligação da subunidade maior, formando o ribossomo. O $tRNA_f^{met}$ fica posicionado no sítio P do ribossomo (releia a estrutura do ribossomo no item 9.1.1), deixando o sítio A livre para o pareamento do tRNA carregado com o aminoácido codificado pelo códon adjacente. Veja a representação desse processo na figura 5.

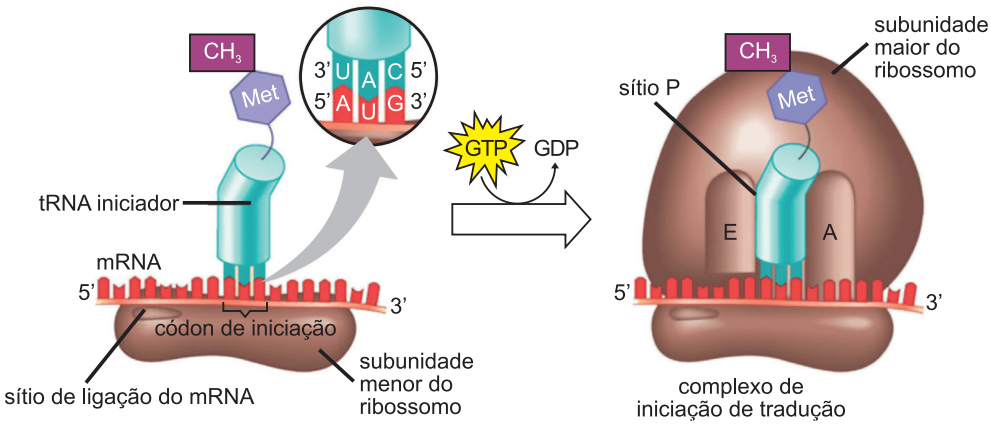


Figura 5. Iniciação de tradução em bactéria. Ocorre a ligação da subunidade menor do ribossomo por pareamento com o rRNA16S e o pareamento do $tRNA_f^{met}$, carregado com uma metionina em cuja extremidade NH_2 foi adicionado um radical formil (CH_3). A seguir ocorre a ligação da subunidade maior do ribossomo com a formação dos sítios P, onde está albergado o $tRNA_f^{met}$ e A, onde ficará o próximo tRNA carregado, pelo pareamento de seu anticódon com o códon do mRNA. Está representado também um sítio chamado de E (de "*exit*", que significa saída), que não é reconhecido por muitos autores, que seria onde ficaria o tRNA vazio, após a ligação de seu aminoácido ao peptídeo nascente. Modificado de http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/translation_initiation.jpg

Em eucariotos, primeiro ocorre a formação de um complexo, chamado de 43S, que é composto pela subunidade menor do ribossomo, alguns fatores protéicos de iniciação de tradução (que sairão quando a tradução começar) e o $tRNA_i^{met}$ carregado com metionina (que não é formilada). Esse complexo se liga ao *cap* na extremidade 5' do mRNA[1] e passa a rastrear o mRNA em direção a extremidade 3' até encontrar o AUG (em geral o primeiro) no contexto apropriado, isto é, imediatamente precedido da sequência de Kozack. Nesse momento acontece a ligação da subunidade maior do ribossomo, e a síntese protéica pode começar.

A próxima etapa do processo de síntese protéica, que é quando os aminoácidos são polimerizados, é conhecida como **elongação**. A figura 6 esquematiza os diferentes momentos da elongação. Inicialmente temos o pareamento do

1 - Reveja o que é cap relendo o item 8.3 da aula 8.

tRNA carregado com o aminoácido codificado pelo códon seguinte ao códon de iniciação. Na sequência, o terminal carboxi da metionina inicial forma uma ligação covalente com o terminal amino do segundo aminoácido, que permanece ligado a seu tRNA. Essa ligação entre os aminoácidos em um polipeptídeo é chamada de ligação peptídica, e a atividade de síntese é chamada de peptidil transferase, sendo catalisada pelo rRNA 23S da subunidade maior do ribossomo. O tRNA ligado ao dipeptídeo não pode ficar albergado no sítio A do ribossomo, que é destinado a tRNAs com apenas um aminoácido ligado. Para resolver essa situação acontece uma translocação do ribossomo em relação ao mRNA, posicionando o tRNA com o dipeptídeo no sítio P e deixando o sítio A livre para o pareamento do tRNA carregado com o próximo aminoácido a ser introduzido na cadeia polipeptídica. O tRNA descarregado se desliga do ribossomo e torna-se alvo de sua aminoacil tRNA sintetase para ligação com uma nova molécula de aminoácido. E o processo se repete até o posicionamento do códon de terminação no sítio A: pareamento do tRNA carregado, ligação do carboxi do aminoácido anterior com o amino do próximo aminoácido, translocação do ribossomo posicionando o peptídeo nascente no sítio P e deixando o sítio A disponível, saída do tRNA sem aminoácido, pareamento do tRNA carregado ao próximo aminoácido, ...

Como discutido anteriormente, cada tRNA possui um anticódon cujas bases pareiam com as bases do códon no mRNA. Entretanto, a não ser quando a última base do códon for G, é possível que esse pareamento aconteça de maneira normal apenas para as duas primeiras bases do códon, havendo flexibilidade no pareamento da terceira base do códon com o anticódon do tRNA. Essa é a base da hipótese da oscilação ("*wobble hypothesis*") que assume que as regras normais de pareamento códon-anticódon se apliquem sempre às duas primeiras posições do códon, mas haja "oscilações" excepcionais no pareamento da terceira posição que permitiriam um único tRNA reconhecer mais de um códon para o mesmo aminoácido. Guanina na terceira posição aparece nos dois códons únicos do código genético: AUG, para metionina, e UGG, para triptofano. Conjuntos de quatro códons para o mesmo aminoácido que diferem apenas na terceira posição podem ser reconhecidos por um mesmo tRNA que contenha a base modificada inosina (I), capaz de formar ligações de hidrogênio com todas as demais bases, em seu anticódon. A modificação de bases constituintes de tRNAs acontece normalmente em diversas posições da molécula.

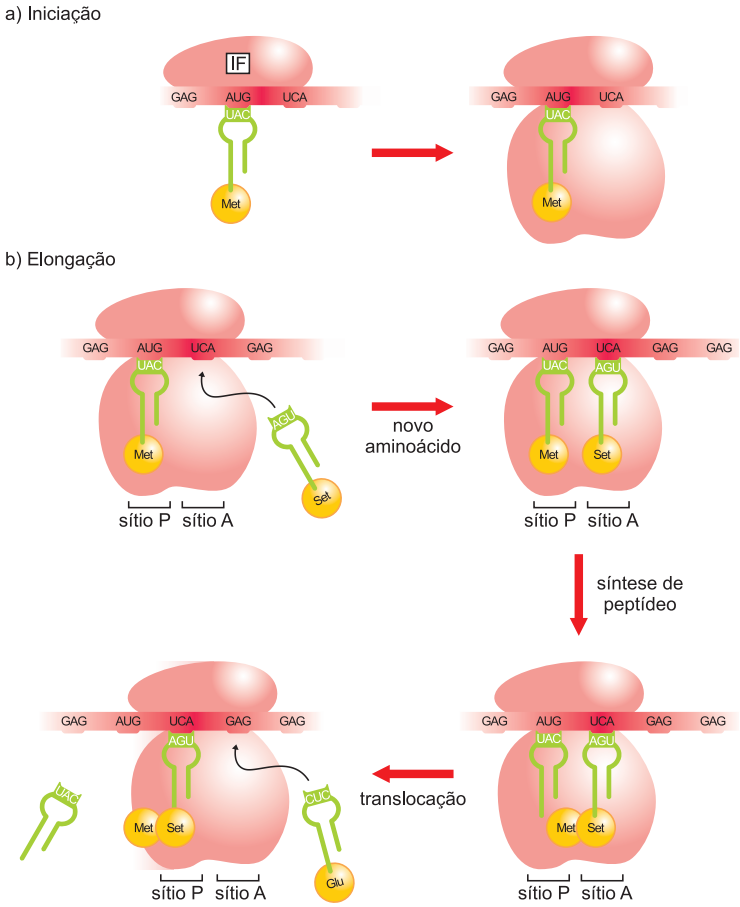


Figura 6. Esquema das fases de iniciação e elongação de tradução, evidenciando a entrada de tRNA carregado no sítio A, a ligação do segundo aminoácido com a metionina, a translocação do ribossomo e a saída do tRNA sem aminoácido. Modificado de http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/protein-synthesis.gif

Embora na representação esquemática o peptídeo nascente apareça quase inteiramente fora do ribossomo, sabe-se que no ambiente ribossômico resguarda aproximadamente 30 resíduos recém polimerizados da proteína nascente. Como o peptídeo continua crescendo durante o processo de tradução, a proteína nascente vai deixando o ribossomo e, em geral, começa a assumir sua estrutura secundária e, posteriormente, terciária.

O ribossomo movimenta-se pelo mRNA em direção a extremidade 3' até que o sítio A esteja posicionado no códon de terminação (veja figura 7). O códon de terminação não é reconhecido por qualquer tRNA mas é reconhecido por fatores protéicos que promovem a quebra da ligação do último aminoácido com seu tRNA e desmonte consecutivo de todo o aparato de tradução, liberando as subunidades ribossômicas para reiniciarem o processo no mesmo ou em outros mRNAs.

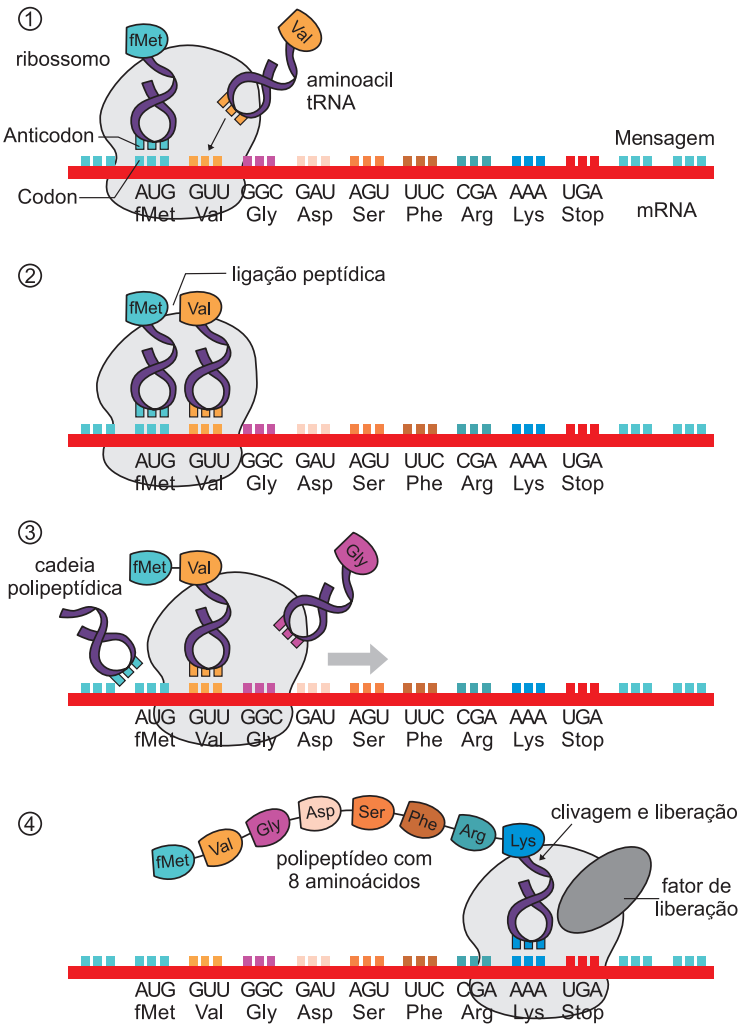


Figura 7. Esquema das etapas de elongação (1-3) e terminação de tradução (4). Modificado de http://oregonstate.edu/instruction/bb331/lecture12/fi5p20.gif

9.2. MODIFICAÇÃO E ENDEREÇAMENTO DE PROTEÍNAS

Após sua síntese, algumas proteínas espontaneamente conseguem assumir sua conformação funcional. Outras necessitam entrar em contato com uma classe de proteínas chamadas de **chaperones** ou **chaperonas** (que dá a ideia de acompanhantes) para assumir a conformação apropriada. Chaperones podem contribuir para a renaturação apropriada de proteínas desnaturadas.

Às vezes a atividade de uma proteína depende de modificações, reversíveis ou não, de sua molécula. Essas modificações podem ser clivagens, formação de pontes de dissulfeto entre cisteínas, fosforilação, glicosilação (ligação de moléculas de açúcar) ou ligação covalente com outros tipos de molécula. Essas modificações são chamadas de modificações pós-traducionais.

Em eucariotos, a grande maioria das proteínas é sintetizada no citoplasma, embora algumas sejam produzidas nas mitocôndrias (e nos cloroplastos, quando estes existem). As organelas possuem moléculas de DNA próprias, portanto, em seu interior ocorre transcrição e tradução (procure as semelhanças e diferenças entre esses processos dentro e fora das organelas). Mas essas organelas que possuem DNA não são capazes de produzir todas as proteínas necessárias para seu funcionamento. Assim, como em organelas que não possuem DNA, é necessária a existência de processos de endereçamento de proteínas e que permitam sua translocação (processo de inserção ou de passagem através de membranas).

As proteínas sintetizadas no citoplasma podem ter diferentes destinos:

- o próprio citoplasma, sendo proteínas do citossol (solúveis) ou associadas a estruturas específicas (como centríolo, por exemplo).
- o núcleo, necessitando transporte pelos poros da carioteca.
- as organelas, como mitocôndrias e cloroplastos.
- sistema reticuloendotelial, que compreende sistemas membranosos citoplasmáticos, como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, lisossomos e endossomos.
- o meio extracelular. São proteínas que percorrem o trajeto reticuloendotelial, mas são exportadas para fora da célula.

A passagem através de membranas é feita com auxílio de **translocons**, complexos protéicos inseridos na camada bilipídica, que podem exigir ou não a formação de um complexo com proteínas carreadoras para permitir a translocação. O processo de translocação pode ser iniciado durante o processo de tradução, sendo chamado de translocação **co-traducional**, ou apenas após o término da síntese da proteína em questão, sendo então chamado de translocação **pós-traducional**. A translocação co-transducional acontece com proteínas endereçadas ao retículo endoplasmático, que assume o aspecto rugoso (retículo rugoso) devido à proximidade dos ribossomos responsáveis pela síntese da proteína que começou o processo de translocação antes de ter sido completamente traduzida.

As proteínas que sofrem translocação pós-traducional apresentam sequências de aminoácidos que sinalizam seu destino cuja localização varia conforme o tipo de sinal. Em proteínas endereçadas ao peroxissomo o sinal está no carboxi terminal, e o sinal de localização nuclear encontra-se na porção interna da proteína.

Proteínas com translocação co-traducional ou pós-traducional direcionadas para mitocôndria ou cloroplasto apresentam em seu N-terminal (que é a primeira extremidade a ser feita) uma sequência de aminoácidos, chamada de **sequência sinal**, que direciona a proteína ao transportador na membrana e é clivada após a translocação da proteína, impedindo que esta volte ao citoplasma.

Em bactérias existe tanto translocação co-traducional quanto pós-traducional para a exportação de proteínas para o periplasma ou meio extracelular.

9.3. EFEITO DE MUTAÇÕES

9.3.1 CLASSIFICAÇÕES DE MUTAÇÕES

As mutações são alterações na sequência de nucleotídeos do DNA que são geralmente identificadas pelas alterações fenotípicas que promovem, seja em características morfológicas, imunológicas ou bioquímicas. Podemos classificar mutações de diversas maneiras, em função de vários aspectos. As mutações são alterações que podem ocorrer de modo espontâneo (como um erro na duplicação do DNA, por exemplo), sendo chamadas de **espontâneas**, ou após indução pelo efeito de um agente mutagênico (seja ele químico ou físico), sendo chamadas de **induzidas**. Dependendo do tipo de célula em que a mutação ocorre, ela será classificada em **somática** (se ocorrer em células do indivíduo que não gerarão gametas) ou **germinativa** (se ocorrer em células do indivíduo que gerarão gametas). Quando as mutações envolvem uma ou poucas bases do DNA são chamadas de **mutações de ponto** (ou **pontuais**). Quando envolvem grandes extensões de DNA, comprometendo, em geral, mais de um gene, são chamadas de **mutações cromossômicas**. As mutações podem ser resultados de troca de nucleotídeos, sem alteração no tamanho da molécula de DNA. Se houver a troca de uma purina (adenina e guanina) por outra purina, ou de uma pirimidina (timina e citosina) por outra pirimidina, essa mutação recebe o nome de **transição**. Se ocorrer a troca de uma purina por uma pirimidina (ou vice-versa), a mutação recebe o nome de **transversão**. Se ocorrer a introdução de um ou mais pares de bases na dupla-fita de DNA, a mutação será chamada de **inserção**, e se um ou mais pares de bases forem retirados, será chamada de **deleção**.

9.3.2. MUTAÇÕES EM REGIÕES CODIFICANTES

É evidente que o efeito das mutações estará relacionado com a função codificada pelo DNA modificado. Se a mutação alterar a sequência de uma região promotora, o gene atingido poderá deixar de ser transcrito de maneira normal, uma vez que a modificação pode alterar o reconhecimento da região pelo aparato de transcrição.

Se a mutação ocorrer dentro da ORF (reveja o conceito no item 8.2.2 da aula anterior), poderá causar diferentes efeitos na proteína a ser sintetizada. Vamos começar com a simples troca de nucleotídeos. A figura 9 mostra exemplos de trocas de nucleotídeos na sequência codificante de uma proteína. Se a alteração do códon não alterar o aminoácido na proteína (porque o código genético é degenerado), a mutação será chamada de **sinônima** por alguns autores e **silenciosa** por outros, e só será detectada pelo seqüenciamento do DNA. Se a troca de base levar à troca de aminoácido na proteína, a mutação será chamada de **não-sinônima**, ou **mutação de sentido trocado** ("*missense*"). Alguns autores usam o termo mutação de sentido trocado apenas quando a troca de aminoácido causa grande alteração de função da proteína e, se a mudança de aminoácido não for acompanhada de alteração conspícua de função, passa a ser chamada de **mutação neutra**.

A troca de bases em uma sequência codificante pode também introduzir um códon de terminação precoce, que encurta o tamanho do polipeptídeo, e é chamada de **mutação sem sentido** ("*nosense*"). Pode também tornar um códon de terminação em um códon de aminoácido, tornando o polipeptídeo mais longo.

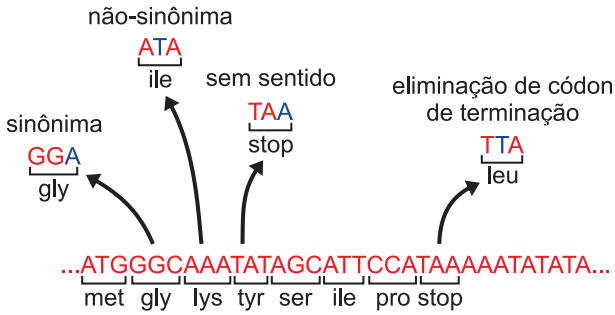


Figura 9. Efeito de mutações de ponto em um polipeptídeo. Mutações sinônimas não causam qualquer alteração na proteína, mutações não sinônimas alteram apenas um aminoácido, mutações sem sentido promovem a síntese de um polipeptídeo menor e mutação no códon de terminação tornando-o em códon para leucina faz com que o polipeptídeo fique maior. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/genomes/ch14f11.gif

Inserções ou deleções de nucleotídeos (em número que não seja múltiplo de 3) em regiões codificantes acarretam **mudança na fase de leitura** ("*frameshift*"), alterando toda sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificada por nucleotídeos posteriores à mutação. Veja no exemplo de inserção abaixo, usando novamente letras e palavras.

sequência selvagem: FUI PRO RIO VER MEU TIO

inserção de A: FAU IPR ORI OVE RME UTI O

A mensagem ficou completamente descaracterizada! Veja o que acontece se a inserção for imediatamente após a 10ª letra:

sequência selvagem: FUI PRO RIO VER MEU TIO

inserção de A: FUI PRO RIO VAE RME UTI O

A mensagem foi comprometida, mas as alterações só ocorreram após a letra inserida.

Vamos ver agora o que acontece se forem inseridas duas letras:

sequência selvagem: FUI PRO RIO VER MEU TIO

inserção de AA: FAA UIP ROR IOV ERM EUT IO

E se forem inseridas 3 letras?

sequência selvagem: FUI PRO RIO VER MEU TIO

inserção de AAA: FAA AUI PRO RIO VER MEU TIO

Nesse último exemplo a inserção modificou dois códons (acrescentaria apenas um se a inserção tivesse acontecido em fase), mas a fase de leitura permaneceu preservada.

A deleção causa o mesmo tipo de efeito, a mudança da fase de leitura, que a inserção. Veja por você mesmo, repetindo os exemplos acima apenas retirando letras ao invés de introduzindo-as.

9.3.3. MUTAÇÕES SUPRESSORAS

As mutações que vimos até agora são chamadas de **mutações diretas**, pois acarretam modificação do tipo selvagem criando o mutante. Mutações em mutantes que levam ao retorno à sequência selvagem são chamadas de **reversões**. Preste bastante atenção na sentença anterior: mutações em mutantes que levam ao **retorno à sequência selvagem** são chamadas de reversões. Isso porque o fenótipo selvagem pode ser obtido pela ocorrência de uma nova mutação, em outro ponto do mesmo ou de outro gene, sendo chamada de **supressor**, ou **mutação supressora**. A deleção de uma base em uma sequência codificadora que havia sofrido inserção faz com que a fase de leitura retorne ao normal, mas ainda há alterações na sequência. Veja o exemplo abaixo.

sequência selvagem:	FUI PRO RIO VER MEU TIO
inserção de A:	FUA IPR ORI OVE RME UTI O
deleção posterior de O:	FUA IPR RIO VER MEU TIO

Esse é um exemplo de supressão em que a segunda mutação ocorreu no mesmo gene que havia sido mutado anteriormente. Quando isso ocorre chamamos de **supressão intragênica**.

Algumas vezes a supressão é devida a uma mutação em um gene diferente do anteriormente mutado. Nesses casos, é chamada de **supressão extragênica**. Veja na figura 10, um exemplo de supressão extragênica. O efeito de uma mutação sem sentido é desfeito pela mutação no anticódon de um tRNA que passa a reconhecer aquele códon de terminação como códon para o seu aminoácido (no caso do exemplo, tirosina). Como nesse exemplo a mutação supressora não apenas suprime a mutação mostrada na figura, mas qualquer outra que crie um códon de terminação UAG, ela é chamada de **supressão informacional**. É claro que uma supressão informacional poderia, a princípio, causar alteração na síntese de outras proteínas, tanto porque deixa de reconhecer um determinado códon como sendo de terminação como por deixar de reconhecer o códon original do aminoácido. Isso não ocorre de maneira significativa porque, em geral, existem vários códons de terminação consecutivos ao final de uma ORF e, existe redundância de genes de um mesmo tRNA, fazendo com que moléculas codificadas por diferentes genes estejam presentes no citoplasma ao mesmo tempo.

O que aconteceria se uma mutação ocorresse em um intron de um gene eucariótico? A princípio, como os introns são retirados na maturação do mRNA,

essa mutação não estaria presente no mRNA, não podendo, portanto, modificar a sequência de aminoácidos da proteína codificada. Na maioria das vezes, é exatamente isso que ocorre, mas, se a mutação criar novo um sítio a ser reconhecido no processo de splicing o mRNA resultante será diferente do original pois haverá alteração na sequência de intron removida. Na figura 11 um exemplo de mutação que cria, dentro do intron, o sinal de junção intron-exon (sítio aceptor de splicing). Com isso, o mRNA que codifica a β-globina passará a codificar a uma proteína diferente, que será degradada precocemente, embora no exemplo usado a diferença será o acréscimo de apenas 6 aminoácidos porque a permanência desse trecho de intron não alterou a fase de leitura (foi um acréscimo de 18 nucleotídeos, que é um múltiplo de 3). O desbalanço entre a quantidade de subunidades a e b da hemoglobina leva a um quadro clínico conhecido como talassemia (talassemia α ou β, conforme qual das subunidades está em quantidade errada).

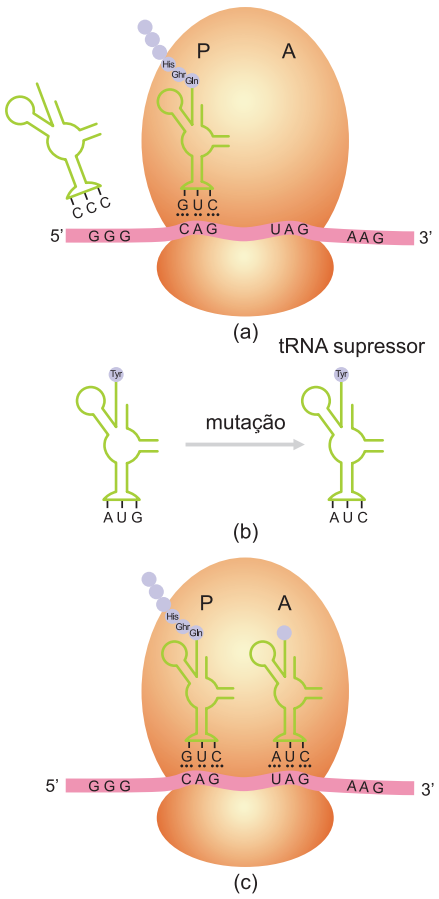


Figura 10. Exemplo de mutação supressora extragênica informacional. Em **(a)** está representado a terminação de tradução de um determinado mRNA pela entrada do códon de terminação no sítio A. Podemos supor que esse códon de terminação é resultante de uma mutação sem sentido. Em **(b)** está representada uma mutação que altera o anticódon de um tRNA de tirosina, que continuará a ser ligada nessa molécula. Essa mutação permite que esse tRNA passe a reconhecer o códon de terminação UAG. Em (c) está representada a supressão da mutação sem sentido, uma vez que o codon UAG será reconhecido pelo $tRNA^{tyr}$ e a tradução prosseguirá. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/iga/ch10f38.gif

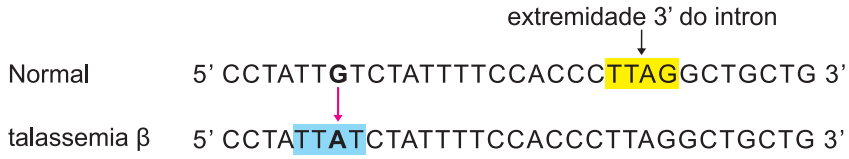


Figura 11. Mutação de ponto no interior do intron (assinalada por uma seta vermelha) cria sequência idêntica (em azul) à que sinaliza a extremidade 3' do intron (em amarelo), passando a funcionar como sítio aceptor de splicing. Dessa maneira o mRNA do mutante será maior que o mRNA selvagem em 18 nucleotídeos. Modificado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/stryer/ch28f28.gif

As mutações em sequências codificantes podem levar à perda, completa ou parcial, de função ou ganho de uma nova função, ou seja, a proteína passa a exercer um papel que não fazia anteriormente. Mutações em sequências regulatórias modificarão as quantidades da proteína produzida, sempre ou em determinada circunstância, podendo haver falta ou excesso de síntese. Em indivíduos diplóides o efeito de uma mutação pode ser detectado em heterozigotos apenas se a mutação for dominante, seja porque traz um ganho de função, seja porque a perda de função não pode ser suprida pela expressão do alelo selvagem.

Autoavaliação:

Como é o processo de síntese de proteínas?

As proteínas recém sintetizadas são sempre ativas?

Como mutações são classificadas?

Como mutações podem alterar a função de proteínas?

Bibliografia indicada:

Genética – Um enfoque conceitual. Pierce, B.A. 2004. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

Introdução à Genética. Griffiths, A.J.F; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C. e Carroll, S.B.. Nona edição (2009). Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

Genes IX. Benjamin Lewis. Nona edição (2009). Ed. Artmed, Porto Alegre, RS.

Fundamentos de Genética. Snustad, D.P. e M.J. Simmons. Quarta edição (2008). E. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J.

Composto em caracteres Aller, Arial, Calibri, PT Sans e Times New Roman.
Editorado pelo Centro de Apoio à Educação a Distância da UFMG (CAED-UFMG).
Impresso pela Adescryn Gráfica Editora LTDA.
Capa em Supremo, 250g, 4 X 0 cores - Miolo Off Set 120g, 4X4 cores.
Julho - 2011

ISBN 978-85-64724-01-3



PRÓ LICENCIATURA

UAB UNIVERSIDADE ABERTA DO BRASIL

GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

CAED - UFMG

UFMG