National Award

Podcasts in Biochemistry and Molecular Biology

Podcasts em Bioquímica e Biologia Molecular

Régis M. Hözer¹, Cristiane Matté^{1*}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica

*e-mail: matte@ufrgs.br

Support: Pró-Reitoria de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROGRAD/UFRGS)

Abstract

Teaching Biochemistry and Molecular Biology represents a big challenge in the undergraduate courses. The topics are complex and integrate knowledge that will be essential for the development of several professional activities. In the classroom, we have a very heterogeneous audience, which may respond better to visual or auditory stimuli. In addition, we need to consider the universal access to information, considering the possibility of having visually impaired students. In this context, we developed a new teaching methodology through the creation and use of podcasts that deal with the content of Biochemistry and Molecular Biology. We selected the most complex subjects in Biochemistry and Molecular Biology, according to the students' performance in the tests to do the podcasts: synthesis and oxidation of fatty acids, nucleic acid metabolism and protein synthesis. We believe the development of podcasts can contribute effectively to the learning of Biochemistry and Molecular Biology.

Keywords: *Biochemistry; Molecular biology; Podcast.*

Resumo

O ensino de Bioquímica e Biologia Molecular representa um desafio nos cursos de graduação. O conteúdo é complexo e integra conhecimentos que serão essenciais para o desenvolvimento de diversas atividades profissionais. Em sala de aula possuímos um público bastante heterogêneo, que pode responder melhor a estímulos visuais ou auditivos. Ainda, precisamos considerar o acesso universal à informação, considerando a possibilidade de termos estudantes deficientes visuais. Nesse contexto, desenvolvemos uma nova metodologia de ensino por meio do desenvolvimento e utilização de áudios que versam sobre o conteúdo de Bioquímica e Biologia Molecular, os *podcast*. Selecionamos os temas mais complexos em Bioquímica e Biologia Molecular para o preparo dos *podcasts*: síntese e oxidação de ácidos graxos, metabolismo de ácidos nucleicos e síntese de proteínas. Acreditamos que o desenvolvimento de podcasts possa contribuir efetivamente para o aprendizado de Bioquímica e Biologia Molecular.

Palavras-chave: *Bioquímica; Biologia molecular; Podcast.*

Ficha da atividade

Título	Podcasts em Bioquímica e Biologia Molecular
Categoria:	Prêmio Nacional de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular “Bayardo Baptista Torres”: Materiais didáticos ou Prática de Ensino
Tipo de Material	Áudio
Público-alvo:	Estudantes cursando as disciplinas de Bioquímica e Biologia Molecular
Conteúdos abordados	Metabolismo de ácidos graxos, de ácidos nucleicos e de proteínas
Objetivos educacionais	Nosso principal objetivo pedagógico é melhorar o entendimento dos estudantes quanto aos tópicos em Bioquímica e Biologia Molecular que apresentam maior complexidade. Embora a utilização de podcasts no ensino superior não seja inédita, podcasts sobre Bioquímica e Biologia Molecular ainda são minoria absoluta e provavelmente aqueles que existem não consigam suprir as carências de diversos alunos, dado o grau de complexidade dos assuntos abordados. Além de que, certamente a produção desses conteúdos facilita o acesso dos estudantes ao estudo de Bioquímica e Biologia Molecular, já que o áudio pode ser acessado facilmente no celular, computador, tablet ou qualquer equipamento leitor de mp3, de forma gratuita e em qualquer lugar.
Duração estimada	O desenvolvimento de cada podcast leva em torno de um mês, considerando a definição do tema, estudo, criação e correção do roteiro, gravação do áudio e edição da versão final. Cada podcast tem duração de 10-15 minutos.
Materiais utilizados	Utilizaram-se livros de Bioquímica e Biologia molecular como referência para a construção de roteiros, os quais foram gravados em estúdio na forma de áudio.
Justificativa	A complexidade do metabolismo traz uma dificuldade intrínseca de aprendizado. O entendimento de todas as reações bioquímicas e das inter-relações metabólicas no organismo é bastante complexo, demandando diferentes formas de ensino. Muitos alunos relatam a dificuldade de compreensão de conceitos bioquímicos e de biologia molecular, mesmo com a utilização de recursos visuais como texto, imagens e vídeos. Sabemos que em sala de aula temos um público heterogêneo, com experiências e motivações diferenciadas. Essa heterogeneidade se reflete nas diversas experiências de aprendizado demonstradas pelos estudantes, considerando que estímulos que são úteis para um aluno nem sempre serão para os demais. Em adição, deficientes visuais também são uma realidade em sala de aula, e existe uma dificuldade em encontrar materiais de apoio para o estudo por esses estudantes. Atualmente têm se utilizado metodologias inovadoras de ensino, com o objetivo de incrementar o aprendizado e apresentar os conceitos teóricos de forma mais atual e dinâmica. Nesse contexto, acreditamos que o desenvolvimento de áudios (podcasts) utilizando o metabolismo como pano de fundo possa ser útil para ampliar o entendimento dos complexos conceitos de Bioquímica e Biologia Molecular por mais estudantes. Um dos pontos positivos dos áudios é o grande detalhamento do conteúdo, que deve ser maior do que em texto escrito em livro, por exemplo, que contém figuras que apoiam o estudo.
Link	http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/159411

1 Introdução

O ensino de bioquímica e biologia molecular na graduação tem apresentado inúmeros desafios em um ambiente cada vez mais tecnológico. O estudo de forma clássica em livros texto tem enfrentado a resistência por parte dos estudantes. Assim, os professores buscam alternativas que possam ser atrativas e complementem o estudo formal em livros texto. Nós optamos pelo desenvolvimento de áudios, também chamados de *podcasts*, como formas complementares de estudo.

A flexibilidade na utilização dos áudios, no momento e local em que o estudante desejar, podendo ser utilizados em computadores, mp3 *players* e celulares, e ouvidos nos mais diversos locais, quantas vezes forem necessárias, além da facilidade da disseminação e acesso aos arquivos; foi o que nos motivou a desenvolver os *podcasts*. Além disso, a inserção nas universidades de estudantes portadores de deficiência visual é uma realidade, e a utilização de *podcasts*, pode auxiliar nos estudos e integração desses estudantes à turma.

Quanto à efetividade do aprendizado, Evans mostrou que a utilização de *podcasts* por estudantes universitários foi considerada mais efetiva que a utilização de livros texto e que suas próprias anotações como forma de revisão de conteúdo antes das avaliações.

O mesmo estudo mostrou que os estudantes são mais receptivos à utilização de *podcasts* do que a leitura em livros textos. Apesar disso, não acreditamos que a utilização de *podcasts* possa substituir o estudo em livros texto, ainda mais na bioquímica e na biologia molecular.

O aprendizado nessas disciplinas está muito vinculado à ativação visual, por meio da interpretação de figuras e vias metabólicas, que são essenciais para a integração do conhecimento e a compreensão dos processos biológicos estudados nessas disciplinas.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver os roteiros, gravar e disponibilizar *podcasts* sobre alguns dos conteúdos mais complexos da bioquímica e da biologia molecular.

2 Apresentação do material ou prática de ensino

Nesse estudo, inicialmente selecionamos os conteúdos mais complexos ministrados na disciplina de Bioquímica II para o curso de farmácia da UFRGS: metabolismo de lipídios, de ácidos nucleicos e de proteínas.

Na sequência, criamos os roteiros a partir do conteúdo selecionado do livro texto “Princípios de Bioquímica de Lehninger”, que foram gravados e editados com o

apoio do Núcleo de Apoio Pedagógico à Educação à Distância (NAPEAD/UFRGS). Os áudios foram disponibilizados aos estudantes pela biblioteca central da UFRGS por meio do link <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/159411>.

3 Potencial Educacional

A utilização de Podcasts no ensino de bioquímica e biologia molecular é inovadora no Brasil. Em sala de aula possuímos um público bastante heterogêneo, com experiências de aprendizagem diferenciadas. Enquanto alguns estudantes dependem da escrita e dos estímulos visuais para o entendimento do conteúdo ministrado, outros são mais sensíveis aos estímulos auditivos. Além disso, a presença de deficientes visuais tem sido uma realidade constante em sala de aula. Atualmente, muitos estudantes gravam o conteúdo ministrado pelo professor durante a aula e relatam que ouvem os áudios no trajeto até o trabalho ou suas casas, a fim de consolidar o conhecimento adquirido em aula.

Nesse sentido, vislumbramos uma nova opção de ensino, por meio do desenvolvimento de roteiros para os tópicos mais desafiadores no ensino e gravação desses na forma de podcast. Esses áudios são disponibilizados aos estudantes, juntamente com os roteiros, a fim de estimular uma nova forma de estudar bioquímica e biologia molecular.

O acesso aos áudios é facilitado, pois pode ser inserido na *playlist* do celular, computador, tablete, ou qualquer dispositivo com leitor de mp3, e acessado durante os estudos formais, ou até mesmo durante a realização de exercício físico e no trajeto da aula para o trabalho ou casa.

4 Diferencial com os materiais/ atividade pré-existent

Quando comparados a livros didáticos, objetos educacionais virtuais, jogos e vídeos educativos, os podcast apresentam como principal diferencial a flexibilidade de uso e a forma de apresentação do conteúdo, que deve ser minuciosa e atrativa, para manter a atenção do ouvinte e explicar de forma detalhada o conteúdo pretendido. Um diferencial importante é o acesso do conteúdo de estudo a deficientes visuais. Não temos conhecimento de outros projetos que desenvolvam esse material para o ensino de bioquímica e biologia molecular para o ensino superior que vislumbre maior grau de complexidade e de forma gratuita, por isso também consideramos essa iniciativa inovadora no Brasil.

5 Procedimentos de uso ou aplicação

O acesso aos podcasts é facilitado, uma vez que, baixado para o celular ou outros leitores de mp3; é facilmente acessado, podendo ser compartilhado com outros dispositivos e ouvido quantas vezes for necessário. O acesso aos áudios pode ser realizado durante os estudos formais, ou até mesmo nos ambientes mais diversos, como academia de ginástica ou no trajeto entre a faculdade e o trabalho ou casa. Além disso, os podcasts são recursos de áudio, o que torna bastante acessível a deficientes visuais o estudo de bioquímica e biologia molecular, sendo um projeto pioneiro no Brasil, no que tange o nosso conhecimento. Juntamente aos podcasts, são disponibilizados aos estudantes os roteiros escritos, a fim de incrementar o aprendizado, e permitir o acesso visual aos deficientes auditivos.

5.1. Materiais/ procedimentos

Material	Descrição	Tipo do arquivo
Podcast: síntese de ácidos graxos	Áudio descrevendo o processo bioquímico de síntese de ácidos graxos saturados e insaturados	Áudio
Podcast: oxidação de ácidos graxos	Áudio descrevendo o processo bioquímico de β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos	Áudio
Podcast: replicação do DNA	Áudio descrevendo o processo bioquímico de replicação do DNA	Áudio
Podcast: transcrição e processamento do RNA	Áudio descrevendo os processos bioquímicos de transcrição e processamento do RNA mensageiro	Áudio
Podcast: síntese de proteínas	Áudio descrevendo o processo bioquímico de síntese de proteínas pelo ribossomo	Áudio

6 Considerações finais

O desenvolvimento e a divulgação de materiais alternativos para o ensino de bioquímica e biologia molecular certamente contribuirão para a melhora do desempenho dos estudantes de graduação atendendo a essas disciplinas. A facilidade de acesso e utilização de áudios, por estudantes regulares ou que apresentam deficiência visual, torna os podcasts uma excelente alternativa ao texto. Entretanto, cabe salientar que os podcasts não substituem a utilização de livros textos, repletos de complexos mapas metabólicos. A Bioquímica é uma disciplina visual, e requer a interpretação das vias metabólicas nos diferentes tipos celulares e situações metabólicas para uma compreensão adequada.

Apêndices

Os áudios estão sendo disponibilizados como apêndices, e os roteiros utilizados na gravação como anexos.

References

- [1] Campbell N, Eaton V, Barnett W, Shim JP, Urbaczewski A. Creative Uses of Podcasting in Education – Panel Discussion. JCSC. 2007;22(5):119-20.
- [2] Evans C. The effectiveness of m-learning in the form of podcast revision lectures in higher education. Computers & Education. 2008;50:491-8.
- [3] Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

Acknowledgments

Agradecemos à bolsa de monitoria concedida pelo Programa de Apoio Pedagógico (PAG), da Pró-Reitoria de Graduação da UFRGS, ao aluno de graduação Régis M. Hözer. Agradecemos à dedicação e apoio técnico do Núcleo de Apoio Pedagógico à Educação à Distância (NAPEAD), em especial à coordenadora Marlise Bock Santos, aos estagiários da área técnica de gravação e edição dos áudios, Douglas dos Santos de Aguiar e Daniel Molena Seraphim; e ao coordenador do Polo de Apoio Presencial de EaD de Porto Alegre, Edson Junior Lima de Oliveira.

Anexo 1. Síntese de ácidos graxos (roteiro para podcast)

Longas cadeias carbonadas são formadas a partir de uma sequência de quatro reações. Essa sequência de reações se repete até formar um ácido graxo de cadeia longa como, por exemplo, o ácido palmítico ou palmitato, um ácido graxo saturado contendo 16 carbonos. Tais reações são catalisadas por uma enzima chamada Ácido-graxo-sintase que se encontra no citosol das células, e ocorrem principalmente no fígado. Primeiramente precisamos entender que há um estado metabólico propício para a síntese de ácidos graxos. Neste caso, o estado alimentado, ou seja, quando há abundância de nutrientes, como a glicose, e energia ou ATP, em nosso organismo. O aumento de glicose sanguínea terá como resposta o aumento nos níveis de insulina, liberada pelas células β -pancreáticas, que dentre diversas funções está a de sinalizar para a síntese de ácidos graxos, que irão depositar-se em nossos adipócitos na forma de triglicerídeos.

A Ácido-graxo-sintase é um complexo enzimático que, em mamíferos, possui sete sítios ativos para reações distintas na formação de palmitato. Antes de a primeira reação iniciar, são necessários dois compostos, acetil-CoA e malonil-CoA. O acetil-CoA pode ser originário da oxidação de carboidratos, aminoácidos cetogênicos, e álcool. Uma vez produzido na mitocôndria, o acetil-CoA condensa com o oxaloacetato formando citrato, em uma reação catalisada pela citrato-sintase. O citrato é transportado para o citosol por um transportador específico na membrana mitocondrial interna. No citosol, o citrato regenera o acetil-CoA, que será utilizado para a síntese de ácidos graxos, correspondendo ao último e penúltimo carbonos. Os demais carbonos são provenientes de malonil-CoA. A enzima acetil-CoA-carboxilase é responsável pela síntese de malonil-CoA por meio da carboxilação do acetil-CoA, em uma reação dependente de ATP. Essa enzima é limitante na síntese de ácidos graxos, sendo regulada covalentemente por insulina, que ativa a enzima via desfosforilação, e glucagon e adrenalina, que inibem a enzima via fosforilação. A acetil-CoA-carboxilase também é regulada alostericamente, sendo ativada por citrato e inibida por palmitoil-CoA. A expressão gênica dessa e outras enzimas lipogênicas é ativada por ligantes do PPAR γ , tais como ácidos graxos poliinsaturados.

Uma vez que acetil-CoA e malonil-CoA estão em concentrações adequadas no citosol, a síntese de ácidos graxos é catalisada pela ácido-graxo-sintase. Primeiramente o composto Acetil-CoA irá perder seu grupamento CoA e ligar-se ao sítio ativo da ácido-graxo-sintase, conhecido como proteína carreadora de acil ou ACP, em uma reação catalisada pela malonil/acetil-CoA-ACP-transferase ou MAT. Em seguida, o acetil será transferido para o sítio conhecido como β -cetoacil-ACP-sintase ou KS. Na sequência, o composto Malonil-CoA perdendo a CoA, liga-se ao primeiro sítio, ACP. Após completado o carregamento da enzima, ocorre a ligação do malonil ao acetil, liberando uma molécula de CO_2 formando uma estrutura acetoacetil, que permanece ligada à ACP. Toda essa etapa é parte da primeira reação, intitulada de condensação, catalisada pela KS.

Na segunda etapa irá acontecer uma reação de redução do grupo acetoacetil, anteriormente formado. Agora o grupamento acetoacetil será reduzido pelo quarto sítio da enzima, conhecida como β -cetoacetil-ACP-redutase ou KR, onde o agente redutor será o NADPH, formando β -hidroxibutiril-ACP. Na terceira etapa, ocorre uma reação de desidratação que irá remover os elementos da água dos carbonos C2 e C3 do composto β -Hidroxibutiril-ACP anteriormente formado, esta reação é catalisada por um dos sítios ativos do complexo, chamada de β -hidroxiacil-ACP-desidratase ou DH, formando o composto trans- Δ^2 -butenoil-ACP.

A quarta e última etapa da primeira rodada na formação do palmitato é a redução da ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 do composto trans- Δ^2 -butenoil-ACP, formando butiril-ACP pela ação de outro sítio do complexo, chamado de enoil-ACP-redutase ou ER, onde o agente redutor novamente será o NADPH. Por fim forma-se um

composto com quatro carbonos, sendo dois carbonos provenientes de cada um dos compostos iniciais, o Acetil-CoA e Malonil-CoA. Para a formação de palmitato é necessário que as reações descritas anteriormente aconteçam novamente, o composto butiril é movido para a KS, liberando a ACP para a entrada de outro Malonil-CoA, que dará reinício as quatro reações que irão alongar a cadeia em mais dois carbonos, até formar o composto de dezesseis carbonos, o palmitato, que será clivado e liberado da ACP pela tioesterase ou TE.

O ácido palmítico pode ser estendido em 2 carbonos, formando ácido esteárico, por um sistema de alongamento presente no retículo endoplasmático e mitocôndria, onde o malonil-CoA é o doador dos 2 carbonos. A sequência de reações é similar a catalisada pela ácido-graxo-sintase.

Os ácidos graxos ainda podem ser dessaturados pela acil-graxo-CoA-dessaturase, uma oxidase de função mista do retículo endoplasmático liso, que transforma uma ligação simples, entre os carbonos 9 e 10, em dupla ligação; ao mesmo tempo que reduz uma molécula de oxigênio em duas de água, utilizando como força redutora o NADPH. Dessa forma, ácidos graxos saturados como o ácido palmítico e o esteárico, originam ácidos graxos monoinsaturados como o ácido palmitoleico, e o ácido oleico, respectivamente.

Aqui, conhecemos a síntese dos principais ácidos graxos sintetizados em células humanas.

Anexo 2. Oxidação de ácidos graxos (roteiro para podcast)

As células podem obter combustíveis de ácidos graxos de três fontes distintas: 1. por meio dos lipídeos consumidos na dieta, 2. via lipídeos que são sintetizados no fígado, que transforma o excesso de carboidratos, álcool e aminoácidos da dieta em ácidos graxos e posteriormente em triglicerídeos, os quais são transportados aos tecidos extra-hepáticos por lipoproteínas; e 3. por meio de triglicerídeos que são armazenados em células adiposas, na forma de gotículas lipídicas, e mobilizados em momentos de necessidade. Alguns estudos apontam que mais de 40% das necessidades energéticas dos humanos são supridas pelos triglicerídeos da dieta, onde os ácidos graxos fornecem mais da metade das necessidades energéticas de órgãos como o fígado, o coração e a musculatura esquelética quando em estado de repouso ou em exercício de baixa intensidade.

Os triglicerídeos ou triacilgliceróis são depositados nos adipócitos em forma de gotículas lipídicas envoltas por uma monocamada de proteínas que regula o acesso de lipases a seus substratos. Essas proteínas são chamadas de perilipinas. Os hormônios adrenalina, secretada pela glândula adrenal em resposta ao exercício físico ou como resposta de luta e fuga; e glucagon, secretado pelo pâncreas em resposta a baixos níveis de glicose, ativam uma enzima chamada adenilil-ciclase que está na membrana dos adipócitos. Essa enzima produz um segundo mensageiro intracelular, o AMP cíclico, que irá ativar uma proteína cinase dependente de AMP cíclico, também conhecida como PKA. A PKA fosforila a perilipina, que muda a sua conformação, permitindo o acesso das lipases à gotícula lipídica, e também fosforila a lipase-hormônio-sensível, que juntamente com outras duas lipases, irá hidrolisar as ligações éster dos triacilgliceróis, liberando 3 ácidos graxos livres e 1 molécula de glicerol. O glicerol é liberado no sangue e alcança o fígado ou os rins, onde será utilizado como substrato nas vias glicolítica ou gliconeogênica, dependendo do estado metabólico. Conforme a hidrólise vai acontecendo, os ácidos graxos livres são liberados e passam dos adipócitos ao sangue, onde irão ligar-se à albumina sérica, uma proteína abundante no plasma sanguíneo, que pode carregar até 10 ácidos graxos por monômero, transportando-os na corrente sanguínea até os tecidos alvos para seguirem na rota da β -oxidação.

Chegando aos tecidos alvos, tais como o fígado, o músculo esquelético e o coração, esses ácidos graxos livres se dissociam da albumina e são incorporados às células por transportadores na membrana plasmática das mesmas. No citosol, a enzima acil-CoA-graxo-sintetase irá catalisar uma reação que irá ligar uma Coenzima A ao ácido graxo, ativando-o. Nessa reação é gasto um ATP para produzir um acil-CoA-graxo, liberando AMP e pirofosfato, o qual é hidrolisado em 2 fosfatos inorgânicos. Esse ácido graxo ativado pode ser utilizado para a síntese de lipídeos complexos, quando as vias anabólicas estiverem ativadas, ou ser captado pela mitocôndria, onde será oxidado.

A β -oxidação acontece prioritariamente dentro da mitocôndria, já que as enzimas responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos estão especificamente localizadas na matriz mitocondrial ou ligadas à membrana mitocondrial interna. Embora ácidos graxos com cadeia de 12 carbonos não tenham a necessidade de um transportador para entrarem na mitocôndria, os ácidos graxos de 14 carbonos ou mais, que configuram a maioria dos ácidos graxos provenientes da dieta ou dos adipócitos, não conseguem passar diretamente pelas membranas mitocondriais. Essas cadeias carbonadas de 14 carbonos ou mais precisam passar primeiramente por três etapas do circuito da carnitina. Após completada a ativação, o acil-CoA-graxo será transesterificado com o grupamento hidroxil da carnitina, formando acil graxo-carnitina, em uma reação catalisada pela enzima carnitina-acil-transferase I ou CATI, presente na membrana externa ou no espaço intermembranas. O ácido graxo que se ligou à carnitina pode incorporar-se à matriz mitocondrial, por difusão facilitada por meio de um transportador acil-carnitina, localizado

na membrana mitocondrial interna. No terceiro e último passo do circuito da carnitina, o grupo acil-graxo é transferido enzimaticamente da carnitina para a coenzima A intramitocondrial pela enzima carnitina-acil-transferase II ou CATII, regenerando a acil-CoA-graxo. A carnitina liberada retorna ao espaço intermembranas pelo mesmo transportador acil-carnitina para que mais acil-CoA-graxo seja incorporado à matriz mitocondrial.

Agora que o ácido graxo se encontra na matriz mitocondrial iniciam-se de fato os processos de oxidação das cadeias carbônicas para a formação de coenzimas reduzidas, NADH.H^+ e FADH_2 , além de acetil-CoA. Os ácidos graxos sofrem a remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos de sua composição, na forma de acetil-CoA, começando pela extremidade carboxil. A oxidação tem quatro passos enzimáticos, que são repetidos até que todos os carbonos de um ácido graxo de cadeia par seja convertido em acetil-CoA. Primeiro, ocorre uma desidrogenação do acil-graxo-CoA, resultando em uma ligação dupla entre os átomos de carbono α e β (também chamados de carbonos 2 e 3), em uma reação catalisada pela enzima acil-CoA desidrogenase, produzindo o $\text{trans-}\Delta^2\text{-enoil-CoA}$. Nessa reação ocorre a redução de uma molécula de FAD a FADH_2 . Na reação 2, o $\text{trans-}\Delta^2\text{-enoil-CoA}$ passa pela ação da enzima enoil-CoA-hidratase, adicionando uma molécula de água à ligação dupla para formar $\text{L-}\beta\text{-hidroxiacil-CoA}$. No terceiro passo, o $\text{L-}\beta\text{-hidroxiacil-CoA}$ será desidrogenado pela enzima $\beta\text{-hidroxiacil-CoA}$ -desidrogenase, produzindo $\beta\text{-cetoacil-CoA}$, concomitantemente à redução de uma molécula de NAD^+ a NADH.H^+ . O quarto e último passo da β -oxidação que irá encurtar a cadeia em 2 carbonos é catalisado pela acil-CoA-acetiltransferase ou tiolase, que irá transferir uma coenzima A livre ao $\beta\text{-cetoacil-CoA}$ anteriormente produzido, liberando um fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo original na forma de acetil-CoA. As coenzimas reduzidas serão reoxidadas pelo sistema transportador de elétrons mitocondrial, produzindo ATP na fosforilação oxidativa. 1 molécula de NADH.H^+ gera 2,5 moléculas de ATP, enquanto 1 molécula de FADH_2 gera 1,5 ATPs. O acetil-CoA pode ser utilizado no ciclo de Krebs, nos tecidos extra-hepáticos, ou na via cetogênica para a síntese de corpos cetônicos, no fígado. O saldo energético final é diretamente dependente do tamanho da cadeia carbonada do ácido graxo, quanto maior a cadeia carbonada, maior o número de ATPs produzidos a partir de NADH.H^+ , FADH_2 e acetil-CoA, que também produzirá GTP, mais NADH.H^+ e FADH_2 no ciclo de Krebs.

A oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar irá requerer reações adicionais para realizar sua oxidação completa. Os ácidos graxos de cadeia ímpar são oxidados na mesma via dos ácidos graxos de cadeia par, começando pela extremidade carboxil da cadeia. A diferença está no momento da última passagem pela sequência de reações da β -oxidação, requerendo três enzimas adicionais. Na última passagem pela via, os produtos finais da oxidação de um ácido graxo de cadeia ímpar serão uma molécula de acetil-CoA e uma de propionil-CoA, que contém 3 carbonos. O propionil-CoA será carboxilado para formar $\text{D-metilmalonil-CoA}$, por ação da enzima propionil-CoA-carboxilase. O $\text{D-metilmalonil-CoA}$ precisa sofrer isomerização, por ação da enzima metilmalonil-CoA-epimerase, produzindo seu estereoisômero L, ou seja, $\text{L-metilmalonil-CoA}$. O $\text{L-metilmalonil-CoA}$ sofrerá um rearranjo intramolecular formando succinil-CoA através da ação da enzima metil-malonil-CoA-mutase. O succinil-CoA formado tem como destino o ciclo de Krebs.

Para a oxidação de ácidos graxos insaturados, ou seja, os que contém uma ou mais ligações duplas entre carbonos, são necessárias reações adicionais. Ácidos graxos insaturados são encontrados nos triglicerídeos e fosfolípidos de animais e vegetais, sendo caracterizados como monoinsaturados, quando contém uma ligação dupla, ou poliinsaturados, com duas ou mais ligações duplas. Essas ligações duplas encontram-se na posição *cis*, o que impede a ação da enzima enoil-CoA-hidratase, que adiciona água

às ligações duplas do tipo trans no segundo passo da β -oxidação. As ligações duplas cis devem ser transformadas em trans e para isso a via necessitará de enzimas auxiliares. Para os monoinsaturados a enzima $\Delta^3,2$ -enoi-CoA-isomerase irá reposicionar a ligação dupla cis em um isômero trans, que é o intermediário normal na β -oxidação. Já para os ácidos graxos poliinsaturados, além da $\Delta^3,2$ -enoi-CoA-isomerase é necessária a enzima 2,4-dienoi-CoA-redutase, a qual atua em ligações duplas conjugadas, convertendo uma das ligações duplas em simples e reposicionando a outra ligação dupla na configuração trans-3. Por fim, a enzima enoi-CoA-isomerase transfere a ligação dupla trans do carbono 3 para o carbono 2, originando o intermediário trans-2, que segue normalmente a via da β -oxidação.

Os hormônios adrenalina e glucagon tem um papel fundamental na sinalização para recrutamento de ácidos graxos, estimulando a lipólise no tecido adiposo. Assim como na síntese de ácidos graxos, há um momento metabólico propício para que aconteça a oxidação dos mesmos, impedindo que síntese e degradação ocorram concomitantemente na mesma célula. A regulação coordenada da síntese e degradação de ácidos graxos é centrada na modulação da atividade da acetil-CoA-carboxilase. Quando estamos em estado alimentado os níveis de glicose estão aumentados na corrente sanguínea, fazendo com que haja liberação de insulina pelo pâncreas. A insulina irá ativar a enzima acetil-CoA-carboxilase via desfosforilação. A enzima acetil-CoA-carboxilase catalisa a reação que transforma acetil-CoA em Malonil-CoA, que é o substrato para a síntese de ácidos graxos, indicando um alto estado energético celular. Nessa situação metabólica, a oxidação de ácidos não é requerida. O Malonil-CoA irá inibir a atividade da carnitina-aciltransferase I, impedindo a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, interrompendo a oxidação dos mesmos. Por outro lado, em situações de jejum, sinalizadas pelo glucagon, ou necessidade aumentada por exercício, sinalizada pela adrenalina, ocorre a fosforilação da acetil-CoA-carboxilase, o que inibe a enzima, reduzindo a síntese de malonil-CoA, e consequentemente reduzindo o efeito inibidor sobre a carnitina-aciltransferase I. Nessa situação, os ácidos graxos são transportados para a mitocôndria e oxidados. Um alto estado energético, indicado por aumento na razão $[NADH]/[NAD]$ e $[acetil-CoA]/[CoA]$, inibe as enzimas da via oxidativa, β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e tiolase, respectivamente. E, por fim, a ativação do $PPAR\alpha$ por medicamentos, como os fibratos, e ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico, estimulam a expressão gênica das enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos.

Anexo 3. Replicação do DNA (roteiro para podcast)

Para falarmos sobre a replicação do ácido desoxirribonucleico, ou DNA, primeiramente devemos lembrar algumas questões básicas sobre o mesmo, como sua localização celular, estrutura e função. A maior parte do DNA eucariótico está localizada no núcleo celular, onde fica altamente compactado e ligado a várias proteínas, dentre essas as histonas, as quais organizam a cromatina em nucleossomos e níveis maiores de compactação, até a forma de cromossomos. O ser humano possui 22 pares de cromossomos mais 2 cromossomos sexuais, ou seja, 46 cromossomos, que são herdados de nossos pais. As mitocôndrias também possuem DNA, mas a estrutura é bastante diferenciada, sendo uma dupla fita circular, muito similar a estrutura do DNA bacteriano. O DNA mitocondrial é herdado exclusivamente de forma materna. O DNA é uma macromolécula formada por duas longas cadeias de nucleotídeos, pareadas de forma antiparalela, formando uma hélice no sentido da mão direita. Cada nucleotídeo é composto por um açúcar, a desoxirribose, cujo carbono 5' está ligado a um grupamento fosfato, o qual forma a ligação fosfodiéster com o próximo nucleotídeo da cadeia, por meio da ligação ao carbono 3' da próxima desoxirribose. Completando a estrutura dos nucleotídeos, cada desoxirribose também está ligada a uma base nitrogenada, por meio de uma ligação β -glicosídica. As bases nitrogenadas presentes no DNA são as purinas, adenina e guanina, e as pirimidinas, citosina e timina. O pareamento da dupla hélice consiste de 2 ligações de hidrogênio entre adenina e timina, e 3 ligações de hidrogênio entre citosina e guanina. O DNA atua como um repositório de informação genética, codificando a estrutura primária de todos os RNAs, e conseqüentemente das proteínas celulares, afetando indiretamente a síntese de todos os outros constituintes de nossas células e o seu metabolismo.

A síntese de DNA em células eucariontes acontece em um momento específico de uma série de fases do ciclo celular, quando uma célula precisa se dividir, produzindo células filhas. Antes da divisão celular acontecer, a célula necessita duplicar seu material genético e para isso passa por um ciclo de quatro fases denominado ciclo celular. As quatro fases deste ciclo são: a fase G1, onde a célula está metabolicamente mais ativa e em crescimento, sintetizando RNA e proteínas; a fase S, onde especificamente acontece a replicação do DNA e conseqüentemente, a duplicação dos cromossomos, a fase G2, em que a célula se prepara para a divisão; e a fase M, em que a célula realiza a divisão propriamente dita.

A replicação do DNA é chamada de semiconservativa, ou seja, cada uma das fitas do DNA servirá como um molde para as novas fitas que serão sintetizadas. Isso acontece, pois as enzimas que sintetizam uma nova fita usam as antigas como molde, resultando que, uma nova molécula de DNA produzida conterá uma fita antiga, que serviu como molde, e uma nova fita. A síntese da nova fita de DNA obedece às regras de pareamento descobertas por Watson e Crick em 1953, onde adenilato pareia com timidilato, e citidilato pareia com guanilato. Dessa forma, garantimos a constância da transferência da informação gênica.

O processo de replicação do DNA se dá em 3 fases: iniciação, alongamento e terminação.

A primeira fase é denominada iniciação, onde uma série de proteínas e enzimas são responsáveis pela abertura e separação das fitas moldes do dúplice de DNA. A replicação do DNA sempre inicia na origem de replicação, uma região rica em pareamentos AT, que é reconhecida pelo complexo de reconhecimento da origem, o qual contém uma helicase responsável pela desnaturação do dúplice de DNA, formando uma forquilha de replicação bidirecional. Em cromossomos eucariotos existem muitas origens, a fim de acelerar o processo de replicação; enquanto que no cromossomo mitocondrial só existe uma origem de replicação. A abertura das fitas no dúplice de DNA causa um

estresse ao longo da estrutura em hélice do DNA, que é aliviado pela ação das topoisomerases. Outra proteína acessória é a proteína de ligação à fita simples, ou SSB, responsável pela estabilização da fita simples de DNA após a ação desnaturante da helicase.

A segunda fase da replicação é o alongamento. Para que a replicação se inicie é necessária uma fita molde e um iniciador complementar ao molde, o qual contém de 10 a 60 ribonucleotídeos e fornece uma extremidade 3' livre para a adição de desoxirribonucleotídeos pela DNA-polimerase. Esse iniciador é um pequeno oligonucleotídeo de RNA sintetizado por uma enzima chamada iniciase, primase ou DNA-polimerase α , a qual atua na síntese dos iniciadores na fita atrasada em eucariotos. A síntese de uma nova fita de DNA acontece no sentido 5' para 3', por meio da formação sucessiva de ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que estão sendo adicionados à extremidade 3' da fita nascente, pela enzima DNA-polimerase. A síntese do DNA utiliza desoxirribonucleotídeos trifosfatados como substrato, adicionando desoxirribonucleotídeos monofosfatados à fita em crescimento, por meio da hidrólise de um grupo pirofosfato. O pirofosfato livre é hidrolisado posteriormente pela pirofosfatase, o que contribui energeticamente para que a reação de adição de nucleotídeos seja exergônica. Considerando que as 2 fitas do dúplex de DNA devem ter sentido antiparalelo, a fita que está sendo sintetizada cresce no sentido 5' para 3', enquanto que a fita molde está sendo lida no sentido 3' para 5'. Apenas 1 enzima DNA-polimerase sintetiza as duas fitas do dúplex em uma mesma forquilha de replicação, carregando as fitas molde ao sítio ativo por meio de um grampo β deslizante. A fita molde que está sendo lida no sentido 3' para 5', está sendo pareada com a fita nascente que é sintetizada de maneira contínua, chamada de fita líder; enquanto a fita descontínua ou atrasada é sintetizada em fragmentos, chamados de fragmentos de Okazaki, onde a fita molde é carregada no sítio ativo da enzima após a formação de uma alça, garantindo a leitura da fita molde no sentido 3' para 5'. Cada fragmento de Okazaki contém um iniciador, que fornece a extremidade 3' para a adição dos nucleotídeos pela DNA-polimerase. Ao final da síntese de um fragmento, a enzima libera o dúplex, e um novo grampo β é carregado pela enzima onde existe um novo iniciador já pareado à fita molde, reiniciando a síntese de um novo fragmento. Dessa forma, a síntese da fita contínua ou líder se dá no mesmo sentido da forquilha de replicação, enquanto a fita descontínua ou atrasada se dá no sentido oposto à forquilha. A DNA-polimerase responsável pela síntese em eucariotos é a α , a qual possui atividade de edição 3' para 5', o que aumenta a fidelidade da duplicação do DNA.

Como citado anteriormente, os iniciadores são oligonucleotídeos de RNA, e assim que os fragmentos de Okazaki são completados, esses iniciadores precisam ser trocados por DNA. Quem realiza essa troca é a DNA-polimerase ϵ , que substitui o iniciador por desoxirribonucleotídeos. Ao final desse processo resta um corte, que é selado pela enzima DNA-ligase, catalisando a formação de uma ligação fosfodiéster entre um hidroxil ligado ao carbono 3' de um nucleotídeo e o fosfato ligado ao carbono 5' do nucleotídeo em sequência.

A terceira etapa da replicação é a Terminação.

Em DNAs circulares, ocorre o encontro das 2 forquilhas de replicação, e a resolução do DNA catenano entrelaçado por uma topoisomerase do tipo II, que é capaz de clivar as 2 fitas do dúplex, e religar as fitas segregando os 2 cromossomos filhos.

Em DNAs eucarióticos nucleares a terminação da replicação requer a atividade da enzima telomerase, que atua em células tronco, a fim de garantir a extensão dos cromossomos com DNA repetitivo, impedindo o encurtamento dos cromossomos a cada replicação. O encurtamento ocorreria na extremidade 3' do dúplex, já que seria impossível substituir o iniciador por inexistência de uma extremidade 3' para adição de nucleotídeos.

pela DNA-polimerase. A telomerase contém em sua estrutura uma sequência repetitiva de 150 nucleotídeos contendo as bases adenina e citosina, que serve como molde para a síntese de DNA e extensão da extremidade 3' do cromossomo. Após a extensão, a iniciase sintetiza o iniciador e a DNA-polimerase alonga a fita complementar. O iniciador é removido por uma RNase e a extremidade do telômero é protegida por proteínas de ligação a repetições do telômero.

A regulação da replicação ocorre na fase da iniciação, e uma vez iniciada a replicação, todo o DNA é copiado, resultando em 2 cópias idênticas. Ao final, o ciclo celular continua, a fim de dar sequência à divisão celular.

Anexo 4. Transcrição e processamento do RNA (roteiro para podcast)

O RNA, ou ácido ribonucleico, tem uma estrutura semelhante ao DNA, sendo composto por nucleotídeos. Cada nucleotídeo possui em sua estrutura química uma base nitrogenada ligada por meio de uma ligação β -glicosídica a um açúcar, a ribose; cujo carbono 5' está ligado a um grupamento fosfato, formando a ligação fosfodiéster com o próximo nucleotídeo, por meio do carbono 3' da ribose. O RNA difere da molécula de DNA em suas bases nitrogenadas, sendo as purinas: Adenina e Guanina, e as pirimidinas: Citosina e Uracila. Em geral, Uracila é específica do RNA e Timina do DNA, mas ambas podem ser encontradas tanto no DNA quanto no RNA, embora isso raramente aconteça.

O RNA possui diversas funções, e muitas classes são encontradas nas células. Os RNAs mensageiros são intermediários que carregam a informação genética contida no DNA para servir de molde na síntese de proteínas. Os RNAs ribossômicos compõem uma ribozima chamada ribossomo, onde ocorre a síntese de proteínas. Os RNAs transportadores são responsáveis pelo transporte de aminoácidos até o ribossomo, onde um anti-códon presente em sua estrutura liga-se a um códon complementar no RNA mensageiro, garantindo a inserção do aminoácido correto na sequência correta para a síntese de proteínas. Além desses, um grande número de RNAs não se enquadram nessas três categorias clássicas, desempenhando funções no processamento de outros RNAs, bem como funções regulatórias no processo de tradução de proteínas.

As células eucariontes possuem três tipos de RNA-polimerases, as enzimas responsáveis pela transcrição, que utilizam como cofatores magnésio e zinco divalentes. A RNA-polimerase I é responsável pela transcrição de pré-RNA ribossômico, a RNA-polimerase II sintetiza RNA mensageiro e pequenos RNAs especializados, e a RNA-polimerase III é responsável pela transcrição de RNAs transportadores, RNA ribossômico 5S e pequenos RNAs especializados.

O processo de transcrição ou síntese de RNA se dá a partir de um segmento específico da fita de DNA, que contém um gene com informação necessária para produzir um RNA ou uma proteína específica. Assim como na replicação do DNA, a síntese de RNA é dividida em fases: iniciação, alongamento e terminação.

A iniciação da síntese de um RNA mensageiro se dá a partir da ligação da enzima RNA-polimerase II ao DNA, o que necessita de outras proteínas, chamadas de fatores de transcrição. Existem diversos fatores de transcrição e os mesmos se ligam a regiões específicas do DNA, chamadas de promotores, dando um ponto de início para a transcrição, indicando onde a RNA-polimerase deve ligar-se para formar um complexo de transcrição ativo. A ligação da RNA-polimerase e dos fatores de transcrição em um promotor iniciam quando a proteína de ligação ao TATA box, também conhecida como TBP, se liga a uma região no DNA rica em nucleotídeos Timina e Adenina, que se encontra em um ponto 30 pares de base antes da região de início da transcrição, sendo denominada, por convenção, como região -30, enquanto a região de início da transcrição é denominada de +1. No entanto, até que a RNA-polimerase consiga ligar-se à fita de DNA, diversos fatores de transcrição estão envolvidos no processo e auxiliam a proteína de ligação, TBP. Eles são denominados fatores gerais de transcrição, também conhecidos como TFII, atuando como recrutadores da RNA-polimerase II ao local correto de ligação no DNA, formando um complexo fechado. Um desses fatores de transcrição, o TFIIH, possui atividade de helicase, desnaturando a fita de DNA e permitindo o acesso da RNA-polimerase ao sítio de início da síntese do RNA, formando o complexo aberto. Outra importante função do TFIIH é a fosforilação do domínio C terminal ou CTD da RNA-polimerase II, o que torna essa enzima ativa e permite a desobstrução do promotor, fazendo, então, com que esse complexo seja ativado e seja iniciada a fase de alongamento. Nesse momento, os fatores de transcrição são desligados, exceto o TFIIIF, que garante a associação da RNA-polimerase à sequência específica do DNA. Ainda,

novos fatores de alongamento ligam-se ao complexo e passam a regular a transcrição, potencializando a atividade da enzima.

O mecanismo bioquímico do alongamento acontece de forma similar ao da replicação do DNA, adicionando, nesse caso, ribonucleotídeos que formam a fita de RNA. A transcrição não necessita de um iniciador, já que a RNA-polimerase pode iniciar uma nova fita de RNA sem uma extremidade 3' inicial. A RNA-polimerase necessita de uma fita molde de DNA, onde será pareada a nova fita de RNA que está sendo sintetizada no sentido 5' para 3'. A fita de DNA complementar à fita molde é denominada fita codificadora, pois possui sequência de nucleotídeos idêntica ao RNA, exceto pela troca de T por U. A fita codificadora não participa da transcrição do RNA. Os nucleotídeos substratos na transcrição do RNA são ATP, GTP, UTP e CTP. Cada nucleotídeo que alonga a fita de RNA é inserido pela RNA-polimerase em uma extremidade 3' da fita nascente, formando uma nova ligação fosfodiéster, por meio do ataque nucleofílico da hidroxila 3' ao fosfato α do novo nucleotídeo, liberando um grupo pirofosfato. A pirofosfatase irá hidrolisar esse pirofosfato, o que garante energia para que o processo seja exergônico. O híbrido DNA molde e RNA, que em geral fica pareado por 8 bases, segue regras de pareamento similares ao DNA, onde Citosina pareia com Guanina, e Adenina com Uracila.

Ao final da transcrição do gene específico, a RNA-polimerase é desfosforilada e reciclada para um novo ciclo, com o auxílio de fatores de terminação. O RNA é liberado e translocado para o citosol onde exercerá sua função.

Logo após o início da fase de alongamento da cadeia, inicia-se o processamento do RNA. No caso do RNA mensageiro, é adicionado um "quepe" na extremidade 5', por um complexo enzimático associado ao domínio C terminal da RNA-polimerase II. Esse quepe consiste de um resíduo de 7-metilguanossina, que tem a função de proteger o RNA mensageiro de ribonucleases e também auxiliar na ligação desse RNA ao ribossomo no processo de tradução.

O RNA mensageiro sintetizado é composto por regiões que darão origem à proteína, chamadas de éxons, e outras regiões não-codificantes, chamadas de íntrons. Os íntrons são removidos por um processo chamado splicing, que ocorre ainda durante a síntese do RNA. Existem quatro classes de íntrons, sendo os tipos I e II autoprocessantes, ou seja, o processamento e retirada do íntron não depende de nenhuma estrutura catalítica externa. A terceira classe de íntrons e também a maior delas, ocorre nos RNAs mensageiros, os quais são processados por um complexo de pequenos RNAs nucleares que compõe o spliceossomo, o qual contém ribonucleoproteínas que fazem a identificação de áreas específicas de cada íntron onde ocorrerá o splicing, que depende de ATP.

Terminando a síntese da fita de RNA mensageiro, sua extremidade 3' possui um conjunto de 80 a 250 resíduos de Adenina, compondo o que chamamos de cauda poli A. Essa cauda tem a função de servir como sítio de ligação para proteínas específicas e, provavelmente tem a função de proteger o RNA mensageiro da destruição enzimática, assim como o quepe no terminal 5'. A cauda poli A é adicionada em um processo com diversos passos, incluindo a extensão do transcrito além do ponto onde será adicionada a cauda poli A, a clivagem da extremidade 3' por uma endonuclease associada ao domínio C terminal da RNA-polimerase II e a adição dos resíduos de adenilato por uma enzima poliadenilato-polimerase.

Utilizamos a síntese de um RNA mensageiro como exemplo, porém, o processo de transcrição produz todos os diferentes tipos de RNA que comentamos no início desse podcast. O processo de transcrição e processamento são variáveis para cada um dos tipos, possuindo similaridades e diferenças relevantes.

Anexo 5. Síntese de proteínas (roteiro para podcast)

A síntese de proteínas, ou tradução, é um dos processos celulares mais importantes e complexos do anabolismo. As proteínas são o produto final da maioria das vias de informação, sendo necessárias para diversas funções celulares, tais como manutenção da forma celular, sinalização e catálise. A síntese de proteínas é um processo altamente regulado, onde proteínas são produzidas para suprir as necessidades da célula em determinados momentos metabólicos e também degradada quando não é mais necessária ou for danificada. A tradução se dá nos ribossomos localizados nas mitocôndrias e no citoplasma da célula, utilizando como base a informação contida no RNA mensageiro, que foi transcrito a partir do DNA.

Para começarmos a falar sobre a síntese de proteínas, precisamos saber o que são os códons. Os RNAs mensageiros, que são produto da fase de transcrição do RNA, possuem uma sequência de nucleotídeos ligados uns aos outros por meio de ligações fosfodiéster. Os códons são triplêtes ou conjuntos de 3 nucleotídeos contidos na estrutura do RNA mensageiro. Durante a síntese das proteínas, os códons são lidos sequencialmente, e cada triplête corresponde a um aminoácido específico que deve ser adicionado a uma cadeia polipeptídica que está em formação. Cada códon especifica um dos 20 aminoácidos, que pode ser identificado pelo código genético; o qual associa uma combinação de 4 letras de nucleotídeos (G A U C) de 3 em 3. Existem, portanto, 64 códons ao total, sendo 61 códons codificadores de aminoácidos, incluindo um códon de iniciação; e mais 3 códons de parada. Por outro lado, um mesmo aminoácido pode ser codificado por diferentes códons, como por exemplo, os códons UCC e UCU que codificam a Serina. Isso acontece com diversos aminoácidos, como a Leucina, que é codificada por seis códons diferentes ou a Valina, codificada por quatro. Essa propriedade é chamada de redundância ou degeneração do código genético. Uma vez que se inicia a tradução, os códons são lidos de forma sequencial no sentido 5' para 3' até o aparecimento de um códon de parada.

Tendo em vista o que são os códons, podemos começar a falar sobre a síntese propriamente dita. Assim como na replicação do DNA, e na transcrição do RNA, a síntese de proteínas acontece em estágios. Para ser mais específico, a síntese acontece em cinco estágios, o primeiro estágio é anterior à síntese, onde ocorre a ativação dos aminoácidos, seguido pelos estágios de iniciação, alongamento e terminação; bem como o quinto, e último, onde ocorrem as modificações pós-traducionais.

Além de um RNA mensageiro, que contém a informação gênica necessária para orientar a sequência de aminoácidos da proteína, são necessários também diversos RNAs transportadores. Cada RNA transportador possui uma característica estrutural própria e irá ligar-se a um aminoácido específico. Os RNAs transportadores são fitas únicas e possuem uma conformação em forma de trevo de quatro folhas, onde dois de seus quatro braços são cruciais para desempenhar sua função na síntese de proteínas. Um dos braços é chamado de braço do aminoácido, contendo a extremidade 3' onde o aminoácido específico é ligado. O outro braço é conhecido como o braço do anti-códon, que irá reconhecer e parear de forma antiparalela com o códon da fita de RNA mensageiro. Esse pareamento ocorre no ribossomo, que possui estrutura para unir as moléculas que participam da tradução, bem como atividade de peptidiltransferase, responsável pela formação da ligação peptídica entre os aminoácidos.

A primeira etapa, que denominamos de etapa de ativação dos aminoácidos, ocorre no citosol. Para ligar os aminoácidos corretos aos seus respectivos RNAs transportadores, um grupo de enzimas denominadas de aminoacil-t-RNA-sintetases esterificam cada um dos 20 aminoácidos aos seus respectivos RNAs transportadores. Assim como os RNAs transportadores, as enzimas que fazem suas ligações são específicas para cada aminoácido, em uma reação que utiliza ATP como substrato

energético, formando uma ligação éster entre a hidroxila 3' do adenilato que compõe a trinca CCA e o grupo α -carboxílico do aminoácido. O produto dessa reação é um aminoacil-tRNA. Esse processo é necessário, pois ativa o aminoácido respectivo para a formação da ligação peptídica posteriormente. O reconhecimento do aminoácido específico pela enzima aminoacil-t-RNA-sintetase, chamado de segundo código genético, vai garantir o posicionamento correto do aminoácido na cadeia polipeptídica que está sendo formada, desde que o pareamento códon-anti-códon esteja correto.

O seguinte passo, a fase de iniciação da síntese de uma nova proteína se dá nos ribossomos e necessita de um RNA mensageiro, contendo a sequência de códons para a produção da nova cadeia polipeptídica, e o RNA transportador iniciador, que sempre carrega uma metionina em eucariotos, codificada pelo códon AUG. Logo, o primeiro aminoácido na extremidade N terminal da cadeia nascente é sempre uma metionina, a qual será retirada em muitos casos nas modificações pós-traducionais. As metioninas inseridas no interior do polipeptídeo serão carregadas por outro tRNA, diferente do iniciador. Esse passo inicial ocorre em três etapas. Primeiramente, um conjunto de proteínas denominadas fatores de iniciação eucarióticos ligam-se à subunidade 40S do ribossomo impedindo a associação precoce da subunidade 60S. O tRNA iniciador carregado com metionina é direcionado ao sítio de ligação no ribossomo 40S, o sítio peptidil, com auxílio de um fator de iniciação e com gasto de GTP. Em seguida, o mRNA é direcionado para o ribossomo 40S, pareando o códon AUG com o anti-códon do t-RNA iniciador. Nesse momento, a maior parte dos fatores de iniciação são desligados da subunidade 40S, permitindo a associação da subunidade 60S, formando o complexo de iniciação. Um desses fatores de iniciação continua ligado, o eIF4F, o qual liga as extremidades 3' e 5' do RNA mensageiro, formando uma estrutura circular; além de possuir uma importante atividade de helicase que elimina estruturas secundárias que poderiam interferir na tradução.

A próxima fase consiste no alongamento da cadeia polipeptídica, por adição dos aminoácidos na sequência determinada pelos códons do RNA mensageiro, lido na direção 5' para 3'. A adição de novos aminoácidos ao peptídeo nascente se dá no sentido N para C terminal e requer, além dos aminoácidos ativados descritos anteriormente, um conjunto de três proteínas citosólicas chamadas de fatores de alongamento eEF1 α , eEF1 $\beta\gamma$ e eEF2. As células realizam três etapas para a adição de cada resíduo de aminoácido na cadeia polipeptídica crescente, e essas etapas são repetidas ao número de vezes necessárias para adicionar todos os aminoácidos que compõe o polipeptídeo. Os ribossomos de células eucarióticas possuem dois sítios que permitem a ligação de RNAs transportadores, sendo eles os sítios A (aminoacil) e P (peptidil). Os aminoacil-RNA transportadores são ligados ao sítio A, com exceção do iniciador, o qual é ligado diretamente ao sítio P. Após a ligação do primeiro aminoacil-RNA transportador ao sítio P, o segundo aminoacil-RNA transportador é ligado ao fator de alongamento eEF1 α , que contém GTP e o direcionará ao sítio A. Imediatamente, ocorre a revisão do pareamento códon-anti-códon no ribossomo, e o fator de alongamento é liberado, hidrolisando o GTP, liberando GDP mais Pi (fosfato inorgânico). O eEF1 α é reciclado pelo eEF1 $\beta\gamma$, o qual liga uma nova molécula de GTP, preparando-o para um novo ciclo de atividade. Na segunda fase do alongamento, com o sítio P e A preenchidos por seus respectivos aminoacil-RNA transportadores, é formada uma ligação peptídica entre ambos. O grupamento α -amino do aminoácido no sítio A atua como um nucleófilo e ataca o carbono do grupo carboxil do aminoacil-RNA transportador iniciador ligado ao sítio P, ocorrendo a formação da ligação peptídica, via catálise realizada pela ribozima 23S que compõe o ribossomo. Nesse momento, o tRNA no sítio P está descarregado, e o tRNA no sítio A está carregado com o peptídeo nascente. O terceiro passo do alongamento é a translocação do ribossomo, onde o mesmo irá mover-se um códon em direção à extremidade 3' do RNA mensageiro,

o que move os RNA-transportadores ligados aos sítios P e A. Em outras palavras, o movimento do ribossomo na direção 3' move o dipeptidil-RNA transportador do sítio A para o sítio P, e o RNA-transportador descarregado que estava no sítio P é liberado do ribossomo, liberando o sítio A para a entrada de um novo aminoacil-RNA transportador. Esse movimento do ribossomo ao longo do RNA mensageiro requer o eEF2, conhecido como translocase, que utiliza a energia fornecida pela hidrólise de um GTP. Após essa translocação, o complexo está pronto para receber o terceiro aminoácido, repetindo o ciclo anteriormente explicado. A adição de cada novo aminoácido à cadeia crescente utiliza duas moléculas de GTP como substrato energético, hidrolisados a GDP mais Pi (fosfato inorgânico). Também é interessante ressaltar que o RNA transportador do último aminoácido inserido na cadeia crescente continua ligado ao RNA mensageiro e ao polipeptídeo que está sendo formado no ribossomo, constituindo numa ligação funcional entre o códon do RNA mensageiro e o aminoácido adicionado, o que auxilia também nos processos subsequentes de ligação de novos aminoácidos.

A quarta etapa da síntese de proteínas é a terminação. A síntese continua até que o ribossomo adicione o último aminoácido que está codificado no RNA mensageiro, até a detecção de um códon específico que tem a função de sinalizar o fim do processo. São eles: UAA, UAG ou UGA. Quando um códon de terminação é apresentado no sítio A, a síntese é imediatamente interrompida e um fator de liberação auxilia no processo, o eRF. Esse fator reconhece os três códons de terminação, e se liga ao sítio A. Isso causa a hidrólise da ligação éster que une o polipeptídeo nascente e o RNA transportador ligado a ele no sítio P, ocorrendo a liberação do mesmo e a dissociação do ribossomo, do RNA mensageiro e do RNA transportador. Esses componentes podem ser reciclados para um novo ciclo de síntese proteica.

O peptídeo é enovelado em suas estruturas secundária, terciária e quaternária durante e após a sua síntese. Além do enovelamento, ocorrem modificações pós-traducionais que permitirão a obtenção da estrutura nativa que possui atividade biológica. As principais modificações são: modificações nos terminais amino e carboxila, perda da sequência de sinalização, processamento proteolítico, modificações em aminoácidos individuais, adição de cadeias laterais de carboidratos, de grupos isoprenil e de grupos prostéticos; bem como a formação de pontes dissulfeto.