

## INIBIÇÃO E REGULAÇÃO ENZIMÁTICA

### META

Entender como os inibidores enzimáticos e a regulação enzimática interferem na velocidade das reações enzimáticas.

### OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:

definir inibição enzimática;

classificar inibição enzimática;

descrever a inibição irreversível;

descrever a inibição reversível competitiva;

descrever a inibição reversível incompetitiva;

reconhecer a inibição reversível mista;

descrever e classificar enzimas reguladoras;

descrever as propriedades das enzimas alostéricas;

descrever as propriedades das enzimas reguladas covalentes; e

definir zimogênios e descrever a sua formação.

### PRÉ-REQUISITOS

Para acompanhar esta aula, é importante buscar subsídios nos conteúdos trabalhados na aula introdução ao estudo das enzimas.



Modelo do enzima *Purina nucleósido fosforilase* (PNP) gerado por computador (Fonte: <http://pt.wikipedia.org>).

### INTRODUÇÃO

Diversos fatores alteram a velocidade de uma reação enzimática, entre eles temos a concentração do substrato no estado de transição, variações no pH do meio em que a enzima se encontra e a elevação da temperatura. Enquanto aumentos da concentração do substrato no estado de transição elevam a velocidade da reação; as variações do pH do meio em que as enzimas se encontram e as elevações da temperatura provocam a desnaturação da enzima, diminuindo a velocidade da reação. A influência desses fatores foi vista na aula introdutória do assunto enzimas. Nessa aula vamos estudar dois outros fatores que interferem na velocidade enzimática: a inibição e a regulação enzimática. De fato, muitos processos enzimáticos podem ser interrompidos, inibidos ou ativados, durante certas fases no ciclo de vida da célula. Se assim não fosse, a célula poderia apresentar um crescimento descontrolado, como o que é observado nas células cancerosas. O estudo da inibição enzimática permitiu aos enzimologistas (bioquímicos estudiosos das enzimas) identificar a estrutura química dos aminoácidos que participam na formação dos sítios ativos dessas moléculas, elucidar as seqüências de diversas vias metabólicas, bem como no esclarecimento do mecanismo de ação de algumas drogas terapêuticas, como por exemplo, o ácido acetil salicílico (AAS, encontrado na aspirina). A regulação das vias metabólicas envolve mecanismos sofisticados e complexos como a regulação alostérica, modificações químicas covalentes da enzima, ativação de zimogênios e produção celular de isoenzimas.



Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas (Fonte: <http://pt.wikipedia.org>).

## DEFINIÇÃO DE INIBIDOR ENZIMÁTICO

Qualquer molécula que se ligue à cadeia polipeptídica de uma enzima, diminuindo a velocidade da reação, é considerada um inibidor enzimático.

## TIPOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A inibição enzimática é classificada em irreversível e reversível. Essa classificação baseia-se na natureza química da ligação do inibidor à enzima. Assim, a inibição irreversível ocorre com a ligação do inibidor de forma covalente ao sítio ativo da enzima. Os inibidores reversíveis se ligam de forma não covalente à cadeia polipeptídica da enzima.

## INIBIÇÃO IRREVERSÍVEL

Na inibição irreversível o inibidor se liga através de ligação covalente ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. A inibição da enzima acetilcolinesterase por organofosforados (como o diisopropilfluorofosfato) é um exemplo de inibição irreversível. Os organofosforados são utilizados como inseticidas na agricultura, para controlar as pragas que atacam as plantações.

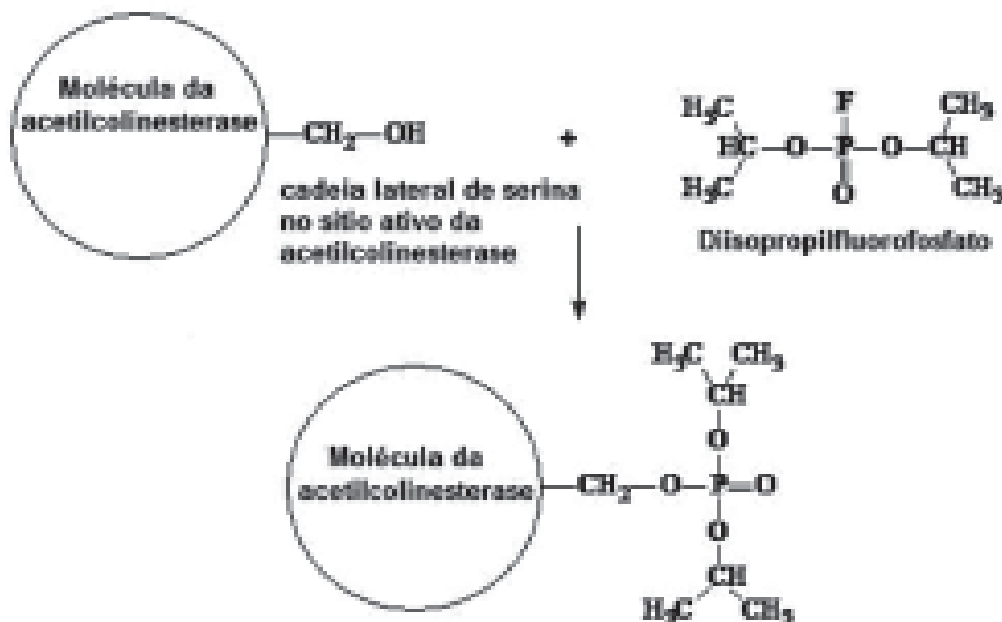


Figura 1: Inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase pelo diisopropilfluorofosfato, um organofosforado.

## INIBIÇÃO REVERSÍVEL

Na inibição reversível o inibidor se liga ao sítio ativo ou então a outra parte da cadeia polipeptídica da enzima, impedindo que o substrato seja transformado em produto. A ligação do inibidor reversível à enzima ocorre através de uma ou mais interações químicas não covalentes como: pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica, ligação iônica, van der Waals, dipolo-dipolo. A inibição reversível é de três tipos, a saber: Competitiva, incompetitiva e mista.

## INIBIÇÃO REVERSÍVEL

competitiva. A inibição competitiva ocorre devido à estrutura química do inibidor competitivo assemelha-se à estrutura do substrato. O inibidor competitivo se liga ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. A inibição da desidrogenase succínica, uma enzima do ciclo de Krebs, (assunto que vamos estudar na aula 13) pelo malonato é um exemplo de inibição competitiva (Figuras 2a e 2b).

O succinato (Figura 2b), um ácido orgânico que apresenta dois grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ), se liga ao sítio ativo da desidrogenase succínica através de ligação iônica. Essa ligação iônica ocorre com a atração das cargas negativas dos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) e a carga positiva dos íons amônio ( $^+\text{NH}_3$ ). O malonato e o oxaloacetato são inibidores competitivos dessa enzima. Tanto o malonato quanto oxaloacetato apresentam estruturas químicas semelhantes a do succinato (Figura 2b) podendo dessa forma, ligar-se ao sítio ativo também através de ligação iônica.

Este exemplo explica como o conhecimento desse inibidor permitiu mapear o sítio ativo da enzima desidrogenase succínica. Assim, se tanto o substrato como os inibidores dessa enzima apresentam carga negativa no pH 7,0 (conferida pelos grupos  $\text{COO}^-$ ), é indicativo de que o sítio ativo dessas enzimas deve conter aminoácidos com carga positiva (aminoácidos básicos). Dessa forma, os substratos e inibidores com carga negativa ( $\text{COO}^-$ ) interagem com os aminoácidos básicos do sítio ativo dessa enzima por formação de ligação iônica.

A inibição competitiva pode ser revertida aumentando-se a concentração do substrato. Isso é explicado pelo fato de que incrementos na concentração de substrato permitirão a eles competir com o inibidor pela ligação ao sítio ativo da enzima.

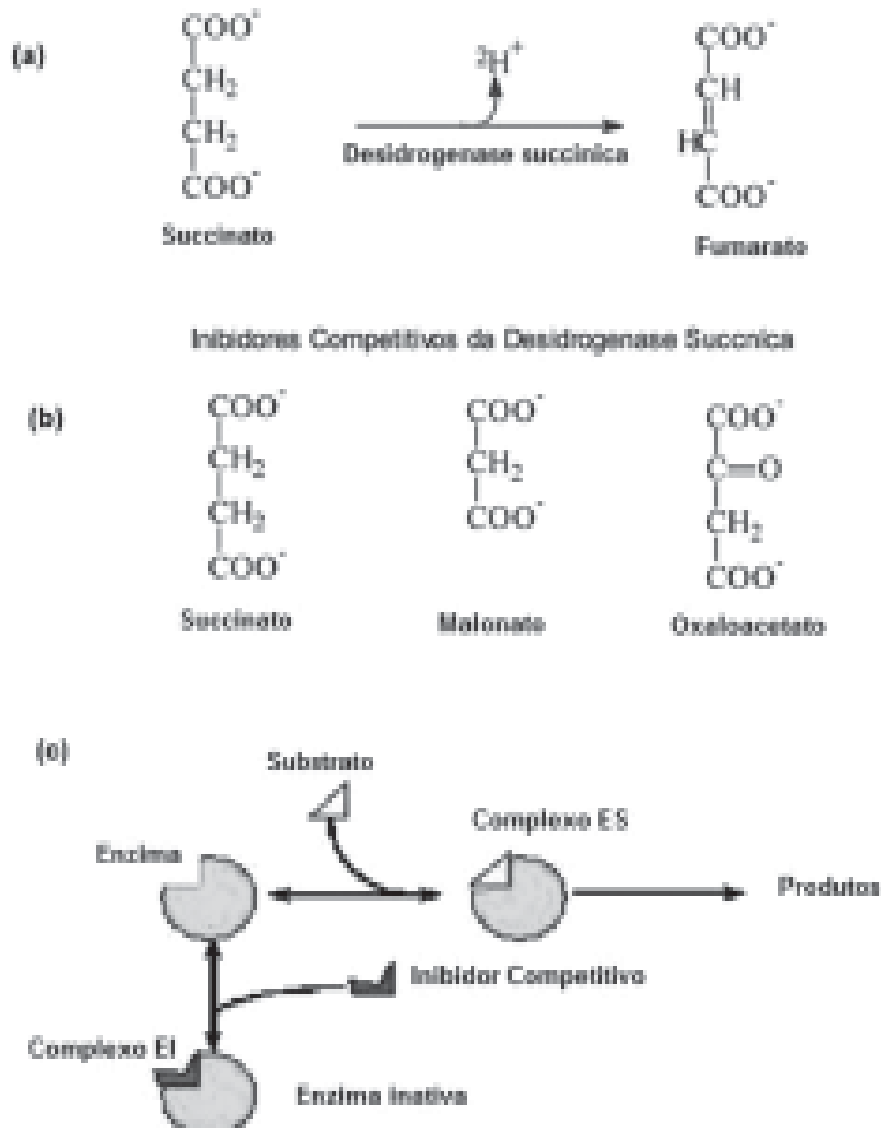


Figura 2 (a) Inibição reversível da enzima desidrogenase succínica pelo malonato. (b) Estruturas químicas do succinato, malonato e oxaloacetato. (c) Representação esquemática da inibição competitiva.

## INIBIÇÃO INCOMPETITIVA

A inibição incompetitiva se caracteriza pela ligação do inibidor apenas ao complexo enzima substrato (representado por ES) originando um complexo enzima-substrato-inibidor (ESI). O complexo ESI é inativo, o que significa dizer que o substrato nessa condição não vai ser transformado pela enzima, formando o produto da reação (Figura 3). O esquema abaixo demonstra como ocorre a reação enzimática em presença do inibidor incompetitivo.



A inibição incompetitiva não é revertida com aumentos na concentração do substrato.

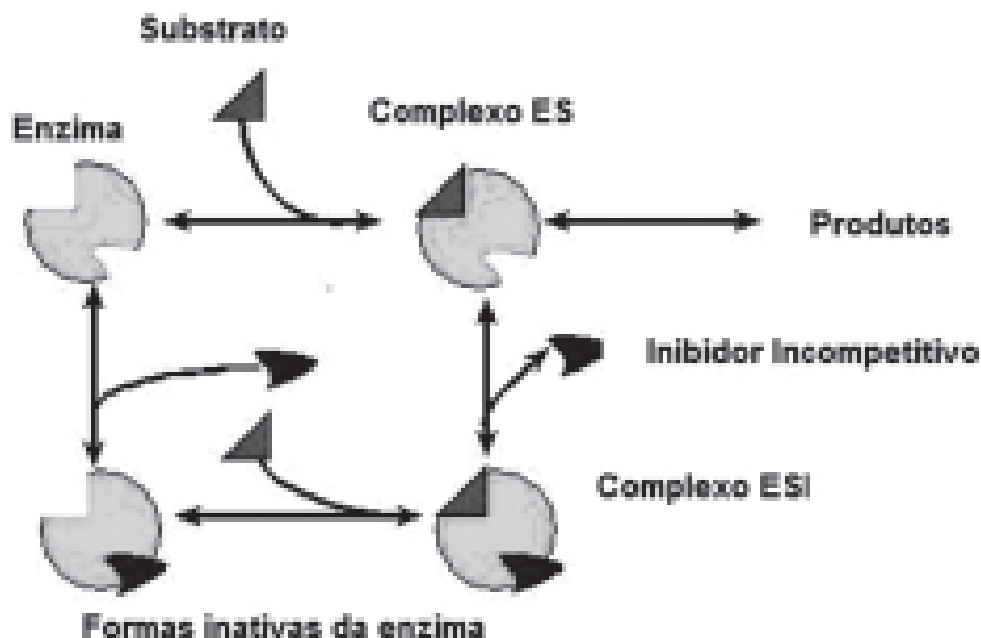


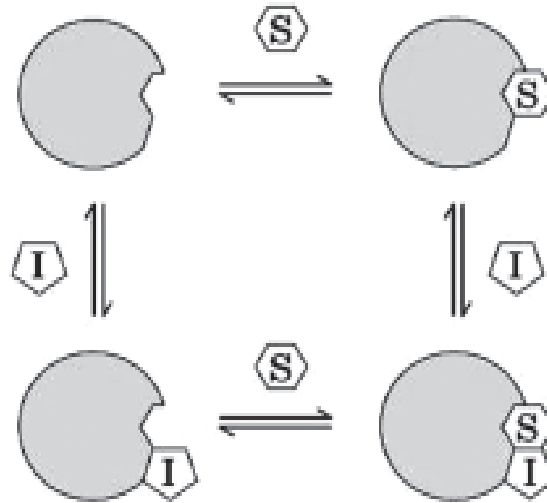
Figura 3. Inibição incompetitiva.

## INIBIÇÃO MISTA

Na inibição mista o inibidor se liga a uma região da enzima, diferente do sítio ativo, sem interferir na ligação do substrato ao sítio catalítico. Uma vez ligado o substrato ao sítio ativo da enzima, ele também não impede a ligação do inibidor. O inibidor pode se ligar tanto a enzima livre [E] quanto ao complexo enzima-substrato [ES], formando o complexo [ESI]. O complexo [ESI] é cataliticamente inativo, ou seja, o substrato não vai ser transformado no produto da reação (Figura 4). São exemplos de inibidores mistos os metais pesados como chumbo ( $Pb^{2+}$ ), prata ( $Ag^{2+}$ ), mercúrio ( $Hg^{2+}$ ), etc. Esses inibidores se ligam a sulfidrilas (SH), grupo funcional encontrado na cadeia lateral do aminoácido cisteína.

Figura 4. Representação esquemática da inibição mista. O Complexo ES representa a enzima ligada ao seu substrato; ESI a enzima ligada ao seu inibidor misto e ao seu substrato. Nesta inibição o inibidor se liga a uma região da enzima diferente do sítio catalítico, que é o local de ligação do

substrato. A inibição não competitiva pode ser revertida através da diálise da enzima.



## ENZIMAS REGULADORAS

A regulação das vias metabólicas envolve mecanismos sofisticados e complexos como:

Regulação não covalente ou controle alostérico. Essa regulação se caracteriza pela ligação não covalente do efetor ou modulador ao sítio regulador das enzimas alostéricas (sítio alostérico ou sítio modulador). O modulador pode ativar ou inibir a atividade enzimática.

Modificação covalente reversível. As propriedades catalíticas de muitas enzimas são alternadas pela ligação covalente e transitória de um grupo químico à cadeia polipeptídica ou ao sítio ativo da enzima. No metabolismo celular é bastante freqüente a regulação de enzimas reguladoras das vias metabólicas por transferência de grupos fosfatos do ATP para sítios ativos dessas enzimas.

Clivagem proteolítica. Nesse mecanismo de controle as enzimas se alternam entre dois estados a saber, inativo (proenzimas ou zimogênios) e enzimas cataliticamente ativas.

Produção de formas múltiplas de enzimas (isoenzimas). Esse tipo de regulação se dá por formas múltiplas de enzimas relacionadas denominadas isoenzimas ou isozimas. As isozimas são enzimas homólogas dentro de um mesmo organismo que catalisam a mesma reação, mas diferem levemente em suas estruturas e nos valores de seus parâmetros cinéticos como  $K_M$  e  $V_{max}$ .

## SISTEMA MULTIENZIMÁTICO OU VIA METABÓLICA

Uma via metabólica se caracteriza como sendo uma seqüência de reações químicas em que um grupo de enzimas (sistema multienzimático) atua em conjunto para converter um determinado substrato em um ou mais produtos. Nessa via multienzimática, o produto da ação de uma enzima é substrato da próxima enzima, e assim sucessivamente. Os produtos das ações dessas enzimas do metabolismo são denominados intermediários metabólicos ou metabólitos (Figura 5).

A glicólise anaeróbica (metabolismo da glicose na ausência de oxigênio), que pode ocorrer em células dos músculos e das hemácias, é um exemplo de uma via metabólica. Nessa via metabólica o monossacarídeo glicose, um dos principais substratos dessa via, vai ser transformado em duas moléculas de ácido láctico, sob a ação conjunta de onze enzimas (Estudaremos esse metabolismo com mais detalhes na aula metabolismo aeróbico e anaeróbico dos carboidratos). Normalmente, a primeira enzima de uma via metabólica é uma enzima reguladora. Em regra, a enzima reguladora que catalisa a reação mais lenta de uma via metabólica é a enzima marca passo. As enzimas marca passos são enzimas reguladoras, sendo classificadas em dois tipos: enzimas alostéricas (ou reguladas de forma não covalente) e enzimas reguladas covalentemente.



Figura 5: Via metabólica. Neste esquema de uma via metabólica, E1 a E6 representam as seis enzimas que catalisam a transformação do substrato A no produto P. As letras B, C, D, E e F representam os intermediários metabólicos.



## REGULAÇÃO ALOSTÉRICA OU REGULAÇÃO NÃO-COVALENTE

As enzimas alostéricas são proteínas reguladoras que apresentam um sítio catalítico e um sítio alostérico ou regulador em suas cadeias polipeptídicas. Ao sítio alostérico se liga o efetor ou modulador, que é a molécula que regula a atividade dessas enzimas. A ligação do modulador alostérico ocorre por interação química não covalente, como pontes de hidrogênio, ligação iônica, dipolo-dipolo, interação de van der Waals e interação hidrofóbica. Os sítios ativos e alostéricos dessas enzimas são localizados em regiões distintas da cadeia polipeptídica. Pode ocorrer também de esses sítios se encontrarem em subunidades distintas da proteína. As enzimas alostéricas existem em duas formas: T (tensa), não ligada ao substrato, e a forma R (Relaxada) ligada ao substrato (Figura 6). As enzimas alostéricas demonstram especificidade tanto para o seu substrato quanto para o modulador. Os moduladores são ativadores ou inibidores da atividade catalítica (Figura 6).



(Fonte: Garret & Grisham, 1995).

Figura 6. Enzimas Alostéricas. O sítio Catalítico é representado por C e o sítio regulador, por R..

## ENZIMAS ALOSTÉRICAS HOMOTRÓPICA E HETEROTRÓPICA

De acordo com a regulação, as enzimas alostéricas classificam-se em homotrópica ou heterotrópica. Na regulação homotrópica o modulador é o próprio substrato da enzima. Quando o substrato atua como modulador homotrópico ele se liga ao sítio alostérico, regulando assim, a atividade da enzima. O regulador heterotrópico é qualquer substância diferente do substrato. Algumas enzimas alostéricas apresentam ambos os tipos de regulação homotrópica e heterotrópica.

## EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS ALOSTÉRICAS

As enzimas alostéricas são enzimas complexas, possuindo duas ou mais cadeias polipeptídicas. Essas enzimas são proteínas oligoméricas. A curva de velocidade de reação em função do aumento da concentração de substrato para as enzimas do tipo Michaelis-Menten, é uma hipérbole retangular, (como aprendemos na aula de introdução ao estudo das enzimas), as enzimas alostéricas, por sua vez, descrevem uma curva do tipo sigmóide (Figura 7). Outro aspecto que merece ser destacado sobre as enzimas alostéricas é que a concentração de substrato que corresponde à metade da velocidade máxima é conhecido como  $K_{0,5}$ .

As enzimas alostéricas apresentam propriedades cooperativas, ou seja, comunicação entre as suas cadeias polipeptídicas, comunicação essa que se caracteriza por uma mudança conformacional da enzima quando a ela se ligam os seus moduladores. Isto pode ser constatado pelo efeito da concentração do substrato na velocidade da reação. Sob concentrações baixas de substrato, a velocidade da reação vai ser igualmente baixa, aumentos subsequentes podem elevar a velocidade da reação, multiplicando-a por um fator de 500 vezes a velocidade inicial. Isso ocorre por que as enzimas alostéricas apresentam propriedades cooperativas ou cooperatividade. A cooperatividade é a comunicação entre as cadeias polipeptídicas das enzimas alostéricas é de dois tipos: Cooperatividade positiva e cooperatividade negativa.

A ligação de um modulador ativador a um sítio regulador pode facilitar a ligação de moléculas de substratos aos outros sítios catalíticos. Essa é a cooperatividade positiva. No entanto, a ligação do modulador inibidor a um sítio regulador, diminuirá a ligação da enzima pelo substrato, verificando-se, portanto, a cooperatividade negativa.

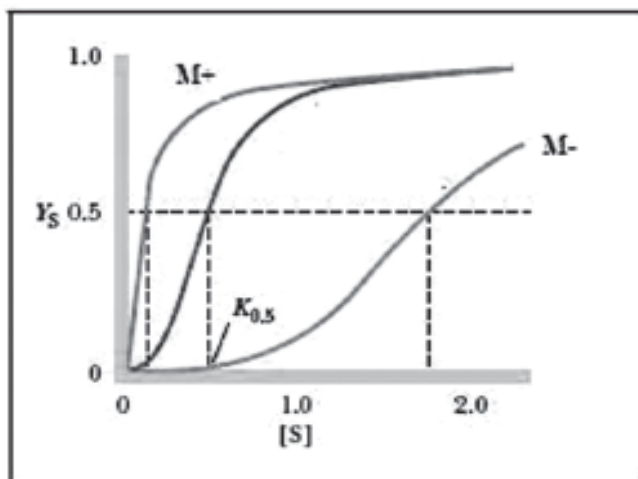


Figura 7. Curva de velocidade das enzimas alostéricas em função da variação da concentração do substrato e efeitos dos moduladores alostéricos heterotrópico positivo (M+) e negativo (M-) na sua curva de saturação.

Fonte: Garret & Grisham, 1995.

## PROPRIEDADES DAS ENZIMAS ALOSTÉRICAS

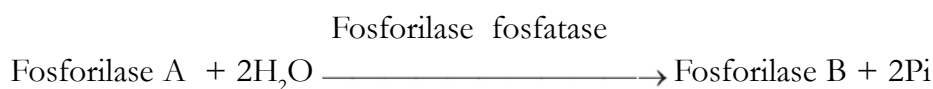
- São proteínas oligoméricas, apresentando duas ou mais cadeias polipeptídicas;
- São reguladas pela ligação não covalente do efetor ou modulador ao sítio regulador ou alostérico;
- Apresentam curva de saturação pelo substrato do tipo sigmóide;
- Apresentam propriedades cooperativas, ou seja, cooperação ou comunicação entre as suas cadeias polipeptídicas;
- Não seguem o comportamento cinético descrito por Michaelis-Menten, para as enzimas simples, ou seja, não apresentam curvas de velocidade em função do aumento do substrato do tipo hiperbólico;
- A concentração do substrato que corresponde à metade da velocidade máxima é denominada  $K_{0,5}$ .

## ENZIMAS REGULADAS COVALENTEMENTE

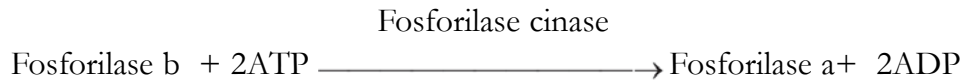
Na regulação covalente essas enzimas reguladoras são inter convertidas entre duas formas ativa e inativa. A ativação ou inativação dessas enzimas ocorre através da ligação covalente de um grupo químico a um átomo ou grupo de átomos dos sítios ativos dessas enzimas. A regulação da enzima fosforilase do glicogênio é um exemplo desse tipo de regulação. A fosforilase do glicogênio é uma enzima encontrada nos músculos e fígado, e catalisa a seguinte reação.



As fosforilases do glicogênio ocorrem em duas formas: fosforilase A e fosforilase B. A fosforilase A é a forma ativa, e a fosforilase B. é a forma relativamente inativa. A fosforilase A tem duas subunidades polipeptídicas, cada uma delas com um resíduo de serina, que é fosforilado no seu grupo hidroxila. Esses resíduos de serina fosfato são necessários para a atividade máxima da enzima. Os grupos fosfatos podem ser removidos por hidrólise, catalisada por uma terceira enzima, com atividade hidrolítica, a enzima fosforilase fosfatase. Nesta reação a fosforilase A é transformada em fosforilase B.



A fosforilase-B, por sua vez, pode ser convertida em fosforilase A ativa, por meio de uma quarta enzima chamada fosforilase cinase. A fosforilase cinase catalisa a transferência de grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila de resíduos específicos de serina na fosforilase B.



## ZIMOGÊNIOS

Um grande número de enzimas (como as enzimas proteolíticas) é sintetizado na forma de precursores inativos denominados zimogênios ou proenzimas. Os zimogênios são convertidos em suas formas ativas pela ação de enzimas proteolíticas em órgãos diferentes daqueles em que foram produzidos. As enzimas proteolíticas hidrolisam as ligações peptídicas específicas dos zimogênios, produzindo proteínas encurtadas de alguns aminoácidos (forma ativa) e peptídeos pequenos. Essas proteínas encurtadas, que são a forma ativa dos zimogênios, apresentam atividade hidrolítica.

Os zimogênios das enzimas digestivas quimotripsina e tripsina, sintetizados nas células pancreáticas, são, respectivamente, quimotripsinogênio e tripsinogênio. Um dos motivos pelo qual se explica a síntese de proteínas na forma inativa é a de que a síntese dessas enzimas como proenzimas evita que elas possam hidrolisar proteínas constitutivas desse órgão. Se essas enzimas fossem produzidas em suas formas ativas elas poderiam causar a destruição desse órgão. Um exemplo que ilustra bem isso é a pancreatite aguda. Na pancreatite aguda verifica-se a síntese das proenzimas de tripsina e quimotripsina nas células pancreáticas em suas formas ativas. A produção dessas proenzimas em suas formas ativas está associado com todos os sintomas letais observados nessa doença.

## ATIVAÇÃO DA TRIPSINA

A conversão do tripsinogênio pancreático em tripsina no intestino pode ocorrer de duas formas distintas, como demonstram as reações 1 e 2. Na reação 1, essa conversão é feita pela enzima intestinal enteroquinase (também conhecida por enteropeptidase). A própria tripsina intestinal pode converter o tripsinogênio em tripsina, como pode ser verificado na reação 2.



Tripsina



### ATIVAÇÃO DA QUIMOTRIPSINA

O quimotripsinogênio pancreático, que possui uma cadeia polipeptídica composta de 245 resíduos de aminoácidos, é convertido em quimotripsina no intestino por dois diferentes modos de ativação como pode ser visto nas reações 1 e 2 e na Figura 8. Na reação 1, a tripsina intestinal hidrolisa ao quimotripsinogênio, em duas cadeias polipeptídicas, que formam a proteína ativa p-quimotripsina. A reação de ativação, catalisada pela p-quimotripsina, hidrolisa a p-quimotripsina, formando três cadeias polipeptídicas, A, B e C, que compõem a  $\alpha$ -Quimotripsina (Figura 8).

Tripsina



p-Quimotripsina

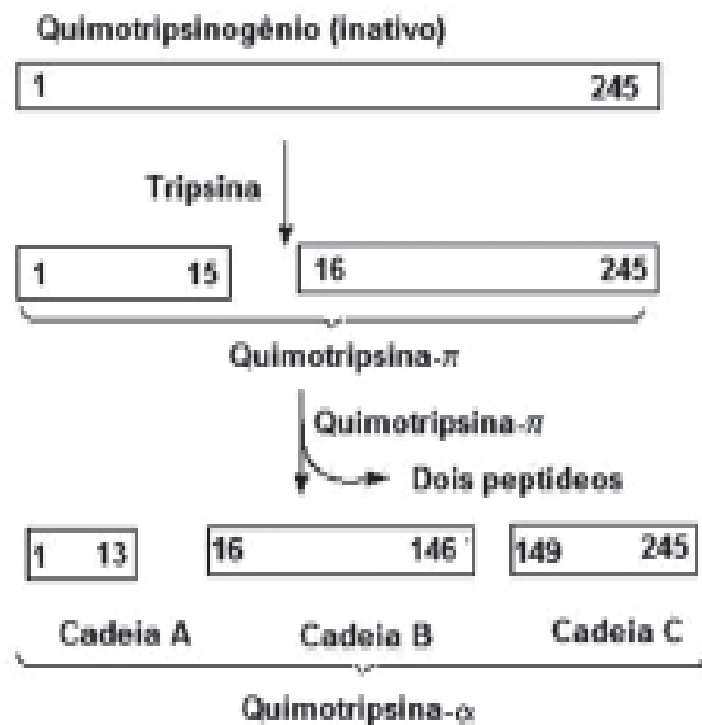


Figura 8. Ativação da quimotripsina.

Os zimogênios são enzimas inativas porque não possuem um sítio ativo. A hidrólise do zimogênio pelas enzimas hidrolíticas, resultam em que interações antes não permitidas entre os aminoácidos sejam descobertas. Isso proporciona mudanças conformacionais da cadeia polipeptídica, fazendo com que o sítio ativo da enzima constitua-se como uma estrutura tridimensional bem definida.

### ISOENZIMAS

Outro fenômeno de regulação metabólica e que depende da estrutura quaternária das proteínas enzimáticas é a produção na célula de isoenzimas. As isoenzimas ou isozimas são formas moleculares múltiplas de uma enzima, que realizam a mesma ação catalítica. A lactato-desidrogenase (LDH), um tetrâmero formado por duas espécies diferentes de cadeias polipeptídicas, denominadas M (músculo) e H (coração) é um exemplo de isoenzima. Essas subunidades são codificadas por genes diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das subunidades da lactato-desidrogenase e suas principais localizações

Tipo	Composição	Localização
LDH-1	HHHH	Miocárdio e eritrócitos
LDH-2	HHHM	Miocárdio e eritrócitos
LDH-3	HHMM	Cérebro e fígado
LDH-4	HMMM	-
LDH-5	MMMM	Músculo esquelético e fígado

A lactato desidrogenase catalisa a redução reversível do piruvato a lactato. Desse modo, no músculo esquelético a isoenzima LDH<sup>5</sup> apresenta  $V_{max}$  elevada para o piruvato e, portanto, converte rapidamente o piruvato a lactato. No caso da LDH<sup>1</sup>, encontrada no coração a  $V_{max}$  é relativamente baixa para o piruvato, não favorecendo a formação do lactato. O excesso de piruvato inibe a isoenzima LDH-1. O músculo cardíaco, um tecido essencialmente aeróbico, metaboliza a glicose a piruvato e, a seguir, a  $CO_2$  e  $H_2O$ , produzindo pouco lactato. Entretanto, em situações de déficit de oxigênio no ambiente celular, o piruvato pode ser convertido a lactato. Assim, as características cinéticas distintas das duas enzimas determinam o tipo de metabolismo em cada tecido. Foram estudadas isoenzimas de várias enzimas diferentes, sendo as mais importantes, do ponto de vista clínico, além da lactato desidrogenase, a creatina cinase e a fosfatase alcalina.

## CONCLUSÃO

Os inibidores enzimáticos são as substâncias que reduzem a velocidade da reação das enzimas. A inibição enzimática é classificada em irreversível e reversível, classificação essa baseada na natureza química da ligação do inibidor à enzima. O inibidor irreversível se liga de forma covalente e duradoura ao sítio ativo da enzima. O inibidor reversível, por sua vez, se liga de forma não covalente a cadeia polipeptídica da enzima. A inibição reversível é de três tipos: inibição competitiva, incompetitiva e mista. O inibidor competitivo por apresentar uma estrutura química semelhante a do substrato se liga ao sítio ativo dessa enzima. Na inibição incompetitiva o inibidor se liga apenas ao complexo [ESI]. Na inibição mista o inibidor tanto se liga a enzima livre, quanto a enzima ligada ao seu substrato. A regulação das vias metabólicas envolve mecanismos sofisticados e complexos como regulação alostérica, modificação covalente da enzima, ativação de zimogênios e produção celular de isoenzimas. As regulação não covalente ou controle alostérico se caracteriza pela ligação não covalente do efetor ou modulador ao sítio alostérico. O modulador alostérico pode ser homotrópico ou heterotrópico. Na regulação covalente as enzimas são alternadas pela ligação covalente e transitória de um grupo químico à cadeia polipeptídica ou ao sítio ativo da enzima. Os zimogênios ou proenzimas são enzimas cataliticamente inativas. Os zimogênios são ativados através da ação de proteínas hidrolíticas que clivam ligações específicas, descobrindo o sítio ativo dessas enzimas. As isoenzimas ou isozimas são formas moleculares múltiplas de uma enzima, que realizam a mesma ação catalítica.

## RESUMO

Qualquer substância que se liga à cadeia polipeptídica de uma enzima diminuindo a velocidade da reação é considerada um inibidor enzimático. A inibição enzimática classifica-se em irreversível e reversível. A inibição irreversível ocorre com a ligação do inibidor de forma covalente ao sítio ativo da enzima, enquanto a inibição reversível ocorre com a ligação não covalente do inibidor à cadeia polipeptídica da enzima. As ligações não covalentes envolvidas na ligação do inibidor reversível são: pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica, ligação iônica, van der Waals, dipolo-dipolo. A inibição da enzima acetilcolinesterase pelo diisopropilfluorofosfato é um exemplo de inibição irreversível. Os tipos de inibição reversível são: competitiva, incompetitiva e mista. O inibidor competitivo, por apresentar uma estrutura química semelhante a do substrato, se liga ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação do substrato. O inibidor

incompetitivo se liga apenas ao complexo enzima substrato (ES) originando um complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) inativo. O inibidor misto se liga a uma região da enzima (que não o sítio ativo), sem interferir na ligação do substrato ao sítio catalítico. Na inibição mista o substrato uma vez ligado ao sítio ativo, também não impede a ligação do inibidor. A regulação das vias metabólicas envolve mecanismos sofisticados e complexos como a regulação alostérica, modificações químicas covalentes da enzima, ativação de zimogênios e a produção celular de isoenzimas. A regulação não covalente ou controle alostérico se caracteriza pela ligação não covalente do efetor ou modulador ao sítio regulador das enzimas alostéricas. As enzimas alostéricas são proteínas oligoméricas, apresentando duas ou mais cadeias polipeptídicas. Elas são reguladas pela ligação não covalente do efetor ou modulador ao sítio regulador. Apresentam curva de saturação pelo substrato do tipo sigmóide; curva essa que é explicada pelas propriedades cooperativas dessas enzimas. Enzimas reguladas por modificação covalente reversível são alternadas entre as formas ativas e inativas, pela ligação covalente e transitória de um grupo químico à cadeia polipeptídica ou ao sítio ativo da enzima. A ativação ou inativação dessas enzimas ocorre através da ligação covalente de um grupo químico a um átomo ou grupo de átomos dos sítios ativos dessas enzimas. A regulação por clivagem proteolítica ocorre nas proenzimas ou zimogênios. Nesse mecanismo de controle as enzimas se alternam entre dois estados a saber, inativo (proenzimas ou zimogênios) e enzimas cataliticamente ativas. A produção de formas múltiplas de enzimas, como as isoenzimas, é também um mecanismo de regulação celular, que se caracteriza pela presença de formas múltiplas de enzimas relacionadas denominadas isoenzimas ou isozimas.



### ATIVIDADES

1. O que são inibidores enzimáticos? Como eles contribuíram no estudo de enzimas?
2. O que é uma inibição irreversível? Exemplifique-a.
3. O que é uma inibição reversível? Como são classificados os inibidores reversíveis?
4. Diferencie regulação homotrópica de regulação heterotrópica das enzimas alostéricas.
5. Como ocorre a regulação de uma via metabólica?
6. Qual a importância dos zimogênios serem sintetizados em uma forma inativa?



**COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES**

1. Observe que o termo é auto-explicativo, servindo para designar qualquer substância que uma vez ligado à enzima, diminui a velocidade da reação. Você deve remontar à importância dos inibidores que, ajudando na identificação dos aminoácidos que entram na formação do sítio ativo das enzimas, no esclarecimento de seqüências metabólicas e na compreensão da ação de algumas drogas terapêuticas, em resumo, contribuíram de forma significativa na compreensão de muitos processos bioquímicos envolvendo a ação de enzimas.
2. Certamente você deve ter associado esse termo irreversível a uma ligação covalente firme e duradoura. Dessa forma, você pode afirmar que a inibição irreversível é a que ocorre com a ligação do inibidor de forma covalente e duradoura ao sítio ativo da enzima. Como exemplo de inibição irreversível você pode apontar a inibição da enzima acetilcolinesterase por um organofosforado (o diisopropilfluorofosfato).
3. Com a leitura do tópico da inibição reversível dessa aula você aprendeu que essa inibição se caracteriza pela ligação não covalente dos inibidores à cadeia polipeptídica da enzima. As ligações não covalentes envolvidas na interação do inibidor com o sítio ativo das enzimas são pontes de hidrogênio, ligação iônica, dipolo-dipolo, van der Waals e interação hidrofóbica. A inibição reversível classifica-se em: competitiva, incompetitiva e mista.
4. Certamente você não deve ter tido qualquer dificuldade em diferenciar a regulação homotrópica da regulação heterotrópica. Naturalmente você identificou que na regulação homotrópica o modulador ou efetor (a molécula que se liga ao sítio regulador) é o próprio substrato da enzima. Você deve ter reconhecido também que quando o substrato atua como modulador homotrópico ele se liga ao sítio alostérico e não ao sítio ativo da enzima. Com relação a regulação heterotrópica você aprendeu nessa aula que o regulador heterotrópico é qualquer substância diferente do substrato.
5. Aprendemos com a regulação de uma via metabólica (ou sistema multienzimático) que no que diz respeito à regulação desse processo, as enzimas reguladoras podem ser de dois tipos: Enzimas alostéricas (reguladas de forma não covalente) e as enzimas reguladas por

modificação não covalente. Na regulação alostérica, o efetor se liga através de ligação não covalente ao sítio modulador da enzima. Na regulação covalente as enzimas reguladoras são inter convertidas entre duas formas ativa e inativa. A ativação ou inativação dessas enzimas ocorre através da ligação covalente de um grupo químico a um átomo ou grupo de átomos dos sítios ativos dessas enzimas. Certamente você deve ter indicado o exemplo da regulação da enzima fosforilase do glicogênio como um exemplo desse tipo de regulação. A fosforilase do glicogênio é uma enzima encontrada nos músculos e fígado, e catalisa a seguinte reação.

6. Você aprendeu com a leitura da regulação de enzimas sintetizadas na forma inativa (os zimogênios) que essas enzimas sofrem a ação de enzimas proteolíticas para passar para sua forma ativa. Nessa ação os zimogênios liberam proteínas encurtadas de alguns aminoácidos (forma ativa) e peptídeos pequenos. Essas proteínas encurtadas (que são a forma ativa dos zimogênios) apresentam atividade hidrolítica. Certamente você reconheceu que se essas proteínas fossem ativadas no órgão em que são produzidos, ou que fossem já sintetizadas na forma ativa, resultaria na destruição desse órgão. Comentando o que ocorre na pancreatite aguda, certamente você identificou que nessa patologia verifica-se a síntese das proenzimas de tripsina e quimotripsina nas células pancreáticas em suas formas ativas. A produção dessas proenzimas em suas formas ativas está associada com todos os sintomas letais observados nessa doença



### PRÓXIMA AULA

Na próxima aula teremos a oportunidade de introduzir o estudo do metabolismo energético celular. Nessa aula estudaremos os tipos de metabolismo celular, procurando compreender o porquê do ATP ser a molécula energética da célula. Até lá!

### REFERÊNCIAS

- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. Editora Artes Médicas, 1997.

KOOLMAN, J.; RÖHM, Klaus-Heinrich. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. . Porto Alegre: Editora Artmed, 2000.