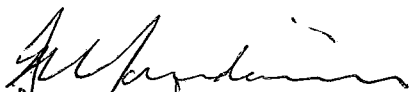


INTEGRAÇÃO DAS REDES BIOMOLECULARES
NA HOMEOSTASIA DA CÉLULA E
NA MORFOGÊNESE DO ORGANISMO

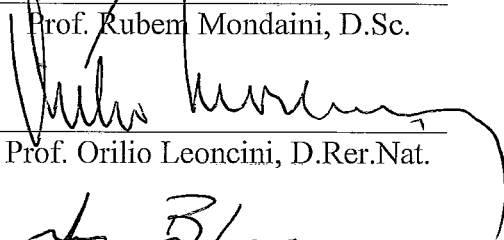
José Negreiros

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DE SISTEMAS E COMPUTAÇÃO.


Aprovada por:



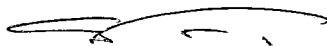
Prof. Rubem Mondaini, D.Sc.



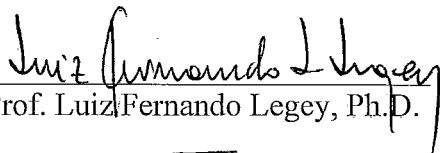
Prof. Orilio Leoncini, D.Rer.Nat.



Prof. Luiz Bevilacqua, Ph.D.



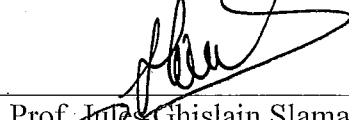
Prof. Amilcar Tanuri, D.Sc.



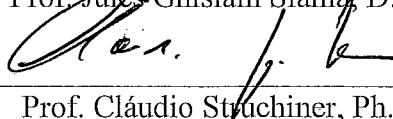
Prof. Luiz Fernando Legey, Ph.D.



Prof. Octavio Ceva Antunes, D.Sc.



Prof. Jules Ghislain Slama, D.Sc.



Prof. Cláudio Struchiner, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

AGOSTO DE 2000

NEGREIROS, JOSÉ

Integração das Redes Biomoleculares
na Homeostasia da Célula e na
Morfogênese do Organismo [Rio de
Janeiro] 2000

X, 203 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia de Sistemas e
Computação, 2000)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Redes Biomoleculares
 2. Homeostasia da Célula
 3. Morfogênese do Organismo
- I. COPPE / UFRJ II. Título (série)

A Deus
de cuja obra
quem poderá tornar linear
o que foi feito não linear? (Eclesiastes 7,13)
e
quem poderá não admirar num organismo
a mais requintada obra prima já conseguida
pelas leis da mecânica quântica do Senhor?
(SCHRÖDINGER, 1992)

A minha esposa Lélia e a minhas filhas
Érika, Nadja, Máslova e Thais
fonte de realimentação de minha
fé e razão
de meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rubem P. Mondaini, pela paciência e tempo dispendido, visando o meu redirecionamento da fenomenologia biológica para os modelos biomatemáticos.

Aos meus colegas da Computação Biológica – Grupo de Biologia Matemática e Computacional, Rosângela Dornas Torres, Luciana Roque Brito, Rosa María García Márquez e Eduardo Pereira Marques, pela agradável e frutuosa convivência.

Ao Programa de Engenharia de Sistemas e Computação da COPPE / UFRJ, pelo apoio na realização desta Tese.

Agradecimento especial a Rosângela Dornas Torres e a Luciana Roque Brito por terem tornado mais amigável a minha briga com programas e computadores.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

INTEGRAÇÃO DAS REDES BIOMOLECULARES
NA HOMEOSTASIA DA CÉLULA E
NA MORFOGÊNESE DO ORGANISMO

José Negreiros

Agosto/2000

Orientador: Rubem Mondaini

Programa: Engenharia de Sistemas e Computação

O presente trabalho apresenta uma visão unificada das redes biomoleculares que integram a homeostasia das células atuais e que foram a condição *sine qua non* para a existência da célula ancestral universal do mundo do DNA: uma rede genômica cujo *output* expressa de modo constitutivo (*default*) a rede metabólica e de manutenção, bem como de modo indutivo (dependente de estímulos do meio) regula o ciclo celular, através de *inputs* trazidos pela rede de sinalização (a nível de *software*) e pela rede mecânica (a nível de *hardware*), definindo o tipo de programa a ser “rodado”: proliferação ou duplicação, diferenciação ou embriogênese, morte programada ou apoptose e transformação ou câncer.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

BIOMOLECULAR NETWORKS INTEGRATION
IN THE CELL HOMEOSTASIS
AND ORGANISM MORPHOGENESIS

José Negreiros

August/2000

Advisor: Rubem Mondaini

Program: Systems Engineering and Computer Science

This work presents an unified vision of the biomolecular networks that integrate the homeostasis of the modern cells and were the *conditio sine qua non* for the existence of the last universal ancestor cell of the DNA World: a genomic network whose output expresses the metabolic and housekeeping network, in a constitutive manner (default), and regulates the cell cycle, in an inductive manner (environmental stimulation dependence), via inputs triggered by the signalling network at software level and by the mechanical network at hardware level. The integration of the external and internal inputs realize the running program: proliferation, differentiation, apoptosis or transformation.

Índice

INTRODUÇÃO	1
1. CARACTERIZAÇÃO FENOMENOLÓGICA DOS BIOPOLÍMEROS INFORMATICAIS	6
1.1 – GÊNESE E PROPRIEDADES MORFOFUNCIONAIS	6
1.1.1 – Elementos químicos com predestinação biótica	7
1.1.2 - Transição do mundo do RNA para o mundo do DNA	8
1.1.3 – Propriedades morfofuncionais	10
1.1.4 – Propriedades entrópicas	13
1.2 – FOSFORILAÇÃO E FUNCIONALIDADE	15
1.2.1 – O sistema ATP/ADP	15
1.2.2 – Sistema GTP/GDP	19
1.2.3 - Sistema NAD ⁺	21
1.3 - SISTEMA DE MEMBRANAS: INTEGRADOR ONIPRESENTE	23
1.3.1 - Composição lipoglicoproteica	23
1.3.2 - Integração das redes biomoleculares	25
1.3.3 - Rede mecânica tensionalmente integrada (<i>tensegrity</i>)	28
1.3.4 - Vesículas transportadoras e regeneradoras	29
2. DESCRIÇÃO PRELIMINAR DAS REDES BIOMOLECULARES	31
2.1 – REDES BIOMOLECULARES	31
2.1.1 - Rede metabólica	32
2.1.2 - Rede de sinalização	32
2.1.3 – Rede mecânica	37
2.1.4 – Rede genética	38

2.2 – DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO	43
2.2.1 – Ovulação e fertilização	43
2.2.2 – Diferenciação e inibição lateral	44
2.2.3 – Indução e morfogênese das redes celulares	45
2.3 – EVOLUÇÃO FILOGENÉTICA	48
2.3.1 - Passagem de célula procariótica a eucariótica	48
2.3.2 – Genoma mínimo e a evolução genômica	48
2.3.3 – Visão unificada da Biologia	50
3. TERMONINÂMICA E CINÉTICA NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	55
3.1 – AS FUNÇÕES ENTALPIA, ENTROPIA E ENERGIA LIVRE	55
3.1.1 – Entalpia	56
3.1.2 – Entropia	57
3.1.3 – Energia livre	61
3.2 – A CONSTANTE MOLAR UNIVERSAL E A EQUAÇÃO FUNDAMENTAL DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	67
3.2.1 – Equação dos gases perfeitos	67
3.2.2 – Equação da Energia Livre de Gibbs (ΔG)	68
3.2.3 – Energia livre, pH e pK	73
3.2.4 – Energia livre e potenciais elétricos	76
3.2.5 – Energia livre e potencial de redução	78
3.3- ENERGIA LIVRE E DINÂMICA DAS REAÇÕES QUÍMICAS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	84
3.3.1 – As relações de Arrhenius e van't Hoff	84
3.3.2 – Teoria do estado de transição de Eyring	86
3.3.3 – Formulações de Marcus e Prigogine	88
3.3.4 – Meio ativo e auto-organização dinâmica	91

4. ESTRATÉGIA CELULAR PARA INTERCONVERSÕES DE ENERGIA LIVRE	94
4.1 – PAPEL DA MUDANÇA CONFORMACIONAL NAS INTERCONVERSÕES DE ENERGIA LIVRE	96
4.1.1 – Parâmetros termodinâmicos e cinéticos	96
4.1.2 – Mudança conformacional se estende aos ácidos nucleicos	98
4.1.3 – Efeito Hidrofóbico e Conversão de Energia Livre	104
4.1.4 – Elastômero: um modelo para conversão de energia livre	109
4.1.5 – Agregação polimérica e doença (Prion e Alzheimer)	115
4.2 – PAPEL DA CATÁLISE ENZIMÁTICA	117
4.2.1 – Interação e não mera agregação	117
4.2.2 – Poder catalítico das enzimas	121
4.2.3 – Otimização da integração entre mudança conformacional e função catalítica	123
4.3 – GÊNESE DAS REDES BIOINFORMACIONAIS	127
4.3.1 – Biopolímeros como autômatos de nível 1	128
4.3.2 – Células como autômatos de nível 2	130
4.3.3 – Organismos pluricelulares como autômatos de nível 3	131
4.3.4 – Biosfera como autômato de nível 4	135
5. INTEGRAÇÃO DAS REDES BIOMOLECULARES: UM MODELO DE CÉLULA VIRTUAL	136
5.1 – FORÇA E LIMITAÇÃO DOS MODELOS EXISTENTES	136
5.1.1 – A metodologia básica	137
5.1.2 – Superação das limitações	138
5.2 – PROCESSOS FUNDAMENTAIS	140

5.3 – A REDE DE SINALIZAÇÃO	144
5.3.1 – Os transdutores na membrana plasmática	144
5.3.2 – A cascata MAPK	145
5.4 – A REDE GENÔMICA	149
5.4.1 – Visão unificada dos complexos nucleoprotéicos	150
5.4.2 – A máquina universal do ciclo celular	152
5.4.3 - O circuito lógico entre regiões cis e elementos trans: integração entre as redes de sinalização e genômica	163
5.4.4 – Termodinâmica e cinética dos complexos nucleoprotéicos	167
5.4.5 – Complexos riboprotéicos na tradução	171
5.4.6 – Origem e evolução do código genético	175
CONCLUSÃO	178
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187

INTRODUÇÃO

A Bioinformática pode ser abordada como “ciência da computação” e também como ciência biológica. Como “ciência da computação”, a presença da Bioinformática é avassaladora (TIMPANE, 1997), tanto como diretriz para desenvolver as tecnologias *in vitro* do Projeto Genoma, quanto como filtro para, com tecnologias *in virtuo* ou *in silico*, utilizar os bancos de dados genômicos via Internet. No entanto, utilizada apenas como “ciência da computação”, a Bioinformática pode não atingir o grau de eficácia necessário para a interpretação adequada do dilúvio de informações geradas pelo sequenciamento dos genomas de organismos modelos que se integram ao sequenciamento do genoma humano, em andamento até pelo menos o ano de 2005. Tal grau de eficácia só poderá ser alcançado com a concentração de estudos em Bioinformática motivados por um maior conhecimento dos fenômenos biológicos. Este parece ser o caminho orientado para a unificação da Biologia, sob a organização das leis da Física e nesta refletindo paradigmas que poderão vir a ser o embrião de novas leis Físicas.

Condições para redução da Biologia à Física

Na interface entre Biologia e Física, é de suma importância o tratamento adequado do trinômio energia, entropia e informação, já que as propriedades entrópicas dos biopolímeros informacionais representam a base para a formação das redes bioinformacionais e para o processamento da informação na computação biológica. É importante também ter sempre presente as relações entre Matemática e Física, entre Física, Química e Biologia, bem como a possibilidade de redução da Biologia à Física, desde que seja levada em conta a quantidade extra de informação contida nas emergências biológicas (vida e consciência).

Uma pergunta muito comum: a Biologia se reduz à Fisicoquímica? No entanto, a pergunta precisa ser reformulada: a Biologia pode se reduzir à Química (HUNTER, 1996), assim como a Química à Física e esta à Matemática?

A Matemática é a ciência mais básica porque ela representa a ponte entre a mente humana e o universo com suas propriedades micro e macrocósmicas (GELLMAN, 1996). A mente humana, através de modelos matemáticos, tenta descobrir as leis que regem tais propriedades, erigindo assim, ao ligar o mundo das idéias com o mundo

material (massa e energia), a ciência chamada Física. Na elaboração de uma teoria física, portanto, fica difícil delimitar a fronteira entre Física e Matemática. Por outro lado, é difícil delimitar a fronteira entre Física e Química, bem como entre Química e Biologia, já que moléculas são entidades materiais e os seres vivos são constituídos de moléculas. Na verdade, esta visão, moderna apenas quanto à terminologia, é a mesma apresentada nas obras de Aristóteles: a Física, tratando dos processos mentais que levam ao conhecimento do mundo das ciências naturais (*perí fiseos*), e a Metafísica (além da física), tratando dos processos mentais que levam à contemplação do mundo das formas puras (geométricas e imateriais).

Embora difícil, a delimitação entre Química e Biologia existe e pode ser descrita, na medida em que propriedades emergentes são descobertas tanto na Química, em relação à Física, quanto na Biologia, em relação à Química. As propriedades emergentes indicam uma quantidade extra de informação, acumulada e tratável a nível da ciência em questão, mas que só se torna redutível à ciência de nível mais básico se esta ampliar o âmbito de suas teorias, capacitando-se para assimilar a quantidade extra de informação. Uma grande pergunta fica no ar: será que as teorias físicas hoje existentes são suficientes para promover a redução da Química e da Biologia à Física (PENROSE, 1997)? A redução da Química à Física já se processa de forma razoável, em função das teorias físicas atuais, mas a redução da Biologia ainda espera por novas teorias. Em relação à Química (à Física em última instância), a Biologia apresenta a grande emergência da vida e, sobre esta, ainda a grande emergência da consciência.

Parece ser lógico que a Biologia se reduza à Química e esta à Física, na medida em que não existem leis especiais para a Química ou a Biologia, a não ser as leis físicas passíveis de serem descobertas pela mente humana interagindo, através de modelos matemáticos, com as propriedades observáveis do Universo. Parece também que a Biologia só se reduzirá à Física quando esta puder manipular a quantidade de informação extra contida em cada propriedade emergente biológica e ainda encontrar a teoria adequada para explicá-la.

Expectativa por um novo paradigma

Na correlação entre as disciplinas que compoem o leque das chamadas Ciências Cognitivas, é importante avançar no estabelecimento de uma Teoria da Consciência, através de comparação entre computação eletrônica e computação biológica (CONRAD, 1989, CONRAD, ZAUNER, 1998), desde a máquina de Turing até o cérebro humano,

passando pelo cérebro zoológico como computador quântico (GREEN *et al.* 1997), cujo análogo físico já começa a existir em modelos teóricos. É importante também a abordagem correta das transições de paradigma em Biologia, com ênfase na expectativa de complementação da Bioquímica e da Biologia Molecular pela Engenharia Molecular (INGBER, 1993), tendo a Bioinformática como disciplina integradora, bem como do paradigma genético reducionista pelo paradigma das redes epigenéticas (STROHMAN, 1997).

O Projeto Genoma, ao englobar genomas de outros organismos modelos além do humano, passou a alavancar pesquisa e desenvolvimento na área biotecnológica, tendo na tecnologia do DNA recombinante sua espinha dorsal, que engloba metodologias originárias da Bioquímica e da Genética, fundidas na Biologia Molecular, bem como otimizadas pela aplicação de ferramentas computacionais, mais recentemente aliadas a ferramentas matemáticas. Com o dilúvio de informação disseminada nos *genome databases* acessáveis via Internet, a presença da Bioinformática como ciência computacional tornou-se avassaladora (TILGHMAN, 1996).

Toda essa pujança, manifestada pelo Projeto Genoma, está sendo engendrada no bojo do paradigma genético, apesar de seu reducionismo que só leva em conta o fluxo de informação genética e unidirecional, condizente com o dogma central da Biologia Molecular. De fato, contrariamente a WILKINS (1996) que defende a idéia de jamais ter ocorrido revolução kuhniana em Biologia, STROHMAN (1997), inspirado pela leitura da nova edição de *The Structure of Scientific Revolutions* de Kuhn, reconhece os atributos dessa revolução nas contradições internas do atual paradigma, caracterizado como determinismo genético reducionista, fruto de um erro epistemológico, quando a estreita teoria do gene passou a ter o *status* de paradigma da vida. Apontando as redes epigenéticas como saída para superar as limitações do paradigma em crise, Strohman reconhece a inexistência de uma teoria unificadora capaz de caracterizar a formação e funcionamento dessas redes não-lineares e próprias de sistemas complexos, auto-organizantes e adaptativos.

Outro fator que contribui para o reducionismo do atual paradigma é o papel preponderante até então exercido pela Bioquímica, hoje em dia identificada com a Biologia Molecular, que privilegia a difusão, tratada pela equação de Michaelis-Menten, ausente na grande maioria dos processos celulares: não responde, por exemplo, pelo *molecular channeling* (EDWARDS, 1996) e pelo *bending* típicos de estado

sólido dos complexos protéicos e nucleoprotéicos (PEREZ-MARTIN, 1997, BRAY, 1998) ou de cristal líquido da membrana (GIRAUD-GUILLE, 1996); pela *tensegrity* gerada pela rede mecânica, fruto da integração da rede da matriz extracelular com a rede citoesquelética, através das integrinas na membrana plasmática, tendo como fator preponderante as propriedades ferromagnéticas dos microtúbulos (INGBER *et al.*, 1994, TUSZYNSKI *et al.*, 1997, INGBER, 1998); sem falar na eletroforese ou *electric focusing* gerado por funcionamento diferencial das bombas iônicas e no transporte de vesículas ou de cromossomos por proteínas motoras orientadas por campo eletromagnético gerado por microtúbulos (GOLDBERG, 1995).

Motivação e Metodologia

Um estudo cuidadoso da literatura leva a identificar as redes epigenéticas, sugeridas por STROHMAN (1997), como os elos de unificação da Biologia, elos estes que, no entanto, ainda estão sendo apresentados de forma fragmentada e redundante em dezenas de revistas especializadas.

Nossa proposta é demonstrar que esses elos de unificação apontam para a existência de apenas quatro redes biomoleculares que, já existentes nas células ancestrais do mundo do DNA, continuam sendo as mesmas presentes nas células de todos os seres vivos atuais e cuja caracterização pode ser feita nos organismos modelos do Projeto Genoma.

Uma **rede genômica** cujo *output* expressa de modo constitutivo (*default*) a **rede metabólica e de manutenção**, bem como de modo indutivo (via estímulos do meio) regula o ciclo celular, através de *inputs* trazidos pela **rede de sinalização** (a nível de *software*) e pela **rede mecânica** (a nível de *hardware*), definindo o tipo de programa a ser “rodado”: proliferação ou duplicação, diferenciação ou embriogênese, morte programada ou apoptose e transformação ou câncer.

As **redes biomoleculares**, tendo os biopolímeros informacionais como autômatos de primeira ordem, integram a homeostasia da célula, o autômato de segunda ordem. As **redes celulares**, produzidas a partir da célula ovo original, através de ciclos autopoieticos (MATURANA, VARELA, 1980), integram a homeostasia do organismo pluricelular, o autômato de terceira ordem, através da interação de tecidos, mediada pela matriz extracelular, formando órgãos. **Redes de organismos** (unicelulares e pluricelulares) integram a homeostasia da biosfera, o autômato de quarta ordem, através

da interação de espécies, mediada pelo meio ambiente, formando ecossistemas que compoem o super-organismo Gaia (LOVELOCK e MARGULIS, 1974, LOVELOCK, 1988, LOVELOCK, 1995). Na perspectiva da Teoria do Caos, é como se essas **redes bioinformacionais**, a partir de condições iniciais relativamente simples, se integrassem em sucessivos níveis fractais de complexidade crescente, gerando toda a biodiversidade hoje visualizada na copa da árvore filogenética.

No capítulo 1 será dada uma descrição fenomenológica da gênese e das funções dos biopolímeros informacionais e no capítulo 2 uma caracterização preliminar das redes bioinformacionais.

O capítulo 3 tratará de Termodinâmica e Cinética nos Sistemas Biológicos, resgatando na base da constante molar universal (R) a equação fundamental dos sistemas biológicos, identificada com a função energia livre de Gibbs (ΔG), o eixo unificador a nível fisicoquímico.

O capítulo 4 apresentará a Estratégia Celular para Interconversões de Energia Livre, estratégia esta levada pela seleção natural ao mais alto grau de otimização, graças à propriedade entrópica dos biopolímeros informacionais, demonstrada no processo de mudança conformacional (*folding*), e ao altíssimo poder da catálise enzimática. Mostrar-se-á como a célula unifica as táticas aplicadas de modo universal na gênese das redes biomoleculares, ao otimizar a integração entre mudança conformacional e função catalítica, tendo como força motriz a hidrólise de ATP, para as conversões entálpicas, e o processo de fosforilação, para as interações entrópicas.

No capítulo 5, tendo em vista, por uma lado, a fundamentação para a gênese das redes biomoleculares apresentada no capítulo 4, bem como, por outro lado, as análises das últimas versões de modelos apresentados pelos principais grupos de pesquisa que vêm trabalhando com segmentos de redes biomoleculares, tentar-se-á mostrar como de fato as quatro redes biomoleculares, consideradas na nossa proposta, se integram na homeostasia da célula e na morfogênese do organismo. Assim sendo, a integração descrita poderá contribuir para a criação de um modelo de célula virtual para futuras simulações.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FENOMENOLÓGICA DOS BIOPOLÍMEROS INFORMACIONAIS

Acidentes congelados fixam determinadas alternativas em função de fatores ambientais que funcionam como condições iniciais para regularidades futuras, passando a predominar a historicidade sobre a aleatoriedade (GELL-MANN, 1996, KAUFFMAN, 1987, HUNTER, 1996).

Nos sistemas biológicos, um mecanismo emergente produz ordem a partir da ordem contida em estruturas cuja ordem foi por sua vez produzida a partir da desordem, segundo mecanismos probabilísticos (SCHRÖDINGER, 1992).

1.1 – GÊNESE E PROPRIEDADES MORFOFUNCIONAIS

No cenário imaginado pelos defensores da hipótese autotrófica (EDWARDS, 1996), os precursores dos biopolímeros informacionais foram surgindo no oceano primitivo e se organizando em complexos metabólicos sobre superfícies minerais até a formação do “crêpe primordial” (em vez da sopa fundamental dos partidários da hipótese heterotrófica), onde as interações entre as moléculas poderiam ocorrer diretamente por *molecular channeling*, sem necessidade da difusão, e onde moléculas biossinteticamente semelhantes se agrupavam em posições de vizinhança, permitindo coevolução do código genético (*codons* existentes em moléculas de RNA se correlacionando com aminoácidos candidatos a ligações peptídicas na síntese de proteínas). Tal coevolução pode ter ocorrido em superfícies minerais, por exemplo, de pirita (FeS_2 , originada de H_2S e FeS), com sistemas de oxidação e redução (sistemas redox) reversíveis e utilizáveis química e fotoautotróficamente. De fato, ainda hoje, sistemas redox Fe-S e Fe-Cu ocupam o núcleo dos complexos protéicos respiratórios e fotossintéticos, sugerindo a coevolução desses processos, bem como a presença dos mesmos no complexo metabólico ancestral universal do mundo do RNA (EDWARDS, 1996) que precedeu a célula ancestral universal do mundo do DNA.

1.1.1 – Elementos químicos com predestinação biótica

Os elementos presentes na Terra primitiva, como em todo o sistema solar, foram resultantes da evolução cósmica: 90% do H formado nos instantes iniciais do universo, ao passo que os restantes foram se formando, em função de seus números atômicos, em núcleos de sucessivas gerações de estrelas. Diferente do mundo mineral, o mundo da célula é constituído por poucos elementos, quatro dos quais (H, C, N e O) compõem 99% de seu peso. Destes quatro, H e O formam a água, responsável por 70% desse peso e cujas propriedades vão delimitar as condições iniciais que nortearão a evolução química.

Na medida em que são alvos, como substratos ou como produtos, de ação enzimática, elementos químicos circulam como cátions e ânions que, através dos elementos elétricos da membrana (bombas e canais iônicos), geram e regulam potenciais elétricos, bem como, através de interações com a água, regulam o pH e a osmolaridade, constituindo o meio eletrolítico cujas interações com os biopolímeros regularão suas propriedades entrópicas e informacionais. Os elementos químicos podem circular ainda em combinações típicas de radicais livres, de cujo *turnover* depende o funcionamento da célula..

Elementos químicos funcionam como indicadores de processos fisicoquímicos como, por exemplo, o S na construção e quebra de pontes dissulfídricas na formação de redes poliméricas (*RAINA, 1997*), como no processo de vulcanização, bem como na taxa de decomposição do querogênio durante a formação de petróleo (*LEWAN, 1998*).

Quebra de simetria na quiralidade

Fatores abióticos (cosmológicos e geológicos) congelaram uma quiralidade altamente conservada: nas proteínas, só aminoácidos levógiros (L-AAAs), e nos ácidos nucléicos, apenas pentoses dextróginas (D-oses). Além de fatores abióticos, a homoquiralidade na natureza pode se estabelecer como um imperativo do próprio sistema estereoquímico, a partir de condições iniciais (*POPA, 1997; SIEGEL, 1998; CHAMBRON, 98 e KAUFFMAN, 1987*).

A ampliação do conhecimento sobre quiralidade é importante não só na pesquisa básica, no esclarecimento dos processos abióticos e na modelagem matemática dos biopolímeros, mas ainda na pesquisa aplicada, principalmente na área farmacológica.

Com suas propriedades topológicas, além de geométricas, a quiralidade apresenta formas enantioméricas (propriedades fisico-químicas idênticas) e diastereoméricas

(diferentes), interligando a si mesma com a entropia e a informação.

1.1.2 - Transição do mundo do RNA para o mundo do DNA

No mundo do RNA, que precedeu o atual mundo do DNA, formou-se o complexo metabólico ancestral (EDWARDS, 1996), tendo como cenário as mesmas condições iniciais que fixaram a quiralidade: microambientes sobre superfícies minerais piríticas, finamente delimitados por membrana em dupla camada lipídica, onde se manifestava o *molecular channeling*, além da difusão (crepe em vez da sopa primordial), a co-localização de monômeros com propriedades semelhantes, bem como coevolução do código genético conduzida pelas propriedades autocatalíticas do RNA, até o estabelecimento dos biopolímeros informacionais e entrópicos típicos do atual mundo do DNA.

Outros dados provenientes de diversas disciplinas apontam para a possibilidade dessa transição:

- a) Condições iniciais próprias de um cenário evolutivo imaginado pelos defensores da hipótese autotrófica, em oposição à hipótese heterotrófica;
- b) diferenças suficientes nas propriedades entrópicas devem explicar a prevalência da ribose sobre a desoxi-ribose, bem como dos ribonucleotídeos sobre os desoxi-ribonucleotídeos, e, em última análise, do RNA sobre o DNA; da mesma forma, explicar a dupla hélice, contínua no DNA e em regiões localizadas no RNA (LANDER, 1995, PROHOFSKY, 1995).
- c) presença marcante dos ribonucleotídeos, tanto como monômeros trifosfatados (presença essencial do sistema ATP/ADP como regulador universal das interações energéticas, entrópicas e informacionais), quanto como cadeias oligonucleotídicas com atividades catalíticas (ribozimas com capacidade de polimerizar ou hidrolizar outras cadeias de RNA e também cadeias peptídicas) (IBBA, 1997; CHEN, 1997);
- d) cadeias de RNAs, capazes de funcionar como mRNA e como tRNA, apresentavam os *codons* geradores das respectivas cadeias polipeptídicas, funcionando como primitivos RNA-genes, constituindo, na verdade os motivos ou domínios básicos evolutivos que posteriormente, com o surgimento da transcriptase reversa, passaram a constituir os DNA-genes que, com a maior estabilidade dessa molécula em dupla hélice, se organizaram em multidomínios, compatíveis com as proteínas do atual

mundo do DNA (MUTO, 1998; TATENO, 1997; BAIROCH, MURZIN,, 1997);

- e) proteínas multidominais tornam-se multifuncionais, substituindo e amplificando a capacidade catalítica das moléculas de RNA: assim, no mundo do DNA, as proteínas se constituem em autênticas máquinas biomoleculares que, através de mudança de fase (*on/off* em função de fosforilação), atuam de forma combinatória, em associações divergentes e convergentes, passando a ativar e regular as funções do DNA (duplicação e transcrição) e dos RNAs (tradução) no funcionamento do código genético, *in vivo*, e até mesmo na computação com DNA, *in vitro* (REIZER, 1997; CAIRNS, 1998; BREZINA, 1996, ADLEMAN, 1994);
- f) as propriedades entrópicas dos biopolímeros informacionais, principalmente das proteínas, se manifestam em função das interações com as moléculas do meio envolvente: a) proteínas solúveis podem ter sua entropia reduzida, em oposição ao grande aumento de entropia das moléculas de água, pela desorganização das estruturas pentagonais (clatradas) previamente formadas ao redor de regiões hidrofóbicas do biopolímero (GROBERG, 1997, URRY, 1995); b) proteínas ancoradas na dupla camada lipídica (proteínas de membrana) têm suas alfa-hélices anfipáticas inseridas apenas quando previamente agregadas, com as regiões hidrofílicas voltadas para o interior, equilibrando o exterior hidrofóbico da proteína com a hidrofobicidade da membrana (SHAI, 1995); c) proteínas que formam complexos (protéicos ou nucleoprotéicos) contribuem para redução da entropia, devido à complementaridade que se manifesta através de forças não covalentes (BRADY, 1997);
- g) entropia e informação, um binômio indissociável nos sistemas biológicos, graças à molécula de ATP que funciona como bateria energética e fonte de fosfato para a fosforilação (*on/off* nas máquinas biomoleculares);
- h) organização e complexidade, outro binômio indissociável nos sistemas biológicos, porque ambas se manifestam a meio caminho no eixo do conteúdo de informação algorítmica (CAI), análogo dos eixos ordem/desordem e simetria/assimetria (ELITZUR, 1996).

1.1.3 – Propriedades morfofuncionais

Estudos matemáticos e físicos, principalmente na linha da mecânica estatística e até mesmo com metodologia específica, como a MSPA (*modified selfconsistent phonon approximation*), aliados a estudos biológicos, principalmente na linha da biologia molecular e até mesmo com metodologia específica, como a do DNA recombinante ou da computação biológica, têm contribuído para o avanço no conhecimento da estrutura e função dos biopolímeros informacionais (DNA, RNAs e proteínas), com suas propriedades entrópicas e manifestações topológicas.

Os três tipos de biopolímeros informacionais apresentam características comuns a todo polímero:

- a) imposições topológicas pelas quais a cadeia se manifesta com estrutura hierárquica em grande escala (monômeros – subcadeias – cadeias – redes), sem que sejam relevantes as interações químicas em pequena escala, permitindo considerações sobre o comprimento da cadeia na sua forma distendida, bem como helicoidizada aleatoriamente (artificial) e com regularidades (natural), sendo que, nesta forma, se manifestam interações de volume entre as regiões que se cruzam no dobramento da cadeia;
- b) elasticidade dos polímeros se manifesta, não como contribuição da energia, mas como contribuição da entropia (que poderíamos considerar como o equivalente energético da probabilidade e da informação): dobramentos, que permitem a redução de entropia no polímero, são consequência de trabalho realizado pelo próprio sistema ou de maior desorganização das moléculas do meio envolvente.

Com relação à molécula de DNA:

- a) além das ligações convencionais, possibilidades de novas interações estão surgindo: interações não-ligadas, derivadas do empilhamento das bases (contribuição para formação dos sulcos (*groove*) maior e menor, assim como para estabilidade termodinâmica cuja existência dificilmente seria explicada só pelo emparelhamento das bases);
- b) interações isolantes por contra-íons, provenientes de água de hidratação ou de sais, dos grupos fosfatos, desprotonizados e negativos, que por si só promovem repulsão *coulombiana* no sentido de separar a dupla hélice (desnaturação e renaturação como processos não localizados, bem como transições entre as

formas B - A - Z);

- c) a estruturação linear do DNA não é aleatória, em primeiro lugar, porque a helicoidização aleatória é insuficiente para atingir o altíssimo grau de empacotamento e, em segundo lugar, porque existem regularidades que permitem o armazenamento e a recuperação da informação: tanto num quanto em outro caso, os objetivos são atingidos graças às proteínas, verdadeiras máquinas remodeladoras da cromatina (CAIRNS, 1998);
- d) a partir do trabalho de Adleman, as enzimas utilizadas na tecnologia do DNA recombinante, como verdadeiras máquinas operadoras do DNA, passaram a ser utilizadas na técnica de DNA *computing* (elevado grau de paralelismo e de reconhecimento permitindo abordagem de problemas insolúveis na computação eletrônica) e agora estão sendo utilizadas na técnica de DNA *shuffling* (rápida otimização funcional de genes que, criando evolução molecular *in vitro*, está revolucionando a engenharia de proteínas).

Com relação à Molécula de RNA

Os mesmos tipos de interações no DNA desvendam estruturas do RNA: primária, sequência linear resultante da transcrição a partir de DNA; secundária, por formação localizada de dupla hélice, com as alças (*loops*) correspondentes, onde a presença de pares não convencionais aponta para a importância das interações eletrostáticas e por empilhamento; terciária, pela compactação das regiões de estrutura secundária, através de *ribose zipper*, com exteriorização dos grupos fosfatos CATE, 1996).

- a) proteínas babás (*chaperones*) auxiliam o dobramento (*folding*) de moléculas de RNA com as quais compartilharão funções no complexo nucleoprotéico, contribuindo para a redução da entropia e estabilidade termodinâmica, bem como caracterizando o tipo de ligação adaptativa (*induced fit recognition*).
- b) uso de *aptamers* (moléculas de RNA selecionadas *in vitro* para ligações de alta afinidade e especificidade com outras moléculas, principalmente de proteínas), permitindo análise da intrincada rede de interações intra e intermoleculares, bem como tendo implicações revolucionárias em farmacologia, ao transformar moléculas de RNA em alvo perfeito para drogas e antibióticos;
- c) uso de oligonucleotídeos está transformando a terapia genética (baixa eficiência: uma célula modificada para cem mil tratadas) em medicina genética que, além de utilizar o DNA como alvo (antigene formando tripla

hélice em regiões específicas do gene, modificando-o), utiliza oligonucleotídeo como ribozima *antisense* capaz de interferir em praticamente todas as etapas reguladoras da expressão gênica;

- d) no contexto da expressão gênica, está surgindo uma nova tecnologia (*expression genetics*) no tratamento do câncer: além do estudo das mutações e dos oncogenes a nível de genoma, passa-se ao estudo da herança a nível do RNA, levando-se em conta o fato de que, nas redes de genes, um gene mutante *upstream* afeta uma cascata de genes não mutantes *downstream*.

Com relação à molécula de proteína:

- a) a molécula de proteína, com sua grande versatilidade estrutural e seu poder catalítico, é o objeto do estudo e da tecnologia de polímeros; a estrutura primária é dada pela sequência de aminoácidos; a estrutura secundária é dada pelo dobramento autônomo, dependente da natureza dos resíduos, em alfa-hélice e beta-folha; a estrutura terciária é dada pelas interações de volume entre os elementos de estrutura secundária e também pela formação de pontes dissulfídicas; ainda existe uma estrutura quaternária, quando átomos metálicos interligam regiões de uma mesma cadeia polipeptídica, como nos domínios *zinc fingers*, ou mais de uma cadeia (sub-unidade), como o Fe e o Mg respectivamente na hemoglobina e na clorofila;
- b) no processo de dobramento (*foldings*), antes de atingir sua conformação nativa de menor energia, em função do meio, a proteína pode se agregar em glóbulos compactos (*moltenglobules*), com exposição de aminoácidos hidrofóbicos ao solvente hídrico (ao contrário da conformação nativa com cerne hidrofóbico; tal agregação desvirtuada no processo de dobramento pode ocorrer também, invertendo-se as posições, durante a inserção de proteínas de membrana na dupla camada lipídica (NETZER, 1998);
- c) para evitar ou corrigir a agregação desvirtuada, chaperoninas (moléculas babás) acompanham o processo de dobramento, ligando-se de forma transitória a resíduos hidrofóbicos de cadeias polipeptídicas em formação ou daquelas pré-existentes mas desdobradas pela exposição da célula a *stress*, principalmente temperatura (daí o nome Hsp: *Heat shock protein*, cujos genes são ativados imediatamente – *immediate early genes* – em resposta a choques); as chaperoninas também desdobram proteínas mal dobradas para dobrá-las novamente;

- d) com o acompanhamento por chaperoninas, durante a regulação pós-traducional, a destinação das proteínas é definida: além das proteínas solúveis para citoplasma, o complexo ribotranslocador destina as proteínas secretadas para o lúmen do retículo endoplasmático (vesícula secretora), bem como insere o domínio hidrofóbico das proteínas de membrana na dupla camada lipídica (BIBI, 1998);
- e) as proteínas de membrana não são simétricas: sofrem, durante a regulação pós-traducional, glicosilações no domínio extra-celular (otimização no reconhecimento entre receptor e ligante), e eventualmente fosforilações no domínio citoplasmático (otimização na transdução, ou seja, na conversão de sinais);
- f) proteínas periplasmáticas podem sofrer lipidilações, ou seja, a mediação de ácidos graxos na inserção de proteínas na membrana, tais como o ácido palmítico, o ácido mirístico etc. Este processo introduz lipídios covalentemente na região N-terminal da proteína, permitindo a inserção de sua porção lipídica na membrana, cuja estabilidade é regulada por fosforilação (otimização na sinalização) (BHATNAGAR, GORDON., 1997).

1.1.4 – Propriedades entrópicas

A informação disponível no DNA e processada por moléculas de proteína, bem como a energia armazenada nas moléculas de ATP, captada e interconvertida também por moléculas de proteínas, são as responsáveis pela existência da organização biológica que é termodinamicamente improvável e que se identifica com a complexidade, situando-se a meio caminho entre a ordem de um cristal e a desordem de um gás. A organização nos sistemas biológicos, como num sistema cristalográfico perfeitamente ordenado, é gerada por um algoritmo repetido indefinidamente. No entanto, um ser vivo difere profundamente de um cristal pelo fato de sua construção a partir de seu algoritmo – o DNA- requerer um grande trabalho de decifração e processamento da informação (ELITZUR, 1996).

Ao elevado nível energético e informacional exigido pelos sistemas biológicos, acrescenta-se o ajuste fino permanente que as pressões de diferentes ambientes exercem sobre a variedade de genótipos, ao permitir, para cada ambiente, a sobrevivência dos mais aptos. Isto, na verdade, significa a acumulação de informação útil no genoma, às custas da seleção natural. Assim, a adaptação, pedra angular da teoria da evolução, pode

ser relacionada ao conceito físico de informação, confirmando o caráter informacional, no sentido real e não meramente metafórico, dos sistemas biológicos.

Por outro lado, é inerente aos seres vivos a capacidade de gerar organização em meio a um mar de desordem. Esta capacidade se correlaciona com o caráter entrópico dos biopolímeros informacionais que, diferentemente da maioria dos materiais, possuem “elasticidade entrópica”, ou seja, diminuição da entropia com o aumento da temperatura, e, por isso, apresentam o que se denomina transição inversa de temperatura (URRY, 1995).

As moléculas de água, normalmente formando pontes de hidrogênio entre si, se organizam de modo diferenciado ao envolver um biopolímero: as pontes de hidrogênio se desorganizam em volta das regiões hidrofílicas e se organizam melhor, formando estruturas pentagonais (clatradas) estáveis, em torno das regiões hidrofóbicas. Com o aumento de hidrofobicidade na molécula de biopolímero, reforça-se, nas moléculas de água, a estrutura pentagonal que, por sua vez, constrange a molécula de biopolímero a se distender (*unfolding*), saindo de sua conformação nativa. Por outro lado, se a estrutura pentagonal das moléculas de água se enfraquecer, desorganizando-se com o aumento de temperatura, a molécula de biopolímero, liberada do constrangimento, se contrairá (*folding*), voltando a organizar-se em sua conformação nativa. Assim, a molécula de biopolímero e as moléculas de água que a envolvem formam um sistema termodinâmico aberto: pode ocorrer redução de entropia na molécula de biopolímero, desde que a esta redução corresponda um aumento igual ou maior de entropia nas moléculas de água.

1.2 – FOSFORILAÇÃO E FUNCIONALIDADE

Como a homeostasia celular mantém rígido controle sobre os fatores físicoquímicos, principalmente temperatura e pH, os processos de fosforilação e desfosforilação se mostraram os mais adequados, através da evolução biológica, para pôr em funcionamento as máquinas biomoleculares (proteínas). A fosforilação e desfosforilação em cascata, como numa via “fosforrelé” de transdutores de sinais, permite a formação da rede de sinalização que materializa o comportamento coordenado da célula ao perceber corretamente os sinais do meio externo e ao gerar respostas apropriadas. Assim, a transdução de sinais é de primordial importância não apenas para a sobrevivência da célula num ambiente em permanentes alterações, mas também para a coordenação de todos os seus processos vitais.

1.2.1 – O sistema ATP/ADP

A molécula de ATP (adenosina tri-fosfato) funciona como doadora universal de grupo fosfato, além de funcionar como a bateria carregada, capaz de ceder a energia contida na sua ligação gama, então hidrolisada, para as reações que necessitem dessa energia (reações endoergônicas). Por sua vez, a molécula de ADP (adenosina di-fosfato) funciona como receptora de grupo fosfato. além de funcionar como bateria descarregada, capaz de armazenar, na ligação gama então construída, a energia proveniente das reações que a liberem (reações exoergônicas).

Dada a importância da molécula de ATP, para manter níveis adequados dessa molécula, todos os tipos de células possuem um complexo protéico (ATP-sintase), inserido em membranas (de mitocôndria e cloroplasto, nas eucarióticas), capaz de fosforilar o ADP transformando-o em ATP, utilizando para tal a energia gerada por um outro complexo protéico (bomba de prótons), também inserido em membranas, nas proximidades da ATP-sintase. Os íons H^+ que alimentam a bomba de prótons são provenientes de átomos de hidrogênio que, por sua vez, podem se originar ou da oxidação da glicose na fermentação e respiração, ou da fotólise da água na fotossíntese. Por isso, a fosforilação diz-se oxidativa, no primeiro caso, e fotossintética no segundo. É interessante notar que as bombas de prótons, sendo também transportadoras dos elétrons provenientes do hidrogênio, constituintes portanto das cadeias respiratória e fotossintética, assim como as ATP-sintase, são complexos protéicos cujas famílias de genes existem conservadas desde bactérias até mamíferos (BICKEL-SANDKÖTTER *et*

al., 1996, CASTRESANA, 1995 e LIN 1996). Aliás, nas células eucarióticas, esses complexos protéicos estão situados na membrana de mitocôndria e cloroplasto, estruturas homólogas a bactéria. Em última análise, todos os genes que codificam as proteínas da rede metabólica apresentam alto nível de conservação através da filogenia (MESSANA, 1996).

Por outro lado, existem proteínas que hidrolizam a molécula de ATP (ATPases), transformando-a em ADP e liberando uma molécula de ácido fosfórico ou Pi (fósforo inorgânico). Sendo importante manterem-se equilibradas as concentrações ATP/ADP, para tal fim, os níveis destas moléculas regulam por retroalimentação negativa pontos críticos da rede metabólica.

Garantido então, pela rede metabólica, seu nível adequado em qualquer situação de repouso ou de atividade celular, a molécula de ATP pode ser usada ou como bateria carregada ou como doadora universal de grupo fosfato. Como bateria carregada, ela é hidrolisada por proteínas ATPases e tem sua energia utilizada imediatamente na produção de trabalho, como por exemplo nas proteínas motoras e nas bombas iônicas. Como doadora universal de grupo fosfato, ela é hidrolisada por proteínas quinases que transferem o grupo fosfato para um outro substrato. Quando o substrato é não protéico, a fosforilação serve para ativar a molécula, energizando-a e tornando-a apta para participar de reações (como a glicose-6 fosfato e demais produtos fosfatados da via metabólica). Quando o substrato é protéico, a fosforilação muda a conformação da molécula de proteína, tornando-a apta para fazer parte da rede de sinalização cujos circuitos de fosfotransferência coordenam as respostas da célula (output da rede gênica) aos fatores do meio (input para a rede gênica).

Há ainda um terceiro papel exercido pela molécula de ATP, quando então funciona como fonte da molécula cíclica de adenosina mono-fosfato, AMP-cíclico (cAMP), e esta molécula, por sua vez, passa a funcionar como segundo mensageiro na regulação das proteínas quinases. A transformação de ATP em cAMP é feita pela adenilato-ciclase, uma proteína de membrana, quando ativada por proteína dependente de guanosina tri-fosfato (GTP), conhecida como proteína G. Esta proteína está associada a um receptor na membrana (denominado receptor heptaélicoidal ou serpentínico) que é ativado por estímulos físicoquímicos provenientes do meio extracelular. Assim, o ATP é diretamente substrato para as proteínas quinases, viabilizando a fosforilação, e indiretamente, através do cAMP, regula a ativação das mesmas proteínas quinases; a regulação das proteínas quinases depende de sinais

provenientes da matriz extracelular que, através de receptores associados a G-proteína, ativam esta proteína que, por sua vez, ativa a adenilato-ciclase para hidrolisar o ATP, transformando-o em cAMP. Fica patente também a existência, além do sistema ATP/ADP, do sistema GTP/GDP. Informação mais detalhada sobre este último sistema será fornecida na seção 1.2.4.

Quinases e fosfatases

Fosforilação, portanto, é o encaixe de um grupo fosfato, executado por uma proteína quinase, sobre a cadeia lateral de um amino ácido (resíduo) pertencente a uma proteína substrato. Uma proteína quinase, para fosforilar uma proteína substrato, precisa estar no seu estado ativo capaz de retirar (hidrolisar) o grupo fosfato da molécula doadora (ATP) e de transferi-lo para um resíduo da proteína substrato (JOHNSON, 1996). No entanto, se uma quinase ficasse permanentemente em estado ativo, fosforilando qualquer substrato, seria um desperdício da valiosa energia contida na ligação gama do ATP, além de gerar confusão e aleatoriedade em vez de precisão na comunicação. Por isso, além do sítio catalítico (C) que processa a fosforilação, a proteína quinase tem que ter um sítio regulador (R) capaz de mantê-la inativa, liberando-a apenas quando em presença de sinalizador (mensageiro) específico, como por exemplo o cAMP (MORGAN, 1996). Geralmente as proteínas quinases são multiméricas, isto é, formam um complexo de várias proteínas, com subunidades reguladoras e catalíticas, constituindo o que se denomina de holoenzima.

A fosforilação é um processo reversível de tal forma que a mudança de conformação da proteína substrato, fosforilada por uma proteína quinase, retorna ao seu estado original ao ser desfosforilada por uma proteína fosfatase. A existência desses dois estados é que caracteriza uma proteína como um interruptor on/off numa via de sinalização (SAMIEL, 1995).

Teoricamente qualquer aminoácido poderia ter sua cadeia lateral fosforilada, podendo chegar até vinte os tipos de resíduos fosforiláveis. No entanto, tais tipos de resíduos não passam de seis, caracterizando em igual número as famílias de proteínas quinases (PKs).

A família das proteínas histidina-quinases (PHKs) é a filogeneticamente mais primitiva, típica das células procarióticas (bactérias), constituindo uma via de sinalização com apenas dois elementos: uma proteína histidina-quinase e uma proteína reguladora de resposta. As proteínas histidina-quinases são receptores na membrana e,

quando ativadas por algum sinal proveniente do meio extracelular, autofosforilam seu resíduo histidina, após hidrolisar o ATP. Posteriormente, sem mais utilização de ATP, fosforilam a proteína reguladora de resposta no resíduo aspartato. A desfosforilação das ligações fosfo-histidina e fosfo-aspartato é feita por modulação alostérica, ou seja, por deformação da molécula de proteína, sem necessidade de retirada de grupo fosfato por fosfatase. Com apenas dois elementos, essa via de sinalização, simples e eficiente para células procarióticas, é insuficiente para cobrir o tamanho e a diversidade de compartimentos das células eucarióticas. Quando encontrado em células eucarióticas, esse sistema de dois elementos funciona apenas como iniciador das complexas vias de sinalização cujos elementos posteriores são proteínas tirosina-, serina- e treonina-quinases. Estes tipos de proteínas quinases são típicos das células eucarióticas, embora ultimamente estejam sendo encontrados também em grupos de bactérias que evidenciam certo grau de sofisticação nos contatos com outras células ou com o substrato (ZHANG, 1996).

A família das proteínas tirosina-quinases (TKs) inclui receptores na membrana, como o receptor de insulina e os receptores dos fatores de crescimento (RTKs), e uma grande variedade de proteínas que, além do domínio catalítico, possuem também um domínio com homologia para reconhecer domínios SH2 de proteínas na interface entre membrana e citoplasma (SH2- TKs).

Os receptores (RTKs) são ativados por ligantes (primeiros mensageiros, como hormônios, moléculas da matriz extracelular ou antígenos) no domínio extracelular e se autofosforilam no domínio intracelular, quando passam a promover a agregação e ativação, fosforilando-as, das SH2-TKs na interface membrana/citoplasma. Estas, por sua vez, fosforilam outras proteínas serina-treonina-tirosina quinases até a fosforilação, no núcleo, dos fatores de duplicação ou de transcrição gênica. As SH2-TKs funcionam como adaptadoras de sinais provenientes dos RTKs, na sua transferência para a etapa seguinte, intermediada pelas GTPases (família RAS, ver abaixo), até a convergência sobre a cascata das MAP quinases (proteínas ativadas por agentes mitogênicos) que finalizam o processo de fosforilação e desfosforilação, dirigindo-o ou para a duplicação ou para a transcrição gênica (SONGIANG, 1995).

Em contraponto com as quinases, existem as fosfatases, viabilizando assim o on/off em cada etapa da via de sinalização. Dessa forma, moléculas do meio extracelular podem modular os ciclos celulares e a expressão gênica, permitindo à célula responder de modo adaptativo às condições mutantes do meio, além de

paralelamente coordenar em cada tipo de rede seus processos vitais.

Um interruptor on/off implosivo: ciclina-CDK

Na regulação do ciclo celular, são importantes as proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Uma CDK é ativada (estado ON) ao formar complexo com uma proteína ciclina, quando é fosforilada e adquire a capacidade de fosforilar suas proteínas substratos, de modo análogo ao de outras quinases. No entanto, sua inativação (estado OFF) é feita de modo diferente ao de outras quinases: em vez de desfosforilação por fosfatase, a ciclina associada à CDK é destruída pelas proteases do complexo proteossômico que é uma máquina que destrói qualquer proteína que esteja marcada pela proteína ubiquitina (“ubiquitinação”). Outra maneira de manter uma CDK em estado OFF, mesmo quando associada à ciclina, é a presença de uma proteína inibidora de CDK. Neste caso, uma CDK passará do estado OFF para ON se a proteína inibidora for marcada pela ubiquitina e destruída no complexo proteossômico. A ubiquitinação de uma proteína é feita pela ação em cascata de proteínas que atuam no ciclo de divisão celular (proteínas CDC), no caso, CDC 16, CDC 23 e CDC 27. A precisão e sofisticação deste tipo de interruptor ON/OFF é a arma utilizada pela célula para garantir a sincronização de processos de grande complexidade que levam à duplicação e separação dos cromossomos durante a mitose e meiose (WUARIN, 1996). Por exemplo, intensa e precisa proteólise tem que ser dirigida para a destruição por vesiculação da membrana nuclear e para a destruição de complexos protéicos (lamínas do nucleoesqueleto e dímeros helicoidais) que interligam as cromátides (hemifitas do cromossomo duplo) na mitose e os cromossomos homólogos na meiose.

1.2.2 – Sistema GTP/GDP

De modo análogo à molécula de ATP, a molécula de GTP é um ribonucleotídeo trifosfatado, tendo também a ligação gama de alta energia entre o segundo e o terceiro grupo fosfato. O sistema GTP/GDP, porém, não funciona nem como bateria carregada e nem como doador de fosfato para fosforilação. O sistema GTP/GDP funciona como um outro tipo de interruptor on/off para proteínas reguladoras, dependentes de GTP/GDP, e pertencentes à superfamília das GTPases. Uma GTPase está na sua forma ativa quando ligada ao GTP, e na sua forma inativa quando ligada ao GDP. Uma GTPase inativa (GDP-GTPase) se transforma numa GTPase ativa (GTP-GTPase) pela ação de um fator denominado GEF (*GDP-GTP exchange factor*) que estabelece a troca, na mesma

GTPase, do GDP pelo GTP. Ao contrário, uma GTPase ativa torna-se inativa ao adquirir a capacidade de hidrolisar seu GTP associado, reduzindo-o a GDP, sob a ação de uma GAP (*GTPase-activating protein*).

As GTPases se subdividem em duas superfamílias: a das grandes GTPases ou heterotriméricas (com três subunidades diferentes, alfa/beta/gama) e a das pequenas GTPases ou monoméricas.

As GTPases heterotriméricas, conhecidas como G-proteínas, estão associadas a receptores na membrana, no domínio citoplasmático, e funcionam como transdutores dos sinais, provenientes do meio, que chegam a esses receptores. Entre os receptores associados a G-proteínas estão, entre outros, os adrenérgicos, os neuropeptídicos, os fotorreceptores da visão, os quimiorreceptores da gustação e da olfação etc. O receptor, ao receber o sinal (um ligante ou um estímulo físico), funciona como um GEF (*GDP-GTP exchange factor*) para a G-proteína que, anteriormente inativa porque associada ao GDP, torna-se ativa ao associar-se ao GTP. Na verdade, lembrando-se que a G-proteína possui as subunidades alfa/beta/gama, a ligação de GDP/GTP ocorre na subunidade alfa.

Com o GDP ligado, as três subunidades formam um complexo, caracterizando o estado inativo. Com o GTP ligado, a subunidade alfa ativada se desliga das subunidades beta/gama e se movimenta até, por sua vez, ativar a proteína efetora, ainda na membrana. A proteína efetora pode ser um canal de cálcio, uma ciclase (adenilato ou guanilato) e uma fosfolipase (A ou C), que podem produzir respectivamente os segundos mensageiros cálcio, cAMP ou cGMP, ácido araquidônico ou diacil glicerol. A transdução termina quando a subunidade alfa, acionada por uma GAP (*GTPase-activating protein*) que pode ser um dos segundos mensageiros produzidos, põe para funcionar sua atividade GTPásica e hidrolisa o GTP, reduzindo-o a GDP. Associada ao GDP, a subunidade alfa volta a formar o complexo com as subunidades beta/gama, deixando a G-proteína inativada e pronta para ser ativada de novo pelo seu receptor associado.

As pequenas GTPases monoméricas constituem a superfamília Ras que inclui as famílias Ras, Rho, Rab, Ran e ARF. Apesar da variedade, essas proteínas, como a subunidade alfa das G-proteínas, possuem homologias nos domínios de ativação ou inativação respectivamente por GEFs e por GAPs, bem como a capacidade de ativar, por fosforilação, proteínas substratos, funcionando como pontes nas diferentes vias de sinalização que acabaram ficando conhecidas como vias Ras (*Ras pathways*). Na via de

sinalização, o elemento corrente acima (*upstream element*) imediatamente anterior a um elemento Ras é um fator GEF (*GDP-GTP exchange factor*), precedido por um elemento SH2-TK (proteína tirosina-quinase com motivos específicos de aminoácidos chamados SH2) que, por seu turno, é precedido por RTK (receptor tirosina-quinase) que, inicializando tudo, é ativado por um sinal provindo do meio extracelular. O elemento sucessor (*downstream element*) imediatamente posterior a um elemento Ras já é o primeiro elemento da cascata MAPK (*Mitogen-activating protein Kinase*): Raf (*serina/treonina quinase*) ou MAPKKK, seguido por um elemento MAPKK (*treonina/tirosina quinase*) que, por sua vez, é seguido por um elemento MAPK (*serina/treonina quinase*) que finalmente canaliza a ativação ou para a duplicação ou para a transcrição gênica, em função do contexto existente na célula (no espaço-tempo ontogenético), no cromossomo (dependente do grau de acessibilidade ao DNA permitido pelas proteínas de seu arcabouço) e na cromatina (dependente do grau de acessibilidade ao DNA permitido pelas histonas de seus nucleossomos).

1.2.3 - Sistema NAD⁺

A molécula de nicotinoamida adenina dinucleotídeo (NAD) é o ADP acrescido de mais uma ribose ligada à nicotinamida. O ADP assim como o GDP são ribonucleotídeos di-fosfatados que fosforilados se transformam respectivamente em ATP e GTP. O ATP e o GTP são hidrolisados por ciclases, ativadas por unidade alfa de G-proteína, transformando-se respectivamente em AMP cíclico (cAMP) e em GMP cíclico (cGMP). O cAMP e o cGMP, por seu turno, são hidrolisados por diesterases e se transformam em AMP e GMP comuns.

Em relação ao NAD, a nicotinamida é desconectada pela ação de enzimas ADP-ribosil transferases que, de acréscimo, transferem o ADP-ribose (ADPR) restante para um resíduo de uma proteína substrato: é o processo de ADP-ribosilação que, de modo análogo ao de fosforilação, regula proteínas nas vias de sinalização. Por outro lado, a molécula de ADPR, mesmo sem adquirir a forma trifosfatada de ATP, pela ação da ribosil-ciclase se transforma em ADPR cíclico (cADPR), funcionando como segundo mensageiro nas vias de sinalização, de modo análogo aos cAMP e cGMP. Em contraponto com o estado ON, o estado OFF é restabelecido com ADP-ribosilases, removendo o ADP-ribose, e com ADP-ribosil hidrolases, retornando o cADPR para ADPR (MURCIA, 1995).

Além da enzima ADP-ribosil transferase, existe enzima poli(ADPR)

polimerase que ribosila não com um, mas com o encaixe de vários ADPR, formando ramificações. Esta enzima é uma das mais abundantes no núcleo, tendo papel relevante na reparação do DNA e na integridade do genoma.

Além desses papéis importantes, o papel mais conhecido do NAD⁺ é o de coenzima envolvida no metabolismo energético, onde funciona como acceptor de hidrogênio (proveniente da glicólise) bem como doador de próton e elétron para a cadeia respiratória e fotossintética. Ainda no metabolismo energético, o NAD⁺ pode existir na forma de NADP⁺ (*nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato*), funcionando como doador de elétrons e com poder redutor, seja para se contrapor ao poder oxidante ou seja para viabilizar as vias biossintéticas. Enquanto o NADH funciona para gerar ATP na via metabólica principal de Embden-Meyerhof (VEM), o NADPH é produto da via das fosfato-pentoses (VFP).

É interessante notar que o mesmo motivo ADPR faz parte também da molécula de FAD (*flavina adenina dinucleotídeo*), coenzima semelhante ao NAD⁺, e da molécula de coenzima-A (CoA) que contém ainda o ácido pantotênico e o grupo sulfidril. O acetil CoA representa o papel chave no ciclo de Krebs e nas vias metabólicas de beta-oxidação e de neoglicogênese.

É mais interessante ainda notar que o motivo ADPR, assim como o ATP e o GTP, são variações de ribonucleotídeos, insinuando a pré-existência do mundo do RNA que serviu de base para o mundo atual do DNA. Outras insinuações são as presenças marcantes de RNA como inicializador da duplicação de DNA, como objeto da transcrição, como elemento integrador e regulador na tradução do código genético.

1.3 - SISTEMA DE MEMBRANAS: INTEGRADOR ONIPRESENTE

A organela mitocôndria representa uma célula procariótica vivendo em simbiose dentro de célula eucariótica, evidenciando a trajetória evolutiva e o nível de complexidade que separam esses dois sistemas biológicos. Tirando o volume, é o sistema de membranas que mais chama a atenção na célula eucariótica. Foi a existência de tal sistema de membranas que permitiu a alta relação superfície/volume, compatível com as interações precisas e rápidas entre os meios intra e extracelular. É interessante notar que o meio extracelular está em continuidade com o lúmen do retículo endoplasmático e do envelope nuclear.

Apesar das várias denominações, a estrutura básica é a mesma em todos os tipos de membrana nos compartimentos (membrana plasmática, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e envelope nuclear) e nas organelas membranosas (mitocôndrias, endossomos / lisossomos, vesículas secretoras, peroxissomos, cloroplastos, vacúolos e cavéolas): uma dupla camada lipídica com proteínas incrustadas.

1.3.1 - Composição lipoglicoproteica

A dupla camada **lipídica** é constituída pela justaposição de moléculas lipídicas anfipáticas (região hidrofóbica ou apolar e região hidrofílica ou polar), através de suas extremidades apolares. Em sua grande maioria, as moléculas lipídicas são fosfolipídios cuja porção hidrofóbica é constituída de duas cadeias de ácidos graxos ligadas à porção hidrofílica, geralmente glicerol fosfato. Outras moléculas lipídicas podem ser encontradas na membrana, tais como esfingolipídios, glicolipídios e colesterol. A fluidez da dupla camada lipídica é diretamente proporcional à temperatura, sendo que o colesterol atenua as variações na fluidez tanto em alta quanto em baixa temperatura. Por outro lado, o nível de saturação nas cadeias de ácidos graxos aumenta o ponto de fusão, permitindo estabilidade com o aumento de temperatura. A célula responde automaticamente às variações de temperatura, com a produção diferenciada dos componentes lipídicos da membrana (SHAI, 1995).

As células normais expressam os fosfolipídios com cargas negativas e positivas em igual quantidade. Já as células cancerosas, por exemplo, expressam, na folha externa da dupla camada lipídica, fosfolipídios carregados negativamente que geralmente passam a funcionar como marcadores para a ulterior destruição dessas células, efetuada por polipeptídios que se ligam aos fosfolipídios negativos.

A fluidez dos lipídios, permitindo rápida difusão lateral, indica que a natureza da membrana é mais para a de cristal líquido do que para a de estado sólido ou mesmo gelatinoso. Além da difusão lateral, existe também a possibilidade de difusão transversal, em movimento flip-flop provocado por enzimas chamadas flipases. Este tipo de movimento só tem sentido porque há alguma assimetria na distribuição dos componentes entre as folhas externa e interna da dupla camada lipídica.

Composição proteica

O ambiente lipídico da membrana, principalmente sua região interior hidrofóbica, representa o contraponto do ambiente aquoso com relação às mudanças conformacionais (*foldings*) das moléculas de proteínas. As interações entre proteínas e membranas, bem como as interações entre diferentes peptídios dentro do ambiente lipídico são essenciais praticamente para todos os processos celulares. Em ambiente aquoso, as mudanças conformacionais naturalmente ajustam as alfa-hélices e beta-fitas de tal forma que a molécula proteica tende a ficar com o cerne hidrofóbico e com a periferia hidrofílica. Em ambiente lipídico, tudo acontece ao contrário, de tal forma que uma proteína hidrossolúvel sofrerá alterações conformacionais substanciais para se inserir na membrana, enquanto uma proteína lipossolúvel naturalmente se comporta como uma proteína integral de membrana, assumindo sua conformação ativa ao se inserir na membrana.

Nas proteínas de membrana, em oposição aos domínios beta-fitas, há uma supremacia dos domínios alfa-hélices, e estes na sua forma anfipática, isto é, com a hidrofobicidade de seus resíduos variando periódicamente, de tal modo que os resíduos hidrofóbicos acabam se arranjando do mesmo lado ao longo da alfa-hélice, enquanto do outro lado se posicionam os resíduos hidrofílicos. Assim, uma alfa-hélice anfipática, ao longo do seu eixo, apresentará uma face apolar de um lado, em oposição a uma face polar do outro. A região hidrofóbica da bicamada lipídica, constituída pelas cadeias de ácidos graxos, tendo uma constante dielétrica baixa e não podendo formar pontes de hidrogênio, não pode interagir diretamente com a face polar das alfa-hélices. Por isso, sendo energeticamente inviável a inserção de uma única alfa-hélice desse tipo na membrana, as alfa-hélices são inseridas previamente agregadas com as regiões hidrofílicas voltadas para o interior.

Uma proteína de membrana, portanto, possui um domínio intramembrânico, constituído principalmente por alfa-hélices agregadas com as faces polares voltadas para

o interior, e os domínios extramembrânicos, extracelular e intracelular, cujas mudanças conformacionais seguem as mesmas tendências das proteínas hidrossolúveis. Há uma assimetria entre os domínios extramembrânicos: o extracelular é glicosilado (a glicosilação aumenta a capacidade informacional da cadeia polipeptídica) e funciona como região de reconhecimento para os estímulos físicoquímicos do meio, enquanto o intracelular é fosforilável (a fosforilação permite a ligação ON/OFF) e funciona como elemento de transdução na inicialização da rede de sinalização ou como elemento de adesão na integração das redes mecânicas do citoesqueleto e da matriz extracelular.

1.3.2 - Integração das redes biomoleculares

As diversas famílias de proteínas de membrana integram e coordenam, quer como proteínas monoméricas quer como poliméricas, as redes biomoleculares da célula, funcionando como elementos químicos, elétricos e mecânicos.

Os **elementos químicos** são os receptores de membrana ativados por ligantes provenientes do meio extracelular. No organismo dos metazoários (pluricelulares), o meio extracelular é o plasma sanguíneo que corre nas veias e banha as células, constituindo o assim chamado meio interno. Os ligantes que circulam no meio interno podem ser hormônios, fatores de crescimento, neuropeptídios e fatores imunológicos, todos fazendo parte da rede solúvel neuroendocrinoimunológica.

Geralmente os receptores proteínas tirosina-quinases funcionam para os fatores de crescimento e fatores imunológicos, enquanto os receptores associados a G-proteína funcionam para os demais hormônios, neuropeptídios e inclusive para os estímulos físicoquímicos dos receptores sensoriais. Os receptores representam os inputs para a rede de sinalização, constituída por uma teia de vias redundantes e de alta velocidade, cuja função é regular a resposta da rede gênica às solicitações do meio extracelular.

Os **elementos elétricos** são as bombas e os canais iônicos.

A bomba de próton garante o gradiente de H^+ para a ATPsintase que, por sua vez, se houver inversão no gradiente de H^+ , pode funcionar também como ATPase, hidrolisando o ATP para o transporte ativo de outros íons. Para transporte ativo, existem ainda as bombas de sódio/potássio (Na-K.ATPase) e de cálcio (Ca.ATPase).

Os canais iônicos podem ser dependentes de voltagem (canais de sódio, de potássio, de cálcio e de cloro, acionados imediatamente por variação de voltagem na membrana), dependentes de ligante (canais para os mesmos íons acima, acionados indiretamente após a ligação de um ligante ao seu receptor) e dependentes de tensão

(canais mecanorreceptivos ativados por proteínas do citoesqueleto tensionadas por integrinas por sua vez tensionadas por proteínas da matriz extracelular, estas por seu turno acionadas por estímulos mecânicos).

As bombas iônicas geram e mantêm, para determinada espécie iônica, um gradiente de concentração que, através da força difusional, origina num átimo uma força elétrica, em sentido contrário, que representa a contribuição dessa espécie iônica (potencial de equilíbrio) para a polaridade ou voltagem da membrana. O valor da voltagem da membrana regula de modo específico para cada espécie iônica sua condutância no respectivo canal. Por seu turno, variação no padrão das condutâncias de diferentes canais modula as variações de voltagem.

A bomba de sódio/potássio funciona de modo acoplado promovendo o efluxo de sódio e o influxo de potássio, mantendo o meio intracelular pobre em sódio e riquíssimo em potássio, enquanto o meio extracelular (plasma ou meio interno) permanece semelhante à água do mar, onde o sódio está em alta e o potássio em baixíssima concentração, indicando que a Na-K.ATPase transporta esses íons ativamente e contra o gradiente de concentração. Como essas condições são válidas para todo o organismo, as células em todos os tecidos estão submetidas aos mesmos gradientes de concentração para o sódio e para o potássio, significando que o valor do potencial de equilíbrio do sódio (E_{Na}) permanece constante, da mesma forma que o do potássio (E_K). No entanto, a polaridade da membrana (E_M) pode variar em diferentes tipos de células, embora em todas as células $E_M = E_{Na} + E_K$, porque em cada tipo de célula a relação entre as condutâncias ao sódio e ao potássio (gNa/gK) pode variar. Da mesma forma, no cérebro, neurônios podem gerar padrões de respostas diferentes, dependendo do padrão das condutâncias entre diferentes canais iônicos.

A nível subcelular, os elementos elétricos funcionam como transdutores eletroquímicos e eletromecânicos, principalmente os diferentes tipos de canais de cálcio cuja onipresença transformam essa espécie iônica em segundo mensageiro para quase todas as funções celulares.

A nível supracelular, os elementos elétricos geram os potenciais elétricos digitais (PA, potenciais de ação) e analógicos (PPS, potenciais pós-sinápticos e PG, potenciais geradores nos receptores sensoriais) que constituem a linguagem do sistema nervoso, que ativam o sistema muscular e modulam o funcionamento dos demais órgãos.

Os **elementos mecânicos** são as proteínas de membrana pertencentes à hiperfamília das imunoglobulinas que incluem, além dos receptores imunológicos, as integrinas e as moléculas de adesão.

As integrinas, em primeiro lugar, funcionam de modo semelhante aos receptores tirosina-quinases, com os quais superpõem sua ação na regulação das vias de sinalização, ao fosforilar o resíduo tirosina da proteína FAK (focal adhesion kinase) que por sua vez promove a fosforilação e agregação das proteínas quinases adaptadoras das vias de sinalização (YAMADA, 1995). Em segundo lugar, as integrinas, através da ação fosforilativa da FAK, formam também o complexo denominado de adesão focal constituído por proteínas do citoesqueleto, tais como vinculina, actina, actinina, talina, tensina, paxilina etc. Quando as integrinas são tensionadas por proteínas da matriz extracelular (lamininas ou fibronectinas), essa tensão, através do complexo de adesão focal, é comunicada ao citoesqueleto e à matriz nuclear, sendo esse processo ativado e regulado por proteínas GTPases da família Rho (superfamília Ras das vias de sinalização).

As moléculas de adesão, tendo como principal família a das caderinas, funcionam nos contatos de célula a célula. Na formação dos tecidos, células que expressam caderinas idênticas (homofílicas) se agrupam, caso contrário (heterofílicas) se repelem e migram. Diferentemente das integrinas, sendo o domínio intracelular das caderinas irrelevante, estas precisam de conexões (alfa, beta e gama cateninas) para a vinculação, através da vinculina, com o citoesqueleto (TAKEICHI, 1995). Tendo em vista tais diferenças, não é de se admirar que a adesão focal das integrinas seja ativada por TKs (proteínas tirosina-kinases) e inibida por TPs (proteínas tirosina-fosfatases), enquanto a adesão das caderinas seja ativada por TPs e inibida por TKs (BRADY-KALNAY, 1995).

As moléculas de adesão, através da vinculação com o citoesqueleto, formam junções especializadas entre células, tais como a junção adesiva, descrita acima, a junção oclusiva (*tight junction*) e a junção aberta (*gap junction*), além das junções com proteínas da matriz extracelular (KIRKPATRICK, 1995).

Além de interações com as vias de sinalização, o principal objetivo dos elementos mecânicos da membrana é integrar fisicamente as redes mecânicas da matriz extracelular com a do citoesqueleto e esta com a da matriz nuclear.

A matriz extracelular contém glicoproteínas (colágeno, laminina, fibronectina etc), proteoglicanas e glicosaminoglicanas. O citoesqueleto é constituído pela rede de

microtúbulos (alfa, beta e gama tubulinas) e de actina, além de proteínas motoras associadas (miosina, dineína e quinesina). A matriz nuclear ou nucleoesqueleto é formada por uma rede de lamínas e outras proteínas nucleares que dinamicamente se associam e dissociam á cromatina e ao envelope nuclear (BOUDREAU *et al.*, 1995).

1.3.3 - Rede mecânica tensionalmente integrada (*tensegrity*)

A um sinal gerado na matriz extracelular, toda a super rede mecânica responde como uma única estrutura tensionalmente integrada (*tensegrity*), isto é, como um continuum molecular de elementos mecanicamente independentes que se rearranjam, em vez de se deformarem localmente (INGBER, 1994). Esse modelo puramente mecânico de resposta imediata e global pode associar-se a modelos combinados de sinalização mecanoquímica e mecanoelétrica. O modelo mecanoelétrico é praticamente tão rápido quanto o modelo puramente mecânico, devido ao fato dos filamentos serem sensíveis a oscilações eletromagnéticas. O modelo mecanoquímico logicamente é mais lento do que o modelo puramente mecânico, mas seguramente muito mais rápido do que o modelo puramente químico, dependente apenas da difusão. Aliás, os sistemas biológicos não podem mais ser explicados só com os processos dependentes da difusão, segundo a equação de Michaelis - Menten. Em ambientes caracterizados como cristais líquidos (membranas) e estado sólido (redes mecânicas e complexos biomoleculares) deve-se levar em consideração a possibilidade de reações diretas entre moléculas que não se difundem (molecular channelling).

Nesse cenário de vias de sinalização redundantes e rápidas, a matriz extracelular é a reguladora eficiente e precisa da execução dos programas induzíveis contidos na rede gênica (ROSKELLEY, 1995).

Dos programas armazenados na rede gênica, um é constitutivo e três são indutivos. No programa constitutivo, a expressão dos genes é contínua e independente de alterações no meio externo: é o caso dos genes responsáveis pelas proteínas "housekeeping", como as das vias metabólicas e energéticas. Nos programas indutivos, a expressão dos genes depende de sinais do meio, emitidos pela rede da matriz extracelular. O programa de proliferação é acionado quando os sinais provenientes da matriz extracelular ativam os genes de ação imediata, ou oncogenes. Esses genes têm esse nome porque, ao sofrerem alguma mutação, tornam o programa de proliferação incontrolável, gerando câncer. O programa de diferenciação é acionado quando os sinais provenientes da matriz extracelular inibem os oncogenes e ativam fatores de transcrição

de genes específicos para o padrão de sinais (tipo de tecido). Por sua vez, os produtos desses genes vão reformular a composição da matriz extracelular, integrando a célula a essa nova realidade.

Existe ainda um programa de morte programada (apoptose) da célula, cujos genes responsáveis, geralmente produzindo proteases do tipo ICE (interleukin-1beta-converting enzyme), são acionados por falhas na sinalização, bem como pelo silenciamento ou destruição da matriz extracelular. Interessante é que a célula marcada para morrer é reconhecida e eliminada mesmo sem demonstrar processo de inflamação ou infecção.

1.3.4 - Vesículas transportadoras e regeneradoras

Além de integrar todas as redes biomoleculares com seus elementos químicos, elétricos e mecânicos, o sistema de membranas, em todos os seus compartimentos, é capaz de gerar com grande rapidez brotamento de vesículas que funcionarão como containers no transporte de massa de proteínas, bem como no processo dinâmico de desestruturação e reestruturação de membranas.

Na invaginação da membrana plasmática, do retículo endoplasmático ou das membranas interna e externa do envelope nuclear (endocitose), forma-se uma vesícula cujo interior era o exterior da célula e, logicamente, a sua folha interna era a folha externa da dupla camada lipídica da membrana inicial.

No citoplasma, as vesículas assim formadas podem se agregar para formar lisossomos ou podem funcionar como vesículas cis na formação do complexo de Golgi. A membrana do complexo de Golgi, por sua vez, pode sofrer evaginação, gerando vesículas trans que, transportadas até a membrana plasmática, se fundem com esta e liberam seu conteúdo para o meio extracelular (exocitose). Durante a divisão celular, todo o complexo de Golgi rapidamente se desfaz em vesículas, garantindo sua distribuição homogênea nas células filhas em cujo citoplasma é reconstituído pela fusão das vesículas. Observa-se que na fusão de vesículas cis ou na evaginação do complexo de Golgi (vesículas trans) é mantida a inversão da polaridade vesicular na dupla camada lipídica, inversão esta que só se desfaz na fusão da vesícula com a membrana plasmática. Em todas essas inversões, reais sob o prisma vesicular, permanece inalterada a interface de contato entre o citoplasma e a folha interna da membrana plasmática inicial.

No núcleo, o envelope nuclear também se desfaz durante a divisão celular,

através do processo de vesiculação, permitindo o posicionamento dos cromossomos na placa equatorial e a ulterior distribuição equalitária dos mesmos nas células filhas (GOLDBERG, 1995).

A eficiência com que as vesículas são formadas e a rapidez com que são transportadas dependem da ação respectivamente das GTPases, já referidas anteriormente, e das ATPases deslisantes sobre microtúbulos. Essas proteínas, embora de famílias diferentes, possuem semelhanças no domínio associado ao fosfato gama do GTP e do ATP (domínio P-loop). As proteínas motoras, deslisantes sobre microtúbulo, são a quinesina e dineína, semelhantes às miosinas que interagem com o filamento de actina.

O mecanismo responsável pela formação de vesículas é coordenado pelo já conhecido interruptor GTP/GDP. A GTPase ARF (*ADP-ribosilation factor*), enquanto ligada ao GDP, permanece em estado OFF e solúvel no citoplasma. Mas, ao ser ativada por um GEF (*GDP-GTP exchange factor*), se vê ligada ao GTP e passa para o estado ON. Neste estado, adere à membrana, deformando-a, e recruta para o local várias proteínas de um complexo protéico (*coatamer*) que, por sua vez, aprofunda a deformação até a formação da vesícula. Após a formação da vesícula, a proteína ARF, ativada por uma GAP (*GTPase-activating protein*), adquire atividade GTPásica e hidrolisa o GTP para GDP, retornando para o estado OFF. Com o retorno ao estado OFF, a vesícula se vê liberada dos complexos protéicos e então preparada para o processo de fusão com a membrana alvo (ROTHMAN, 1996).

O processo de brotamento de vesícula acima descrito é o dependente de COP (*coatamer proteins*). Existe também o processo dependente de clatrina no qual esse monômero, com forma geométrica adequada para formação de cúpulas geodésicas, forma complexos com regulação semelhante ao anterior.

No processo de fusão, são necessários outros complexos protéicos: NSF's (*N-ethylmaleimide-sensitive factors*) e SNAP's (*NSF attachment proteins*), ambos solúveis no citoplasma, mas recrutáveis para os locais de fusão pelos receptores SNAREs (*SNAP receptors*), presentes de modo específico tanto na membrana vesicular (receptor v-SNARE, tipo sinaptobrevina) quanto na membrana alvo (receptor t-SNARE, tipo syntaxina).

CAPÍTULO 2

DESCRIÇÃO PRELIMINAR DAS REDES BIOMOLECULARES

Os biopolímeros informacionais, pelas suas características entrópicas, se integram em *automata networks*, funcionando como autômatos moleculares cujas interconversões energéticas e informacionais são produzidas por processos de fosforilação e desfosforilação, viabilizados pelos ribonucleotídeos (ATP, GTP, NAD, FAD e coenzima A) que oferecem as bases para a formação das extensas redes biomoleculares, cuja visão integrada pode ser dada da seguinte forma:

uma **rede genética** com programa *default* cujo *output* expressa constitutivamente os genes comuns a todas as células do organismo (**rede metabólica** e de manutenção estrutural) e com um programa facultativo ou indutivo cujo *output* regula o ciclo celular com pontos de controle dependentes dos *inputs* trazidos pela **rede de sinalização** e, para os ajustes morfofuncionais adequados às fases do ciclo, dependentes da **rede mecânica** (citoesqueleto integrado à matriz extracelular pelos elementos mecânicos da membrana), de tal forma que em função desses *inputs* são definidos os destinos da célula que podem ser duplicação (proliferação), desenvolvimento embrionário (diferenciação), morte programada (apoptose) ou transformação (câncer).

Em analogia aos nossos computadores atuais, é como se a rede de sinalização atuasse a nível de *software* e a rede mecânica a nível de *hardware* sobre a rede genética, na definição do tipo de programa a ser executado, tendo como *default* o funcionamento permanente da rede metabólica.

2.1 – REDES BIOMOLECULARES

As interações entre biopolímeros para a formação de redes podem se viabilizar em função das propriedades físicoquímicas que permitem os processos de mudança conformacional, tendo a entropia como o equivalente energético da informação (item 1.1.4), de fosforilação e desfosforilação, permitindo ativação e inativação de componentes de vias fosforrelés (seção 1.2), bem como de estruturação do sistema de membranas, funcionando como integrador onipresente graças aos seus elementos

químicos, elétricos e mecânicos (seção 1.3).

2.1.1 – Rede metabólica

O *output* da rede metabólica termina na síntese da molécula de ATP cujo papel se destaca como fonte universal de energia, como doadora de grupos fosfato no processo de fosforilação e como substrato para a formação de AMP cíclico (cAMP) que, por sua vez, funciona como segundo mensageiro nas vias de sinalização (item 1.2.1).

Além do ATP, outros ribonucleotídeos funcionam como elementos de integração das vias de sinalização: o sistema GTP/GDP, como modulador da hiperfamília das proteínas GTPases (superfamília das G-proteínas heterotriméricas, sempre associadas à grande família de receptores heptaelicoidais na membrana, e superfamília Ras das G-proteínas monoméricas, elementos integradores de vias fosforrelés), com seus fatores GEF (*GTP/GDP exchange factor*), GID (*GDP dissociation inhibitor*) e GAP (*GTPase activated protein*), além de servir como substrato para formação de GMP cíclico (cGMP) que, por sua vez, funciona como segundo mensageiro (item 1.2.2); o sistema NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), como modulador do processo de ADP-ribosilação (ADPR) e como substrato para formação de ADPR cíclico (cADPR), além de funcionar como coenzima nas vias metabólicas propriamente ditas, juntamente com os sistemas FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e coenzima A (item 1.2.3).

2.1.2 - Rede de sinalização

A rede de sinalização, com toda sua redundância de divergências e convergências, incide sobre a maquinaria do ciclo celular, cuja evolução temporal se faz às custas de transformações morfofuncionais na cromatina, cerne da rede genética, executadas pela rede mecânica e reguladas pelo sistema CDK (*ciclin dependent kinases*) associado ao sistema proteolítico ubiquitina-dependente.

Dois elementos contribuem de forma preponderante para o funcionamento integrado da rede de sinalização: a) a presença universal do íon cálcio como intermediário (segundo ou terceiro mensageiro) em todos os mecanismos celulares e b) a presença marcante da proteína G heterotrimérica (sub-unidades alfa, beta e gama) como *switch* na transdução de sinais provenientes do meio extracelular, trazidos pelo receptor heptaelicoidal associado (serpentinico).

Em que pese sua predominância, além do sistema receptor associado à proteína G, como inicializador das vias de sinalização, existem também os receptores tirosina-

quinases, os receptores serina/treonina-quinases e os receptores intracelulares cujos ligantes, por serem lipossolúveis, atravessam a membrana indo acionar diretamente fatores de transcrição.

Receptor associado à G-proteína

A visão tradicional linear, em que um receptor ativa uma proteína G, é inadequada para tratar a complexidade do assunto e não mais condiz com os dados mais recentes (GUDERMANN, 1997, NURNBERG, 1996).

Para começar, existem mais de cem subtipos de receptor heptaelicoidal e um número muito maior de subtipos de proteína G. Os receptores são montados por autoassociação ou com ajuda de moléculas babás (chaperoninas), a partir de unidades (hélices) estáveis com dobramento (*folding*) independente, num processo de coexpressão gênica, permitindo grande variedade de recombinações e até mesmo correções competitivas, no caso de truncamento e falha no dobramento (*misfolding*). A superfamília das G-proteínas heterotriméricas é classificada em quatro famílias, segundo a natureza da subunidade alfa: Gs, Gi, Gq e G12. Na verdade existem 23 tipos de subunidade alfa, 6 de beta e 11 de gama que combinados podem originar cerca de 1000 subtipos de proteína G.

Como visto no item 1.2.2, o receptor funciona como GEF ao ativar a subunidade alfa separando-a do dímero beta-gama que, por sua vez, funciona como GDI competindo com a ação ativadora do receptor, enquanto as enzimas efetoras (ciclases e fosfolipases) funcionam como GAPs (GUNDERMANN, 1997, BREZINA, 1996).

Receptor mGlu como base molecular da memória neural

A substância glutamato, o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC, ativa vários tipos de receptores que são classificados em a) *ligand-gated ionotropic channels* (NMDA, AMPA e kainate) e b) *G protein-coupled metabotropic receptors* (mGlu). Destes receptores, são conhecidos oito tipos subdivididos em três classes, de acordo com suas características farmacológicas.

Aprendizagem é a modificação do comportamento pela experiência, enquanto memória é a retenção dessas modificações. Para que essas duas etapas ocorram, deve haver diferenciação da relação ruído/sinal bem como a eliminação da informação irrelevante e a amplificação da relevante. Isto é feito pelos receptores mGlu.

A formação da memória é bloqueada pelo tratamento *pre-training* com agonistas

e antagonistas, ao passo que é amplificada pelo tratamento *post-training* com agonistas.

Na infinidade de estímulos a que somos submetidos, quando vivenciamos uma cena ou somos submetidos a uma experiência, a imensa população de neurônios sensoriais são ativados de tal forma que subpopulações, respondendo de modo específico a mesmas características do estímulo, passam a disparar sincronizadamente de acordo com seu padrão global de condutâncias nos seus canais iônicos. Os disparos sincronizados de muitos neurônios se somam gerando um campo elétrico externo (onda no EEG) que, por sua vez, sincroniza outras áreas. Assim, cada instante motivante ou traumático da cena “congela-se” num tipo de circuito único e irrepitível, envolvendo milhões de neurônios, cada um, além de outros *inputs* e *outputs*, com um padrão característico de resposta dos receptores mGlu. E, mais incrível ainda, as alterações de curta duração nas sinapses entre esses neurônios poderão passar a memória de longa duração, na medida em que houver ativação da transcrição: pre-sinápticamente resulta em *cell-wide* LTM (*long-term memory*), enquanto pós-sinápticamente em *specific-synapse* LTM. Na formação de LTP (*long-term potentiation*) têm participação ativa os canais de glutamato ligante-dependentes (NMDA).

Receptores intracelulares

Os ligantes neste caso são os hormônios esteróides, derivados do colesterol: corticóides, sexuais, tireoideanos, retinóides (vitamina A) e vitamina D. Como são lipossolúveis, atravessam a membrana plasmática e vão diretamente ao núcleo onde se ligam a um receptor cuja função já é de um fator de transcrição, um HRE (*hormon receptor element*). Esse HRE tem como inibidor da sua ação sobre o DNA uma HSP (*heat-shock protein*) cuja inibição é retirada com a ligação do hormônio. O HRE liberado ativa um gene de ação imediata cujo produto será uma proteína primária que, por sua vez, tanto pode inibir o seu gene imediato quanto pode ativar um novo gen secundário. Logicamente, nem o HRE e nem a proteína primária, como fatores de transcrição que são, podem atuar isoladamente, já que os fatores de transcrição atuam em complexos combinatórios, com elementos trans ativadores e silenciadores sobre os elementos cis do gene.

Os esteróides são os hormônios de ação mais rápida, já que trafegam numa via direta, e ao mesmo tempo são os que permanecem por mais tempo na circulação porque, sendo insolúveis em água, estão sempre associados a proteínas transportadoras.

Receptores tirosina-quinases (RTK)

A característica marcante desses receptores é a autofosforilação conseguida pela dimerização que ocorre quer pela ligação de dois ligantes, um para cada receptor, quer pela ligação de um mesmo ligante a dois receptores. Na formação do dímero, uma molécula serve de babá (chaperonina) para outra nas alterações conformacionais, aumentando o tempo de interação e por conseguinte a afinidade entre o ligante e o receptor, de forma independente das relações estequiométricas, e as suas fosforilações cruzadas. Essa tendência a autoagregação se propaga a outras moléculas adaptadoras com domínio SH2 e SH3, tanto para moléculas adaptadoras, sem atividade catalítica da família *Srb*, quanto para moléculas com atividade tirosina-quinase, da família *Src*. Uma grande variedade de moléculas adaptadoras faz convergir as vias de sinalização sobre a proteína *Ras* que inicia a via direta (*core network*) da cascata *MAPK* (*mitogen-activating protein kinases*). A família *Ras*, abastecida por proteínas *G* monoméricas, além de contribuir para levar o sinal até o núcleo, tem atuação também sobre a organização do citoesqueleto e o tráfego de vesículas através respectivamente das proteínas *Rho* e *Rab*. Ao final dessa cascata, à semelhança dos hormônios esteróides, há ativação simultânea de genes imediatos (oncogenes), por exemplo *fos* e *jun*, para a produção de proteínas primárias que se agregam em uma estrutura, conhecida como complexo de transcrição *AP-1*, para ativar outros genes secundários.

A tendência de agregação se acentua nos receptores de célula *T* (célula imunológica produzida no tímo) e de célula *B* (célula imunológica produzida na medula óssea, descrita pela primeira vez na *bursa fabbrizzi* das aves), atingindo o máximo na adesão focal (*FAK: focal adhesion kinases*) que se manifesta na ativação das integrinas e das *CAMs* (*cell adhesion molecules*) para integração da rede mecânica que será conceituada em item posterior.

Sofisticação dos receptores imunológicos

O receptor da célula *T* (*TCR*), além do receptor propriamente dito (subunidades alfa, beta e gama), possui outras subunidades agregadas. Destas, a melhor conhecida e talvez a mais importante é a *CD4* (ou *CD8*) cujo papel lembra a dimerização dos receptores tirosina-quinases.

Os linfócitos *Tc* (citotóxicos) percebem a infecção de uma célula ao *escanear* a superfície desta em busca de peptídeos virais ou bacterianos, previamente proteolisados no interior e apresentados na superfície em associação com moléculas *MHC1* (*major*

hystocompatibility complex 1) da própria célula. No complexo peptídico-MHC1, o peptídeo representa o elemento estranho (*non self*) e a molécula MHC1 representa o elemento próprio (*self*). Qualquer que seja a identidade de um complexo peptídeo/MHC, sempre haverá uma célula T com um receptor específico para reconhecê-lo.

Os linfócitos Th (*Helpers*) fazem a mesma coisa, só que em vez de célula infectada *escaneam* células B que expressem na superfície um complexo peptídeo/MHCII. Logicamente os genes que expressam as moléculas MHCII são diferentes daqueles que expressam MHCII. A origem dos peptídeos também difere. Na célula B os peptídeos se originam de um antígeno que foi reconhecido especificamente por um receptor IgM (imunoglobulina de membrana), absorvido por endocitose e processado para posteriormente ser apresentado na superfície em associação com moléculas MHCII. O objetivo da célula B é produzir um anticorpo (imunoglobulina solúvel) com afinidade máxima pelo antígeno previamente reconhecido e processado. No entanto, essa produção só ocorrerá se a célula B for ativada pela célula Th como consequência do reconhecimento, feito pelo receptor CTRh, do complexo peptídeo/MHCII apresentado pela célula B.

Para atingir essa sofisticação na capacidade de reconhecimento de qualquer identidade de *non self* comparando-a ao mesmo tempo com a única identidade do *self*, a população de células T passa por um rígido processo de seleção positiva e negativa, de tal forma que 97% da população desaparece, entre o córtex e a medula do timo, por morte programada (apoptose).

A variedade de receptores (TCR ou IgM) produzidos na população de linfócitos é da ordem de 10 elevado a 15, muito maior do que o número de genes no genoma humano (da ordem de 10 elevado a 5)! E o mais incrível é que essa variedade surge de apenas 3 genes.

A seleção natural conseguiu esta proeza criando, para cada gene, várias repetições das regiões V, J e D com sequências estratégicas de DNA entre elas, favorecendo-lhes recombinações. Este arranjo no genoma, ainda presente na célula germinativa, é rearranjado no processo de maturação dos linfócitos, de tal modo que, sob ação das enzimas recombinases, é extremamente grande o número de mRNAs diferentes com cópia única de cada região.

Evidências recentes de inibição via proteínas SHP e SHIP

SHP é uma família de proteínas que, além do domínio SH2 característico das

moléculas adaptadoras, contêm um domínio tirosina-fosfatase (SHP) ou um domínio inositol -fosfatase (SHIP). As proteínas SHP, por possuírem um domínio fosfatase, ao ligarem-se a receptores tirosina-quinases previamente ativados por fosforilação, passam a conferir uma capacidade inibidora ao conjunto.

Quando a produção de imunoglobulina pela célula B ultrapassa um certo nível, os fragmentos de imunoglobulina com afinidades diferentes em relação ao mesmo antígeno, conhecidos como receptores Fc e sIg, criam um *feedback* negativo informando a célula de que o nível adequado já foi atingido. Uma célula NK (*natural killer*) reconhece e destrói uma célula alvo marcada com anticorpo; no entanto, se a célula alvo expressar moléculas MHC I, o receptor KIR (*killer inhibitory receptor*) as reconhecerá e a destruição será evitada. Uma célula T é ativada ao ligar-se a uma célula apresentadora de antígeno (APC, semelhante a célula B, ver acima) e como consequência passa a produzir citocinas e a expressar o receptor inibitório CTLA-4 que gera um *feedback* negativo afim de evitar a hiperativação da célula T.

2.1.3 – Rede mecânica

No item 1.3.2, após a descrição dos elementos mecânicos da membrana, foi sugerido como esses elementos operam a integração entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, até a canalização dos *inputs* do meio sobre os elementos da rede genética. No item 1.3.3, foi visto que o papel da rede mecânica, tradicionalmente relacionado apenas aos aspectos estruturais do citoesqueleto, cada vez mais adquire relevância morfofuncional, na medida em que se reconhece que essa rede responde como uma única estrutura tensionalmente integrada, gerando *tensegrity* (INGBER *et al.*, 1993, INGBER, 1994, 1998, TUSZYNSKI *et al.*, 1995, 1997). Nos processos morfogenéticos, a relevância da rede mecânica é de tal monta que a matriz extracelular, de onde partem os *inputs* e para onde retornam os *outputs*, já está sendo chamada como o órgão da forma. De fato, a matriz extracelular coordena a integração estrutural e funcional entre células de diferentes tecidos, desde a formação de junções sinápticas até a formação de membranas basais.

A matriz extracelular, integrada à rede citoesquelética pelos elementos mecânicos da membrana (integrinas e moléculas de adesão), é fabricada pela respectiva célula e possui como principal componente as fibras de colágeno, além de proteoglicanas, lamininas, fibronectinas etc. Como consequência do fluxo bidirecional de informação entre a matriz extracelular e a rede genética, é daquela que partem os

sinais de indução que levam á morfogênese, promovendo a adequação contínua das modificações intracelulares sintonizadas com aquelas que ocorrem no domínio extracelular. Assim, os mesmos elementos da matriz extracelular vão servindo de base para estruturas variáveis como malha cristalina de apatita nos ossos, cordas e tiras nos tendões, folhas tecidas na pele, membrana de filtração nos glomérulos e outros suportes estruturais pelo corpo.

Existe uma íntima ligação entre o cito e o nucleoesqueleto, bem como entre esses dois e o sistema de membrana (membrana nuclear como continuidade da membrana plasmática intermediada pelo retículo endoplasmático e sistema de Golgi) que, com seus elementos químicos, mecânicos e elétricos, integra e coordena a rede mecânica e a rede de sinalização.

Os componentes do citoesqueleto são os microtúbulos (treze protofilamentos que se polimerizam a partir de dímeros globulares de alfa e beta tubulina), os filamentos de actina (filamento bicilicoidal que se polimeriza a partir de monômeros globulares de actina), filamentos intermediários (complexo em malha filamentosa que se polimeriza a partir de monômeros lineares de lamina) e proteínas motoras (miosina, cinesina e dineína).

Esses mesmos elementos se organizam na sofisticada unidade contrátil (sarcômero) da célula muscular e distributivamente são responsáveis pelos diversos mecanismos de mecanotransdução (tato, audição, otequilíbrio e osmoregulação, tendo nesses casos os canais iônicos *stretch activated* como elementos principais).

O citoesqueleto, além das funções tradicionalmente consideradas, é hoje reconhecidamente o sistema responsável, em associação com o sistema de membrana, pelas transformações morfofuncionais da cromatina durante a progressão do ciclo celular.

Assim, sob a inovação da visão bioinformacional, a rede mecânica passa a ter um papel não só estrutural mas principalmente dinâmico, entre as demais redes epigenéticas, no controle do fluxo de informação genética, bem como contribui para a complementação da bioquímica pela bioinformática e da biologia molecular pela engenharia molecular (item 1.3.4).

2.1.4 – Rede genética

Os elementos essenciais da rede genética, na visão linear do dogma central da Biologia Molecular, estão representados por molécula de DNA com potencialidade para

auto-replicação e para transcrição, sendo que nesta última função são produzidos os tipos de RNA que coordenarão a tradução, ou seja, a síntese de proteínas. No entanto, para que o fluxo unidirecional de informação genética predito pelo dogma central possa funcionar, tem que se admitir a existência de proteínas organizadoras e modificadoras da molécula de DNA na cromatina, bem como de proteínas formadoras dos complexos nucleoprotéicos para catalisar os processos de duplicação, transcrição e tradução. Assim mesmo, a unidirecionalidade só pode existir no processamento de programa constitutivo, já que é exigida retroalimentação de via epigenética para o processamento de programa indutivo (item 1.3.3).

Transformações morfofuncionais da cromatina

Durante a mitose, em que o núcleo celular não mais existe (vesicularizou-se) e os cromossomos duplicados estão condensados, tendo alças de cromatina presas à estrutura central (SARs ou *scaffold attachment regions*), a rede microtubular se organiza a partir dos centríolos, já separados em polos opostos. No equador da célula, um par de microtúbulos se liga no cinetócoro, constituído por regiões situadas nas antípodas do centrômero (a parte central do cromossomo). A polimerização dos microtúbulos é organizada pelo complexo MTOC (*microtubule organization center*) que reduz a concentração necessária das subunidades alfa e beta, tendo a subunidade gama como inicializadora, e conferindo polaridade ao filamento: *minus end* no MTOC e *plus end* na periferia.

O centrômero, à semelhança da região terminal do cromossomo denominada telômero, é uma região altamente condensada de heterocromatina, com número elevado de repetições de pares de bases (satélite) que funcionam como elementos *cis* para coordenar os elementos *trans* (proteínas centroméricas e associadas ao microtúbulos) na ligação do microtúbulo ao cinetócoro.

Na fase da mitose e meiose em que há separação dos cromossomos (anáfase), o complexo APC (*anaphase promoting complex*) define a saída da **mitose** coordenando a separação do centrômero, após a ubiquitinação e proteólise das proteínas centroméricas. Nesse ponto de controle (*checking point*) pode ocorrer desvio para a **meiose** quando certas proteínas, provavelmente homólogas das enzimas de reparo do DNA, passam a inibir o complexo APC e a ubiquitinação, dando progressão ao processo. Na formação do fuso e na separação dos cromossomos, além das interações cinetócoro-microtúbulos, interagem também as proteínas motoras (McKIM, HAWLEY, 1995).

No final da anáfase, forças aplicadas localmente pelos microtúbulos sobre o cinetócoro levam a uma polarização global do núcleo, já feito na interfase, estando os cromossomos orientados com o centrômero numa extremidade e os telômeros em outra.

Ao plano da configuração conhecida por Rabl pode superpor-se emparelhamento simétrico de algumas regiões entre homólogos, com forças locais gerando aproximação e afastamento entre *loci*, podendo ocorrer ainda ligações de regiões da cromatina ao envelope (membrana) nuclear, originando um posicionamento radial global de *loci*. Assim, como consequência do citoesqueleto em fases anteriores, durante a interfase estabelece-se *a high degree of large scale order in the nucleus, indicating that the position of each gene within the nucleus is not random* (MARSHALL *et al.*, 1997).

Na interfase, portanto, não existindo mais cromossomo com estrutura central, as alças de cromatina se prendem ao envelope ou à matriz nuclear (MARs ou *matrix attachment regions*). Ao contrário das SARs (*scaffold attachment regions*) que estabilizam a heterocromatina em grande escala, as MARs estão associadas a domínios funcionais da eucromatina como a ORIs (origens de replicação) e a regiões reguladoras ou elementos cis de transcrição (promotor, amplificador e silenciador) aos quais se ligam os fatores de transcrição ou elementos trans.

Tal organização em grande escala (*large-scale order*) no núcleo oferece a possibilidade de ativação da cromatina (*chromatin switch*) e de organização hierárquica das regiões cis no DNA, de tal forma a enuclearem os elementos trans na formação dos complexos nucleoprotéicos controladores do ciclo celular (BODNAR *et al.*, 1996, BODNAR, 1997, ALLSHIRE, 1997).

Sistema ciclina-cdk

Todas as transições no ciclo celular dependem do sistema **ciclina-cdk** (cdk ou *cyclin-dependent kinase*). A ciclina é produzida de forma intermitente durante o ciclo celular. Quando presente, só o fato de ligar-se a uma cdk já ativa o sistema (estado ON) tornando-o apto para fosforilar substratos. O estado OFF é restabelecido com a destruição da ciclina, realizada no complexo proteossômico após ser marcada para a destruição pela ubiquitina.

Existe uma outra maneira para estabelecer o estado OFF sem destruição da ciclina: é a sua ligação a um inibidor específico, mantendo o sistema ciclina-cdk desativado. Logicamente, neste caso, a ubiquitinação e ulterior destruição do inibidor restabelecerá o estado ON. A proteólise por ubiquitinação, característica do sistema

ciclina-cdk, caracteriza também a regulação dos pontos de checagem do ciclo celular.

Com uma meia dúzia de genes para cada molécula, o sistema ciclina-cdk oferece uma base combinatória suficiente para o número muito maior de combinações entre os fatores do complexo de transcrição, por sua vez ativados combinatoriamente pela convergência de *inputs* das vias de sinalização. Mesmo se os cem mil genes das células humanas fossem ativados concomitantemente, bastariam que não mais de dez fatores de transcrição formassem um complexo em que todas as possibilidades de associação dos fatores, cinco a cinco, fossem consideradas. Supondo que menos de 10% sejam ativados de modo permanente em todas as células e outros 10% sejam ativados de modo específico em cada tecido, significa que 90% dos genes, se combinados em conjuntos de dez mil para os diversos tecidos, ofereceriam uma base de diversificação muito grande para a diferenciação e especialização dos tecidos.

Além do processo geral de fosforilação e do mais restrito de glicosilação de proteínas, no contexto da cromatina existem os importantes processos de metilação e de acetilação.

A metilação é feita diretamente sobre bases do DNA, enquanto a acetilação é feita sobre resíduos positivos na cauda N-terminal das histonas, tendo efeitos opostos sobre a abertura do acesso à molécula de DNA. O mais interessante é que agora está se descobrindo que os fatores de transcrição e as proteínas do complexo de duplicação podem ser as próprias enzimas responsáveis por acetilação (desacetilação) ou por metilação (desmetilação).

A abertura do acesso ao DNA, através da acetilação e desmetilação, durante os processos de transcrição ou de duplicação, é feito no contexto da eucromatina que se organiza difusamente no núcleo interfásico, sendo caracterizada pela presença das MARs.

O fechamento do acesso ao DNA é feito com a condensação da heterocromatina durante a mitose (meiose), iniciando-se com a desacetilação que reforça o empacotamento das histonas nos nucleossomos e com a metilação que funciona como ponto de atração para as proteínas do arcabouço cromossômico, sobre o qual se fixarão as SARs (*scaffold attachment regions*).

Dosage compensation no cromossomo X:

Um exemplo de regulação cromatínica em grande escala

Se numa espécie é possível a fêmea apresentar mais cromossomo X do que o

macho, é porque existe um mecanismo para equalizar, em cada indivíduo, o nível de expressão gênica nesses cromossomos.

No verme nematódio, os dois Xs da fêmea são inativados parcialmente através da proteína DPY27, da família das SMC (*segregation mitotic complex*), que coordena a condensação da heterocromatina e a consequente inativação dos genes vizinhos (PEV, *position effect variegation*).

Na mosca drosófila, o único cromossomo X do macho é ativado por hiperacetilação e hipometilação, aumentando o nível de expressão gênica.

Nos mamíferos, um cromossomo inteiro da fêmea é inativado através de um mecanismo mais sofisticado: o RNA transcrito do gene Xist, em vez de traduzir a proteína correspondente, liga-se em *cis* à região Xce do DNA, iniciando a agregação dos fatores silenciadores que se espalham por todo o cromossomo.

O processo de inativação do cromossomo X é a ampliação da influência repressiva já existente na heterocromatina centrossômica e telomérica: fatores silenciadores, como as proteínas SIRs ligadas à cauda das histonas H3-H4, avançam sobre genes vizinhos causando a PEV.

2.2 – DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO

Todas as células de um organismo, apesar da diferenciação e da especificidade que apresentam em cada tecido, possuem os mesmos tipos de redes biomoleculares que já estavam presentes na célula-ovo ou zigoto inicial.

Todas as células humanas, por terem se formado a partir de uma célula ovo original (ontogenia), possuem os mesmos cem mil genes presentes no genoma humano. No entanto, as células em cada tecido expressam menos de vinte mil desses genes, dos quais cerca da metade se expressa em todas as células do organismo, de modo constitutivo ou permanente (*housekeeping genes*), enquanto a outra metade se expressa de modo específico para cada tipo de tecido, de modo facultativo ou indutivo, em função de sinais provenientes do meio, através da matriz extracelular.

Por mais especializada que seja uma célula humana, ou por mais sofisticado que seja seu *output*, ela representará sempre o resultado da integração das mesmas redes biomoleculares existentes em outras células aparentemente mais primitivas e mais simples. E ainda, assim como a integração das redes biomoleculares mantém a homeostasia da célula, da mesma forma a integração das redes celulares, a seu tempo formadas por interações entre redes biomoleculares, mantém a homeostasia do organismo.

2.2.1 – Ovulação e fertilização

O óvulo, ainda na forma de oócito, fica estacionado na metáfase da segunda divisão meiótica, diferentemente do espermatozóide cuja meiose se completa. Nessa fase, embora a transcrição seja impossível (a cromatina das duas cromátides está condensada nas SARs ligadas ao arcabouço sinaptonêmico comum), os mRNAs existentes podem ser traduzidos e expressar suas proteínas correspondentes, através da integração das redes biomoleculares anteriormente descritas.

Mecanismos precisos de regulação da tradução definem os mRNAs destinados à ativação ou repressão, gerando diferentes gradientes de proteínas que passarão a funcionar como morfogênicos. Os *inputs* para o oócito provêm da matriz extracelular, compartilhada por outras 15 células auxiliares (*nurse cells*) consituíntes do folículo, entre as quais se reorganiza a rede mecânica comum, com interconexões compartilhadas por CAMs (*cell-adhesion molecules*), SAMs (*substrate-adhesion molecules*) e CJMs (*cell-junction molecules*). Apenas três tipos de sinais são suficientes para definir as

polaridades dos eixos A/P (anteroposterior) e D/V (dorsoventral) do óvulo, ainda antes de sua fertilização. O eixo D/V é definido por um sinal ventralizador gerado pelas células do folículo. O eixo A/P é definido por dois morfogênios resultantes da transcrição de mRNAs dos genes *nanos* e *bicoid*. Apesar desses mRNAs se distribuírem uniformemente pelo interior do óvulo, suas proteínas (morfogênios) correspondentes acabam se concentrando em polos opostos, já que uma proteína inibe a tradução da outra.

Na fertilização se manifesta o poder integrador da membrana, quer com sua capacidade de vesiculação, quer com seus elementos integradores da rede mecânica, capaz de gerar instantaneamente a *tensegrity*. Coordenada pelo citoesqueleto, principalmente pelas fibras de actina, ocorre a exocitose das vesículas acrossômicas do espermatozóide, resultando na destruição das pontes de hidrogênio da matriz extracelular do óvulo e na ulterior fusão entre as membranas dos dois gametas. Com a fusão provocada pelo primeiro espermatozóide, a rede mecânica instantaneamente se reorganiza, gerando o estado de *tensegrity* que impedirá a polispermia, ou a penetração de outros espermatozoides.

Após a fertilização, os mRNAs maternos continuam coordenando de modo epigenético a primeira segmentação do zigoto até que, a partir da segunda segmentação, o genoma zigótico passa a controlar o relógio do ciclo celular.

2.2.2 – Diferenciação e inibição lateral

Como ficou evidenciado para os morfogênios *nanos* e *bicoid*, os gradientes morfogenéticos funcionam como um equipamento molecular capaz de informar a cada célula sua posição no espaçotempo do embrião, além de a cada instante redefinir seu estado morfofuncional, em função do padrão de interações entre suas SAMs e a matriz extracelular, bem como entre suas CAMs e CJMs com as respectivas moléculas de células vizinhas. Assim, na crescente população de células do embrião, vão se formando subpopulações de células que se ligam ou se repelem em função do grau de homofilia ou heterofilia entre suas moléculas de adesão, representadas principalmente pela família das caderinas. Desta forma se estabelece um mecanismo de inibição lateral, pelo qual uma população de células com um padrão típico de interações (*default fate*) interage com células de população vizinha diferente, inibindo-as e impedindo-as de seguirem o mesmo destino na diferenciação (COLLIER *et al.*, 1996).

Um mecanismo de inativação lateral é produzido pela interação do receptor de

membrana *notch* com o seu ligante *delta*, também receptor de membrana em outra célula. Na mesma célula, a atividade de *notch* inibe a atividade de *delta*, enquanto a inatividade de *delta* desinibe a atividade de *notch*. Na interação intercelular, a atividade de *delta* (célula A) ativa *notch*, enquanto a inatividade de *delta* (célula B) inativa *notch* (célula A). O nível de ativação de *notch* reflete a intensidade da inibição que a célula B recebe da célula A, inversamente proporcional à inibição que a célula B liberará para a célula A.

A partir da segunda divisão celular, com a degradação dos mRNAs maternos, o genoma zigótico passa a comandar o padrão corporal do embrião, sob o controle preciso da família dos *Hox genes* (**H**omeobox-containing genes), graças à colinearidade desses genes no cromossomo que os atrela a um rígido padrão espaço-temporal de expressão, bem como a uma grande sensibilidade a determinados fatores, como o ácido retinóico. Não é de se estranhar o papel do ácido retinóico porque, como hormônio lipossolúvel, tem como seu receptor nuclear uma proteína da superfamília dos *Pax genes* (**P**aired **b**ox) que engloba a família dos *Hox genes*.

Os *Hox genes*, das regulações acima, podem regular sua própria transcrição na medida em que suas próprias proteínas, como fatores *trans*, podem se ligar aos elementos *cis* da região promotora de seus próprios genes. Com a atuação em circuitos com códigos combinatórios, esses genes geram os gradientes morfogenéticos que se refletirão na segmentação do embrião em regiões chamadas de somitos, e na metamerização precursora da estrutura final do tecido. E ainda mais, esses genes codificam os fatores de transcrição da família bHLH (*basic helix-loop-helix*) que ativam os genes historreguladores que, por sua vez, ativam os genes estruturais específicos para cada tecido.

A família dos *Hox genes* serve como reforço da hipótese segundo a qual as redes biomoleculares das células atuais são qualitativamente as mesmas das células primitivas, tornando-se apenas quantitativamente enriquecidas por amplificação nas famílias de genes. De fato, o único gene da célula ancestral se triplicou nas células de invertebrados, passando a um módulo de uma dezena nos cordados inferiores, módulo esse que aparece quadruplicado e em cromossomos diferentes nos vertebrados.

2.2.3 – Indução e morfogênese das redes celulares

Populações diferentes de células interagem entre si, induzindo variações no estado padrão de interação entre a matriz extracelular (MEC) e as moléculas de adesão

(CAMs e SAMs), e, como consequência, no padrão da expressão gênica. Os primeiros passos para a diferenciação são dados com a formação de epitélio primitivo onde predominam as interações de moléculas de junções intercelulares (CJMs), com possibilidade de reversão ao tecido indiferenciado do estágio inicial (mesênquima), até a aquisição da estabilidade definitiva de tecido epitelial.

A célula epitelial padrão, polarizada tanto a nível estrutural (membrana apical com microvilosidades e membrana basolateral com junções e transportadores específicos) quanto a nível funcional (polaridade elétrica transmembrana e trancelular), possui eficiente e flexível sistema de transportadores e cotransportadores iônicos, permitindo regulação desde a produção de HCl no estômago, passando pela absorção intestinal até a depuração do filtrado glomerular nos túbulos renais.

Processo semelhante acompanha as fases da morfogênese da musculatura estriada, desde as células mesenquimais precursoras, passando pela manutenção do programa de diferenciação no ciclo celular e pela diferenciação da parte muscular do somito, conhecida como miótomo, graças à indução produzida por *Hox genes* vizinhos. Regulados pelas interações intercelulares entre moléculas de adesão, os miócitos se fundem para a formação da fibra muscular sincicial (multinucleada). A seguir, seus diversos núcleos passam a ativar de forma integrada os genes estruturais que produzirão as proteínas específicas (actina, miosina, troponina, tropomiosina etc) para a constituição do sarcômero.

Após a complementação morfofuncional da fibra muscular esquelética, a matriz extracelular entre a fibra muscular e os terminais axônicos coordena todas as etapas para a formação da junção neuromuscular, evidenciando que a integração histológica entre os dois sistemas é bidirecional, uma vez que os sinais viajam do músculo para o nervo e vice-versa.. A nível orgânico a bidirecionalidade se acentua, dada a existência de proprioceptores no músculo (fuso muscular e órgão tendinoso de Golgi), gerando retrocontrole sobre os neurônios motores: o fuso muscular, em paralelo com as fibras do músculo, gera *feedback* negativo sobre o neurônio motor em resposta a estiramento, enquanto o órgão tendinoso de Golgi, em série com o músculo correspondente, gera *feedback* positivo sobre o neurônio motor em resposta a contrações. Sofisticando ainda mais o sistema de retroalimentação, existem neurônios eferentes (γ) inervando fibras intrafusais, bem como a existência, em cada articulação, de pares de músculos flexores / extensores que permitem geração de padrões locomotores precisos, graças aos complexos circuitos de ativação e de inibição cruzada, ipsilateral e contralateral.

A junção miotendinosa, além da retroalimentação exercida sobre o músculo, opera também a integração musculoesquelética, através dos tendões que, na verdade, nada mais são do que fibrócitos espalhados pela rede da matriz extracelular, tendo feixes de colágeno e elastina como principais constituintes. A rede da matriz extracelular no tendão se interdigita com o músculo, de um lado, e, de outro, mergulha-se na matriz extracelular óssea, que é uma malha cristalina sendo depositada sobre os componentes convencionais.

Na musculatura estriada cardíaca, a sinalização elétrica, gerada intrinsecamente por células marcapasso e modulada pelo sistema nervoso, precede e aciona a contração do coração que, devido a condições isovolumétricas, gera pressão hidrostática suficiente para impulsionar o sangue para a grande e pequena circulação. Nos capilares sanguíneos e alveolares, a integração entre pressão hidrostática e osmótica regula a interface entre o tecido sanguíneo, o meio interno e os demais tecidos.

2.3 – EVOLUÇÃO FILOGENÉTICA

As redes biomoleculares que existem nas células humanas são as mesmas existentes, não só nas células eucarióticas de seres filogeneticamente mais simples, como mosca, verme e fungo, mas também nas procarióticas. Em última análise, essas mesmas redes já existiam, como *core networks*, na célula ancestral universal do mundo do DNA.

2.3.1 - Passagem de célula procariótica a eucariótica

À primeira vista, olhando em média a quantidade de genes, constata-se certa lógica: houve um pequeno aumento na passagem de célula procariótica para eucariótica e um grande aumento na passagem de organismo eucariótico unicelular para pluricelular mais primitivo.

O pequeno aumento mostra que não houve amplificação dos elementos constitutivos de cada rede, apesar da aparente emergência do citoesqueleto e do aumento de volume constrangido por uma elevadíssima relação superfície/volume que originou o onipresente sistema de membrana. A existência de citoesqueleto em bactérias comprova-se com o fato de *Mycoplasma genitalium*, por ser parasita de mucosa, ter perdido os genes codificantes da parede celular (externa à membrana plasmática e geradora de domínio análogo à matriz extracelular) mas, em compensação, houve amplificação de elementos do citoesqueleto afim de manutenção da forma não mais gerada pela parede celular. Da mesma forma, em bactérias já existem genes para histonas, apesar do DNA não se estruturar em nucleossomos. O estudo da bactéria *Mycoplasma genitalium* foi empreendido em trabalhos de nosso grupo de pesquisa, seja na análise de homologias em bancos de dados (TORRES et al., 1998), seja no uso de curvas tri-dimensionais suavizadas para identificar sequências de genes (ROQUE et al., 1998).

2.3.2 – Genoma mínimo e a evolução genômica

A quantidade de genes dobrou do fungo *Sacharomyces cerevisiae* (6.000) para o verme *Caenorhabditis elegans* (12.000), aumento este refletido na amplificação de genes nas vias de sinalização, necessária para a diferenciação em diferentes tecidos. Nos vermes *Caenorhabditis elegans*, metade dos genes tem expressão constitutiva, independente dos tecidos, semelhante à quase totalidade dos genes dos fungos, enquanto

a outra metade tem expressão indutiva em função dos tecidos que se formam. O nível de diferenciação, no entanto, não é grande porque o conjunto de genes indutivos é praticamente o mesmo em todas as células.

No caso dos mamíferos (homem e camundongo), apesar do grande genoma estar presente em todas as células, o número de genes que se expressa em cada célula deve ser semelhante ao total de genes do verme. Isto significa que nos mamíferos o conjunto de genes indutivos apresenta variabilidade grande entre células de diferentes tecidos, permitindo alto nível de diferenciação e de especialização.

No ciclo celular, entre os circuitos que regulam os programas, existe também o circuito de genes que funcionam como relógio biológico. Alguns genes desse circuito já foram encontrados em verme (clk e daf) e em fungo (SIR). Pequenas alterações nesse circuito, envolvendo um ou dois genes e imperceptíveis a nível genômico, podem significar grandes alterações no controle do período de vida. E é presumível que haja uma relação entre período de vida, metabolismo e tamanho corpóreo.

A bactéria *Mycoplasma genitalium* possui apenas 470 genes. Um estudo, usando análise computadorizada para comparar genomas conhecidos, chegou à conclusão de que organismos mais simples do mundo do DNA poderiam sobreviver com apenas 250 genes. Se, por um lado, o genoma mínimo deveria conter umas duas dezenas de genes, por outro, os genes primitivos deveriam ser muito menores do que os atuais. Poder-se-ia esperar que os genes primitivos se reduzissem a um único *exon* ou a um domínio funcional das proteínas atuais. O trabalho do grupo de Tateno contribuiu para dar maior substância a esta hipótese:

*“We developed a method for multiple alignment of protein sequences. The main feature of this method is that it takes the evolutionary relationship of the proteins in question into account repeatedly for execution, until the relationships and alignment results are in agreement. We then applied this method to the data of the international DNA sequence databases, which are the most comprehensive and updated DNA databases in the world, in order to estimate the “evolutionary motif” by extensive use of a supercomputer. The motif could possibly be a “fossil” of a gene of the primordial life. If this turns out to be true in general, it would provide us with insight into the origin and evolution of a gene with respect to structure and function. We believe that we are now in a position to analyze DNA and protein not only **in vivo** and **in vitro** but also **in silico**”* (TATENO *et al.*, 1997).

As duas centenas de domínios que caracterizam o genoma primitivo podem ser

classificadas em apenas uma dezena de famílias de motivos que demarcam ainda hoje regiões atratoras no espaço abstrato conformacional das proteínas. Holm e Sander contribuem para enfatizar melhor esta redução no número possível de conformações dos domínios de proteínas:

“The comparison of the three-dimensional shapes of protein molecules poses a complex algorithmic problem. Its solution provides biologists with computational tools to organize the rapidly growing set of thousands of known protein shapes, to identify new types of protein architecture, and to discover unexpected evolutionary relations, reaching back billions of years, between protein molecules. Protein shape comparison also improves tools for identifying gene functions in genome databases by defining the essential sequence-structure features of a protein family. Finally, an exhaustive all-on-all shape comparison provides a map of physical attractor regions in the abstract shape space of proteins, with implications for the processes of protein folding and evolution” (HOLM, SANDER, 1996).

2.3.3 – Visão unificada da biologia

Os biopolímeros informacionais são os ácidos nucleicos (RNA e DNA) e as proteínas, cujo caráter informacional é dado pelos tipos diferentes de monômeros que se ligam em sequências não aleatórias. De fato, com a transição do mundo do RNA para o mundo do DNA, o círculo de informação se fechou entre esses três tipos de biomoléculas: no DNA do indivíduo está armazenado o genoma da espécie, recebido de herança e com a possibilidade de replicação; as sequências de DNA codificantes de proteínas (genes) são transcritas em sequências de RNA mensageiro (mRNA) que por sua vez tem seus *codons* traduzidos em sequências de aminoácidos (proteínas), com a intermediação de sequências de RNA transportador (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA), também transcritas de sequências específicas de DNA. Esse fluxo de informação genética, tradicionalmente denominado dogma central da biologia molecular, representa apenas uma parte da informação total da rede genética e, logicamente, uma parcela ainda menor da informação total da célula, devendo ser complementado por outros fluxos de informação epigenética.

Rede genética

Na rede genética (item 2.1.4), portanto, existe o fluxo de informação genética, ligando o gene ao seu *output* (proteína), e o fluxo de informação epigenética, conferindo

às proteínas, com modificações pós-traducionais (epigenéticas), a função de *input* na ativação de outros genes. As sequências de DNA, além de genes (ORFs: *open reading frames*), contêm os elementos reguladores desses genes (*cis-acting elements*) que são acionados de modo combinatório pelos fatores de transcrição (*trans-acting elements*) e RNA-polimerases. Além da função de transcrição, existe ainda a função de duplicação do DNA quando o complexo protéico de replicação (*trans*), incluindo a DNA-polimerase, atua sobre os elementos origens de replicação (*cis*). Na sua linearidade, a molécula de DNA está sempre associada a complexos protéicos, formando a fita de cromatina. Como eucromatina (nível de organização em baixa escala), a molécula de DNA está associada às proteínas histonas, geralmente formando nucleossomos, tornando o DNA acessível, de modo localmente seletivo, aos complexos de replicação e transcrição. Como heterocromatina (nível de organização em grande escala), a cromatina, por sua vez, se associa às proteínas do esqueleto cromossômico, compactando-se e tornando o DNA inacessível para os complexos de replicação e de transcrição. A passagem do estado de eucromatina para o de heterocromatina, e vice-versa, se dá durante as fases do ciclo celular, controladas por pares de proteínas ciclinas-cdks (*cyclin-dependent kinases*), por sua vez, reguladas pela rede mecânica e pela rede de sinalização.

Rede mecânica

Na rede mecânica (itens 1.3.3 e 2.1.3), os elementos mecânicos da membrana (integrinas, moléculas de adesão e canais iônicos dependentes de tensão) integram os *inputs* da rede da matriz extracelular (laminina, fibronectina e colágeno) à rede do citoesqueleto (microtúbulos, fibras de actina e filamentos intermediários), gerando a *tensegrity* que regula a forma da célula, bem como produz os ajustes morfofuncionais adequados às fases do ciclo celular.

Rede de sinalização

Os elementos químicos (receptores neuroendocrinoimunológicos) e os elementos elétricos (canais iônicos dependentes de voltagem ou de ligantes) da membrana, interagindo também com os elementos mecânicos, transduzem os *inputs* do meio e integram-nos a vias paralelas e redundantes que, com divergências e convergências, processam de modo combinatório as informações, dirigindo-as a complexos específicos de transcrição ou de replicação. O *output* desta rede é a ativação de modo indutivo,

dependente do meio, da rede genética, permitindo à célula a elaboração de uma resposta adaptativa (seção 1.2 e item 2.1.2).

Rede metabólica e de manutenção

Os genes da rede metabólica e de manutenção (*housekeeping*) são ativados de modo constitutivo, embora existam também elementos sensíveis à indução, permitindo a produção constante de proteínas, tanto daquelas estruturais quanto daquelas que constituem os ciclos metabólicos que levam à síntese de ATP. Como exemplo de transição de modo constitutivo para indutivo, tem-se a transição da via das pentoses fosfatadas para a via de Embdon-Meyerhof, em função da redução na curva de saturação do oxigênio.

Vida como emergência biológica

A existência da vida como emergência biológica se comprova por ocasião da morte clínica de um organismo, por exemplo, o de uma cobaia morta por anoxia (ausência de oxigênio): a vida deixa de existir sem que nenhuma alteração a nível físico ou químico tenha ocorrido. Ou seja, as alterações ocorrem a nível biológico: paralelamente vão ocorrendo a desintegração das redes biomoleculares que mantêm a homeostasia de cada célula e a desintegração das redes celulares que mantêm a homeostasia do organismo.

A desintegração das redes biomoleculares ocorre porque, com a ausência do oxigênio, não há a transferência de elétrons e o transporte de prótons (provenientes do hidrogênio que veio da glicose) através da cadeia respiratória (um segmento da rede metabólica), comprometendo a síntese da molécula de ATP. A molécula de ATP é a fonte de energia (bateria carregada) para todas as reações e a doadora de grupo fosfato para a fosforilação/desfosforilação (*on/off*) dos biopolímeros informacionais e entrópicos. Sem a energia do ATP, cessa a capacidade entrópica (reduzir entropia e aumentar organização) dos biopolímeros. Sem a fosforilação, cessa o fluxo de informação entre os biopolímeros, comprometendo o funcionamento de cada rede biomolecular, bem como a integração entre elas. Não procede a objeção reducionista de que ocorre alteração físicoquímica na cadeia respiratória: esta apenas para de funcionar na ausência de oxigênio, um comportamento fisiologicamente previsto, como o de um carro na ausência de combustível.

A desintegração das redes celulares, devido à existência de hierarquia funcional entre essas redes, começa antes que ocorra a desintegração das redes biomoleculares em todas as células do organismo. A redução do aporte de oxigênio e a consequente redução na concentração de ATP afetam antecipadamente o funcionamento de segmentos da rede neural (isquemia), com reflexos na integração da rede neuromuscular na locomoção (paraplegia) e na contração muscular (parada respiratória), bem como da rede miocárdica (enfarto), com reflexos na integração da rede vascular na circulação. Com isso, entram em colapso as coordenações neural e hormonal, responsáveis pela integração de todas as redes celulares na homeostasia do organismo. Como a nível celular, também a nível de organismo, a vida deixa de existir como fenômeno global, por desintegração de redes, sem que nenhuma alteração fisicoquímica tenha ocorrido localmente. Logicamente, o contrário também é verdadeiro: a vida emerge e continua existindo como fenômeno holístico, por integração de redes, e não como somatório de eventos fisicoquímicos isolados, conforme a visão reducionista.

Organização das redes bioinformacionais

A organização das redes bioinformacionais ocorre graças às propriedades entrópicas dos biopolímeros informacionais, de tal forma que esses biopolímeros funcionam como autômatos básicos de redes booleanas.

Em um primeiro nível de organização, os autômatos biomoleculares (autômatos de nível 1) formam redes biomoleculares, como produtos do genoma fixado na população de células ancestrais, cuja integração permite a homeostasia da célula (autômato de nível 2). As mesmas redes biomoleculares iniciais, descritas no item 2.1.1, estão presentes em todas as células dos organismos atuais, sejam unicelulares ou pluricelulares, apesar do explosivo aumento do número de genes nos genomas. Enquanto a célula ancestral deveria possuir um genoma com umas duas centenas de genes, em bactérias (células procarióticas) o número de genes oscila entre quinhentos a quatro mil, no verme *Caenorhabditis elegans* (organismo pluricelular simples) o número de genes se aproxima de dez mil, podendo chegar a cem mil em mamíferos (organismo pluricelular complexo). Olhando para os extremos, é como se, durante três bilhões de anos, a centena de genes iniciais tivesse originado uma centena de famílias de genes, cada uma com cerca de mil genes. Isto significa que, no início, cerca de cem proteínas (*output* da centena de genes) se distribuíam como elementos das mesmas quatro redes biomoleculares que hoje são alimentadas pela centena de milhares de

proteínas (*output* da centena de famílias de genes).

Num segundo nível de organização, formaram-se as redes celulares de cuja integração vai depender a homeostasia do organismo pluricelular (autômato de nível 3). As redes celulares se estabelecem na medida em que, durante o desenvolvimento embrionário (seção 2.2), as células vão se diferenciando para a formação de tecidos. A partir da célula ovo inicial, em sucessivas gerações, células com fenótipos semelhantes se interligam em segmentos de redes locais (tecidos) que, por sua vez, se interligam formando órgãos numa rede global. A rede da matriz extra-celular (o órgão da forma) coordena, como *input*, o *output* das redes biomoleculares de cada célula, tanto para a interligação local quanto para a interligação entre tecidos. Assim, a integração dos *outputs* de cada autômato celular (gerados em cada célula pelo funcionamento integrado das redes biomoleculares) origina o organismo pluricelular como autômato de nível 3.

Num terceiro nível de organização, formaram-se as redes de organismos de cuja integração vai depender a homeostasia da biosfera (autômato de nível 4). As redes de espécies de organismos (uni e pluricelulares) no ecossistema são análogas às redes de células de tecidos no órgão: tem-se respectivamente uma população de indivíduos com genoma semelhante, capazes de se reproduzirem, e uma população de células com fenótipo semelhante, apresentando mesmas estruturas e funções. A analogia entre órgão e ecossistema ainda se aprofunda: ambos não podem ser considerados autômatos, já que formam segmentos abertos de redes que só se completam ao interagirem com outros segmentos.

Em cada nível de organização, as propriedades entrópicas e informacionais do autômato depende de suas interações com o meio. Em se tratando de biosfera e ecossistemas, o meio ambiente é o considerado de modo convencional pela ecologia. Em se tratando de organismos pluricelulares, existe o meio interno do organismo (plasma sanguíneo se comunicando com a matriz extracelular) que representa ao mesmo tempo o meio extracelular, bem como o meio intracelular que, por sua vez, se identifica com o meio envolvente dos biopolímeros. Em se tratando de organismos unicelulares, a única diferença é que não existe meio interno: o meio externo se comunica com a matriz extracelular, direta ou indiretamente (através da parede celular).

CAPÍTULO 3

TERMODINÂMICA E CINÉTICA NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Em se tratando do Universo, como um sistema isolado que não troca nem energia e nem massa com o inexistente meio circundante, as leis da termodinâmica apresentam uma evidência imediata. A primeira lei, pelo princípio da conservação de energia, afirma ser constante a energia do universo, podendo esta ser transformada ou em calor ou em trabalho, mas nunca ser criada ou destruída.

Para um sistema fechado, onde há troca de energia mas não de massa, as quantidades de calor (ΔQ) e trabalho (ΔW) são as formas de energia que ele pode trocar com o meio. A liberação de calor ou a produção de trabalho pelo sistema leva sinal negativo, enquanto a absorção de calor ou o trabalho realizado sobre o sistema leva sinal positivo. Por essa convenção, ΔQ e ΔW são positivos quando aumentam a energia do sistema. Assim, de acordo com a primeira lei da termodinâmica, quando a energia (E) muda de um estado inicial para um estado final, estando o sistema absorvendo calor e realizando trabalho sobre o meio, pode-se escrever

$$\Delta E = \Delta Q - \Delta W \quad (3.1.1a)$$

3.1 – AS FUNÇÕES ENTALPIA, ENTROPIA E ENERGIA LIVRE

Num processo cíclico em que há retorno do sistema ao seu estado inicial, pode-se considerar $\Delta E = 0$, enquanto o calor absorvido ($+\Delta Q$) pelo sistema se iguala ao trabalho realizado sobre o sistema ($+\Delta W$), ou vice versa.

Se um sistema altera sua energia interna (ΔE), sem ter realizado trabalho ou sem que trabalho tenha sido realizado sobre ele ($\Delta W = 0$), então $\Delta E = \Delta Q$. Neste caso, em situação de endotermia, tem-se absorção de calor ($+\Delta Q$) e ΔE é positiva ($E_{\text{final}} > E_{\text{inicial}}$), enquanto, em situação de exotermia, o calor é liberado ($-\Delta Q$) e ΔE é negativa. No entanto, como se verá em se tratando da segunda lei, não existe situação em que se

verifique a igualdade $\Delta Q = 0$, já que é impossível a conversão total de energia em trabalho.

Se o calor é trocado livremente com o meio até ser atingido o equilíbrio térmico, tem-se o sistema isotérmico. Se for excluída a troca de calor com o meio, mantendo-se porém outras trocas de energia envolvendo trabalho, tem-se o sistema adiabático.

3.1.1 – Entalpia

A energia interna do sistema é uma variável de estado, ou seja, é uma propriedade do sistema que não depende do caminho que leva do estado inicial ao estado final. Já o calor e o trabalho não são variáveis de estado, dependendo assim do método usado para a mudança de um estado para outro.

No caso dos gases, o trabalho (W), sendo igual ao produto de força pelo deslocamento, pode ser representado por

$$\Delta W = P\Delta V \quad e \quad W = \int_{V_1}^{V_2} P dV \quad (3.1.2)$$

onde P é a pressão externa que, diante de uma pressão interna maior ou menor, permitirá ao sistema expandir-se ($-\Delta W$) ou comprimir-se ($+\Delta W$). Quando é muito pequena a diferença entre as pressões interna e externa, diz-se que o processo é reversível, de forma análoga ao processo reversível da mudança de estado, onde o fluxo de calor é definido para dentro (endotermia, $+\Delta Q$) ou para fora (exotermia, $-\Delta Q$) em função de pequena diferença de temperatura entre o sistema e o meio.

Nos sistemas químicos, geralmente a pressão permanece constante e, em situação de endotermia, sendo a expansão a única forma de trabalho exercido sobre o meio, a primeira lei pode ser reescrita:

$$\Delta E = \Delta Q - P\Delta V \quad (3.1.1b)$$

enquanto o calor absorvido em tal sistema se iguala ao aumento de energia interna ($\Delta E + P\Delta V$). Esta mudança da energia interna, a pressão constante, define a função entalpia ou conteúdo de calor (ΔH), segundo a equação

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V \quad (3.1.3a)$$

onde ΔH é positiva para mudança endotérmica e negativa para exotérmica. Nos sistemas líquidos e sólidos, com expansão pequena e ocorrendo a pressão ambiente, ΔH não difere muito de ΔE .

Por outro lado, para um sistema fechado, a quantidade de calor transferida (ΔQ) é proporcional à diferença de temperatura do sistema antes e depois da troca de calor. A constante de proporcionalidade é a capacidade calorífica do sistema conforme a equação $\Delta Q = C \Delta T$ e,

$$Q = \int_{T_1}^{T_2} C dT = H \quad (3.1.4)$$

onde H define a função entalpia, quando se iguala ao calor absorvido, já que o trabalho se iguala a zero, a volume constante. Como visto acima, a pressão constante, H se iguala a $E + PV$, representando calor absorvido ou liberado, enquanto PV representa o único tipo de trabalho realizado. Valores de ΔH para mudanças reversíveis de fase são encontrados em tabelas. Como, nas condições acima, calor e entalpia se identificam, pode-se referir ao calor de vaporização, por exemplo, como sendo uma entalpia de vaporização.

3.1.2 – Entropia

A segunda lei da termodinâmica e o conceito de entropia, criado por Clausius, surgiram respectivamente de uma intuição desse autor e de uma constatação já existente em seu tempo. A intuição (o calor não pode passar de um corpo mais frio para um corpo mais quente) reflete o conceito moderno de calor como uma energia cinética aleatória que é transferida entre átomos e moléculas através de colisão e radiação. A constatação (na produção de trabalho, parte da energia utilizada é transformada em calor) levou Clausius a estabelecer o conceito de entropia (conteúdo de transformação) em oposição a energia (conteúdo de trabalho). Quanto maior o número de transformações de energia em trabalho, maior será a entropia ou a desordem relativa do sistema. Segundo o enunciado de Clausius, “a energia do Universo é constante, enquanto a entropia tende para o máximo”.

Assim, sendo o Universo um sistema isolado onde não entra e não sai nem energia e nem massa, o fluxo interno de energia é sempre no sentido de uma distribuição mais uniforme dessa energia até atingir o estado de equilíbrio correspondente ao estado de maior probabilidade (aleatoriedade, desordem) que, por sua vez, equivale ao grau de entropia máxima. Por isso, a segunda lei da termodinâmica afirma que a entropia tende para o máximo, significando que ela está sempre aumentando em todos os processos que ocorrem espontaneamente no universo.

Num parágrafo anterior, referiu-se a mudança de estado como sendo processo reversível ocorrendo em sistema praticamente isotérmico, já que, no ponto de mudança, é muito pequena a diferença de temperatura entre o meio e o sistema. Numa mudança de estado, ocorrendo reversivelmente a temperatura constante (T), haverá um aumento de entropia (+ ΔS , correspondente a aumento na desordem do sistema) quando houver absorção de calor (+ ΔQ), bem como redução de entropia (- ΔS , correspondente a aumento na ordem do sistema) quando houver liberação de calor (- ΔQ), segundo a equação

$$\Delta S \geq \frac{\Delta Q}{T} \quad \text{ou} \quad \Delta S \geq \frac{\Delta H}{T} \quad (3.1.5)$$

onde a igualdade indica situação de equilíbrio (reversibilidade) e a desigualdade representa irreversibilidade.

Esta equação permite reescrever a equação (3.1.3a),

$$\Delta E = T\Delta S - P\Delta V \quad (3.1.3b)$$

Um processo irreversível é considerado um processo termodinamicamente espontâneo. A espontaneidade ou a probabilidade de ocorrência está associada à produção de calor pelo sistema e/ou ao aumento de entropia (aleatoriedade, desordem) dos componentes do mesmo. Por exemplo, uma folha de papel pode sofrer combustão e transformar-se em cinzas, mas das cinzas é termodinamicamente improvável a recuperação do papel, na medida em que os átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio tendem a existir como moléculas inorgânicas simples de gás carbônico e água, em vez de moléculas orgânicas complexas de celulose (BECKER, DEAMER, 1991).

De fato, para que uma fibra de celulose exista, precisa-se de muita energia e informação para que os átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio se liguem em ligações químicas não-aleatórias para formar moléculas de glicose que, por sua vez, funcionarão como monômeros para, novamente através de ligações não-aleatórias, se polimerizar formando uma extensa rede macromolecular. Existe, portanto, uma improbabilidade termodinâmica para que a ordem existente nas fibras de celulose que constituem o papel seja produzida espontaneamente a partir da desordem que caracteriza a existência das moléculas de gás carbônico e água. Tudo parece acontecer como se o novo aforisma *natura abhorruit ab ordine* pudesse substituir o antigo *natura abhorruit a vacuo*.

O binômio energia e informação

Apesar da improbabilidade termodinâmica, a cada instante toneladas de celulose estão sendo produzidas pelos vegetais cuja biodiversidade se espalha pela biosfera. Aliás, como uma árvore, também um computador, pelo seu alto grau de ordenação e complexidade, é uma estrutura improvável que se torna possível graças ao uso adequado do binômio energia e informação. Em outras palavras, o uso adequado do binômio energia e informação, otimizado pela evolução biológica ou através da revolução tecnológica, foi capaz de conferir reversibilidade a processos irreversíveis e, ao mesmo tempo, superar a reversibilidade característica do equilíbrio termodinâmico, ao gerar sistemas que funcionam em condições distantes do equilíbrio (NICOLIS, PRIGOGINE, 1989). Na verdade, um sistema em equilíbrio termodinâmico não pode apresentar mudança espontânea a não ser se retirado dessa condição por alguma fonte externa de energia ou informação.

Estando relacionada com probabilidade, a entropia também se relaciona com a informação (THAXTON *et al.*, 1984)

$$S = k \ln \Omega \quad (3.1.6a)$$

onde k é a constante de Boltzmann e Ω corresponde ao número de maneiras com que energia e massa se distribuem num sistema.

A distribuição de energia está associada à entropia térmica (**th**) e a distribuição de massa à entropia configuracional (**c**)

$$S = S_{th} + S_c = k \ln(\Omega_{th} \cdot \Omega_c) \quad (3.1.6b)$$

É possível a dissociação entre entropia S_e (fluxo de energia no sistema) e S_i (processos irreversíveis no sistema)

$$\Delta S = \Delta S_e + \Delta S_i \quad (3.1.7)$$

enquanto as condições para a *negentropia* (THAXTON *et al.*, 1984, NICOLIS, PRIGOGINE, 1989) existem quando

$$\Delta S_e \leq 0 \quad e \quad |\Delta S_e| > \Delta S_i \quad (3.1.8)$$

Note-se que, mesmo para sistemas não-isolados, a condição de irreversibilidade é dada por

$$\Delta S_i \geq 0 \quad (3.1.9)$$

Uma nova teoria da informação

Historicamente, o conceito de informação nasceu associado ao de entropia e o conceito de entropia foi criado para quantificar a dissipação de energia. É interessante notar que a necessidade de definir informação só surgiu no século XX, com a implantação das primeiras redes telefônicas, assim como a necessidade de definir entropia só surgiu no século XIX, com a utilização das máquinas a vapor.

Tradicionalmente, a teoria da informação é atribuída a Shannon (SHANNON, WEAVER, 1964), mas na verdade o objetivo desse autor era estabelecer uma teoria da comunicação, ou seja, do transporte da informação através das redes telefônicas. A partir desta restrição e considerando outras interpretações relativas ao conceito de informação, STONIER (1996) julga necessário estabelecer uma nova teoria da informação, considerando-a como uma das propriedades básicas do Universo, tão fundamental quanto matéria e energia. Especificamente, pode-se dizer que um sistema contém informação se tal sistema exhibe organização. Existe uma forte tendência a

ênfatisar o binômio entropia-informação em analogia com o binômio massa-energia. Por organização entende-se a existência de um padrão não aleatório de partículas, de campos de energia ou outras sub-unidades do sistema.

Assim como a energia cinética e a energia potencial representam formas de manifestação de energia, a entropia térmica e a entropia configuracional, também conhecidas respectivamente como cinética e estrutural, representam as duas maiores classes de formas de entropia. A conservação de energia deve ser possivelmente ampliada para a conservação da soma de energia mais informação, de tal forma que a própria equação de Einstein, relacionando massa e energia, deveria ser complementada pela quantidade de informação. Se a informação é uma propriedade básica do Universo, como a massa e a energia o são, é evidente que o Universo se organiza em níveis hierárquicos de informação, da mesma forma em que a informação contida num sistema é função das conexões interligando seus elementos.

Em resumo, a teoria de STONIER (1996) leva em conta que existe uma relação direta entre o grau de organização e a quantidade de informação estrutural. No entanto, a relação entre informação e entropia não é direta: a entropia, ou melhor a *negentropia*, é o inverso multiplicativo da informação e não seu inverso aditivo, como usualmente tem sido considerada. Assim, a equação 3.1.6a poderia readquirir a forma $I=(I_0)e^{-S/k}$, onde I_0 representa o conteúdo de informação do sistema quando $S=0$.

3.1.3 – Energia livre

Enquanto o Universo é um sistema isolado, a Biosfera, o autômato de nível mais elevado, é um sistema fechado onde há troca de energia, mas não de massa, com o mundo exterior. A energia solar na forma de fons entra na Biosfera e desta sai em forma de calor, contribuindo para o aumento de entropia do Universo, conforme a segunda lei. No entanto, parte da energia solar, antes de dissipar-se em forma de entropia universal, fica armazenada nas ligações químicas das moléculas que constituem os seres vivos, gerando um fluxo energético unidirecional dos seres vivos autotróficos (fototróficos e quimiotróficos) aos heterotróficos, bem como um fluxo cíclico de matéria entre esses dois grupos, tendo como intermediárias, de um lado, moléculas de alta energia livre (baixa entropia) e, de outro, moléculas de baixa energia livre (alta entropia). O equilíbrio entre autotróficos e heterotróficos reflete a reversibilidade entre fotossíntese e respiração, processos que evoluíram para grande complexidade, tornados possíveis graças ao mecanismo acoplador e conversor de energia solar em energia

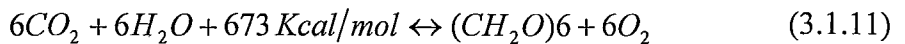
química, representado pela transformação da molécula de ADP em molécula de ATP, raiz de todos os processos de fosforilação responsáveis pela manutenção dos sistemas biológicos distantes do equilíbrio, dotados de *negentropia* e altos níveis de energia livre.

Equilíbrio ecológico entre fotossíntese e respiração

A energia interna (E) da Biosfera se identifica com a energia solar armazenada no sistema e cuja variação pode ser medida como a diferença entre a energia que entra (E_{in}) e a energia que sai do sistema (E_{ex})

$$\Delta E = E_{in} - E_{ex} \quad (3.1.10)$$

A energia interna da Biosfera aumenta com a realização da fotossíntese, na proporção de 673 kcal/mol de glicose produzida a partir de 6 moles de gás carbônico e de 6 moles de água. Isto significa que 1 mol de glicose tem 673 kilocalorias de energia interna a mais do que 6 moles de gás carbônico e de água, provindo esta energia da luz solar convertida em energia química armazenada em moléculas de ATP que, por sua vez, cederão energia para as diversas etapas da redução de gás carbônico a glicose. Ao contrário, durante a respiração, a energia interna do sistema se reduz de 673 kcal/mol pela oxidação da glicose até a formação de gás carbônico e água



Energia livre de Gibbs

Considerando-se a célula, onde se realiza a fotossíntese e/ou a respiração, como um sistema aberto, trocando energia e massa com o meio, é permitido reescrever as relações abaixo, a partir da equação 3.1.5,

$$\Delta S_{sist} + \Delta S_{meio} > 0$$

$$\Delta S_{sist} - \frac{\Delta H}{T} > 0$$

$$\Delta H - T\Delta S_{sist} \leq 0$$

Destas condições, provém a definição de energia livre de Gibbs (ΔG):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{sist} \quad (3.1.12)$$

A variação da energia livre de Gibbs é representada pela diminuição máxima ($-\Delta G$) da energia armazenada na molécula de glicose, dando a medida da capacidade máxima de transferência de energia como trabalho útil. Com relação à glicose, é lógico que a variação da energia livre de Gibbs é exatamente a forma negativa ($-\Delta G$, exotermia) da energia livre de formação dessa molécula ($+\Delta G$, endotermia).

Segundo a constatação de Clausius, durante a variação da energia livre do sistema, uma parte desta energia se relacionará com a variação da entalpia, enquanto outra parte se relacionará com a variação da entropia.

A entalpia é a medida do calor absorvido ou produzido pela reação, o que significa, em última análise, o trabalho químico realizado na construção ou na quebra das ligações químicas (THAXTON *et al.*, 1984). A entropia, como se viu anteriormente, dependendo da natureza das ligações químicas, pode se apresentar como entropia informacional (medida da incerteza e aleatoriedade) ou como entropia conformacional (medida da flexibilidade e da cinética).

Os seres vivos trocam energia e massa com o meio (sistemas abertos) em condições distantes do equilíbrio, graças ao mecanismo de fosforilação que mantém um suprimento constante de energia responsável pela negentropia geradora do trabalho de auto-organização sobre o sistema biológico (NICOLIS, PRIGOGINE, 1977). Este trabalho realizado sobre o sistema pode movê-lo para longe do equilíbrio e mantê-lo assim enquanto o fluxo de massa e/ou energia persistir.

O trabalho exercido sobre os sistemas biológicos se identifica com a energia livre cuja variação representa a melhor medida da espontaneidade termodinâmica (BECKER, DEAMER, 1991). De fato, numa reação a variação de energia livre pode ser facilmente calculada a partir da constante de equilíbrio dada pela relação das concentrações de reagentes e produtos. Especificamente, pelo fato da variação de energia livre da reação se relacionar de maneira simples e contrária à variação de entropia do Universo, nas condições da equação 3.1.12, toda reação espontânea é caracterizada por uma diminuição na energia livre do sistema e por um aumento na entropia do Universo

$$\Delta G_{sist} < 0 \quad e \quad \Delta S_{univ} > 0 \quad (3.1.13)$$

No entanto, a espontaneidade termodinâmica é um critério necessário mas insuficiente para determinar se de fato uma reação está ocorrendo porque, na realidade, a energia livre avaliável numa reação é função do afastamento dos componentes em relação à condição de equilíbrio.

Estrutura e função em sistemas evolutivos

Geralmente os estudiosos que se preocupam com a origem dos biopolímeros informacionais partem do dogma central que caracteriza o mundo do DNA e, por essa razão, se enredam no insolúvel problema de primazia na gênese, ou seja, o que surgiu primeiro, o DNA ou a proteína?

É possível contornar tal problema, através de uma abordagem indireta na qual a questão passe a ser não como os sistemas biológicos evoluíram, mas sim que características são necessárias para um sistema qualquer adquirir a capacidade de evoluir em determinadas condições. Sistemas com tal capacidade são denominados sistemas evolutivos (THEODORIDIS *et al.*, 1996), consistindo de unidades monoméricas (*building blocks*), estáveis ou com fornecimento contínuo, e de complexos poliméricos, instáveis e em contínuos ciclos de montagem e desintegração. Os sistemas evolutivos têm acesso a *inputs de negentropia* na forma de *quanta* de energia, acima da oscilação térmica, viabilizando acúmulo de estruturas em diferentes níveis hierárquicos, em paralelo com aparecimento de variedade de funções, tais como catálise de reações químicas, bem como processamento de informação (movimentação, percepção, reprodução, transmissão e armazenamento). A mesma relação entre redes de unidades monoméricas e biopolímero, como autômato de primeira ordem, pode ser estabelecida entre redes de biopolímeros e célula, como autômato de segunda ordem, ou entre redes de células e organismo, como autômato de terceira ordem, ou ainda entre redes de organismos e a biosfera, como autômato de quarta ordem.

Tal comportamento poderá ser demonstrado nos diferentes níveis hierárquicos dos sistemas biológicos, representados pelos biopolímeros informacionais, pelas células,

pelos organismos pluricelulares e pela biosfera, que, como autômatos booleanos, se distribuem pelos níveis fractais das redes bioinformacionais.

Na formação das redes bioinformacionais, em cada nível fractal, redes de autômatos booleanos de ordem inferior integram a homeostasia do autômato de ordem superior: redes de biopolímeros integram a homeostasia da célula, redes de células integram a homeostasia do organismo pluricelular (através das interações de tecidos entre si na formação de órgãos), bem como redes de organismos (uni e pluricelulares) integram a homeostasia da biosfera como super-organismo Gaia (através das interações de espécies entre si na formação de ecossistemas).

Retornando à pergunta inicial, o que surgiu primeiro foi o RNA com poder autocatalítico, cuja existência, em cadeias curtas e aleatórias (TATENO *et al.*, 1997), se explica sem necessidade do trabalho da entropia conformacional e apenas com o trabalho da energia química, minimizada tanto pelo próprio poder autocatalítico quanto pelo *molecular channeling* típico de superfícies minerais, principalmente de pirita.

Ao surgirem, as primeiras moléculas de RNA não permitiam estabelecer a diferença entre o genótipo e o fenótipo. A entropia conformacional pode dar a informação contida numa cadeia polimérica cujo teor informacional pode ser dissociado em entropia configuracional para uma cadeia aleatória (S_{ca}) e para uma cadeia com mensagem específica (S_{cm}), conforme a equação

$$I = S_{ca} - S_{cm} = k \ln \frac{\Omega_{ca}}{\Omega_{cm}} \quad (3.1.14)$$

O componente S_{ca} foi minimizado pelas condições iniciais do mundo do RNA, conforme acenado acima. O componente S_{cm} , diferentemente com o que ocorre com as atuais longas cadeias de DNA e de proteína, era inexistente em se tratando das primeiras curtas cadeias de RNA que, como RNA-genes contendo em si o genótipo e o fenótipo, tiveram sua aleatoriedade congelada em mensagem específica para a codificação de futuras cadeias peptídicas. Posteriormente, após surgir o complexo ribopeptídico com função de transcriptase reversa, a mensagem específica de cada RNA-gene foi transferida pela transcriptase reversa para cada DNA-gene da célula ancestral universal do mundo do DNA.

À primeira vista parece haver uma aparente contradição entre as predições da

termodinâmica, cuja segunda lei prevê uma progressão da ordem para a desordem em função do contínuo aumento de entropia no universo, e da evolução biológica, cuja teoria constata uma progressão hierárquica para formas de sistemas vivos cada vez mais organizados e complexos, gerados pela integração de redes bioinformacionais em diferentes níveis fractais. A contradição, no entanto, desaparece diante da consideração de que, embora em todo processo a entropia do universo sempre aumente, é possível num sistema particular haver uma redução na entropia do sistema, desde que compensada por um aumento igual ou maior na entropia do meio envolvente.

3.2 – A CONSTANTE MOLAR UNIVERSAL E A EQUAÇÃO FUNDAMENTAL DOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Na célula, a concentração da parte fluida do citoplasma (conhecida como hialoplasma) classifica-se como a de uma solução diluída e, considerando-se que as reações enzimáticas se encadeiam em redes metabólicas, as concentrações de elementos de uma reação são mantidas constantes, caracterizando um estado estacionário, diferentemente da condição de equilíbrio em que essas constantes se equalizam. Isto se dá, devido à contínua adição de reagentes (produtos da reação anterior) e remoção de produtos (substratos da reação posterior). Em laboratório, no entanto, o primeiro passo no estudo de uma reação enzimática é determinar experimentalmente sua constante de equilíbrio, associando-a com sua diferença de energia livre em condições padrão. Para tal, a concentração de água, embora em torno de 50 M, não precisa ser levada em conta, considerando sua constância, e o pH neutro pode ser considerado como padrão. Além do pH, foram padronizadas também as condições para concentração a 1 molar (1M), para pressão a 1 atmosfera (1 atm, condizente com 1mol / litro para gases) e temperatura a 25 graus centígrados (298K).

3.2.1 – Equação dos gases perfeitos

Para os gases perfeitos, a partir das leis de Boyle e Gay-Lussac, se determina que a relação PV/T é constante, sendo R a constante de proporcionalidade cujo valor ($8,3 \text{ J} / \text{K} \cdot \text{M}$), tomando-se cada espécie na concentração de 1 molar, é determinado quando a pressão é igual a 1,0 atmosfera, o volume 22,4 litros e temperatura 273 graus Kelvin. Nessas condições, um mol de qualquer mistura gasosa ocupa 22,4 litros e contém $6,023 \times 10^{23}$ moléculas, podendo-se inferir que volumes iguais de qualquer gás contém o mesmo número de moléculas. Sendo n o número de moles, a equação de estado para gases perfeitos é

$$PV = nRT \quad (3.2.1)$$

A partir do comportamento de um gás perfeito e da água em condições padrão, é possível definir a faixa de normalidade em que se deve trabalhar com misturas gasosas

e soluções aquosas. Para os gases, se a pressão for baixa, a equação de gás ideal se aplica a todos os gases. Para sólidos e líquidos, a primeira aproximação é considerar o volume como sendo constante, calculando-o a partir da densidade ou volume específico. Para a água, as equações podem ser obtidas para V como uma função de P e T (TINOCO Jr *et al.*, 1995).

3.2.2 – Equação da Energia Livre de Gibbs (ΔG)

Nos sistemas biológicos, no laboratório como na natureza, as reações químicas geralmente se processam a T e P constantes: o sistema troca calor com o meio para se ajustar à temperatura ambiente e expande e contrai seu volume para permanecer na pressão atmosférica. A energia livre de Gibbs, conforme definida na equação 3.1.12, como sendo uma variável de estado, extensiva e com as mesmas unidades de energia e entalpia, funciona como critério de espontaneidade termodinâmica para as reações do sistema nessas condições: se a variação de energia livre for negativa ($-\Delta G$), a reação poderá ocorrer espontaneamente; se a variação for positiva ($+\Delta G$), a reação não poderá ocorrer espontaneamente, necessitando para tal de energia externa, universalmente fornecida pela molécula de ATP; se a variação for nula ($\Delta G = 0$), a reação estará no equilíbrio (TINOCO Jr *et al.*, 1995).

No item 3.1.1 definiu-se a função entalpia como

$$H = E + PV \quad (3.2.2a)$$

e no item 3.1.3 ficou estabelecida a definição de energia livre de Gibbs

$$G = H - TS \quad (3.2.3a)$$

Diferenciando-se cada uma

$$dH = dE + PdV + VdP \quad (3.2.2b)$$

$$dG = dH - TdS - SdT \quad (3.2.3b)$$

e substituindo o valor de dE (equação 3.1.3b) na equação 3.2.2b, tem-se

$$dH = TdS + VdP \quad (3.2.2c)$$

Por outro lado, substituindo dH dado acima na equação 3.2.3b, tem-se

$$dG = VdP - SdT \quad (3.2.3c)$$

Integrando esta equação, considerando T constante:

$$\int_{P_1}^{P_2} dG = \int_{P_1}^{P_2} VdP$$

o que permite escrever que a variação da energia livre de Gibbs com a pressão, à temperatura constante, é

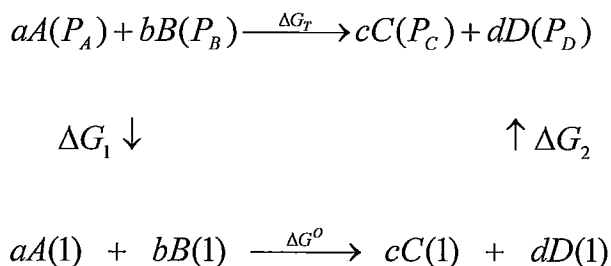
$$G(P_2) - G(P_1) = \int_{P_1}^{P_2} VdP \quad (3.2.4a)$$

Fazendo-se substituições relativas à equação dos gases perfeitos (3.2.1), tem-se:

$$G(P_2) - G(P_1) = \int_{P_1}^{P_2} nRT \frac{dP}{P} = nRT \ln P_2/P_1 \quad (3.2.4b)$$

Considere-se uma reação em que dois gases reagentes, A e B, originam dois gases produtos, C e D, numa condição inicial em que as pressões parciais se acomodam

naturalmente, em função da estequiometria (a,b e c,d) em questão, e numa condição final em que as pressões parciais são fixadas em 1 atmosfera:



Independentemente dos caminhos a seguir, a diferença de energia livre total para a reação é igual à soma das diferenças de energia livre parciais

$$\Delta G_T = \Delta G_1 + \Delta G^o + \Delta G_2$$

Para a diferença de energia livre ΔG_1 , na passagem dos reagentes da condição inicial para a condição final (a de se manter a pressão na reação em 1,0 atmosfera), leva-se em conta a diferença de energias livres entre essas condições, ou seja:

$$\Delta G_1 = [G(P_{Af}) - G(P_{Ai})] + [G(P_{Bf}) - G(P_{Bi})]$$

de onde, usando a equação 3.2.4,

$$\Delta G_1 = aRT \ln \frac{1}{P_A} + bRT \ln \frac{1}{P_B} = RT \ln \frac{1}{(P_A)^a (P_B)^b}$$

Procedendo-se de forma análoga para os produtos, tem-se:

$$\Delta G_2 = cRT \ln P_C + dRT \ln P_D = RT \ln (P_C)^c (P_D)^d$$

e, finalmente, teremos para a diferença de energia livre total:

$$\Delta G_T = \Delta G_T^o + RT \ln \frac{(P_C)^c (P_D)^d}{(P_A)^a (P_B)^b}$$

Representando-se por Q o argumento do logaritmo acima, tem-se a equação generalizada

$$\Delta G_T = \Delta G^o + RT \ln Q \quad (3.2.5)$$

O quociente Q, portanto, é a razão entre as pressões parciais de produtos e reagentes, cada um elevado à potência de seu coeficiente estequiométrico, notando-se que Q será grande se as pressões dos produtos forem grandes ou as pressões dos reagentes forem pequenas. Um valor de Q grande significa uma contribuição positiva (desfavorável) para a energia livre da reação. Ao contrário, um Q pequeno (se pressões dos produtos forem pequenas ou se pressões dos reagentes forem grandes) significa uma contribuição negativa (favorável) para a energia livre da reação. Ou seja, para $Q > 1$, tem-se $+\Delta G$; para $Q < 1$, tem-se $-\Delta G$; e para $Q = 1$, tem-se $\Delta G = 0$.

Para toda reação química em determinada temperatura, existirão pressões parciais ou, para generalizar, potenciais químicos (μ) de produtos e reagentes para os quais o sistema entra em equilíbrio. Neste caso, Q é usualmente escrito como K, a constante de equilíbrio, e, sendo $\Delta G_T = 0$ no equilíbrio, a equação 3.2.5 pode ser reescrita na forma abaixo para caracterizar a constante de equilíbrio de uma reação em condições padrão:

$$\Delta G^o = -RT \ln K \quad (3.2.6)$$

Combinando-se as equações 3.2.5 e 3.2.6, tem-se

$$\Delta G_T = -RT \ln K + RT \ln Q = RT \ln \frac{Q}{K} \quad (3.2.7)$$

A determinação experimental da constante de equilíbrio (K) permite o cálculo da diferença de energia livre padrão (ΔG^0). Resolvendo a equação 3.2.6 para K e depois substituindo para ΔG^0 , usando a equação 3.1.12:

$$K = e^{-\Delta G^0/RT} \quad (3.2.8)$$

$$K = e^{(T\Delta S - \Delta H^0)/RT} \quad (3.2.9)$$

A equação da diferença de energia livre de Gibbs (ΔG) foi deduzida a partir da equação dos gases perfeitos, utilizando para cada componente sua pressão molar parcial como o equivalente do potencial químico. No entanto, nos sistemas biológicos, com exceção das trocas gasosas na respiração sistêmica, a pressão parcial de gases deve ser substituída pelo conceito de atividade de solutos como equivalente do potencial químico. Potencial químico, por sua vez, nada mais sendo do que a energia livre molar parcial ($\mu = G$), permite correlacionar a atividade de cada soluto componente da reação com a diferença de energia livre entre o estado atual do soluto e seu estado padrão, conforme as equações abaixo.

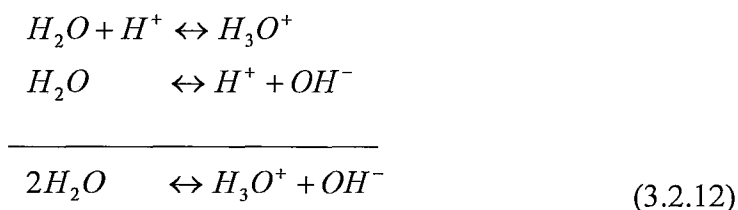
$$\bar{G}_B = \bar{G}_B^0 + RT \ln a_B \quad (3.2.10)$$

$$a_B = e^{(\bar{G}_B - \bar{G}_B^0)/RT} \quad (3.2.11)$$

Em última análise, no entanto, para soluções diluídas, como nos sistemas biológicos, as atividades dos solutos componentes da reação podem ser tomadas como equivalentes das concentrações.

3.2.3 – Energia livre, pH e pK

As moléculas de água normalmente se organizam em aglomerados de 4 ($H_9O_4^+$) ou 21 ($H_{43}O_{21}^+$) moléculas em cujo centro coexistem, de forma dinâmica, o H^+ excedente e um par básico de elétrons, permitindo que esse aglomerado funcione ora como um ácido, doador de próton (cátion hidrônio, representado por H_3O^+ ou H^+), e ora como uma base, receptora de próton (ânion hidroxila, representado por OH^-), além de poder funcionar também como molécula neutra (H_2O). Assim, as moléculas de água podem ceder prótons de duas maneiras: a) como molécula de água propriamente dita que, embora funcionando como um ácido fraco ($pK_a = 15,7$), mantém a onipresença de H^+ graças à sua altíssima concentração (55 M); b) como cátion hidrônio funcionando como ácido forte ($pK_a = - 1,7$). Por seu turno, as moléculas de água podem receber prótons ou como molécula de água propriamente dita, funcionando como base fraca para formar cátion hidrônio, ou como ânion hidroxila, funcionando como base forte para formar água (KYTE, 1995). Nas soluções aquosas diluídas típicas dos sistemas biológicos, as atividades dos íons H^+ e OH^- se identificam com suas concentrações.

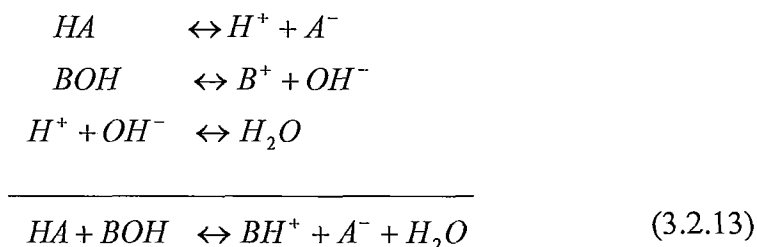


Um composto evidencia sua natureza ácida quando, em solução aquosa, passa a funcionar como doador de prótons para a água que passa a atuar neste caso como base, ou como H_2O transformando-se em H_3O^+ , ou como OH^- transformando-se em H_2O . Os ácidos fortes se dissociam imediata e completamente (K_a elevado e pK_a reduzido), permitindo cálculo direto do pH, já que a concentração de H^+ é a própria concentração do ácido.

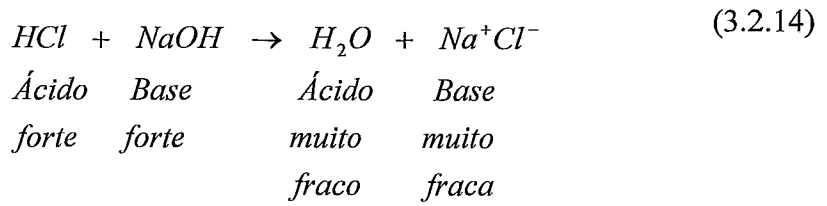
A força de uma base é determinada pela eficiência com que retira prótons da água. A espécie formada pela associação de uma base com prótons da água nada mais é do que o ácido conjugado. Se a base é forte, o ácido conjugado será fraco, ou seja, dificilmente se dissociará, caracterizando o aumento na concentração de OH^- proporcional à concentração da base inicial. Neste caso, do fato de existirem 10^{-7} íons H^+ e 10^{-7} íons OH^- em solução, tem-se a relação $pH = 14 - pOH$. Reciprocamente, a uma base fraca corresponderá um ácido conjugado forte cuja dissociação neutralizará o

aumento de OH^- eventualmente causado pela base fraca. A formação de ácido associado permite definir a força de uma base não só pela constante de dissociação básica (K_b), mas também pela ácida (K_a).

Quando na solução existem ácido e base interagindo, não só a base forma ácido conjugado, mas também o ácido forma base conjugada, envolvendo a água em ambas as etapas. De acordo com a concepção de Bronsted e Lowry, em vez de se tentar encontrar um sal como produto da interação entre ácido e base, deve-se procurar o ácido e a base que interagem num processo de neutralização. Considerando a dissociação do ácido genérico HA e da base genérica BOH, tem-se:

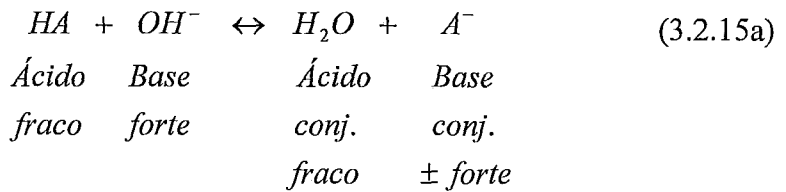


Na titulação de ácido forte (HCl) com base forte (NaOH), o processo de neutralização será completo, já que o grau de reversibilidade da reação é mínimo. No ponto de equivalência, em que $[\text{NaOH}] = [\text{HCl}]$, a mistura apresentará $\text{pH} = 7$, já que na solução, sendo irrelevantes os íons Na^+ e Cl^- , é como se apenas existisse água. Abaixo do ponto de equivalência, $[\text{H}^+]$ se iguala à concentração residual de HCl ainda não neutralizado. Acima do ponto de equivalência, $[\text{NaOH}]$ passa a refletir o excesso de OH^- sobre H^+ . É interessante notar que 95% da quantidade total de álcali, necessária para elevação do pH até 7, se consome quando pH está entre os valores 1 e 3. Nas imediações do ponto de equivalência, a curva de titulação apresenta inclinação máxima, indicando grande variação de pH para pequenos aumentos em $[\text{NaOH}]$. A capacidade de neutralização (*buffering*) é mínima nessa região, sendo ao contrário máxima nas regiões extremas da curva, entre $3 > \text{pH} > 11$.



Na titulação de ácido fraco, como o ácido acético, com base forte, como NaOH, a base forte conjugada reverte a reação, utilizando o H⁺ da água e criando situações em que o pH dependerá não só da quantidade de ácido [HA] que fica sem dissociar (porque é fraco), mas também da quantidade de base conjugada razoavelmente forte [A⁻]. Duas etapas importantes:

a) eliminação por neutralização do H⁺ proveniente do HA, formando H₂O e A⁻:



b) produção progressiva de A⁻ passa a reprimir novas dissociações de HA residual, com reflexo na pequena variação de pH (poder tampão) na faixa próxima ao pK_a:



Neste caso, em que [HA] ≠ [A⁻], a titulação se faz segundo a equação de Henderson e Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conj.}]}{[\text{ácido}]} \quad (3.2.16)$$

ou

$$pH = pK_a + \log \frac{[\alpha]}{[1 - \alpha]} \quad (3.2.17)$$

onde α como coeficiente de ionização corresponde a [A⁻] e (1-α) corresponde a [HA].

A equação de Henderson e Hasselbalch pode ser adaptada para tratamento de ionização de resíduos e de desvio no pK em proteínas,

$$pH = pK^0 + \Delta pK + \frac{1}{n} \log \frac{[\alpha]}{[1-\alpha]} \quad (3.2.18)$$

onde n é o número de moles, correspondente ao número de resíduos ionizáveis (URRY, 1997).

A partir desta última equação, comparada com a equação 3.2.8, é possível estabelecer a correlação entre energia livre e pH / pK (URRY, 1997), lembrando-se que, por definição, $pH = -\log [H^+]$, $pK = -\log K_a$ e $\ln \Delta G^0 / RT = \log \Delta G^0 / 2,3RT$,

$$pH = \frac{\Delta G^0}{2,3RT} + \frac{\Delta \Delta G}{2,3RT} + \frac{1}{n} \log \frac{[\alpha]}{[1-\alpha]} \quad (3.2.19)$$

3.2.4 – Energia livre e potenciais elétricos

Uma espécie iônica “X” que mantenha um gradiente de concentração através da membrana celular, poderá gerar um campo elétrico (polaridade elétrica) através dessa mesma membrana, cuja intensidade (E_x) se identificará com a diferença de energia livre (ΔG), proporcional à constante de equilíbrio dessa espécie iônica., conforme a equação (3.2.6). Esta mesma equação, para o caso de potenciais de equilíbrio iônicos, é conhecida como equação de Nernst

$$E_x = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[X]_e}{[X]_i} \quad (3.2.20)$$

onde R é a constante molar universal (dos gases perfeitos); T é temperatura (+273 graus Kelvin); Z refere-se à carga da espécie iônica (no caso de íons monovalentes como Na e K, Z = 1); F se refere ao número de Faraday, adequado para converter molaridade em

carga elétrica ($F \equiv 10^5 \text{ C}$); $[X]_e$ é a concentração do lado externo e $[X]_i$ a do lado interno da membrana.

Teoricamente, numa célula, a polaridade elétrica através da membrana (E_M) deveria ser o resultado da soma dos potenciais de equilíbrio das diferentes espécies iônicas. No entanto, constata-se que apenas os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) possuem um mecanismo acoplado de transporte ativo, efetuado pela bomba Na/K (a enzima de membrana Na-K.ATPase), contra o gradiente de concentração para cada íon, resultando num efluxo de sódio e influxo de potássio. A enzima Na-K.ATPase, ao hidrolisar a molécula de ATP, utiliza a energia desta molécula para operar mudanças conformacionais que redundam no transporte acoplado dos íons sódio e potássio e na geração dos gradientes de concentração e dos potenciais eletroquímicos relativos a esses dois íons.

O potencial elétrico da membrana em repouso, portanto, será dado pela soma das contribuições relativas aos potenciais de equilíbrio desses dois íons.

$$E_M = E_K + E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_e + [Na]_e}{[K]_i + [Na]_i} \quad (3.2.21)$$

A existência de polaridade elétrica, mantida em equilíbrio dinâmico durante o potencial de repouso (PR), se explica pelo modelo elétrico da membrana no qual o elemento capacitivo se relaciona com a dupla camada lipídica, enquanto o elemento resistivo se relaciona com as condutâncias variáveis dos canais iônicos.

Dessa forma, a contribuição de cada espécie iônica, além da diferença de concentração, depende também do grau da condutância (g) do respectivo canal iônico. Com a introdução do fator condutância (g_{Na} para os canais de sódio e g_K para os canais de potássio), a equação de Nernst passou a ter a forma da equação de Goldman:

$$E_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_e + g_{Na}/g_K [Na]_e}{[K]_i + g_{Na}/g_K [Na]_i} \quad (3.2.22)$$

Em cada situação particular, o potencial elétrico da membrana (E_M), em função das variações na relação g_{Na}/g_K , passa a oscilar entre os valores limites relativos aos

potenciais de equilíbrio do potássio ($E_K \cong -100 \text{ mV}$) e do sódio ($E_{Na} \cong +50 \text{ mV}$).

Pela observação da equação (3.2.22), pode-se constatar:

- a) quando $g_K \gg g_{Na}$, como no potencial de repouso, E_M tende para E_K , gerando uma polaridade de -100 mV (interior negativo), correspondente a um campo elétrico, orientado de fora para dentro, com intensidade $\cong 10^7 \text{ V/m}$;
- b) quando $g_{Na} \gg g_K$, como na despolarização do potencial de ação, E_M tende para E_{Na} com uma taxa de 10 V/s , gerando o pico em agulha, dependente de sódio;
- c) num mesmo organismo, onde logicamente os valores para E_{Na} e para E_K são constantes, células em tecidos diferentes podem apresentar valores diversos para E_M , na medida em que apresentem relações g_{Na}/g_K típicas;
- d) o potencial de repouso oscilante das células marcapasso cardíacas é devido a oscilações na relação g_{Na}/g_K , enquanto o longo platô do potencial de ação miocárdico é devido a inserção de componente g_{Ca} , além da relação g_{Na}/g_K ;
- e) as populações de neurônios cerebrais que disparam em sincronia possuem um padrão comum de canais com outras relações de condutâncias além da relação g_{Na}/g_K .

Durante o potencial de repouso, portanto, a força eletromotriz (*fem*) sobre cada espécie iônica “X” é

$$fem = E_X - E_M \quad (3.2.23)$$

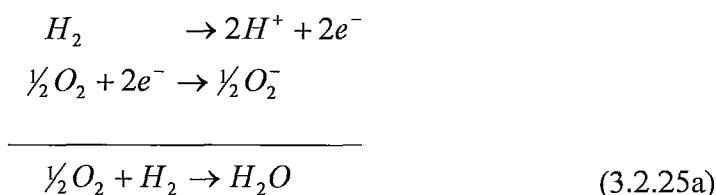
3.2.5 – Energia livre e potencial de redução

Assim como existe a variação de energia livre padrão (ΔG^0), existe também o potencial de redução padrão (E^0) para caracterizar a facilidade de receber elétrons, demonstrada por um aceptor, comparando-a com a de outros aceptores e doadores.

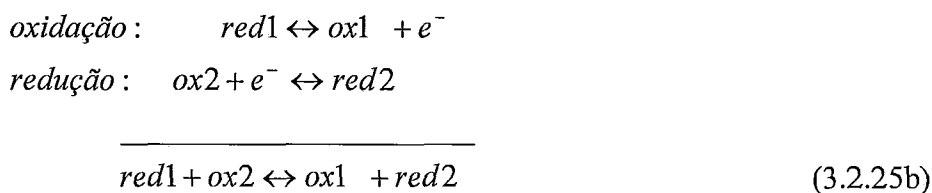
Da equação



retira-se o par redox $2H^+ / H_2$ que é usado como padrão, com um potencial de redução padrão igual a zero, o que corresponde a $[H^+] = 1,0 \text{ M}$ que especifica $\text{pH} = 0$. Esta equação é chamada de “meia célula” de hidrogênio porque a equação completa, uma célula” de oxi-redução, é



No item sobre pH, tratou-se da transferência de prótons e da relação existente entre um ácido (doador de prótons) e sua base conjugada (acceptora de prótons). No presente item sobre reação de oxi-redução, trata-se da transferência de elétrons e da relação existente entre um doador de elétrons ou agente redutor que ao perder elétrons, oxidando-se, permite a um acceptor de elétrons ou agente oxidante receber elétron, reduzindo-se. Assim, uma reação completa (“uma célula”) de oxi-redução é a soma de duas reações conjugadas, sendo uma “meia célula” oxidante e outra “meia célula” redutora:



O potencial redox de qualquer par pode ser calculado a partir da força eletromotriz (fem) da célula elétrica constituída pela “meia célula” do par em questão conectada à “meia célula” do eletródio padrão de hidrogênio anteriormente definido. Um célula eletroquímica opera de forma termodinâmica reversível no seu ponto de equilíbrio potenciométrico. Na reação 3.2.25b, a oxidação de red-1 por ox-2 é espontânea, na medida em que o trabalho elétrico produzido por mol de redutor oxidado corresponde a uma ΔG negativa (variação de energia livre), dada por:

$$-\Delta G = nF\Delta E \quad (3.2.26)$$

onde n é o número de elétrons transferidos, F é a constante de Faraday (23.062 cal/M.V) e ΔE é a diferença de potenciais entre o potencial do agente oxidante e de sua forma reduzida. Por outro lado, sendo $nF\Delta E = RT \ln K$, pode-se escrever a mesma relação na forma da equação de Nernst:

$$\Delta E = \frac{2,3RT}{nF} \log \left[\frac{oxid}{red} \right] \quad (3.2.27)$$

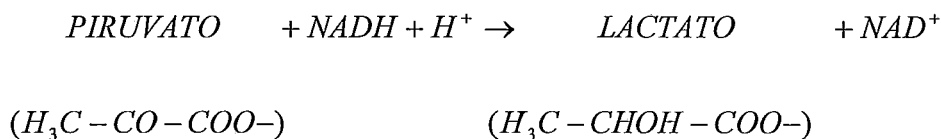
Existem tabelas relacionando valores dos potenciais padrões (E°) para pares redox de relevância biológica, determinados por comparação com o eletródio padrão, ou seja, o par H^+/H_2 , a 25 graus centígrados e $pH = 7$.

No par $2H^+/H_2$, como ficou enfatizado, a forma H^+ é a oxidada ou acceptora de e^- , funcionando como agente oxidante; a forma H_2 , ao contrário, é a reduzida ou doadora de e^- , funcionando como agente redutor. Nas tabelas, o par H^+/H_2 , com $E^\circ = 0$, é tido como referência. Acima deste, em ordem crescente de negatividade, estão localizados os agentes redutores mais fortes. Abaixo, em ordem crescente de positividade, estão localizados os agentes oxidantes mais fortes. Em suma, as tabelas estão organizadas de tal forma que qualquer composto considerado terá, como antecessor, um melhor doador de elétrons e, como sucessor, um melhor acceptor de elétrons.

A seguir, estão mostradas duas equações de meia-célula, com seus respectivos valores de E° , bem como a respectiva reação completa de oxi – redução.

Equação meia-célula	E° (V)	$n = e^-$
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH + H^+$	- 0,320	2
$PIRUVATO + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons LACTATO$	- 0,185	2

Equação célula-completa de oxi-redução:



Esta reação é termodinamicamente espontânea porque o par $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ é mais negativo do que o par piruvato / lactato.

$$\text{No caso, } \Delta E^{\circ} = -0,185\text{V} - (-0,320)\text{V} = +0,135\text{ V} \quad e$$

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} = -(2)(23.062)(0,135) = -6.227 \text{ cal / M.}$$

Uma reação espontânea, de fato, em condição padrão, apresenta ΔG° negativa e ΔE° positivo.

É interessante notar que a seleção natural utilizou a mesma lógica embutida nas tabelas de pares redox para organizar a cadeia de transferidores de elétrons (e transportadores de prótons), localizada em membranas de mitocôndrio e cloroplasto.

Compostos intermediários na cadeia de transferidores de elétrons estão dispostos na membrana interna de mitocôndrios e cloroplastos, de tal modo que, ao mesmo tempo em que os elétrons fluem pelos substratos reduzidos, os prótons são bombeados para fora. Como resultante do fluxo de elétrons, o bombeamento vetorial de prótons através da membrana interna de mitocôndrios ou de cloroplastos cria o gradiente quimiosmótico que funcionará como força protonmotriz (fpm) análoga à força eletromotriz dos potenciais elétricos:

$$f_{pm} = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{[H^+]_e}{[H^+]_i} \right] + E_M \quad (3.2.28)$$

Considerando que $\text{pH} = -\log [H^+]$, a equação anterior pode ser reescrita

$$f_{pm} = \frac{2,3RT}{F}(pH_i - pH_e) + E_M \quad (3.2.29)$$

A membrana mitocondrial, a 37°C, apresentando em média um potencial transmembrana de 0,10 V, caso apresente uma diferença de 3 unidades de pH entre pH_i – pH_e, ter-se-á, segundo a equação anterior

$$f_{pm} = \frac{(2,3) \cdot (1,98) \cdot (273 + 37) \cdot (3)}{23.062} + 0,10 = 0,28 \text{ V}$$

A enzima de membrana ATP-sintetase, caracterizada estruturalmente como o complexo F₀F₁, pode funcionar sintetizando ATP em função do gradiente de concentração de hidrogênio. Isto está de acordo com a hipótese quimiosmótica (MITCHELL, 1961, 1966, RACKER, 1980), segundo a qual a energia liberada durante o transporte de elétrons é conservada como um gradiente eletroquímico de prótons, através da membrana interna mitocondrial (IWATA *et al.*, 1998, SMITH, 1998), onde está inserida a cadeia transferidora de elétrons e também de prótons. Esta energia eletroquímica, representada por um potencial ΔpH acrescentado ao potencial de membrana ΔE_M até atingir um limiar hiperpolarizante de diferença de potencial, apropriado para produzir mudanças conformacionais no complexo F₀F₁, fazendo-o funcionar como ATP-sintetase, única produtora da molécula de ATP, a fonte energética universal de todos os sistemas biológicos.

Caso o gradiente de [H⁺] mude de sentido (pH_e – pH_i), atingindo o limiar despolarizante, o complexo F₀F₁ funcionará como qualquer outra ATPase, hidrolisando ATP.

Na fotossíntese também existe a cadeia transferidora de elétrons e também de prótons, geradora da força proton-motriz da fosforilação (fotossintética ou respiratória) da molécula de ADP para sua transformação em molécula de ATP. A diferença entre os dois processos diz respeito à origem e ao destino do elétron. Na respiração, o elétron entra na cadeia através da molécula NADH, reduzida por hidrogênio proveniente da glicose, e ao final da cadeia passa para o átomo de oxigênio, decaindo de um potencial de redução de –0,4 V até +0,8 V. Na fotossíntese, no modelo mais simples onde só entra

o fotossistema I, o elétron vem da clorofila e precisa ser ativado de um potencial +0,6V até o potencial da ferredoxina (-0,6V), de onde tem uma queda parcial (no segundo segmento da cadeia) até a redução da molécula NADPH (-0,2V). Esta coenzima reduzida será o agente redutor de outras coenzimas na síntese da glicose. Como o elétron da clorofila pode também decair rapidamente para seu estado basal sem reduzir o NADP+, a seleção natural supriu os cloroplastos com o fotossistema II, operando numa faixa mais eletropositiva, capaz de excitar o elétron da água de +1,0 até a coenzima Q (-0,2), daí decaindo parcialmente (no primeiro segmento da cadeia) até o nível em que poderá ser reativado pelo fotossistema II. No seu decaimento parcial, a energia do elétron é conservada como potencial eletroquímico, em decorrência do transporte de H⁺ da matriz do cloroplasto (estroma) para o interior da membrana (espaço tilacóide), diferentemente do mitocôndrio, onde o H⁺ é transportado da matriz para fora da membrana interna.

A bactéria *Halobacterium halobium*, além de ser halofílica (amiga da salinidade), não podendo viver numa concentração abaixo de 3 molar de NaCl (ordinariamente a concentração da água do mar é cerca de 0,6 M), possui também a capacidade de operar com os dois tipos de cadeia (respiratória e fotossintética). Quando em ambiente aeróbico, ela usa a fosforilação oxidativa para produzir ATP. Quando em ambiente anaeróbico, a baixa pressão parcial de oxigênio induz a ativação do gene da rodopsina bacteriana, o pigmento púrpura da membrana interna bacteriana que, por fotoindução, gera o gradiente de próton que permite, através do complexo F₀F₁ (ATP-sintetase), o uso da fosforilação fotossintética para produzir ATP (STOECKENIUS *et al.*, 1977, RACKER, 1980). A primeira etapa desta fototransdução é o que se conhece por fotoisomerização da opsina, o grupo não proteico da enzima rodopsina, sendo o retinal o mais comum (GAI *et al.*, 1998).

A rodopsina bacteriana é o arquétipo dos receptores serpentínicos que, durante a evolução e além da função transportadora de prótons, passaram a funcionar, como a rodopsina da retina humana, de forma associada à proteína G (ADAMS *et al.*, 1998). A utilização do receptor associado a proteína G, a principal entrada para a rede de sinalização (itens 1.2.2 e 2.1.2), em mecanismos aparentemente tão disparatados, mostra como a complexidade é gerada nos sistemas biológicos a partir de processos básicos relativamente simples.

3.3 - ENERGIA LIVRE E DINÂMICA DAS REAÇÕES QUÍMICAS NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Embora o primeiro tratamento de forma estruturada sobre o tema tenha sido a teoria do estado de transição de Eyring, em 1935, certamente os precedentes foram as equações de Arrhenius e de van't Hoff.

3.3.1 – As relações de Arrhenius e van't Hoff

A equação utilizada por Arrhenius é uma relação determinada empiricamente entre a energia de ativação (E_a) e a constante de velocidade ou de taxa da reação (k), na qual k depende da temperatura.

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (3.3.1)$$

Integrando, já que E_a independe de T

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

ou

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (3.3.2a)$$

onde A é o valor da taxa de reação quando a energia de ativação é zero. É possível obter graficamente o valor da energia de ativação de uma reação, fazendo o gráfico de $\ln k$ versus $1/T$. A inclinação da curva é igual a $(-E_a/R)$. Embora ainda não se caracterize formalmente a estrutura do estado de transição, já se pode calcular o equivalente da energia livre de ativação dos reagentes (E_{ar}) e dos produtos (E_{ap}) cuja diferença dá o equivalente da diferença de energia livre de ativação (ΔE).

Na relação de van't Hoff, em vez da constante de taxa da reação (k), é usada a constante de equilíbrio (K), e, em vez da energia de ativação, é usada a entalpia (ΔH):

$$K = Ae^{-\Delta H/RT} \quad (3.3.2b)$$

Numa reação exotérmica, sendo a entalpia negativa e os produtos tendo menor entalpia que os reagentes, a elevação de temperatura favorece os reagentes, reduzindo o valor da constante de equilíbrio (numa reação endotérmica, invertem-se as posições).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT \ln A - RT \ln K \quad (3.3.3)$$

onde ΔH independe de T .

Nas temperaturas T_1 e T_2 ,

$$\ln K_2 = -\frac{\Delta H}{RT_2} + \frac{\Delta S}{R} - \ln A$$

$$\ln K_1 = -\frac{\Delta H}{RT_1} + \frac{\Delta S}{R} - \ln A$$

ou,

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3.3.4)$$

No gráfico de $\ln K$ versus $1/T$, a inclinação da curva dá a diferença de entalpia (ΔH) a partir da medida de K (para reagentes ou para produtos) entre duas temperaturas diferentes.

3.3.2 –Teoria do estado de transição de Eyring

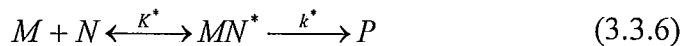
A estruturação dos princípios básicos dessa teoria encontra-se em GLADSTONE *et al.* 1941.

Estado de transição ou complexo ativado é um composto instável, com curtíssimo tempo de vida, da ordem de pico a femtossegundos, ocupando na coordenada de reação o ponto de máxima energia livre.

Uma equação geral do tipo



onde k é a constante da taxa (velocidade) de reação, pode ser reescrita, levando em conta a existência de um estado ativado intermediário (MN^*), da constante de equilíbrio (K^*) entre esse estado intermediário e os reagentes (M e N), bem como de uma taxa de reação (k^*) que define a evolução do estado intermediário para o produto (P).



$$\frac{dP}{dT} = k^* K^* [M][N] \quad (3.3.7)$$

Na verdade, K^* e k^* não são valores mensuráveis, mas se relacionam com a taxa da reação (k), medida experimentalmente.

A constante de equilíbrio (K^*), no caso relacionada ao complexo ativado, é definida em analogia com a equação 3.2.8:

$$K^* = e^{-\Delta G^*/RT} \quad (3.3.8)$$

onde ΔG^* corresponde à energia livre de ativação.

Por seu turno, k^* pode ser definido como o fator de transmissão, ou seja, como a probabilidade do complexo ativado evoluir para produto, o que depende dos movimentos vibratórios do complexo e, em última análise, se identifica com o fator de frequência universal

$$k^* = \frac{k_B T}{h} \quad (3.3.9)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e h é a constante de Planck.

Sendo $k = k^* K^*$, pode-se escrever

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^*/RT} \quad (3.3.10)$$

de onde se retira a forma usualmente utilizada para a energia livre de ativação

$$\Delta G^* = -RT \ln \frac{kh}{k_B T} \quad (3.3.11)$$

A equação 3.3.10, costuma ser reescrita, como,

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{(T\Delta S^* - \Delta H^*)/RT} \quad (3.3.12)$$

Na progressão da reação, constata-se que a diferença da energia livre entre reagentes e produtos (ΔG_{rp}) é igual à diferença entre as respectivas energias de ativação (G_r^* e G_p^*)

$$\Delta G_{rp} = G_p^* - G_r^* \quad (3.3.13)$$

3.3.3 – Formulações de Marcus e Prigogine

Baseado em princípios básicos da termodinâmica e da dinâmica molecular, MARCUS (1985) desenvolveu a partir da década de 50 os conceitos empíricos de Kramers, segundo os quais para o entendimento da constante de taxa da reação deve ser levado em conta o efeito friccional do solvente, o meio circundante que funciona como interface entre as espécies químicas nas transferências de elétrons.

A taxa de transferência de elétron (k) se relaciona com a diferença de energia livre de Gibbs entre o doador e o acceptor de elétron (ΔG^0) e a energia de reorganização (λ) do meio molecular, afim de permitir trocas isoenergéticas de elétrons.

Apesar de limitada teoricamente à interação fraca, resultante de pequena interpenetração dos orbitais eletrônicos, e aos processos estatísticos de quase equilíbrio, a formulação de Marcus tem sido aplicada com sucesso a problemas de transferência de elétrons, tanto em química quanto em biologia:

$$k = A \left(\frac{-\Delta G^*}{k_B T} \right) \quad (3.3.14)$$

$$\Delta G^* = W_r + \frac{(\Delta G^0 + W_p - W_r + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (3.3.15)$$

$$\lambda = \lambda_0 + \lambda_i \quad (3.3.16)$$

onde A é o fator de Arrhenius, ΔG^* é a diferença de energia livre de ativação, k_B é a constante de Boltzmann, T é temperatura, ΔG^0 é a diferença de energia livre da etapa elementar de transferência de elétron. Nessa etapa elementar, em que $-e\eta$ se refere ao eletródio (η sendo o potencial elétrico correspondente), λ_0 e λ_i correspondem às energias de reorganização do solvente, respectivamente para a esfera exterior e interior de elétrons, W_r é o trabalho necessário para aproximar os dois reagentes, ou o reagente e o eletródio, bem como W_p é o termo correspondente para os produtos (TRIBUSCH, POHLMANN, 1998).

A energia de reorganização do solvente deve se relacionar com o parâmetro controle (λ) de Prigogine, introduzido como o parâmetro intrínseco do sistema passível

de modificação por imposições do meio (forçando o sistema para funcionar fora do equilíbrio e introduzindo não-linearidade), na expressão matemática da evolução no tempo de um conjunto de variáveis de estado $\{X_i\}$ (NICOLIS, PRIGOGINE, 1989):

$$\frac{\partial X_i}{\partial t} = F_i(\{X_j\}, \lambda) \quad (3.3.17)$$

Aliás, a influência de Prigogine vai muito além do parâmetro controle, ao apontar para a possibilidade de um modelo universal (*brusselator*) que, fundamentado na dinâmica não-linear de sistemas dissipativos funcionando fora do equilíbrio, pode dar conta dos mecanismos comuns geradores de complexidade, refletindo a dependência específica da estrutura das funções $\{F_i\}$, em relação aos diferentes processos subjacentes a esses sistemas, estejam eles nas células de convecção de Bénard, na reação química de Belousov-Zhabotinski, na agregação das amebas *Dictyostelium discoideum* ou na padronização espaço-temporal da morfogênese orgânica. Como sistemas abertos, trocando massa e/ou energia com o meio, os sistemas naturais funcionam geralmente evoluindo do estado de equilíbrio para um estado fora do equilíbrio termodinâmico.

Na verdade, o estado macroscópico de um sistema real $X(t)$, estando submetido continuamente a perturbações $x(t)$, oriundas tanto de flutuações intrínsecas do próprio sistema quanto de imposições friccionais do meio, estará sempre se desviando do estado de referência X_s , cujas variáveis de estado (X_i) representam médias de estados instantâneos ou valores mais prováveis que poderão atingir, em função do tempo:

$$X(t) = X_s + x(t) \quad (3.3.18)$$

Com relação à utilização das duas equações anteriores, considere-se como exemplo a reação Belousov-Zhabotinski. Seja X_s a variável de estado representando as concentrações de reagentes no estado estacionário, independente de estar sob regime linear ou não-linear. Seja λ o parâmetro controle ou a imposição experimental representada pelo tempo de residência dos reagentes. Num mecanismo do tipo $A \leftrightarrow X$

$\leftrightarrow D$, X_s evoluirá como $dX/dt = \lambda - kX_s$ e, estando num estado estacionário ($\lambda - kX_s = 0$), ter-se-á $X_s = \lambda/k$.

Quando o tempo de residência dos reagentes for muito longo ($\lambda > \lambda_2$), o sistema passa a funcionar em equilíbrio termodinâmico, evidenciando um comportamento linear cuja caracterização usualmente é obtida com apenas dois pontos e a extrapolação para o zero de origem. Quando o tempo de residência é muito curto ($\lambda < \lambda_1$), o sistema passa a funcionar fora do equilíbrio, evidenciando também linearidade, de tal forma que as duas regiões definidas por $\lambda_1 > \lambda > \lambda_2$ estão na mesma situação anterior. No entanto, na região definida por $\lambda_1 < \lambda < \lambda_2$, o sistema funciona em regime de biestabilidade, podendo oscilar entre os estados de equilíbrio e não-equilíbrio, em função de valores limiares em λ .

O comportamento biestável, com estados dinâmicos (*steady states*) distintos, correspondentes a condições de estimulação sub e supraliminar, é característico de autômato celular regido pela função booleana $F(X)$, segundo equação

$$X_{t+1} = F(X_t) \quad (3.3.19)$$

As variáveis booleanas mudam sincronizadamente de valores e em etapas discretas de tempo, de tal forma que a taxa de variação de $F(X)$ é muito pequena quando $0 < X < X_0$ (X e F são iguais a “zero”), enquanto a variação de $F(X)$ rapidamente satura num valor de F_{\max} quando $X > X_0$ (X e F são iguais a “um”), num comportamento típico de cooperatividade (autocatálise) e de ultra-sensitividade biológicas.

Se a reação BZ ocorrer sem agitação magnética, prevalece a heterogeneidade espacial com frentes de ondas que geram padrões espaço-temporais e se propagam por distâncias macroscópicas, transmitindo mensagens emitidas pela reação química a partir do ponto de origem do padrão global, num comportamento típico do desenvolvimento embrionário e da morfogênese do organismo.

De forma análoga, pode ocorrer o fenômeno de bifurcação, em função de um valor limiar (λ_c). O sistema que vem funcionando num regime de equilíbrio termodinâmico, no momento crucial de transição, quando $\lambda = \lambda_c$, ao passar por fase caótica tem de escolher novas alternativas entre permanecer no estado instável e/ou evoluir para estados estáveis. A instabilidade associada ao caos permite ao sistema explorar continuamente seu espaço de estado, gerando informação e complexidade.

Numa representação mecânica ou química de estabilidade local e instabilidade global, um estado $X(t)$ permanece na vizinhança do estado de referência X_s para perturbações subliminares, mas ultrapassa X_s para perturbações supraliminares. Um objeto móvel, seja uma bola ou um reagente químico, com uma quantidade de energia cinética subliminar permanecerá no primeiro vale ou poço, mas com aumento de energia cinética até a condição supraliminar, poderá ultrapassar a barreira para o segundo vale ou poço.

Retornando à equação 3.3.18, sua representação pode ser feita pela representação de uma variável de estado X_1 (de um estado de referência X_s), com suas respectivas perturbações, em função do tempo, ou pela representação de duas variáveis de estado, X_1 e X_2 , uma contra a outra, caracterizando assim o espaço de fase. (O espaço de fase é análogo ao plano de fase que, considerando uma perturbação tipo onda elétrica, é obtido pela representação da diferença de potencial (V) contra sua derivada (dV/dt) e que, para uma senóide, gera uma órbita circular caracterizada como figura de Lissajous). Nos dois casos em questão, a variável X , quando não perturbada (estado de referência X_s), gera um ponto concêntrico no espaço de fase, enquanto as perturbações de X_s geram trajetórias orbitais no espaço de fase. A evolução temporal do estado de referência gera uma estabilidade orbital e trajetórias convergindo para um atrator.

Em vez de atrator, pode ocorrer a formação de ciclo limite, quando as trajetórias divergem do ponto central. Como tal divergência não pode levar ao infinito (implicaria transporte infinito de matéria ou energia), as trajetórias terminam numa curva fechada, apresentando estabilidade assintótica e comportamento periódico no tempo. Neste caso o ciclo limite também é um atrator periódico e, na medida em que resiste às perturbações, pode se constituir no arquétipo natural de modelos (como o brusselator) para descrever os fenômenos cíclicos observados na natureza (como o ciclo celular, a ser tratado no item 5.4.2).

3.3.4 – Meio ativo e auto-organização dinâmica

A energia de reorganização do meio, intuída por Kramers, adotada por Marcus e desenvolvida por Prigogine, inicialmente tratando apenas da interação fraca, resultante de pequena interpenetração dos orbitais eletrônicos, posteriormente passou a ser considerada no âmbito da interação forte, envolvendo trabalho de transferência de elétrons na esfera interna (nucleofílicos), próprio de processos de transferência coordenativa. Neste tipo de processo, onde o doador passa por estados transitórios de

ligações que, moduladas pelo meio, induzem alta reatividade, resultante da diminuição de entropia devido ao aumento da ordem eletrônica molecular. Em tais processos, o tratamento clássico, que considera as densidades coletivas de estado de um eletródio e o comportamento estatístico molecular de suas constantes de taxa de reação, deve ser complementado pelo tratamento do ambiente químico localizado com sua capacidade de estabelecimento de ligações transitórias dinâmicas.

Assim, um meio passivo, contando apenas com as flutuações térmicas ou engajado apenas em auto-organização passiva, não é mais a única opção de modelo. Sendo o fluxo de elétrons um processo de não equilíbrio, ele está sujeito a condições não-lineares de termodinâmica irreversível onde se torna possível a auto organização dinâmica (TRIBUTSCH, POHLMANN, 1998).

A dinâmica das reações biológicas (enzimáticas) é típica de fase condensada onde o “solvente” que envolve o sítio ativo é uma região altamente organizada de uma proteína cuja arquitetura influencia o comportamento químico no sítio ativo. Um dos modelos mais estudado é o da rodopsina bacteriana que, sob ação da luz visível, desenvolve uma força próton-motiva que promove a síntese de ATP (ver item 3.2.5). Como na rodopsina da retina humana, o cromóforo que absorve luz é a molécula chamada retinal que está ligada covalentemente à proteína através de uma base de Schiff protonada. A fotoisomerização da molécula retinal se dá, após excitação fotônica, da forma *all-trans* para a forma *13-cis*, com a reversão espontânea desta última para a posição original *all-trans*. A propensão para fotoisomerizar-se é intrínseca à molécula de retinal, mas estudos comparativos do processo em proteína e em solução mostram que a arquitetura da proteína que contém a molécula de retinal aumenta em mais de 60% a eficiência e a seletividade da reação (GAI *et al.*, 1998).

A transferência ordinária de elétrons, fora do contexto enzimático, é conduzida por excitação flutuacional, sendo retardada por interação friccional passiva com o meio. A transferência auto-organizada de elétrons, no contexto enzimático, retira energia do meio (fase condensada no sítio ativo) ativado temporariamente através de armazenamento de energia conformacional (mudança de conformação e redução de entropia). Durante a relaxação do elétron, após excitação fotônica, parte da energia liberada fica armazenada temporariamente no meio, causando a fricção negativa que acelera a passagem eletrônica pela barreira potencial. Formas das distribuições de probabilidades dentro do vale ou poço potencial: a distribuição próxima do equilíbrio, semelhante à distribuição de Boltzmann, comparada com a distribuição distante do

equilíbrio, própria do complexo ativado auto-organizado. Como será visto no item 4.2.2, em se tratando de pontes de H com baixa barreira energética, a forma rasa da distribuição aumenta a probabilidade do sistema cruzar a barreira da energia de ativação. (TRIBUTSCH, POHLMANN, 1995, 1996 e 1998).

CAPÍTULO 4

ESTRATÉGIA CELULAR PARA INTERCONVERSÕES DE ENERGIA LIVRE

Antes da realização da reação química conhecida como Belousov-Zhabotinski (BZ), já referida no item 3.3.3, acreditava-se que todo sistema representativo de reações químicas evoluiria para um estado homogêneo e independente de tempo, próprio de equilíbrio termodinâmico. No entanto, essa reação, sob certas condições de não-equilíbrio, apresenta um espectro de comportamentos inesperados, tais como de relógio, de biestabilidade e de padronização espacial, anteriormente creditados apenas a sistemas biológicos (NICOLIS, PRIGOGINE, 1989).

Na reação BZ, o sistema experimental funciona como um sistema aberto, com o eficiente controle do fluxo de substâncias garantido por agitação magnética que, além disso, mantém a homogeneidade espaço-temporal da solução. A manutenção do sistema fora do equilíbrio é controlada por variações na taxa de bombeamento para dentro ou para fora, definindo assim o tempo de residência das substâncias: por longo período, o sistema tende para o equilíbrio termodinâmico, permitindo o cálculo da constante de equilíbrio; por curto período, o sistema passa a funcionar num estado estacionário fora do equilíbrio e a gerar, como um relógio químico, oscilações que se manifestam também em padrões espaciais, refletindo a dinâmica intrínseca do sistema, modulada por condições experimentais extrínsecas. O comportamento desse relógio químico se assemelha ao comportamento dos relógios biológicos, independente de se manifestar na mudança de conformação de um biopolímero, na replicação do DNA, na reprodução celular ou na morfogênese de um organismo.

A semelhança entre relógio químico e biológico, no entanto, não é compartilhada por uma simplificação de relógio físico, como o pêndulo, relógio convencional. Este sistema demonstra uma dinâmica reversível, permanecendo a estrutura de suas equações invariável com a reversão do tempo, e um comportamento conservativo, acomodando seu ritmo a um novo equilíbrio em resposta a perturbações. Ao contrário, os sistemas químicos e biológicos, em resposta a perturbações, alteram transitoriamente o padrão de seus ritmos, retomando-o com a remoção da causa da

perturbação. Desta forma, demonstram um comportamento irreversível (a estrutura de suas equações se modifica com a reversão do tempo) e dissipativo (através de parâmetros controle, mecanismos autocatalíticos não-lineares interagem com imposições friccionais do meio, mantendo flutuações fora do equilíbrio).

Se a reação BZ ocorrer sem agitação magnética, prevalece a heterogeneidade espacial com frentes de ondas que geram padrões espaço-temporais e se propagam por distâncias macroscópicas, transmitindo mensagens emitidas pela reação química a partir da origem do padrão global, num tipo de comportamento que lembra o do desenvolvimento embrionário e da morfogênese do organismo.

É importante notar, porém, que separando um sistema químico e um sistema biológico existem vários níveis hierárquicos de organização, além da autopoiese (MATURANA, VARELA, 1980) que representa uma verdadeira emergência biológica, evoluída a partir da autocatálise, pois que naquela ocorre transcrição gênica, ou seja, a ativação de genes com a consequente produção de proteínas.

Na descrição da estratégia celular para interconversões de energia livre, tendo já um esboço de roteiro traçado no capítulo anterior, e conservando uma linha evolutiva, tratar-se-á primeiro do papel da mudança conformacional nos polímeros e depois da relevância da catálise nos biopolímeros informacionais.

Tradicionalmente o problema de mudança conformacional tem sido apresentado como se fosse próprio apenas das moléculas de proteínas (*the protein folding problem*), mas atualmente o domínio desse problema começa a estender-se também aos ácidos nucléicos, já estando de forma irrestrita associado às moléculas de RNA no que tange à estrutura terciária e às interações com o solvente, bem como às moléculas de DNA no que tange às mudanças na tensão helicoidal.

Com relação ao problema da catálise biológica, obviamente, as proteínas são os mais eficientes e específicos catalisadores. No entanto, a partir do final da década de oitenta, com a descoberta das ribozimas, a plataforma catalítica dos ácidos nucléicos começou a ser considerada no âmbito da tecnologia não só *in vivo* mas também *in vitro*.

4.1 – PAPEL DA MUDANÇA CONFORMACIONAL NAS INTERCONVERSÕES DE ENERGIA LIVRE

Na relação entre mudança conformacional e conversão entre formas de energia livre, não se pode mais separar a problemática relativa a proteínas e a ácidos nucleicos. Por exemplo, como se verá abaixo, os tipos de interações a curta e a longa distância que definem a formação de α -hélice e de β -fita, ou a eventual transição de α -hélice para β -fita, verificam-se também na formação de estrutura secundária e terciária das moléculas de RNA transportador. Já existem estudos comparando a estrutura catalítica de proteína, esqueleto tipo amida com suas ligações ϕ e ψ , com a estrutura catalítica de ácidos nucleicos, esqueleto tipo fosfodiéster com suas ligações ϕ , ψ e χ (TARASOW, EATON, 1998, KOOL, 1998).

4.1.1 –Parâmetros termodinâmicos e cinéticos

No estudo da mudança de conformação (*folding*) dos biopolímeros costuma-se dividir o problema numa parte termodinâmica, tratando do equilíbrio entre as fases, e numa parte cinética, tratando das fases de transição, no caminho da reação (CREIGHTON, 1990, LAURENTS, BALDWIN, 1998,). Como o tempo não é uma das variáveis termodinâmicas, cabe à cinética interessar-se pelo processo da transição do estado nativo (estado F, de *folded* ou contraído) para um outro estado desnaturado (estado U, de *unfolded* ou distendido) e vice-versa (*refolding*).

Em situações experimentais (WILF, MINTON, 1981, JENNINGS *et al.*, 1991, YUAN *et al.*, 1998, DUAN *et al.*, 1998, TÖLGYESI *et al.*, 1999), a transição do estado F para o estado U ocorre quando, a partir de uma solução apropriada para o estado F, o aumento na concentração de desnaturante ($[d]$) ultrapassa o limiar conhecido como ponto médio ($[d]_{1/2}$). Ao contrário, quando, numa solução típica que levou ao estado U, a redução na concentração de desnaturante cair abaixo do ponto médio, haverá a transição do estado U para o estado F. A constante de equilíbrio $K_{FU} = [U]/[F]$, conforme a equação 3.2.6, define a diferença de energia livre entre os estados, segundo a equação

$$\Delta G = -RT \ln K_{FU} \quad (4.1.1)$$

A passagem para o estado U é detectada através de métodos físicos de análise, por exemplo, a espectroscopia de fluorescência com utilização do resíduo triptofano como fluoróforo (emissão entre 308-340nm quando no interior da conformação F e entre 340-350nm quando exposto ao solvente na conformação U (MATOUSCHEK, FERSHT, 1991). Graficamente, em lançamento de F (intensidade de fluorescência) versus d (concentração de desnaturante), além da variação de energia livre em presença de desnaturante (ΔG_{FU}) é possível também determinar a variação de energia livre em solução normal (ΔG_{FU-H_2O}), desde que se leve em conta um parâmetro ($m = -\partial\Delta G_{FU}/\partial[d]$) que descreva a influência da concentração do desnaturante.

$$\Delta G_{FU} = \Delta G_{FU-H_2O} - m[d] \quad (4.1.2)$$

A medida de parâmetros cinéticos da transição entre os estados, bem como a identificação de estados intermediários podem ser efetuadas em experimentos envolvendo duplo salto na variação da concentração de desnaturante (EFTINK, SHASTRY, 1997). No primeiro salto para a região onde $[d] > [d]_{1/2}$, mantém-se o biopolímero em condições desnaturantes até que todas as conformações se separem. Posteriormente, no segundo salto para região onde $[d] < [d]_{1/2}$, na medida em que as conformações retornam ao estado F com velocidades diferenciadas, é possível medir a constante de tempo (τ) da transição entre os dois estados, bem como caracterizar as constantes de tempo de *refolding* para outros estados intermediários.

No gráfico ($\log \tau^{-1}$) versus $[d]$, verifica-se que $\tau^{-1} = k_U$ quando $[d] > [d]_{1/2}$, enquanto $\tau^{-1} = k_F$ quando $[d] < [d]_{1/2}$, de tal forma que

$$\tau^{-1} = k_U + k_F \quad (4.1.3)$$

A diferença de energia livre para o estado de transição, logicamente coincide com a equação 3.3.11 referente à teoria do estado de transição de Eyring:

$$\Delta G_{FU}^* = -RT \ln k \left(\frac{h}{k_B T} \right) \quad (4.1.4)$$

4.1.2 – Mudança conformacional se estende aos ácidos nucleicos

Hoje em dia já se nota um deslocamento de paradigma do gene isolado para o genoma com arquitetura de sistemas (SHAPIRO, 1999). No contexto da teoria genética reducionista, falar em rede genética levava o pensamento para genes isolados, circunscritos a regiões codificantes de proteína na molécula de DNA. No contexto das redes epigenéticas, falar em rede genômica leva o pensamento para todas as regiões, codificantes e não codificantes, da cromatina, o mega complexo nucleoprotéico que, semelhante à CPU de um hipercomputador (a célula), alimentada pela rede metabólica, a cada instante integra os *outputs* da rede de sinalização e se ajusta a novas imposições do meio, através de reestruturações a nível de *hardware*, operadas pela rede mecânica..

RNA folding problem

Mesmo nas células procarióticas e eucarióticas do atual mundo do DNA, em que o processo de tradução ocorre normalmente no complexo ribossômico, ficou demonstrado (NITTA *et al.*, 1998) que é possível para uma molécula de RNA (RNA ribossômico 23S de *Escherichia coli*), na ausência das demais proteínas do complexo ribossômico, catalisar a formação de ligações peptídicas entre aminoácidos. Essa molécula de RNA atua de forma modular, com os vários módulos interagindo entre si para a criação de um centro catalítico, à semelhança de proteínas com múltiplos domínios, reforçando a hipótese segundo a qual os genes teriam surgido como pequenos motivos de RNA (TATENO *et al.*, 1997) que, como domínios estruturais autônomos (*autonomously folding domains*), passaram a se aglomerar de forma hierárquica (*hierarchical RNA self-assembly*). Posteriormente, com o surgimento da transcriptase reversa, foram retrotranscritos para moléculas de DNA, cuja estrutura em dupla hélice estável permitiu a evolução do mundo do RNA para o mundo do DNA. Na medida em que o mundo protéico evoluía a partir do mundo do RNA, complexos riboprotéicos começaram a se formar, geralmente dependentes de metais, como a holoenzima ribonuclease P, cujo poder catalítico se exerce na maturação de moléculas de pré-RNAs, ou como o complexo ribossômico, a máquina da fase de tradução do

código genético. No entanto, o estudo da estrutura e da atividade enzimática das moléculas de RNA não tem acompanhado o das moléculas de proteína.

Só recentemente, vindo acrescentar-se às estruturas cristalinas de tRNA e da *hammerhead ribozyme* (de 50 a 70 nucleotídeos), foi apresentada a estrutura cristalina, com 160 nucleotídeos e resolução de 2,8 Angstrom, do domínio P4-P6 do *self-splicing intron* de *Tetrahymena thermophila* (CATE *et al.*, 1996a e 1996b, KOLK *et al.*, 1998). A estrutura primária das moléculas de RNA é definida pela sequência de ribonucleotídeos, conforme transcrição a partir da hélice molde de DNA (no mundo do DNA, esta é a única forma de origem). A estrutura secundária é definida pelo emparelhamento convencional WC (Watson-Crick) de bases, gerando regiões em dupla hélice e com alças (*loops*) decorrentes desse emparelhamento. A estrutura terciária é definida pela compactação resultante da aproximação entre regiões de estrutura secundária, sem rearranjos nessa estrutura e com motivos recorrentes, tais como zíper de riboses, alça GNRA e plataforma A-A. O zíper de riboses se forma graças a pontes de H entre grupos OH-2' da ribose e bases no sulco menor, promovendo aproximação entre regiões distantes. A alça GNRA, onde N é qualquer base e R pode ser G ou A, forma uma estrutura de encaixe cujas regiões receptoras contêm a plataforma A-A. A plataforma Adenina / Adenina surge graças ao favorecimento energético das purinas (A e G) durante o empilhamento de bases, juntamente com a minimização de rupturas estéricas.

As mesmas injunções termodinâmicas e cinéticas que condicionam a estruturação e funcionamento do DNA, bem como todas as interações com proteínas DNA-ligantes na formação de complexos, também estão presentes quando se trata da estruturação e funcionamento do RNA ou na formação de complexos riboprotéicos.

Um exemplo marcante dessa unificação na estruturação e funcionamento dos complexos nucleoprotéicos é a atividade da topoisomerase I no processo de *splicing* (excisão de íntrons) no RNA, além de sua bem conhecida atividade como reguladora de tensão helicoidal no DNA na replicação, transcrição e recombinação, bem como de outras atividades menos conhecidas, tais como formação de cromossomos, fator de transcrição e até de proteína quinase (STRAUB *et al.*, 1998).

Linking number (Lk) e tensão helicoidal no DNA

Na década de 60, a forma circular de moléculas de DNA, principalmente do vírus polioma, despertou a atenção de vários grupos, não só de biólogos mas também de biomatemáticos (para revisão ver BATES, MAXWELL, 1993). Uma molécula convencional de DNA, linear em dupla hélice, pode se fechar num círculo ao ter suas extremidades (W-3'/ C-5' e W-5'/ C-3') ligadas de modo covalente através de ligação fosfodiéster. No momento da ligação, as moléculas podem estar estabilizadas em três estados:

- a) moléculas relaxadas na conformação normal, com número de giros entre as hélices (*linking number*, Lk) formando turnos ou passos (h) de aproximadamente 10,5 pares de bases (bp);
- b) moléculas super-helicoidizadas (*supercoiled*) positivamente, tendo sofrido torções dextrógiras (mesmo sentido de enrolamento das hélices na forma B-DNA) em torno do eixo da dupla hélice (*twisting number*, Tw);
- c) moléculas super-helicoidizadas negativamente, tendo sofrido torções sinistrógiras.

Após se fechar em círculo, as moléculas previamente relaxadas apresentam a aparência circular (forma circular relaxada com baixo coeficiente de sedimentação na eletroforese), enquanto as moléculas super-helicoidizadas apresentam forma compactada (alto coeficiente de sedimentação na eletroforese), já que regiões de dupla hélice se enrolam, com o eixo da dupla hélice se espiralizando no espaço (*writhing number*, Wr). Em uma tese de doutorado, J. H. White demonstrou a seguinte relação (teorema Calugareanu-White)

$$Lk = Tw + Wr \quad (4.1.5)$$

Na situação em que o eixo da dupla hélice esteja no plano (Wr=0), tem-se Lk=Tw. No entanto, embora seja esta uma situação ideal, existe uma situação especial em que o eixo da molécula de DNA está repousando sobre a superfície de uma esfera, e temos ainda Wr=0 (alguma analogia com o DNA circundando o nucleossomo, como se verá abaixo). Na realidade, sempre existe um ΔWr relativo ao ajuste torcional exigido pela correta ligação das extremidades. Por isso, surge a necessidade, aparentemente sutil

em se tratando de moléculas com número total de bases (N) muito grande em relação ao número de bases do passo (h), de distinguir dois tipos de Lk:

- a) $Lk_m \cong N/h$, quando há aproximação para o inteiro mais próximo (o verdadeiro Lk é um inteiro), sem levar em consideração o ΔW_r ;
- b) $Lk^0 = N/h$, sem aproximação, incluindo portanto o ΔW_r .

Define-se o grau de helicoidização (ΔLk) pela relação

$$\Delta Lk = Lk_m - Lk^0 \quad (4.1.6)$$

Na determinação da energia livre, associada ao topoisômero mais comum na forma circular relaxada, deve-se levar em conta o pequeno deslocamento angular ($\omega = \Delta W_r$) correspondente a $Lk_m - Lk^0$ ($-0,5 < \omega < 0,5$) Considerando a energia livre deste topoisômero como proporcional ao quadrado do deslocamento, segundo a lei de Hooke, tem-se:

$$G(Lk_m) = k\omega^2 \quad (4.1.7)$$

Outras formas de topoisômeros ($Lk_{(x)}$) na distribuição podem ser comparadas a Lk_m :

$$\Delta Lk_{(x)} = Lk_{(x)} - Lk_m \quad (4.1.8)$$

A energia livre dessas outras formas ($Lk_{(x)}$) será dada por

$$G[Lk_{(x)}] = k(\Delta Lk_{(x)} + \omega)^2 \quad (4.1.9)$$

A diferença de energia livre entre as duas espécies de conformação, comparando o grau de *supercoiling* (ΔG_{sc}), será

$$G(Lk_{(x)}) - G(Lk_m) = \Delta G_{sc} = -RT \ln \frac{[Lk_{(x)}]}{[Lk_m]} \quad (4.1.10)$$

e,

$$\Delta G_{sc} = k \left[(\Delta Lk_{(x)} + \omega)^2 - \omega^2 \right] \quad (4.1.11)$$

Se ΔLk é grande (alto grau de *supercoiling*), ω se torna insignificante e o valor de ΔLk passa a se identificar indiferentemente com $(Lk_{(x)} - Lk_m)$ ou com $(Lk_{(x)} - Lk^0)$. Neste caso, a equação anterior pode ser reescrita:

$$\Delta G_{sc} = k (\Delta Lk_{(x)})^2 \quad (4.1.12)$$

A presença de enzimas topoisomerases reduz as conformações super-helicoidizadas a conformações relaxadas. A enzima topoisomerase I se liga de forma covalente a um fosfato de uma hélice de DNA e, conservando a energia do fosfato, quebra de forma reversível a ligação fosfodiéster, cortando a hélice correspondente, de tal modo que desaparece a contribuição de W_r , responsável pela compactação. Já a topoisomerase II é ativada por hidrólise de ATP e, com mais energia disponível, liga-se à dupla hélice, cortando ambas e desfazendo a forma circular, ou religando-as em condições de recombinação (GUO *et al.*, 1997, RINGROSE *et al.*, 1998) ou de fixação a substratos do arcabouço cromossômico (SARs) e da matriz nuclear (MARs), conforme visto no item 2.1.2. A ação das topoisomerases, portanto, tem um papel essencial na economia energética e entrópica da função genômica, através da regulação da tensão helicoidal da cromatina, local e globalmente.

A organização da cromatina em nucleossomos não só garante a compactação necessária para o empacotamento do DNA dentro do núcleo das células eucarióticas, mas também cria o contexto para a regulação da expressão genômica, graças à sua organização em pequena e grande escala.

O vírus SV40, utilizando as histonas de células eucarióticas hospedeiras, organiza hierarquicamente seu DNA em nucleossomos para formar um minicromossomo circular. No estudo da estrutura desses minicromossomos (PRUNELL, 1998, ZLATANOVA *et al.*, 1998), constata-se o paradoxo do *linking number* do DNA na cromatina: dois giros sinistrógiros em volta do nucleossomo com a redução de uma unidade no Lk, enquanto era de se esperar a redução de 2Lk ($\Delta Lk = -2$). O debate continua em aberto, na tentativa de definir em que condições se manifesta a afinidade do tetrâmero de histonas para com o DNA *supercoiled* negativa ou positivamente.

Papel do empilhamento de bases

O papel do empilhamento de bases para a estrutura e função da molécula de DNA só recentemente começou a ser abordado (KELLEY, 1999). Segundo metodologia da equipe de J.K. Barton (Caltech), no direcionamento de elétrons para dentro da molécula de DNA, são utilizados complexos metálicos como pontes, cuja ligação não-covalente se faz por empilhamento π -dependente entre as bases, através da região ligante que apresenta uma superfície aromática como plataforma de intercalamento (HOLMLIN, 1997, DANDLIKER *et al.*, 1998). Graças a esse tipo de empilhamento entre as bases, estas não funcionam apenas como fonte de informação e de reconhecimento específico, mas também como ponte para transferência de elétrons ou como canal para oxidação a distância (*hole excitation*) ou ainda como fio condutor cuja condutância é modulada intrinsecamente em função da sequência de bases empilhadas. Da mesma forma, a própria informação, além do contato físico entre bases, também pode ser transmitida a distância.

Assim, a dupla hélice de DNA, além da sua superfície interativa com o solvente e com proteínas DNA-ligantes e além do reconhecimento específico entre as bases, é também um meio com capacidade de permitir transferência de cargas, através da qual as reações químicas podem ocorrer a distância, por tunelamento, sem contato físico entre os reagentes (KELLEY, 1999).

Papel do íon magnésio na estabilidade

Na interação com o solvente, os grupos fosfatos nos ácidos nucléicos desempenham papel importante, na medida em que, com sua carga negativa distribuindo-se ao longo de cada hélice, estabelecem uma força coulombiana repulsiva

entre as duas hélices quando emparelhadas, de forma contínua no DNA ou em regiões complementares do RNA (PROHOFSKY, 1995). Esta força repulsiva entre hélices é neutralizada quando cátions da solução salina, inclusive H^+ e com preponderância de Mg^{2+} (MISRA *et al.*, 1999), interagem com os grupos fosfatos, recobrando-os. Daí a importância das variações no pH e nas concentrações salinas para os processos de desnaturação e de hibridização de ácidos nucleicos, da ação localizada das helicases abrindo e separando duplas hélices, bem como da atuação de proteínas SSB (*single-strand binding*) na estabilização de cada hélice isolada. O estudo do papel dos íons de magnésio na estabilidade do RNA (MISRA *et al.*, 1999) tem contribuído para um melhor entendimento das interações entre os biopolímeros e o solvente.

4.1.3 – Efeito Hidrofóbico e Conversão de Energia Livre

A impossibilidade de água se misturar com óleo é apenas a manifestação da tendência extrema da água de expelir solutos que não sejam íons e que não tenham número significativo de doadores e aceptores para formação de pontes de hidrogênio. Um soluto iônico é mantido na água por valores elevados e negativos de entalpia de hidratação, enquanto solutos doadores e aceptores de cátion hidrogênio são mantidos porque a água possui essas duas tendências na formação de pontes de hidrogênio. Por outro lado, a rejeição a solutos desprovidos dessas qualidades, como as moléculas apolares de óleos e gorduras, é referida como efeito hidrofóbico. O termo hidrofóbico é etimologicamente enganoso, já que medidas das energias de interface sugerem que o óleo prefere mais a água do que a si próprio. Na verdade a água é lipofóbica, na medida em que rejeita violentamente as moléculas de óleo por gostar demais de suas próprias moléculas (KYTE, 1995).

A energia livre padrão de transferência de um soluto B, da água (H_2O) para um solvente (Sol), $[\Delta G^{\circ}_{B,H_2O \rightarrow Sol}]$, pode ser obtida após o cálculo do coeficiente de partição dado pela relação da concentração do soluto em cada uma das fases (${}^B K_p = B^{Sol} / B^{H_2O}$).

$$\Delta G^{\circ}_{B,H_2O \rightarrow Sol} = \lim(-RT \ln {}^B K_p) \quad (4.1.13)$$

O limite, quando a concentração de B tende para zero, define o estado padrão de diluição infinita. Focalizando apenas a diferença de energia livre padrão de solvatação,

as condições são tais que as moléculas do soluto B estão envolvidas apenas por moléculas de água ou de solvente, sem que as moléculas do soluto interfiram consigo mesmas ou com as moléculas dos solventes. Em concentrações suficientemente baixas do soluto, como nos sistemas biológicos, o potencial químico do soluto B, assim como seu coeficiente de atividade estão definidos nas equações 3.2.10 e 3.2.11.

Temperatura de Transição e Mudança de Estado

As mudanças de estado físico da água ocorrem a temperatura constante (temperatura de transição, T_t). Os processos de fusão e de vaporização são endotérmicos, caracterizando aumento na entalpia (ΔH_t), com absorção de calor, e aumento na entropia (ΔS_t), com propagação de desordem para as moléculas. Nesses processos, caracterizados como espontâneos em termos termodinâmicos, nenhum trabalho foi empregado para promover a mudança: em situação de endotermia, a força atuante foi a tendência natural para a desordem, ou seja, para o aumento de entropia, de acordo com a segunda lei da termodinâmica. No entanto, para instaurar os processos inversos (solidificação e condensação da água), será necessário recriar o estado de ordem entre as moléculas, com exportação de entropia ($-\Delta S_t$), e em situação de exotermia, empregando trabalho para liberação de calor na transição ($-\Delta H_t$). Assim, a exportação de entropia para alguma parte do Universo, aumentará a entropia dessa parte muito mais do que a redução de entropia ($-\Delta S_t$) necessária para reversão do processo.

Considerando que na transição de estado a variação de energia livre (ΔG_t) é zero (ver equações 3.1.5 e 3.1.12), bem como levando-se em conta os sinais, as transições acima podem ser descritas pela expressão

$$T_t = \frac{\Delta H_t}{\Delta S_t} \quad (4.1.14)$$

Na mudança de conformação dos biopolímeros em solução aquosa, muitos aspectos da transição do estado nativo (estado F, de *folded* ou contraído) para um outro estado desnaturado (estado U, de *unfolded* ou distendido) podem ser definidos indiretamente por comparação com dados relativos à estruturação das moléculas de água em torno de grupos apolares ou superfícies hidrofóbicas (água de hidratação

hidrofóbica) e em torno de grupos polares ou superfícies hidrofílicas (água de hidratação hidrofílica).

A presença de solutos logicamente modifica o comportamento das moléculas de água, sendo de longa data a constatação de que a entropia de vaporização (ΔS_t) é maior para soluções com solutos apolares do que para soluções com solutos polares (para revisão, ver URRY, 1997). ΔS_t é positiva, indicando que, nesse processo de transição endotérmica (ΔH_t positiva), a tensão superficial entre as moléculas de água se reduz, aumentando a desorganização das mesmas. Isto significa que, ao contrário, antes dessa transição, a dissolução de solutos apolares em água se caracteriza como um processo exotérmico (ΔH_t negativa) onde há um aumento de organização das moléculas de água como água de hidratação hidrofóbica (ΔS_t negativa). No processo de dissolução, o aumento da quantidade de água de hidratação hidrofóbica, com a respectiva redução na entropia, é diretamente proporcional ao grau de hidrofobicidade do polímero em dissolução. Por outro lado, no processo de vaporização ou simplesmente com o aumento de temperatura, antes que se inicie o processo de vaporização (URRY, 1997), há destruição das camadas de hidratação hidrofóbica, com o respectivo aumento na entropia relativa às moléculas de água. No primeiro caso, a redução na entropia relativa às moléculas de água se faz às custas de aumento de entropia na molécula do polímero, como se o aumento na organização das camadas de hidratação hidrofóbica constrangesse o polímero a se distender (*unfold*), fugindo da conformação nativa. No segundo caso, o aumento de entropia nas moléculas de água, com a destruição das camadas de hidratação hidrofóbica, permite uma redução de entropia correspondente na molécula do polímero, quando, livre do constrangimento, se contrai (*fold*) para readquirir sua conformação nativa.

Nos dois casos, em se tratando das moléculas de água, há variações significativas e compensatórias na entropia e entalpia; em se tratando da molécula do polímero, são significativas apenas as variações na entropia, já que nas mudanças conformacionais prevalecem as alterações não-covalentes e pós-traducionais. Assim, durante o processo de dobramento (*fold*ing) de um biopolímero, a quantificação da variação de entropia no biopolímero é dada como imagem especular da variação de entropia nas moléculas de água (ΔS_t) cujo valor, por sua vez, é calculado a partir das medidas da temperatura de transição (T_t) e da entalpia (ΔH_t), conforme a equação 4.1.5.

Elasticidade entrópica dos biopolímeros

As moléculas de água, normalmente formando pontes de hidrogênio entre si, se organizam de modo diferenciado ao envolver uma molécula de biopolímero: as pontes de hidrogênio se organizam melhor em torno das regiões hidrofóbicas, formando estruturas pentagonais (clatradas) constituintes das camadas de hidratação hidrofóbica que, por sua vez, exercem constrangimento sobre a molécula de biopolímero, obrigando-a a se distender (*unfolding*) e a sair de sua conformação nativa. Por outro lado, se a estrutura pentagonal das moléculas de água se enfraquecer (desorganização), por exemplo, pelo aumento de temperatura, então a molécula de biopolímero, livre do constrangimento, se contrairá (*folding*), readquirindo sua conformação nativa (organização). Assim, a molécula de biopolímero e as moléculas de água que o envolvem constituem um sistema aberto, podendo ocorrer redução de entropia (organização) na molécula de biopolímero, desde que essa redução seja compensada por um maior aumento de entropia (desorganização) nas camadas de hidratação hidrofóbica. Dessa forma, diferentemente da maioria dos materiais, os biopolímeros possuem elasticidade entrópica, ou seja, apresentam diminuição de entropia com o aumento da temperatura, e, por isso mesmo, a temperatura de transição (T_t) na qual ocorre a mudança conformacional é denominada de temperatura de transição inversa (URRY, 1997, 1998).

Essas características dos biopolímeros informacionais, que permitiram a gênese da vida como um fluxo de organização brotando de um mar de desorganização, podem se manifestar não só em função da temperatura mas também em função de outros estímulos ou energias de *input*. É importante notar que essas características não são propriedades intrínsecas de biopolímeros isolados, mas só se manifestam na medida em que eles interagem com as moléculas do solvente. Enquanto os dois componentes do sistema, no caso biopolímero e solvente, estão em equilíbrio, a estrutura pentagonal das moléculas da água de hidratação hidrofóbica se reforça em função do grau de hidrofobicidade do biopolímero. Assim, segundo o princípio de Le Chatelier, após cada modificação na molécula do biopolímero, um novo equilíbrio do sistema será resultante da competição entre as camadas de água de hidratação hidrofóbica e de hidratação hidrofílica (SUZUKI *et al.*, 1997, WONG, GEIDUSCHEK, 1998).

A variação de temperatura afeta imediatamente a estrutura pentagonal da água, antes que a hidrofobicidade do biopolímero tenha sofrido alteração. Assim, como foi visto acima, o aumento de temperatura enfraquece a estrutura pentagonal das moléculas

de água ao desorganizar as camadas de hidratação hidrofóbica, retirando a distensão (*unfolding*) provocada sobre o biopolímero que, então, contraindo-se (*folding*), readquire sua conformação nativa. Logicamente, acima da temperatura de transição, T_t , o aumento de temperatura provocará aumento de entropia também no biopolímero, contribuindo para sua desnaturação (*unfolding*). No caso do aumento de temperatura, a energia de *input* é térmica, enquanto a de *output* é mecânica (mudança de conformação).

A variação de pressão, de forma análoga à variação de temperatura, afeta imediatamente a estrutura pentagonal da água, mas, diferentemente do aumento de temperatura, o aumento de pressão reforça, em vez de enfraquecer, as camadas de hidratação hidrofóbica, acentuando o constrangimento e a ulterior distensão (*unfolding*) do biopolímero. Por outro lado, se a pressão for exercida diretamente sobre o biopolímero, provocando sua distensão forçada, a cada aumento na distensão corresponderá um deslocamento no pKa do biopolímero, indicando maior exposição de grupos polares e o conseqüente aumento de pH do meio, relativo à captação de H^+ pelos grupos carboxilatos ($COO^- \rightarrow COOH$) ou amínicos ($NH_2 \rightarrow NH_3^+$). O deslocamento de pKa se dá na faixa de pH entre 4 e 7 para os grupos carboxílicos e entre 7 e 10 para os grupos amínicos (URRY, 1997). No caso do aumento da distensão forçada sobre o biopolímero, a energia de *input* é mecânica, enquanto a de *output* é química (variação no pKa ou no potencial de redução).

A redução no pH do meio, a partir de pH neutro, faz com que grupos carboxílicos ($pKa < 7$) no biopolímero, ainda apresentando comportamento hidrofílico (COO^-), passem a apresentar comportamento hidrofóbico ($COOH$). O aumento de superfícies hidrofóbicas no biopolímero, graças à destruição de camadas de hidratação hidrofílicas, reforça as camadas de hidratação hidrofóbica que aumentam o constangimento sobre o biopolímero, levando-o a se equilibrar numa forma mais distendida (*unfolded*). Nesta nova situação, com o aumento de hidrofobicidade no biopolímero, a temperatura de transição (T_t) se reduz, como que facilitando a transição na qual maior quantidade de água de hidratação hidrofóbica será destruída, causando maior redução de entropia no biopolímero. O aumento no pH do meio, na faixa assinalada acima, por outro lado, faz com que grupos carboxílicos ($COOH$), ainda apresentando comportamento hidrofóbico, passem a apresentar comportamento hidrofílico (COO^-), com a destruição de camadas de hidratação hidrofóbica, levando o biopolímero a se equilibrar numa forma menos distendida. Nesta nova situação, com a redução de hidrofobicidade no biopolímero, a temperatura de transição (T_t) aumenta,

como que dificultando a transição na qual menor quantidade de água de hidratação hidrofóbica será destruída, causando menor redução de entropia no biopolímero

O comportamento dos grupos amínicos ($pK_a > 7$) se dá de forma especular em relação aos grupos carboxílicos. Com aumento de pH do meio, acima de $pH=7$, os grupos amínicos, ainda apresentando comportamento hidrofílico (NH_3^+), passam a apresentar comportamento hidrofóbico (NH_2). Com redução de pH do meio, na faixa assinalada acima, os grupos amínicos, ainda apresentando comportamento hidrofóbico (NH_2), passam a apresentar comportamento hidrofílico (NH_3^+).

No caso da variação de pH, a energia de *input* é química, enquanto a energia de *output* pode se manifestar como potencial redox ou como variação mecânica.

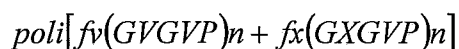
4.1.4 – Elastômero: um modelo para conversão de energia livre

Muitos tecidos de vertebrados, tais como pele, vasos sanguíneos e pulmões, possuem na matriz extracelular uma rede de fibras elásticas cujo comportamento, semelhante ao da borracha, permite o relaxamento do tecido após distensão transitória provocada por estiramento. Uma fibra elástica, geralmente com diâmetro entre 5 e 6 μm , é constituída por moléculas de elastina intercruzadas, segundo um processo de automontagem hierárquica de estruturas em diferentes níveis fractais. A estrutura linear primária da molécula de elastina é constituída pelo pentapeptídeo {Val – Pro – Gli – Val – Gli} repetido dezenas de vezes. As repetições de (VPGVG) n geram uma espiral chamada β -turno que se espiraliza numa β -espiral que, por sua vez, se espiraliza na forma definitiva do filamento de elastina que, finalmente, se inter cruza com outros filamentos para formar a rede da fibra de elastina. A capacidade elástica da elastina, cinco vezes maior que a da borracha, tem origem no somatório das contribuições de cada estrutura nos diferentes níveis fractais.

A molécula de elastina, nas duas últimas décadas, tem inspirado a equipe de Dan W. URRY (1997, 1998), inicialmente no Laboratório de Biofísica Molecular, Universidade de Alabama em Birmingham, e posteriormente no Departamento de Engenharia Química e Ciência de Materiais, Universidade de Minnesota, em Minneapolis, a criar um modelo de elastômero que permite o planejamento e a síntese de polímeros sob medida, próprios para fundamentar o mecanismo geral de mudança conformacional e capazes de operar conversões de energia livre. Polímeros com balanceamento adequado de grupos polares e apolares aumentam a ordem durante o dobramento hidrofóbico (*hydrophobic folding*), na medida em que a temperatura é

elevada acima da temperatura de transição inversa (T_t). No entanto, em vez de variação da temperatura (processo inadequado para os sistemas biológicos), muitas variáveis reduzem o valor de T_t abaixo da temperatura operacional, propulsora da mudança conformacional geradora de função. Assim, a temperatura de transição inversa provê um mecanismo fundamental por meio do qual a mudança conformacional e a função dos biopolímeros, bem como as conversões de energia livre que sustentam os sistemas biológicos, podem ocorrer à temperatura constante.

A representação geral de uma das formas de polímero sintético é dada abaixo



onde GVP representa a sequência de aminoácidos glicina, valina e prolina, enquanto a letra X representa qualquer outro aminoácido utilizado para substituir V na segunda posição. Aliás, desde que as posições GP sejam mantidas intactas, outras substituições podem ser feitas, por exemplo ($\text{G}\alpha\text{G}\beta\text{P}$), sem que se altere o comportamento da elastina. Por seu turno, f_v e f_x traduzem as frações molares respectivamente do pentâmero normal (V na segunda posição) e do pentâmero mutante (X substituindo V na segunda posição), verificando-se sempre a relação $f_v + f_x = 1$.

Utilizando-se o polímero básico $(\text{GVGVP})_{251}$, onde $f_x = 0$ e $f_v = 1$, determinou-se a temperatura de transição (T_t), caracterizada pela presença de V na segunda posição, cujo valor foi 25°C . Assim, o valor de $T_t = 25^\circ\text{C}$ ficou como característica do aminoácido valina. Posteriormente, o valor de T_t foi determinado para os demais aminoácidos (X), quando um de cada vez passava a substituir V na segunda posição. O valor de T_t para cada X era extrapolado para quando $f_x = 1$ e $f_v = 0$. Desta forma foi obtida uma escala relativa de hidrofobicidade T_t -dependente, onde se constata que o valor de T_t é inversamente proporcional ao grau de hidrofobicidade do aminoácido em questão. Tendo o aminoácido valina (V) como referência ($T_t = 25^\circ\text{C}$), na extremidade mais hidrofóbica está o aminoácido triptofano (W) com $T_t = -90^\circ\text{C}$, enquanto na extremidade oposta está o glutamato (E) com $T_t = 250^\circ\text{C}$.

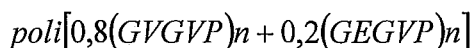
É digno de nota, nessa escala relativa de hidrofobicidade, a disparidade em relação aos aminoácidos polares, como o ácido glutâmico para o qual, ao apresentar um comportamento hidrofóbico (COOH), $T_t = 30^\circ\text{C}$ e, ao apresentar um comportamento hidrofílico (COO^-), $T_t = 250^\circ\text{C}$. Conforme o critério de construção da escala, esses valores são obtidos quando $f_x = 1$ e $f_v = 0$, isto é, quando todos os V (valina) na

segunda posição foram substituídos por E (glutâmico). Por outro lado, como o valor de T_t é função de f_x , quando $f_x = 0,2$ e $f_v = 0,8$, o valor de T_t fica em torno de 20° C para ácido glutâmico (E^0) e em torno de 45° C para glutamato (E^-).

Elastômero definido como matriz elástica macroscópica

Abaixo de 25° C, o polímero (GVGVP)₂₅₁, caracterizado pela hidrofobicidade do aminoácido valina (V), é solúvel em água em todas as proporções, inclusive na concentração limite de 40 mg/ml de água. Com a elevação de temperatura, ao passar por 25° C, a solução se torna turva, indicando o início da transição de fase que leva à contração (*foldng*) as moléculas do polímero, bem como à posterior agregação das mesmas. Com a agregação, separa-se a fase viscoelástica mais densa que contém aproximadamente 40% de polímero e 60% de água. Esta fase elástica, após ser tratada com irradiação gama, se transforma numa matriz elástica que pode tomar a forma de folhas ou tiras elásticas, análogas a tiras de borracha. As tiras elásticas sintéticas (elastômeros), assim como as fibras naturais de elastina, estando na sua forma nativa contraída (*folded*), podem ser submetidas a processos de distensão forçada e mantidas indefinidamente distendidas (*unfolded*) quando, por exemplo, sustentando pesos em situação isotônica. Nessas condições, e mergulhado em solução padrão, cada tipo de elastômero (definido pela relação f_v/f_x), quando submetido a aumento de temperatura, se contrairá e levantará o peso apenso (de até mil vezes seu próprio “peso a seco”) ao ser atingida sua temperatura de transição (T_t) característica, a mesma definida anteriormente pelo grau de “turbidância” e agregação.

Seguindo a metodologia acima e utilizado-se o elastômero obtido a partir do polímero abaixo (caracterizado pela presença do ácido glutâmico)



distendido com um peso constante, constata-se que, com a elevação da temperatura e mantido num pH=2,1, o polímero começa a desenvolver força para contrair-se ao passar por 20° C, enquanto que, em pH=4,5, o elastômero começa a desenvolver a tensão que o levará a contrair-se de modo isotônico só quando a temperatura passar por 45° C. Através da calorimetria de varredura diferencial (DSC, *differential scanning calorimetry*), com o aumento de pH e o respectivo aumento de

grupos ionizados, constata-se uma redução no calor de transição endotérmica ($+\Delta H_t$) requerido para a desestruturação das camadas remanescentes de hidratação hidrofóbica que, por sua vez, refletem um menor aumento na entropia ($+\Delta S_t$) das moléculas de água. Como imagem especular, o aumento de pH provoca uma menor redução na entropia de transição ($-\Delta S_t$) do polímero.

Estes dados obtidos com a metodologia do elastômero constata a mesma diferença nas temperaturas de transição (ΔT_t) já descritas anteriormente com a metodologia da “turbidância” e agregação.

Ao se manter a temperatura fisiológica típica dos mamíferos (37°C), o elastômero caracterizado pela presença do ácido glutâmico e distendido com um peso constante, ao ser levado a $\text{pH}=2,1$ se contrairá levantando o peso, enquanto se distenderá ao ser levado, da situação anterior, a $\text{pH}=4,5$. Assim, mantendo-se a temperatura constante e aumentando-se o potencial químico de próton, provoca-se a contração do elastômero com realização de trabalho mecânico.

Mecanismo ΔT_t para conversão de energia livre

O exemplo acima mostra como, pela utilização da metodologia descrita, qualquer modificação ou novo tipo de interação, envolvendo dois grupos funcionais distintos num polímero, poderá ser caracterizada pela diferença entre as temperaturas de transição inversa (ΔT_t), oferecendo, assim, uma perspectiva unificadora para o entendimento dos processos de dobramento (*foldings*) e de conversão de energia livre nos biopolímeros. Qualquer energia de *input* que reduza T_t abaixo da temperatura fisiológica pode provocar o dobramento (*foldings*) hidrofóbico em condições de isoterma.

O acoplamento entre dois grupos funcionais distintos num mesmo polímero pode ser estudado, por exemplo, quando, além da presença do ácido glutâmico (E) com seu grupo carboxílico ($\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^-$), insere-se também o aminoácido lisina (K) com o grupo prostético N-metil nicotinamida (K-NMeN) ligado ao seu grupo amínico ($\text{NH}_2 \leftrightarrow \text{NH}_3^+$). Tanto a protonação de um grupo carboxílico quanto a redução de um potencial redox, isoladamente, aumentam a hidrofobicidade do polímero, reduzindo sua temperatura de transição para o dobramento hidrofóbico (T_t).

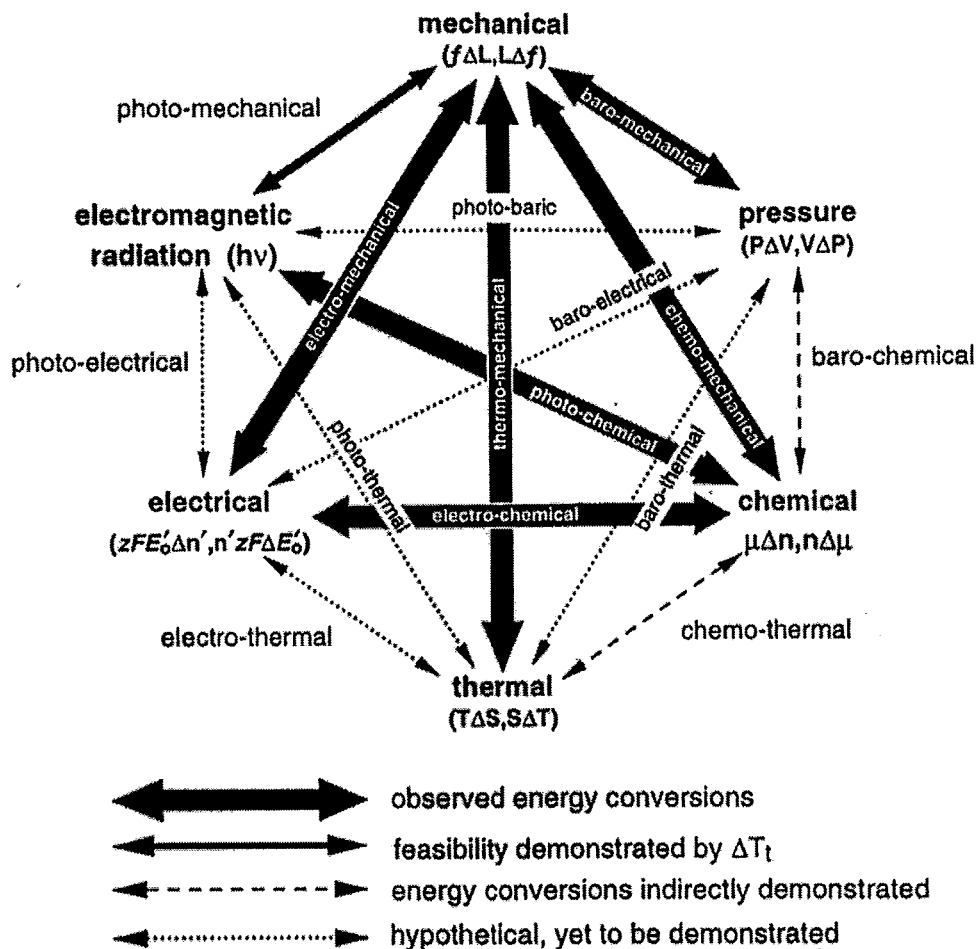


Figura 4.1.4. 1 – Interconversões de energia livre baseadas no mecanismo ΔT_t , proposto pela equipe de URRY (1997, 1998). Estão representadas aos pares as interconversões entre os seis tipos de energia existentes nos sistemas biológicos, viabilizadas graças à metodologia que utiliza a variação na temperatura de transição inversa (ΔT_t), manifestada e medida em polímeros elastoméricos projetados e sintetizados de forma específica para cada tipo de conversão.

O aumento na hidrofobicidade devido à redução de um potencial redox provoca o deslocamento no pKa de um grupo carboxílico, enquanto o aumento na hidrofobicidade devido à protonação de um grupo carboxilato provoca o deslocamento no potencial redox da K-NMeN. Este exemplo demonstra como, segundo o mecanismo ΔT_i , se opera a conversão de energia livre num par de dois tipos de energia (química \leftrightarrow elétrica). Esta conversão de energia se torna mais eficiente quando processada em polímeros mais hidrofóbicos, cujo grau de hidrofobicidade é avaliado pelo acréscimo do resíduo fenilalanina (F). A mesma composição de um polímero pode gerar diferentes deslocamentos no pKa, dependendo não só da concentração mas também da proximidade dos resíduos mais hidrofóbicos em relação a grupos ionizáveis (carboxilatos).

O fato de tanto a concentração quanto a posição estratégica de F pesar na eficiência da conversão de energia, demonstra a importância da competição positiva existente entre a formação de carga nos carboxilatos e a desestruturação de água de hidratação hidrofóbica. Esta competição gera a diferença de energia livre de hidratação repulsiva apolar versus polar, em regime de cooperação positiva cuja derivada parcial, a temperatura constante, pode ser representada por $[(\partial\Delta G/\partial\alpha)_T]_{A-P}$, onde α representa o grau de ionização dos grupos carboxílicos, e cuja curva sigmóide de titulação apresenta um coeficiente de Hill maior do que o da equação de Henderson-Hasselbalch. Por outro lado, como a presença de carga aumenta a energia livre requerida para a formação da próxima carga, a repulsão carga versus carga, representada por $[(\partial\Delta G/\partial\alpha)_T]_{C-C}$, se dá em regime de cooperação negativa cuja curva sigmóide de titulação apresenta um coeficiente de Hill menor do que o da equação de Henderson-Hasselbalch.

No item 3.2.3, a partir da equação de Henderson-Hasselbalch (3.2.18), foi tratada a relação entre pH/pK e energia livre (3.2.19).

Englobando na equação 3.2.18 as diferenças de energia livre referentes às interações descritas acima, tem-se

$$pH = pK_0 + \Delta pK_{C-C} + \Delta pK_{A-P} + \frac{1}{n} \log \left[\frac{\alpha}{1-\alpha} \right] + \frac{\left[\left(\frac{\partial\Delta G}{\partial\alpha} \right)_T \right]_{C-C} + \left[\left(\frac{\partial\Delta G}{\partial\alpha} \right)_T \right]_{A-P}}{2,3RT} \quad (4.1.15)$$

4.1.5 – Agregação polimérica e doença (Prion e Alzheimer)

Se por um lado a agregação de peptídeos baseados na proteína elastina formam fibras funcionais, por outro lado existem proteínas, como as causadoras das doenças de Alzheimer (peptídeo β -amilóide) e da vaca louca (proteína prion), que perdem sua função ao sofrerem a agregação dita fibrilogênica ou amiloidogênica. Fatores genéticos (mutações) e epigenéticos (tipo de solvente) que podem desestabilizar estruturas nativas de proteínas, bem como facilitar a formação de formas intermediárias parcialmente dobradas (*folded*), podem ser as causas da agregação e da formação de fibrilas de proteína. Uma característica comum que precede esse processo de agregação é a transição de α -hélice para β -fita.

Para o estudo dessa transformação, nos últimos cinco anos têm sido criados modelos sintéticos, à semelhança do elastômero de Urry apresentado acima, nos quais o controle da periodicidade de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na sequência peptídica (peptídeo anfifílico) é essencial para determinação das propriedades das estruturas secundárias, bem como das eventuais transições de α -hélice para β -fita (MIHARA *et al.*, 1998). Em outras palavras, o encaixe de estrutura hidrofóbica entre peptídeos anfifílicos parece definir a forma final das estruturas secundárias e de suas transformações. Domínios de nucleação hidrofóbica, com defeitos previamente programados, revelaram que a estabilidade da α -hélice no seu estado inicial tem papel importante na definição da ulterior transformação. Nesse mecanismo de polimerização por nucleação, inicialmente formam-se agregados com α -hélices instáveis nos quais as interações a curta distância são substituídas por interações a longa distância, originando assim a transição autocatalítica de α -hélice para β -fita, que coincide com a formação de fibrilas características das proteínas amiloidogênicas. Foram criadas sequências peptídicas ditas camaleônicas nas quais a formação de estruturas secundárias (se a conformação peptídica se define em α -hélice ou β -fita) pode ser controlada pelo caráter anfifílico da sequência (através de mutações dirigidas) ou pelas condições do solvente.

As proteínas prions podem existir na célula como isoforma normal (PrP^{C}) e como isoforma causadora da doença *scrapie*, entre outras doenças (PrP^{Sc}). Esta última pode existir como resultado de mutação no gene PrP (modo convencional de transmissão, segundo a teoria genética) ou como resultado de mudança conformacional da forma PrP^{C} para PrP^{Sc} (modo não convencional de transmissão, segundo a teoria epigenética, efetivada unicamente por proteína, conhecida como teoria *protein only*).

Segundo a hipótese *protein only* (COHEN, PRUSINER, 1998), de algum modo a isoforma patogênica PrP^{Sc} exógena invade uma célula hospedeira onde exista um gene PrP produzindo a isoforma normal PrP^C. Quando isto acontece, a isoforma patogênica passa a funcionar como molde, induzindo a mudança de conformação da isoforma endógena PrP^C para PrP^{Sc}, caracterizando assim o processo de replicação epigenética da conformação PrP^{Sc}. A mudança de conformação ocorre num processo de dimerização como num *refolding* da forma PrP^C para a forma PrP^{Sc}, sob influência desta última que, agindo como molde, contribui para reduzir a barreira de energia livre que separa a forma PrP^C da forma PrP^{Sc}.

Modelos tridimensionais das isoformas mostram que a conformação PrP^C contém quatro α -hélices (H1-H4) e as regiões incluindo H1 e H2 se convertem em quatro β -fitas durante a mudança da conformação PrP^C para PrP^{Sc}. Outros estudos (MIHARA *et al.*, 1998) sugerem um mecanismo para a doença mediante o qual mutações causam a desestabilização da conformação PrP^C, facilitando seu *refolding* para a conformação PrP^{Sc}. Desta forma, para explicar a agregação amiloidogênica, o mecanismo de polimerização por nucleação parece mais lógico do que o mecanismo por dimerização, ampliando sua validade não só para as proteínas prions, mas também para os peptídeos β -amilóides.

A forma solúvel do peptídeo β -amilóide contendo α -hélices como estrutura pode se transformar num agregado de β -fitas intercruzadas. Substituições de resíduos por prolina na região central (12-26) aumenta a solubilidade do peptídeo, evitando a transição e a agregação do mesmo em fibrilas. A desestabilização da estrutura nativa pode ocorrer por interações entálpicas (perda ou ganho de ligações covalentes) e por interações entrópicas (substituições de resíduos e reorganizações não-covalentes).

4.2 – PAPEL DA CATÁLISE ENZIMÁTICA NAS INTERCONVERSÕES DE ENERGIA LIVRE

Na seção 4.1, quando se tratou da mudança conformacional, foram levadas em conta apenas as interações entre o polímero e o solvente, dominadas pelo efeito hidrofóbico e caracterizadas pelo princípio da aditividade química. Daqui para frente, ao se considerar as interações entre biopolímeros na formação de complexos, devem-se levar em conta as propriedades que se manifestam de modo preponderante na vertente bioquímica, tais como a especificidade (cuja medida termodinâmica é a energia livre de formação do complexo), a cooperatividade (que, se não anula, pelo menos introduz correções na aditividade), fator entrópico (redução na entropia como principal componente da redução da energia de ativação), pré-organização da enzima e reorganização do solvente etc.

Ainda na seção 4.1, quando se tratou dos pares de conversão de energia livre, mesmo em situação de isotermita, as diversas energias de *input* atuavam diretamente sobre os polímeros. Na célula, com exceção dos transdutores localizados na membrana, a única energia de *input* é proveniente da hidrólise de ATP.

4.2.1 – Interação e não mera agregação

A agregação patogênica de proteínas vista na seção anterior é diferente da formação de complexos funcionais, característicos dessas proteínas em situação normal. Mesmo o elastômero, ao ser agregado de forma semelhante à vulcanização da borracha, difere consideravelmente da rede da matriz extracelular, onde as moléculas de elastina formam complexos entre si formando fibras de elastina que, por sua vez, se complexificam com outras moléculas da matriz, principalmente colágeno. Assim, no comportamento global da rede mecânica, a grande distensibilidade da elastina é atenuada pela menor distensibilidade do colágeno.

A previsão da especificidade biológica, subjacente aos processos de formação de complexos entre biopolímeros, tem como medida termodinâmica a diferença de energia livre da formação do complexo. Num trabalho experimental sobre formação de complexo proteína-proteína (OLSON, 1998), utilizando os anticorpos D1.3 e E5.2, foi possível decompor a energia livre de ligação em contribuições independentes originárias das interações eletrostáticas e não-polares, bem como das conformações entrópicas, conforme a equação:

$$\Delta G_{LIG} = \Delta G_{ELE} + \Delta G_{NP} - T\Delta S \quad (4.2.1)$$

O primeiro passo foi separar a diferença de energia livre na interface entre o solvente, com constante dielétrica alta (ϵ_s), e a proteína, com constante dielétrica baixa (ϵ_p):

$$\Delta G_{SOL} = G_{SOL}(\epsilon_s, \epsilon_p) - G_{SOL}(\epsilon_p, \epsilon_p) \quad (4.2.2)$$

A associação entre duas moléculas de proteína envolve a remoção de um volume do solvente correspondendo ao espaço a ser ocupado pela molécula parceira na ligação, com a posterior ocupação daquele volume por essa molécula. Para cada proteína, a perda de solvatação é obtida subtraindo a diferença de energia livre da parceira, ou:

$$\Delta\Delta G_{SOL}^E = \Delta G_{SOL}^{D-E} - \Delta G_{SOL}^D \quad (4.2.3a)$$

$$\Delta\Delta G_{SOL}^D = \Delta G_{SOL}^{E-D} - \Delta G_{SOL}^E \quad (4.2.3b)$$

A energia de interação eletrostática entre as duas proteínas pode ser avaliada pela equação

$$\Delta G_{INT}^{D-E} = \int \rho^D(\vec{r}) \phi^E(\vec{r}) dV \quad (4.2.4)$$

onde ϕ^E é o potencial gerado pela proteína E ao interagir com a proteína D, tendo intensidade de carga ρ num volume V, sendo \vec{r} o vetor posição.

Assim, as contribuições eletrostáticas para a formação do complexo macromolecular são dadas pela expressão

$$\Delta G_{ELE} = \Delta\Delta G_{SOL}^D + \Delta\Delta G_{SOL}^E + \Delta G_{INT}^{D-E} \quad (4.2.5)$$

A contribuição não-polar pode ser subdividida em

$$\Delta G_{NP} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{CAV}$$

com as energias livres surgindo das interações de van der Waals (vdW) e do efeito hidrofóbico relativo à formação de cavitação (LEVY, GALLICCHIO, 1998). Para a energia livre de cavitação, costuma-se usar a seguinte relação linear

$$\Delta G_{CAV} = \gamma \Delta A \quad (4.2.7)$$

onde, na formação de complexo, ΔA representa a mudança na área da superfície molecular ou da superfície acessível do solvente, enquanto γ representa a tensão superficial. Entre essas duas superfícies, a superfície macromolecular descreve melhor o efeito hidrofóbico no processo de associação de proteínas porque sua energia livre é independente de sua forma. A contribuição da mudança nas interações de van der Waals pode ser desprezada, devido à compensação entropia/entalpia.

Mudanças na energia de dispersão entre átomos que interagem na superfície do complexo e entre átomos que contactam a água no estado dissociado se igualam à diminuição de entropia conformacional, por ocasião da formação de complexo, conforme a equação

$$\Delta H_{DISP}^{D-E} - \left(\Delta H_{DISP}^{D-H_2O} + \Delta H_{DISP}^{E-H_2O} \right) - T\Delta S = 0 \quad (4.2.8)$$

onde as quantidades ΔH_{DISP} são as energias de dispersão e os termos entre parênteses representam as interações na superfície (virtual) de interface do complexo com a água, quando considerado no estado dissociado. Mudanças na entropia conformacional relativa ao grau de liberdade das cadeias laterais dos resíduos podem ser dadas pela fórmula

$$T\Delta S_{RES} = RT \ln \left(\frac{N_{LIG}}{N_{LIVRE}} \right) \quad (4.2.9)$$

onde N_{LIG} e N_{LIVRE} representam o número de torções possíveis respectivamente no estado ligado e livre.

Entropias são geralmente não aditivas

Ken A. Dill, numa revisão sobre os princípios da aditividade em Bioquímica (DILL, 1997), chama a atenção para o fato das entropias associadas a mudanças conformacionais poderem funcionar de modo não aditivo, embora apresentem grande contribuição ao processo. Quando as cadeias poliméricas obedecem a estatísticas aleatórias (*random-flight statistics*), como nos estados desnaturados, ou quando as interações são dominadas por fatores locais, atuantes na formação das estruturas secundárias, as entropias da cadeia de fato representam a soma das entropias dos monômeros. No entanto, elas não são aditivas quando estão envolvidos contatos não locais, como no estado dobrado (*folded*) ou de glóbulos agregados (*molten globules*). Um contato entre os terminais da cadeia pode restringir globalmente as opções possíveis para todos os monômeros. O erro introduzido por não se levar em conta a existência da não aditividade pode ser grande, sendo da ordem de 60 kcal/mol para um polímero de 100 monômeros.

Na seção anterior foi visto que a entropia conformacional não é independente das condições do solvente no processo de *folding*, apontando para o fato de que o esqueleto da molécula, ao diminuir seu raio de giro, imobiliza para fora as conformações dos resíduos ($\Delta S \neq \Delta S_{\text{resid}} + \Delta S_{\text{esquel}}$). Na verdade, a energia livre do processo de *folding* não é uma simples soma da transferência água-óleo de cada monômero constituinte, já que os aminoácidos hidrofóbicos, por exemplo, por ficarem no interior da proteína, não passarão pela transição. Da mesma forma, as energias livres de formação da ligação entre pares de monômeros não são aditivas, na medida em que as frequências de contato e ligação não são independentes: por exemplo, ao mesmo tempo em que os aminoácidos hidrofóbicos promovem o colapso da proteína, eles também empurram indiretamente os grupos polares para a superfície. Assim, a não aditividade deve ser a regra para as entropias e energias livres conformacionais dos biopolímeros, cuja mensuração poderá ser feita pela soma das funções de estado ao longo de ciclos termodinâmicos, no sentido de determinar seus desvios do zero e escapar da compensação entropia/entalpia.

O fato da formação de sequência hidrofóbica não ser independente da formação de sequência hidrofílica chama a atenção para a improbabilidade de, na evolução do código genético, as sequências gênicas terem surgido aleatoriamente, sem a imposição prévia e reversa da funcionalidade proteica (ver item 4.2.4).

4.2.2 – Poder catalítico das enzimas

Como pode uma enzima aumentar em até 10^{18} vezes a velocidade de uma reação química? Linus Pauling foi o primeiro a sugerir, em 1946, que uma enzima poderia ser complementar ao estado de transição de uma reação química e por meio disso acelerar a reação ao ligar-se ao estado de transição, baixando a energia de ativação ao longo da coordenada da reação. Atualmente, considera-se tacitamente pelo menos uma complementaridade parcial ao estado de transição, enquanto as teorias acerca da eficiência catalítica das enzimas focalizam detalhes dessa complementaridade, se ela é eletrostática, se contém modos especiais de ligações (principalmente de pontes de hidrogênio), se existe rearranjo no sítio ativo e no solvente, ou tudo isso concomitantemente (NEET, 1998).

Pré-organização do sítio ativo e reorganização do solvente

Uma vertente comumente explorada se baseia no fato do microambiente no sítio ativo se tornar diferente da solução circundante, justificando o tratamento em ciclos termodinâmicos onde se comparam as fases ocorrendo sob regime não catalítico e catalítico (CANNON, BENKOVIC, 1998). A comparação é feita entre a reação na solução, onde ocorre a transformação de um substrato (S) em um substrato ativado ou estado de transição (S^*), e a mesma reação catalisada por uma enzima (E), onde ocorre a transformação do estado não ativado ou *ground state* (ES) para o estado ativado ou de transição (ES^*). A reação na solução (não catalisada) é caracterizada pela taxa de reação k_{non} e a reação catalisada o é pela taxa de reação k_{cat} e pela constante de Michaelis-Menten K_m . Uma constante de equilíbrio aparente para a dissociação do estado de transição ES^* pode ser obtida pela utilização da teoria do estado de transição (TS, *transition state*).

$$K_{TS} = \left[\frac{k_{cat}/K_m}{k_{non}} \right]^{-1} \quad (4.2.10)$$

Para uma mesma enzima, no estudo comparativo entre a reação na solução e a reação catalisada, costuma-se fazer o gráfico de K_{TS} versus k_{cat} e k_{non} , observando-se que K_{TS} correlaciona-se ponto a ponto com k_{non} mas não com k_{cat} que varia muito pouco

em relação a K_{TS} . Por isso não se pode inferir, como tradicionalmente se tem feito, que K_{TS} reflita as interações ocorridas em ES^* .

As enzimas podem aumentar a taxa da reação quer providenciando forte ligação ao ES, ou seja, aumentando a afinidade e reduzindo K_m , quer reduzindo a energia de ativação (ΔG^*_{cat}) e aumentando k_{cat} . O efeito devido a K_m é evidente, mas o difícil é explicar qual foi o mecanismo utilizado pela evolução para reduzir ΔG^*_{cat} , aumentando k_{cat} . Este mistério permanece em aberto ainda hoje, embora, como foi acenado acima, já existam trilhas entre as energias de reorganização do meio e do sítio ativo, com preponderância de reduções na entropia (*negentropia*) e cujos protagonistas principais são as pontes de hidrogênio de baixa barreira energética (LBHBs, *low barrier hydrogen bonds*).

Pontes de H de baixa barreira energética (LBHB)

No item 3.2.3, foi visto que o cátion hidrônio e a água (forma neutra da molécula de água) possuem pKs respectivamente de $-1,7$ e de $15,7$. Em função da disparidade nos valores do pK, o próton na estrutura $H_2O...H-OH$ está associado fortemente ao grupo OH^- , como uma molécula de água, conferindo fraco valor à ponte de hidrogênio formada, cuja entalpia de formação não passa de 5 Kcal/mol e cuja distância entre os átomos de O chega a $2,8$ Angstroms. Neste tipo de ponte existe uma barreira energética considerável entre as duas posições possíveis para o H se ligar forte ou fracamente ao O, no caso o heteroátomo, refletindo a disparidade nos pKs.

Só recentemente tem sido considerada a possibilidade de uma enzima, utilizando o componente entrópico da energia de reorganização do sítio ativo e do meio (conferir item 4.1.3 sobre elasticidade entrópica), poder converter uma ponte de hidrogênio fraca, existente no complexo ES, numa ponte de hidrogênio forte (LBHB) que passará a existir transitoriamente (na transição de S para P) no complexo ES^* (CLELAND *et al.*, 1998). Como visto acima, uma ponte de hidrogênio só poderá se tornar forte se houver equiparação entre os valores de pKs dos respectivos heteroátomos. Assim, uma enzima opera tal conversão provocando uma mudança no valor do pK do substrato (ΔpK , ver equações 3.2.18 e 4.1.15), de tal forma que ele se aproxima do valor do pK do grupo enzimático com o qual passa a formar a ponte de hidrogênio, agora forte e contribuindo para reduzir ΔG^*_{cat} , aumentando k_{cat} . Em outras palavras, a equiparação dos valores de

pKs se faz entre os grupos doadores e receptores de H^+ . A contribuição das LBHBs para o aumento da taxa de reação pode chegar a cinco ordens de grandeza.

Por outro lado, a estabilidade dos biopolímeros, quando em solução fisiológica e em ausência da enzima específica, refletida na lentidão da reação (alta ΔG^* e baixa k_{non}), é essencial para a existência da regulação biológica e das próprias vias metabólicas, bem como das redes biomoleculares. Na ligação de circuitos (*switching*), a existência de um estado *ON* eficiente exige um estado *OFF* com energia potencial equivalente. As próprias características da solução fisiológica contribuem para tornar lenta a reação ocorrendo em ausência de enzima específica. Numa reação do tipo Belousov-Zhabotinski, por exemplo, a taxa de reação passa de um valor próximo da unidade, quando realizada em fase gasosa, para $10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, quando em solução aquosa. Isto significa que, de alguma forma, a enzima tem de proteger o substrato contra a ação da solução, criando no sítio ativo um meio que se aproxime do gasoso (“*null solvent*”).

4.2.3 – Otimização da integração entre mudança conformacional e função catalítica

Na história de uma proteína não é possível separar o processo de dobramento (*folding*) do processo de ligação na formação de complexos (*binding*), de cuja integração depende sua função (TSAI *et al.*, 1999). O mais alto grau de otimização acompanha o ciclo de existência de uma proteína, desde seu nascimento assistido por chaperoninas (proteínas babás) até sua degradação conduzida por proteínas proteolíticas. Esses dois sistemas de regulação, conservados estrutural e funcionalmente através da evolução e ligados às vias de regulação genética, englobam as proteínas da família HSP (*heat-shock proteins*), normalmente sensíveis a situações estressantes que provocam mudanças no nível ou no estado conformacional de outras proteínas.

Função das chaperoninas

A principal função das chaperoninas é proteger o processo de dobramento (*folding*) das proteínas, prevenindo a associação prematura na agregação patológica (tratada no item 4.1.5). Um dos modelos mais estudados, no sentido de esclarecer como funciona essa proteção, é o referente à formação dos *pili* (do latim, *pilum*: pêlo) – as estruturas adesivas que permitem à bactéria *Escherichia coli* aderir e colonizar tecidos hospedeiros (EISENBERG, 1999).

Geralmente, nas proteínas existem pelo menos dois motivos complementares, distanciados o suficiente para se posicionarem na molécula em extremidades opostas, de tal forma a interagirem durante o processo de dobramento. Na formação das possíveis estruturas de baixa energia, a interação entre dois motivos complementares pode ocorrer na mesma molécula, formando monômeros, ou envolvendo moléculas diferentes, originando estruturas diméricas (*domain-swapped dimer*) ou agregados poliméricos (*domain-swapped aggregate*).

No caso da proteína pilina, existe um domínio, análogo ao da imunoglobulina, composto por várias β fitas antiparalelas. Diferentemente da imunoglobulina, porém, a ausência da última β fita deixa uma fenda hidrofóbica no domínio, fenda esta que poderá ser preenchida por uma β fita de outro domínio de molécula homóloga (agregação) ou de molécula diferente (no caso, “chaperoneamento”). Uma molécula de pilina “chaperoneada” é adicionada à extremidade de crescimento do *pilum*, na medida em que a chaperonina é deslocada pelo encaixe de β fita de uma nova molécula de pilina (*donor strand compensation*).

Deslocamento de paradigma no *folding problem*

No contexto das configurações de energia, baseadas na distribuição em funil das conformações (*energy landscapes funnel-like shaped*), surgiu e amadureceu a visão do processo de *folding* indissociável do processo de *binding* (TSAI *et al.*, 1999, DILL, 1999).

Na reação de *folding*, tradicionalmente representa-se o diagrama de reação que consiste no gráfico da energia livre G_{macro} (conjunto de configurações) contra a coordenada de reação (um macroestado definido pelos diferentes microestados inacessíveis experimentalmente). Numa nova maneira de representação, através da configuração de energia, a energia livre G_{micro} (cada conformação individual da cadeia) é representada em função dos graus de liberdade microscópicos. A energia livre G_{macro} inclui a entropia conformacional (item 3.1.2) relativa ao número de conformações microscópicas em determinado macroestado. A barreira de energia livre, presente no diagrama de reação mas ausente na configuração de energia, é devida a explorações entrópicas realizadas por cadeias procurando a saída do funil que leva ao único estado nativo.

A forma em funil da distribuição de configurações reflete o colapso hidrofóbico (item 4.1.2) que, em paralelo com a formação das estruturas secundárias, leva à compactação do cerne hidrofóbico (*hydrophobic core*) e à redução drástica no número de conformações. A fração de conformações que se compactam é infinitesimal comparada ao espaço conformacional total.

Nesse sentido, funil significa que muitas conformações têm alta energia e poucas têm-na baixa. Mais especificamente, conformações apresentando altos valores para G_{micro} , típicos dos estados desnaturados, possuem entropia conformacional elevada, enquanto conformações apresentando baixos valores para G_{micro} , típicos do estado nativo, possuem entropia conformacional baixa.

Na evolução para a visão de conjunto do processo de *folding*, houve unificação das forças associadas ao comportamento da coluna dorsal da cadeia (ângulos $\phi\psi$ e pontes de Hidrogênio) com as forças associadas ao comportamento das cadeias laterais (solvatação e colapso hidrofóbico), contribuindo para um deslocamento de paradigma no sentido de fundir a vertente do dobramento hierárquico com a vertente das configurações de energia (DILL, 1999, BALDWIN, ROSE, 1999a, 1999b).

Os métodos de busca local, tais como MC (Monte Carlo), SA (*simulated annealing*) e MD (*molecular dynamics*), exploram energias de superfície e não podem utilizar a informação global subjacente às paisagens de energia em funil. Na busca local, as estratégias são muito lentas porque, não sendo guiadas pela informação global, elas acabam por se tornarem vítimas de armadilhas cinéticas, ao se perderem na aleatoriedade dos paradoxos de Levinthal e do Relojoeiro Cego (DILL, 1999).

Segundo esses paradoxos, o espaço sequencial nos processos de formação e de *folding* de proteína é infinitamente grande, da ordem de $20^{100} = 10^{130}$, para um polímero de 100 resíduos (considerando os 20 tipos de aminoácidos). No entanto, graças a processos evolutivos guiados por congelamentos que priorizam relações funcionais em vez de sequências estruturais, o espaço de sequências se tornou enormemente degenerado, com diferentes sequências podendo formar uma mesma estrutura. Para o colapso hidrofóbico, por exemplo, o alfabeto se restringe às letras H (hidrofóbico) e P (polar), reduzindo o espaço de sequências para $2^{100} = 10^{30}$. Considerando ainda que, dos 100 resíduos, apenas 1/3 formam o cerne hidrofóbico, o espaço sequencial se reduz mais ainda, para $2^{100/3} \approx 2^{33} \approx 10^{10}$. Defensores da não-aleatoriedade expõem suas idéias tipicamente como:

“The conclusion is that we should beware of needle in a haystack arguments, because nature does not seem to work that way. Each step is not unguided. Conformational and sequence spaces are more like landscapes... All conformations – not just on-pathway intermediates for example – can give some guidance toward the global minimum. New computational search methods are drawing on this information to make better folding and docking algorithms. The energy landscape perspective may help connect the currently disjoint areas of kinetics experiments and conformational search strategies” (DILL, 1999).

4.3 – GÊNESE DAS REDES BIOINFORMACIONAIS

Na seção 1.2 estão apresentadas as duas propriedades da molécula de ATP, ao funcionar como bateria energética universal da célula, possibilitando todas as reações endoergônicas através da ação das enzimas ATPases, e como doadora universal de grupo fosfato, possibilitando a formação das redes biomoleculares através do processo de fosforilação e desfosforilação (REIZER, SAIER Jr, 1997).

Na mesma seção 1.2 e no item 3.2.5 está demonstrado como a única forma de síntese de ATP, através do complexo protéico ATP-sintetase, representa o *output* da rede metabólica, bem como a molécula de ATP, por sua vez, funciona como *input* para a integração das redes biomoleculares, inclusive da própria rede metabólica.

Na seção 2.1, onde estão descritas de forma preliminar as redes biomoleculares, constata-se que, além das fosforilações e desfosforilações diretas das proteínas nas vias fosforrelés, existem também mensageiros intermediários, como o cálcio e o AMP cíclico (cAMP), que, como produtos da via de sinalização, atuam também como reguladores alostéricos de outras enzimas situadas na mesma via, permitindo a formação de alças autocatalíticas (NICOLIS, PRIGOGINE, 1989, KLEIN, MAYER, 1999, LISMAN, FALLON, 1999) e alças autopoieticas (MATURANA, VARELA, 1980).

Na formação de alça autocatalítica, não estando envolvida a ativação de genes, não ocorre *de novo* nem transcrição de mRNA e nem tradução de proteína. Moléculas de proteínas pré-existentes, já com suas modificações pós-traducionais específicas, principalmente em termos de fosforilação e desfosforilação, interagem entre si em *feedforward* na via fosforrelé ou em *feedback* positivo na alça autocatalítica. Alças de *feedback* negativo podem se expressar quando moléculas de mRNAs diferentes se inativam mutuamente, após hibridizações coordenadas pelas suas UTRs (*untranslated regions*).

Na formação de alça autopoietica, existe a ativação de genes com a conseqüente produção de proteínas. Como será visto no item 5.4.3, na dinâmica do complexo de transcrição, as regiões *cis* no DNA, específicas para genes *ieg* (*immediate early genes*), vão sendo expostas pela ação combinatória dos elementos *trans* (fatores de transcrição), em função dos *outputs* da rede de sinalização, transduzidos a partir de estímulos do meio. As proteínas produtos dos genes *ieg* constituirão os elementos da alça autopoietica, podendo interagir entre si nos moldes já descritos para a alça autocatalítica. No caso da autopoiese, e considerando a natureza combinatória do

complexo de transcrição, existe ainda a possibilidade de um elemento da alça atuar ora como componente determinante de um complexo, contribuindo para a ativação (ou inativação) de determinado gene, e ora como componente determinante de outro complexo, contribuindo para a inativação (ou ativação) desse mesmo gene. Com suas incalculáveis variações, esta última possibilidade funciona como mecanismo chave na regulação do *timing* dos relógios biológicos. Na verdade, a dimensão temporal é inerente às redes biomoleculares e caracteriza também tanto a memória de curta duração (autocatálise) quanto a de longa duração (autopoiese).

4.3.1 – Biopolímeros como autômatos de nível 1

A teoria cinética tradicional, formulada em termos de processos aleatórios markovianos, considera o tempo relativo à cinética de uma reação química, analisada a nível macroscópico, como sendo muito maior do que a duração de um único evento a nível molecular, de tal forma que esses eventos podem ser tratados como instantâneos.

No entanto, nas condições fisiológicas da célula, caracterizadas por *molecular channeling* em microcompartimentos, os biopolímeros informacionais funcionam como máquinas moleculares (autômatos), em cujo ciclo de mudanças conformacionais o tempo da dinâmica interna de cada molécula é maior do que o tempo da cinética da reação (STANGE *et al.*, 1998). De fato, como visto no item 4.2.2, uma enzima se liga ao seu substrato S e o complexo ES passa por uma série de mudanças conformacionais que terminam, após tempo τ_1 , na liberação do produto P, quando se estabelece um período refratário, relativo ao tempo τ_2 , requerido para o retorno à conformação de repouso e durante o qual não pode ocorrer a ligação da enzima com uma nova molécula do substrato. Isto significa que, em analogia com a sequência de transições refletidas no potencial de ação do neurônio, só após o tempo $\tau_0 = \tau_1 + \tau_2$, representativo do ciclo molecular catalítico, é que a enzima pode começar um novo ciclo.

Por outro lado, a ligação da enzima ao substrato é regulada alostericamente, no sentido de que a probabilidade dessa ligação passa de baixa, quando a enzima está na sua conformação de repouso, para alta, quando uma molécula adequada se liga ao sítio regulador na mesma enzima, na medida em que ocorrem essas interações em regime de cooperatividade. A reação enzimática se torna autocatalítica quando o próprio produto passa a exercer o papel regulador

E, ainda mais, quando as moléculas reguladoras são produzidas por enzimas na mesma população, surgem interações ou comunicações entre os ciclos de diferentes enzimas, de tal forma que o tempo de difusão das moléculas reguladoras entre as enzimas torna-se curto quando comparado com a duração dos ciclos moleculares. Assim, em volumes micrométricos com eficiente mistura difusional (*strong diffusional mixing*) e disponibilização rápida (*short delivery times*), uma molécula reguladora liberada por uma dada enzima pode influenciar com igual probabilidade o ciclo catalítico de qualquer outra enzima na população. O nome de **redes biomoleculares** foi sugerido em 1996 pelo grupo de Stange (STANGE *et al.*, 1998) para caracterizar as populações interativas de biopolímeros.

A caracterização dos biopolímeros informacionais como autômatos, capazes de interagirem entre si para formação de redes biomoleculares, adquire maior significado ao considerar-se sua conceituação como **conformons** (JI, 2000).

Um conformon pode ser definido como a tensão conformacional que, sendo específica para cada sequência de aminoácidos em proteína ou de nucleotídeos em ácido nucléico, encerra um *quantum* de energia livre proporcional ao seu grau de complexidade estrutural ou ao número de seus sítios ativos. Níveis crescentes de *quanta* de energia livre podem ser constatados, desde domínios peptídicos e proteínas monoméricas, passando por proteínas poliméricas e complexos protéicos ou nucleoprotéicos, até módulos integrados de vias fosforrelés e organelas, como vesículas sinápticas.

Na seção 4.1 foi visto que a toda mudança na tensão conformacional de um biopolímero informacional, seja ele proteína ou ácido nucléico, está associada uma mudança no seu nível de energia livre, cujos componentes refletem alterações tanto na força mecanoelétricoquímica (entalpia) quanto na informação genética e epigenética (entropia).

Segundo o paradigma genético reducionista, que só leva em conta o fluxo unidirecional da informação genética, as proteínas funcionariam como o componente *hardware* da célula, enquanto o DNA funcionaria como *software*, sendo ainda possível imaginar o funcionamento da célula ora como *hardware* puro, capaz de metabolismo, e ora como *software* puro, capaz de replicação (DYSON, 1988).

No entanto, se se quisesse insistir na comparação da célula com os nossos computadores convencionais, segundo o paradigma das redes epigenéticas, todo o complexo cromatínico do genoma, e não apenas o DNA isoladamente, poderia ser

considerado o componente *hardware* da célula, assim como o funcionamento integrado das redes biomoleculares poderia representar o *software*, capaz de interpretar e processar a informação, tanto genética quanto epigenética, em sintonia com as imposições do meio. Na célula, porém, não existe nitidez de fronteira entre *hardware* e *software*, já que as mesmas famílias de proteínas podem funcionar ao mesmo tempo como elementos estruturais e como elementos reguladores da cromatina. Por outro lado, na medida em que é impossível separar num conformon a sua estrutura de sua função (item 4.2.3), não tem sentido a distinção entre *hardware* e *software* numa célula. E, por fim, o armazenamento e o processamento da informação na célula se faz segundo processos autocatalíticos e autopoieticos, enquanto que no computador tudo é manufaturado extrinsecamente, de acordo com informações tecnológicas adquiridas e processadas pela mente humana.

4.3.2 – Células como autômatos de nível 2

Nas células eucarióticas, além da forma livremente distribuída de proteínas em microambientes, adequada para células procarióticas, existe também a forma de organização espacial dos biopolímeros na formação de complexos (BRAY, 1998) que conferem às redes biomoleculares, novamente em analogia com as redes neurais, a capacidade de processamento paralelo distribuído (FISHER *et al.*, 1999). As proteínas sinalizadoras podem ser descritas como máquinas termodinâmicas que atuam individualmente como agentes (*devices*) inteligentes e coletivamente como redes (*ecologies*), no sentido da integração dos processos celulares.

A visão das proteínas quinases e fosfatases, bem como das GTPases, como agentes com habilidades sociais permite uma abordagem computacional baseada no comportamento de indivíduos (automata) numa comunidade, realizada, por exemplo, na modelagem ecológica de JUDSON (1994) ou de DEVINE e PATON (1997), incorporando tanto o processo de informação quanto o poder catalítico (ver item seguinte).

A formação de complexos otimiza a regulação e a transferência de informação, através de cooperatividade entre componentes de cada módulo de sinalização paralela, bem como através da cooperatividade entre módulos que se inter cruzam, sejam eles FAK (*focal adhesion kinases*, item 1.3.3), AKAP (*A-kinases anchor protein*, item 1.2.4), MAPK (*mitogen activated protein kinase*, item 5.3.2) ou complexos nucleoprotéicos (seção 5.4).

As considerações acima, principalmente as relativas ao curto tempo de difusão comparado à duração dos ciclos biomoleculares, aliadas às adaptações ocorridas na célula eucariótica (seção 1.3), principalmente a compartimentalização e a *tensegrity* decorrentes respectivamente da altíssima relação superfície/volume e do arcabouço do citoesqueleto, apontam para a universalidade da Teoria Celular (“todo ser vivo é célula e vem de célula”), englobando todos os tipos, formas e dimensões de célula, independente de ser procariótica ou eucariótica, como a unidade morfofuncional dos seres vivos. Assim, a integração das redes biomoleculares se faz com a mesma eficiência, seja numa bactéria, semelhante a um mitocôndrio, seja numa célula eucariótica contendo centenas de mitocôndrios. A mesma maquinaria, com base no citoesqueleto, que integra e coordena a realização do ciclo celular (seção 5.4), também coordena a herança e o comportamento mitocondrial, integrando-o ao controle nuclear (YAFFE, 1999).

Assim, como a célula ancestral universal do mundo do DNA, todas as células componentes da biodiversidade atual continuam tendo sua homeostasia regulada pela integração das mesmas redes biomoleculares, já descritas fenomenologicamente no capítulo 2 e com fundamentações no capítulo 5. Na integração dessas redes, a pressão da seleção natural se exerce no sentido de, a nível de célula, maximizar a disponibilização da informação nas vias fosforrelés, minimizando a dissipação de energia. Em outras palavras, existe minimização do tempo e da resistência à disponibilização de recursos através da minimização da distância linear interna entre os módulos integrados em rede hierárquica, como se a maximização da taxa metabólica da célula se escalonasse pela área de superfície efetiva total e não pela área de superfície euclidiana. O escalonamento de área comparada a distância e a volume daria a relação A, L^2 , e $V^{2/3}$, considerando um conjunto convencional de variáveis euclidianas, e daria a relação a, l^3 , e $v^{3/4}$, considerando a integração das redes biomoleculares. Isto significa que, independente da grande variedade de tipos e de tamanhos de células, a integração global das redes biomoleculares se dá como se existisse uma área de superfície efetiva, a , cuja dimensão fractal é $d_a = 3$, ao contrário de 2, o valor canônico euclidiano, e que, por isso mesmo, se escala como se fosse volume (WEST *et al.*, 1999).

4.3.3 – Organismos pluricelulares como autômatos de nível 3

Como foi acenado acima, a nível de integração das redes biomoleculares, existe analogia entre o comportamento da célula procariótica bacteriana e o da célula ovo de

metazoários, não levando em conta as condições iniciais, genômicas e ambientais, predeterminantes da futura individualidade (colônia de unicelulares, no primeiro caso, e organismo pluricelular, no segundo caso). Em ambas as células existem, como *inputs* da rede de sinalização, sistemas de transdutores na membrana que, funcionando como sensores de concentração (*quorum-sensing systems*), permitem a comunicação de cada célula com o meio e com outras células da própria ou de outras espécies (STRAUSS, 1999).

Entre as condições genômicas iniciais que orientam o destino da célula ovo para a morfogênese do organismo estão genes homeóticos específicos de metazoários, cuja ação coordenada sobre circuitos autocatalíticos e autopoieticos definem previamente os eixos corpóreos (A/P e D/V), a lateralidade (direita/esquerda) e a competência para, independentemente do ciclo celular, atuar diretamente sobre o citoesqueleto na diferenciação dos folhetos embrionários, ao gerar células assimétricas MS (mesodérmicas) e E (endodérmicas) a partir de células EMS (seção 2.2). No desenvolvimento dos organismos pluricelulares, portanto, em que pese a grande diversidade de genomas, existem genes de mesma família que controlam ciclos autopoieticos homólogos cujas redes são reguladas por genes heterocrônicos, na dimensão temporal, e por genes alométricos (por exemplo, genes homeóticos), nas dimensões espaciais. De fato, heterocronia costuma ser definida como mudanças na taxa e no *timing* dos ciclos ontogenéticos, com reflexo nos processos evolutivos, enquanto alometria é definida como o padrão de covariação entre características morfofuncionais, resultantes da expressão de genes que regulam a formação de padrões espaciais (SLACK, RUVKUN, 1998, KLINGENBERG, 1999).

Considerando como exemplos as ontogenias de camundongo e de ser humano, constata-se que, no início do processo de diferenciação de cada tecido, a identidade é total em termos da integração das redes biomoleculares, promotoras de ciclos autopoieticos sincrônicos e com mesmos padrões espaciais. No entanto, no decorrer do processo, grandes diferenças surgem, em termos alométricos, indicando que circuitos autopoieticos homólogos, em termos heterocrônicos, apresentam sistemas de controle temporal diferentes. Nesse sentido, é como se os ciclos autopoieticos (relógios biológicos) estivessem regulados para marcha acelerada, no camundongo, e para marcha lenta, no ser humano. As etapas ontogenéticas se completam num curto período de vida, para o primeiro, e num longo período, para o segundo. A duração do período de vida

está ligada ao grau de iteratividade nas redes biomoleculares que circunscrevem os ciclos autopoieticos (KENYON, 1996).

Por exemplo, na formação da fibra muscular esquelética de camundongo e de ser humano, constata-se identidade total quanto aos processos de diferenciação, proliferação e fusão dos mioblastos para a formação da célula muscular multinucleada (sincicial), bem como quanto à dimensão do sarcômero, a unidade contrátil que se repete ao longo da miofibrila. As grandes diferenças só aparecem depois, ficando por conta da massa muscular, reflexo do comprimento das miofibrilas por fibra, da quantidade de fibras por músculo e da quantidade de músculo por órgão. Da mesma forma, na comparação entre os sistemas cardiovasculares de camundongo e de ser humano, constata-se identidade total quanto à morfofunção das células endoteliais, desde a formação do tubo capilar (fusão das células com continuidade dos respectivos vacúolos formando o lúmen) até a formação da camada endotelial revestindo internamente todos os vasos e o coração, bem como quanto ao diâmetro dos capilares e pequenos vasos proximais. As grandes diferenças só aparecem depois, ficando por conta da extensão das redes capilares, do calibre e do comprimento dos grandes vasos, bem como do tamanho do coração (ALBERTS *et al.*, 1994).

Mantendo em foco a árvore cardiovascular, as diferenças observadas entre camundongo e ser humano estão condizentes com o fato de que as ramificações, fruto de um esquema análogo ao modelo fractal de Mandelbrot, são produzidas por ativações iterativas da via tirosinaquinase por fatores de crescimento, sendo operadas por cerca de 7 gerações no camundongo e de 21 gerações no ser humano (METZGER, KRASNOW, 1999), acarretando logicamente grande diferença na massa corpórea e no metabolismo basal de ambos animais.

Com relação às diferenças na massa corpórea dos organismos de camundongo e de ser humano, valem as considerações feitas anteriormente sobre a fractalidade das redes biomoleculares. Os organismos desenvolveram redes fractais com ramificações hierárquicas que começam ou terminam em unidades funcionais de mesmo tamanho, como os sarcômeros ou os capilares no caso considerado. Para cada tipo de organismo, a área de superfície efetiva é uma função dessas unidades funcionais de tamanho fixo, caracterizadas por uma escala de comprimento l_0 , que juntamente com outras escalas de comprimento l_i parametrizam sua estrutura fractal (WEST *et al.*, 1999). Segundo esses autores, o escalonamento biológico pode ser descrito pela equação alométrica $Y=Y_0M^b$, onde M é a massa corpórea, Y é uma variável alométrica como a taxa metabólica, Y_0 é

uma constante de normalização e b é o expoente de escalonamento. Enquanto Y_0 varia livremente com o tipo de organismo estudado, os valores assumidos por b são limitados e múltiplos de $1/4$.

Desde o século passado já se admitia a idéia de que os animais queimavam energia, desprendendo calor, em função de sua superfície corpórea, de forma mais acelerada e em menor tempo de vida, para os pequenos animais, e de forma menos acelerada e em maior tempo de vida, para os grandes animais, bem como já se diferenciava o conceito de taxa metabólica total, a queima de energia por unidade de tempo (expressa em watt, unidade de potência), do de taxa metabólica específica, a energia queimada por unidade de massa (associada à pulsação cardíaca). Em 1883 o biólogo Max Rubner já avançava a explicação euclidiana das relações A , L^2 , e $V^{2/3}$, segundo as quais a taxa metabólica total se escala em relação à massa corpórea como $M^{2/3}$, enquanto a taxa metabólica específica o faz como $M^{-1/3}$. Em 1932 o zoólogo Max Kleiber demonstrou com medições precisas que os mesmos escalonamentos se fazem como $M^{3/4}$ e $M^{-1/4}$, respectivamente para a taxa metabólica total e taxa metabólica específica, o que posteriormente se mostrou condizente com as relações de fractalidade biológica, a , l^3 , e $v^{3/4}$, de West e colaboradores, acima citados (MACKENZIE, 1999). Entre outras relações de escalonamento que envolvem potência ($1/4$) ligando variáveis biológicas à massa corpórea, ainda podem ser citadas: diâmetros de troncos de árvores e de aortas ($M^{3/8}$), metabolismo celular ($M^{-1/4}$) e tempo de circulação do sangue ($M^{1/4}$).

Geralmente, nas comparações alométricas a densidade dos tecidos é considerada constante. No entanto, não só a densidade mas também as relações entre taxa metabólica e massa corpórea podem se ajustar de forma diferenciada aos tecidos em grupos diferentes de animais, sendo tal diferenciação significativa em se tratando de cérebros de mamíferos e explosiva em se tratando do cérebro humano. Pesquisa comparada em taxa metabólica basal mostrou que em mamíferos o tamanho do cérebro de neonatos tende a se correlacionar com a taxa metabólica materna, indicando que cérebros maiores requerem maior consumo de energia. E, entre homem e chimpanzé, embora a diferença genômica não ultrapasse 2%, durante a filogenia houve triplicação no tamanho do cérebro humano, enquanto na massa corpórea houve apenas duplicação. O aumento no tamanho do cérebro foi acompanhado com redução no tamanho do trato gastrointestinal, como se o excesso de energia desse sistema, tornado inútil pela qualidade da dieta, fosse drenada para satisfazer a voracidade do cérebro pós-natal, ainda não satisfeito com o

aporte de energia materna sobressalente durante a gestação e a lactação (GIBBONS, 1998).

4.3.4 – Biosfera como autômato de nível 4

Para a vida surgir na Terra, além da água e dos poucos elementos químicos essenciais (item 1.1.1), foi necessária uma fonte de energia adequada para o metabolismo, crescimento, manutenção e reprodução. Antes da evolução de organismos procarióticos capazes de realizar a fotossíntese e a fotorrespiração, as células primitivas não poderiam utilizar diretamente a luz solar, mas apenas fontes abióticas de energia química na forma de acoplamentos entre pares favoráveis para oxidação e redução, levadas a efeito por atividade hidrotermal (*vent ecosystems*), impacto mecânico, radiação ultravioleta e descargas elétricas. No entanto, este cenário inicial seria insustentável em termos termodinâmicos, já que todos os pares redox tenderiam ao equilíbrio em função das próprias atividades abióticas e biológicas incipientes, a não ser que novas variedades de microorganismos adquirissem a capacidade de utilização de novas fontes de energia tanto interna, como a geoquímica, quanto externa, como a luz solar. A energia para a vida passou então a ser derivada, ainda de forma limitada, das reações geoquímicas, tais como metanogênese e redução de enxofre livre, e, de forma mais eficiente, da luz solar através da fotossíntese (em *eubacteria* e seus derivados cloroplastos) e da fotorrespiração (em *archaea* e seus derivados mitocôndrios).

A integração desses dois tipos de energia cria um novo cenário dominado, de um lado, pelo desequilíbrio de acoplamento geotérmico - direção de uma reação redox se opondo em alta e em baixa temperatura, com inibição cinética desta última - e, de outro, pela catálise biológica - realizada a baixa temperatura com extração de energia do gradiente geotérmico (GAIDOS *et al.*, 1999).

Desde a origem da vida, as vias metabólicas passaram a adquirir importância geológica, com os ciclos geoquímicos operantes na biosfera sendo alterados pelo metabolismo microbiano, de tal forma que as reações químicas típicas desses ciclos passaram a ser mediadas biologicamente e não mais inorganicamente.

Na biosfera atual é impossível o entendimento dos ciclos geoquímicos globais, bem como da distribuição e da regulação da biodiversidade, sem levar em conta a rede procariótica onipresente.

CAPÍTULO 5

INTEGRAÇÃO DAS REDES BIOMOLECULARES: CONTRIBUIÇÃO PARA UM MODELO DE CÉLULA VIRTUAL

No capítulo 2, onde se tratou da descrição fenomenológica das redes bioinformacionais, foi sugerido que para explicar o funcionamento integrado da célula, como unidade básica dos seres vivos, seguindo o paradigma das redes epigenéticas (STROHMAN, 1997), é suficiente fundamentar o funcionamento integrado das seguintes redes biomoleculares:

uma **rede genômica** cujo *output* expressa de modo constitutivo (*default*) a **rede metabólica e de manutenção**, bem como de modo indutivo (via estímulos do meio) regula o ciclo celular, através de *inputs* trazidos pela **rede de sinalização** (a nível de *software*) e pela **rede mecânica** (a nível de *hardware*), definindo o tipo de programa a ser “rodado”: proliferação ou duplicação, diferenciação ou embriogênese, morte programada ou apoptose e transformação ou câncer.

A denominação de rede genômica, chamada anteriormente de rede genética, será justificada na seção 5.4. Na seção 2.1, só o *output* da rede metabólica, e não a rede metabólica em si mesma (seção 1.2), foi considerado como elemento essencial para a integração das demais redes biomoleculares. Isto se justifica pela sua gênese constitutiva para funcionar de forma linear direcionada para um alvo único, a síntese de ATP, diferentemente das outras vias de sinalização, com gênese indutiva e comunicações cruzadas entre si (FRIDLAND, SCHEIBE, 1999).

Assim, as redes biomoleculares se resumirão na rede de sinalização (5.3), englobando a rede mecânica e a rede de sinalização propriamente dita, e na rede genômica (5.4), expandindo-se para englobar todas as regiões do DNA, não só as codificantes de proteína como também as não codificantes.

5.1 – FORÇA E LIMITAÇÃO DOS MODELOS EXISTENTES

A revista *Science* de 30 de abril de 1999 apresenta, numa seção especial, a transdução de sinal como uma nova ciência cujo objeto é a linguagem pela qual as células se comunicam e respondem a estímulos internos e externos, através de vias de

sinalização bioquímicas. Na mesma seção, após reconhecimento de que, diante do dilúvio de informações nos *genome databases*, as vias devam ser conectadas em redes de sinalização, é anunciado para breve o lançamento de uma revista virtual “*at Science’s Signal Transduction Knowledge Environment*” (www.stke.org).

Note-se que as palavras transdução e sinalização estão sendo usadas aqui no seu sentido mais amplo. No sentido estrito, a palavra transdução pode se referir apenas à conversão de energia e/ou sinal do meio, operada por receptores de membrana, enquanto a palavra sinalização pode aparecer apenas como conotativo de uma das redes biomoleculares, ou seja, da rede de sinalização. Por seu turno, a expressão “rede de sinalização” pode ser usada no sentido restrito, referindo-se à rede tradicionalmente tratada como solúvel, ou no sentido amplo, englobando também a rede mecânica cuja existência só recentemente está sendo reconhecida.

Em número anterior da mesma revista (*Science*, 2 de abril de 1999), numa seção especial sobre Sistemas Complexos, aparece a notícia de que milhões de dólares estão sendo investidos em estudos interdisciplinares, a fim de melhorar o conhecimento sobre o funcionamento das redes biológicas, através do entendimento de como as biomoléculas interagem entre si. Na mesma seção, são apresentados dois modelos de célula virtual, considerados os mais avançados até então: o modelo criado por Masaru Tomita, Universidade de Keio, Fujisawa (www.e-cell.org), e o modelo criado por Leslie Loew e James Schaff, Universidade de Connecticut (www.nrcam.uhc.edu).

5.1.1 – A metodologia básica

A metodologia básica para criação desses dois modelos é a mesma proposta para a criação do nosso modelo: as informações e os parâmetros são retirados de estudos experimentais publicados na literatura. Há, porém, uma grande diferença: os modelos até então apresentados utilizam a bioinformática como ciência da computação, refletindo o paradigma genético reducionista, enquanto o nosso modelo se inspira na bioinformática como ciência biológica, integrando o *feedback* das redes epigenéticas ao fluxo da informação genética, tradicionalmente considerado apenas no seu fluxo unidirecional.

Nesse sentido, o modelo de simulação de redes, criado por Bhalla e Iyengar (piris.pharm.mssm.edu/urilab/), representa um avanço considerável (LISMAN *et al.* 1999, BHALLA, IYENGAR, 1999). Todos os parâmetros utilizados nas simulações são retirados de estudos experimentais publicados na literatura, cujas medidas são

comparadas e cruzadas, primeiro a nível da reação de ativação dos componentes de cada nó, em seguida a nível de via de sinalização envolvendo vários nós, até chegar a nível de integração de várias vias em redes mais amplas. Tais redes exibem propriedades emergentes, tais como integração de sinais através de escalas múltiplas de concentração e de tempo; geração de *outputs* distintos dependendo da intensidade e duração dos *inputs*, bem como alças de retroalimentação auto-sustentáveis (*self-sustaining feedback loops*). Estas, por sua vez, evidenciam comportamento bi-estável com atividades em distintos estados dinâmicos (*steady-state*), com limiares de ativação (*input thresholds*) bem definidos para a transição entre estados e, finalmente, com sinal de saída prolongado após remoção da estimulação. Um aspecto atraente dessas alças de retroalimentação como um mecanismo para armazenar informação é que o armazenamento, ou seja, a memória não está localizada em nenhuma molécula individual da alça. Assim, o armazenamento de informação pode permanecer estável, independente da instabilidade ou da reciclagem dos componentes moleculares. No caso da memória de longa duração, as alças de retroalimentação podem conter complexos que sofrem remodelações ou cujas sub-unidades sofrem mudanças na conformação (*folding*), relacionadas com expressão gênica ou envolvendo pelo menos a ativação local da tradução de moléculas de mRNA preexistentes.

Apesar do considerável avanço, o modelo de Bhalla e Iyengar, como é reconhecido pelos próprios autores, ainda não pode ser considerado como descrições definitivas de redes dentro da célula, na medida em que seus dados retirados da literatura refletem parâmetros bioquímicos obtidos de componentes isolados, ao passo que os sistemas reais de sinalização biológica estão em geral hierarquicamente ancorados em estruturas e agrupados em complexos.

5.1.2 – Superação das limitações

No sentido de superar essas limitações, a nossa proposta de modelo leva em consideração dados experimentais mostrando, por exemplo, como a transdução de sinais na cascata da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) é controlada tanto por regulação da ativação enzimática quanto pela organização de complexos enzimáticos em arcabouços moleculares (SCHAEFFER *et al.* 1998). Por outro lado, graças à sua “ancoragem”, esses processos de transdução funcionam de forma cooperativa, caracterizada por elevado coeficiente de Hill, e com alça de retroalimentação positiva (FERRELL Jr, MACHLEDER,, 1998), em regime de autocatálise (NICOLIS,

PRIGOGINE, 1989) e de autopoiese (MATURANA, VARELA, 1980). Um outro exemplo recente são os canais de cálcio (receptores rianódinos) do músculo esquelético, que formam complexos com interligações mecânicas e abertura sincronizada (*coordinated gating*), em contraste com a visão tradicional segundo a qual cada canal funcionaria de forma independente (*stochastic gating*) (BERS *et al.*, 1998, MARX *et al.*, 1998).

Considere-se ainda que o modelo de Bhala e Iyengar só trata da rede de sinalização, enquanto o nosso modelo integra a rede de sinalização (a nível de *software*), juntamente com a rede mecânica (a nível de *hardware*), à rede genômica (CPU da célula), sendo estas redes alimentadas pelo *output* da rede metabólica.

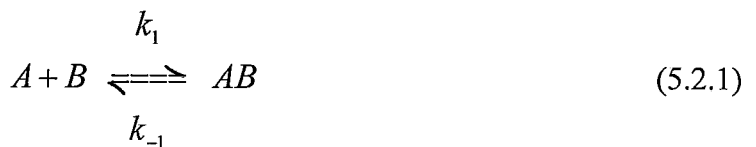
5.2 – PROCESSOS FUNDAMENTAIS

A caracterização e a descrição do funcionamento das redes biomoleculares que integram a homeostasia da célula já foram feitas no capítulo 2. No capítulo 3, foi mostrado como o conceito de energia livre de Gibbs pode ser usado na descrição dos sistemas biológicos, enquanto no capítulo 4 foram apresentados mecanismos para a interconversão de energia livre, com exemplos dos principais pares de transdução que ocorrem na célula, bem como a otimização desses mecanismos. O *output* da rede metabólica se identifica com a síntese da molécula de ATP cuja hidrólise fornece a energia universal de *input* para todas as conversões.

Geralmente os processos biológicos envolvem conversões entre as diversas formas da energia livre de Gibbs, tendo a hidrólise de ATP como única forma de energia de *input*, em se tratando de processos intracelulares. Daí se deduz a importância dos mecanismos de fosforilação e desfosforilação.

Em última análise, o conceito de diferença de energia livre de Gibbs está presente em todos os ajustes feitos por estruturas celulares a diferentes situações promotoras de transdução de energia e de informação de sinais. Assim, usando deste conceito, tentar-se-á, ao final deste capítulo 5, passar da descrição fenomenológica para a fundamentação dos mecanismos de funcionamento e de integração das redes biomoleculares.

Na transdução de energia ou na transmissão de sinal estão envolvidos os processos de fosforilação (proteína quinase) e de desfosforilação (proteína fosfatase), associados aos processos de ativação (*folding*) e inativação (*unfolding*) de proteínas, cujos tipos de ON-OFF já foram descritos no capítulo 1 e cujo mecanismo de ação, já descrito no capítulo 4, pode ser esquematizado pela reação química



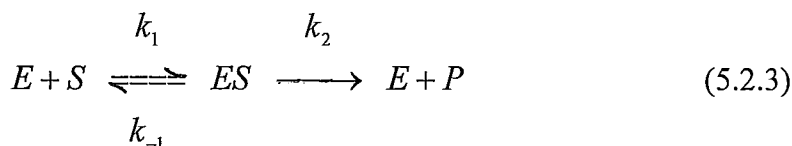
onde k_1 representa proteína quinase e k_{-1} representa proteína fosfatase.

O envolvimento desses processos pode ser indireto, como no sistema ciclina-CDK (cuja fenomenologia foi descrita no capítulo 1 e cujo funcionamento será dado a seguir, na seção 5.4), onde a fosforilação está associada a degradação ou produção de

mensageiros intracelulares. Estes processos são descritos pelo esquema de reação do tipo anterior e do tipo



A equação de Michaelis-Menten é um caso especial, em que os dois esquemas acima ocorrem em seqüência, considerando-se a etapa final como irreversível,



sendo esta equação especificada pelas três constantes k_1 , k_{-1} e k_2 , e pelas concentrações iniciais da enzima E, do substrato S e do produto P.

As reações químicas 5.2.1 e 5.2.2 são analiticamente equivalentes e podem ser descritas por equações diferenciais da forma

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{-1}[C][D] - k_1[A][B] \quad (5.2.4)$$

onde se utiliza a cinética de ação das massas.

Utiliza-se a cinética de Michaelis-Menten, em se tratando das enzimas reguladoras. Geralmente, quando nos referimos à velocidade (v) de ocorrência de reação, são usadas as expressões taxa da reação (*rate*) ou taxa máxima (*maximum rate*), bem como atividade constante (*constant activity*). As outras constantes de reação são: a constante de taxa, k (*rate constant*), e a constante de Michaelis-Menten, K .

Várias reações podem ser conectadas através de fosforilações e desfosforilações, representando vários nós numa via fosforrelé de sinalização que, por sua vez, também pode ser conectada a outras vias, através de alças de retroalimentação, envolvendo um

segundo mensageiro comum, ou através de janela de permissividade (*gate*), envolvendo ciclo de ação retardada da fosfatase (BHALA, IYENGAR, 1999). Assim, o *output* de uma rede biomolecular integrada evidencia o comportamento bi-estável, com estados dinâmicos (*steady states*) distintos, correspondentes a condições de estimulação sub e supraliminar, característicos de autômato celular regido pela lógica booleana, segundo equação abaixo (NICOLIS, PRIGOGINE, 1989).

$$X_{t+1} = F(X_t) \quad (5.2.5)$$

As variáveis booleanas mudam sincronizadamente de valores e em etapas discretas de tempo, de tal forma que a taxa de variação de $F(X)$ é muito pequena quando $0 < X < X_0$ (X e F são iguais a “zero”), enquanto a variação de $F(X)$ rapidamente satura num valor de F_{\max} quando $X > X_0$ (X e F são iguais a “um”), cujas curvas evidenciam cooperatividade (autocatálise) e ultrasensibilidade de sistema biológico em diferentes situações (FERRELL Jr, MACHLEDER, 1998).

A ultrasensibilidade, como característica de cascata de enzimas e não de enzima isolada, vem sendo definida como a resposta de um sistema que se mostra mais sensível a mudanças na concentração de substrato do que a resposta hiperbólica dada pela equação de Michaelis-Menten. Geralmente se usa o coeficiente de Hill (n) para caracterização de sensibilidade hiperbólica ($n = 1$) e de ultrasensibilidade ($n > 1$). Alguns mecanismos de ultrasensibilidade já são conhecidos, tais como o de cooperatividade na hemoglobina, o de ordem zero na reação de quinases próximas da saturação, o de múltiplos reguladores para mesma enzima e o da cascata MAPK (KOSHLAND Jr, 1998).

Representa apenas o início de uma longa jornada o tratamento adequado da cooperatividade, existente graças à organização de complexos enzimáticos em arcabouços moleculares (SCHAEFFER *et al.* 1998), na cascata MAPK (FERRELL Jr, MACHLEDER, 1998) ou nos canais de cálcio rianódinos do músculo esquelético (BERS *et al.*, 1998, MARX *et al.*, 1998). Por outro lado, para além dos complexos nucleoprotéicos, cresce o reconhecimento de fatores físicos e biofísicos que levam à formação dos complexos de sinalização, cuja formação é coordenada por elementos da membrana integrando as sub-redes biomoleculares da matriz extracelular com a do citoesqueleto (BRAY, 1998, INGBER, 1998). Com relação aos complexos

nucleoprotéicos, já existem trabalhos tratando da sucessão termodinâmica e cinética desses complexos na replicação e na transcrição (von HIPPEL, 1998), além da caracterização desses complexos graças à técnica de *footprinting* (TSODIKOV, 1998, CRAIG, 1998) e do funcionamento, como num circuito lógico, dos elementos cis da região promotora (YUH, 1998).

Todo esse tratamento está levando em conta a linguagem das energias livres, caracterizada no capítulo 4, onde também ficou registrada a constatação de que a cooperatividade nada mais representa do que correções não-aditivas feitas nas variações de energia livre e de entropia conformacional (item 4.2.1).

5.3 – A REDE DE SINALIZAÇÃO

Nos capítulos 1 e 2 foram descritos os principais transdutores localizados na membrana plasmática, bem como a integração dos mesmos na rede de sinalização onde vias de sinalização, tanto solúveis quanto mecânicas, convergem sobre arcabouços cooperativos, como o da cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que, por sua vez, canalizam os *outputs* da rede de sinalização para funcionarem como *inputs* da rede genômica.

5.3.1 – Os transdutores na membrana plasmática

Os hormônios lipossolúveis, por exemplo esteróides e corticóides, se ligam diretamente a um receptor intracelular que, ativado pelo ligante, muda de conformação, passando a ter grande afinidade por um elemento cis no DNA, um HRE (*hormone response element*), funcionando como um coativador no complexo de transcrição.

Os receptores RTK (*receptor tyrosine kinases*) (itens 1.2.1 e 2.1.2), com atividade intrínseca de autofosforilação, ao serem ativados por fatores de crescimento ou por reações cruzadas na rede imunológica, se dimerizam e formam complexos com proteínas adaptadoras que, através da quinase PKC (*protein kinase C*), da quinase PKA (*protein kinase A*) e da quinase CamKII (*calmodulin kinase II*) canalizam a via fosforrelé para a cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Receptores RTK sem atividade intrínseca de autofosforilação se associam a proteínas JAK (*Janus kinases*), passando a fosforilar as proteínas STATs (*signal transducers and activators of transcription*) que, migrando para o núcleo celular, funcionam diretamente como fatores de transcrição, sem passagem pela cascata MAPK.

As integrinas (itens 1.3.3 e 2.1.3), como o próprio nome indica, são os receptores que integram a matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto, gerando a propriedade denominada “*tensegrity*” que permite à célula, através de sua ancoragem ao substrato ou a outras células, adquirir sua forma adequada, bem como coordenar todos os movimentos a nível extra e intracelulares. As integrinas sinalizam através da membrana em ambas as direções, permitindo reorganizações rápidas da rede mecânica, tanto a nível da MEC quanto a nível do citoesqueleto. A sinalização pelas integrinas regulam as atividades de todas as outras vias, inclusive dos canais iônicos, coordenando a regulação do ciclo celular, tanto a nível de *software* (vias de sinalização) quanto a nível de *hardware* (modificação e transporte da cromatina).

Referência especial merecem os receptores heptaalcoídicos ou serpentínicos, associados às G-proteínas (itens 1.2.2 e 2.1.2), responsáveis pela grande maioria de transduções de sinais tanto do meio externo quanto do meio interno (ver seção 2.1), tendo o cálcio ou o cAMP (*cyclic AMP*) como segundo mensageiro que, através da quinase PKC (*protein kinase C*), da quinase PKA (*protein kinase A*) e da quinase CamKII (*calmodulin kinase II*) canalizam a via fosforrelé para a cascata MAPK.

5.3.2 – A cascata MAPK

A cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), sem levar em conta a sinonímia específica para cada organismo modelo, apresenta proteínas quinases em ordem decrescente de sítios fosforiláveis, genericamente chamadas de MAPKKK, MAPKK e MAPK, tendo sido muito estudada em oócitos de *Xenopus laevis* (FERRELL Jr, MACHLEDER, 1998). Estes oócitos, estacionados na fase G2 da primeira divisão meiótica, quando estimulados com progesterona entram no processo de maturação que se completa na transição do ciclo celular (ver item 5.4.2) até a fase da metafase II. A maturação do oócito, quando um estímulo variável e contínuo é convertido numa resposta “tudo ou nada”, é um exemplo de definição do destino celular (*cell fate switch*), típica dos sistemas biológicos, geradora de biestabilidade: os oócitos podem residir ou no estado G2 ou no estado metafase II, passando apenas de forma transitória pelo estado intermediário (EL-MASRI, PORTIER, 1999).

O hormônio progesterona, através do seu receptor nuclear (sendo lipossolúvel não tem receptor na membrana) ou elemento HRE (*hormone response element*) coordena a formação do complexo de transcrição que leva à síntese da proteína Mos, promovendo o acúmulo dessa quinase (MAPKKK) fosforiladora e ativadora da quinase Mek-1 (MAPKK) que, por sua vez, fosforila e ativa a proteína MAPK. Esta proteína ativada atua sobre o ciclo celular (ver item 5.4.2), ativando o dímero cdk1-ciclina B, o fator mitogênico (MPF, *mitogen promoting factor*) responsável pela progressão da fase G2 para a metafase II.

A análise do comportamento de oócitos individuais mostra que a resposta da MAPK à progesterona é típica de cooperatividade enzimática, com um coeficiente de Hill em torno de 35, ou seja, dez vezes mais que o apresentado pela hemoglobina, quando tratada pela equação de Hill, apresentada abaixo.

$$Y = \frac{X^n}{K^n + X^n} \quad (5.3.1)$$

Nesta equação, Y é o rendimento ou resposta da reação (*yield*), n representa o coeficiente de Hill que, sendo $n=1$, reflete o comportamento michaeliano (sensibilidade hiperbólica) das enzimas, ao passo que, sendo $n>1$, reflete o comportamento cooperativo (ultra-sensibilidade). No primeiro caso a reação enzimática é de primeira ordem, com a concentração de substrato em torno do K_m , enquanto, no segundo caso, a equação é de ordem zero (pseudo primeira ordem), com a concentração do substrato na faixa de saturação, numa situação típica dos sistemas biológicos. Por outro lado, na situação experimental do trabalho de FERRELL Jr, MACHLEDER, (1998), Y representa a resposta de cada oócito à progesterona, refletida no nível de fosforilação da MAPK; X representa o estímulo, ou seja, a variação nas concentrações de progesterona, enquanto K representa o K_m , ou seja, a concentração de X para a qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima.

O valor de K é específico para cada oócito, refletindo o limiar de excitabilidade, abaixo do qual o oócito permanece em situação de *OFF* (baixo nível de fosforilação da MAPK), e acima do qual o oócito permanece em situação de *ON* (alto nível de fosforilação). Este tipo de comportamento pode ser detectado ao se tratar uma população de oócitos com um valor médio de estimulação. Como a resposta é tudo ou nada, só se encontrarão oócitos em situação ou de *OFF* ou de *ON*, sem situação intermediária.

A distribuição (D) de oócitos para os valores de K é dada por

$$D = \frac{dN}{dK} \quad (5.3.2)$$

onde N se expressa como

$$N = \frac{K^m}{a^m + K^m} \quad (5.3.3)$$

O expoente m se relaciona com a variabilidade de oócitos: quanto maior o valor de m , menor será a variabilidade, quando em concentrações correspondentes a K . A constante “ a ” representa a concentração de estímulo (progesterona) para a qual a metade da população de oócitos apresenta uma resposta que seja pelo menos a metade da máxima.

A distribuição de oócitos para valores de Y é dada por

$$F = -\frac{dN}{dY} \quad (5.3.4)$$

Resolve-se para K em termos de X e Y na equação 5.3.1, substituindo-se na equação 5.3.3:

$$K = X \left(\frac{1-Y}{Y} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (5.3.5)$$

$$N = \frac{X^m \left(\frac{1-Y}{Y} \right)^{\frac{m}{n}}}{a^m + X^m \left(\frac{1-Y}{Y} \right)^{\frac{m}{n}}} \quad (5.3.6)$$

Tomando-se a derivada de N em relação a Y :

$$F = -\frac{ma^m X^m \left(\frac{1-Y}{Y} \right)^{\frac{m}{n}}}{n \left[a^m + X^m \left(\frac{1-Y}{Y} \right)^{\frac{m}{n}} \right]^2 (Y-1)Y} \quad (5.3.7)$$

Esta equação descreve como uma população de oócitos se distribui entre vários valores da resposta Y , para determinados níveis de X , m e n , permitindo inferir valores de n para distribuições de oócitos determinadas experimentalmente.

Trabalhando-se *in vitro*, com as enzimas da cascata MAPK isoladas, constata-se a situação michaeliana em que $n=1$, gerando uma curva hiperbólica. Trabalhando-se *in vitro*, mas mantendo-se a preservação estrutural do complexo MAPK nos extratos, constata-se a situação de cooperatividade em que $n>5$, gerando curva sigmóide. Trabalhando-se *in vivo*, com populações de oócitos, constata-se a existência de alça autocatalítica com retroalimentação positiva em que $n>30$, gerando curva típica de biestabilidade. Na verdade, nos sistemas biológicos, a manifestação de alça autocatalítica se confunde com a manifestação da autopoiese (MATURANA, VARELA, 1980) pela qual ocorre transcrição com expressão e acumulação de elementos constitutivos da alça.

5.4 – A REDE GENÔMICA

Por vários motivos, o nome de rede genômica é preferível ao de rede genética. São consideradas como genes, só as regiões de DNA denominadas ORFs (*open-reading frames*) que codificam proteínas, tendo como intermediário o RNA mensageiro (mRNA) transcrito dessas regiões. Por extensão, podem ser consideradas genes também as sequências de DNA, das quais são transcritas as moléculas de RNA transportador (tRNA) e ribossômico (rRNA), que não codificam proteínas diretamente, embora sejam auxiliares essenciais nessa codificação.

Por outro lado, os íntrons que, embora sendo regiões dentro de ORF, não permanecem na versão final do mRNA, bem como os elementos cis-reguladores que, embora fora de ORF, são essenciais para a transcrição, não podem ser considerados elementos estranhos aos genes. Nesse sentido mais amplo, poder-se-ia continuar usando o nome genética em vez de genômica.

No entanto, os genes, mesmo neste sentido mais amplo, não chegam a ocupar nem 10% do genoma de mamífero e os 90% de DNA extra-gênico não pode ser DNA descartável (*junk DNA*). Mas, para não se admitir um contra-senso da seleção natural, inadmissível em termos termodinâmicos, tem que se admitir a importância do DNA extra-gênico para o funcionamento global da rede genômica (SANDLER *et al.*, 1998, SHAPIRO, 1999).

Tradicionalmente, os processos relacionados ao funcionamento genômico têm sido estudados em compartimentos estanques, dando a impressão da existência de sistemas complexos isolados, tornando quase impossível, para um cientista especializado numa área, acompanhar os simpósios e a copiosa literatura das outras áreas. No entanto, não existem sistemas complexos isolados, mas sim um comportamento complexo de elementos com características comuns a vários sistemas (NICHOLIS, PRIGOGINE, 1989). Assim, é possível recolher na literatura atualizada as visões de grupos de pesquisa e revisões de autores que começam a apontar para essas características comuns ou para novas interpretações desse comportamento complexo, afim de reunir a diversidade de “nós” (já disponíveis mas dispersos) na malha mais ampla da rede genômica, bem como evidenciar o funcionamento desta rede, com sua modulação a nível de *hardware* pela rede mecânica (INGBER, 1993, 1994, 1998) e a nível de *software* pela rede de sinalização (LISMAN, 1999, BHALLA, YENGAR, 1999), sendo todas alimentadas pela rede metabólica.

Entre as visões e revisões, encontram-se temas referentes à organização do genoma de cada espécie como sendo hierárquica e nos moldes da arquitetura de sistemas dos computadores eletrônicos, onde programas com mesma funcionalidade podem ser codificados de forma diferente segundo exigências contextuais de *hardware* e de sistema operacional (SHAPIRO, 1999), o que condiz com a possibilidade da transcrição poder ser regulada também por regiões não codificantes (SANDLER *et al.*, 1998); à capacidade da molécula de DNA funcionar em regime de tunelamento energético, com transferência de elétrons facilitada pelo π -empilhamento (HOLMLIN *et al.*, 1997, KELLEY *et al.*, 1999), ou em transferências de energia graças a tensão helicoidal, regulada por enzimas (BATES, MAXWELL, 1993); às semelhanças espantosas existentes no funcionamento e na estrutura dos complexos nucleoprotéicos (KODADECK, 1998), bem como à sucessão termodinâmica e cinética desses complexos na replicação, na transcrição e na recombinação (von HIPPEL, 1998), e ainda à caracterização desses complexos graças à técnica de *footprinting* (TSODIKOV, 1998, CRAIG, 1998); ao funcionamento, como num circuito lógico, dos elementos cis e trans na região promotora (YUH, 1998); às consequências do vergamento do DNA (*DNA-bending*), promovido por enzimas DNA-ligantes, na reestruturação da cromatina e dos complexos nucleoprotéicos (PÉREZ-MARTÍN, DE LORENZO, 1997); ao papel do RNA na gênese e evolução dos complexos nucleoprotéicos, através de sua versatilidade estrutural e ribozímica (CATE, 1998a e 1998b), de seu processo de maturação e de sua capacidade primordial de catalisar a formação de ligação peptídica, até mesmo na ausência de proteínas do complexo ribossômico (NITTA, 1998).

5.4.1 – Visão unificada dos complexos nucleoprotéicos

Já existe uma visão unificada dos complexos nucleoprotéicos sedimentada na literatura (KODADECK, 1998). A base molecular para a formação e funcionamento da rede genômica reside na correlação entre sítios específicos na sequência de DNA (elementos cis) e, para reconhecimento desses sítios, domínios específicos em proteínas DNA-ligantes (elementos trans). Como referido no item 2.1.4, graças a essa correlação, formam-se nucleossomos em função de interações entre proteínas histonas e a dupla hélice de DNA, bem como regiões MARs (*matrix attachment regions*) e SARs (*scaffold attachment regions*), em função da estruturação dinâmica da cromatina em grande e pequena escala, além das interações da cromatina com os microtúbulos nos processos citocinéticos.

Os complexos nucleoprotéicos coordenam a evolução do ciclo celular (os complexos mais conhecidos de transcrição, de replicação e dos próprios nucleossomos, bem como os complexos de recombinação, o complexo promotor da anáfase, o organizador de microtúbulo, o centromérico e o telomérico) e os complexos riboprotéicos entram em cena na regulação pós-transcricional e na tradução (esplaiçoossomo, nucléolo e ribossomo).

Independente do tipo, na estruturação e no funcionamento dos complexos nucleoprotéicos existem princípios básicos comuns, dinâmicos e eficientes (KODADECK, 1998), que permitem a orquestração de processamento de monômeros na polimerização a velocidades em torno de 500 a 1000 nucleotídeos por segundo e com uma taxa de erro de um por dez milhões. Tal grau de otimização é atingido graças às propriedades, em muitos pontos complementares, dos ácidos nucléicos e das enzimas, que, além da estruturação dinâmica dos complexos, permitem ainda em cada etapa a superação das barreiras energéticas limitantes (item 5.4.4).

As proteínas conhecidas como DBP (*DNA-binding proteins*) funcionam como máquinas modificadoras da cromatina (NELSON, 1995, ORLANDO, PARO, 1995, HAGMANN, 1999). As enzimas helicases se ligam a uma fita simples de DNA, hidrolisam ATP e com esta fonte de energia mudam sua conformação, passando a deslizar sobre uma das fitas de DNA que se desliga da sua complementar. Num sítio de iniciação de replicação, envolvendo algumas dezenas de pares de bases, duas helicases deslocando-se em sentido contrário dão origem à bolha de iniciação entre duas forquilhas. Para a manutenção da bolha e o posterior deslocamento da forquilha, torna-se necessária a ação cooperativa das proteínas SSB cujos monômeros globulares se polimerizam ao longo da hélice simples, estabilizando-a, sem cobrir porém as bases desemparelhadas. A ação cooperativa das helicases e das proteínas SSB, na medida em que desespiralisa a dupla hélice localmente, abre caminho para o deslocamento da forquilha, que, para se tornar efetivo, exigirá revoluções à frente em toda a molécula de DNA. Se um passo de dupla hélice tem 10 pares de bases e se a forquilha se movimenta com a velocidade de 500 nucleotídeos por segundo, então a molécula de DNA deve dar 50 giros à frente por segundo, o que representa uma barreira energética dificilmente transponível, cuja superação, no entanto, é feita sem gasto adicional de energia pelas enzimas topoisomerases. A enzima topoisomerase I se liga de forma covalente a um fosfato de uma hélice de DNA e, conservando a energia do fosfato, quebra de forma reversível a ligação fosfodiéster, cortando a hélice correspondente, de tal modo que as

desespiralizações provocadas na forquilha morrem no corte, desfazendo a necessidade dos giros à frente em toda a molécula de DNA. Já a topoisomerase II é ativada por hidrólise de ATP e, com mais energia disponível, liga-se à dupla hélice, cortando ambas e religando-as em condições de recombinação ou de fixação a substratos do arcabouço cromossômico (SARs) ou da matriz nuclear (MARs). A ação das topoisomerasas, portanto, tem um papel essencial na economia energética e entrópica da função genômica, através da regulação da tensão helicoidal da cromatina, local e globalmente.

O complexo de replicação (MARX, 1995, ROWLES, BLOW, 1997, TOONE *et al.*, 1997, CLEAVER, 1999), ou ORC (*origin recognition complex*), caracterizado como a holoenzima DNA-polimerase, se organiza sobre os elementos cis denominados ARSs (*autonomously replicating sequences*), progredindo na polimerização em função de reestruturações a nível termodinâmico e cinético (ver item 5.4.4). O complexo de transcrição (WICKELGREN, 1995, NOWAK, 1995, TJIAN, 1995, BEATO, EISFELD, 1997, YUH, 1998), caracterizado pela holoenzima RNA-polimerase II, codificante de mRNA (as RNA-polimerases I e III codificam os respectivos tRNA e rRNA), se organiza sobre a região promotora do gene (*promoter*) que contém os elementos cis de reconhecimento para os elementos trans, os fatores de transcrição (ver item 5.4.3). O complexo de recombinação (GUO *et al.*, 1997, RINGROSE *et al.*, 1998), caracterizado por holoenzima recombinase, se forma em regiões específicas da molécula de DNA, quando emparelhadas em condições de homologia, com possibilidade de cortes, reconstrução e trocas. O complexo telomérico (ZAKIAN, 1995, MORIN, 1996, GREIDER, BLACKBURN, 1996), caracterizado pela holoenzima telomerase, se forma nas extremidades dos cromossomos (telômero) para promover o alongamento da molécula de DNA, afim de compensar o encurtamento geralmente produzido durante o processo de replicação. O complexo centromérico (PLUTA *et al.*, 1995, SCHIEBEL, BORNENS, 1995), caracterizado por holoenzimas CENPs, se organiza em torno da heterocromatina dessa região, permitindo a interação do cinetócoro com o microtúbulo no sub-complexo denominado MTOC (*microtubule organization center*).

5.4.2– A máquina universal do ciclo celular

A partir das primeiras células do mundo do DNA, originadas por evolução abiótica processada no mundo do RNA, fixaram-se as condições termodinâmicas e cinéticas que selaram o destino da evolução biológica, segundo os ditames da Teoria Celular: “todo ser vivo é célula e vem de célula”. As fases da vida de uma célula,

ligando-a à célula progenitora e à célula filha, constituem o chamado ciclo celular que oscila entre síntese de DNA (fase S) e divisão mitótica ou meiótica (fase M), com os intervalos (*gap*) caracterizando a fase G1, logo após a fase M, e a fase G2, logo após a fase S. Desde as células ancestrais e ainda presente em todas as células atuais, existe a máquina universal que promove a transição entre as fases do ciclo celular, com sensibilidade para pontos de controle (*checkpoints*) específicos em cada fase.

O elemento básico da máquina universal do ciclo celular é o heterodímero formado pelas sub-unidades proteicas ciclina B e cdk1 (*cyclin-dependent kinase*). Ciclina B e cdk1 também são referidas com outros nomes, tais como cdc13 e cdc2 respectivamente. Ao lado desse heterodímero básico (cdk1 - ciclina B), existe um outro heterodímero análogo (cdk2 – ciclina E) como coadjuvante.

Além da ligação com a ciclina B, a cdk1 pode ser regulada de várias maneiras, conforme se observa na figura 5.4.2.1A: fosforilação no resíduo treonina (T) pela quinase QT e desfosforilação pela fosfatase FT, bem como fosforilação no resíduo tirosina (Y) pela quinase QY e desfosforilação pela fosfatase FY. Desses quatro possíveis estados adquiridos pelo heterodímero (HD, HDp, pHD e pHDp), apenas o estado HDp, correspondente ao fosforilado no resíduo T, é ativo (HDp*), recebendo o nome de MPF (*Mitosis-promoting factor*). A acumulação desses três estados inativos cria a possibilidade da autoamplificação do MPF, associada à gênese de alça autocatalítica de retroalimentação positiva, quando o fator MPF, levado à condição limiar pela retirada dos pontos de controle $\emptyset 1$ (crescimento da célula e replicação do DNA), juntamente com a cdk2-ciclina E passa a fosforilar a FY, ativando-a (FYp*), e a fosforilar a QY, inativando-a (QYp-). Assim, a característica central na regulação do ciclo celular é definida quando o MPF, ao atingir um certo limiar de atividade, cria a alça autocatalítica que promove sua autoamplificação, reforçada pela contribuição da cdk2 (figura 5.4.2.1B).

Outra forma de acumular o dímero HD na sua forma inativa é quando esse dímero, no seu estado de MPF, se liga a uma proteína inibidora (INIB) formando o trímero (TRIM). Essa proteína inibidora também é fosforilada pelo fator MPF, quando em atividade supraliminar, destinando-a à degradação e contribuindo ainda mais para a autoamplificação do MPF (figura 5.4.2.1C).

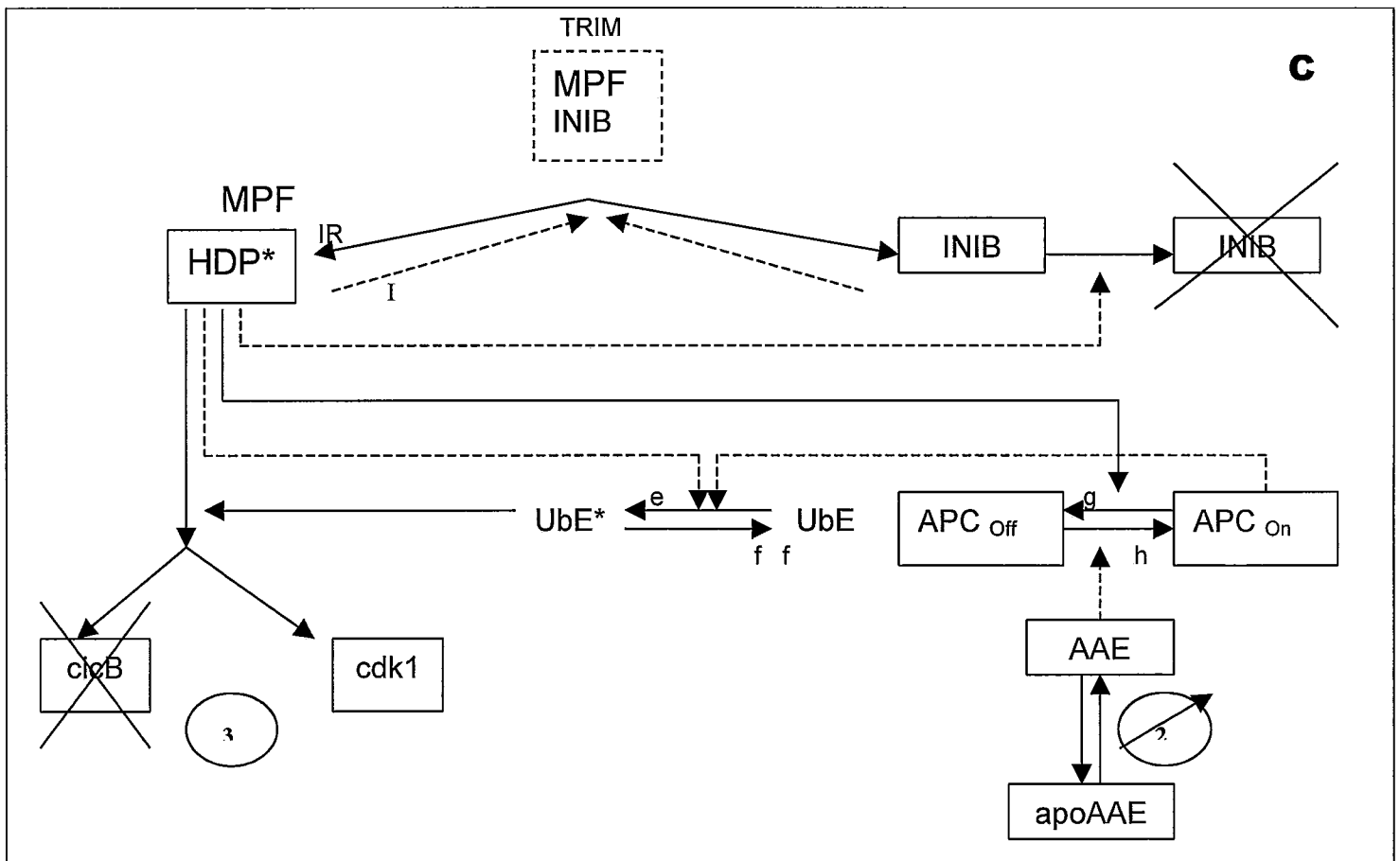
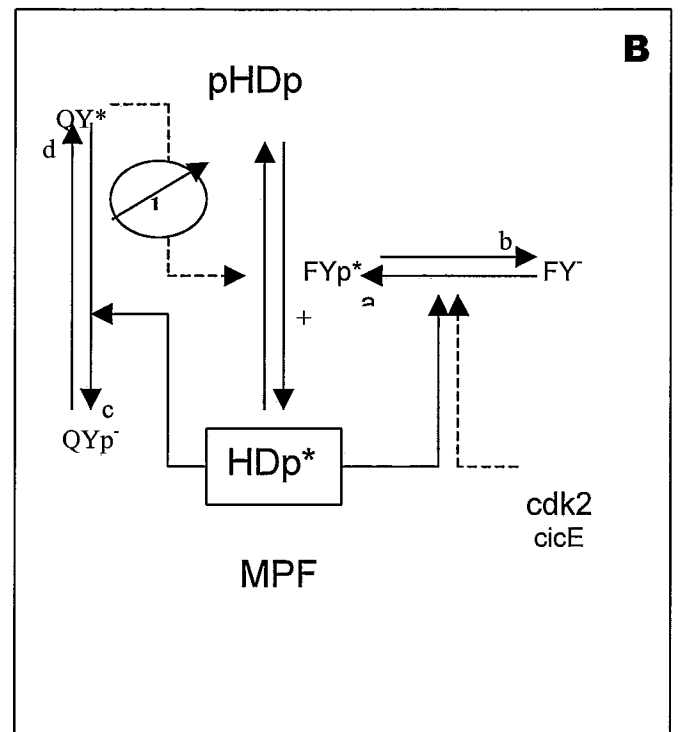
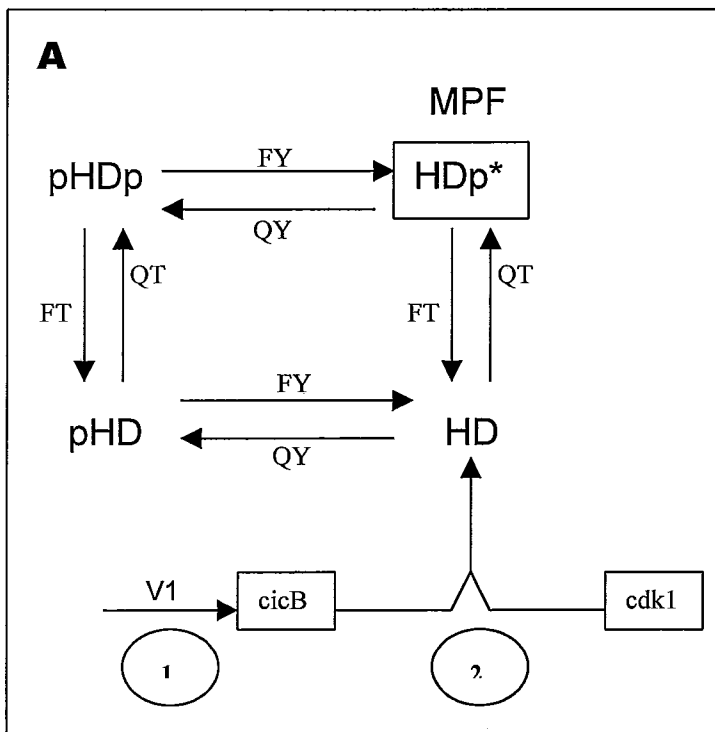


Figura 5.4.2. 1 – O Ciclo Celular

Por outro lado, a maneira drástica de desativar o fator MPF e reduzir todas as formas de HD é a degradação da ciclina, após sua marcação com a proteína ubiquitina (ubiquitinação). A ubiquitinação da ciclina, para sua ulterior degradação no complexo proteossômico, é feita pelo complexo APC (*anaphase promoting complex*) na sua forma ativa. Por sua vez, o complexo APC passa da forma OFF para a forma ON graças à ação de uma proteína intermediária AAE (*APC activating enzyme*), mantida fora de ação até completar o alinhamento dos cromossomos (ponto de controle \checkmark para a transição da metafase para a anafase). Há um antagonismo entre o fator MPF e o complexo APC: o fator MPF, competindo negativamente com a enzima AAE, reduz o complexo APC ao seu estado OFF, ao passo que o complexo APC contribui para a destruição da ciclina e a desagregação do fator MPF (figura 5.4.2.1C).

Desta forma, enquanto o fator MPF promove a transição G2-M e a manutenção da fase M, o complexo APC promove a transição M-G1 e o encaminhamento da célula para a interfase, com a possível instauração de uma nova fase S. Para que a transição M-G1 ocorra, o complexo APC tem que promover também a ubiquitinação, para ulterior destruição, das proteínas centroméricas que interligam as cromátides irmãs, ao mesmo tempo em que a rede microtubular está pronta para puxar os novos cromossomos para pólos opostos da nova célula.

Equações diferenciais do Ciclo Celular

As equações podem ser escritas, a partir de dados experimentais esquematizados na figura 5.4.2.1, pela utilização da cinética de ação das massas, em se tratando dos vários estados do dímero HD, e pela utilização da cinética de Michaelis-Menten, em se tratando das enzimas reguladoras. Geralmente, quando se refere a velocidade (v), são usadas as expressões taxa da reação (*rate*) ou taxa máxima (*maximum rate*), e atividade constante (*constant activity*). As outras constantes de reação são: a constante de taxa, k (*rate constant*), e a constante de Michaelis-Menten, K .

Com relação à sub-unidade ciclina B, pobre em formas de regulação, as informações que entram na equação são relativamente poucas: a sua síntese com velocidade constante (v_1) e a sua associação / dissociação no dímero HD regida pela constante de taxa k_2 (figura 5.4.2.1A), bem como a sua degradação regida pela constante de taxa k_{UBE} , referente à atividade da enzima ubiquitinadora (figura 5.4.2.1C, “e”):

$$\frac{d[CicB]}{dt} = v_1 - k_{UBE}[CicB] - k_2[CicB][cdk1] \quad (5.4.1)$$

Com relação à sub-unidade cdk1, como ela pode ser regulada de várias formas, devem ser levados em conta seus vários estados, com as respectivas constantes, mostrados na figura 5.4.2.1. Deve-se correlacionar a concentração total de cdk1 ($[cdk1]_T$) com os demais estados onde ela aparece preservada, segundo a conservação das massas,

$$[cdk1]_T = [cdk1] + [HD] + [MPF] + [pHD] + [pHD_p] + [TRIM]$$

para depois escrever as equações referentes a cada estado, com suas respectivas constantes, conforme os dados experimentais constantes da figura 5.4.2.1.

Assim, a variação da cdk1 na sua forma livre será dada pela equação abaixo

$$\frac{d[cdk1]}{dt} = k_{UBE}([HD] + [pHD] + pHD_p) + [MPF] + [TRIM] - k_2[CicB][cdk1] \quad (5.4.2)$$

Por sua vez, a variação do HD na sua forma ativa (HDp* ou MPF) dependerá do aumento na sua concentração, em função das constantes de taxa k_{QT} (fosforilação no resíduo T) e k_{FY} (desfosforilação no resíduo Y), bem como da redução na sua concentração, em função das constantes de taxa k_{FT} (desfosforilação no resíduo T), k_{QY} (fosforilação no resíduo Y) e k_{UBE} (desintegração do dímero com a destruição da ciclina):

$$\frac{d[MPF]}{dt} = k_{QT}[HD] + k_{FY}[pHD_p] - (k_{FT} + k_{QY} + k_{UBE})[MPF] \quad (5.4.3)$$

Em se tratando das enzimas reguladoras, as equações são escritas pela utilização da cinética de Michaelis-Menten, a partir dos dados experimentais em cuja obtenção são usados os esquemas das figuras 5.4.2.1.

A reação enzimática correspondente à enzima FY (fosfatase Y, conhecida como cdc25), responsável pela ativação do MPF (figura 5.4.2.1B, “a” e “b”), é regulada no sentido “a” (fosforilação e ativação da enzima FY) pela ação conjunta do MPF (k_{a1}) e do dímero cdk2-ciclinaE, aqui representado por cdk2 (k_{a2}), enquanto no sentido “b” (desfosforilação e inativação da enzima FY) é mantida pelo ponto de controle $\emptyset 1$ (crescimento da célula e replicação do DNA).

$$\frac{d[FY_p^*]}{dt} = \frac{k_{a1}[MPF][FY_-]}{K_{a1} + [FY_-]} + \frac{k_{a2}[cdk2][FY_-]}{K_{a2} + [FY_-]} - \frac{v_b[FY_p^*]}{K_b + [FY_p^*]} \quad (5.4.4)$$

A reação enzimática correspondente à enzima QY (quinase Y, podendo ser a Wee1 ou a Mik1), responsável pela inativação do MPF (figura 5.4.2.1B, “c” e “d”), é regulada no sentido “c” (fosforilação e inativação da enzima QY) pela ação do MPF (k_c), enquanto no sentido “d” (desfosforilação e ativação da enzima QY) é mantida pelo ponto de controle $\emptyset 1$ (crescimento da célula e replicação do DNA).

$$\frac{d[QY_p]}{dt} = \frac{k_c[MPF][QY_-]}{K_c + [QY_-]} - \frac{v_d[QY_p]}{K_d + [QY_p]} \quad (5.4.5)$$

A reação enzimática correspondente à enzima UBE (*ubiquitin-ligating enzyme*), ubiquitinadora da ciclina para sua ulterior destruição no complexo proteossômico (figura 5.4.2.1C, “e” e “f”), é regulada no sentido “e” (fosforilação e ativação da enzima UBE*) pela ação conjunta do MPF (k_{e1}) do APC (k_{e2}).

$$\frac{d[UBE^*]}{dt} = \frac{k_{e1}[MPF][UBE]}{K_{e1} + [UBE]} + \frac{k_{e2}[APC^*][UBE]}{K_{e2} + [UBE]} - \frac{v_f[UBE^*]}{K_f + [UBE^*]} \quad (5.4.6)$$

A reação enzimática correspondente à ativação/inativação do complexo APC (*anaphase promoting complex*), responsável pela transição M-G1 como consequência da desagregação do MPF (figura 5.4.2.1C, “g” e “h”) é regulada no sentido “g” (inativação do APC) pela ação do MPF (k_g), enquanto no sentido “h” (ativação do APC) é regulada pela enzima AAE (k_h) cuja ação, por sua vez, está regulada pelo ponto de controle $\emptyset 2$ (alinhamento dos cromossomos).

$$\frac{d[APC^*]}{dt} = \frac{k_h[AAE][APC^-]}{K_h + [APC^-]} - \frac{k_g[MPF][APC^-]}{K_g + [APC^-]} \quad (5.4.7)$$

As concentrações totais das enzimas FY, QY e UBE são conservadas e apenas o estado mais ativo deve ser considerado. A atividade catalítica de cada enzima é definida através da constante de taxa aparente de primeira ordem (k_{FY} , k_{QY} , e k_{UBE}) que representa a soma ponderada das atividades dos dois estados. Os superíndices (‘) e (‘‘) nas constantes de segunda ordem, nas equações 5.4.8 a 5.4.10 abaixo, denotam as constantes de taxa associadas com os estados de menor e de maior atividade, respectivamente. Em última análise, essas enzimas estão presentes em dois estados de atividade, com alguma atividade basal na forma menos ativa e com as constantes de taxa de pseudo primeira ordem (item 5.3.2), associadas às atividades globais (k_{FY} , k_{QY} , e k_{UBE}), representando a média das atividades dos dois estados. Assim, como as concentrações totais dessas enzimas são constantes, basta levar em conta um estado para se ter idéia da atividade total dessas enzimas.

$$k_{FY} = k'_{FY} [FY_-] + k''_{FY} [FY_p^*] \quad (5.4.8)$$

$$k_{QY} = k'_{QY} [QY_p] + k''_{QY} [QY_-^*] \quad (5.4.9)$$

$$k_{UBE} = k'_{UBE} [UBE] + k''_{UBE} [UBE^*] \quad (5.4.10)$$

É possível acompanhar a evolução do ciclo celular através do plano de fase, analisando-se o gráfico de [ciclina B]_{TOTAL} versus MPF (NOVAK *et al.*, 1998, 1999, OBEYESEKERE *et al.*, 1999).

Na fase S, para as células que não terminaram a replicação do DNA, estando ainda sob o regime do ponto de controle $\emptyset 1$ (fig. 5.4.2.1B), existe apenas um estado de equilíbrio dinâmico (S), com um nível alto em termos de ciclina e baixo em termos de atividade do MPF, predominando, portanto, as formas inativas do heterodímero. O ponto de controle atua no sentido de desfosforilação das enzimas QY e FY, abolindo a alça autocatalítica de retroalimentação positiva.

No início da fase G2, as células que terminaram a replicação do DNA passam a apresentar biestabilidade com dois estados dinâmicos estáveis (G2 e M), introduzidos por uma bifurcação em nó de sela, intermediário e instável (I, fig. 5.4.2.1C). A situação destas células é semelhante à dos oócitos durante o processo de maturação, modulado pela cascata MAPK, sugerindo que as oscilações no ciclo celular estão sob o controle remoto das vias de sinalização. Enquanto o tamanho crítico da célula e o limiar de atividade do MPF não forem atingidos, a célula permanecerá no estado G2.

Enquanto retida na fase G2, a célula continua acumulando em seu núcleo as formas inativas do MPF (aumento na curva da ciclina), de tal forma que, ao ser atingido o limiar de atividade do MPF, surge de modo explosivo a autoamplificação deste, levando o estado G2 a desaparecer e só o estado M a permanecer como atrator.

Com o alinhamento dos cromossomos na placa equatorial, é retirado o ponto de controle $\emptyset 2$ (fig. 5.4.2.1C), processando-se a transição M-G1, com a ativação do APC e com o conseqüente colapso na curva da ciclina. No entanto, não chega a haver colapso na curva do MPF, inclusive pela sua conservação em estado de pré-competência no trímero. Assim, com a fosforilação e destruição do inibidor (INIB), a célula recém-nascida entra rapidamente na fase S.

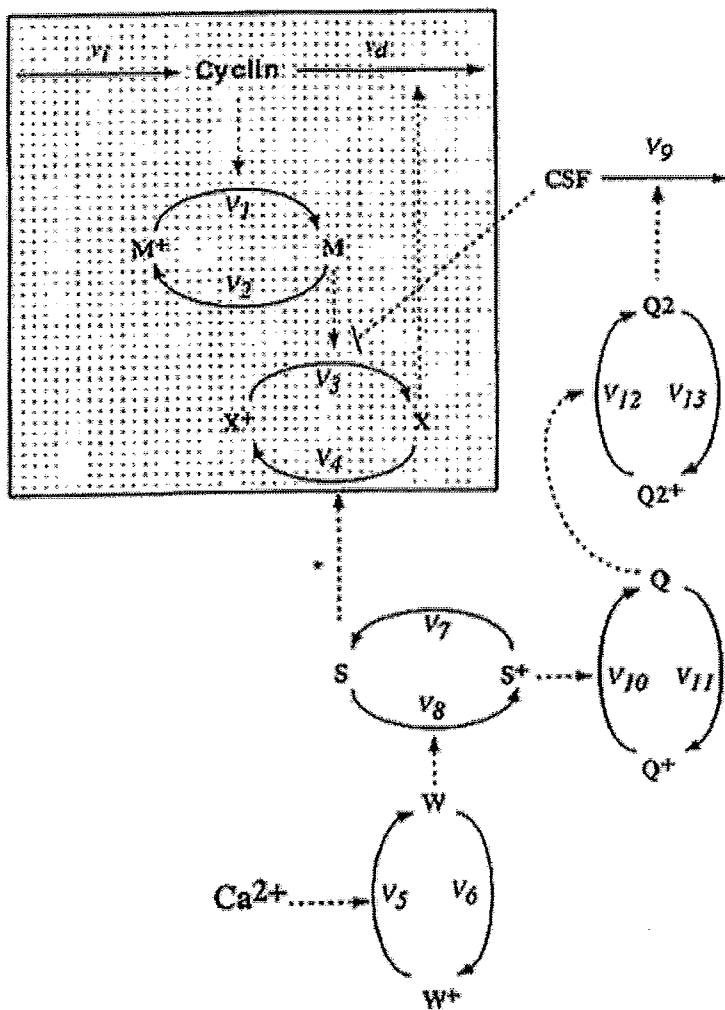


Figura 5.4.2. 2 – Transição da proliferação para a diferenciação, segundo o modelo de Dupont e Goldbeter (DUPONT, 1998). O fator citostático (CSF), ao manter o complexo APC inativado, inibe a degradação da ciclina. A partir dessa situação, a fertilização do óvulo desencadeia um processo que se caracteriza por ondas de cálcio que varrem o espaço-tempo zigótico, reduzindo a atividade dos fatores MPF e CSF, o que permite a retomada das cinéticas do ciclo celular que conduzirão a mitoses sucessivas, características do desenvolvimento embrionário.

Transição da proliferação para a diferenciação

Estudos em fertilização de mamíferos, realizados pela equipe de Goldbeter (DUPONT, 1998), mostram que os oócitos, amadurecidos e estacionados na metafase II da meiose, por ocasião da ovulação apresentam alto nível de ciclina B e de MPF ativo, conservados nesta situação graças à atuação do fator CSF (*cytostatic factor*) que inibe a degradação da ciclina, mantendo o complexo APC inativado (figura 5.4.2. 2). A partir dessa situação, a fertilização do óvulo desencadeia um processo que se caracteriza por ondas de cálcio que varrem o espaço-tempo zigótico, reduzindo a atividade dos fatores MPF e CSF, o que permite a retomada das cinéticas do ciclo celular que conduzirão a mitoses sucessivas que caracterizam o desenvolvimento embrionário (figura 5.4.2. 2).

Embora as ondas de cálcio sejam o fato marcante do início do desenvolvimento embrionário, é importante notar que o ciclo celular por si mesmo já apresenta um comportamento oscilatório, de acordo com o modelo de Novak e Tyson (NOVAK *et al.*, 1998, 1999).

O modelo de Kaern e Hunding (KAERN *et al.*, 1998, 1999) realça a contribuição do heterodímero cdk2-ciclina E para a instauração da alça de retroalimentação positiva e da autoamplificação do MPF (figura 5.4.2.1B). Esse novo heterodímero age como um modulador do limiar da atividade do MPF: na sua presença o limiar diminui e a transição G2/M ocorre ainda que a atividade do MPF seja baixa; na sua ausência o sistema estaciona na fase G2. Tomando-se $[cdk2]/[cdk1]_T$ como parâmetro de bifurcação *versus* $[MPF]/[cdk1]_T$, no plano de fase constata-se um ponto crítico na concentração de cdk2 (cdk2-ciclina E), acima do qual o sistema passa a oscilar numa órbita estável (ciclo limite), refletindo as mitoses sucessivas típicas do desenvolvimento embrionário.

O modelo de Romond e Goldbeter (ROMOND *et al.*, 1999), simplificando o modelo anterior (DUPONT, 1998), converte o ciclo celular em dois osciladores funcionando de modo acoplado e controlando as fases M e S (figura 5.4.2. 3A).

O primeiro oscilador, controlando o início da mitose na transição G2/M, envolve a ativação da cdk1 (M_1) pela ciclina B (C_1) e a degradação cdk1-induzida da ciclina B por uma ubiquitina ligase (X_1) que faz parte do sistema proteolítico mediado pela ubiquitina.

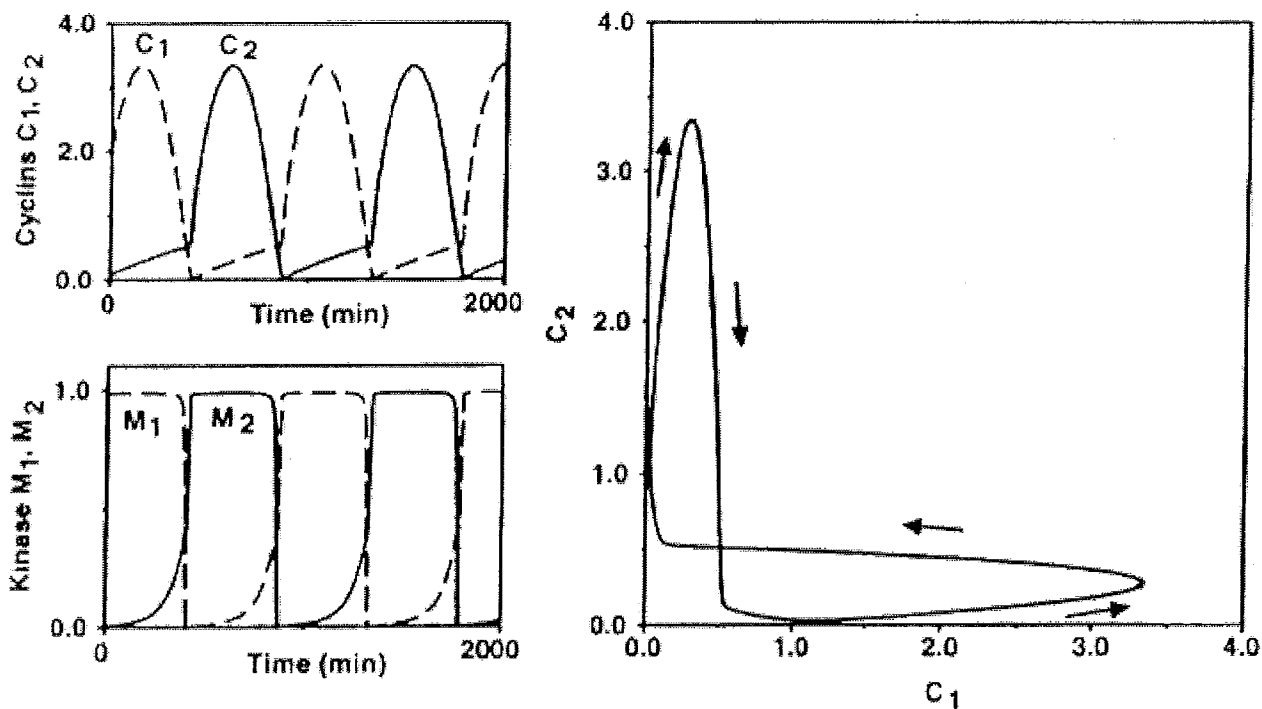


Figura 5.4.2. 3A – O Ciclo Celular funcionando como dois osciladores acoplados, segundo o modelo de Romond e Golbeter (ROMOND *et al.*, 1999). Como a natureza do acoplamento ainda não está caracterizada com precisão, assume-se uma inibição mútua entre os dois osciladores: cdk1 (M_1) inibe a síntese de ciclina E (C_2), enquanto cdk2 (M_2) inibe a síntese de ciclina B (C_1).

O segundo oscilador, controlando o início da replicação do DNA na transição G1/S, envolve a ativação da cdk2 (M_2) pela ciclina E (C_2) e a degradação cdk2-induzida da ciclina E por outra ubiquitina ligase (X_2). Para simplificação, não se considera a formação de heterodímero e sim a ativação de ciclina por cdk. Como a natureza do acoplamento não está caracterizada com precisão, considera-se uma inibição mútua entre os dois osciladores: cdk1 (M_1) inibe a síntese de ciclina E (C_2), enquanto cdk2 (M_2) inibe a síntese de ciclina B (C_1). A análise do sistema fica restrita ao caso simétrico em que os valores dos parâmetros correspondentes são idênticos para cada um dos dois osciladores.

Em particular, a velocidade máxima para a síntese de ciclina (V_i) e a constante de Michaelis-Menten para a inibição (K_{im}) têm os mesmos valores para ambos osciladores. Sendo K_{im} a medida da força de inibição mútua entre os osciladores, este parâmetro é o mais indicado para o estudo do acoplamento entre as duas cascatas enzimáticas controladoras da ativação periódica de cdk1 (fase M, mitose ou meiose) e de cdk2 (fase S, síntese e replicação de DNA). A sequência desses dois eventos no espaço-tempo embrionário é regulada por mecanismos de controles baseados na mútua inibição entre os estados SARs (*scaffold-attachment regions*) e MARs (*matrix-attachment regions*) da cromatina (ver seção 2.2).

As oscilações das ciclinas C_1 e C_2 e das quinases M_1 e M_2 refletem um ciclo limite assimétrico (item 3.3.3), sendo uma função da constante de inibição K_{im} (figura 5.4.2. 3B).

5.4.3 - O circuito lógico entre regiões cis e elementos trans:

integração entre as redes de sinalização e genômica

A região promotora (*promoter*) de um gene é constituída por um sítio de iniciação, localizado entre -50 e $+50$ bp (*base pairs*) do ponto de partida da transcrição do mRNA, onde se forma o complexo BTA (*basal transcription apparatus*), bem como por outros sítios de reconhecimento para ativadores e repressores (*enhancers* e *silencers*) posicionados acima (*upstream* ou na região negativa) do ponto de partida.

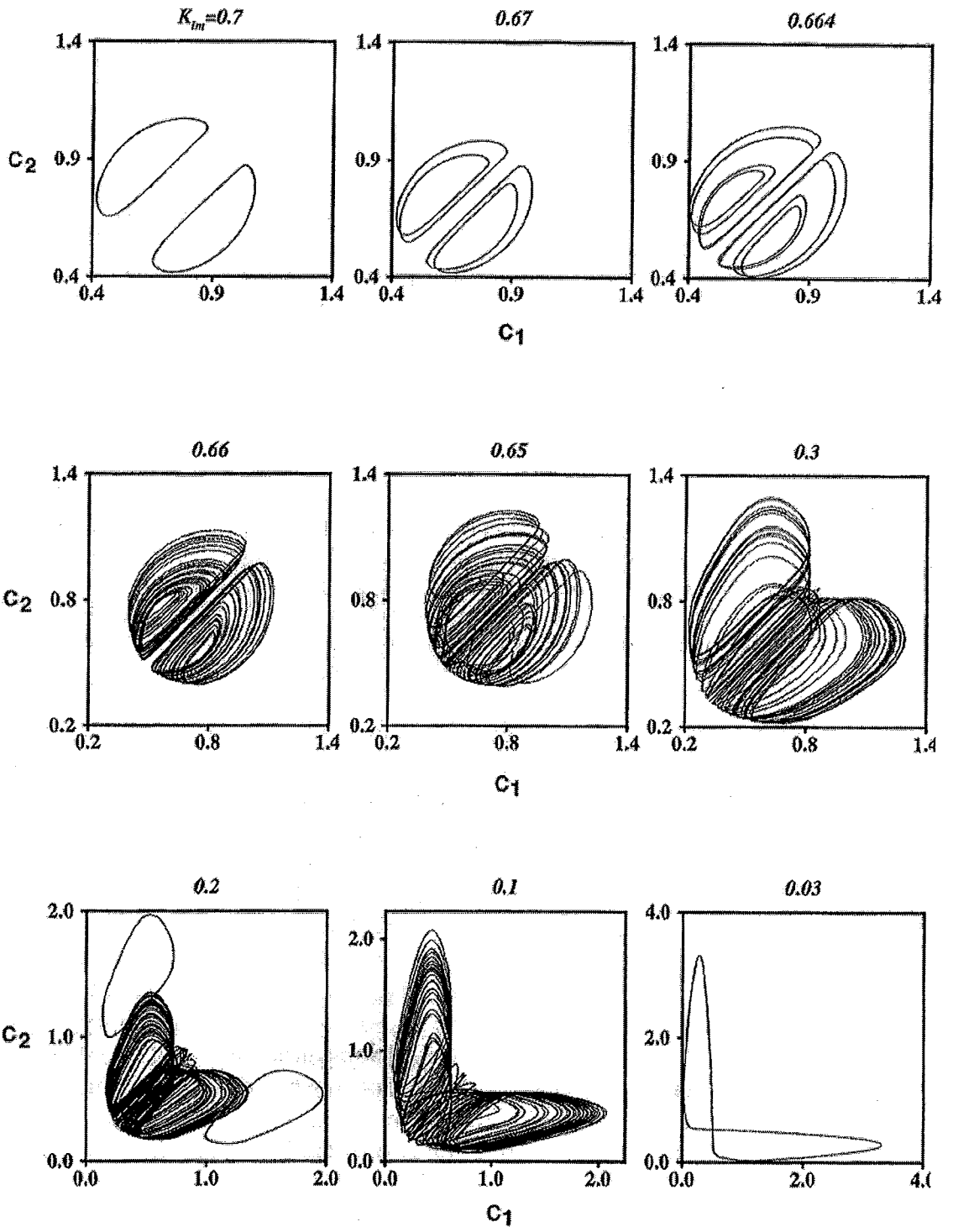


Figura 5.4.2. 3B - O Ciclo Celular funcionando como dois osciladores acoplados, segundo o modelo de Romond e Golbeter (ROMOND *et al.*, 1999). As oscilações das ciclinas C_1 e C_2 refletem um ciclo limite assimétrico, sendo uma função da constante de inibição K_{im} .

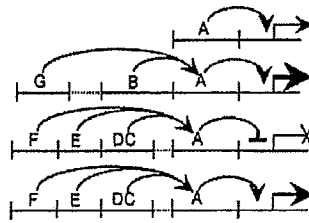
Na formação do complexo BTA, o elemento cis enucleador geralmente é uma sequência rica em T e A (TATA-box), onde se liga a proteína TBP (*TATA-binding protein*) que promove a integração das demais sub-unidades do complexo basal, inclusive a RNA-polimerase. A este complexo basal se integram coativadores, com interações entre proteínas, que, por sua vez, se interligam também com ativadores ou repressores cujos elementos cis se situam a centenas e até milhares de pares de bases acima, convergindo todos para o BTA, graças ao encurvamento dinâmico do DNA.

A especificidade e a precisão na ativação ou repressão de um gene não estão restritas à especificidade da região de iniciação (TATA-box), mas se estendem a várias regiões do LCR (*locus control regions*), onde, graças às proteínas curvadoras de DNA, os elementos cis específicos para cada gene vão sendo expostos de forma combinatória e em função dos *outputs* das vias de sinalização, gerados por estímulos do meio. A ação do LCR, antes de promover a ativação dos genes individualmente, estabelece a competência transcricional através de hiper-acetilação das histonas nos nucleossomos da região em questão. Aliás, existe ainda o estado de pré-competência da cromatina, quando a eucromatina se organiza em MARs durante a interfase do ciclo celular.

O estabelecimento do estado de pré-competência e de competência se faz às custas de reorganizações da cromatina, em grande e pequena escala, caracterizando um fenômeno de tal magnitude que extrapola os estreitos limites da teoria genética reducionista, abrindo espaço para o novo paradigma das redes epigenéticas.

O *promoter* do gene Endo 16 de ouriço do mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) foi estudado pela equipe de E.H. Davidson (Caltech) que constatou seu funcionamento preciso e versátil como um computador analógico (YUH, 1998). Seus mais de trinta elementos reguladores, distribuindo-se por mais de 2 Kbp (*Kilobase-pairs*), têm suas respectivas proteínas organizadas em distintos módulos funcionais. Logicamente, cada módulo contém vários elementos reguladores com suas respectivas proteínas ligadas. A integração de vários módulos se faz através do módulo A que funciona como unidade de processamento e de integração, tendo várias funções com seus elementos reguladores e as respectivas proteínas ligadas. Em suma, o módulo A integra os estados dos demais módulos ao complexo BTA (aparelho basal de transcrição), com sinergismo ativador relativo aos módulos B e G, bem como com ação repressiva relativa aos módulos DC, E e F (figura 5.4.3. 1).

A)



B)

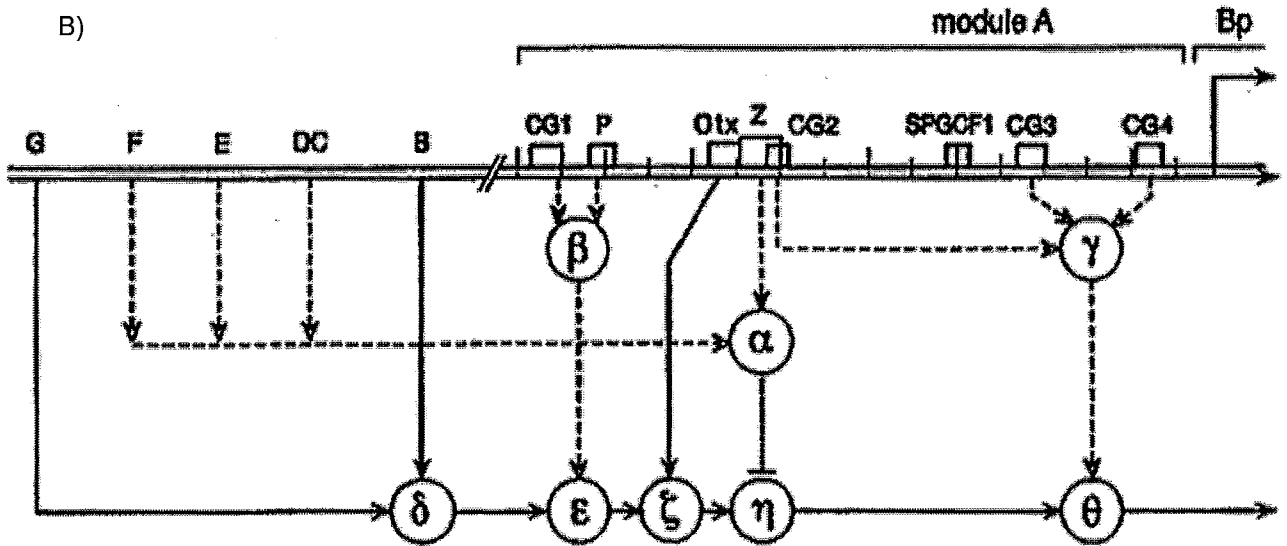


Figura 5.4.3. 1 – Circuito lógico entre regiões *cis* no DNA e elementos *trans* nos complexos de transcrição, organizados em função do *output* da rede de sinalização. O módulo A integra os estados dos demais módulos, gerando o *output* final da rede genômica através do complexo Bp (aparelho basal de transcrição). As letras gregas representam os nós do circuito, que são os pontos do sistema onde ocorre uma operação quantitativa específica entre os estados do complexo de cada módulo. Existe sinergismo ativador relativo aos módulos B e G, bem como ação repressiva relativa aos módulos DC, E e F (adaptado de YUH, 1998).

É importante observar que as conexões entre os nós do circuito não são feitas por ligações diretas entre os elementos cis (regiões no DNA), mas sim por contatos entre os elementos trans (fatores de transcrição) que formam o complexo de transcrição (ou de replicação), moldado para cada caso em função de combinações definidas por *outputs* das vias de sinalização, gerando o *output* integrado final para a ativação de um determinado gene.

5.4.4 – Termodinâmica e cinética dos complexos nucleoprotéicos

O complexo de ativação ou de iniciação da transcrição de um gene, resultante do *output* do circuito lógico da região promotora, só se tornará efetivo quando ocorrer a mudança conformacional adequada na holoenzima RNA-polimerase, permitindo sua integração à hélice de DNA que funcionará como molde, bem como o início da transcrição até que o transcrito nascente torne-se suficientemente longo para estabilizar o complexo, contra sua dissociação e dissolução.

A equipe de M.T. Record, Jr (Universidade de Wisconsin) vem caracterizando, através de técnica MHF (*mult hit footprinting*), os parâmetros termodinâmicos e cinéticos dos complexos de iniciação da transcrição que envolvem o promotor λ -Pr e a enzima RNA-polimerase E σ -70, em *Escherichia coli* (CRAIG, 1998, TSODIKOV, 1998). Como existem complexos intermediários instáveis, muitas vezes é necessário, para identificação de transições estruturais na sucessão de complexos, obter o *footprinting* dos complexos a baixa temperatura, quando se tornam estáveis no equilíbrio.

Como foi visto acima, em analogia com os demais complexos nucleoprotéicos envolvendo DNA, a característica central do complexo de transcrição, em qualquer de suas fases, é a bolha entre forquilhas, aberta transitoriamente e englobando cerca de 20 bp da molécula de DNA (KODADECK, 1998), cujo deslocamento se faz em conjunto com a enzima RNA-polimerase, com dupla hélice se abrindo *downstream* e se fechando *upstream*.

A partir do momento em que o complexo de iniciação se estabiliza, a sucessão de complexos no processo de transcrição passa a definir, para cada nova posição ou novo nucleotídeo na hélice molde de DNA, o caminho a seguir entre o alongamento do transcrito (molécula de mRNA nascente), a correção de erro (*editing*, no caso de inserções defeituosas) ou o término da transcrição. A esses caminhos, definidos em função de cada nova posição no molde, corresponderão reações alternativas cujas taxas

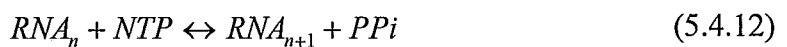
variação em competição cinética que pode ser quantificada em termos da diferença de energia livre da barreira de ativação (ΔG^*) entre as reações. Diferenças na taxa da reação (k) ou no tamanho da barreira de ativação (ΔG^*) podem prever a taxa de mudança na estabilidade entre os complexos na sucessão dos complexos de transcrição (von HIPPEL, 1998).

O **complexo de alongamento na transcrição** é relativamente estável tanto estaticamente, permanecendo paralisado na ausência de substrato NTP (qualquer nucleotídeo tri-fosfatado), quanto dinamicamente, não podendo se dissociar enquanto se movimenta de uma posição para outra do molde. No entanto, os componentes do complexo, sejam ácidos nucleicos ou proteínas, se rearranjam rapidamente quando o complexo se movimenta, voltando ao equilíbrio durante a parada em cada nova posição (nucleotídeo) da hélice molde. Nessa condição de equilíbrio, o complexo de alongamento pode ser representado pela equação

$$\Delta G_{complex} = \Delta G_{DNA \leftrightarrow DNA} + \Delta G_{NA-polim} + \Delta G_{RNA-DNA} \quad (5.4.11)$$

$\Delta G_{complex}$ é a diferença de energia livre necessária para estabilizar o complexo de alongamento contra sua dissolução. $\Delta G_{DNA-DNA}$ é a diferença de energia livre necessária para a abertura dos pares de bases da molécula de DNA na bolha de transcrição. Esta energia é desfavorável para a formação do complexo, sendo compensada pela ação das helicases, componentes do complexo. $\Delta G_{NA-polim}$ representa a diferença de energia livre favorável para a interação da holoenzima RNA-polimerase com as estruturas de ácidos nucleicos (NA) do complexo. $\Delta G_{RNA-DNA}$ é a diferença de energia livre favorável para o emparelhamento de bases da hélice molde de DNA com bases da molécula de RNA nascente.

Por outro lado, a reação química que comanda o processo de alongamento pode ser escrita como



de onde se deduz que, com a incorporação do próximo NTP (ribonucleotídeo A, U, C ou G trifosfatado), a cadeia nascente de RNA se alonga de um resíduo, liberando uma molécula de PPi (pirofosfato inorgânico).

Tirando a especificidade no reconhecimento do substrato NTP (ribo ou desoxiribo nucleotídeo trifosfatado), existe grande semelhança no modo de agir entre as holoenzimas RNA-polimerases (I, II e III) no processo de alongamento e a holoenzima DNA-polimerase no processo de replicação. Em todas existem os sub-sítios para ligação do substrato NTP e do produto NMP (qualquer nucleotídeo monofosfatado), já incorporado à extremidade 3' da hélice nascente. Esta incorporação é operada por uma sub-unidade com atividade ATPásica (hidrólise de ATP) típica de enzima ligase, construtora da ligação fosfodiéster pentose-fosfato, em paralelo com as formações das pontes de H entre as bases complementares do nucleotídeo molde e do nucleotídeo nascente.

A energia proveniente da hidrólise de NTP, além da formação da ligação fosfodiéster, é utilizada também para mudar a conformação da holoenzima, deixando-a num modo deslizante por sobre a dupla hélice nascente (DNA-DNA na replicação ou a forma híbrida DNA-RNA no alongamento da transcrição). Este estado deslizante permanece até o religamento duplo (substrato / produto) do próximo NTP. Na condição deslizante, o complexo holoenzimático pode avançar para uma nova posição de polimerização (alongamento), pode parar e retroceder (correção ou *editing*), bem como se dissolver (terminação), dependendo da competição cinética entre as diferenças de energia livre das barreiras de ativação dos respectivos complexos (figura 5.4.4. 1)

A competição entre os complexos de alongamento e de terminação pode ser vista como a diferença $\Delta\Delta G^*$ entre as barreiras de ativação nas posições de alongamento ($\Delta G^*_{term} \gg \Delta G^*_{along}$) e nas posições de terminação ($\Delta G^*_{term} \gtrsim \Delta G^*_{along}$), sendo a eficiência da terminação (ET) expressa por $[k_{term}/(k_{along} + k_{term})]$, em função das taxas de reação. Usando a equação 3.3.10, estas taxas podem ser escritas:

$$k_{along} = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^*_{along}/RT}$$

$$k_{term} = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^*_{term}/RT}$$

e, por sua vez, a eficiência de terminação será dada por

$$ET = \frac{1}{1 + e^{\Delta\Delta G^*/RT}} \quad (5.4.13)$$

onde

$$\Delta\Delta G^* = \Delta G_{term}^* - \Delta G_{along}^*$$

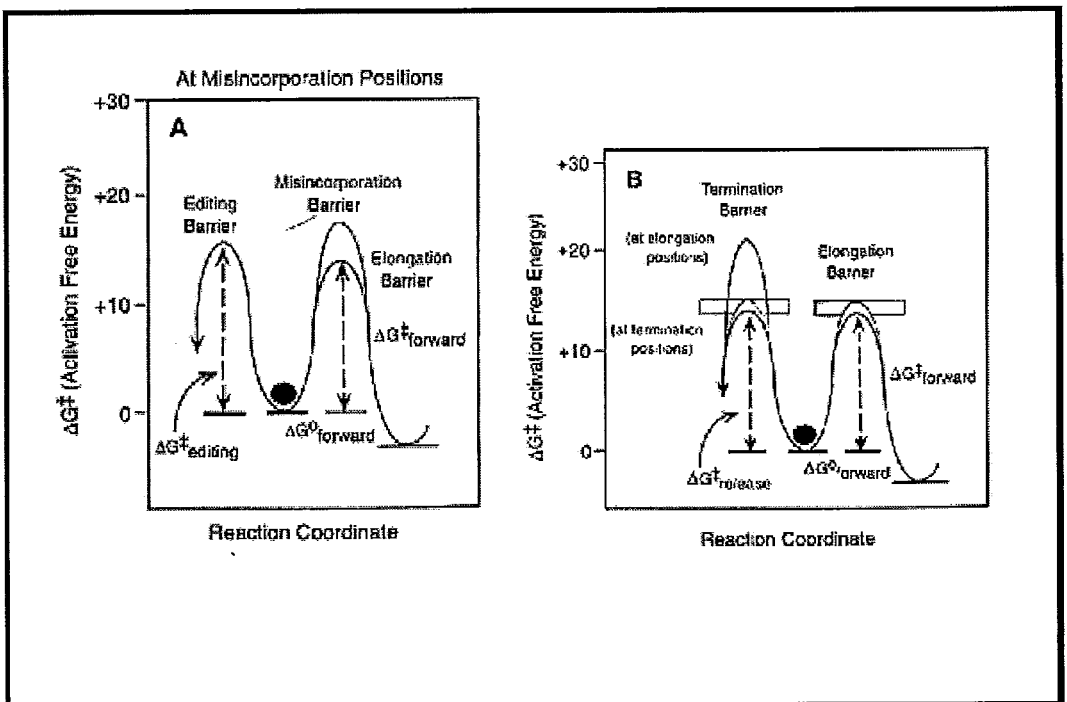


Figura 5.4.4. 1 – Competição cinética entre as diferenças de energia livre das barreiras de ativação dos respectivos complexos. O complexo holoenzimático pode avançar para uma nova posição de polimerização (alongamento), pode parar e retroceder (correção ou *editing*), bem como se dissolver (terminação). (Adaptado de von HIPPEL, 1998).

A competição entre os complexos de alongamento e de correção pode ser vista como a diferença entre as barreiras de ativação ($\Delta\Delta G^*$) nas posições de alongamento normal ($\Delta G^*_{\text{corr}} > \Delta G^*_{\text{along}}$) e nas posições de incorporação defeituosa ($\Delta G^*_{\text{corr}} < \Delta G^*_{\text{along}}$). O complexo holoenzimático, estando configurado em um modo deslizante, tem possibilidade de se movimentar para trás durante o processo de correção.

O deslizamento para frente realizado pelas holoenzimas polimerases, ao longo da hélice molde de DNA, se assemelha a outros movimentos dependentes de hidrólise de ATP, como o deslizamento de helicases sobre ácidos nucléicos ou de proteínas motoras sobre filamentos de microtúbulos e actina. Já o deslocamento para trás realizado pela holoenzima polimerase, reprogramada para o processo de correção, não requer hidrólise de ATP, sendo portanto um deslizamento passivo sobre superfície isopotencial, mais de natureza eletrostática do que dependente de sequência específica. O trecho híbrido DNA-RNA é fundamental para gerar a superfície de difusão isopotencial unidimensional.

5.4.5 – Complexos riboprotéicos na tradução

Ao término da transcrição, as moléculas de RNA na sua forma original (pré-RNA) precisam passar por um processo de maturação, durante o qual cada tipo de RNA (mensageiro, transportador e ribossômico) sofre rígidos testes de qualidade (*proofreadings*) e correções por editoração (*editing*), tanto antes de deixar o núcleo quanto na hora de atuar no citoplasma (HOPPER, 1998, LUND, 1998). A primeira etapa, comum a todos os tipos de RNA, é a excisão de íntrons (*splicing*). A partir daí cada tipo de RNA segue por caminhos diferentes. A pressão sobre o RNA ribossômico (rRNA) é relativamente menor, já que sua responsabilidade quanto a fidelidade na transmissão da informação genética fica diluída no complexo ribossômico. A situação é diferente para os outros dois tipos de RNA.

O RNA mensageiro (mRNA), intermediário na transferência da informação genética de DNA para proteína, recebe nas extremidades sequências não traduzíveis, as UTRs (*untranslate regions*): na extremidade 3', uma sequência em torno de 200

adeninas (3' poli-A), e, na extremidade 5', uma sequência de metil-guanosina como capuz (5' mG-cap). Sobre esses elementos cis, atuam proteínas como elementos trans. Na extremidade 5', competem as proteínas decapitadoras e as proteínas iniciadoras da tradução. Com a vitória das proteínas decapitadoras, a região 5'mG-cap é destruída, abrindo caminho para a ação das nucleases que degradam o mRNA em milésimos de segundo. Mas, a vitória das decapitadoras só ocorre com a permissão de proteínas PABPs (*poly-A binding proteins*) cujo complexo, inicialmente formado na região 3'poli-A, graças a curvaturas no mRNA (*RNA bending*) passa a interagir com o complexo de iniciação na região 5'mG-cap.

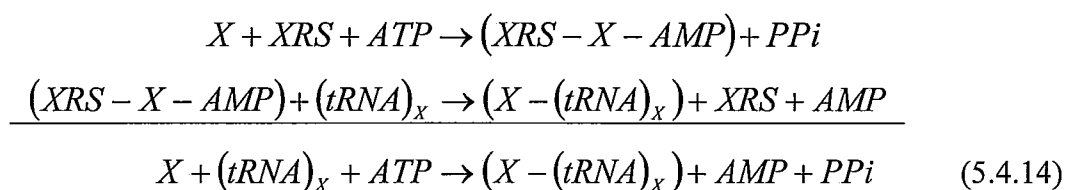
Na organização do complexo de iniciação da tradução, o fator de iniciação eIF4G (anteriormente conhecido como p220 ou eIF-4gama), como um adaptador ribossômico polivalente, coordena primeiramente a ligação do mRNA, contactado na extremidade 5'do *codon* de iniciação, com a sub-unidade ribossômica menor; depois, com o *RNA-bending*, o fator eIF4G funciona como coativador, integrando ao complexo as PABPs previamente ligadas à extremidade 3'poli-A; finalmente, define-se o complexo ribossômico na fase de iniciação, quando, somando-se à ação cooperativa de fatores com atividade GEF (*GDP/GTP exchange factor*) e com atividade GAP (*GTPase activating protein*), promove a integração do complexo ribossômico maior juntamente com o tRNA carregado com o resíduo N-formil metionina, o iniciador universal da cadeia peptídica. Até encontrar o *codon* de iniciação (AUG) no mRNA, o complexo parece deslizar ao longo da dupla hélice formada pela região inicial 5'-3' do mRNA e pela região central 3'-5' do rRNA 16S, à semelhança do movimento para trás do complexo de transcrição. Como na transcrição, também na tradução o complexo de iniciação (da cadeia peptídica) compete com o complexo de degradação (do mRNA) em termos da diferença de energia livre entre as respectivas barreiras de ativação, tendo destaque os fatores de iniciação do alongamento (eIF) da cadeia peptídica (HENTZE, 1997)

O RNA transportador (tRNA), como espécie genérica, é aquela sobre a qual incide a maior pressão no controle de qualidade (*proofreading*) e na correção por editoração (*editing*) no sentido de manter uma alta fidelidade na transferência de informação, apesar de barreiras às vezes de difícil superação nas etapas de reconhecimento que levam à especificação correta de cada aminoácido na cadeia peptídica, rigidamente de acordo com o *codon* no mRNA e o *anticodon* no tRNA. A começar pelo fato do código genético ser degenerado (existência de 64 tripletos de bases

para 20 aminoácidos), passando pela possibilidade da terceira base na posição 5' do *anticodon* estar sujeita a regras de hesitação (*wobble rules*, CRICK, 1966), por problemas de alinhamento que levam-na a emparelhamento não convencional à sua base complementar na posição 3' do *codon*, e terminando no problema de reconhecimento específico mais difícil que é o fato da enzima isoleucil-tRNA sintetase excluir a inserção do aminoácido valina, cujo tamanho difere do aminoácido isoleucina por apenas um grupo metil, com uma taxa de erro de apenas 1 / 40.000.

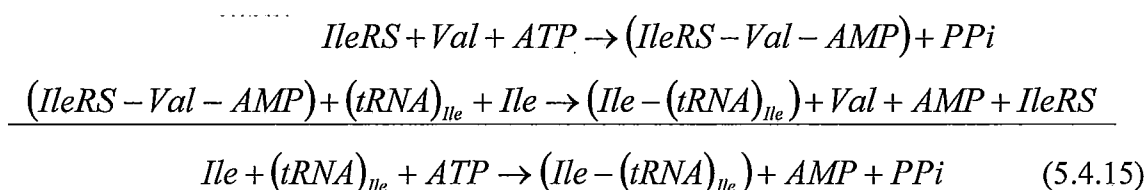
Os testes de qualidade e os mecanismos de editoração ocorrem em diferentes etapas do código genético. Começando de trás para frente, a enzima isoleucil – tRNA sintetase ativa não apenas seu substrato específico, L-isoleucina, mas também o seu semelhante, L-valina, num primeiro estágio. Depois, numa segunda etapa de correção, a enzima hidrolisa o produto relativo ao aminoácido valina, substituindo-o pelo produto correto com a ligação entre o aminoácido isoleucina e seu tRNA específico. Como a força que predomina num reconhecimento específico é a repulsão estérica, o mecanismo de editoração funciona como um peneiramento duplo: os substratos maiores são excluídos em função do tamanho maior em relação ao sítio catalítico, enquanto os substratos iguais ou menores que aderem ao sítio são reconhecidos em termos de características químicas (FERSHT, 1998, NUREKI, 1998). Por outro lado, todos os tRNAs passam pelo teste de qualidade durante o processo de maturação, só deixando o núcleo celular após o *splicing*, o *folding* correto, o encaixe do 3'CCA (sítio de ligação ao aminoácido específico) pela enzima nucleotidil transferase, bem como a própria aminoacilação pela enzima aminoacil-tRNA sintetase.

A primeira etapa da tradução é o carregamento de um $(tRNA)_X$ com o aminoácido específico (X), após seu reconhecimento e ativação catalisados por uma aminoacil-tRNA sintetase específica (XRS), sendo $X-(tRNA)_X$ o produto do carregamento, conforme a equação:

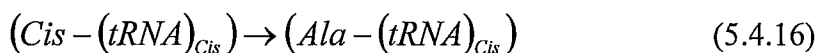


As enzimas aminoacil-tRNA sintetases são ATPases que, após hidrólise da molécula de ATP, transferem a energia livre correspondente ao complexo instável XRS-X-AMP (aminoacil adenilato) quando, nesse estado de transição e em presença de tRNA, desfazem a ligação de AMP com o aminoácido X e estabelecem a ligação de X com o seu respectivo (tRNA)_X, permanecendo a energia livre armazenada no produto X-(tRNA)_X.

No caso da isoleucil-tRNA sintetase (IleRS), pode chegar a formar-se o complexo transitório para a ativação do aminoácido valina mas, quando em presença da isoleucina e de seu respectivo (tRNA)_{Ile}, a enzima hidrolisa a ligação do aminoácido valina tanto com a molécula de AMP quanto com o (tRNA)_{Ile}, substituindo esta última ligação pela ligação do aminoácido isoleucina com o (tRNA)_{Ile}. Assim, pelo mecanismo de correção, a presença de (tRNA)_{Ile} leva à hidrólise do adenilato de valina e, em vez do produto errado Val-(tRNA)_{Ile}, é produzido o produto correto Ile-(tRNA)_{Ile}.

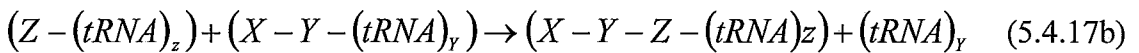
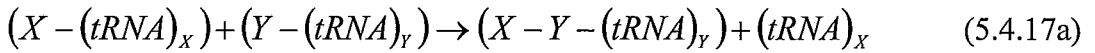


Se não funcionasse o mecanismo de exclusão do aminoácido valina no carregamento do (tRNA)_{Ile}, o aminoácido valina seria inserido erroneamente na cadeia polipeptídica porque no reconhecimento entre *codon* e *anticodon* só conta a complementaridade entre as bases. De fato, o aminoácido cisteína, quando ligado ao seu tRNA específico (tRNA)_{Cis} e sob a ação do hidreto de níquel, se transforma no aminoácido alanina que, neste caso é inserido de forma errônea na cadeia peptídica (GRIFFITHS, 1996).



Nesta primeira etapa, outras enzimas aminoacil-tRNA sintetases estarão carregando outros tRNAs com seus aminoácidos específicos, por exemplo, a enzima YRS produzindo Y-(tRNA)_Y e permitindo a segunda etapa que é a ligação peptídica de alongamento, onde o novo aminoacil-tRNA que entra no sítio A(3') do ribossomo

interage com peptidil-tRNA que já se encontra no sítio P(5'), com o acréscimo de mais um aminoácido na cadeia peptídica. Enquanto a ativação de cada aminoácido e seu carregamento no tRNA específico é feito por uma enzima aminoacil-tRNA sintetase específica (equação 5-4-14), o acréscimo de um novo aminoácido à cadeia peptídica (equação 5-4-17) é feito sempre pela mesma enzima peptidil transferase quando, somando-se à ação cooperativa de fatores com atividade GEF (*GDP/GTP exchange factor*) e com atividade GAP (*GTPase activating protein*), transloca a cadeia peptidil do sítio P para o sítio A, onde um novo aminoácido ativado é inserido na cadeia. Então, o complexo ribossômico, novamente somando-se à ação cooperativa de fatores com atividade GEF e GAP, se desloca na direção 5'=> 3', fazendo com que o sítio A(3') passe a ocupar a posição do sítio P(5') no ribossomo.



Na tradução, como na replicação e na transcrição, existe também a sucessão de complexos cuja definição, caracterizada pela interação combinatória de fatores específicos, é renovada em cada nova posição ao longo da hélice que funciona como molde. No processo de tradução, cada posição ao longo do molde de mRNA é definida pelo tripleto de bases do *codon*, diferentemente de única base na hélice molde de DNA nos processos de replicação e transcrição.

5.4.6 – Origem e evolução do código genético

Neste capítulo, a rede genômica foi apresentada como a unidade central de processamento em todos os tipos de células do atual mundo do DNA, onde todas as funções atingiram um grau elevado de otimização, graças à atuação de complexos enzimáticos nucleoprotéicos. No entanto, no primitivo mundo do RNA, onde necessariamente o código genético teve origem (seção 1.1 e item 3.1.3), não existiam ainda nem DNA e nem proteína. Naquelas condições, devem ter prevalecido apenas injunções de propriedades físicoquímicas das moléculas então implicadas no processo, tais como os aminoácidos mais simples e pequenas cadeias de RNA, diferentemente do cenário que vem inspirando as hipóteses tradicionais, baseadas em comparações entre sequências de tRNAs e de aminoacil-tRNA sintetases atuais, permitindo construções de

árvores filogenéticas e de tabelas conectando os diferentes grupos de famílias codônicas.

Considerando que as etapas de funcionamento devam ser as mesmas, tanto no atual quanto no primitivo código, é lógico inferir que nos sítios ativos das enzimas atuais, principalmente em se tratando das vinte aminoacil-tRNA sintetases (uma enzima específica para cada aminoácido) e da única peptidil transferase (catalisa a ligação peptídica inespecificamente, ao transferir a cadeia peptídica do sítio P para o sítio A, no ribossomo), podem ser encontradas evidências das primitivas injunções físicoquímicas (LEHMANN, 2000):

a) a correlação entre a hidrofobicidade dos aminoácidos e a hidrofobicidade dos dupletos anticodônicos (as duas primeiras bases na direção 3'-5' da alça de tRNA);

b) a correlação entre o volume de van der Waals do aminoácido, caracterizado pela sua cadeia lateral, e a força da interação *codon-anticodon*, definida em termos de energia livre;

c) a possibilidade da representação de simetria em tabelas do código genético, em função da ordem U, C, G, A (da menor para a maior hidrofobicidade) que manifesta simetria das degenerações duplas e quádruplas, reflexos das frequências de purinas (R) e pirimidinas (Y) para as três posições codônicas que, por sua vez, refletem o padrão RNN de sequências codificantes, com excesso de purina na primeira posição, originando a simetria R-Y de degeneração.

A correlação na hidrofobicidade representa o primeiro nível de seleção na especificidade entre um aminoácido e seu respectivo tRNA: o contato não covalente se inicia na região anticodônica do tRNA (alça sem emparelhamento de bases), de acordo com a equiparação entre a hidrofobicidade das bases anticodônicas (com predomínio da segunda posição) e a hidrofobicidade do aminoácido (com predomínio da cadeia lateral). No sistema atual, tanto esta primeira interação não covalente quanto a ligação covalente posterior, entre o aminoácido e a extremidade 3' do tRNA, são catalisadas por uma enzima aminoacil-tRNA sintetase, conforme visto no item anterior. No sistema primitivo, porém, em função da estabilidade da interação não covalente, a molécula de RNA, anteriormente estabilizada (*folding*) em forma de grampo de cabelo (*hairpin*), se abre (*unfolding*), permitindo que a extremidade livre 3' se posicione em relação ao aminoácido, de tal forma a estabelecer a ligação covalente entre as duas moléculas. Desse modo, a ligação covalente se forma graças primeiramente à correlação hidrofóbica e, em seguida, à ação catalítica da molécula de RNA, através da energia

livre liberada ($-\Delta G$) por ocasião da abertura (*unfolding*) da região emparelhada do grampo.

A correlação entre o volume de van der Waals do aminoácido e a força da interação *codon-anticodon* perdeu seu significado imediato, com a presença do complexo ribossômico que garante o tempo de permanência de diferentes aminoácidos nos respectivos *codons* até se completar a ação inespecífica da enzima peptidil transferase. No sistema primitivo, no entanto, as imposições fisicoquímicas exigiam maior força das interações *codon-anticodon* (ΔG^0), no sentido de permitir maior tempo de permanência dos aminoácidos nos seus respectivos *codons*, já que na população primitiva de aminoácidos predominavam as cadeias laterais mais simples. A correlação entre esse intervalo de tempo e o limiar de energia livre, acima do qual todas as famílias de *codons* possuem as bases A ou U, é dada por [$\Delta t = A \exp(-\Delta G^0/RT)$].

A inexistência de aminoácidos mais complexos sugere que, no início, apenas pequenos fragmentos de mRNA poderiam ser traduzidos, acumulando grande quantidade de *codons* sem correspondência, análogos aos três remascentes *stop codons* do sistema atual. Em suma, a evolução do código genético consistiu no preenchimento de significado para os numerosos *stop codons* primitivos, graças à produção dos aminoácidos mais complexos já sob regime enzimático protéico, e na fixação do *codon* para metionina como o *codon* de partida para a tradução do gene, agora como ORF (*open-reading frame*).

CONCLUSÃO

Um aspecto original da nossa proposta é a visão unificada da Biologia (item 2.3.3), fruto da identificação e da fundamentação das redes biomoleculares, cujo funcionamento integrado serviu de *conditio sine qua non* para a origem da célula ancestral do mundo do DNA e para sua evolução a nível ontogenético e filogenético. Isto significa que, para a ocorrência de tal evolução, a pressão da seleção natural não se fez de modo aleatório e lento sobre genes isolados, distribuídos num incomensurável espaço sequencial genômico (conforme a visão do paradigma genético reducionista), mas se fez de modo dirigido sobre a otimização da integração das redes biomoleculares, definida por reestruturações e interações globais a nível genômico e proteômico (conforme a visão do paradigma das redes epigenéticas).

Segundo a metodologia proposta, na procura de fundamentação para as redes bioinformacionais, houve integração de conceitos, usualmente apresentados de forma fragmentária nos livros textos, bem como de teorias e modelos, criados pelos principais grupos de pesquisa que trabalham com segmentos isolados de redes biomoleculares.

No primeiro caso, o conceito de energia livre de Gibbs é fundamental no estudo da evolução dos sistemas biológicos (seções 3.2 e 3.3), assim como a complementação entre os estudos de termodinâmica irreversível e de cinética de reações químicas é o suporte necessário ao entendimento de integração das redes a nível fisicoquímico, bioquímico e bioinformacional (seções 3.3, 4.2 e 4.3).

No segundo caso, encontramos uma convergência impressionante de teorias, refletidas em modelos e tecnologias que apresentam o estado da arte da ciência biológica atual em diversas áreas específicas.

Convergências de modelos e de tecnologias

O melhor conhecimento das reações enzimáticas (item 4.2.2) caminha em convergência com os últimos avanços no conhecimento da dinâmica das reações químicas. As abordagens modernas evoluíram dos estudos fotoquímicos em fase gasosa e das teorias do estado de transição para observações diretas de eventos que moldam o mecanismo e de fatores eletrônicos e estruturais que determinam o produto da reação. A dinâmica de reações simples em fase gasosa estão sendo entendidas nos seus mínimos

detalhes, enquanto a atenção já se volta para reações mais complexas conduzidas em superfícies, em soluções ou em proteínas. Neste campo, como é sempre esperado, o progresso está na dependência de estreita colaboração entre trabalhos experimentais e teóricos. Para reações simples em fase gasosa, as previsões teóricas já se rivalizam com os experimentos em grau de precisão. Os produtos podem ser controlados, com utilização de laser e de feixes moleculares, através de seleção de estados de energia interna dos reagentes, antes da colisão, ou através de condução dos reagentes durante a reação, no sentido de controlar as fases de suas vibrações (ZARE, 1998). Em se tratando de reações mais complexas, as enzimas têm servido de inspiração, na medida em que elas oferecem sítios de reação organizados que podem ser otimizados para obtenção de produtos desejados (GAI *et al.*, 1998). É interessante notar que assim como a reação de Belousov-Zhabotinski, ao romper com os padrões tradicionais da Química, se tornou paradigmática no estudo do comportamento complexo de sistemas fora do equilíbrio (capítulo 4, introdução), a reação de Diels-Alder o faz no estudo da energia de ligação na função catalítica (ROMESBERG *et al.*, 1998, HEINE *et al.*, 1998).

O melhor conhecimento do processo de enovelamento (*folding*), oferecido pela teoria das conformações de energia (item 4.2.3), caminha em convergência com os avanços no estudo de moléculas individuais, cujas técnicas podem ser aplicadas aos biopolímeros, sem necessidade de retirá-los de seu ambiente fisiológico e sem necessidade de estatística ou de sincronização da população de moléculas. Assim como os ecologistas usam anéis de identificação providos de controle remoto para acompanhar o comportamento de indivíduos na população, os biólogos moleculares podem agora utilizar laser ou outras ondas eletromagnéticas para colher informações sobre o comportamento de biomoléculas individuais. Microscopia STM (*scanning tunneling microscopy*) e AFM (*atomic force microscopy*), bem como espectroscopia de fluorescência com SMD (*single-molecule detection*) e SMS (*single-molecule spectroscopy*) estão permitindo o acompanhamento de biopolímeros, quando fluoróforos são ligados a sítios específicos dessas moléculas, principalmente quando dois fluoróforos interagem em condições definidas como FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), após co-localização previamente conhecida (WEISS, 1999). Para sistemas com alto grau de liberdade conformacional, como os biopolímeros, estão se tornando mais adequadas as tecnologias identificadas como SMFS (*single-molecule force spectroscopy*) e IEF (*inelastic electron tunneling*) que permitem obter informações sobre propriedades conformacionais e mecânicas, bem como introdução de energia para

excitação de ligações específicas. O progresso na detecção de fluoróforos aliado ao avanço na utilização de pinças óticas, explorando a pressão de radiação *laser* sobre a matéria, tem permitido o desenvolvimento da biomecânica aplicada aos biopolímeros individuais que funcionam de forma análoga a motores rotativos, como a ATP-sintetase ou o motor do flagelo bacteriano; a máquinas progressivas sobre “trilhos”, como a quinesina sobre microtúbulos ou as polimerases sobre ácidos nucleicos; bem como a máquinas motoras lineares, como a miosina interagindo com a actina (MEHTA *et al.*, 1999). No estudo das máquinas biomoleculares, fica patente que só se pode entender o comportamento individual dos biopolímeros na medida em que se leva em conta a formação de complexos, nos diversos níveis hierárquicos de automontagem em que se manifestam não só os ciclos autocatalíticos mas principalmente os ciclos autopoieticos (capítulo 4, introdução).

Ponto de convergência: papel integrador da rede mecânica

Nas seções 1.3 e 2.2 está retratada a importância da rede mecânica, constituída pelos elementos mecânicos da membrana (integrinas e moléculas de adesão), integradores da matriz extracelular ao citoesqueleto. Na linha defendida pela equipe de Ingber (INGBER, 1993, INGBER *et al.*, 1994, INGBER, 1998, CHICUREL *et al.*, 1998a, CHICUREL *et al.*, 1998b), a rede mecânica, através de *tensegrity* e de percolação (FORGACS, 1995), promove respectivamente a integração das redes biomoleculares e a intercomunicação entre elas, mais pela reorganização de complexos modulares do que pela modificação de atividade em componentes individuais. Além da promoção de intercomunicação entre as vias de sinalização, está se evidenciando que a interação entre integrinas e citoesqueleto é bidirecional: ao mesmo tempo em que interações adesivas (a outras células ou à matriz extracelular) influenciam a organização do citoesqueleto, este reciprocamente afeta a adesão e a função das moléculas de adesão (SCHOENWAEELDER, BURRIDGE, 1999).

Trabalhos recentes, levando em conta este cenário, estão contribuindo para esclarecer paradoxos e contradições que se aprofundavam, na medida em que se avolumavam exponencialmente as publicações com visão fragmentária, demonstrando que a integração e a intercomunicação entre as redes biomoleculares não são resultantes de processos aleatórios, mas de processos ativos e organizados como o são os ciclos autopoieticos geradores de automontagem hierárquica (itens 4.2.3 e 5.1.2).

A proteína arrestina, tradicionalmente considerada apenas uma desativadora da via de sinalização mediada pela proteína G, está adquirindo o novo papel (ZUKER, RANGANATHAN, 1999, LUTTRELL *et al.*, 1999a e 1999b) de funcionar também como proteína adaptadora na junção das duas maiores vias de sinalização, ou seja, as que partem respectivamente do receptor tirosina quinase e do receptor associado a proteína G (seção 2.1 e item 5.3.1), antes de convergirem para a cascata MAPK (item 5.3.2). A ligação da molécula agonista (hormônio) ao receptor serpentina resulta na dissociação da proteína G em $G\alpha$ -GTP, que ativa a produção de cAMP através da adenilciclase, e em $G\beta\gamma$, que favorece a fosforilação, via quinases, do receptor ativado. A arrestina se liga ao receptor ativado e fosforilado, por um lado impedindo nova ativação da proteína G (sua primeira função) e por outro lado recrutando para o complexo, ainda na membrana, outras proteínas quinases adaptadoras, bem como a proteína clatrina que opera a internalização ou endocitose de todo o complexo (sua segunda função). Na gênese desta condição endocítica (MARSH, McMAHON, 1999), quando se estabelece a intercomunicação com a cascata MAPK, todas as etapas estão na dependência de estruturações da rede mecânica, inclusive de cruzamento de informações com o complexo de adesão focal coordenado por integrina (GIANCOTTI, RUOSLAHTI, 1999).

Também para os receptores RTKs (item 5.3.2), tradicionalmente considerados apenas como transdutores de sinais trazidos pelos fatores de crescimento, estão sendo demonstradas novas funções como mediadores entre diversos sistemas de comunicação, verdadeiros relés da rede de sinalização (HACKEL *et al.*, 1999).

Por outro lado, as interações entre receptores imunológicos começam a ser visualizadas como verdadeira máquina molecular para ativação cruzada entre células T e B, formando autêntica sinapse imunológica, sob controle da rede mecânica (GRAKOUÏ *et al.*, 1999), diferente da visão tradicional que costuma considerar cada receptor isoladamente, como se cada um transmitisse seu próprio sinal. Em relação à descrição contida no item 2.1.2, ainda retratando a visão tradicional, a novidade que emerge do conceito de sinapse imunológica é o mecanismo de engajamento sustentado entre o complexo TCRs na célula T e o complexo MHC-peptídeo na célula B, mecanismo este coordenado pela rede mecânica, em analogia com a formação das sinapses propriamente ditas do sistema nervoso (KIM, HUGANIR, 1999).

Reestruturações genômicas a nível global

Regulação da variação genética a nível local

No item 2.1.3, a matriz extracelular foi apresentada como o órgão da forma, na medida em que partem dela os sinais para reestruturações da cromatina, típicas para cada tecido, que permitirão a expressão de grupos de genes específicos que, por sua vez, viabilizarão a intercomunicação entre células de um mesmo tecido. Estas reestruturações no genoma comum de células somáticas, produzindo variação e diferenciação na ontogenia do organismo, apontam para a possibilidade de reestruturações no genoma de espécies, produzindo variação e evolução filogenética. Assim, a evolução biológica não seria o resultado de um processo cego, com mutações ao acaso em genes individuais e egoistas, segundo a visão tradicional de DAWKINS (1996).

O melhor entendimento da origem e do funcionamento do sistema imunológico (SI) adaptativo, típico dos vertebrados homeotérmicos (aves e mamíferos), tem contribuído para deslocar o paradigma genético reducionista, segundo o qual a evolução do SI acontece pelo acúmulo de mutações isoladas, para o paradigma das redes epigenéticas globalmente integradas, segundo o qual não só a evolução mas também o funcionamento do SI ocorre por exploração de conexões a nível genômico e proteômico. A impressionante variação do DNA a nível de célula somática (item 2.1.2), graças aos rearranjos por recombinações das regiões V(D)J (V=variável, D=diversidade, J=junção) nos genes para imunoglobulinas (célula B) e para TCRs (*T-cell receptors*), exemplifica o efeito de um conjunto de estratégias para exploração eficiente do espaço de sequências, facilitando ao mesmo tempo a evolução rápida do potencial de ligação, nas regiões variáveis, e a conservação da característica de atuação, nas regiões constantes (CAPORALE, 1999, LEWIS, 1999). Entre os sítios de reconhecimento para a ação das enzimas recombinases, no recorte de DNA, existem sequências não codificantes, com motivos palindrômicos, que contêm a informação que permite a colagem entre novas regiões.

Assim como o mecanismo de recombinação existente nas células B e T não é uma exceção evolutiva, mas se enquadra na CSSR (*conservative site-specific recombination*) das células procarióticas, assim também a informação que emerge de regiões não codificantes, moduladora da taxa e do tipo de variação genética, contribui para a evolução do genoma como um todo e não só como regiões codificantes (seção 5.4).

Como uma organela de armazenamento de informação, o genoma deve passar por duplicação e por transmissão acurada da informação para a descendência de células. Estes processos essenciais dependem também de elementos repetitivos dispersos que não codificam proteína, tais como os códigos que organizam as regiões replicadoras, centroméricas e teloméricas, bem como as *tandemly repeating sequences* que, como botões de rádio, sintonizam e irradiam a informação em faixas típicas para cada espécie.

“Based on their fundamental role in genome transmission and in determining patterns of gene expression, it can be proposed that repetitive DNA elements set the “System architecture” of each species. The term “System architecture” is used to draw the analogy with computers, when programs with the same functionality (e. g., Microsoft Word) are encoded differently according to the requirements of the underlying hardware and operating system (e. g., MacOS or Windows). From the system architecture perspective, what make each species unique is not the nature of its proteins (a Windows desktop resembles a MacIntosh desktop) but rather a distinct specific organization of the respective DNA elements that must be recognized by nuclear replication, segregation and transcription functions. In other words, resetting the genome system architecture through reorganization of the repetitive DNA content is a fundamental aspect of evolutionary change” (SHAPIRO, 1999).

Ciclos autopoiéticos e automontagem hierárquica

Na comparação entre o comportamento de uma tira de elastômero (item 4.1.4) e de uma tira de musculatura estriada, à primeira vista impressiona a semelhança: sob estimulação adequada, ambas se contraem levantando peso em condições isotônicas ou geram tensão em condições isométricas, evidenciando um processo de cooperatividade e de autocatálise entre as unidades do sistema. No entanto, a semelhança não vai além das aparências. Logo na curva da tensão versus estiramento, o elastômero apresenta um comportamento linear típico de um sistema polimérico, enquanto o músculo apresenta um comportamento não linear, com um máximo de tensão correspondendo a um grau de estiramento médio das fibras. Segundo a lei de Starling, a maior força de contração da fibra muscular coincide com a conformação topológica onde maior número de cabeças de miosinas no filamento grosso interagem com pontos específicos (troponina / tropomiosina) sobre a molécula de actina no filamento fino.

Enquanto o elastômero adquire sua estrutura definitiva após uma única etapa de agregação, uma fibra muscular estriada passa por vários ciclos autopoiéticos até sua

automontagem, e depois vários ciclos autopoieticos ainda são necessários para automontagem de fibras paralelas num músculo, com seus respectivos proprioceptores, bem como para a integração do músculo como unidade servomecânica no aparelho locomotor, após a integração ao sistema nervoso, através das junções neuromusculares, e ao sistema esquelético, através das junções miotendinosas (item 2.2.3). Assim, no estudo da contração muscular, mesmo a nível molecular, vários níveis de complexidade devem ser levados em conta (IMAFUKU *et al.*, 1999, SANTILLÁN, 1999).

Níveis hierárquicos semelhantes de autopoiese e de automontagem integradas podem ser detectados na morfogênese dos demais sistemas do organismo, como já foi acenado para o caso do sistema imunológico, quando cada tipo de célula passa por processo de maturação específico, mas ao mesmo tempo sob coordenação global das reestruturações genômicas próprias de cada tecido, permissoras de interações complementares entre células.

Originalidade e relevância da proposta

Um aspecto original da proposta é a visão unificada da Biologia, como já foi enfatizado no início deste trabalho de tese, que surge do tratamento da Bioinformática como ciência biológica, e não como mera tecnologia computacional. Este ponto de vista, enriquecido por estudos intensivos dos fenômenos biológicos, permite viabilizar um nível bioinformacional de análise para as propriedades biológicas emergentes, possibilitando a integração de análises a nível bioquímico e fisicoquímico, geralmente conduzidas em compartimentos estanques.

Na genética clássica, o acesso à informação genética é indireto, quando uma mutação no gene é identificada a nível de modificações produzidas no fenótipo, através de experimentos recombinantes de indivíduos, que permitem localizar tais modificações em mapas genéticos, sem o conhecimento da natureza química do gene. Não existe, portanto, análise da natureza molecular dos genes e das mutações.

A genética molecular parte da informação genética contida em regiões de DNA que codificam proteínas (ORFs e respectivos elementos reguladores) e, aplicando estratégia de genética reversa, induz mutagênese localmente dirigida afim de observar as modificações a nível fenotípico. Não existe, porém, análise das funções e reestruturações genômicas envolvendo regiões não codificantes.

Surgida no contexto do paradigma genético reducionista que só leva em conta o fluxo unidirecional de informação, captado pelo dogma central da Biologia Molecular, a

genética molecular tradicional ainda não tem se interessado pelo efeito das reestruturações genômicas a nível global e nem se preocupado pela integração das redes biomoleculares a nível genômico e proteômico, contentando-se com uma versão da evolução biológica, como a defendida com fervor por DAWKINS (1996), que contempla um processo lento, dependente de variação genética cega e mudança fenotípica gradual.

Fundamentada no estudo das relações termodinâmicas e das análises cinética e dinâmica das reações químicas pertinentes (seção 3.2) com a concentração do estudo no funcionamento das ATPases (seção 4.3), a presente proposta, que se configura como uma teoria da bioinformação inspirada na teoria da informação de Stonier (item 3.1.2), na teoria de sistemas evolutivos de Theodoridis (item 3.1.3) e na teoria das redes biomoleculares de Stange (seção 4.3), apresenta coerência interna não só pela capacidade de detectar e absorver as convergências das mais recentes versões de modelos e de tecnologias, mas principalmente pela capacidade de integrar, sob o ponto de vista bioinformacional, as análises de propriedades dos sistemas biológicos que se manifestam a níveis fisicoquímico, bioquímico e biológico.

Conforme considerações do item 4.2.3, a análise da mudança conformacional dos biopolímeros não pode só levar em conta a aditividade química das interações entálpicas (quando o espaço sequencial nos processos de enovelamento de proteína é infinitamente grande, da ordem de $20^{100} \approx 10^{130}$, para um polímero de 100 resíduos, considerando os 20 tipos de aminoácidos), mas deve levar em conta também a não aditividade das interações entrópicas (item 4.2.1) dos processos enzimáticos (4.2.2), guiados por congelamentos que priorizam relações funcionais em vez de sequências estruturais, como no colapso hidrofóbico (quando, dada a redução no alfabeto às letras H, de hidrofóbico, e P, de polar, o espaço de sequências se reduz para $2^{100} \approx 10^{30}$, e posteriormente para $2^{100/3} \approx 2^{33} \approx 10^{10}$, considerando que apenas 1/3 dos 100 resíduos formam o cerne hidrofóbico). Por outro lado, não se pode deixar de levar em conta o nível biológico, considerando ainda a drástica redução no espaço sequencial, graças à presença de chaperoninas específicas para proteínas nascentes, sem falar na precisão com que o peptídeo sinalizador define a destinação para colapso hidrofóbico (proteína solúvel) ou para colapso hidrofílico (proteína de membrana).

O nível bioinformacional se faz presente nas primeiras células, quando, após a transição do mundo do RNA para o do DNA (itens 1.1.1 e 3.1.3), surgem as condições *negentrópicas* para a gênese das redes bioinformacionais (itens 3.1.2, 3.1.3 e seção 4.3),

sob regime de um genoma mínimo, mas com arquitetura de sistema (SHAPIRO, 1999), funcionando em *feedback* com as redes epigenéticas que ele próprio produz (STROHMAN, 1997). Desta forma, a análise bioinformacional se processa tendo em vista não só os aspectos genéticos, relativos às sequências codificantes, mas também os aspectos genômicos, relativos às sequências não codificantes.

A análise bioinformacional, aliada à visão unificada do funcionamento integrado das quatro redes biomoleculares nos organismos modelos mais simples do Projeto Genoma, permitindo a criação de um modelo de célula virtual, poderá se transformar em arma poderosa na interpretação, até agora inviável, do dilúvio de informação que se acumula exponencialmente nos bancos de dados genômicos e proteômicos. Como resultado dessa interpretação, novos genes e novas proteínas poderão ser descritos, bem como suas funções descritas durante simulações em situação fisiológica e de patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. A. *et al.*, 1998, "A Mathematical Model for Ligand/Receptor/G-Protein Dynamics and Actin Polymerization in Human Neutrophils." *J. theor. Biol.*, 193: 547-560.
- ADLEMAN, L. M., 1994, "Molecular computation of solutions to combinatorial problems." *Science*, 266: 1021-1024.
- ALBERTS *et al.*, 1994, *Molecular Biology of the Cell*. 3th ed., Garland Publishing, Inc., New York.
- ALLSHIRE, R. C., 1997, "Centromeres, checkpoints and chromatid cohesion." *Curr. Op. Gen. Develop.*, 7: 264-273.
- BAASS, P. C. *et al.*, 1995, "Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases." *Trends Cell Biol.*, 5: 465-470.
- BAINS, W., 1997, "Should you hire an epistemologist?" (Response to Strohmman). *Nature Biotechnology*, 15: 396.
- BAIROCH, A., MURZIN, A. G., 1997, "Sequences and topology: Predicting evolution." *Current Op. Struct. Biol.*, 7: 367-368.
- BALDWIN, R. L., ROSE, G. D., 1999a, "Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding". *Trends Biochem Sci*, 24: 26-33.
- BALDWIN, R. L., ROSE, G. D., 1999b, "Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states". *Trends Biochem Sci*, 24: 77-83.
- BATES, A. D., MAXWELL, A., 1993, *DNA Topology*, New York, Oxford University Press Inc.
- BEATO, M., EISFELD, K., 1997, "Transcription factor access to chromatin". *Nucleic Acid Res.*, 25: 3559-63.
- BEAUMONT, M. A. 1993, "Evolution of optimal behaviour in networks of Boolean automata." *J. theor. Biol.*, 165: 455-476.
- BECKER, W. M., DEAMER, D. W., 1991,. *The World of the Cell*. 2th ed., Benjamin Cummings, New York.
- BERS, D. M., FILL, M., 1998, "Coordinate Feet and the Dance of Ryanodine Receptors". *Science*, 281: 790-791.

- BHALLA, U. S., IYENGAR, R., 1999, "Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways". *Science*, 283: 381-389.
- BHATNAGAR, R. S., GORDON, J. I., 1997, "Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle." *Trends Cell Biol.* 7: 14-20.
- BIBI, E., 1998, "The role of the ribosome-translocon complex in translation and assembly of polytopic membrane proteins." *Trends in Biochem. Sci.* 23: 51-56.
- BICKEL-SANDKÖTTER, S., GARTNER, W., DANE, M., 1996, "Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis." *Arch. Microbiol.*, 166: 1-11.
- BLACKWOOD, E. M., KADONAGA, J. T., 1998, "Going the Distance: A Current View of Enhancer Action." *Science*, 281: 60-63.
- BODNAR, J. W., BRADLEY, M. R., 1996, "A Chromatin Switch". *J. theor. Biol.*, 183: 1-7.
- BODNAR, J. W., 1997. "Programming the *Drosophila* embryo". *J. theor. Biol.*, 188: 391-445.
- BOUDREAU, N., MYERS, C., BISSEL, M. J., 1995, "From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM." *Trends Cell Biol.*, 5: 1-5.
- BRADY, G. P. *et al.*, 1997, "Entropy in protein folding and in protein-protein interactions." *Current Op. Struct. Biol.*, 7: 215-221.
- BRADY-KALNAY, S. M., TONKS, N. K., 1995, "Protein tyrosine phosphatase as adhesion receptors." *Current Op. Cell Biol.*, 7: 650-657.
- BRAY, D., 1998, "Signaling Complexes: Biophysical Constraints on Intracellular Communication." *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27: 59-71.
- BREZINA, V. *et al.*, 1996, "Functional uncoupling of linked neurotransmitter effects by combinatorial convergence." *Science*, 273: 806-810.
- BROWN, E. J. *et al.*, 1996, "A signaling Pathway to Translational Control." *Cell*, 86: 517-520.
- CAIRNS, B. R., 1998 "Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives." *Trends Biochem. Sci.* 23: 20-25.
- CANNON, W. R., BENKOVIC, S. J., 1998, "Solvation, Reorganization Energy and Biological Catalysis". *J. Biol. Chem.*, 273: 26257-26260.

- CAPORALE, L. H., 1999, "Chance Favors the Prepared Genome". *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 870: 1-21.
- CASTRESANA, J., SARASTE, M., 1995, "Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis." *Trends Biochem. Sci.*, 20: 443-448.
- CATE, J. H. *et al.*, 1996a, "Crystal Structure of a Group I Ribozyme Domain: Principles of RNA Packing". *Science*, 273: 1678-1685.
- CATE, J. H. *et al.*, 1996b, "RNA Tertiary Structure Mediation by Adenosine Platforms". *Science*, 273: 1698-1699.
- CHAMBRON, J. C. *et al.*, 1998, "Resolution of topologically chiral molecular objects." *Chirality*, 10: 125-133.
- CHEN, H. *et al.*, 1997, "Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome *Echerichia coli* mutant." *Nature Biotechnol.*, 15: 432-435.
- CHICUREL, M. E., CHEN, C. S., INGBER, D. E., 1998a, "Cellular control lies in the balance of forces". *Current Opinion Cell Biol.*, 10: 232-239.
- CHICUREL, M. E. *et al.*, 1998b, "Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions". *Nature*, 392: 730-733.
- CLELAND, W. W., FREY, P. A., GERLT, J. A., 1998, "The Low Barrier Hydrogen Bond in Enzymatic Catalysis". *J. Biol. Chem.*, 273: 25529-32.
- CLEAVER, J. E., 1999, "Stopping DNA replication in Its Tracks." *Science*, 285: 212-213.
- COHEN, F. E., PRUSINER, S. B., 1998, "Pathological Conformations of Prion Proteins". *Ann. Rev. Biochem.*, 67: 793-819.
- COLLIER, J. R. *et al.*, 1996, "Pattern Formation by Lateral Inhibition with Feedback: a Mathematical Model of Delta-Notch Intercellular Signalling." *J. theor. Biol.*, 183: 429-446.
- CONRAD, M. 1989. "The brain-machine disanalogy." *BioSystems*, 22: 197-213.
- CONRAD, M., ZAUNER, K. P., 1998, "DNA as a vehicle for the self-assembly model of computing." *BioSystems*, 45: 59-66.
- CRAIG, M. L. *et al.*, 1998, "DNA Footprints of the Two Kinetically Significant Intermediates in Formation of an RNA Polymerase-Promoter Open Complex." *J. Mol. Biol.*, 283: 741-756.
- CREIGHTON, T. E., 1990, "Protein Folding". *Biochem. J.*, 270: 1-16.

- CRICK, F.H.C., 1966, "Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis". *J. Mol. Biol.*, 19:548.
- DANGLIKER, P. J., NÚÑEZ, M. E., BARTON, J. K., 1998, "Oxidative Charge Transfer to Repair Thymine Dimers and Damage Guanine Bases in DNA Assemblies Containing Tethered Metallointercalators." *Biochemistry*, 37: 6491-6502.
- DAWKINS, R., 1996, *The blind watchmaker: Why the evidence of evolution reveals a universe without design*. Norton, New York.
- DEVINE, P., PATON, R. C., 1997, "Individual Based Modeling in an Explicitly Spatio-temporal Ecosystem". Proceedings of XV IMACS World Congress. *Scientific Computation. Modelling and Applied Mathematics*. Berlin.
- DILL, K. A., 1997, "Additivity Principles in Biochemistry", *J. Biol. Chem.*, 272: 701-704.
- DILL, K. A., 1999, "Polymer principles and protein folding". *Protein Science*, 8: 1166-1180.
- DUAN, Y., WANG, L., KOLMANN, P. A., 1998, "The early stage of folding of villin headpiece subdomain observed in a 200-nanosecond fully solvated molecular dynamics simulation." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 9897-9902.
- DUPONT, G., 1998, "Link between fertilization-induced Ca^{2+} oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation." *Biophysical Chemistry*, 72: 153-167.
- DYSON, F., 1988, *Infinite in all Directions*, Harper & Row, New York.
- EDWARDS, M. R., 1996, "Metabolite Channeling in the origin of life." *J. Theor. Biol.*, 179: 313-322.
- EFTINK, M. R., SHASTRY, M. C. R., 1997, "Fluorescence Methods for Studying Kinetics of Protein-Folding Reactions". *Meth. Enzimol.*, 278: 258-286.
- EISENBERG, D., 1999, "How Chaperones Protect Virgin Proteins." *Science*, 285: 1021-1023.
- ELION, E. A., 1998, "Routing MAP Kinase Cascades". *Science*, 281: 1625-1632.
- ELITZUR, A. C., 1996, "Life's emergence is not an axiom: a reply to Yockey." *J. theor. Biol.*, 180: 175-180.

- EL-MASRI, H. A., PORTIER, C. J., 1999, "Replication Potential of Cells via the Protein Kinase C-MAPK Pathway: Application of a Mathematical Model." *Bull. Math. Biol.*, 61: 379-398.
- FERRELL Jr, J. E., MACHLEDER, E. M., 1998, "The Biochemical Basis of an All-or-None Cell Fate Switch in *Xenopus* Oocytes". *Science*, 280: 895-901
- FERSHT, A. R., 1998, "Sieves in Sequence". *Science*, 280: 541.
- FISHER, M. J., PATON, R. C., MATSUNO, K. J., 1999, "Intracellular signalling proteins as 'smart' agents in parallel distributed processes". *BioSystems*, 50: 159-171.
- FORGACS, G., 1995, "On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signalling: an approach based on percolation." *J. Cell Sci.*, 106:2131-2143.
- FRIDLAND, L. E., SCHEIBE, R., 1999, "Regulation of the Calvin Cycle for CO₂ Fixation as an Example for General Control Mechanisms in Metabolic Cycles." *BioSystems*, 51: 79-93.
- GAI, F. *et al.*, 1998, "Chemical Dynamics in Proteins: The Photoisomerization of Retinal in Bacteriorhodopsin". *Science*, 279: 1886-1891.
- GAIDOS, E. J., NEALSON, K. H., KIRSCHVINK, J. L., 1999, "Life in Ice-covered Oceans". *Science*, 284: 1631-1633).
- GELL-MANN, M., 1996. *O Quark e o Jaguar*. Editora Rocco Ltda, Rio de Janeiro.
- GIANCOTTI, F. G. *et al.*, 1999, "Integrin Signaling." *Science*, 285: 1028-1032.
- GIBBONS, A., 1998, "Solving the Brain's Energy Crisis". *Science*, 280: 1345-1347.
- GIRAUD-GUILLE, M-M., 1996, "Twisted Liquid Crystalline Supramolecular Arrangements in Morphogenesis". *Int. Review Cytol.*, 166: 59-99.
- GLADSTONE, S., LAIDLER, K., EYRING, H., 1941, *The Theory of Rate Processes*, New York, McGraw-Hill.
- GOLDBERG, M.W. *et al.*, 1995, "Structural and functional organization of the nuclear envelope." *Current Op. Cell Biol.*, 7: 301-309.
- GRAKOU, A. *et al.*, 1999, "The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation." *Science*, 285: 221-227.
- GREEN, H. S., TRIFFET, T., 1997, "The animal brain as a quantal computer." *J. theor. Biol.*, 184: 385-403.

- GREIDER, C. W., BLACKBURN, E. H., 1996, "Telomeres, Telomerase and Cancer." *Scient. Amer.*, Feb 1996: 80-85.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.*, 1996, *An Introduction to Genetic Analysis*, 6 ed., New York, W.H. Freeman and Company.
- GROSBURG, A. Y., KHOKHLOV, A. R., 1997. *Giant Molecules*. Academic Press.
- GUNDERMANN, T. *et al.*, 1997, "Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors." *Am. Rev. Neurosci.*, 20: 399-427.
- GUO, F., GOPAUL, D. N., VAN DUYN, 1997, "Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse". *Nature*, 389: 40-46.
- HACKEL, P. O. *et al.*, 1999, "Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways". *Curr. Op. Cell Biol.*, 11: 184-189.
- HAGMANN, M., 1999, "How Chromatin Changes Its Shape". *Science*, 285: 1200-1203.
- HEINE, A. *et al.*, 1998, "An Antibody exo Diels-Alderase Inhibitor Complex at 1.95 Angstrom Resolution". *Science*, 279: 1934-1940.
- HENTZE, M. W., 1997, "eIF4G: A Multipurpose Ribosome Adapter?" *Science*, 275: 500-501.
- HOLM, L., SANDER, C., 1996, "Mapping the protein universe." *Science*, 273: 595-602.
- HOLMLIN, R. E., DANDLIKER, P. J., BARTON, J. K., 1997, "Charge Transfer through the DNA Base Stack". *Angew. Chem. Int. Engl.*, 36: 2714-2730.
- HOPPER, A. K., 1998, "Nuclear Functions Charge Ahead." *Science*, 282: 200-201.
- HUNTER, G. K., 1996, "Is Biology reducible to Chemistry?" *Perspect. Biol. Med.*, 40: 130-138.
- IBBA, M., CURNOW, A. W., SOLL, D., 1997, "Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal." *Trends Biochem. Sci.* 22: 39-43.
- IMAFUKU, Y., EMOTO, Y., TAWADA, K., 1999, "A Protein Friction Model of the Actin Sliding Movement Generated by Myosin in Mixtures of MgATP and MgGTP *in vitro*." *J. theor. Biol.*, 199: 359-370.
- INGBER, D. E., 1993. "The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering." *Cell*, 75: 1249-1252.

- INGBER, D. E. *et al.*, 1994, "Cellular Tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis." *Int. Rev. Cytol.*, 150: 173-224.
- INGBER, D. E., 1998, "The Architecture of Life", *Scientific American*, 278: 30-39.
- IWATA, S. *et al.*, 1998, "Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex." *Science*, 281: 64-71.
- JENNINGS, P. A. *et al.*, 1991, "Mutational Analysis of Protein Folding Mechanisms". *Meth. Enzimol.*, 202: 113-126.
- JESSELL, T. M., KANDEL, E. R., 1993, "Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication." *Cell*, 72/*Neuron*, 10(Suppl): 1-30.
- JI, S., 2000, "Free energy and information contents of *Conformons* in proteins and DNA". *Bio Systems*, 54: 107-130.
- JOCKUSCH, B. M. *et al.*, 1996, "Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation." *Trends Cell Biol.*, 6: 311-315.
- JOHNSON, L. N., NOBLE, M. E. M., OWEN, D. J., 1996, "Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation." *Cell*, 85: 149-158.
- JUDSON, O. P., 1994, "The rise of the individual-based model in ecology". *Trends Evol. Ecol.*, 9: 9-14.
- KAERN, M., HUNDING, A., 1998, "Dynamics of the Cell Cycle Engine: Cdk2-kinase and the Transition into Mitosis". *J. theor. Biol.*, 193: 47-57.
- KAERN, M., HUNDING, A., 1999, "The Effect of Slow Allosteric Transitions in a Coupled Biochemical Oscillator Model". *J. theor. Biol.*, 198: 269-281.
- KAUFFMAN, S. A., LEVIN, S., 1987, "Towards a general theory of adaptative walks on rugged landscapes." *J. theor. Biol.*, 128: 11-45.
- KELLEY, S. O., BARTON, J. K., 1999, "Electron Transfer Between Bases in Double Helical DNA". *Science*, 283: 375-381.
- KENYON, C., 1996. "Ponce d'elegans: Genetic Quest for the Fountain of Youth." *Cell*, 84: 501-504.
- KIM, J. H., HUGANIR, R. L., 1999, "Organization and regulation of proteins at synapses". *Curr. Op. Cell Biol.*, 11: 248-254.

- KIRKPATRICK, C., PEIFER, M., 1995, "Not just glue: cell-cell junctions as cellular signalling centers." *Current Op. Genet. Develop.*, 5: 56-65.
- KLEIN, C. T., MAYER, B., 1999, "Sources for structure formation and switches in metabolic pathways". *BioSystems*, 51: 41-52.
- KLINGENBERG, C. P., 1998. "Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny." *Biol. Rev.*, 73: 79-123.
- KODADEK, T., 1998, "Mechanistic parallels between DNA replication, recombination and transcription." *Trends Biochem. Sci.*, 23: 79-83.
- KOLK, M. H. *et al.*, 1998, "NMR Structure of a Classical Pseudoknot: Interplay of Single- and Double-Stranded RNA". *Science*, 280: 434-437.
- KOOL, E. T., 1998, "Replication of Non-hydrogen Bonded Bases by DNA Polymerases: A Mechanism for Steric Matching." *Biopol. (N. Acid Sci.)*, 48: 3-17.
- KOSHLAND Jr, D. E., 1998, "The Era of Pathway Quantification". *Science*, 280: 852-853.
- KRAUSE, D. C., 1996, "Mycoplasma pneumoniae cytoadherence: unravelling the tie that binds." *Mol. Microbiol.*, 20: 247-253.
- KULL, F. J. *et al.*, 1996, "Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin." *Nature*, 380: 550-555.
- KYTE, J., 1995, *Mechanism in Protein Chemistry*, Garland Publishing, New York.
- KYTE, J., 1995, *Structure in Protein Chemistry*, Garland Publishing, New York.
- LANDER, E. S., WATERMAN, M. S., 1995, *Calculating the secrets of Life. Applications of the Mathematical Sciences in Molecular Biology*. National Academy Press.
- LAURENTS, D. V., BALDWIN, R. L., 1998, "Protein Folding: Matching Theory and Experiment." *Biophys. J.*, 75: 428-434.
- LEHMANN, J., 2000, "Physico-chemical Constraints Connected with the Coding Properties of the Genetic System." *J. theor. Biol.*, 202: 129- 144.
- LELOUP, J. C., GOLDBETER, A., 1999, "Chaos and Birhythmicity in a Model for Circadian Oscillations of the PER and TIM Proteins in *Drosophila*." *J. theor. Biol.*, 198: 445-459.
- LEVY, R. M., GALLICCHIO, E., 1998, "Computer Simulations with Explicit Solvent: Recent Progress in the Thermodynamic Decomposition of Free Energies and in Modeling Electrostatic Effects". *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 49: 531-567.

- LEWIS, S. M., 1999, "Evolution of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Assembly". *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 870: 58-67.
- LIN, K. *et al.*, 1996, "A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in glycogen phosphorylase." *Science*, 273: 1539-1541.
- LISMAN, J.E., FALLON, J.R., 1999, "What Maintains Memories?". *Science*, 283: 339.
- LOVELOCK, J., 1988, *The Ages of Gaia: a Biography of Our Living Earth*. New York: W. W. Norton.
- LOVELOCK, J., 1995. "The Ontogeny of Gaia: the Role of Microorganisms in Planetary Information Network. *J. Theor. Biol.*, 176: 175-180.
- LOVELOCK, J., MARGULIS, L., 1974, "Atmospheric homeostasis: the Gaia hypothesis." *Tellus*, 26: 1-10.
- LUND, E., DAHLBERG, J. E., 1998, "Proofreading and Aminoacylation of tRNAs Before Export from the Nucleus." *Science*, 282: 2082-2085.
- LUTTRELL, L. M. *et al.*, 1999a, "B-Arrestin-Dependent Formation of B₂ Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes". *Science*, 283: 655-661.
- LUTTRELL, L. M. *et al.*, 1999b, "Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors". *Curr. Op. Cell Biol.*, 11: 177-183.
- MACHESKY, L. M., HALL, A., 1996, "Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton." *Trends Cell Biol.*, 6: 304-308.
- MACKENZIE, D., 1999, "New Clues to Why Size Equals Destiny". *Science*, 284: 1607-1609.
- MARCUS, R. A., 1965, "On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions". *J. Chem. Physics*, 43: 679-701.
- MARSH, M., McMAHON, H. T., 1999, "The Structural Era of Endocytosis." *Science*, 285: 215-220.
- MARSHALL, W. F., FUNG, J. C., SEDAT, J. W., 1997, "Deconstructing the nucleus: global achitecture from local interactions." *Curr. Op. Gen. Develop.*, 7: 259-263.
- MARX, J., 1995, "How DNA Replication Originates." *Science*, 270: 1585-1587.

- MARX, S. O., ONDRIAS, K., MARKS, A. R., 1998, "Coupled Gating Between Individual Skeletal Muscle Ca Release Channels (Ryanodine Receptors)". *Science*, 281: 818-821.
- MATOUSCHEK, A., FERSHT, A. R., 1991, "Protein Engineering in Analysis of Protein Folding Pathways and Stability". *Meth. Enzimol.*, 202: 82-112.
- MATURANA, H. R., VARELA, F. J., 1980, *Autopoiesis and Cognition*. Reidel, Dordrecht, The Netherlands.
- McKIM, K. S., HAWLEY, R. S., 1995, "Chromosomal Control of Meiotic Cell Division." *Science*, 270: 1595-1601.
- MEHTA, A. D. *et al.*, 1999, "Single-molecule Biomechanics with Optical Methods". *Science*, 283: 1689-1695.
- MESSANA, I. *et al.*, 1996, "Human erythrocyte metabolism is modulated by the O₂-linked transition of hemoglobin." *FEBS Letters*, 390: 25-28.
- METZGER, R. J., KRASNOW, M. A., 1999, "Genetic Control of Branching Morphogenesis". *Science*, 284: 1635-1639.
- MIHARA, H., TAKAHASHI, Y., UBNO, A., 1998, "Design of Peptides Undergoing Self-Catalytic α -to- β Transition and Amyloidogenesis". *Biopolymers*, 47: 83-92.
- MISRA, V. K., DRAPER, D. E., 1999, "On the Role of Magnesium Ions in RNA Stability". *Biopolymers*, 48: 113-135.
- MITCHELL, P., 1961, "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." *Nature*, 191: 144-148.
- MITCHELL, P., 1966, *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation*. Glynn Research Ltd, Bodmin, UK.
- MORGAN, D. O., 1996, "Under arrest at atomic resolution." *Nature*, 382: 295-296.
- MORIN, G. R., 1996, "The structure and properties of mammalian telomerase and their potential impact on human disease." *Cell Develop. Biol.*, 7: 5-13.
- MURCIA, G., JACOBSON, M., SHALL, S., 1995, "Regulation by ADP-ribosylation." *Trends Cell Biol.*, 5: 78-81.
- MUTO, A., USHIDA, C., HIMENO, H., 1998, "A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA." *TIBS*, 23: 25-28.

- NEET, K. E., 1998, "Enzyme Catalytic Power Minireview Series". *J. Biol. Chem.*, 273: 25527.
- NELSON, H. C. M., 1995, "Structure and function of DNA-binding proteins". *Current Op. Gen. Develop.*, 5: 180-189.
- NELSON, W. J., 1996, "Meeting of cell-cell adhesion, communication and signalling at the junction." *Trends Cell Biol.*, 6: 325-327.
- NETZER, W. J. *et al.*, 1998, "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent an – independent mechanisms. *TIBS*, 23: 68-70.
- NICOLIS, G., PRIGOGINE, I., 1977. *Self Organization in Nonequilibrium Systems*. New York: John Wiley.
- NICOLIS, G., PRIGOGINE, I., 1989, *Exploring Complexity*, New York, W.H.Freeman and Company.
- NITTA, I. *et al.*, 1998, "Reconstitution of Peptide Bond Formation with *Escherichia coli* 23S Ribosomal RNA Domains". *Science*, 281: 666-669.
- NOVAK, B. *et al.*, 1998, "Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions". *Biophysical Chemistry*, 72: 185-200.
- NOVAK, B. *et al.*, 1999, "Finishing the Cell Cycle." *J. theor. Biol.*, 199: 223-233.
- NOWAK, R., 1995, "Molecular Machines May Aid Gene Expression." *Science*, 270: 1589-1590.
- NUREKI, O. *et al.*, 1998, "Enzyme Structure with Two Catalytic Sites for Double-Sieve Selection of Substrate". *Science*, 280: 578-582.
- OBEYESEKERE, M. N. *et al.*, 1999, "A Model of Cell Cycle Behavior Dominated by Kinetics of a Pathway Stimulated by Growth Factors." *Bull. Math. Biol.*, 61: 917-934.
- OLSON, M. A., 1998, "Mean-field analysis of protein-protein interaction", *Biophys. Chem.*, 75: 115-128.
- ORLANDO, V., PARO, R., 1995, "Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns". *Current Op. Gen. Develop.*, 5: 174-179.
- PENROSE, R. 1997. *The large, the small and the human mind*. Cambridge Univ. Press.
- PÉREZ-MARTÍN, J., DE LORENZO, V., 1997, "Clues and Consequences of DNA bending in Transcription." *Ann. Rev. Microbiol.*, 51: 593-628.

- PLUTA , A. F. *et al.*, 1995, “The Centromere: Hub of Chromosomal Activities.” *Science*, 270: 1591-1595.
- POPA, R., 1997, “A sequential scenario for the origin of biological chirality.” *J. Mol. Evol.*, 44:121-127.
- PROHOFSKY, E., 1995, *Statistical Mechanics and Stability of Macromolecules*, Cambridge Univ. Press.
- PRUNELL, A., 1998, “A Topological Approach to Nucleosome Structure and Dynamics: The Linking Number Paradox and Other Issues”. *Biophysical J.*, 74: 2531-2534.
- RACKER, E., 1980, “From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics.” *Federation Proc.*, 39: 210-215
- RAINA, S., MISSIAKAS, D., 1997, “Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51: 179-202.
- REIZER, J., SAIER Jr, M. H., 1997, “Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Current Op. Struct. Biol.*, 7: 407-415.
- RINGROSE, L. *et al.*, 1998, “Comparative Kinetic Analysis of FLP and Cre Recombinases: Mathematical Models for DNA Binding and Recombination.” *J. Mol. Biol.*, 284: 363-384.
- ROMESBERG, F. E. *et al.*, 1998, “Immunological Origins of Binding and Catalysis in a Diels-Alderase Antibody”. *Science*, 279: 1929-1933.
- ROMOND, P.C. *et al.*, 1999, “Alternating Oscillations and Chaos in a Model of Two Coupled Biochemical Oscillators Driving Successive Phases of the Cell Cycle”. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 879: 180-193.
- ROQUE, L. G., NEGREIROS, J., MONDAINI, R., 1998, “DNA Sequences and the Geometrical Analysis of their associated Smooth Curves” – Proceedings XXI CNMAC – Caxambu, MG. – 14 –18 setembro 1998.
- ROSSELLEY, C. D., SREBROW, A., BISSEL, M. J., 1995, “A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression.” *Current Op. Cell Biol.*, 7: 736-747.
- ROTHMAN, J. E., ORCI, L., 1996. “Budding vesicles in living cells.” *Sci. Amer.*, March: 50-55.

- ROWLES, A., BLOW, J. J., 1997, "Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication." *Current Op. Genet. Develop.*, 7: 152-157.
- SABLIN, E.P. *et al.*, 1996. "Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ndc." *Nature*, 380: 555-559.
- SAMIEI, H.V., 1995. "Signalling in new directions." *Biochem. Cell Biol.*, 73: 133-136.
- SANDLER, U. *et al.*, 1998. "Non-coding DNA Can Regulate Gene Transcription by its Base Pair's Distribution". *J. theor. Biol.*, 193: 85-90.
- SANTILLÁN, M., 1999, "A Thermodynamic Optimization Analysis of a Possible Relation between the Parameters that Determine the Energetics of Muscle Contraction in Steady State". *J. theor. Biol.*, 199: 105-112.
- SCHAEFFER, H. J. *et al.*, 1998, "MP1: A MEK Binding Partner that Enhances Enzymatic Activation of the MAP Kinase Cascade". *Science*, 281: 1668-1674.
- SCHIEBEL, E., BORNENS, M., 1995, "In search of a function for centrins." *Trends Cell Biol.*, 5: 197-204.
- SCHOENWAELDER, S. M., BURRIDGE, K., 1999, "Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins". *Curr. Op. Cell Biol.*, 11: 274-286.
- SCHRÖDINGER, E., 1992. *What is Life? with Mind and Matter with Autobiographical Sketches*. Cambridge University Press.
- SHAI, Y., 1995. "Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides." *Trends Biochem. Sci.*, 20:460-465.
- SHANNON, C. E., WEAVER, W., 1964, *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- SHAPIRO, J. A., 1999, "Genome System Architecture and Natural Genetic Engineering in Evolution." *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 870: 23-35.
- SHORTLE, D. *et al.*, 1996. "Protein folding for realists: a timeless phenomenon." *Protein Sci.*, 5: 991-1000.
- SIEGEL, J. S., 1998, "Homochiral imperative of molecular evolution." *Chirality*, 10: 21-27.
- SLACK, F., RUVKUN, G., 1998. "Heterochronic Genes in Development and Evolution". *Biol. Bull.*, 195: 375-376.
- SMITH, J. L., 1998, "Secret Life of Cytochrome bc₁." *Science*, 281: 58-59.

- SONGIANG, Z., CANTLEY, L. C., 1995, "Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling." *Trends Biochem. Sci.*, 20: 470-475.
- STANGE, P. *et al.*, 1998, "Self-organizing molecular networks." *Biophys. Chem.*, 72: 73-85.
- STOECKENIUS, W., OESTERHELT, D., 1977, "Light energy transduction by the purple membrane of halophilic bacteria". *Feder. Proc.*, 36: 1797.
- STONIER, T., 1996, "Information as a basic property of the universe". *BioSystems*, 38: 135-140.
- STRAUB, T. *et al.*, 1998, "The RNA-splicing Factor PSF/p54^{nrb} Controls DNA-Topoisomerase I Activity by a Direct Interaction." *J. Biol. Chem.*, 273: 26261-26264.
- STRAUSS, E., 1999. "A Symphony of Bacterial Voices". *Science*, 284: 1302-1304.
- STROHMAN, R. C., 1997, "The coming Kuhnian revolution in biology." *Nature Biotechnol.*, 15: 194-200.
- STUTTS, M. J. *et al.*, 1995, "CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels." *Science*, 269: 847-850.
- SUZUKI, M. *et al.*, 1997, "Coupling of Protein Surface Hydrophobicity Change to ATP Hydrolysis by Myosin Motor Domain." *Biophys. J.*, 72: 18-23.
- TAKEICHI, M., 1995, "Morphogenetic roles of classic cadherins." *Current Op. Cell Biol.*, 7: 619-627.
- TARASOW, T. M., EATON, B. E., 1998, "Dressed for Success: Realizing the Catalytic Potential of RNA". *Biopolymers (N. Acid Sci.)*, 48, 29-37.
- TATENO, Y. *et al.*, 1997, "Evolutionary motif and its biological and structural significance." *J. Mol. Evol.*, 44 (Suppl): 38-43.
- THAXTON, C. B, *et al.*, 1984, *The Mystery of Life's Origin: Reassessing Current Theories*. New York: Philosophical Library.
- THEODORIDIS, G. C., ANNÉ, A., STARK, L., 1996, "On Evolutive Systems and the Initial Evolution of Structure and Function." *J. theor. Biol.*, 178: 61-88.
- TIMPANE, J., 1997, "Growing opportunities: European careers and graduate programs for Life Scientists." *Science*, 275: 690-696.
- TINOCO Jr, I., SAUER, K., WANG, J. C., 1995, *Physical Chemistry*, 3 ed. New Jersey, Prentice-Hall.

- TJIAN, R., 1995, "Molecular Machines That Control Genes." *Scientif. Amer.*, Feb 1995: 38-45.
- TÖLGYESI, F., ULRICH, B., FIDY, J., 1999, "Tryptophan phosphorescence signals characteristic changes in protein dynamics at physiological temperatures." *Biochim. Biophys. Acta*, 1435: 1-5.
- TOONE *et al.*, 1997, "Getting Started: Regulating the Initiation of DNA Replication in Yeast." *Annu. Ver. Microbiol.*, 51: 125-149.
- TORRES, R. D., NEGREIROS, J., MONDAINI, R., 1998, "Hidden Markov Models and their Applications to Protein Modelling" – Proceedings XXI CNMAC – Caxambu, MG. – 14 –18 setembro 1998.
- TRIBUTSCH, H., POHLMANN, L., 1995, "Synergetic molecular approaches towards artificial and photosynthetic water photoelectrolysis". *J. Electroanal. Chemistry*, 396: 53-61.
- TRIBUTSCH, H., POHLMANN, L., 1997, "Synergetic Mechanisms in Energy and Signal Transduction: Photo Oscillating Proton Transport in Bacteriorhodopsin". *J. theor. Biol.*, 178: 17-28.
- TRIBUTSCH, H., POHLMANN, L., 1998, "Electron Transfer: Classical Approaches and New Frontiers". *Science*, 279: 1891-1895.
- TSAL, C. J. *et al.*, 1999, "Folding funnels, binding funnels and protein function". *Protein Science*, 8: 1181-1190.
- TSODIKOV, O. V. *et al.*, 1998, "Quantitative Analysis of Multiple-Hit Footprinting Studies to Characterize DNA conformational Changes in Protein-DNA Complexes: Application to DNA Opening by E σ 70 RNA Polymerase". *J. Mol. Biol.*, 283: 757-769.
- TUSZYNSKI, J. A. *et al.*, 1995, "Ferroelectric behavior in microtubule dipole lattices: implications for information processing, signaling and assembly/disassembly". *J. Theor. Biol.*, 174: 371-380.
- TUSZYNSKI, J. A. *et al.*, 1997, "Selected physical issues in the structure and function of microtubules". *J. Struct. Biol.*, 118: 94-106.
- URRY, D. W., 1995, "Elastic Biomolecular Machines". *Sci. Amer.*, 272: 44-49.

- URRY, D. W., 1997, "Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers". *J. Phys. Chem.*, 101: 11007-11028.
- URRY, D. W., 1998, "Five Axioms for the Functional Design of Peptide-Based Polymers as Molecular Machines and Materials: Principle for Macromolecular Assemblies." *Biopolymers*, 47: 167-178.
- VALLEE, R. B., OKAMOTO, P. M., 1995, "The regulation of endocytosis: identifying dynamin's binding partners." *Trends Cell Biol.*, 5: 43-47.
- VOGEL, G., 1999, "Many Modes of Transport for an Embryo's Signals." *Science*, 285: 1003-1005.
- von HIPPEL, P. H., 1998, "An Integrated Model of the Transcription Complex in Elongation, Termination and Editing." *Science*, 281: 660-665.
- WEISS, S., 1999, "Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules". *Science*, 283: 1676-1683.
- WEST, G. B., BROWN, J. H., ENQUIST, B. J., 1999, "The Fourth Dimension of Life: Fractal Geometry and Allometric Scaling of Organisms". *Science*, 284, 1677-1679.
- WICKELGREN, I., 1995, "Protein Sculptors That Help Turn On Genes." *Science*, 270: 1587-1588.
- WILF, J., MINTON, A. P., 1981, "Evidence for Protein Self-association Induced by Excluded Volume Myoglobin in the Presence of Globular Proteins." *Biochim. Biophys. Acta*, 670: 316-322.
- WONG, K., GEIDUSCHEK, E. P., 1998, "Activator-Sigma Interaction: A Hydrophobic Segment Mediates the Interaction of a Sigma Family Promoter Recognition Protein with a Sliding Clamp Transcription Activator." *J. Mol. Biol.*, 284: 195-203.
- WUARIN, J. *et al.*, 1996, "Regulating S phase: CDKs, licencing and proteolysis." *Cell*, 85: 785-787.
- YAFFE, M. P., 1999. "The Machinery of Mitochondrial Inheritance and Behavior". *Science*, 283: 1493-1497.
- YAMADA, K. M., MIYAMOTO, S., 1995. "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." *Current Op. Cell Biol.*, 7: 681-689.

- YUAN, X. *et al.*, 1998, "Effects of proline *cis-trans* isomerization on TB domain secondary structure." *Protein Science*, 7: 2127-2135.
- YUH, C. H. *et al.*, 1998, "Genomic Cis-Regulatory Logic: Experimental and Computational Analysis of a Sea Urchin Gene." *Science*, 279: 1896-1902.
- ZAKIAN, V. A., 1995 "Telomeres: Beginning to Understand the End." *Science*, 270: 1601-1606.
- ZARE, R. N., 1998, "Laser Control of Chemical Reactions". *Science*, 279: 1875-1879.
- ZHANG, C.C., 1996, "Bacterial signaling involving eukariotic-type protein kinases." *Mol. Microbiol.*, 20: 9-15.
- ZLATANOVA, J. *et al.*, 1998, "Chromatin Fiber Structure: Morphology, Molecular Determinants, Structural Transitions." *Biophys. J.*, 74: 2554-2566.
- ZUKER, C. S., RANGANATHAN, R., 1999, "The Path to Specificity". *Science*, 283: 650-651.