

NÃO EQUIVALÊNCIA DE CADEIAS NA
INTERAÇÃO ALOSTÉRICA DA HEMOGLOBINA

TESE DE DOUTORADO

SAUL GDANSKI JACCHIERI

CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS
Rio de Janeiro
Maio 1983

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Ferreira pela sua contribuição à minha formação científica.

Aos amigos do Centro Brasileiro de Pesquisas Física (CBPF), pela sua amizade e estímulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Nós estudamos neste trabalho a importância, para a dependência com a temperatura do comportamento cooperativo da hemoglobina, da não equivalência funcional das cadeias polipeptídicas que constituem a molécula de hemoglobina. Com este propósito, nós introduzimos os parâmetros termodinâmicos de interação alostérica denominados "efetivos", que relacionam as duas últimas etapas da oxigenação da hemoglobina com as duas primeiras. Nós mostramos que a energia livre de interação alostérica efetiva está fortemente correlacionada ao parâmetro de Hill que é a medida clássica da cooperatividade; portanto, a energia livre de interação alostérica efetiva é uma medida da cooperatividade. Dados experimentais recentes mostram que a energia livre de interação alostérica efetiva é uma função crescente da temperatura; isto é devido às entalpia e entropia de interação alostérica efetivas serem quantidades positivas. Para analisar este comportamento em termos de argumentos relativos à Termodinâmica, nós deduzimos equações para os parâmetros termodinâmicos de oxigenação da hemoglobina como função dos de suas cadeias. Como as equações assim obtidas têm um grande número de termos, nós aplicamos o mesmo tratamento a um dímero hipotético, obtendo relações mais simples. Concluimos, em ambos os casos, que o caráter positivo das entalpia e entropia de interação alostérica efetivas é devido à presença de termos cooperativos e anticooperativos. Como estes estão ausentes em equações que se referem a homoproteínas alostéricas, a dependência com a temperatura característica da cooperatividade da hemoglobina depende da presença de cadeias não equivalentes.

No cálculo das contribuições cooperativas e anticooperativas dos parâmetros termodinâmicos de interação alostérica efetivos nós nos deparamos com a indeterminância de um problema de muitos corpos. Fizemos duas aproximações, das quais obtemos resultados para vários ambientes químicos e temperaturas. Nós pudemos demonstrar que a não equivalência funcional das cadeias da hemoglobina leva ao seu comportamento térmico característico e que tal efeito é acentuado pelos efetores DPG e IHP, que ligam-se seletivamente a um tipo de cadeia, assim como pelo efetor H^+ .

ABSTRACT

We study in this work the importance, for the temperature dependence of the cooperative behaviour of hemoglobin, of the functional non-equivalence of the polypeptide chains from which the hemoglobin molecule is built. With such purpose we have introduced thermodynamic allosteric parameters called "mean allosteric parameters" which relate the last two oxygen bindings to the first two ones. We showed that the mean allosteric free energy is strongly correlated to the Hill parameter which is a classic measure of cooperativity; hence, the mean allosteric free energy measures the hemoglobin cooperativity. Recent experimental data show that the mean allosteric free energy decreases with temperature; this is due to the mean allosteric enthalpy and entropy being positive quantities. To analyse such behaviour in terms of Thermodynamic's arguments we have derived equations for the thermodynamic parameters of oxygen binding to hemoglobin in terms of those of its chains. Since the obtained equations have a great number of terms we applied the same treatment to a hypothetical dimer from which we derived simpler relations. From both cases we concluded that the positive character of the mean allosteric enthalpy and entropy is due to the presence of cooperative and anticooperative terms. Since the last terms are absent in the equations of allosteric homoproteins, the characteristic temperature-dependence of hemoglobin's cooperativity depends on the presence of non-equivalent chains.

In calculating the cooperative and anticooperative contributions to the mean allosteric parameters we faced the indeterminateness of a many body problem. We made two approximations from which we obtained results for various chemical environments and temperatures. We were able to show that the functional non equivalence of hemoglobin's chains yields its characteristic thermal behaviour and that such a effect is enhanced by the effectors DPG and IHP known to bind specifically to one kind of chain, and by H^+ as well.

Lista de Figuras

	<u>pág</u>
FIGURA 2.1.1-.....	10
O Heme.	
FIGURA 2.2.1-.....	18
Molécula de Hemoglobina no Estado Conformacional Deoxi.	
FIGURA 2.2.2-.....	19
Molécula de Hemoglobina no Estado Conformacional Oxi.	
FIGURA 2.2.3-.....	20
Distâncias entre os Hemes.	
FIGURA 2.2.4-.....	21
Ligação do Heme à Cadeia Polipeptídica.	
FIGURA 2.3.1-.....	33
Micro-estados de Ocupação das Subunidades.	
FIGURA 2.3.2-.....	34
Curva de Saturação Fracional da Hemoglobina Comparada à da Mioglobina	
FIGURA 2.3.3-.....	35
Variação da Interação Alostérica Efetiva com o Parâmetro de Hill.	
FIGURA 2.4.1-.....	40
Curvas de Saturação Fracional da Hemoglobina em Diversas Condições.	
FIGURA 2.4.2-.....	41
Efeito Bohr.	
FIGURA 2.5.1-.....	47
Associação entre as Subunidades.	
FIGURA 3.5.1-.....	76
Variação do Ganho de Energia Livre de Interação Alostérica do Dímero $\delta\gamma$ com a diferença entre as afinidades por	

Oxigênio das Subunidades δ e γ .	
FIGURA 3.5.2-.....	77
Comportamento Predito para um Homodímero	
FIGURA 4.1.1-.....	83
Equilíbrios Intermediários que Ocorrem entre a Deoxi e a Oxihemoglobina.	
FIGURA 4.4.1-.....	112
Gráficos de Van't Hoff de $k_{\alpha}, k_{\beta}, k'_{\alpha\beta}, k''_{\alpha\beta}$.	
FIGURA 4.4.2-.....	118
Gráficos de Van't Hoff da Interação Alostérica Efetiva.	
FIGURA 4.4.3-.....	122
Energias Livres de Oxigenação dos Equilíbrios Intermediários.	

Lista de Tabelas

	<u>pág</u>
TABELA 2.3.1-.....	32
Constantes de Adair	
TABELA 2.4.1-.....	42
Protons Liberados em cada Etapa da Oxigenação da Hemoglobina	
TABELA 2.4.2-.....	43
Constantes de Equilíbrio de Adição de DPG e IHP	
TABELA 4.4.1-.....	108
Aplicação da Primeira Aproximação aos Dados de Tyuma, Imai e Shimizu.	
TABELA 4.4.2-.....	109
Termos Dominantes da Equação (4.4.3)	
TABELA 4.4.3-.....	110
Resultados Obtidos com a Primeira Aproximação em vários valores de pH	
TABELA 4.4.4-.....	111
Aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani.	
TABELA 4.4.5-.....	115
Parâmetros Termodinâmicos de Oxigenação.	
TABELA 4.4.6-.....	116
Termos Dominantes das Equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3)	
TABELA 4.4.7-.....	117
Aplicação da Primeira Aproximação aos Dados de Imai.	
TABELA 4.4.8-.....	119
Condições Experimentais dos Sete Casos de Imai.	

TABELA 4.4.9-.....	120
Valores dos Parâmetros Termodinâmicos de Interação Alostérica Efetivos.	
TABELA 4.4.10-.....	121
Principais Termos das Equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3).	
TABELA 4.4.11-.....	123
Resultados Obtidos com a Segunda Aproximação.	

SUMÁRIO

	<u>pág</u>
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
CAPÍTULO I -	
1 - Introdução.....	1
CAPÍTULO II -	
2 - A Hemoglobina como Exemplo de Proteína A- lostérica.....	8
2.1- Proteínas Alostéricas.....	8
2.2- Hemoglobina.....	14
2.3- A Curva de Saturação Fracional e a Inte- ração Alostérica.....	22
2.4- O Papel dos Efetores Heterotrópicos.....	36
2.5- Associação entre as Subunidades.....	44
CAPÍTULO III-	
3 -Um Modelo Dimérico.....	48
3.1-Descrição do Modelo.....	48
3.2-Constantes de Equilíbrio.....	49
3.3-Entalpias, Entropias e Energias Livres de Oxigenação.....	54
3.4-Sobre as Entropias de Mistura.....	62
3.5-A Fidelidade Térmica do Dímero $\delta\gamma$	64

CAPÍTULO IV -

4 -O Equilíbrio Hemoglobina-Oxigênio.....	78
4.1-Constantes de Equilíbrio.....	78
4.2-Parâmetros Termodinâmicos de Oxigenação....	84
4.3-Aproximações.....	93
4.3.1-Primeira Aproximação.....	93
4.3.2-Segunda Aproximação.....	96
4.4-Confronto com os Dados Experimentais.....	99
4.5-Conclusões.....	124

BIBLIOGRAFIA	129
--------------------	-----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O problema ao qual nos dedicamos, o equilíbrio Hb/O₂, tem sido intensivamente estudado desde o princípio do século, devido não só à sua importância em si, mas também à possibilidade de estender os conhecimentos adquiridos ao estudo de outros sistemas, já que dentre as proteínas que apresentam a propriedade denominada *alosteria*¹, da qual trataremos no decorrer deste trabalho, a hemoglobina tornou-se, sem dúvida, a melhor conhecida.

A molécula de hemoglobina é formada de quatro *subunidades* ou *cadeias* (ver o próximo capítulo) sendo que cada subunidade combina-se reversivelmente com uma molécula do oxigênio e interage alostêricamente com as demais. Por interação alostêrica designa-se a propriedade que a hemoglobina (e outras proteínas alostêricas) apresenta de uma subunidade ter a sua afinidade pelo ligante controlada pela ocupância das demais. A afinidade por oxigênio de uma subunidade é tão maior quanto maior for o número de subunidades vizinhas ocupadas; por este motivo, a interação alostêrica que ocorre na hemoglobina é de nominada *cooperatividade*.

Parte do esforço empregado no estudo da hemoglobina foi dirigido para a determinação de sua estrutura, da qual trataremos no próximo capítulo; outra parte, mesmo antes de a es

trutura da hemoglobina ter sido desvendada, foi dedicada à elaboração de modelos para a cooperatividade. Os modelos atualmente aceitos foram criados a partir de uma mistura de dados estruturais, medidas do equilíbrio Hb/O_2 e hipóteses sobre o mecanismo da cooperatividade. Uma característica comum a estes modelos é ser a cooperatividade devida a mudanças de conformação da *estrutura quaternária*² da molécula em que contactos (ligações químicas fracas), localizados nas interfaces das subunidades, são rompidos.

Uma questão que domina o problema da cooperatividade divide estes modelos em orquestrados ("concerted") e sequenciais. Os modelos orquestrados assumem que há uma mudança de conformação determinante para a cooperatividade que ocorre em uma certa etapa da oxigenação; os modelos sequenciais assumem que em cada etapa ocorrem uma mudança de conformação significativa. Os últimos permitem reproduzir melhor algumas evidências experimentais, mas os primeiros apresentam um menor número de variáveis independentes e por isso são considerados mais práticos.

Neste trabalho, nós consideramos que o mecanismo da cooperatividade é sequencial e utilizamos o modelo de Adair³ que, apesar de ter sido o primeiro a ser proposto, é o mais geral. Fazemos também uma referência ao modelo de Guidotti⁴, que nos auxilia a pensar sobre algumas suposições. Ambos os modelos serão descritos no próximo capítulo.

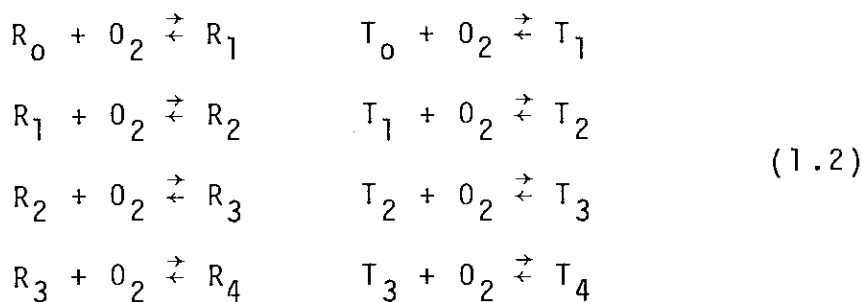
Dois dos modelos mais importantes são o modelo orquestrado de Monod, Wyman e Changeux⁵ (MWC) e o modelo sequencial de Koshland, Nemethy e Filmer⁶ (KNF). Embora haja bons textos sobre estes modelos e nós não os utilizemos em nosso trabalho, é conveniente fazer uma breve revisão sobre os seus aspectos mais gerais.

O modelo MWC pressupõe que há dois estados conformacionais acessíveis à molécula de hemoglobina. Em cada estado a simetria da molécula é conservada e as afinidades por oxigênio das subunidades são iguais e, portanto, independem da ocupância de outras subunidades. Em diferentes estados as afinidades por oxigênio são diferentes.

Os dois estados são denominados R e T. Quando não há moléculas de oxigênio adicionadas à hemoglobina (deoxihemoglobina), os estados R e T participam do equilíbrio.



cuja constante de equilíbrio é $L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$. A adição de oxigênio à hemoglobina nos estados R e T ocorre segundo as reações



sendo que as reações da esquerda têm constante de equilíbrio k_R e as da direita k_T .

O modelo se propõe a reproduzir a cooperatividade da seguinte maneira: a deoxihemoglobina no estado T é mais estável do que no estado R ($L \gg 1$), mas as constantes de equilíbrio de adição de oxigênio ao estado R são maiores ($k_R > k_T$), de forma que a tetraoxihemoglobina é mais estável no estado R do que no estado T. Deste modo, a adição de oxigênio à hemoglobina no estado T induz a transição T→R, o que torna mais fácil a adição das próximas moléculas de oxigênio.

A principal característica do modelo MWC é a participação de apenas dois estados. O modelo KNF assume uma situação oposta, a cada adição de uma molécula de oxigênio ocorre uma mudança de conformação. É assumido que cada subunidade existe em duas conformações (A e B) e que a afinidade por oxigênio do estado conformacional B é muito maior do que a do estado A. A adição de oxigênio a uma subunidade induz mudanças de conformação nas demais.

Neste trabalho, nos preocupamos não com a elaboração de modelos para a cooperatividade, mas com um aspecto do problema da hemoglobina cuja importância só recentemente foi reconhecida e, mesmo assim, de um ponto de vista diferente do nosso. As subunidades que constituem a molécula de hemoglobina não são idênticas, embora semelhantes⁷, há duas subunidades denominadas α e duas subunidades denominadas β . Durante muito tempo se pensou que o equilíbrio Hb/O₂ pode ser completamente descrito independentemente da diferenciação entre as subunidades. Uma das características utilizadas para estudar o equilíbrio Hb/O₂ é a *saturação fracional* Y (fração de subunidades ocupa -

das por moléculas de oxigênio) como função da concentração de oxigênio no meio (curva de saturação fracional). Peller⁸ e Weber⁹, mostraram recentemente com base em argumentos previamente desenvolvidos por Wyman⁴⁴, que a assimetria de um gráfico de Y contra $\log O_2$ é devida à presença de interfaces especializadas na molécula de hemoglobina que, como veremos no próximo capítulo, decorre da diferença entre as cadeias α e β . Segundo estes autores, a assimetria da curva de saturação fracional devida à assimetria da molécula de hemoglobina é importante para a função de transportador de oxigênio¹ que a hemoglobina desempenha. O nosso trabalho é feito de um ponto de vista semelhante; nós mostramos que, no intervalo de temperatura de significado fisiológico, a cooperatividade da hemoglobina aumenta com a temperatura e que este efeito é o contrário do que seria de se esperar de uma proteína formada por subunidades funcionalmente equivalentes.

Nós baseamos a nossa argumentação no modelo sequencial de Adair que, sendo o mais geral, é o menos detalhado; por este motivo, ao introduzirmos no modelo de Adair a diferença entre as cadeias α e β , o número de variáveis incógnitas torna-se maior do que o número de variáveis que podemos conhecer, o que nos levou a fazer duas aproximações cujas formas e resultados são descritos no capítulo 4.

A interação alostérica, é definida em termos de diferenças entre energias livres e, na verdade, há muitas definições possíveis. Nós definimos uma variável que denominamos *energia livre de interação alostérica efetiva* ($G_{34,12}^0$), dada

pela diferença entre as somas das energias livres de adição das duas últimas moléculas de oxigênio e das duas primeiras.

Nos capítulos seguintes, fazemos uma análise da variação de $G_{34,12}^0$ com a temperatura, com base em dados experimentais e em equações que deduzimos a partir do modelo de Adair e de equações fundamentais da Termodinâmica. Como aquelas equações são muito extensas, pois a diferenciação entre as subunidades acrescenta muitas constantes de equilíbrio ao modelo de Adair, nós baseamos parte da nossa argumentação em um modelo dimérico, cujas subunidades podem ser idênticas ou diferentes, e que, embora mais simples, conserva os aspectos mais relevantes do problema da hemoglobina aos quais este trabalho se refere.

Outra característica da alosteria que levamos em consideração é a participação de ligantes denominados *efetores* ou *agentes alostéricos heterotrôpicos* aos quais o equilíbrio Hb/O_2 é sensível. Este assunto está relacionado com o nosso trabalho, pois alguns efetores atuam especificamente sobre as cadeias β acentuando assim a sua diferenciação das cadeias α e outro efector, o ion H^+ , que não foi considerado implicitamente nas equações que deduzimos mas está presente na forma paramétrica, é demasiadamente importante para não ser levado em conta. Pudemos deduzir, através de cálculos realizados com uma de nossas aproximações, que o efector H^+ , apesar de atuar sobre os dois tipos de subunidades, tem uma ação mais intensa sobre as cadeias β .

Consideramos necessária uma revisão sobre a estrutura e função da hemoglobina e de outras proteínas alostéricas, mas,

como este tema é muito extenso, nos limitamos a apresentar no próximo capítulo as informações mais importantes para a compreensão do equilíbrio Hb/O₂.

CAPÍTULO II

2 - A HEMOGLOBINA COMO EXEMPLO DE PROTEINA ALOSTÉRICA

2.1 - Proteínas Alostéricas

Os mecanismos que permitem aos seres vivos integrarem informações sobre o meio externo e mudanças metabólicas internas são, em grande parte, baseados em mudanças de conformação em proteínas¹⁰. A propriedade, denominada alosteria, que faz com que estas proteínas tenham a sua função controlada consiste em interações entre regiões distantes (em uma escala molecular) da cadeia polipeptídica. É interessante observar que o termo alosteria, que significa outra estrutura, surgiu relacionado ao modelo de dois estados MWC.

Uma característica comum às proteínas alostéricas é a presença de cadeias polipeptídicas (denominadas cadeias ou subunidades) unidas por ligações químicas fracas. O esforço, que ocorreu nas últimas décadas, para entender a hemoglobina como um protótipo de proteína alostérica levou a modelos baseados em mudanças nas interfaces das subunidades (estrutura quaternária) e nas suas estruturas internas¹¹ (*estruturas terciária e secundária*).

As características das proteínas alostéricas abrangem uma vasta gama de variações. Seu peso molecular pode variar de alguns milhares a alguns milhões de daltons¹². Quanto à função, destacam-se as proteínas transportadoras de oxigênio e as enzi

mas (proteínas que catalisam uma reação química), sendo que as subunidades que constituem estas últimas podem ter a mesma função ou funções diferentes.

Um exemplo, citado como o caso mais complexo, dentre todas as proteínas alostéricas com estruturas terciária a quaternária conhecidas, de arranjo espacial entre as subunidades, é a enzima ATCase, da bactéria *Escherichia Coli*¹³. Esta enzima catalisa o primeiro passo de uma sequência de reações que leva às pirimidinas, sua ação catalítica é inibida pelo produto final. A ATCase é constituída por seis subunidades de peso molecular $3,3 \times 10^4$, que têm ação catalítica, e seis subunidades, de peso molecular $1,7 \times 10^4$, que tem ação reguladora. O produto final da sequência de reações iniciada pela ATCase, ligando-se às subunidades reguladoras, inibe a função das subunidades catalíticas. Como mostra a figura 2-49 da referência 13, as subunidades reguladoras estão contidas em um "sandwich" formado pelas subunidades catalíticas.

Outra característica comum às proteínas alostéricas é que a reação química associada à função de uma subunidade ocorre em uma região definida, denominada *sítio ativo*. O número de sítios ativos pode variar de dois até algumas centenas¹².

Em muitos casos, o sítio ativo não é parte da cadeia polipeptídica mas uma estrutura, denominada *grupo prostético*, implantada na proteína. Um exemplo típico de grupo prostético é o *heme* (FIGURA 2.1.1) formado por um anel porfirínico com um átomo de ferro no centro.

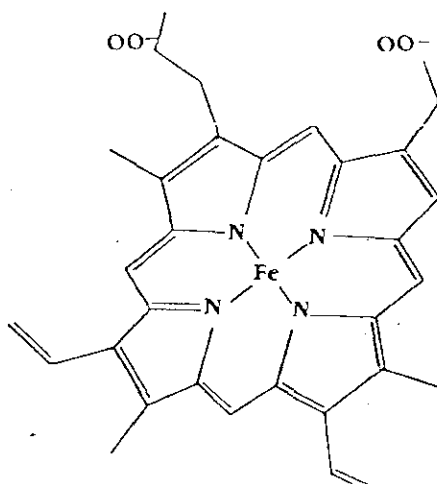


FIGURA 2.1.1

O heme é formado por um anel porfirínico com um átomo de ferro no centro.

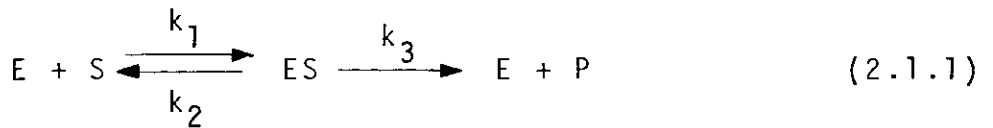
Entre as proteínas alostéricas transportadoras de oxigênio compreendem-se as *hemoglobinas*¹⁴ e as *hemocianinas*¹⁵. Estas proteínas têm um tipo de interação alostérica denominado cooperatividade, importante para a sua função biológica. A cooperatividade consiste em um sítio ativo ter a sua afinidade por oxigênio regulada pela ocupância dos demais da seguinte maneira: a presença de uma molécula de oxigênio em um sítio ativo faz com que a afinidade por oxigênio de outros sítios ativos livres seja maior; inversamente, quando um sítio ativo é deoxigenado, outros sítios ativos ocupados liberam oxigênio com uma facilidade maior.

As hemocianinas^{12,15}, contendo dois átomos de cobre em cada sítio ativo, ocorrem em alguns artrópodos e moluscos e seu peso molecular varia de 400000 a 9×10^6 daltons. Nos artrópodos, o peso molecular de uma subunidade varia de 66000 a 75000 daltons, sendo que cada subunidade contém um sítio ativo ao qual liga-se reversivelmente uma molécula de oxigênio. Nos moluscos, estima-se que há dois átomos de cobre por cada 50000 daltons.

O termo hemoglobina é, de uma forma geral, utilizado para designar proteínas transportadoras de oxigênio cujos sítios ativos são hemes. Nos invertebrados as hemoglobinas são, algumas vezes, moléculas de dimensões comparáveis às das hemocianinas com centenas de sítios ativos¹². Nos vertebrados as hemoglobinas são moléculas de peso molecular de cerca de 64000 daltons e contêm quatro subunidades, sendo que cada uma tem um heme ao qual liga-se reversivelmente uma molécula de oxigênio¹⁶.

As hemoglobinas e as hemocianinas, assim como outras proteínas alostéricas, têm a sua função controlada por substâncias denominadas agentes alostéricos heterotrópicos ou efetores. O cátion H^+ é um efector ao qual são sensíveis tanto as hemocianinas quanto as hemoglobinas; o comportamento cooperativo em relação à presença de H^+ e denominado *efeito Bohr*^{17,18}. As hemoglobinas tetraméricas e algumas hemocianinas têm a sua afinidade por oxigênio diminuída, na faixa de pH 9,0-6,5, em concentrações crescentes de H^+ ; outras hemocianinas apresentam um efeito Bohr invertido¹², ou seja, adicionam oxigênio em concentrações crescentes de H^+ . Outros efetores são alguns fosfatos orgânicos (hemoglobinas), Cl^- (hemoglobinas e hemocianinas), Ca^{++} e Mg^{++} (hemocianinas). De uma forma geral, os efetores são essenciais ao comportamento cooperativo; em solução aquosa, na ausência desses efetores, as hemoglobinas e hemocianinas são muito pouco cooperativas.

As enzimas alostéricas cujas subunidades têm a mesma função podem ser cooperativas, como a hemoglobina e a hemocianina, ou *anticooperativas*, i.e., a ação catalítica de uma subunidade é inibida pela presença de substrato ligado ao sítio ativo de outra subunidade. A ação catalítica de enzimas que não apresentam interações alostéricas é descrita pela equação de Michaelis-Menten¹⁹; segundo este modelo, uma molécula de enzima (E) combina-se com o substrato (S), com uma constante de velocidade k_1 , para formar o complexo ES que pode se dissociar em E e S (reação inversa), com uma constante de velocidade k_2 , ou na enzima e nos produtos da reação (P), com uma constante de velocidade k_3 . A reação geral é



A suposição de que a concentração de complexo ES permanece constante (estado estacionário) e, portanto,

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad (2.1.2)$$

leva à equação de Michaelis-Menten

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2.1.3)$$

onde V_{\max} é o limite superior da reação de dissociação do complexo ES em E e P (que seria observado quando $|S| \rightarrow \infty$) e

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.1.4)$$

é a constante de Michaelis.

Ocorre que as enzimas alostéricas (cooperativas ou anticooperativas) não obedecem à equação de Michaelis-Menten. Como mostra a FIGURA 2.3.2, a curva da fração de sítios satura - dos (curva de saturação fracional) como função de concentração de ligante é, tanto para as proteínas transportadoras de oxigê - nio quanto para as enzimas, hiperbólica, se não há interação alostérica entre os sítios ativos, ou sigmoideal, se a presença de ligante adicionado a um sítio ativo determina um aumento na afinidade de outro sítio ativo pelo ligante. Se a interação a - lostérica é anticooperativa, observa-se uma curva de saturação

fracional também hiperbólica que indica uma menor afinidade da proteína pelo ligante.

A hemoglobina (nome pelo qual passaremos a designar as hemoglobinas tetraméricas) e a mioglobina são um exemplo da discussão acima. A mioglobina é uma proteína monomérica e, portanto, não alostérica que apresenta uma curva de saturação fracional hiperbólica que não é afetada sensivelmente por variações nas concentrações de H^+ , Cl^- , etc... A hemoglobina é formada por quatro subunidades semelhantes à molécula de mioglobina que interagem cooperativamente e apresenta uma curva de saturação fracional sigmoideal sensível a de H^+ , Cl^- , 2,3-Difosfoglicerato (DPG), Inositolhexafosfato (IHP),... etc.

2.2 - Hemoglobina

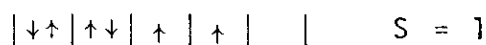
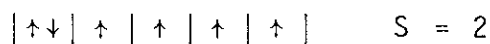
As estruturas quaternárias da molécula de hemoglobina em seus estados completamente oxigenado e completamente deoxigenado estão representadas nas FIGURAS 2.2.1 e 2.2.2. As quatro subunidades que constituem a molécula de hemoglobina, embora semelhantes entre si e à molécula de mioglobina, não são idênticas⁷; diferenças estruturais permitem distinguir dois pares de subunidades (subunidades α e subunidades β). A posição das subunidades α e β na molécula de hemoglobina permite que aquelas sejam identificadas como α_I , α_{II} , β_I e β_{II} .

A molécula de hemoglobina, em seus estados oxi e deoxi, tem um eixo de rotação C_2 , indicado nas FIGURAS 2.2.1 e 2.2.2, que faz com que o par $\alpha_I \beta_I$ seja equivalente ao par $\alpha_{II} \beta_{II}$ e

que o par $\alpha_I \beta_{II}$ seja equivalente ao par $\alpha_{II} \beta_I$. Também há dois pseudoeixos de rotação C_2 que sobrepõem a subunidade α_{II} à subunidade β_I e a subunidade α_I à subunidade β_{II} . Como consequência, a molécula de hemoglobina tem quatro tipos distintos de interfaces: uma interface $\alpha\alpha$, uma interface $\beta\beta$, duas interfaces $\alpha_I \beta_I$ (ou $\alpha_{II} \beta_{II}$) e duas interfaces $\alpha_I \beta_{II}$ (ou $\alpha_{II} \beta_I$).

Nos mamíferos, as subunidades α contêm 141 aminoácidos e as subunidades β 146 aminoácidos. Em ambas as subunidades o heme está contido em um envólucro hidrofóbico formado pela cadeia polipeptídica. Em hemes isolados da cadeia polipeptídica, o átomo de ferro está no estado férrico (Fe^{3+}) e não se combina reversivelmente com moléculas de oxigênio. Nas moléculas de mioglobina e hemoglobina funcionalmente ativas, os átomos de ferro, tanto na forma oxigenada quanto na forma deoxigenada, permanecem no estado ferroso (Fe^{2+}) e têm a propriedade de combinar-se reversivelmente com moléculas de oxigênio; esta propriedade é devida ao ambiente químico criado pela cadeia polipeptídica.

Um átomo de ferro no estado ferroso tem a configuração eletrônica $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6$. Na camada 3d, os 6 spins podem estar alinhados de três maneiras distintas



No deoxiheme o átomo de ferro é paramagnético ($S=2$) e no oxiheme é diamagnético²⁰ ($S=0$).

Na FIGURA 2.2.3 estão indicadas as distâncias entre os hemes nas formas oxi e deoxi na molécula de hemoglobina²¹. O ordenamento espacial da molécula ocorre de forma a haver poucos contactos entre subunidades idênticas (interfaces $\alpha\beta$) e muito contactos entre subunidades diferentes (interfaces $\alpha_I\beta_I$ e $\alpha_I\beta_{II}$)²². As interfaces $\alpha_I\beta_{II}$ e $\alpha_{II}\beta_I$ distinguem-se das interfaces $\alpha_I\beta_I$ e $\alpha_{II}\beta_{II}$. A interface $\alpha_I\beta_I$ é a mais extensa, sendo estabilizada por contactos entre 34 cadeias laterais de aminoácidos, mas também é a mais rígida²³, passando por poucas modificações entre os estados conformacionais das FIGURAS 2.2.1 e 2.2.2. A interface $\alpha_I\beta_{II}$, que é estabilizada por contactos entre 19 cadeias laterais no estado conformacional da FIGURA 2.2.1, é atribuído o principal papel no mecanismo da cooperatividade. Como mostra a figura 2.2.2 da referência 18, quando uma molécula de hemoglobina é oxigenada, alguns contactos são rompidos na interface $\alpha_I\beta_{II}$ e outros são formados. Tanto a oxi quanto a deoxi hemoglobina dissociam-se em dímeros (ver seção 2.5) $\alpha_I\beta_I$ de acordo com a reação $\alpha_I\alpha_{II}\beta_I\beta_{II} \rightleftharpoons 2\alpha_I\beta_I$, mas a constante de equilíbrio desta dissociação é, para a oxi hemoglobina, cerca de 10.000 vezes maior do que para a deoxi hemoglobina; isto se deve à interface $\alpha_I\beta_{II}$ ser estabilizada, na forma oxi, por um número de contactos menor do que na forma deoxi.

O entendimento atual sobre o mecanismo da interação alostérica na hemoglobina fundamenta-se na ligação de uma molécula de oxigênio ao heme, na ligação de heme à proteína e nas

interfaces entre as subunidades α e β . Como mostra a FIGURA 2.2.4, o heme está ligado covalentemente  cadeia polipeptídica através da ligao entre o átomo de ferro e o átomo de ni trognio da histidina proximal. No deoxiheme, o átomo de ferro  pentacoordenado; quando o sexto ligante (que em condioes nor mais  O_2 , mas CO também liga-se cooperativamente  hemoglobi na) liga-se ao heme, o átomo de ferro, deslocando-se para o plano do heme, puxa a histidina proximal. O movimento do átomo de ferro para o plano do heme inicia a sequência de transformao es que leva da deoxi a oxihemoglobina²³. A etapa do mecanis mo que se segue  ligao de uma molécula de oxigênio a um he me  a quebra de ligao es químicas nas interfaces entre as ca deias α e β . Segundo os dados de difrao de raio X para oxie a deoxi hemoglobinas, as interfaces $\alpha_I \beta_I$ e $\alpha_{II} \beta_{II}$ comportam -se como unidades rgidas²³, sendo que as principais transfor maço es ocorrem nas interfaces $\alpha_I \beta_{II}$ e $\alpha_{II} \beta_I$. Se, como mostra a FIGURA 2.2.1, há uma molécula de DPG ou IHP ligada  interfa ce $\beta\beta$, o estreitamento da separao entre as cadeias β torna-se importante para a interao alostérica.

O papel que o átomo de ferro desempenha no mecanismo da cooperatividade  um assunto controvertido. Pensava-se que o anel porfirínico na hemoglobina  uma estrutura plana e que o átomo de ferro, ao passar de spin alto para spin bai xo, tem o seu diâmetro reduzido, deslocando-se, por este moti vo, $0,6 \text{ \AA}$ para o plano do heme. Recentemente, medidas fei tas com EXAFS ("extended x-ray absorption fine structure") mos traram que o heme tem uma concavidade dirigida para a histidi na proximal e que as distâncias entre o átomo de ferro e os

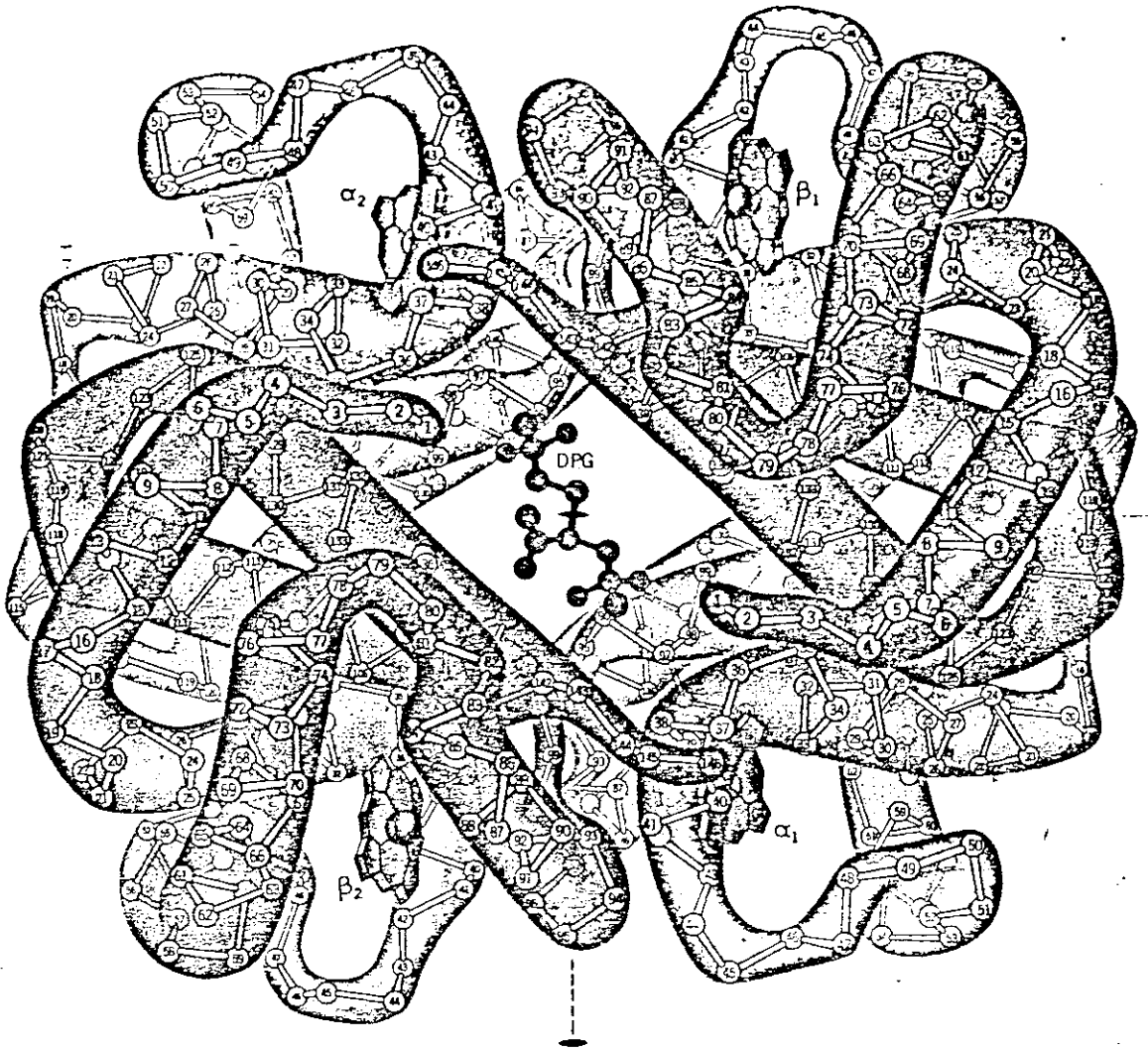


FIGURA 2.2.2

Molécula de hemoglobina em seu estado conformacional completamente deoxigenado. No centro da molécula há um eixo C_2 perpendicular ao plano do desenho; também há dois pseudo eixos C_2 nas direções vertical e horizontal. Ve-se uma molécula de 2,3-difosfoglicerato ligada à interface $\beta\beta$.

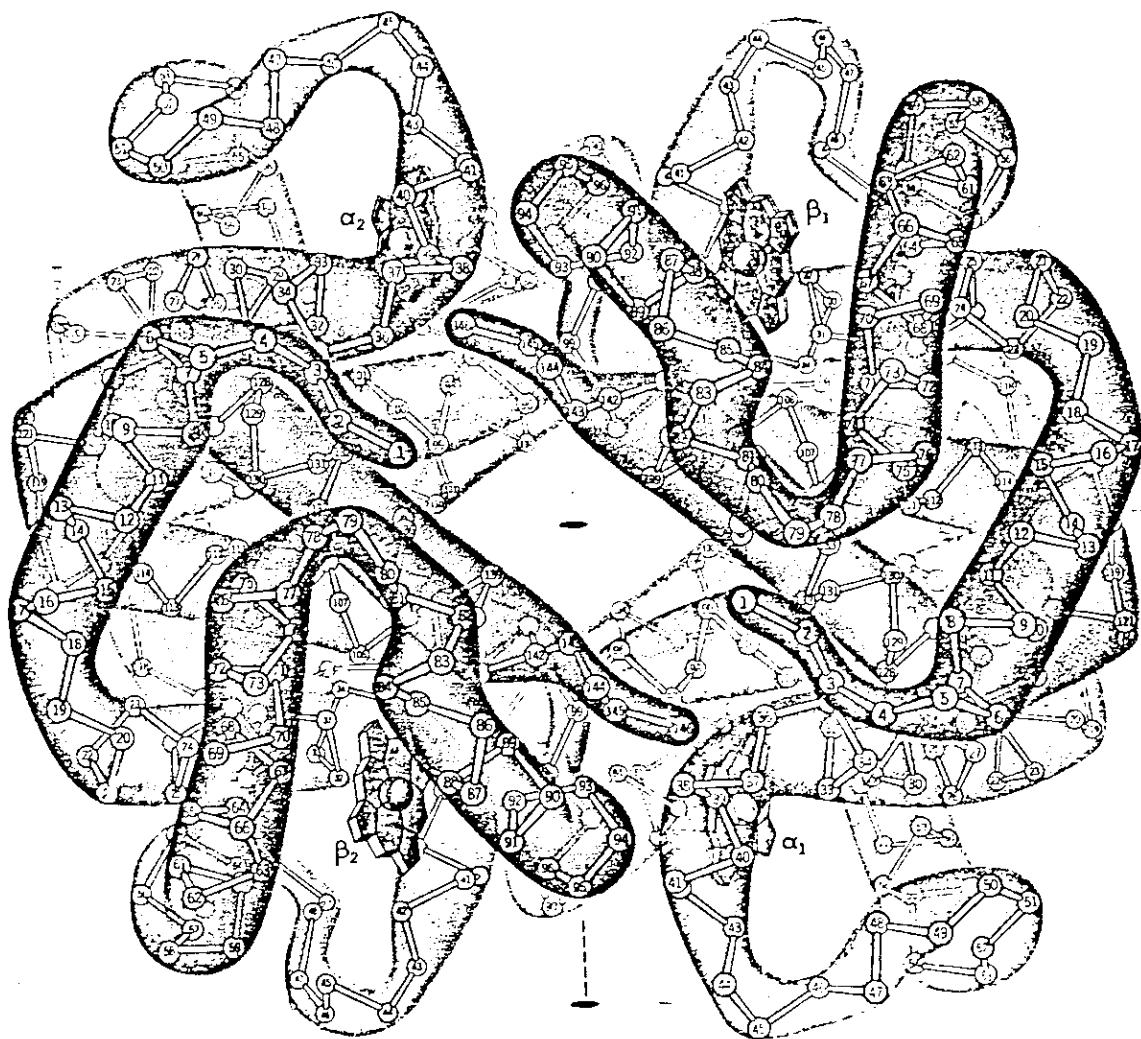


FIGURA 2.2.1

Molécula de hemoglobina em seu estado conformacional completamente oxigenado. No centro da molécula há um eixo C_2 perpendicular ao plano do desenho; também há dois pseudo eixos C_2 nas direções vertical e horizontal.

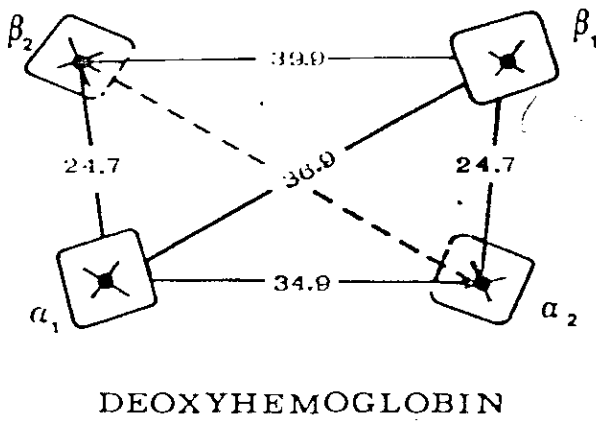
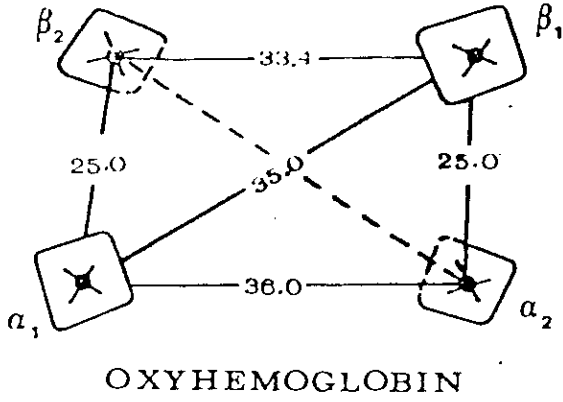


FIGURA 2.2.3

Distâncias (em Å) entre os hemes, na oxi e na deoxihemoglobina.

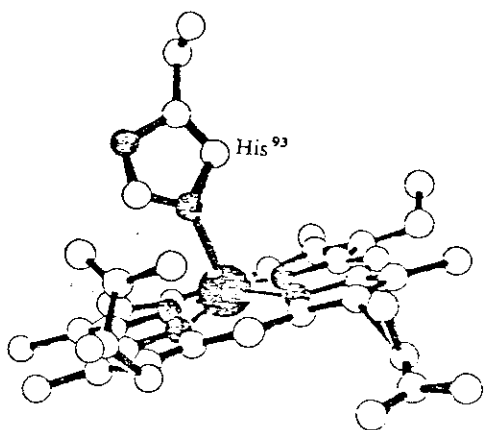


FIGURA 2.2.4

O heme está ligado à cadeia polipeptídica através de uma ligação covalente entre o átomo de ferro e um átomo de nitrogênio da histidina proximal.

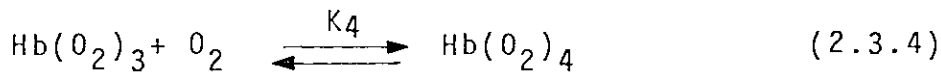
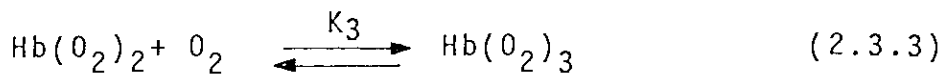
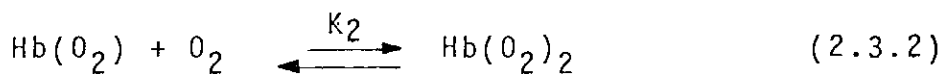
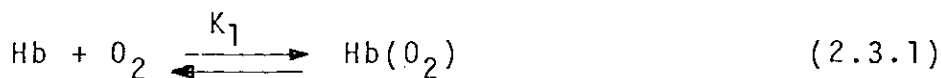
quatro nitrogênios do heme varia apenas cerca de 0.02 \AA^0 entre os estados oxi e deoxi²⁴. Não obstante, as evidências atuais continuam a atribuir ao átomo de ferro e à histidina proximal o papel de gatilho da sequência de transformações responsável pela cooperatividade. No deoxiheme, a histidina proximal está rotacionada cerca de 8° em relação a um plano perpendicular ao heme; no oxiheme, a histidina proximal move-se para uma posição perpendicular ao heme e desloca-se cerca de $0,5 \text{ \AA}^0$ em direção ao heme, pois a concavidade deste torna-se menor.

A figura 2.1.9 da referência 18 e a FIGURA 2.2.3 ilustram como a mudança de conformação entre os estados conformacionais oxi e deoxi tornam as subunidades α e β funcionalmente não equivalentes. Na transição para o estado conformacional oxi, o dímero $\alpha_I \beta_I$ roda cerca de 15° em relação ao dímero $\alpha_{II} \beta_{II}$, diminuindo assim as distâncias entre as duas subunidades β e as duas subunidades α , mas a posição do eixo desta rotação é tal que a distância entre as subunidades α pouco varia, mas a distância entre as subunidades β diminui cerca de 6 \AA^0 . Se uma molécula de DPG ou IHP está localizada na interface $\beta\beta$, o balanço de energia livre faz com que a afinidade por oxigênio das subunidades β torne-se menor.

2.3 - A Curva de Saturação Fracional e a Interação Alostérica

Gilbert Adair³, baseado em medidas de pressão osmótica que indicavam que a hemoglobina é tetramérica nas condições em que a curva de saturação fracional é determinada, propôs uma se

quência de quatro etapas para a oxigenação de hemoglobina:



A aplicação da lei da ação das massa aos equilíbrios (2.3.1)...(2.3.4) leva às seguintes equações para as concentrações das espécies oxigenadas:

$$[\text{Hb}(\text{O}_2)] = K_1 [\text{Hb}] [\text{O}_2] \quad (2.3.5)$$

$$[\text{Hb}(\text{O}_2)_2] = K_1 K_2 [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2 \quad (2.3.6)$$

$$[\text{Hb}(\text{O}_2)_3] = K_1 K_2 K_3 [\text{Hb}] [\text{O}_2]^3 \quad (2.3.7)$$

$$[\text{Hb}(\text{O}_2)_4] = K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{Hb}] [\text{O}_2]^4 \quad (2.3.8)$$

A fração de sítios saturados (Y) é dada por

$$Y = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)] + 2[\text{Hb}(\text{O}_2)_2] + 3[\text{Hb}(\text{O}_2)_3] + 4[\text{Hb}(\text{O}_2)_4]}{4 \{ [\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_2] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_3] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_4] \}} \quad (2.3.9)$$

Aplicando as relações (2.3.5)...(2.3.8) à equação (2.3.9) obtemos a equação de Adair

$$Y = \frac{K_1 [\text{O}_2] + 2K_1 K_2 [\text{O}_2]^2 + 3K_1 K_2 K_3 [\text{O}_2]^3 + 4K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{O}_2]^4}{4 \{ 1 + K_1 [\text{O}_2] + K_1 K_2 [\text{O}_2]^2 + K_1 K_2 K_3 [\text{O}_2]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 [\text{O}_2]^4 \}} \quad (2.3.10)$$

Como mostra a FIGURA 2.3.1, o estado monooxigenado pode ocorrer em quatro microestados, o estado dioxigenado pode ocorrer em seis microestados, o estado trioxigenado pode ocorrer em quatro microestados e o estado tetraoxigenado pode ocorrer em um microestado. Se quisermos exprimir as constantes dos equilíbrios (2.3.1)...(2.3.4) em termos de constantes de equilíbrios intrínsecas de adição de oxigênio a um sítio ativo (k_1, k_2, k_3 e k_4), devemos utilizar coeficientes estatísticos de acordo com as equações

$$K_1 = \frac{4}{1} k_1 \quad (2.3.11)$$

$$K_2 = \frac{6}{4} k_2 = \frac{3}{2} k_2 \quad (2.3.12)$$

$$K_3 = \frac{4}{6} k_3 = \frac{2}{3} k_3 \quad (2.3.13)$$

$$K_4 = \frac{1}{4} k_4 \quad (2.3.14)$$

A equação de Adair, em termos das constantes de equilíbrio intrínsecas, tem a forma

$$Y = \frac{k_1 [O_2] + 3k_1 k_2 [O_2]^2 + 3k_1 k_2 k_3 [O_2]^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 [O_2]^4}{1 + 4k_1 [O_2] + 6k_1 k_2 [O_2]^2 + 4k_1 k_2 k_3 [O_2]^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 [O_2]^4} \quad (2.3.15)$$

Na TABELA 2.3.1 estão expostas as constantes de Adair determinadas experimentalmente por Tyuma, Imai e Shimizu²⁵ em concentrações crescentes de DPG. A FIGURA 2.3.2 mostra qual é a vantagem que a hemoglobina tem, como transportador de oxigênio, sobre uma proteína monomérica como a mioglobina. Se, por exemplo, a pressão parcial de oxigênio nos alvéolos pulmonares

é de 100 mm Hg e nos capilares de um músculo é de 20 mm Hg, a diferença de saturação fracional de uma curva de saturação típica da hemoglobina entre estes dois pontos é 0,72; a mioglobina, por sua vez, libera 10% do seu oxigênio neste intervalo de pressão, ou seja, a cooperatividade faz com que a hemoglobina libere 7 vezes o volume de oxigênio que liberaria se os sítios ativos fossem independentes.

Um índice útil para determinar a afinidade da hemoglobina ou da mioglobina por oxigênio é a pressão parcial de oxigênio em que metade dos sítios ativos estão saturados (p_{50}), i.e., em que $Y = 0,5$. O p_{50} de adição de ligante a uma proteína tetramérica como a hemoglobina é dado pela relação

$$p_{50} = \frac{1}{(k_1 k_2 k_3 k_4)^{1/4}} \quad (2.3.16)$$

Como mostra a FIGURA 2.3.2, o p_{50} da hemoglobina

é maior do que a mioglobina o que indica que a associação cooperativa entre as subunidades diminui a afinidade da hemoglobina por oxigênio. Este efeito faz com que a hemoglobina libere em pressões parciais de oxigênio baixas uma fração significativa das moléculas de oxigênio que adicionou em pressões parciais de oxigênio altas.

Na ausência de interações alostéricas entre as subunidades as constantes de equilíbrio intrínsecas são idênticas ($k_1 = k_2 = k_3 = k_4$) e a equação (2.3.15) se reduz a

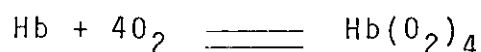
$$Y = \frac{k [O_2]}{1 + k [O_2]} \quad (2.3.17)$$

Note-se a semelhança desta equação com a equação de Michaelis-Menten (2.1.3). Os sistemas que obedecem a equação (2.3.17) têm uma curva de saturação fracional hiperbólica como a da mioglobina FIGURA 2.3.2. O p_{50} de uma proteína não cooperativa é dado por $p_{50} = 1/k$, de modo que na equação (2.3.17) a constante k pode ser substituída por p_{50} , com o resultado

$$Y = \frac{p_{O_2}}{p_{O_2} + p_{50}} \quad (2.3.18)$$

a onde p_{O_2} designa a pressão parcial de oxigênio.

A curva de saturação fracional também pode ser descrita através de uma equação denominada equação de Hill²⁶ que, embora não se baseie nas características físicas do sistema, é útil para definir quantitativamente a cooperatividade. Se a cooperatividade fosse muito grande (tendendo ao infinito) a adição de oxigênio à hemoglobina poderia ser descrita através da reação



cuja equação para a saturação fracional seria

$$Y = \frac{(p_{O_2})^4}{(p_{O_2})^4 + (p_{50})^4}$$

Esta última equação não permite descrever corretamente a curva de saturação fracional, mas verifica-se que se subs

tituímos os expoentes por um número n , sendo que $1 \leq n \leq 4$, a equação

$$Y = \frac{(p_{O_2})^n}{(p_{O_2})^n + (p_{50})^n}, \quad (2.3.19)$$

que se refere a uma reação do tipo



permite descrever a curva de saturação fracional entre os limites $Y = 0,1$ e $Y = 0,9$.

Se reescrevermos a equação (2.3.19) como

$$\frac{Y}{1-Y} = \left(\frac{p_{O_2}}{p_{50}} \right)^n \quad (2.3.21)$$

torna-se evidente que, quando $p_{O_2} = p_{50}$ e, portanto, $Y = 0,5$, qualquer n é uma solução. Tomando o logaritmo dos dois lados da equação (2.3.21), temos que

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log p_{O_2} - n \log p_{50} \quad (2.3.22)$$

Um gráfico dos pontos experimentais de $\log(Y/(1-Y))$ contra $\log(p_{O_2})$ na maioria dos casos, em um intervalo centrado em $\log(Y/(1-Y)) = 0$ ($Y=0,5$) e com extremos $\log(Y/(1-Y)) \cong -1$ ($Y=0,1$) e $\log(Y/(1-Y)) \cong 1$ ($Y = 0,9$), apresenta-se como uma reta. A inclinação da reta é o parâmetro de Hill(n).

n menor do que 1 indica comportamento anticooperativo,

n maior do que 1 indica comportamento cooperativo, sendo que quando a cooperatividade tende para o infinito n tende para 4.

Este não é o único modo de definir a cooperatividade. A interação alostérica em cada uma das quatro etapas da oxigenação é dada, em termos das constantes de Adair intrínsecas, por

$$G_{i,i-1}^0 = -RT \ln \frac{k_i}{k_{i-1}} \quad (2.3.23)$$

a onde $G_{i,i-1}^0$ é a energia livre de interação alostérica da i-ésima etapa. Como mostram os valores da TABELA 2.3.1, a última constante de Adair é grande comparada com as demais, de forma que os valores típicos de G_{21}^0 e G_{32}^0 variam entre -1Kcal/mol (interação cooperativa) e +1Kcal/mol (interação anticooperativa), mas o valor de G_{43}^0 (cerca de -2,5Kcal/mol) é sempre o mais negativo. A soma de todas as interações alostéricas é dada por

$$G_{41}^0 = \sum_{i=2}^4 G_{i,i-1}^0 = -RT \ln \frac{k_4}{k_1} \quad (2.3.24)$$

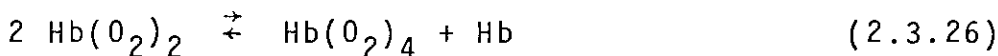
sendo que G_{41}^0 varia entre -3 e -4 Kcal/mol.

Um parâmetro que se revelou útil para estudar a diferenciação entre as cadeias α e β é

$$G_{34,12}^0 = -RT \ln \frac{k_3}{k_1} \frac{k_4}{k_2} \quad (2.3.25)$$

que definimos como a energia livre de interação alostérica efetiva.

$\frac{1}{36} (k_3 k_4) / (k_1 k_2)$ é a constante de equilíbrio da reação

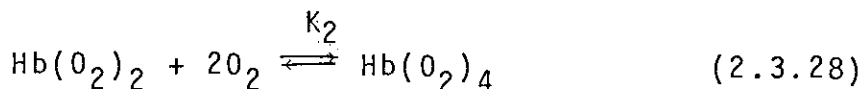
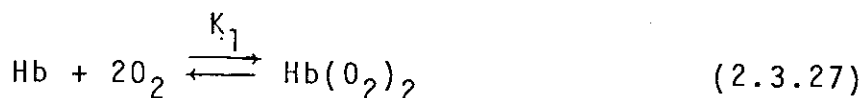


$G_{34,12}^0$ representa, portanto, a estabilidade de uma molécula de hemoglobina completamente oxigenada e de uma molécula hemoglobina deoxigenada comparada à estabilidade de duas moléculas de hemoglobina duplamente oxigenadas ou, em outras palavras, $G_{34,12}^0$ representa o quanto a adição das duas primeiras moléculas de oxigênio torna mais fácil a adição das duas últimas.

De acordo com dados experimentais recentes²⁷, a entalpia de interação alostérica efetiva $H_{34,12}^0$ é positiva, i.e., $\ln(k_3 k_4 / k_1 k_2)$ é uma função crescente da temperatura. Nos capítulos seguintes nós argumentamos que esta característica só pode ser entendida se considerarmos as cadeias α e β como sendo funcionalmente não equivalentes e mostramos como uma análise assim fundamentada permite interpretar os dados experimentais.

Guidotti^{4,28} propôs em 1967 um modelo em que a oxigenação da hemoglobina ocorre em duas etapas. Este modelo baseia-se em que, provavelmente devido à estabilização das interfaces $\alpha_I \beta_{II}$ e $\alpha_{II} \beta_I$, em uma solução de hemoglobina parcialmente saturada com oxigênio e na ausência das condições que favorecem a dissociação tetrâmero-dímero²² (ver seção 2.5), as espécies químicas cujas populações predominam são Hb , $\text{Hb}(\text{O}_2)_2$ e $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$.

De acordo com o modelo de Guidotti, a oxigenação da hemoglobina ocorre segundo as reações



e a saturação fracional é dada pela equação

$$Y = \frac{K_1 [\text{O}_2]^2 + 2K_1 K_2 [\text{O}_2]^4}{2(1 + K_1 [\text{O}_2]^2 + K_1 K_2 [\text{O}_2]^4)} \quad (2.3.29)$$

Note-se a semelhança desta equação com a equação (3.2.5) do capítulo seguinte. Se considerarmos válido o modelo de Guidotti, as equações do capítulo III, com algumas modificações, aplicam-se diretamente ao equilíbrio Hb/O₂.

O parâmetro de Hill está relacionado às constantes de equilíbrio k_1 e k_2 pela equação

$$n = \frac{8}{2 + (K_1/K_2)^{1/2}} \quad (2.3.30)$$

k_1 e k_2 , que representam as duas primeiras e as duas últimas etapas da oxigenação da hemoglobina, podem ser expressas, como função das constantes de equilíbrio intrínsecas do modelo de Adair, pelas equações

$$K_1 = 6 k_1 k_2 \quad (2.3.31)$$

$$K_2 = \frac{1}{6} k_3 k_4 \quad (2.3.32)$$

Substituindo estas duas últimas equações na equação (2.3.30), obtemos

$$n = \frac{8}{2 + 6 \left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2}} \quad (2.3.33)$$

Quando $k_3 k_4 / k_1 k_2 = 1$, $n = 1$; quando $k_3 k_4 / k_1 k_2 < 1$, $n < 1$ e, quando $k_3 k_4 / k_1 k_2 \rightarrow \infty$, $n \rightarrow 4$. Desta forma, a interação alostérica efetiva $G_{34,12}^0$ comparada ao parâmetro de Hill revela-se, como este, uma medida de cooperatividade.

A equação para o parâmetro de Hill como função das constantes de Adair intrínsecas é bem mais complicada do que a equação (2.3.30), obtida com o modelo de Guidotti:

$$n = \frac{4 k_1 p_{50} + 24 \left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2} + 36 k_1 k_2 k_3 p_{50}^3 + 16}{4 k_1 p_{50} + 12 \left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2} + 12 k_1 k_2 k_3 p_{50}^3 + 4} + \frac{12 k_1 p_{50} + 24 \left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2} + 12 k_1 k_2 k_3 p_{50}^3}{12 k_1 p_{50} + 12 \left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2} + 4 k_1 k_2 k_3 p_{50}^3 + 4} \quad (2.3.34)$$

O termo $\left(\frac{k_1 k_2}{k_3 k_4} \right)^{1/2}$ é o único que tem os mesmos coeficientes nos numeradores e nos denominadores dos dois termos do lado direito da equação (2.3.31). Se negligenciarmos, nesta última equação, os termos em p_{50} , obteremos a equação (2.3.30).

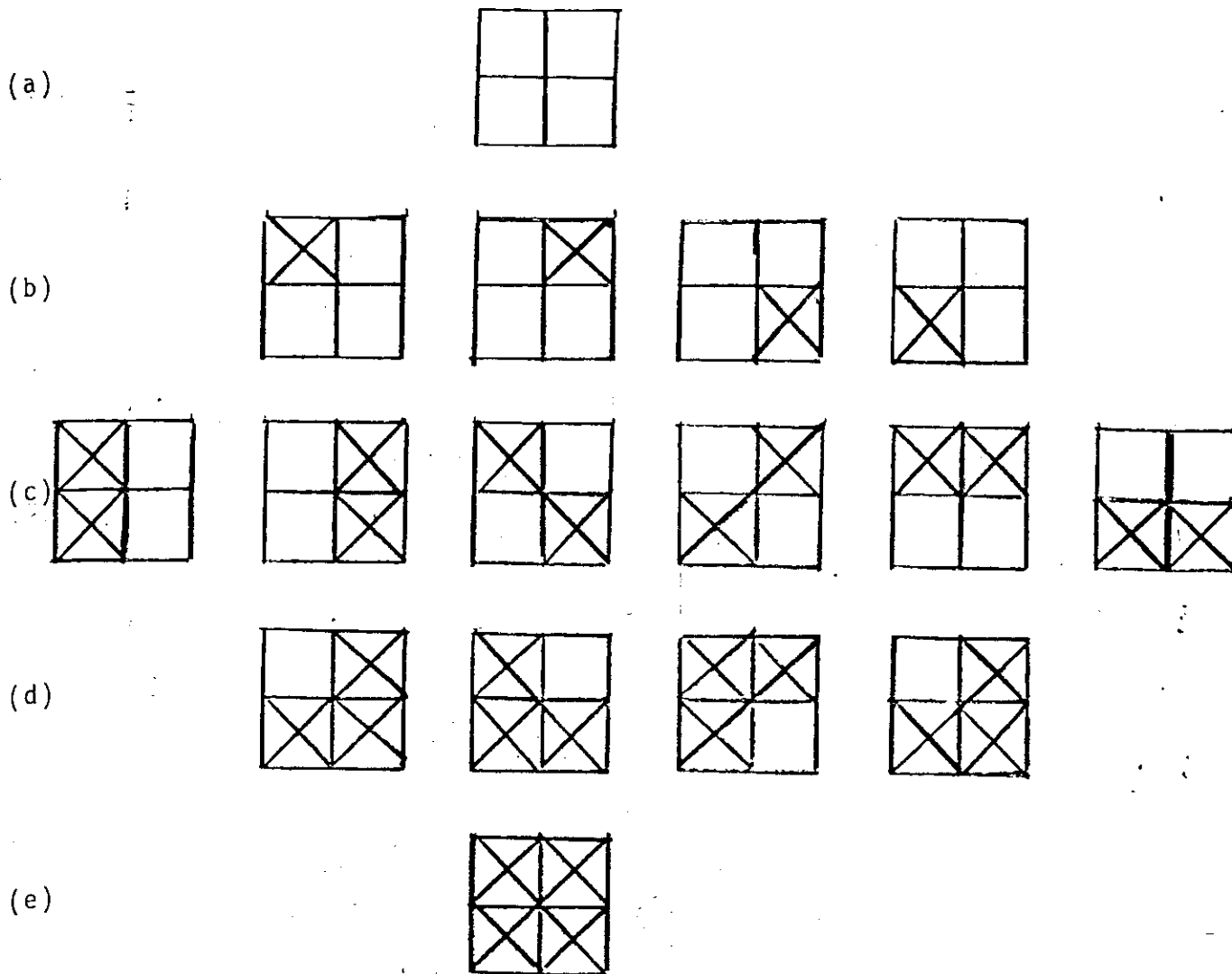


FIGURA 2.3.1

Microestados de ocupação das

(c) $\text{Hb}(\text{O}_2)_2$, (d) $\text{Hb}(\text{O}_2)_3$ e (e) $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$.

espécies: (a) Hb , (b) $\text{Hb}(\text{O}_2)$,

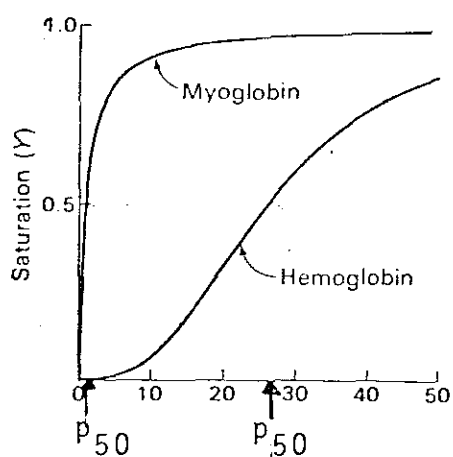


FIGURA 2.3.2

Curva de saturação fracional da hemoglobina comparada à da mio_globina. Esta figura ilustra também o comportamento de uma enzima cooperativa comparado ao de uma enzima não cooperativa.

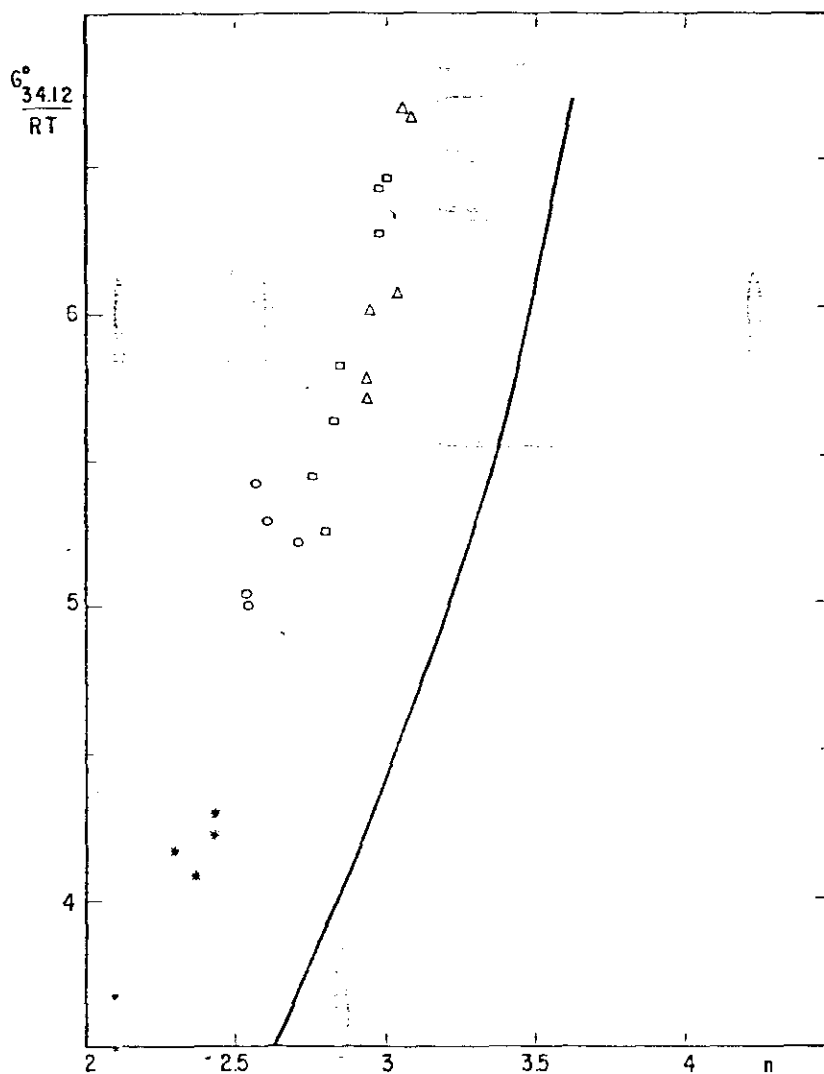


FIGURA 2.3.3

Variação da interação alostérica efetiva com o parâmetro de Hill. A curva cheia representa o modelo de Guidotti⁴.

- caso 3 de Imai²⁹
- caso 4 de Imai
- △ casi 5 de Imai
- * caso 6 de Imai

Na FIGURA 2.3.3 está ilustrada a variação de $G_{34,12}^0/RT$ com o parâmetro de Hill para 24 pontos experimentais²⁹; para comparação, traçamos também a curva do modelo de Guidotti obtida com a equação (2.3.33). Há uma forte correlação entre $G_{34,12}^0$ e o parâmetro de Hill, o que indica que $G_{34,12}^0$, que é a grandeza que apresenta o comportamento peculiar em relação à temperatura que comentamos acima, está relacionada com o comportamento cooperativo da hemoglobina.

2.4 - O Papel dos Efeitos Heterotrópicos

A curva de saturação fracional Hb/O_2 é alterada pela presença de fosfatos orgânicos (DPG e IHP) e ions H^+ , sendo que a ação destes últimos é denominada efeito Bohr.

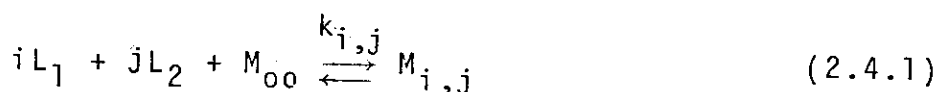
A FIGURA 2.4.1 ilustra a influência dos fosfatos orgânicos no equilíbrio Hb/O_2 . Um aspecto aparente é que a afinidade por oxigênio diminui na presença de DPG e IHP, sendo que o efeito do IHP é mais intenso. Em $[Cl^-] = 0,1 M$ a hemoglobina liga-se a DPG e IHP com uma estequiometria de 1 mol de fosfato por um mol de hemoglobina. Sabe-se que a ligação tanto do DPG quanto de IHP localiza-se na interface³⁰ $\beta\beta$ (FIGURA 2.2.1)

A FIGURA 2.4.2 mostra a dependência de $\log(p_{50})$ com o pH (efeito Bohr). A afinidade por oxigênio tem um mínimo em $pH = 6,2$ e, tanto do lado ácido quanto do lado básico do gráfico, é crescente³¹.

O efeito de dois ou mais ligantes em uma proteína po

de ser entendido com o auxílio da Teoria das Funções Correlacionadas (Linked Functions) de Wyman³².

Seja uma proteína (M) que combina-se com dois ligantes (L_1 e L_2), sendo que há n sítios que adicionam L_1 e m sítios que adicionam L_2 . Haverá $n \times m$ reações do tipo



a onde $i = 1, \dots, n$; $j = 1, \dots, m$

A concentração da espécie $M_{i,j}$ é dada por

$$[M_{i,j}] = k_{i,j} [M_{00}] [L_1]^i [L_2]^j \quad (2.4.2)$$

e as frações de sítios saturados (saturação fracional) pelos ligantes L_1 e L_2 são, respectivamente

$$Y_1 = \frac{\frac{1}{n} \frac{\sum_i \sum_j i k_{i,j} [L_1]^i [L_2]^j}{\sum_i \sum_j k_{i,j} [L_1]^i [L_2]^j}}{\frac{\partial \log \sum_i \sum_j k_{i,j} [L_1]^i [L_2]^j}{\partial \log [L_1]}} = \frac{1}{n} \frac{\partial \log \sum_i \sum_j k_{i,j} [L_1]^i [L_2]^j}{\partial \log [L_1]} \quad (2.4.3)$$

$$Y_2 = \frac{1}{m} \frac{\partial \log \sum_i \sum_j k_{i,j} [L_1]^i [L_2]^j}{\partial \log [L_2]} \quad (2.4.4)$$

Consideremos a reação



aonde M^i designa todas as espécies químicas que contêm i molé

culas de L_1 adicionadas.

$$[M^i] = \sum_j [M_{i,j}] = [M_{00}] [L_1]^i \sum_j k_{i,j} [L_2]^j \quad (2.4.6)$$

$$[M^{i-1}] = \sum_j [M_{i-1,j}] = [M_{00}] [L_1]^{i-1} \sum_j k_{i-1,j} [L_2]^j \quad (2.4.7)$$

A constante de equilíbrio \bar{k}_i é dada por

$$\bar{k}_i = \frac{[M^i]}{[M^{i-1}] [L_1]} = \frac{\sum_j k_{i,j} [L_2]^j}{\sum_j k_{i-1,j} [L_2]^j} \quad (2.4.8)$$

Diferenciando $\log(\bar{k}_i)$ com respeito a $\log(L_2)$, obtemos

$$\frac{\partial \log(\bar{k}_i)}{\partial \log(L_2)} = \frac{\partial \log \sum_j k_{i,j} [L_2]^j}{\partial \log [L_2]} - \frac{\partial \log \sum_j k_{i-1,j} [L_2]^j}{\partial \log [L_2]} = m(Y_2^i - Y_2^{i-1}) \quad (2.4.9)$$

aonde Y_2^i e Y_2^{i-1} são respectivamente, as saturações fracionais, com respeito ao ligante L_2 , das espécies químicas com i e $i-1$ moléculas de ligante L_1 adicionadas. A diferença $(Y_2^i - Y_2^{i-1})$ é uma medida da quantidade (ΔL_2) de ligante L_2 adicionado ou liberado quando ocorre a adição de i -ésima molécula de L_1 , de forma que

$$\frac{\partial \log \bar{k}_i}{\partial \log [L_2]} = m \Delta L_2 \quad (2.4.10)$$

A aplicação da equação (2.4.10) ao efeito Bohr leva à relação

$$\Delta H_i^+ = \frac{\partial \log k_i}{\partial \text{pH}} \quad i = 1, \dots, 4 \quad (2.4.11)$$

aonde ΔH_i^+ é o número de prótons liberados na i ésima etapa da oxigenação

O trabalho de Imai e Yonetani³³ mostra que a forma da curva de saturação fracional varia com o pH e, portanto, a cooperatividade e o efeito Bohr são fenômenos interligados. Alguns resultados experimentais estão expostos na TABELA 2.4.1 ; o número de prótons liberados na última etapa de oxigenação permanece constante na faixa de pH 8,8 - 6,5.

Wyman³⁴ propôs um modelo para o efeito Bohr em que há participação de oito sítios (dois em cada subunidade). No modelo de Wyman as subunidades α e β são equivalentes. Cálculos por nós efetuados indicam que as afinidades das subunidades α e β por oxigênio variam diferentemente com a concentração de H^+ ; os resultados estão comentados no capítulo IV.

Os efetores DPG e IHP ligam-se a um sítio em cada molécula de hemoglobina. A aplicação da equação (2.4.8) leva à relação

$$\bar{k}_i = k_i \frac{1 + M_i [L]}{1 + M_{i-1} [L]} \quad i = 1, \dots, 4 \quad (2.4.12)$$

aonde \bar{k}_i e k_i são as constantes de Adair intrínsecas na presença e na ausência do efetor, $[L]$ designa a concentração de DPG ou IHP e M_0, \dots, M_4 são as constantes de equilíbrio de adição

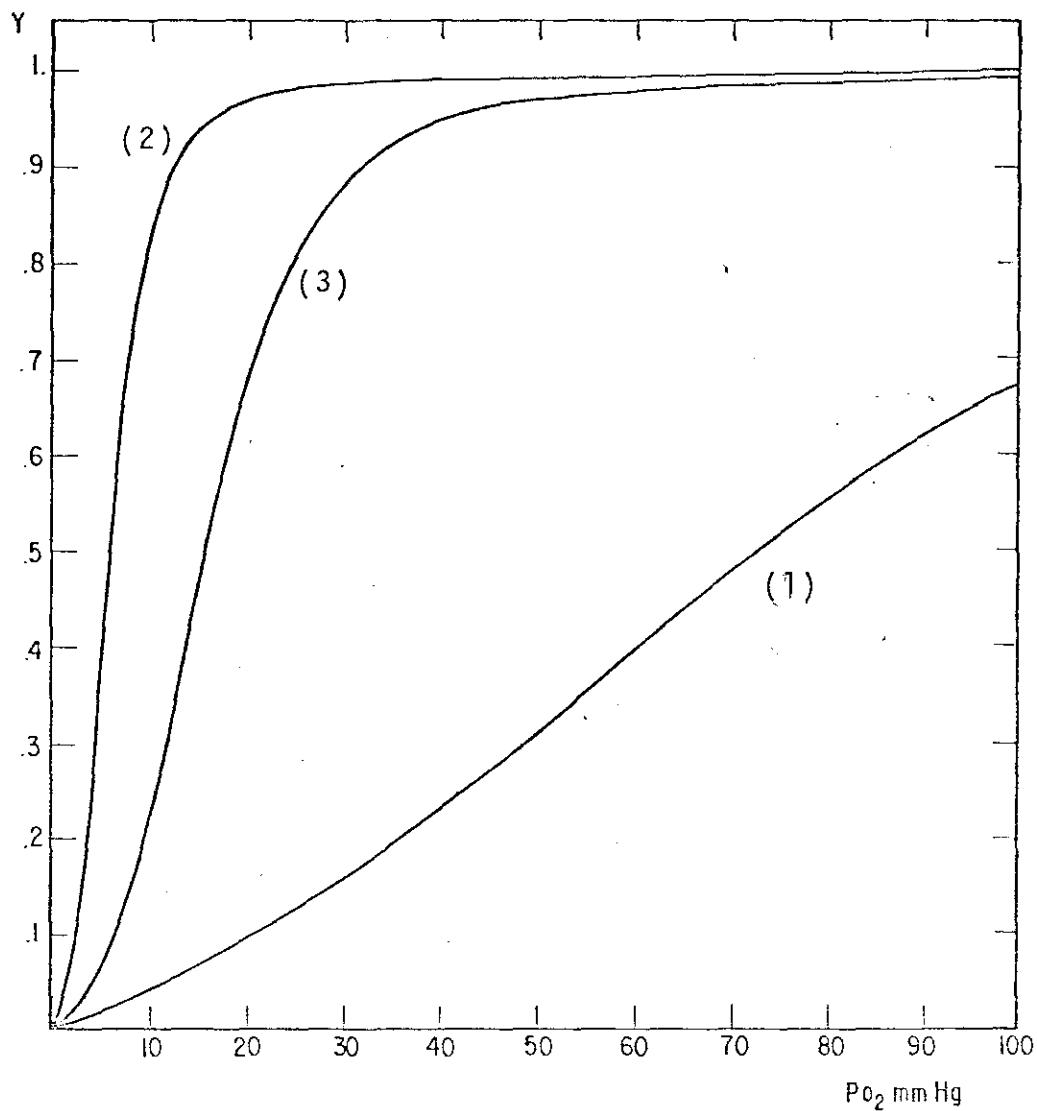


FIGURA 2.4.1

Curvas de saturação fracional²⁵ da hemoglobina nas condições:

(1) 1,7 mM IHP

(2) 0,1 M HCl

(3) 0,1 M HCl, 2,0 mM DPG

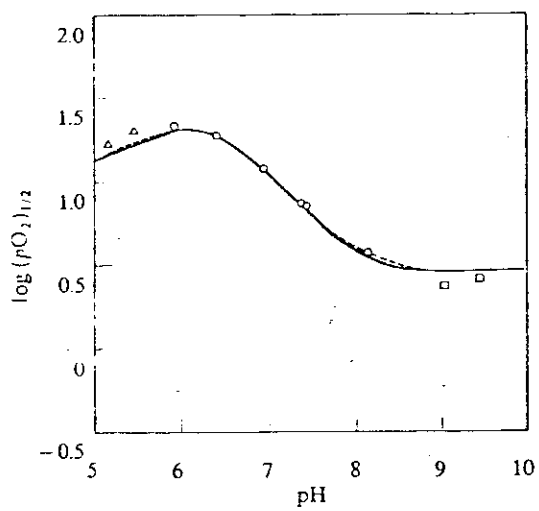


FIGURA 2.4.2

Efeito Bohr

ΔH_i^+ (mol/l)			
i	pH 8,25	pH 7,5	pH 6,6
1	0,30	0,43	0,41
2	0,54	0,80	0,53
3	0,28	1,07	0,56
4	0,10	0,10	0,11

TABELA 2.4.1

Protons liberados em cada etapa(i) da oxigenação da hemoglobina; valores determinados por Imai e Yonetani⁴³.

TABELA 2.4.2

Efator	Referência	M_0	M_1	M_2	M_3	M_4
DPG	25	$3,1 \times 10^4$	$1,81 \times 10^4$	-	-	-
DPG	35	$8,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$7,7 \times 10^2$
IHP	35	$2,4 \times 10^7$	-	-	-	$2,0 \times 10^3$

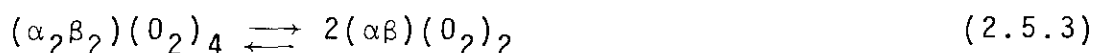
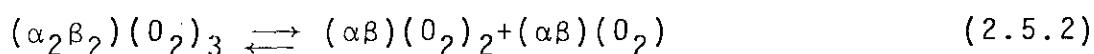
valores das constantes de equilíbrio de adição dos efetores DPG e IHP

do efetor às espécies $Hb, \dots, Hb(O_2)_4$, respectivamente.

Na TABELA 2.4.2 estão expostos alguns valores de M_i determinados experimentalmente^{25,35}. A afinidade da hemoglobina por DPG e IHP decresce nas sucessivas etapas de oxigenação. A hemoglobina liga-se a IHP com uma afinidade maior do que a DPG; a substituição na equação (2.4.12) das constantes de adição de IHP mostra que na presença deste efetor as constantes de Adair são drasticamente reduzidas, i.e., a afinidade por oxigênio diminui, o que permite explicar as diferenças entre as curvas 1 e 3 da FIGURA 2.4.1.

2.5 - Associação entre as Subunidades

As propriedades do tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$ estão relacionadas com as propriedades das cadeias α e β isoladas e do dímero $\alpha\beta$. A hemoglobina, em seus diversos estados de ligação, dissocia-se em dímeros $\alpha\beta$ através de reações do tipo³⁶



A FIGURA 2.5.1 mostra como estão relacionados os valores experimentais das diversas energias livres envolvidas.

O dímero $\alpha\beta$ apresenta-se como não cooperativo dentro

do erro experimental, já que as suas duas energias livres de oxigenação (no canto esquerdo da FIGURA 2.5.1) são iguais. As espécies químicas $\alpha_2\beta_2$, $(\alpha_2\beta_2)(O_2)$ e $(\alpha_2\beta_2)(O_2)_3$ estão estabilizadas por energias livres de associação decrescentes (em valor absoluto) o que está de acordo com a idéia de que nas sucessivas etapas de oxigenação contactos nas interfaces $\alpha_I\beta_{II}$ e $\alpha_{II}\beta_I$ são rompidos, mas a espécie $(\alpha_2\beta_2)(O_2)_4$ é um pouco mais estável do que a espécie $(\alpha_2\beta_2)(O_2)_3$. O deoxitetramero é 6.3 kcal/mol mais estável do que o tetraoxitetramero; segundo a FIGURA 2.5.1, esta energia livre de estabilização está distribuída entre a primeira etapa de oxigenação, as duas etapas intermediárias e a última etapa, de forma que não há uma transição definitiva que ocorra em uma determinada etapa, o que está em desacordo com o modelo MWC (ver Introdução). O fato de a energia livre de associação que leva à espécie completamente oxigenada ser menor do que a energia livre de dissociação que leva à espécie triplamente oxigenada constitui o efeito³⁷ denominado "quaternary enhancement" em que a hemoglobina triplamente oxigenada tem uma energia livre de oxigenação cerca de 600 cal/mol menor do que as subunidades β isoladas, ou seja, a associação entre as subunidades faz com que a hemoglobina, em sua última etapa de oxigenação, tenha uma afinidade por oxigênio maior do que a das subunidades isoladas.

As subunidades β , quando na ausência de subunidades α , formam o tetrâmero β_4 não cooperativo. Verifica-se³⁷ que a energia livre de oxigenação de uma subunidade β que faz parte do tetrâmero β_4 ($\Delta G_{\beta_4}^0 = -8,56 \pm 0,12$ kcal/mol) é menor do que a energia livre de oxigenação de uma subunidade β na forma de mo

número ($\Delta G_{\beta}^0 = 7,72 \pm 0,3$ kcal/mol). A energia livre de oxigenação de uma subunidade α isolada ($\Delta G_{\alpha}^0 = 8,11 \pm 0,08$ kcal/mol) é menor do que a energia livre de oxigenação de uma subunidade β na forma de monômero e maior do que a energia livre de adição de uma molécula de oxigênio ao tetrâmero β_4 .

Resta saber qual é a relação entre as energias livres de oxigenação das subunidades α e β na molécula de hemoglobina. Há evidências experimentais^{38,39}, sobre o que foi denominado o xigenação preferencial das cadeias α , que indicam que, em sucessivos estados de equilíbrio em que a saturação por oxigênio de uma solução de hemoglobina é feita aumentar, as cadeias α são oxigenadas antes das cadeias β , i.e., a população de cadeias α oxigenadas, quando a saturação por oxigênio é pequena, é maior do que a população de cadeias β oxigenadas; as evidências experimentais também indicam que os efetores DPG e IHP, que ligam-se seletivamente interface $\alpha\beta$, reduzindo assim a afinidade das cadeias β por oxigênio, acentuam a oxigenação preferencial.

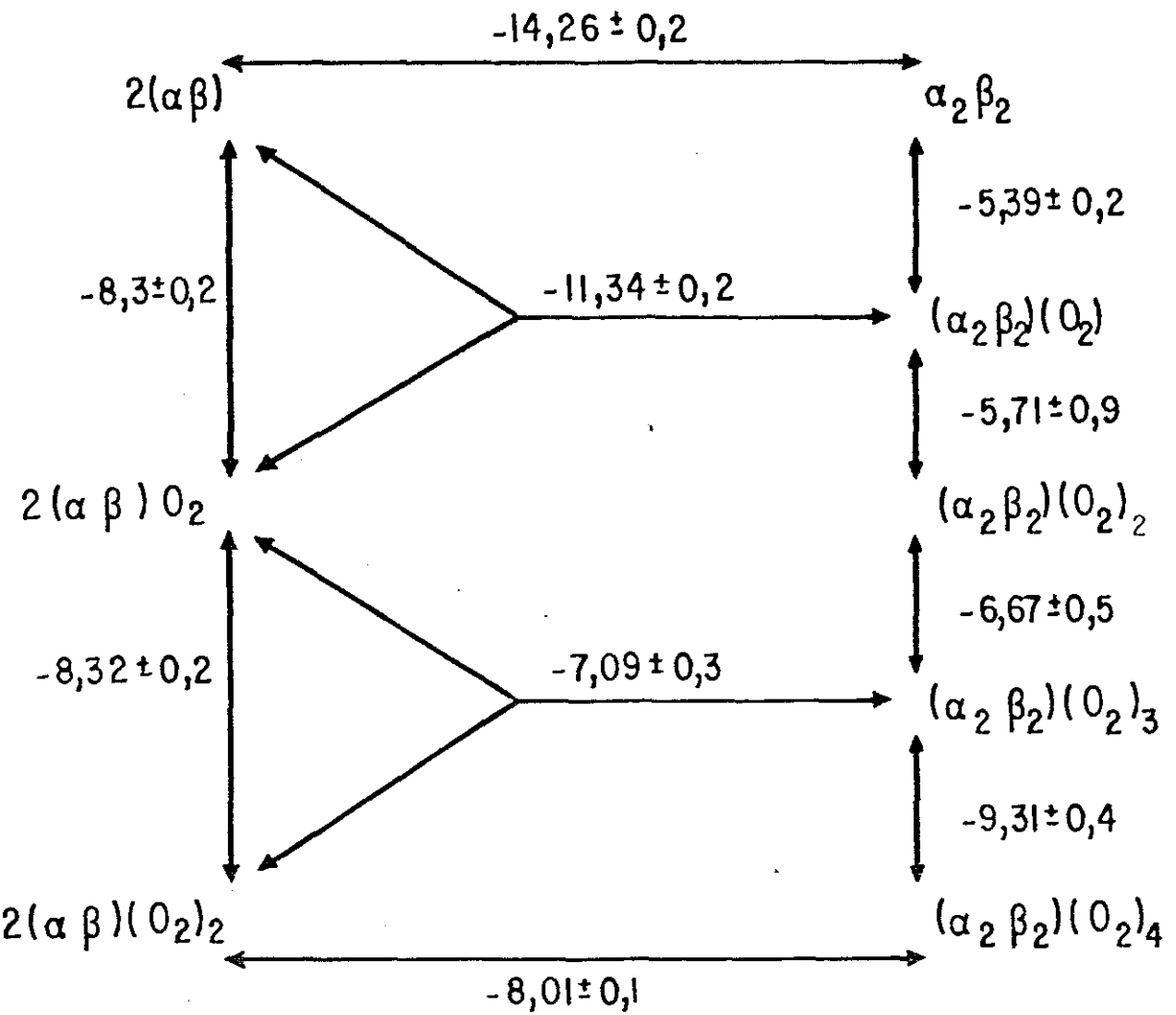


FIGURA 2.5.1

Associação Dímero-Tetrâmero³⁶.

CAPÍTULO III

3 - UM MODELO DIMÉRICO

3.1 - Descrição do Modelo

Um modelo útil para se entender, não todos, mas alguns aspectos do equilíbrio entre hemoglobina e oxigênio é um dímero hipotético formado pelas subunidades δ e γ , semelhantes às cadeias α e β da molécula de hemoglobina. À semelhança do que ocorre com as moléculas de hemoglobina, as subunidades δ e γ são passíveis de interações alostéricas; além disso, é incluído no modelo um agente heterotrópico L que liga-se seletivamente às cadeias γ .

Como já foi comentado (Introdução), neste trabalho fazemos uma análise sobre as consequências da diferenciação entre as cadeias α e β ; para tanto, permitimos que as cadeias γ do dímero transformem-se em cadeias δ , obtendo assim um homodímero $\delta\delta$. Desta forma, podemos comparar um heterodímero com um homodímero.

Nas equações que se seguem, os índices δ , γ , $\delta\gamma$ e $\gamma\delta$ indicam, respectivamente, adição de oxigênio a uma cadeia δ , a uma cadeia γ , a uma cadeia γ quando a cadeia δ já foi ocupada e a uma cadeia δ quando a cadeia γ já foi ocupada. Estes índices indicam também adição do ligante L às espécies $\delta O_2\gamma$, $\delta\gamma O_2$, etc...

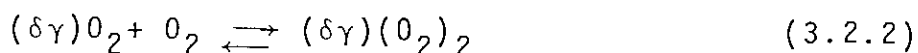
Os índices Δ e D referem-se, respectivamente, à adi-

ção de O_2 e a adição de L. Da mesma forma, K e k denotam constantes de equilíbrio com O_2 e M denota constantes de equilíbrio com L. Para as entalpias, entropias e energias livres, usamos os símbolos usuais H, S e G. O símbolo de uma espécie química entre chaves ($[]$) indica a sua concentração.

No capítulo seguinte, sobre o equilíbrio Hb/ O_2 , utilizamos uma notação semelhante à exposta acima.

3.2 - Constantes de Equilíbrio

De modo análogo ao modelo proposto por Gilbert Adair para o equilíbrio Hb/ O_2 , a adição de oxigênio ao dímero ocorre em duas etapas



As reações (3.2.1) e (3.2.2) estão associadas as constantes de equilíbrio extrínsecas K_1 e K_2 . As constantes de equilíbrio extrínsecas estão relacionadas (ver capítulo II) pelos fatores estatísticos 1/2 e 2 às constantes de equilíbrio intrínsecas k_1 e k_2

$$K_1 = 2k_1 \quad (3.2.3)$$

$$K_2 = \frac{1}{2}k_2 \quad (3.2.4)$$

A saturação fracional do dímero é dada, como função

das constantes de equilíbrio extrínsecas e intrínsecas e da concentração de oxigênio (ou atividade) $|O_2|$, pelas equações

$$Y = \frac{K_1 [O_2] + 2K_1 K_2 [O_2]^2}{2\{1 + K_1 [O_2] + K_1 K_2 [O_2]^2\}} \quad (3.2.5)$$

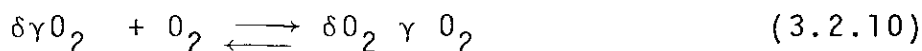
$$Y = \frac{k_1 [O_2] + k_1 k_2 [O_2]^2}{1 + 2k_1 [O_2] + k_1 k_2 [O_2]^2} \quad (3.2.6)$$

Se considerarmos as diferenças entre as cadeias δ e γ , há duas reações de adição da primeira molécula de oxigênio ao dímero



com constantes de equilíbrio k_δ e k_γ , respectivamente, de acordo com a convenção que fizemos acima.

Do mesmo modo, há duas reações de adição da segunda molécula de oxigênio ao dímero, com constantes de equilíbrio $k_{\delta\gamma}$ e $k_{\gamma\delta}$.



Para obtermos as constantes de equilíbrio k_1 e k_2 como função de k_δ , k_γ , $k_{\delta\gamma}$ e $k_{\gamma\delta}$, partimos das equações

$$k_1 = \frac{1}{2} \frac{[\delta\gamma(O_2)]}{[\delta\gamma][O_2]} \quad (3.2.11)$$

$$k_2 = 2 \frac{[\delta\gamma(O_2)_2]}{[\delta\gamma(O_2)][O_2]} \quad (3.2.12)$$

deduzidas de (3.2.1), (3.2.2), (3.2.3) e (3.2.4).

Como hã duas especies monooxigenadas ($\delta O_2\gamma$ e $\delta\gamma O_2$), a concentraçãõ de dímero monooxigenado ã dada por

$$[\delta\gamma(O_2)] = [\delta O_2\gamma] + [\delta\gamma O_2] \quad (3.2.13)$$

A partir de (3.2.7) e (3.2.8), obtemos que

$$[\delta O_2\gamma] = k_\delta [\delta\gamma][O_2] \quad (3.2.14)$$

$$[\delta\gamma O_2] = k_\gamma [\delta\gamma][O_2] \quad (3.2.15)$$

Da mesma forma, a partir de (3.2.7), (3.2.8), (3.2.9) e (3.2.10), obtemos

$$[\delta O_2\gamma O_2] = k_\delta k_{\delta\gamma} [\delta\gamma][O_2]^2 = k_\gamma k_{\gamma\delta} [\delta\gamma][O_2]^2 \quad (3.2.16)$$

aonde $k_\delta k_{\delta\gamma} = k_\gamma k_{\gamma\delta}$ por conservaçãõ de energia livre

Substituindo (3.2.14), (3.2.15) e (3.2.16) em (3.2.11) e (3.2.12), obtemos

$$k_1 = \frac{1}{2} (k_\delta + k_\gamma) \quad (3.2.17)$$

$$k_2 = 2 \frac{k_\delta k_{\delta\gamma}}{k_\delta + k_\gamma} \quad (3.2.18)$$

Substituindo (3.2.17) e (3.2.18) em (3.2.6), obtemos

$$Y = \frac{\frac{1}{2} (k_{\delta} + k_{\gamma}) [O_2] + k_{\delta} k_{\delta\gamma} [O_2]^2}{1 + (k_{\delta} + k_{\gamma}) [O_2] + k_{\delta} k_{\delta\gamma} [O_2]^2} \quad (3.2.19)$$

Esta última equação ilustra o fato de que parte da informação experimental que temos sobre o equilíbrio Hb/O₂, (curva de saturação fracional) não depende explicitamente das constantes dos equilíbrios intermediários (neste modelo (3.2.7) , (3.2.8) e (3.2.9)) mas sim de como estas constantes se agregam para formar as constantes de Adair.

Se o equilíbrio $\delta\gamma/O_2$ ocorre na presença de um agente heterotrópico L que liga-se seletivamente às cadeias γ , as equações (3.2.17) e (3.2.18) tornam-se algo diferentes.

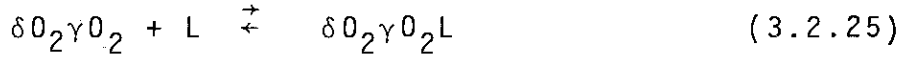
Temos agora quatro espécies monooxigenadas e duas espécies dioxigenadas, de forma que

$$[\delta\gamma(O_2)] = [\delta O_2\gamma] + [\delta O_2\gamma L] + [\delta\gamma O_2] + [\delta\gamma O_2 L] \quad (3.2.20)$$

$$[\delta\gamma(O_2)_2] = [\delta O_2\gamma O_2] + [\delta O_2\gamma O_2 L] \quad (3.2.21)$$

aonde $[\delta O_2\gamma]$, $[\delta\gamma O_2]$ e $[\delta O_2\gamma O_2]$ são dadas por (3.2.14), (3.2.15) e (3.2.16).

Para obtermos as concentrações das demais espécies presentes nas equações (3.2.20) e (3.2.21), temos que considerar as seguintes reações de adição do ligante L:



cujas constantes de equilíbrio são, respectivamente, M_0 , M_δ , M_γ e $M_{\delta\gamma}$.

A partir de (3.2.22), temos que a concentração total de deoxidímero é dada por

$$[\delta\gamma]_T = [\delta\gamma] + [\delta\gamma L] = [\delta\gamma](1 + M_0 [L]) \quad (3.2.26)$$

Da mesma forma, a partir de (3.2.14), (3.2.15), (3.2.23) e (3.2.24), obtemos que

$$[\delta O_2\gamma L] = k_\delta M_\delta [\delta\gamma] [O_2] [L] \quad (3.2.27)$$

$$[\delta\gamma O_2 L] = k_\gamma M_\gamma [\delta\gamma] [O_2] [L] \quad (3.2.28)$$

e, a partir de (3.2.16) e (3.2.25), obtemos que

$$[\delta O_2\gamma O_2 L] = k_\delta k_{\delta\gamma} M_{\delta\gamma} [\delta\gamma] [O_2]^2 [L] \quad (3.2.29)$$

As constantes de Adair são agora dadas por

$$k_1 = \frac{1}{2} \frac{[\delta\gamma(O_2)]_T}{[\delta\gamma]_T [O_2]} = \frac{1}{2} \frac{k_\delta(1 + M_\delta [L]) + k_\gamma(1 + M_\gamma [L])}{1 + M_0 [L]} \quad (3.2.30)$$

$$k_2 = 2 \frac{[(\delta\gamma)(O_2)_2]_T}{[\delta\gamma(O_2)]_T [O_2]} = \frac{2 k_\delta k_{\delta\gamma} (1 + M_{\delta\gamma} [L])}{k_\delta(1 + M_\delta [L]) + k_\gamma(1 + M_\gamma [L])} \quad (3.2.31)$$

aonde

$$\begin{aligned} [\delta\gamma(O_2)]_T &= [\delta O_2\gamma] + [\delta O_2\gamma L] + [\delta\gamma O_2] + [\delta\gamma O_2 L] = \\ &= k_\delta(1+M_\delta[L]) [\delta\gamma] [O_2] + k_\gamma(1+M_\gamma[L]) [\delta\gamma] [O_2] \end{aligned} \quad (3.2.32)$$

$$\begin{aligned} [\delta\gamma(O_2)_2]_T &= [\delta O_2\gamma O_2] + [\delta O_2\gamma O_2 L] = \\ &= k_\delta k_{\delta\gamma}(1+M_{\delta\gamma}[L]) [O_2]^2 [\delta\gamma] \end{aligned} \quad (3.2.33)$$

e $|\delta\gamma|_T$ é dada pela equação (3.2.26).

3.3 - Entalpias, Entropias e Energias Livres de Oxigenação

Aplicando as relações

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

$$\Delta S = R \frac{d}{dT} T \ln k \quad (3.3.2)$$

$$\frac{dk}{dT} = k \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (3.3.3)$$

$$\frac{\Delta H}{T} = \Delta S - R \ln k \quad (3.3.4)$$

nas equações (3.2.30) e (3.2.31), obtemos expressões para as entalpias e entropia de oxigenação intrínsecas na presença de L.

Antes de expormos os resultados obtidos é conveniente fazer as seguintes definições:

J_δ e J_γ são as frações das espécies monooxigenadas sem ligante adicionado

$$J_\delta = \frac{[\delta O_2 \gamma]}{[\delta O_2 \gamma] + [\delta O_2 \gamma L] + [\delta \gamma O_2] + [\delta \gamma O_2 L]} = \frac{k_\delta}{k_\delta(1+M_\delta[L]) + k_\gamma(1+M_\gamma[L])} \quad (3.3.5)$$

$$J_\gamma = \frac{[\delta \gamma O_2]}{[\delta O_2 \gamma] + [\delta O_2 \gamma L] + [\delta \gamma O_2] + [\delta \gamma O_2 L]} = \frac{k_\gamma}{k_\delta(1+M_\delta[L]) + k_\gamma(1+M_\gamma[L])} \quad (3.3.6)$$

h_δ e h_γ são as frações das espécies monooxigenadas com ligante adicionado

$$h_\delta = \frac{[\delta O_2 \gamma L]}{[\delta O_2 \gamma] + [\delta O_2 \gamma L] + [\delta \gamma O_2] + [\delta \gamma O_2 L]} = \frac{k_\delta M_\delta [L]}{k_\delta(1+M_\delta[L]) + k_\gamma(1+M_\gamma[L])} \quad (3.3.7)$$

$$h_\gamma = \frac{[\delta \gamma O_2 L]}{[\delta O_2 \gamma] + [\delta \gamma O_2 L] + [\delta \gamma O_2] + [\delta \gamma O_2 L]} = \frac{k_\delta M_\gamma [L]}{k_\delta(1+M_\delta[L]) + k_\gamma(1+M_\gamma[L])} \quad (3.3.8)$$

e

$$n_\delta = j_\delta + h_\delta \quad (3.3.9)$$

$$n_\gamma = j_\gamma + h_\gamma \quad (3.3.10)$$

$j_{\delta\gamma}$ e $h_{\delta\gamma}$ são, respectivamente, as frações das espécies dioxigenadas sem e com ligante adicionado

$$j_{\delta\gamma} = \frac{[\delta O_2 \gamma O_2]}{[\delta O_2 \gamma O_2] + [\delta O_2 \gamma O_2 L]} = \frac{1}{(1+M_{\delta\gamma}[L])} \quad (3.3.11)$$

$$h_{\delta\gamma} = \frac{[\delta O_2 \gamma O_2 L]}{[\delta O_2 \gamma O_2] + [\delta O_2 \gamma O_2 L]} = \frac{M_{\delta\gamma} [L]}{(1+M_{\delta\gamma} [L])} \quad (3.3.12)$$

p e q são, respectivamente, as frações das espécies deoxigenadas sem e com ligante adicionado

$$p = \frac{[\delta\gamma]}{[\delta\gamma] + [\delta\gamma L]} = \frac{1}{1 + M_0 [L]} \quad (3.3.11)$$

$$q = \frac{[\delta\gamma L]}{[\delta\gamma] + [\delta\gamma][L]} = \frac{M_0 [L]}{1 + M_0 [L]} \quad (3.3.12)$$

É interessante observar que

$$p + q = 1 \quad (3.3.15)$$

$$h_\delta + J_\delta + h_\gamma + J_\gamma = n_\delta + h_\gamma = 1 \quad (3.3.16)$$

$$J_{\delta\gamma} + h_{\delta\gamma} = 1 \quad (3.3.17)$$

ΔH_δ^0 , ΔS_δ^0 e ΔG_δ^0 , ΔH_γ^0 , ΔS_γ^0 e ΔG_γ^0 , $\Delta H_{\delta\gamma}^0$, $\Delta S_{\delta\gamma}^0$ e $\Delta G_{\delta\gamma}^0$, DH_δ^0 , DS_δ^0 e DG_δ^0 , DH_γ^0 , DS_γ^0 e DG_γ^0 , $DH_{\delta\gamma}^0$, $DS_{\delta\gamma}^0$ e $DG_{\delta\gamma}^0$ são, respectivamente, as entalpias, entropias e energias livres das reações (3.2.7), (3.2.8), (3.2.9), (3.2.22), (3.2.23), (3.2.24) e (3.2.25)

ΔH_1^0 , ΔS_1^0 e ΔG_1^0 , ΔH_2^0 , ΔS_2^0 e ΔG_2^0 são, respectivamente, as entalpias, entropias e energias livres padrão das reações (3.2.1) e (3.2.2).

Temos ainda, as entropias e energias livres de mistura das várias espécies presentes

$$\mu S_0 = pR \ln p + qR \ln q \quad (3.3.18)$$

$$\mu G_0 = T \mu S_0 \quad (3.3.19)$$

$$\mu S_1 = J_\delta R \ln J_\delta + J_\gamma R \ln J_\gamma + h_\delta R \ln h_\delta + h_\gamma R \ln h_\gamma \quad (3.3.20)$$

$$\mu G_1 = T \mu S_1 \quad (3.3.21)$$

$$\mu S_2 = J_{\delta\gamma} R \ln J_{\delta\gamma} + h_{\delta\gamma} R \ln h_{\delta\gamma} \quad (3.3.22)$$

$$\mu G_2 = T \mu S_2 \quad (3.3.23)$$

e as seguintes variáveis

$$\sigma H_0 = qDH_0^0; \quad \sigma S_0 = qDS_0^0; \quad \sigma G_0 = qDG_0^0 \quad (3.3.24)$$

$$\sigma H_1 = h_\delta DH_\delta^0 + h_\gamma DH_\gamma^0; \quad \sigma S_1 = h_\delta DS_\delta^0 + h_\gamma DS_\gamma^0; \quad \sigma G_1 = h_\delta DG_\delta^0 + h_\gamma DG_\gamma^0 \quad (3.3.25)$$

$$\sigma H_2 = h_{\delta\gamma} DH_{\delta\gamma}^0; \quad \sigma S_2 = h_{\delta\gamma} DS_{\delta\gamma}^0; \quad \sigma G_2 = h_{\delta\gamma} DG_{\delta\gamma}^0 \quad (3.3.26)$$

$$H_{\delta\gamma}^0 = \Delta H_{\delta\gamma}^0 - \Delta H_\gamma^0 \quad (3.3.27)$$

$$S_{\delta\gamma}^0 = \Delta S_{\delta\gamma}^0 - \Delta S_\gamma^0 \quad (3.3.28)$$

$$G_{\delta\gamma}^0 = \Delta G_{\delta\gamma}^0 - G_\gamma^0 \quad (3.3.29)$$

Aplicando a equação (3.3.1) à equação (3.2.30), obtemos

$$\Delta H_1^0 = j_\delta \Delta H_\delta^0 + h_\delta (\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0) + j_\gamma \Delta H_\gamma^0 + h_\gamma (\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0) - qDH_0^0 \quad (3.3.30)$$

ou

$$\Delta H_1^0 = n_\delta \Delta H_\delta^0 + n_\gamma \Delta H_\gamma^0 + \sigma H_1 - \sigma H_0 \quad (3.3.31)$$

Aplicando a equação (3.3.2) à equação (3.2.30), obtemos

$$\begin{aligned} \Delta S_1^0 = & R \ln \{k_\delta (1 + M_\delta(L)) + k_\gamma (1 + M_\gamma(L))\} + j_\delta \frac{\Delta H_\delta^0}{T} + h_\delta \frac{\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0}{T} + \\ & + j_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0}{T} + h_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0}{T} - R \ln (1 + M_0[L]) - q \frac{DH_0^0}{T} + R \ln \frac{1}{2} \end{aligned} \quad (3.3.32)$$

Esta equação pode ser simplificada com a utilização das relações

$$R \ln(1+M_o[L]) + q \frac{\Delta H_o^0}{T} = qDS_o^0 + Rq \ln[L] - \mu S_o \quad (3.3.33)$$

$$R \ln \{k_\delta(1+M_\delta[L]) + k_\gamma(1+M_\gamma[L])\} + j_\delta \frac{\Delta H_\delta^0}{T} + h_\delta \frac{\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0}{T} + j_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0}{T} + h_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0}{T} = n_\delta \Delta S_\delta^0 + n_\gamma \Delta S_\gamma^0 + \sigma S_1 + (h_\delta + h_\gamma) R \ln[L] - \mu S_1 \quad (3.3.34)$$

assumindo a forma

$$\Delta S_1 = n_\delta \Delta S_\delta^0 + n_\gamma \Delta S_\gamma^0 + \sigma S_1 - \sigma S_o + R\{h_\delta + h_\gamma - q\} \ln[L] - \mu S_1 + \mu S_o + R \ln \frac{1}{2} \quad (3.3.35)$$

Combinando (3.3.31) e (3.3.35) através da relação fundamental

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (3.3.36)$$

obtemos

$$\Delta G_1^0 = n_\delta \Delta G_\delta^0 + n_\gamma \Delta G_\gamma^0 + \sigma G_1 - \sigma G_o + \mu G_1 - \mu G_o - RT(h_\delta + h_\gamma - q) \ln[L] - RT \ln \frac{1}{2} \quad (3.3.37)$$

Através de um procedimento análogo ao utilizado na obtenção das equações (3.3.31), (3.3.35) e (3.3.37), aplicamos a equação (3.3.1) à equação (3.2.31), tendo como resultado

$$\Delta H_2^0 = \Delta H_\delta^0 + \Delta H_{\delta\gamma}^0 + h_{\delta\gamma} DH_{\delta\gamma}^0 - j_\delta DH_\delta^0 - j_\gamma DH_\gamma^0 - h_\delta (\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0) - h_\gamma (\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0) \quad (3.3.38)$$

ou

$$\Delta H_2^0 = \Delta H_\delta^0 + H_{\delta\gamma}^0 - n_\delta \Delta H_\delta^0 - n_\gamma \Delta H_\gamma^0 + \sigma H_2 - \sigma H_1 \quad (3.3.39)$$

Acrescentando e subtraindo ΔH_γ^0 a esta última equação e utilizando a relação (3.3.16), obtemos

$$\Delta H_2^0 = H_{\delta\gamma}^0 + n_\delta \Delta H_\gamma^0 + n_\gamma \Delta H_\delta^0 + \sigma H_2 - \sigma H_1 \quad (3.3.40)$$

onde $H_{\delta\gamma}^0 = \Delta H_{\delta\gamma}^0 - \Delta H_\gamma^0$

Aplicando a equação (3.3.2) à equação (3.2.31), obtemos

$$\begin{aligned} \Delta S_2^0 = & R \ln k_\delta k_{\delta\gamma} + \frac{\Delta H_\delta^0 + \Delta H_{\delta\gamma}^0}{T} + R \ln(1 + M_{\delta\gamma}(L)) + h_{\delta\gamma} \frac{DH_{\delta\gamma}^0}{T} + \\ & - R \ln\{k_\delta(1 + M_\delta(L)) + k_\gamma(1 + M_\gamma(L))\} - j_\delta \frac{\Delta H_\delta^0}{T} - h_\delta \frac{\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0}{T} + \\ & - j_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0}{T} - h_\gamma \frac{\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0}{T} + R \ln 2 \end{aligned} \quad (3.3.41)$$

Esta última equação pode ser simplificada com o auxílio das relações

$$R \ln k_\delta k_{\delta\gamma} + \frac{\Delta H_\delta^0 + \Delta H_{\delta\gamma}^0}{T} = \Delta S_\delta^0 + \Delta S_{\delta\gamma}^0 \quad (3.3.42)$$

$$R \ln(1 + M_{\delta\gamma}(L)) + h_{\delta\gamma} \frac{\Delta H_{\delta\gamma}^0}{T} = \sigma S_2 - \mu S_2 + h_{\delta\gamma} R \ln[L] \quad (3.3.43)$$

e (3.3.34), assumindo a forma

$$\begin{aligned} \Delta S_2^0 = & \Delta S_\delta^0 + \Delta S_{\delta\gamma}^0 - n_\delta \Delta S_\delta^0 - n_\gamma \Delta S_\gamma^0 + \sigma S_2 - \sigma S_1 - \mu S_2 + \mu S_1 + \\ & + R(h_{\delta\gamma} - (h_\delta + h_\gamma)) \ln[L] + R \ln 2 \end{aligned} \quad (3.3.44)$$

Adicionando e subtraindo ΔS_Y^0 a esta última equação e utilizando a relação (3.3.16), obtemos

$$\Delta S_2^0 = S_{\delta Y}^0 + n_{\delta} \Delta S_Y^0 + n_Y \Delta S_{\delta}^0 + \sigma S_2 - \sigma S_1 - \mu S_2 + \mu S_1 + \\ + R(h_{\delta Y} - (h_{\delta} + h_Y)) \ln[L] + R \ln 2$$

aonde $S_{\delta Y}^0 = \Delta S_{\delta Y}^0 - \Delta S_Y^0$.

Combinando (3.3.40) e (3.3.45) através da relação fundamental (3.3.36), obtemos

$$\Delta G_2^0 = G_{\delta Y}^0 + n_{\delta} \Delta G_Y^0 + n_Y \Delta G_{\delta}^0 + \sigma G_2 - \sigma G_1 + \\ + \mu G_2 - \mu G_1 - RT(h_{\delta Y} - (h_{\delta} + h_Y)) \ln[L] - RT \ln 2 \quad (3.3.46)$$

aonde $G_{\delta Y}^0 = \Delta G_{\delta Y}^0 - \Delta G_Y^0$

Podemos obter agora as entalpias, entropias e energias livres de interação alostérica. Subtraindo (3.3.31) de (3.3.40), (3.3.35) de (3.3.45) e (3.3.37) de (3.3.46), obtemos, respectivamente

$$\Delta H_2^0 - \Delta H_1^0 = H_{21}^0 = H_{\delta Y}^0 + (n_{\delta} - n_Y)(\Delta H_Y^0 - \Delta H_{\delta}^0) + \sigma H_2 - 2\sigma H_1 + \sigma H_0 \quad (3.3.47)$$

$$\Delta S_2^0 - \Delta S_1^0 = S_{21}^0 = S_{\delta Y}^0 + (n_{\delta} - n_Y)(\Delta S_Y^0 - \Delta S_{\delta}^0) + \sigma S_2 - 2\sigma S_1 + \sigma S_0 + \\ - \mu S_2 + 2\mu S_1 - \mu S_0 + R(h_{\delta Y} - 2(h_{\delta} + h_Y) + q) \ln[L] + R \ln 4 \quad (3.3.48)$$

$$\Delta G_2^0 - \Delta G_1^0 = G_{21}^0 = G_{\delta Y}^0 + (n_{\delta} - n_Y)(\Delta G_Y^0 - \Delta G_{\delta}^0) + \sigma G_2 - 2\sigma G_1 + \sigma G_0 + \\ + \mu G_2 - 2\mu G_1 + \mu G_0 - RT(h_{\delta Y} - (2h_{\delta} + h_Y) + q) \ln[L] - RT \ln 4 \quad (3.3.49)$$

Quando o agente heterotrópico está ausente ($[L] = 0$) obtemos as seguintes equações:

$$\Delta H_1^0 = j_\delta \Delta H_\delta^0 + j_\gamma \Delta H_\gamma^0 \quad (3.3.50)$$

$$\Delta S_1^0 = j_\delta \Delta S_\delta^0 + j_\gamma \Delta S_\gamma^0 - \mu S_1 + R \ln \frac{1}{2} \quad (3.3.51)$$

$$\Delta G_1^0 = j_\delta \Delta G_\delta^0 + j_\gamma \Delta G_\gamma^0 + \mu G_1 - RT \ln \frac{1}{2} \quad (3.3.52)$$

$$\Delta H_2^0 = H_{\delta\gamma}^0 + j_\delta \Delta H_\gamma^0 + j_\gamma \Delta H_\delta^0 \quad (3.3.53)$$

$$\Delta S_2^0 = S_{\delta\gamma}^0 + j_\delta \Delta S_\gamma^0 + j_\gamma \Delta S_\delta^0 + \mu S_1 + R \ln 2 \quad (3.3.54)$$

$$\Delta G_2^0 = G_{\delta\gamma}^0 + j_\delta \Delta G_\gamma^0 + j_\gamma \Delta G_\delta^0 - \mu G_1 - RT \ln 2 \quad (3.3.55)$$

$$H_{21}^0 = H_{\delta\gamma}^0 + (j_\delta - j_\gamma) (\Delta H_\gamma^0 - \Delta H_\delta^0) \quad (3.3.56)$$

$$S_{21}^0 = S_{\delta\gamma}^0 + (j_\delta - j_\gamma) (\Delta S_\gamma^0 - \Delta S_\delta^0) + 2\mu S_1 + R \ln 4 \quad (3.3.57)$$

$$G_{21}^0 = G_{\delta\gamma}^0 + (j_\delta - j_\gamma) (\Delta G_\gamma^0 - \Delta G_\delta^0) - 2\mu G_1 - RT \ln 4 \quad (3.3.58)$$

sendo que, nas equações para j_δ (3.3.5) e j_γ (3.3.6),

$$[\delta O_2 \gamma L] = [\delta \gamma O_2 L] = 0$$

e que, na equação para μS_1 (3.3.20)

$$h_\delta = h_\gamma = 0$$

Se permitirmos que o dímero $\delta\gamma$ se transforme em um dímero $\delta\delta$, as equações tornam-se bem mais simples:

$$\Delta H_1^0 = \Delta H_\delta^0 \quad (3.3.59)$$

$$\Delta S_1^0 = \Delta S_\delta^0 \quad (3.3.60)$$

$$\Delta G_1^0 = \Delta G_\delta^0 \quad (3.3.61)$$

$$\Delta H_2^0 = \Delta H_{\delta\delta}^0 \quad (3.3.62)$$

$$\Delta S_2^0 = \Delta S_{\delta\delta}^0 \quad (3.3.63)$$

$$\Delta G_2^0 = \Delta G_{\delta\delta}^0 \quad (3.3.64)$$

$$H_{21}^0 = H_{\delta\delta}^0 = \Delta H_{\delta\delta}^0 - \Delta H_{\delta}^0 \quad (3.3.65)$$

$$S_{21}^0 = S_{\delta\delta}^0 = \Delta S_{\delta\delta}^0 - \Delta S_{\delta}^0 \quad (3.3.66)$$

$$G_{21}^0 = G_{\delta\delta}^0 = \Delta G_{\delta\delta}^0 - \Delta G_{\delta}^0 \quad (3.3.67)$$

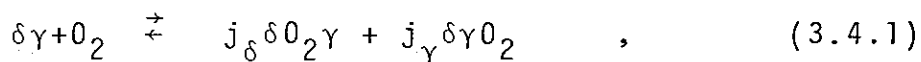
3.4 - Sobre as Entropias de Mistura

As entropias de mistura μS_0 (eq. 3.3.18), μS_1 (eq. 3.3.20) e μS_2 (eq. 3.3.22) resultam da distinguibilidade das cadeias δ e γ e das espécies com e sem ligante adicionado.

Podemos tomar como exemplo o equilíbrio (3.2.1)



no qual as cadeias δ e γ são indistinguíveis, e o equilíbrio



no qual as cadeias δ e γ são distinguíveis.

A estes equilíbrios correspondem as constantes de equilíbrio intrínsecas k_1 (eq. 3.2.17)

$$k_1 = 1/2(k_{\delta} + k_{\gamma})$$

e \underline{k}_1 , que pode ser calculada com o auxílio das equações (3.2.14), (3.2.15) e (3.4.1)

$$\underline{k}_1 = \frac{[\delta O_2 \gamma]^{j_\delta} + [\delta \gamma O_2]^{j_\gamma}}{[\delta \gamma] [O_2]} = k_\delta^{j_\delta} k_\gamma^{j_\gamma} \quad (3.4.2)$$

Aos equilíbrios (3.2.1) e (3.4.1) correspondem também as energias livres

$$\Delta G_1^0 = -RT \ln \frac{1}{2} (k_\delta + k_\gamma) \quad (3.4.3)$$

$$\Delta \underline{G}_1^0 = -RT \ln k_\delta^{j_\delta} k_\gamma^{j_\gamma} \quad (3.4.4)$$

Como pode ser facilmente verificado, subtraindo (3.4.4) de (3.4.3), obtemos

$$\Delta G_1^0 - \Delta \underline{G}_1^0 = -T \mu S_1 - RT \ln 2 \quad (3.4.5)$$

aonde μS_1 é uma entropia de mistura na ausência do agente heterotrópico L ($h_\delta = h_\gamma = 0$).

A equação (3.4.5) ilustra o fato de que a distinguibilidade das espécies químicas que participam dos vários equilíbrios entre $\delta\gamma$, O_2 e L está presente nas entropias de mistura μS_0 , μS_1 e μS_2 .

3.5 - A Fidelidade Térmica do Dímero $\delta\gamma$

Entende-se por fidelidade térmica a manutenção da cooperatividade em um intervalo de temperatura que vai de 5 a 40°C.

A hemoglobina, com outras proteínas, tem uma proteção, (que lhe confere uma certa estabilidade térmica) contra o perigo de se desnaturar quando submetida a uma elevação de temperatura ou a outras mudanças do meio. A desnaturação representa uma perda brusca da identidade da proteína (destruição das estruturas quaternária, terciária e secundárias); a interação alostérica, que é um efeito que envolve troca de energia relativamente pequenas (o equivalente à ruptura de cerca de duas pontes hidrogênio), poderia ser perturbada, ao ponto de cessar a sua função fisiológica, antes da hemoglobina se desnaturar.

O problema da resistência a uma elevação de temperatura se coloca então em dois níveis. Primeiro é necessário que a hemoglobina não perca a sua identidade quando submetida a uma elevação de temperatura; além disso, também é importante que propriedades frágeis, como a interação alostérica, sejam preservadas.

A condição para que o dímero seja cooperativo é que a energia livre intrínseca de adição da segunda molécula de oxigênio seja mais negativa do que a energia livre intrínseca de adição da primeira molécula do oxigênio. Esta condição pode ser expressa como

$$k_2/k_1 > 1 \quad (3.5.1)$$

ou como

$$G_{21}^0 = -RT \ln(k_2/k_1) < 0 \quad (3.5.2)$$

Para entender em que condições o dímero $\delta\gamma$ poderia deixar de ser cooperativo, devemos estudar o comportamento esperado das equações (3.3.47), (3.3.48) e (3.3.49).

A nossa intenção é reproduzir neste modelo as características mais importantes do equilíbrio Hb/O₂. A interação alostérica tende a aumentar a afinidade das subunidades α e β por oxigênio; assim

$$\Delta G_{\alpha\beta}^0 < \Delta G_{\beta}^0 ; \Delta G_{\delta\gamma}^0 < \Delta G_{\gamma}^0 \quad (3.5.3)$$

e, conseqüentemente

$$G_{\delta\gamma}^0 < 0 \quad (3.5.4)$$

Podemos também prever que

$$H_{\delta\gamma}^0 = \Delta H_{\delta\gamma}^0 - \Delta H_{\gamma}^0 < 0 \quad (3.5.5)$$

$$S_{\delta\gamma}^0 = \Delta S_{\delta\gamma}^0 - \Delta S_{\gamma}^0 < 0 \quad (3.5.6)$$

A primeira destas suposições (3.5.5) é justificada com o seguinte argumento: tanto no dímero $\delta\gamma$ quanto na hemoglobina a alosteria é devida ao rompimento de ligações químicas fracas

nas interfaces das subunidades; assim, o calor de adição da primeira molécula de oxigênio a uma subunidade γ (ΔH_{γ}^0) é igual à troca de calor envolvida no rompimento de ligações químicas entre as subunidades subtraída da troca de calor intrínseca à oxigenação de uma subunidade γ . Quando uma molécula de oxigênio é adicionada à espécie $\delta O_{2\gamma}$ para formar o dioxidímero, as ligações químicas fracas entre as subunidades já foram rompidas, de forma que o calor trocado neste caso ($\Delta H_{\delta\gamma}^0$) é mais negativo do que o calor trocado no caso anterior, portanto

$$\Delta H_{\delta\gamma}^0 < \Delta H_{\gamma}^0 \quad (3.5.7)$$

e a inequação (3.5.5) se verifica.

A inequação (3.5.6) é justificada com um argumento semelhante. Podemos atribuir duas contribuições às entropias de oxigenação ΔS_{γ}^0 e $\Delta S_{\delta\gamma}^0$; a perda de entropia de translação da molécula de oxigênio ($(\Delta S_{\gamma}^0)_{tr}$) e as entropias de relaxação resultantes da liberação de graus de liberdade antes constrangidos pelas ligações químicas entre as subunidades $((\Delta S_{\gamma}^0)_r)$ e $((\Delta S_{\delta\gamma}^0)_r)$.

Como $(\Delta S_{\delta\gamma}^0)_r$ é a entropia de relaxação de uma molécula já relaxada é razoável supor que

$$(\Delta S_{\delta\gamma}^0)_r = 0 \quad (3.5.8)$$

temos também que

$$(\Delta S_{\gamma}^0)_r > 0 \quad , \quad (3.5.9)$$

jã que a entropia aumenta quando o sistema \bar{e} relaxado, e que

$$(\Delta S_{\gamma}^0)_{tr} < 0 \quad (3.5.10)$$

$$\Delta S_{\gamma}^0 = (\Delta S_{\gamma}^0)_r + (\Delta S_{\gamma}^0)_{tr} \quad (3.5.11)$$

$$\Delta S_{\delta\gamma}^0 = (\Delta S_{\gamma}^0)_{tr} \quad (3.5.12)$$

subtraindo (3.5.11) de (3.5.12) constatamos que

$$S_{\delta\gamma}^0 = \Delta S_{\delta\gamma}^0 - \Delta S_{\gamma}^0 = -(\Delta S_{\gamma}^0)_r < 0$$

O termo seguinte a ser examinado \bar{e} $(n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta G_{\gamma}^0 - \Delta G_{\delta}^0)$ da equação (3.3.49). Se o efetor L estã ausente (eq.(3.3.58)), o termo $(j_{\delta} - j_{\gamma})(\Delta G_{\gamma}^0 - \Delta G_{\delta}^0)$ \bar{e} sempre positivo, pois, partindo da relação fundamental $K = \exp(-\Delta G/RT)$ e das equações (3.3.5) e (3.3.6) temos que, se $\Delta G_{\delta}^0 < \Delta G_{\gamma}^0$, entã $j_{\delta} > j_{\gamma}$, por outro lado, se $\Delta G_{\gamma}^0 < \Delta G_{\delta}^0$, entã $j_{\gamma} > j_{\delta}$, e a inequação

$$(j_{\delta} - j_{\gamma})(\Delta G_{\gamma}^0 - \Delta G_{\delta}^0) > 0 \quad (3.5.13)$$

sempre se verifica porque os dois termos do lado esquerdo sã ambos positivos ou ambos negativos.

Se admitirmos que, \bar{a} semelhança da ação dos efetores DPG e IHP sobre a interface $\beta\beta$ da molécula de hemoglobina, o efetor L diminui a afinidade das subunidades γ por oxigênio, en

tão a inequação

$$(n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta G_{\gamma}^0 - \Delta G_{\delta}^0) > 0 \quad (3.5.14)$$

também se verifica por serem positivos os dois termos do lado esquerdo.

Seguindo as evidências experimentais que indicam que as subunidades β da molécula de hemoglobina, às quais se ligam os agentes heterotrôpicos DPG e IHP têm menor afinidade por oxigênio do que as subunidades α ($\Delta G_{\alpha}^0 < G_{\beta}^0$), sendo que esta característica se acentua quando a concentração destes agentes heterotrôpicos (DPG) e (IHP) aumenta, assumimos que

$$\Delta G_{\delta}^0 < \Delta G_{\gamma}^0 \quad (3.5.15)$$

e portanto

$$n_{\delta} > n_{\gamma} \quad (3.5.16)$$

Assumimos também que

$$\Delta H_{\delta}^0 < \Delta H_{\gamma}^0 \quad (3.5.17)$$

e, conseqüentemente

$$(n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta H_{\gamma}^0 - \Delta H_{\delta}^0) > 0 \quad (3.5.18)$$

e que

$$\Delta S_{\delta}^0 < \Delta S_{\gamma}^0 \quad (3.5.19)$$

e

$$(n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta S_{\gamma}^0 - \Delta S_{\delta}^0) > 0 \quad (3.5.20)$$

A influência do agente heterotrópico L sobre a interação alostérica é introduzida, em parte, através dos termos $(\sigma H_2 - 2\sigma H_1 + \sigma H_0)$, $(\sigma S_2 - 2\sigma S_1 + \sigma S_0)$ e $(\sigma G_2 - 2\sigma G_1 + \sigma G_0)$, das equações (3.3.47), (3.3.48) e (3.3.49).

A influência de L acentua a diferença entre as cadeias δ e γ . Tomemos como exemplo a equação (3.3.30)

$$\Delta H_1^0 = j_\delta \Delta H_\delta^0 + h_\delta (\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0) + j_\gamma \Delta H_\gamma^0 + h_\gamma (\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0) - q DH_0^0 \quad (3.3.30)$$

e a equação (3.3.50) para ΔH_1^0 na ausência de L

$$\Delta H_1^0 = j_\delta \Delta H_\delta^0 + j_\gamma \Delta H_\gamma^0 \quad (3.3.50)$$

A comparação entre estas duas equações mostra que a equação (3.3.30) tem, além dos termos cujos coeficientes são j_δ e j_γ os termos $(\Delta H_\delta^0 + DH_\delta^0)$ e $(\Delta H_\gamma^0 + DH_\gamma^0)$, de coeficientes h_δ e h_γ , em que as entalpias DH_δ^0 e DH_γ^0 de adição do ligante L (equilíbrios (3.2.7) e (3.2.8) atuam com uma correção aos termos ΔH_δ^0 e ΔH_γ^0 de adição de oxigênio (equilíbrio (3.2.7) e (3.2.8)).

O termo $(h_{\delta\gamma} - 2(h_\delta + h_\gamma) + q) \ln [L]$ não será considerado nesta análise, pois, quando a concentração de L é muito pequena, h_δ , h_γ , $h_{\delta\gamma}$ e q tendem para zero, de forma que

$$(h_{\delta\gamma} - 2(h_\delta + h_\gamma) - q) \ln [L] \rightarrow 0 \ln 0 = 0 \quad (3.5.21)$$

Quando a concentração de L é muito grande h_δ , $h_{\delta\gamma}$ e q tendem para 1 e h_γ tende para zero, de forma que

$$(h_{\delta\gamma} - 2(h_{\delta} + h_{\gamma}) + q) \ln[L] \rightarrow (1 - 2 + 1) \ln[L] = 0 \quad (3.5.22)$$

e, além disso assumimos que, também em concentrações intermediárias de L, o termo $(h_{\delta\gamma} - 2(h_{\delta} + h_{\gamma}) + q) \ln[L]$ não é importante.

As entropias de mistura μS_0 , μS_1 e μS_2 também não serão consideradas. As entropias de mistura atingem os seus valores máximos quando a mistura é equimolar; assim, os valores máximos de μS_0 , μS_1 e μS_2 são

$$\mu S_0 = \frac{1}{2} R \ln \frac{1}{2} + \frac{1}{2} R \ln \frac{1}{2} \cong -1,4 \quad (3.5.23)$$

$$\mu S_1 = \frac{1}{4} R \ln \frac{1}{4} + \frac{1}{4} R \ln \frac{1}{4} + \frac{1}{4} R \ln \frac{1}{4} + \frac{1}{4} R \ln \frac{1}{4} \cong -2,8$$

$$\mu S_2 = \frac{1}{2} R \ln \frac{1}{2} R \ln \frac{1}{2} \cong -1,4$$

Comparados com o valor típico de uma entropia de oxigenação da hemoglobina $\Delta S = 20 \text{ cal}/(\text{mol} \text{ } ^\circ\text{K})$, μS_0 , μS_1 e μS_2 podem ser desprezados.

Com base nas considerações feitas acima, podemos analisar o comportamento de G_{21}^0 , H_{21}^0 e S_{21}^0 .

Se o dímero tem um comportamento cooperativo ($k_2 > k_1$), então $G_{21}^0 < 0$ e $G_{\delta\gamma}^0 < 0$ (eq. 3.5.4). Desprezando os termos $RT(h_{\delta\gamma} - 2(h_{\delta} + h_{\gamma}) + q) \ln[L]$ e $(\mu G_2 - 2\mu G_1 + \mu G_0)$ na equação (3.3.49), a condição de cooperatividade torna-se

$$G_{21}^0 = G_{\delta\gamma}^0 + (n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta G_{\gamma}^0 - G_{\delta}^0) + (\sigma G_2 - 2\sigma G_1 + \sigma G_0) < 0 \quad (3.5.24)$$

Na ausência do agente heterotrópico $L(G_{21}^0)$ dado pela equação (3.3.58)) a condição de cooperatividade é

$$G_{21}^0 = G_{\delta\gamma}^0 + (j_\delta - j_\gamma)(\Delta G_\gamma^0 - G_\delta^0) < 0 \quad (3.5.25)$$

Se as subunidades que constituem o dímero são iguais G_{21}^0 dado pela equação (3.3.67)), a condição de cooperatividade é

$$G_{21}^0 = G_{\delta\gamma}^0 < 0 \quad (3.5.26)$$

Esta última equação mostra que, se as subunidades que constituem o dímero são idênticas, para haver um comportamento cooperativo é suficiente que a afinidade por oxigênio da espécie $\delta O_2 \delta$ seja maior do que a afinidade por oxigênio da espécie $\delta\delta$. Se as subunidades que constituem o dímero são diferentes, para haver um comportamento cooperativo na ausência do agente heterotrópico-L é necessário que

$$|G_{\delta\gamma}^0| > (j_\delta - j_\gamma)(\Delta G_\gamma^0 - G_\delta^0) \quad , \quad (3.5.27)$$

jã que $(j_\delta - j_\gamma)(\Delta G_\gamma^0 - \Delta G_\delta^0) > 0$ (eq. 3.5.14), e, para haver um comportamento cooperativo na presença do agente heterotrópico L, é necessário que

$$|G_{\delta\gamma}^0| > (n_\delta - n_\gamma)(\Delta G_\gamma^0 - \Delta G_\delta^0) + \sigma G_2 - 2\sigma G_1 + \sigma G_0 \quad (3.5.28)$$

As inequações (3.5.27) e (3.5.28) mostram que, para

que o dímero $\delta\gamma$ seja cooperativo, não é suficiente que a afinidade por oxigênio da espécie $\delta O_2\gamma$ seja maior do que a afinidade por oxigênio da espécie $\delta\gamma$. Além disso, a interação alostérica ($G_{\delta\gamma}^0$) deve sobrepujar os demais termos da equação (3.5.24).

Os termos $(n_\delta - n_\gamma)(\Delta G_\gamma^0 - \Delta G_\delta^0)$ e $(\sigma G_2 - 2\sigma G_1 + \sigma G_0)$ introduzem um efeito que podemos chamar de antícooperatividade não alostérica (por não ter origem na interação alostérica entre as subunidades).

Tomemos como exemplo o dímero $\delta\gamma$ sem interação alostérica entre as subunidades ($\Delta G_\delta^0 < \Delta G_\gamma^0$, $\Delta G_\delta^0 = \Delta G_{\gamma\delta}^0$ e $\Delta G_\gamma^0 = \Delta G_{\delta\gamma}^0$). Como as cadeias δ tem maior afinidade por oxigênio do que as cadeias γ , a primeira molécula de oxigênio liga-se preferencialmente a uma cadeia δ , de forma que $k_1 \approx k_\delta$, e a segunda molécula de oxigênio liga-se preferencialmente a uma cadeia γ , de forma que $k_2 \approx k_\gamma$. Como $k_\delta > k_\gamma$, $k_1 > k_2$ e o dímero tem um comportamento antícooperativo.

Denominamos $G_{\delta\gamma}^0$, $H_{\delta\gamma}^0$ e $S_{\delta\gamma}^0$ de energia livre, entalpia e entropia de interação alostérica reais e G_{21}^0 , H_{21}^0 e S_{21}^0 de energia livre, entalpia e entropia de interação alostérica efetivas.

Pode-se mostrar que, no caso do dímero $\delta\gamma$ na ausência do agente heterotrópico L, a diferença entre as energias livres de interação alostérica real e efetiva é função apenas da relação $X = k_\delta/k_\gamma$ (ou de $\Delta G_\delta^0 - \Delta G_\gamma^0$), ou seja da diferença entre as subunidades δ e γ .

$$G_{21}^0 - G_{\delta\gamma}^0 = \frac{x-1}{x+1} RT \ln x - 2RT \left(\frac{x}{x+1} \ln \frac{x}{x+1} + \frac{1}{x+1} \ln \frac{1}{x+1} \right) - RT \ln 4 \quad (3.5.29)$$

A FIGURA (3.5.1) ilustra a variação de $(G_{21}^0 - G_{\delta\gamma}^0)$ com $(\Delta G_{\delta}^0 - \Delta G_{\gamma}^0)$.

O que se conclui das considerações feitas acima é que o dímero $\delta\gamma$ pode apresentar uma curva sigmóide idêntica à curva sigmóide de um dímero $\delta\delta$, sendo que a interação alostérica real do dímero $\delta\gamma$ é maior do que a interação alostérica do dímero $\delta\delta$.

É difícil julgar se este efeito tem alguma importância biológica. Podemos estimar que é vantajoso que as forças que determinam o comportamento cooperativo de uma proteína (ou qualquer outro comportamento importante) sejam maiores do que outras forças que ocorram do modo aleatório.

O comportamento de H_{21}^0 e S_{21}^0 depende da relação entre os termos cooperativos e anticooperativos presentes nas equações (3.3.47) e (3.3.48).

De forma esquemática, temos que

$$H_{21}^0 \geq 0 \text{ se } [H_{\delta\gamma}^0] \leq (n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta H_{\gamma}^0 - \Delta H_{\delta}^0) + \sigma H_2 - 2\sigma H_1 + \sigma H_0 \quad (3.5.30)$$

e que

$$S_{21}^0 \geq 0 \text{ se } [S_{\delta\gamma}^0] \leq (n_{\delta} - n_{\gamma})(\Delta S_{\gamma}^0 - \Delta S_{\delta}^0) + \sigma S_2 - 2\sigma S_1 + \sigma S_0 \quad (3.5.31)$$

Se as subunidades que constituem o dímero são idênticas, H_{21}^0 , S_{21}^0 e G_{21}^0 são dados, respectivamente pelas equações (3.3.65), (3.3.66) e (3.3.67). Neste caso, os mesmos argumentos que permitiram justificar as inequações (3.5.4), (3.5.5) e (3.5.6) nos levam a concluir que

$$H_{21}^0 < 0 \quad (3.5.32)$$

$$S_{21}^0 < 0 \quad (3.5.33)$$

e

$$G_{21}^0 < 0 \quad (3.5.34)$$

Uma diferença importante entre o dímero $\delta\delta$ e o dímero $\delta\gamma$ é que este, de acordo com as inequações (3.5.30) e (3.5.31), pode apresentar $H_{21}^0 > 0$ e $S_{21}^0 > 0$ e ainda assim ser cooperativo ($G_{21}^0 < 0$), desde que a condição $TS_{21}^0 > H_{21}^0$ seja satisfeita; o dímero $\delta\delta$, por sua vez, se a sua cooperatividade tem um mecanismo como o que conhecemos sobre a hemoglobina, obedecerá às inequações (3.5.32), (3.5.33) e (3.5.34). Outra diferença que, apesar de ser mais especulativa, encontra um paralelo no equilíbrio Hb/O₂, está em como se comportam H_{21}^0 , S_{21}^0 e G_{21}^0 se a interação alostérica é feita aumentar (G_{21}^0 torna-se mais negativo). Um modo de fazer com que o dímero torne-se mais cooperativo é aumentar o número de contactos, na interface das subunidades, que são rompidos na primeira etapa da oxigenação; se isto ocorre, então o calor trocado e a entropia de relaxação mencionada na equação (3.5.9) também aumentam (em valor absoluto), de forma que, se a interação alostérica do dímero $\delta\gamma$ torna-se maior, então H_{21}^0 e S_{21}^0 tornam-se mais negativos, como mos

tra a FIGURA (3.5.2). O dímero $\delta\gamma$ pode apresentar um comportamento oposto a este, como o comportamento ilustrado na FIGURA (4.4.2), observado para o equilíbrio Hb/O₂.

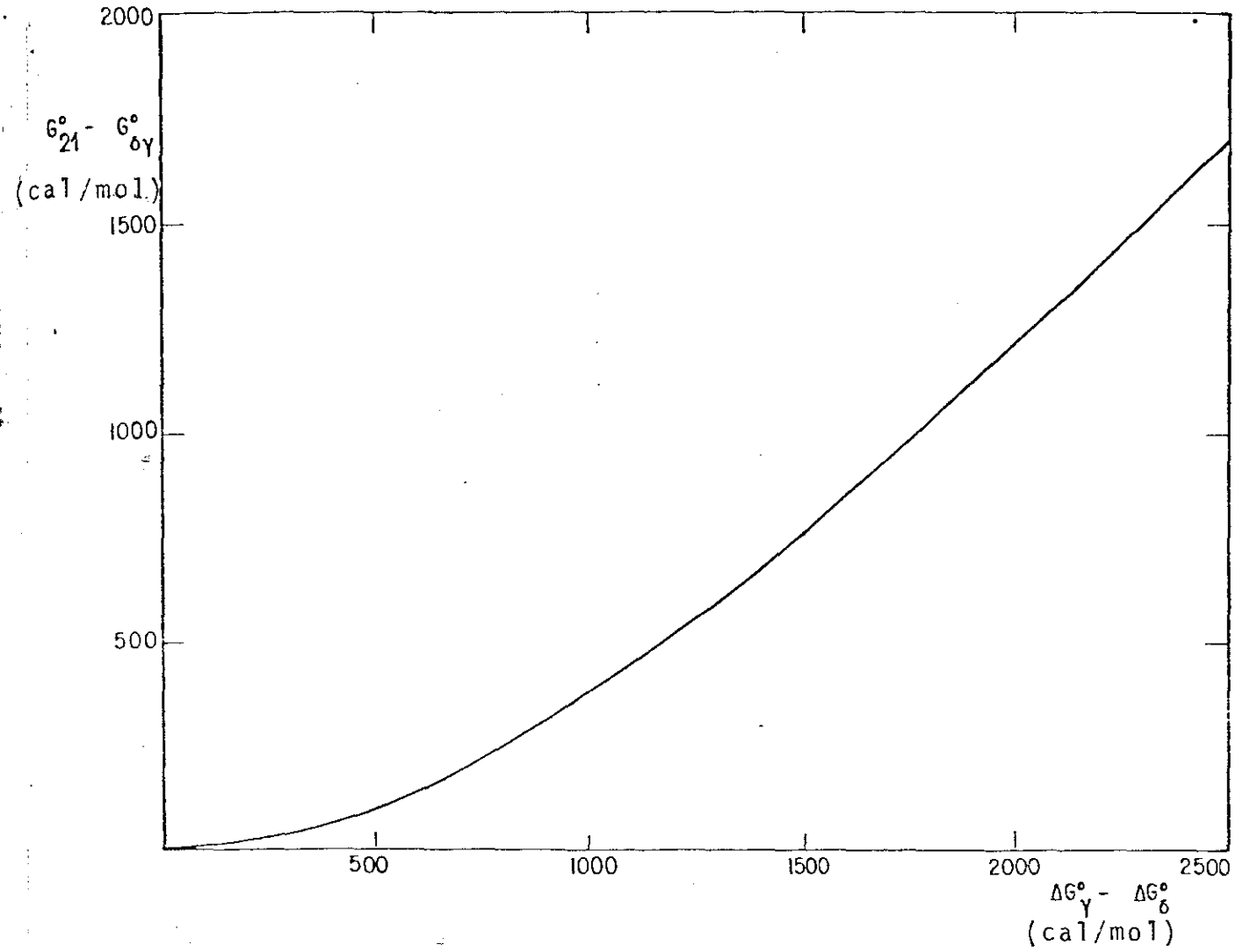


FIGURA 3.5.1

Variacão do ganho de energia livre de interaco alostérica com a diferença entre as afinidades por oxigênio das subunidades δ e γ .

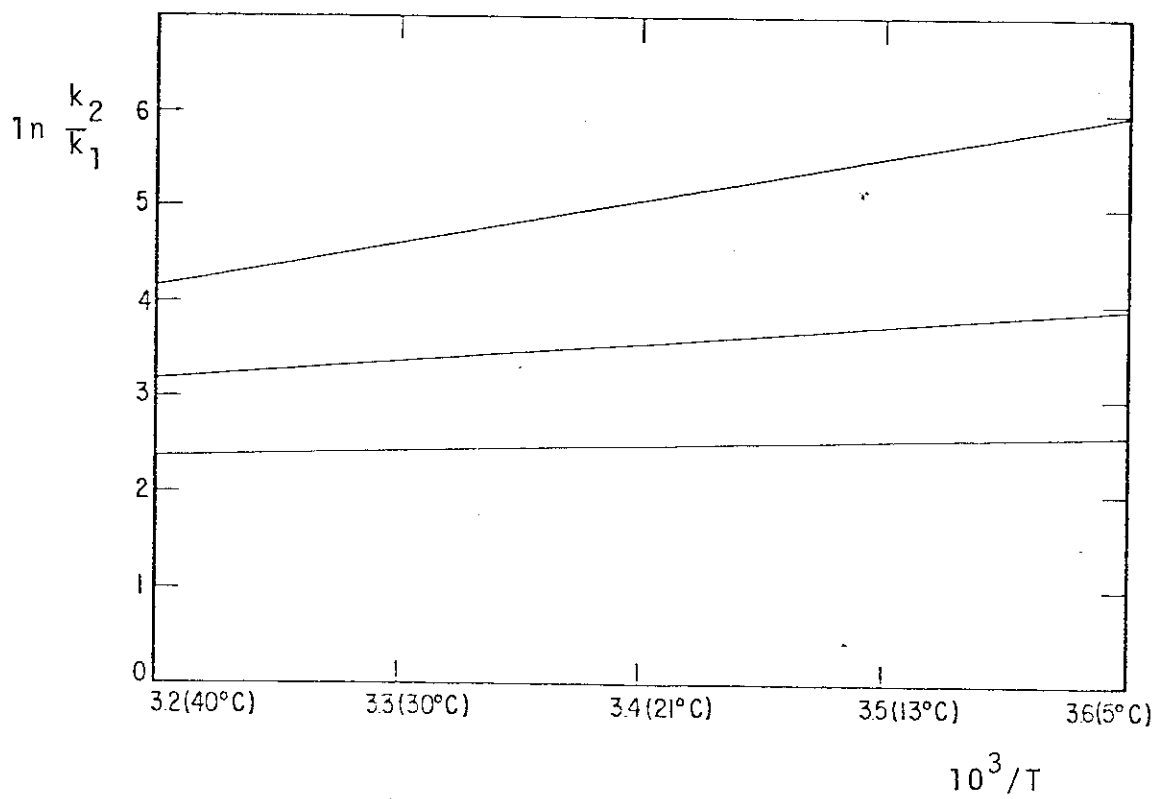


FIGURA 3.5.2

Comportamento predito para um homodímero.

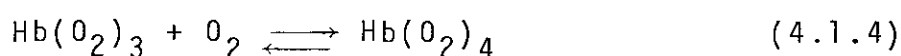
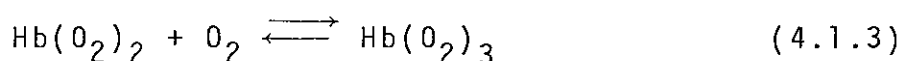
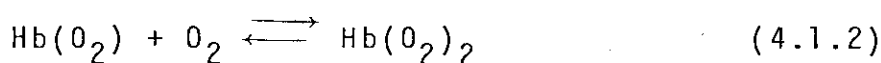
CAPÍTULO IV

4 - O EQUILÍBRIO HEMOGLOBINA-OXIGÊNIO

4.1 - Constantes de Equilíbrio

Na FIGURA 4.1.1 estão ilustrados os diversos caminhos e as diversas espécies químicas que ocorrem entre a deoxihemoglobina e a oxihemoglobina.

Segundo o modelo proposto por Gilbert Adair³, a hemoglobina é oxigenada através de uma sequência de quatro equilíbrios.



aos quais correspondem as constantes de equilíbrio extrínsecas K_1 , K_2 , K_3 e K_4 ou as constantes de equilíbrio intrínsecas k_1 , k_2 , k_3 e k_4 . As constantes de equilíbrio extrínsecas e intrínsecas estão relacionadas de acordo com as equações

$$K_1 = 4k_1 \quad (4.1.5)$$

$$K_2 = \frac{3}{2} k_2 \quad (4.1.6)$$

$$K_3 = \frac{2}{3} k_3 \quad (4.1.7)$$

$$K_4 = \frac{1}{4} k_4 \quad (4.1.8)$$

Em termos das constantes de equilíbrio intrínsecas, a saturação fracional é calculada segundo a equação

$$Y = \frac{k_1 [O_2] + 3k_1 k_2 [O_2]^2 + 3k_1 k_2 k_3 [O_2]^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 [O_2]^4}{1 + 4k_1 [O_2] + 6k_1 k_2 [O_2]^2 + 4k_1 k_2 k_3 [O_2]^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 [O_2]^4} \quad (4.1.9)$$

Se considerarmos as cadeias α e β como sendo diferentes, podemos deduzir equações análogas às equações (3.2.17), (3.2.18), (3.2.30) e (3.2.31) do capítulo anterior. Como os raciocínios envolvidos nas deduções destas equações são essencialmente os mesmos, nós nos limitamos a destacar os aspectos que diferenciam o equilíbrio Hb/O₂ do equilíbrio $\delta\gamma/O_2$.

Seja a primeira constante de Adair K_1 (ou k_1). A FIGURA 4.1.1 mostra que há duas espécies monooxigenadas: $\alpha_I O_2 \alpha_{II} \beta_I \beta_{II}$ ou $\alpha_I \alpha_{II} O_2 \beta_I \beta_{II}$ e $\alpha_I \alpha_{II} \beta_I O_2 \beta_{II}$ ou $\alpha_I \alpha_{II} \beta_I \beta_{II} O_2$.

É importante lembrar que, como os sítios α_I, α_{II} e β_I, β_{II} são funcionalmente equivalentes, $\alpha_I O_2 \alpha_{II} \beta_I \beta_{II}$, $\alpha_I \alpha_{II} O_2 \beta_I \beta_{II}$ e $\alpha_I \alpha_{II} \beta_I O_2 \beta_{II}$, $\alpha_I \alpha_{II} \beta_I \beta_{II} O_2$ são diferentes notações para as mesmas espécies. Passaremos a indicar as espécies monooxigenadas por $\alpha O_2 \alpha \beta \beta$ e $\alpha \alpha \beta O_2 \beta$.

Se k_α e k_β são as constantes intrínsecas de oxigenação de um sítio α e de um sítio β , então as constantes de equilíbrio de formação das espécies $\alpha O_2 \alpha \beta \beta$ e $\alpha \alpha \beta O_2 \beta$ são $2k_\alpha$ e $2k_\beta$, respectivamente (já que há dois sítios α e dois sítios β). Segue-se que

$$[\alpha O_2 \alpha \beta \beta] = 2 k_\alpha [\text{Hb}] [O_2] \quad (4.1.10)$$

$$[\alpha \alpha \beta O_2 \beta] = 2 k_\beta [\text{Hb}] [O_2] \quad (4.1.11)$$

$$k_1 = \frac{1}{4} \frac{[\text{Hb} O_2]}{[\text{Hb}] [O_2]} = \frac{1}{4} \frac{(2k_\alpha + 2k_\beta) [\text{Hb}] [O_2]}{[\text{Hb}] [O_2]} = \frac{1}{4} (2k_\alpha + 2k_\beta) \quad (4.1.12)$$

Se o equilíbrio Hb/O₂ ocorre na presença de um agente heterotrópico (que pode ser um dos fóstatos orgânicos DPG ou IHP) L, que liga-se seletivamente às cadeias β, então

$$[\text{Hb} O_2] = [\alpha O_2 \alpha \beta \beta] + [\alpha O_2 \alpha \beta \beta L] + [\alpha \alpha \beta O_2 \beta] + [\alpha \alpha \beta O_2 \beta L] \quad (4.1.13)$$

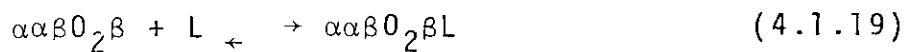
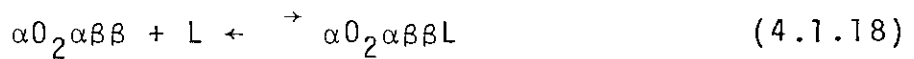
$$[\alpha O_2 \alpha \beta \beta L] = 2 k_\alpha M_\alpha [\text{Hb}] [O_2] [L] \quad (4.1.14)$$

$$[\alpha \alpha \beta O_2 \beta L] = 2 k_\beta M_\beta [\text{Hb}] [O_2] [L] \quad (4.1.15)$$

$$[\text{Hb}]_T = [\text{Hb}] + [\text{Hb} L] = (1 + M_o [L]) [\text{Hb}] \quad (4.1.16)$$

$$k_1 = \frac{1}{4} K_1 = \frac{1}{4} \frac{\{2k_\alpha (1 + M_\alpha [L]) + 2k_\beta (1 + M_\beta [L])\}}{1 + M_o [L]}, \quad (4.1.17)$$

sendo que M_α e M_β são constantes de adição de L segundo os equilíbrios



De acordo com a FIGURA 4.1.1, há 16 constantes de equilíbrio envolvidas na oxigenação da hemoglobina. Este número pode ser reduzido para nove porque há sete equações de conservação de energia

$$k_{\alpha} k_{\alpha_I \beta_I} = k_{\beta} k_{\beta_I \alpha_I} \quad (4.1.20)$$

$$k_{\alpha} k_{\alpha_I \beta_{II}} = k_{\beta} k_{\beta_I \alpha_{II}} \quad (4.1.21)$$

$$k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} = k_{\alpha_I \beta_I} k_{\alpha_I \beta_{II} \alpha_{II}} = k_{\alpha_I \beta_I} k_{\alpha_I \beta_I \alpha_{II}} \quad (4.1.22)$$

$$k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha} = k_{\beta_I \alpha_I} k_{\beta_I \alpha_I \beta_{II}} = k_{\beta_I \alpha_{II}} k_{\beta_I \alpha_{II} \beta_{II}} \quad (4.1.23)$$

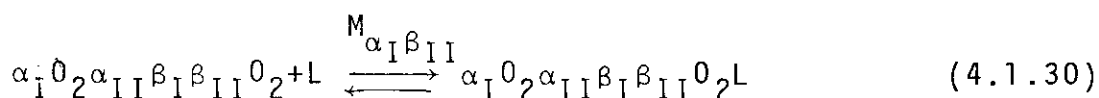
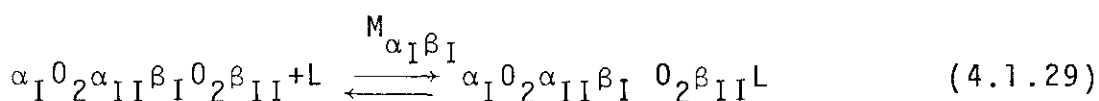
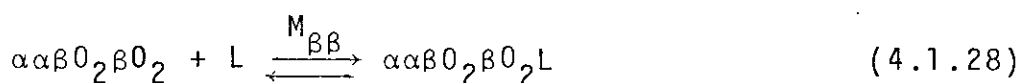
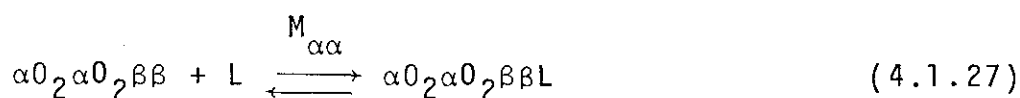
$$k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} = k_{\beta} k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha} k_{\beta\beta\alpha\alpha} \quad (4.1.24)$$

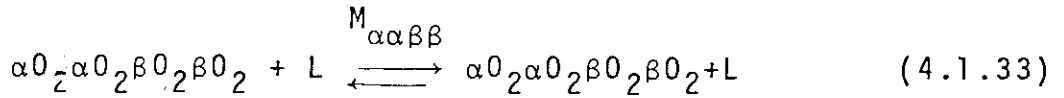
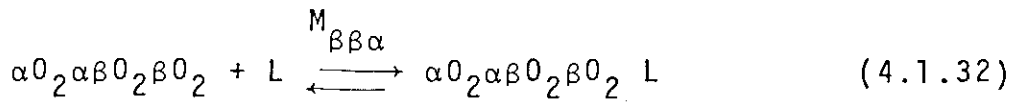
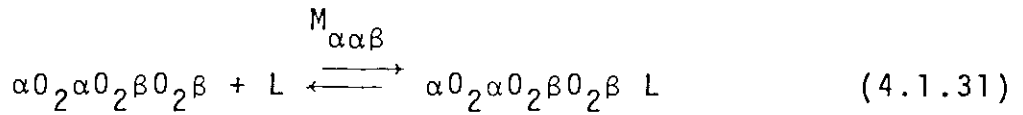
$$k_{\alpha_I \beta_I \alpha_{II}} k_{\alpha\alpha\beta\beta} = k_{\beta_I \alpha_I \beta_{II}} k_{\beta\beta\alpha\alpha} \quad (4.1.25)$$

$$k_{\alpha_I \beta_{II} \alpha_{II}} k_{\alpha\alpha\beta\beta} = k_{\beta_I \alpha_{II} \beta_{II}} k_{\beta\beta\alpha\alpha} \quad (4.1.26)$$

O conjunto que escolhermos é constituído pelas constantes de equilíbrio intrínsecas k_{α} , k_{β} , $k_{\alpha\alpha}$, $k_{\beta\beta}$, $k_{\alpha_I \beta_I}$, $k_{\alpha_I \beta_{II}}$, $k_{\alpha\alpha\beta}$, $k_{\beta\beta\alpha}$ e $k_{\alpha\alpha\beta\beta}$ ou pelas constantes de equilíbrio extrínsecas $2k_{\alpha}$, $2k_{\beta}$, $1/2k_{\alpha\alpha}$, $1/2k_{\beta\beta}$, $k_{\alpha_I \beta_I}$, $k_{\alpha_I \beta_{II}}$, $2k_{\alpha\alpha\beta}$, $2k_{\beta\beta\alpha}$ e $k_{\alpha\alpha\beta\beta}$.

Temos ainda as constantes de adição de um agente heterotrópico L





Em termos destas constantes de equilíbrio, as demais constantes de Adair são dadas por

$$K_2 = \frac{3}{2} k_2 = \frac{k_{\alpha\alpha\alpha}^{(1+M_{\alpha\alpha}|L|)} + k_{\beta\beta\beta}^{(1+M_{\beta\beta}|L|)} + 2k_{\alpha\alpha\beta}^{(1+M_{\alpha\alpha\beta}|L|)} + 2k_{\alpha\beta\beta}^{(1+M_{\alpha\beta\beta}|L|)}}{2k_{\alpha}^{(1+M_{\alpha}|L|)} + 2k_{\beta}^{(1+M_{\beta}|L|)}} \quad (4.1.34)$$

$$K_3 = \frac{2}{3} k_3 = \frac{2k_{\alpha\alpha\alpha}^{(1+M_{\alpha\alpha}|L|)} + k_{\beta\beta\beta}^{(1+M_{\beta\beta}|L|)} + 2k_{\alpha\alpha\beta}^{(1+M_{\alpha\alpha\beta}|L|)} + 2k_{\beta\beta\alpha}^{(1+M_{\beta\beta\alpha}|L|)}}{k_{\alpha\alpha}^{(1+M_{\alpha\alpha}|L|)} + k_{\beta\beta}^{(1+M_{\beta\beta}|L|)} + 2k_{\alpha\beta}^{(1+M_{\alpha\beta}|L|)} + 2k_{\beta\alpha}^{(1+M_{\beta\alpha}|L|)}} \quad (4.1.35)$$

$$K_4 = \frac{1}{4} k_4 = \frac{k_{\alpha\alpha\alpha\beta}^{(1+M_{\alpha\alpha\alpha\beta}|L|)}}{2k_{\alpha\alpha\alpha}^{(1+M_{\alpha\alpha\alpha}|L|)} + 2k_{\beta\beta\beta\alpha}^{(1+M_{\beta\beta\beta\alpha}|L|)}} \quad (4.1.36)$$

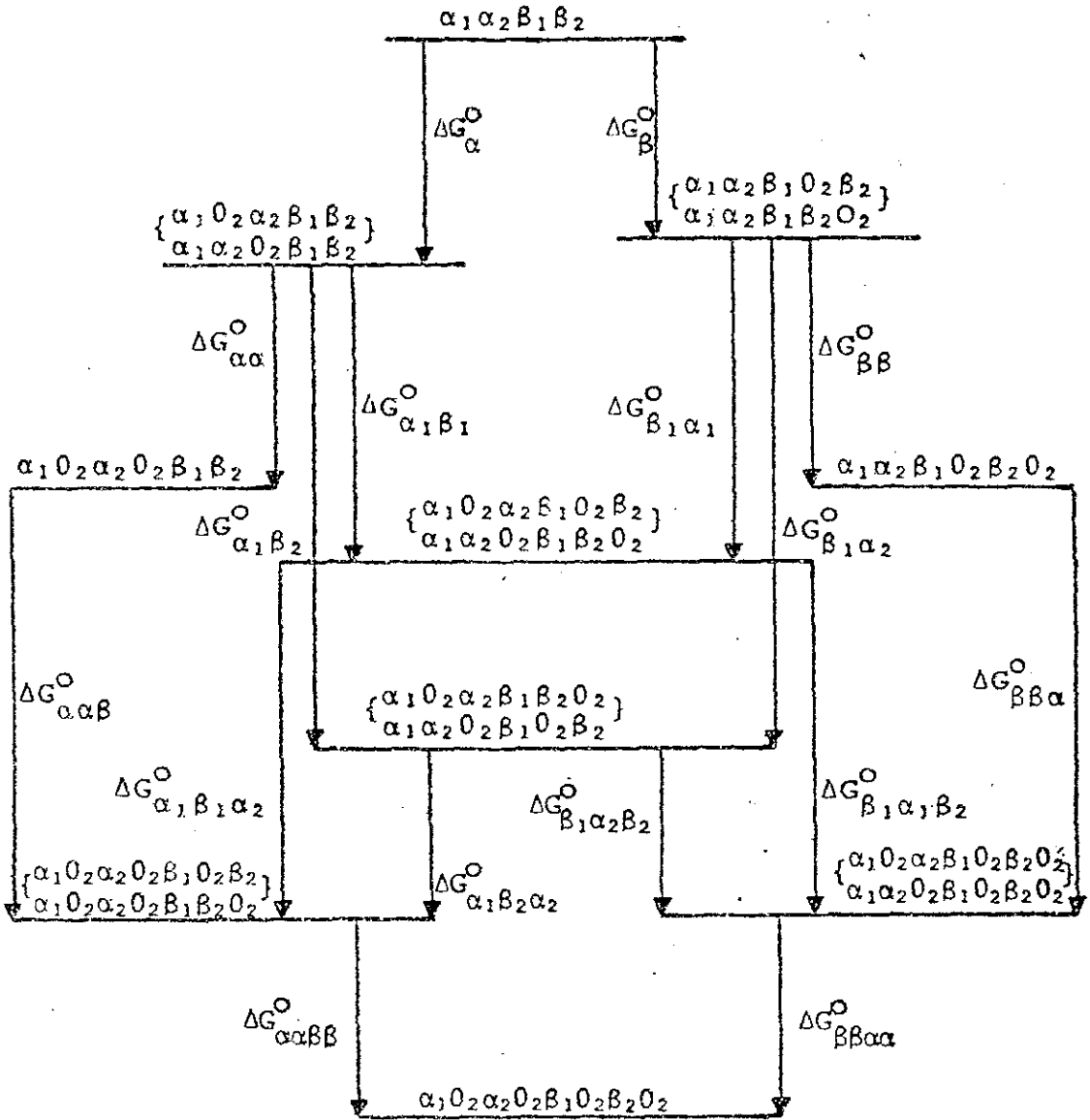


FIGURA 4.1.1

Equilíbrios intermediários que ocorrem entre a deoxi e a oxihemoglobina.

4.2 - Parâmetros Termodinâmicos de Oxigenação

Expressões para as entalpias, entropias e energias livres de oxigenação são obtidas aplicando-se as equações (3.3.1), (3.3.2), (3.3.3.) e (3.3.4) às equações (4.1.17), (4.1.34), (4.1.35) e (4.1.36). Como este procedimento é equivalente ao apresentado no capítulo anterior, nós nos limitamos a apresentar os resultados. De acordo com a notação introduzida no capítulo III, os símbolos Δ e D indicam, respectivamente, oxigenação e adição do ligante L:

No capítulo anterior foram introduzidas as frações molares $p, q, j_\delta, j_\gamma, h_\delta, h_\gamma, j_{\delta\gamma}$ e $h_{\delta\gamma}$. No caso do equilíbrio Hb/O₂, o número de frações molares é bem maior, já que, na presença de um agente heterotrópico, há duas espécies deoxigenadas, quatro espécies monooxigenadas, oito espécies dioxigenadas, quatro espécies trioxigenadas e duas espécies tetraoxigenadas.

É conveniente, por uma questão de simplicidade, sistematizar a definição destas frações molares. Começemos por definir as variáveis

$$[Hb]_T = [Hb] + [HbL] = \{1 + M_0 [L]\} [Hb] \quad (4.2.1)$$

$$\begin{aligned} [Hb(O_2)] &= [\alpha O_2 \alpha \beta \beta] + [\alpha O_2 \alpha \beta \beta L] + [\alpha \alpha \beta O_2 \beta] + [\alpha \alpha \beta O_2 \beta L] = \\ &= \{2k_\alpha (1 + M_\alpha [L]) + 2k_\beta (1 + M_\beta [L])\} [Hb] [O_2] \end{aligned} \quad (4.2.2)$$

$$\begin{aligned}
[\text{Hb}(\text{O}_2)_2] &= [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha\alpha\beta_0\beta_0\beta_0\beta_0] + [\alpha\alpha\beta_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\text{L}] + \\
&+ [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\text{L}] = \\
&= \{k_\alpha k_\alpha (1+M_\alpha [\text{L}]) + k_\beta k_\beta (1+M_\beta [\text{L}]) + \\
&+ 2k_\alpha k_{\alpha\beta} (1+M_{\alpha\beta} [\text{L}]) + 2k_\alpha k_{\alpha\beta\beta} (1+M_{\alpha\beta\beta} [\text{L}])\} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2 \quad (4.2.3)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
[\text{Hb}(\text{O}_2)_3] &= [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0\text{L}] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0\text{L}] = \\
&= \{2k_\alpha k_\alpha k_{\alpha\beta} (1+M_{\alpha\beta} [\text{L}]) + 2k_\beta k_\beta k_{\beta\alpha} (1+M_{\beta\alpha} [\text{L}])\} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^3 \quad (4.2.4)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{Hb}(\text{O}_2)_4 &= [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0\beta_0] + [\alpha_0\alpha_0\alpha_0\beta_0\beta_0\beta_0\beta_0\text{L}] = \\
&= \{k_\alpha k_\alpha k_{\alpha\beta} k_{\alpha\beta\beta} (1+M_{\alpha\beta\beta} [\text{L}])\} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^4 \quad (4.2.5)
\end{aligned}$$

As frações molares das espécies deoxigenadas são definidas por

$$p = \frac{[\text{Hb}]}{[\text{Hb}] + [\text{Hb L}]} = \frac{1}{1+M_0 [\text{L}]} \quad (4.2.6)$$

$$q = \frac{[\text{HbL}]}{[\text{Hb}] + [\text{Hb L}]} = \frac{M_0 [\text{L}]}{1+M_0 [\text{L}]} \quad (4.2.7)$$

De forma similar, para as demais espécies, são definidas as frações molares:

especies monooxigenadas

$$j_{\alpha} = \frac{2k_{\alpha} [\text{Hb}] [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2]} \quad ; \quad j_{\beta} = \frac{2k_{\beta} [\text{Hb}] [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2]} \quad (4.2.8)$$

especies monooxigenadas com L adicionado

$$h_{\alpha} = \frac{2k_{\alpha} M_{\alpha} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2]} \quad ; \quad h_{\beta} = \frac{2k_{\beta} M_{\beta} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]}{[\text{HbO}_2]} \quad (4.2.9)$$

especies dioxigenadas

$$j_{\alpha\alpha} = \frac{k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad ; \quad j_{\beta\beta} = \frac{k_{\beta} k_{\beta\beta} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad (4.2.10)$$

$$j_{\alpha_I\beta_I} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha_I\beta_I} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad ; \quad j_{\alpha_I\beta_{II}} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha_I\beta_{II}} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]}$$

especies dioxigenadas com L adicionado

$$h_{\alpha\alpha} = \frac{k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} M_{\alpha\alpha} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad ; \quad h_{\beta\beta} = \frac{k_{\beta} k_{\beta\beta} M_{\beta\beta} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad (4.2.11)$$

$$h_{\alpha_I\beta_I} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha_I\beta_I} M_{\alpha_I\beta_I} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \quad ; \quad h_{\alpha_I\beta_{II}} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha_I\beta_{II}} M_{\alpha_I\beta_{II}} [\text{L}] [\text{Hb}] [\text{O}_2]^2}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]}$$

especies trioxigenadas

$$j_{\alpha\alpha\beta} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^3}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_3]} \quad ; \quad j_{\beta\beta\alpha} = \frac{2k_{\beta} k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha} [\text{Hb}] [\text{O}_2]^3}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_3]} \quad (4.2.12)$$

especies trioxigenadas com L adicionado

$$h_{\alpha\alpha\beta} = \frac{2k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} M_{\alpha\alpha\beta} [L] [Hb] [O_2]^3}{[Hb(O_2)_3]}$$

$$h_{\beta\beta\alpha} = \frac{2k_{\beta} k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha} M_{\beta\beta\alpha} [L] [Hb] [O_2]^3}{[Hb(O_2)_3]} \quad (4.2.13)$$

especie tetraoxigenada

$$j_{\alpha\alpha\beta\beta} = \frac{k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} [Hb] [O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]} \quad (4.2.14)$$

especie tetraoxigenada com L adicionado

$$h_{\alpha\alpha\beta\beta} = \frac{k_{\alpha} k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} M_{\alpha\alpha\beta\beta} [L] [Hb] [O_2]^4}{[Hb(O_2)_4]} = \frac{M_{\alpha\alpha\beta\beta} [L]}{1 + M_{\alpha\alpha\beta\beta} [L]} \quad (4.2.15)$$

As variáveis

$$n_{\alpha} = j_{\alpha} + h_{\alpha}$$

$$n_{\beta} = j_{\beta} + h_{\beta}, \text{ etc ...}$$

são definidas de acordo com a equação genérica

$$n = j + h \quad (4.2.16)$$

As variáveis

$$h_1 = h_{\alpha} + h_{\beta}$$

$$h_2 = h_{\alpha\alpha} + h_{\beta\beta} + h_{\alpha_I\beta_I} + h_{\alpha_{II}\beta_{II}}, \text{ etc ...}$$

são definidas de acordo com a equação genérica

$$h_n = \sum_i h_{in} \quad n = 1, 2, 3, 4 \quad (4.2.17)$$

Temos também as entropias e energias livres de mistura

$$\mu S_0 = R (p \ln(p) + q \ln(q)) \quad (4.2.18)$$

$$\mu G_0 = T \mu S_0 \quad (4.2.19)$$

$$\mu S_1 = R (j_\alpha \ln(j_\alpha) + h_\alpha \ln(h_\alpha) + j_\beta \ln(j_\beta) + h_\beta \ln(h_\beta)) \quad (4.2.20)$$

$$\mu G_1 = T \mu S_1 \quad (4.2.21)$$

$$\begin{aligned} \mu S_2 = & R (j_{\alpha\alpha} \ln(j_{\alpha\alpha}) + j_{\beta\beta} \ln(j_{\beta\beta}) + j_{\alpha_I \beta_I} \ln(j_{\alpha_I \beta_I})) + \\ & + j_{\alpha_{II} \beta_{II}} \ln(j_{\alpha_{II} \beta_{II}}) + h_{\alpha\alpha} \ln(h_{\alpha\alpha}) + h_{\beta\beta} \ln(h_{\beta\beta}) + h_{\alpha_I \beta_I} \ln(h_{\alpha_I \beta_I}) + \\ & + h_{\alpha_{II} \beta_{II}} \ln(h_{\alpha_{II} \beta_{II}})) \end{aligned} \quad (4.2.22)$$

$$\mu G_2 = T \mu S_2 \quad (4.2.23)$$

$$\mu S_3 = R (j_{\alpha\alpha\beta} \ln(j_{\alpha\alpha\beta}) + h_{\alpha\alpha\beta} \ln(h_{\alpha\alpha\beta}) + j_{\beta\beta\alpha} \ln(j_{\beta\beta\alpha}) + h_{\beta\beta\alpha} \ln(h_{\beta\beta\alpha}))$$

$$\mu G_3 = T \mu S_3$$

$$\mu S_4 = R (j_{\alpha\alpha\beta\beta} \ln(j_{\alpha\alpha\beta\beta}) + h_{\alpha\alpha\beta\beta} \ln(h_{\alpha\alpha\beta\beta}))$$

$$\mu G_4 = T \mu S_4$$

e as variáveis

$$\sigma H_1 = h_\alpha DH_\alpha^0 + h_\beta DH_\beta^0 \quad (4.2.24)$$

$$\sigma H_2 = h_{\alpha\alpha} DH_{\alpha\alpha}^0 + h_{\beta\beta} DH_{\beta\beta}^0 + h_{\alpha_I\beta_I} DH_{\alpha_I\beta_I}^0 + h_{\alpha_{II}\beta_{II}} DH_{\alpha_{II}\beta_{II}}^0 \quad (4.2.25)$$

$$\sigma H_3 = h_{\alpha\alpha\beta} DH_{\alpha\alpha\beta}^0 + h_{\beta\beta\alpha} DH_{\beta\beta\alpha}^0 \quad (4.2.26)$$

$$\sigma H_4 = h_{\alpha\alpha\beta\beta} DH_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 \quad (4.2.27)$$

onde DH_α^0 , DH_β^0 , etc... são entalpias padrão de adição do agente heterotrópico L segundo os equilíbrios (4.1.18), (4.1.19) e (4.1.27)...(4.1.33). Do mesmo modo, obtemos σS_1^0 , etc... e σG_1^0 etc..., substituindo DH_α^0 , DH_β^0 , etc... por DS_α^0 , DS_β^0 , etc... ou por DG_α^0 , DG_β^0 , etc...

O símbolo Σ , colocado antes de um parâmetro termodinâmico, indica uma somatória em todos os passos que levaram àquela determinada espécie química. Assim, por exemplo

$$\Sigma G_{\alpha\alpha\beta\beta} = \Delta G_\alpha^0 + \Delta G_{\alpha\alpha}^0 + \Delta G_{\alpha\alpha\beta}^0 + \Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 \quad (4.2.28)$$

$$\Sigma H_{\beta_I\alpha_I\beta_{II}} = \Delta H_\beta^0 + \Delta H_{\beta_I\alpha_I}^0 + \Delta H_{\beta_I\alpha_I\beta_{II}}^0 \quad (4.2.29)$$

Antes de passarmos ao enunciado das equações para os parâmetros termodinâmicos de oxigenação, falta definir as entalpias, entropias e energias livres de interação alostérica efetiva ($H_{34,12}^0$, $S_{34,12}^0$ e $G_{34,12}^0$) e reais ($H_{\alpha\alpha\beta}^0$, $S_{\alpha\alpha\beta}^0$, $G_{\alpha\alpha\beta}^0$ e $H_{\alpha\alpha\beta\beta}^0$, $S_{\alpha\alpha\beta\beta}^0$, $G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0$).

$$H_{34,12}^0 = \Delta H_3^0 + \Delta H_4^0 - \Delta H_1^0 - \Delta H_2^0$$

$$S_{34,12}^0 = \Delta S_3^0 + \Delta S_4^0 - \Delta S_1^0 - \Delta S_2^0 \quad (4.2.30)$$

$$G_{34,12}^0 = \Delta G_3^0 + \Delta G_4^0 - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0$$

$$H_{\alpha\alpha\beta}^0 = \Delta H_{\alpha\alpha\beta}^0 - \Delta H_{\beta}^0; \Delta S_{\alpha\alpha\beta}^0 = \Delta S_{\alpha\alpha\beta}^0 - \Delta S_{\beta}^0; \Delta G_{\alpha\alpha\beta}^0 = \Delta G_{\alpha\alpha\beta}^0 - \Delta G_{\beta}^0 \quad (4.2.31)$$

$$H_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 = \Delta H_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 - \Delta H_{\beta\beta}^0; \Delta S_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 = \Delta S_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 - \Delta S_{\beta\beta}^0; \Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 = \Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 - \Delta G_{\beta\beta}^0$$

Em termos das variáveis acima definidas, os parâmetros termodinâmicos de oxigenação são dados pelas seguintes equações:

$$\Delta H_1^0 = n_{\alpha} \Delta H_{\alpha}^0 + n_{\beta} \Delta H_{\beta}^0 + \sigma H_1 - \sigma H_0 \quad (4.2.32)$$

$$\Delta S_1^0 = n_{\alpha} \Delta S_{\alpha}^0 + n_{\beta} \Delta S_{\beta}^0 + \sigma S_1 - \sigma S_0 - \mu S_1 + \mu S_0 + R(h_1 - q) \ln [L] + R \ln 2 + R \ln \frac{1}{4} \quad (4.2.33)$$

$$\Delta G_1^0 = n_{\alpha} \Delta G_{\alpha}^0 + n_{\beta} \Delta G_{\beta}^0 + \sigma G_1 - \sigma G_0 + \mu G_1 - \mu G_0 - RT(h_1 - q) \ln [L] + RT \ln 2 - RT \ln \frac{1}{4} \quad (4.2.34)$$

$$\Delta H_2^0 = n_{\alpha\alpha} \Sigma H_{\alpha\alpha} + n_{\beta\beta} \Sigma H_{\beta\beta} + n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma H_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_{II}\beta_{II}} \Sigma H_{\alpha_{II}\beta_{II}} - n_{\alpha} \Delta H_{\alpha}^0 - n_{\beta} \Delta H_{\beta}^0 + \sigma H_2 - \sigma H_1 \quad (4.2.35)$$

$$\begin{aligned} \Delta S_2^0 = & n_{\alpha\alpha} \Sigma S_{\alpha\alpha} + n_{\beta\beta} \Sigma S_{\beta\beta} + n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma S_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_{II}\beta_{II}} \Sigma S_{\alpha_{II}\beta_{II}} - n_{\alpha} \Delta S_{\alpha}^0 + \\ & - n_{\beta} \Delta S_{\beta}^0 + \sigma S_2 - \sigma S_1 - \mu S_2 + \mu S_1 + (n_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_{II}\beta_{II}}) R \ln 2 - R \ln 2 + \\ & + R(h_2 - h_1) \ln [L] + R \ln \frac{2}{3} \end{aligned} \quad (4.2.36)$$

$$\begin{aligned}
\Delta G_2^0 = & n_{\alpha\alpha} \Sigma G_{\alpha\alpha} + n_{\beta\beta} \Sigma G_{\beta\beta} + n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma G_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_I\beta_{II}} \Sigma G_{\alpha_I\beta_{II}} + \\
& - n_{\alpha} \Delta G_{\alpha}^0 - n_{\beta} \Delta G_{\beta}^0 + \sigma G_2 - \sigma G_1 + \mu G_2 - \mu G_1 - (n_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_I\beta_{II}}) RT \ln 2 + \\
& + RT \ln 2 - RT (h_2 - h_1) \ln [L] - RT \ln \frac{2}{3}
\end{aligned} \tag{4.2.37}$$

$$\begin{aligned}
\Delta H_3^0 = & n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma H_{\alpha\alpha\beta} + n_{\beta\beta\alpha} \Sigma H_{\beta\beta\alpha} - n_{\alpha\alpha} \Sigma H_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta} \Sigma H_{\beta\beta} - n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma H_{\alpha_I\beta_I} + \\
& - n_{\alpha_I\beta_{II}} \Sigma H_{\alpha_I\beta_{II}} + \sigma H_3 - \sigma H_2
\end{aligned} \tag{4.2.38}$$

$$\begin{aligned}
\Delta S_3^0 = & n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma S_{\alpha\alpha\beta} + n_{\beta\beta\alpha} \Sigma S_{\beta\beta\alpha} - n_{\alpha\alpha} \Sigma S_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta} \Sigma S_{\beta\beta} - n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma S_{\alpha_I\beta_I} + \\
& - n_{\alpha_I\beta_{II}} \Sigma S_{\alpha_I\beta_{II}} + \sigma S_3 - \sigma S_2 - \mu S_3 + \mu S_2 + (h_3 - h_2) R \ln [L] + \\
& + R(1 - n_{\alpha_I\beta_I} - n_{\alpha_I\beta_{II}}) \ln 2 + R \ln \frac{3}{2}
\end{aligned} \tag{4.2.39}$$

$$\begin{aligned}
\Delta G_3^0 = & n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma G_{\alpha\alpha\beta} + n_{\beta\beta\alpha} \Sigma G_{\beta\beta\alpha} - n_{\alpha\alpha} \Sigma G_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta} \Sigma G_{\beta\beta} - n_{\alpha_I\beta_I} \Sigma G_{\alpha_I\beta_I} + \\
& - n_{\alpha_I\beta_{II}} \Sigma G_{\alpha_I\beta_{II}} + \sigma G_3 - \sigma G_2 + \mu G_3 - \mu G_2 - (h_3 - h_2) RT \ln [L] + \\
& - RT(1 - n_{\alpha_I\beta_I} - n_{\alpha_I\beta_{II}}) \ln 2 - RT \ln \frac{3}{2}
\end{aligned} \tag{4.2.40}$$

$$\Delta H_4^0 = \Sigma H_{\alpha\alpha\beta\beta} - n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma H_{\alpha\alpha\beta} - n_{\beta\beta\alpha} \Sigma H_{\beta\beta\alpha} + \sigma H_4 - \sigma H_3 \tag{4.2.41}$$

$$\begin{aligned} \Delta S_4^0 &= \Sigma S_{\alpha\alpha\beta\beta} - n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma S_{\alpha\alpha\beta} - n_{\beta\beta\alpha} \Sigma S_{\beta\beta\alpha} + \sigma S_4 - \sigma S_3 - \mu S_4 + \mu S_3 + \\ &- R \ln 2 + (h_4 - h_3) R \ln [L] + R \ln 4 \end{aligned} \quad (4.2.42)$$

$$\begin{aligned} \Delta G_4^0 &= \Sigma G_{\alpha\alpha\beta\beta} - n_{\alpha\alpha\beta} \Sigma G_{\alpha\alpha\beta} - n_{\beta\beta\alpha} \Sigma G_{\beta\beta\alpha} + \sigma G_4 - \sigma G_3 + \mu G_4 - \mu G_3 + \\ &- (h_4 - h_3) RT \ln [L] + RT \ln 2 - RT \ln 4 \end{aligned} \quad (4.2.43)$$

$$\begin{aligned} H_{34,12}^0 &= H_{\alpha\alpha\beta}^0 + H_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 + (n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta}) (\Sigma H_{\beta\beta} - \Sigma H_{\alpha\alpha}) + \\ &+ n_{\alpha_I\beta_I} (\Sigma H_{\alpha\alpha} + \Sigma H_{\beta\beta} - 2\Sigma H_{\alpha_I\beta_I}) + n_{\alpha_I\beta_{II}} (\Sigma H_{\alpha\alpha} + \Sigma H_{\beta\beta} - 2\Sigma H_{\alpha_I\beta_{II}}) + \\ &+ \sigma H_4 - 2\sigma H_2 + \sigma H_0 \end{aligned} \quad (4.2.44)$$

$$\begin{aligned} S_{34,12}^0 &= S_{\alpha\alpha\beta}^0 + S_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 + (n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta}) (\Sigma S_{\beta\beta} - \Sigma S_{\alpha\alpha}) + \\ &+ n_{\alpha_I\beta_I} (\Sigma S_{\alpha\alpha} + \Sigma S_{\beta\beta} - 2\Sigma S_{\alpha_I\beta_I}) + n_{\alpha_I\beta_{II}} (\Sigma S_{\alpha\alpha} + \Sigma S_{\beta\beta} - 2\Sigma S_{\alpha_I\beta_{II}}) \\ &+ \sigma S_4 - 2\sigma S_2 + \sigma S_0 - \mu S_4 + 2\mu S_2 - \mu S_0 + (h_4 - 2h_2 + q) R \ln [L] + \\ &- (n_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_I\beta_{II}}) R 2 \ln 2 + R \ln 36 \end{aligned} \quad (4.2.45)$$

$$\begin{aligned} G_{34,12}^0 &= G_{\alpha\alpha\beta}^0 + G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 + (n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta}) (\Sigma G_{\beta\beta} - \Sigma G_{\alpha\alpha}) + \\ &+ n_{\alpha_I\beta_I} (\Sigma G_{\alpha\alpha} + \Sigma G_{\beta\beta} - 2\Sigma G_{\alpha_I\beta_I}) + n_{\alpha_I\beta_{II}} (\Sigma G_{\alpha\alpha} + \Sigma G_{\beta\beta} - 2\Sigma G_{\alpha_I\beta_{II}}) + \\ &+ \sigma G_4 - 2\sigma G_2 + \sigma G_0 + \mu G_4 - 2\mu G_2 + \mu G_0 - (h_4 - 2h_2 + q) RT \ln [L] + \\ &+ (n_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_I\beta_{II}}) RT 2 \ln 2 - RT \ln 36 \end{aligned} \quad (4.2.46)$$

4.3 - Aproximações

Nas equações (4.1.17), (4.1.34), (4.1.35) e (4.1.36) há 17 variáveis incógnitas (as quatro constantes de Adair e a constante $M_{\alpha\beta\beta}$ são, em muitos casos, determináveis experimentalmente). Por este motivo fizemos duas aproximações que permitem obter as constantes de equilíbrio intermediárias k_α , k_β , etc..., como função das constantes de Adair.

4.3.1 - Primeira Aproximação

As constantes de equilíbrio de adição do agente heterotrópico L são eliminadas (das equações para as constantes de Adair) através da suposição de que as constantes de equilíbrio intermediárias são funções paramétricas da concentração de L.

Nas equações (4.1.35) e (4.1.36), o produto $k_\beta k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha}$ é substituído por $k_\alpha k_{\alpha I \beta I} k_{\beta I \alpha I \beta II}$ ($k_\beta k_{\beta\beta} k_{\beta\beta\alpha} = k_\alpha k_{\alpha I \beta I} k_{\beta I \alpha I \beta II}$, ver FIGURA 4.1.1)

Desta forma, obtemos equações para as variáveis

$$C_1 = K_1, \quad C_2 = K_1 K_2, \quad C_3 = K_1 K_2 K_3 \quad \text{e} \quad C_4 = K_1 K_2 K_3 K_4 .$$

$$C_1 = 2 k_\alpha + 2 k_\beta \quad (4.3.1)$$

$$C_2 = k_\alpha k_{\alpha\alpha} + 2k_\alpha k_{\alpha I \beta I} + 2k_\alpha k_{\alpha I \beta II} + k_\beta k_{\beta\beta} \quad (4.3.2)$$

$$C_3 = 2k_\alpha k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} + 2k_\alpha k_{\alpha I \beta I} k_{\beta I \alpha I \beta II} \quad (4.3.3)$$

$$C_4 = k_\alpha k_{\alpha\alpha} k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} \quad (4.3.4)$$

Através deste procedimento, ficamos com nove incógnitas: $k_\alpha, k_\beta, k_{\alpha\alpha}, k_{\beta\beta}, k_{\alpha_I\beta_I}, k_{\alpha_I\beta_{II}}, k_{\alpha\alpha\beta}, k_{\beta_I\alpha_I\beta_{II}}, k_{\alpha\alpha\beta\beta}$. Fazemos, a seguir, as seguintes aproximações "fortes":

i) $k_\alpha = k_{\alpha\alpha}$; isto está baseado no fato de que a quantidade e os tipos das pontes salinas quebradas quando uma subunidade é oxigenada são independentes da ocupância da outra subunidade α ²³.

ii) $k_\beta = k_{\alpha_I\beta_I}$; o trabalho de Perutz²³ mostra que a interação alostérica ocorre através das interfaces $\alpha_I\beta_{II}$ e não das interfaces $\alpha_I\beta_I$.

As aproximações "fortes" permitem que o número de incógnitas seja reduzido para sete e que as equações (4.3.1),..., (4.3.4) sejam reescritas como

$$C_1 = 2k_\alpha + 2k_\beta \quad (4.3.1)$$

$$C_2 = k_\alpha^2 + 2k_\alpha k_\beta + k_\beta k_{\beta\beta} + 2k_\alpha k_{\alpha_I\beta_{II}} \quad (4.3.5)$$

$$C_3 = 2k_\alpha^2 k_{\alpha\alpha\beta} + 2k_\alpha k_\beta k_{\beta_I\alpha_I\beta_{II}} \quad (4.3.6)$$

$$C_4 = k_\alpha^2 k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} \quad (4.3.7)$$

O número de incógnitas é reduzido para quatro, através das seguintes aproximações "fracas":

i) $k_\beta = k_{\beta\beta}$; as conseqüências desta aproximação e suas prováveis causas serão comentadas na secção seguinte, em que a

1ª aproximação é aplicada e dados experimentais.

ii) A interação alostérica é independente da ocupação de outro sítio α ($k_{\alpha\alpha\beta} = k_{\alpha_I\beta_{II}} = k'_{\alpha\beta}$), mas é dependente da ocupação de um segundo sítio β ($k_{\beta_I\alpha_{II}} = k_{\alpha\alpha\beta\beta} = K''_{\alpha\beta}$).

As aproximações "fortes" e "fracas" permitem que tenhamos um sistema de quatro equações e quatro incógnitas

$$C_1 = 2k_{\alpha} + 2k_{\beta} \quad (4.3.1)$$

$$C_2 = k_{\alpha}^2 + k_{\beta}^2 + 2k_{\alpha}k_{\beta} + 2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta} \quad (4.3.8)$$

$$C_3 = 2k_{\alpha}^2 k'_{\alpha\beta} + 2k_{\alpha}k_{\beta}k''_{\alpha\beta} \quad (4.3.9)$$

$$C_4 = k_{\alpha}^2 k'_{\alpha\beta} k''_{\alpha\beta} \quad (4.3.10)$$

cuja solução é

$$K_{\beta} = \frac{C_3 - \frac{C_1}{2} \left[C_2 - \frac{C_1^2}{4} \right]}{4C_4 - \frac{C_1^2}{C_2 - \frac{C_1^2}{4}} - C_2 + \frac{C_1^2}{4}} \quad (4.3.11)$$

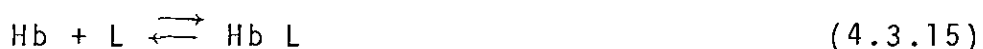
$$K_{\alpha} = \frac{C_1}{2} - k_{\beta} \quad (4.3.12)$$

$$K'_{\alpha\beta} = \frac{C_2 - \frac{C_1^2}{4}}{C_1 - 2k_{\beta}} \quad (4.3.13)$$

$$K''_{\alpha\beta} = \frac{C_4}{k_{\alpha}^2 k'_{\alpha\beta}} \quad (4.3.14) \quad \times$$

4.3.2 - Segunda Aproximação

Ainda não foram projetadas experiências que permitam determinar as constantes de equilíbrios M_α , M_β , $M_{\alpha\alpha}$, etc...., das reações (4.1.18), (4.1.19) e (4.1.27)... (4.1.33). O que se determinou experimentalmente³⁵ são as constantes de equilíbrio M_0 , M_1 , M_2 , M_3 e M_4 das reações



sendo que $M_4 = M_{\alpha\alpha\beta\beta}$.

Do equilíbrio (4.3.16), temos que

$$M_1 = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)\text{L}]}{[\text{Hb}(\text{O}_2)][\text{L}]} = \frac{[\alpha\text{O}_2\alpha\beta\beta\text{L}] + [\alpha\alpha\beta\text{O}_2\beta\text{L}]}{\{[\alpha\text{O}_2\alpha\beta\beta] + [\alpha\alpha\beta\text{O}_2\beta]\}[\text{L}]} \quad (4.3.20)$$

Das equações (4.1.18), (4.1.19), (4.1.14) e (4.1.15), temos que

$$[\alpha\text{O}_2\alpha\beta\beta\text{L}] = 2k_\alpha M_\alpha [\text{Hb}] [\text{O}_2] [\text{L}] \quad (4.3.21)$$

$$[\alpha\alpha\beta\text{O}_2\beta\text{L}] = 2k_\beta M_\beta [\text{Hb}] [\text{O}_2] [\text{L}] \quad (4.3.22)$$

Introduzindo as equações (4.3.21), (4.3.22), (4.1.14) e

(4.1.15) na equação (4.3.20), obtemos

$$M_1 = \frac{M_\alpha 2k_\alpha + M_\beta 2\bar{k}_\beta}{2k_\alpha + 2\bar{k}_\beta} = \frac{M_\alpha 2k_\alpha + M_\beta 2\bar{k}_\beta}{\bar{K}_1} \quad (4.3.23)$$

Nestas equações e nas que se seguirão, as constantes de equilíbrio intermediárias foram supostas funções paramétricas da concentração de L (como na aproximação anterior). A barra superior em \bar{k}_β e \bar{K}_1 indica o valor em que $[L] = 0$.

O valor de k_α é suposto independente da concentração de L. Esta aproximação pressupõe que uma molécula de fosfato orgânico (DPG ou IHP) é deslocada da interface $\beta\beta$ quando a primeira molécula de oxigênio é adicionada a uma cadeia β (não sendo deslocada quando uma molécula de oxigênio é adicionada a uma cadeia α).

A aproximação seguinte é que k_α e \bar{k}_β são da mesma ordem de grandeza mas $M_\beta \ll M_\alpha$. Esta aproximação tem a mesma justificação que a anterior.

Tendo sido feitas estas considerações, a equação (4.3.23) se transforma em

$$M_1 = \frac{M_\alpha 2k_\alpha}{\bar{K}_1} \quad (4.3.24)$$

A seguir, nós consideramos que $M_\alpha = M_0$. Isto se justifica se supormos novamente que o deslocamento de uma molécula

la de fosfato da interface $\beta\beta$ independe da ocupancia das cadeias α , pois este fato s \bar{o} ocorre quando uma mol \bar{e} cula de oxig \bar{e} nio \bar{e} adicionada a uma cadeia β .

Podemos agora ter uma equa \bar{c} o para K_α em fun \bar{c} o de va-ri \bar{a} veis que podem ser conhecidas atrav \bar{e} s da experi \bar{e} ncia

$$K_\alpha = \frac{\bar{K}_1 M_1}{2M_0} \quad (4.3.25)$$

Acrescentamos \bar{a} s aproxima \bar{c} o \bar{e} s acima descritas as apro- xima \bar{c} o \bar{e} s "fortes" da se \bar{c} o anterior e a suposi \bar{c} o de que $\bar{K}_\beta = K_{\beta\beta}$. Esta \bar{u} ltima hip \bar{o} tese se justifica se tornarmos a considerar que uma mol \bar{e} cula de fosfato org \bar{a} nico \bar{e} deslocada da interface $\beta\beta$ quando uma mol \bar{e} cula de oxig \bar{e} nio \bar{e} adicionada, pe- la primeira vez, a uma cadeia β . Ficamos assim com um sistema de equa \bar{c} o \bar{e} s formado pela equa \bar{c} o (4.3.25) e pelas equa \bar{c} o \bar{e} s

$$C_1 = 2k_\alpha + 2k_\beta \quad (4.3.1)$$

$$C_2 = k_\alpha^2 + k_\beta \bar{k}_\beta + 2k_\alpha k_\beta + 2k_\alpha k_{\alpha\beta} \quad (4.3.26)$$

$$C_4 = k_\alpha^2 k_{\alpha\alpha\beta} k_{\alpha\alpha\beta\beta} \quad (4.3.7)$$

Este sistema de equa \bar{c} o \bar{e} s admite a seguinte solu \bar{c} o

$$K_\alpha = \frac{\bar{K}_1 M_1}{2M_0} \quad (4.3.25)$$

$$K_{\beta\beta} = \bar{K}_\beta = \frac{\bar{K}_1 (M_0 - M_1)}{2M_0} \quad (4.3.27)$$

$$K_\beta = \frac{\bar{K}_1 M_0 - \bar{K}_1 M_1}{2M_0} \quad (4.3.28)$$

$$K_{\alpha I \beta II} = \frac{C_2 - k_{\alpha}^2 - 2k_{\alpha}k_{\beta} - k_{\beta} \bar{k}_{\beta}}{2k_{\alpha}} \quad (4.3.29)$$

$$K_{\alpha\alpha\beta} K_{\alpha\alpha\beta\beta} = \frac{C_4}{k_{\alpha}^2} \quad (4.3.30)$$

É interessante notar que, como

$$\frac{k_{\alpha}}{k_{\beta}} = \frac{M_1}{M_0 - M_1} \quad (4.3.31)$$

a relação $K_{\alpha}/\bar{K}_{\beta}$, segundo a 2ª aproximação, depende apenas das constantes de equilíbrio (de adição do agente heterotrópico L) M_0 e M_1 .

4.4 - Confronto com os Dados Experimentais

Com a aplicação da Primeira e da Segunda Aproximações a dados experimentais obtemos valores numéricos das constantes de equilíbrio e parâmetros termodinâmicos dos equilíbrios intermediários. Estes resultados, por sua vez, permitem estudar a validade das suposições feitas no capítulo anterior.

Na TABELA 4.4.1 estão expostos os resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵ em concentrações crescentes de DPG. A primeira e a segunda colunas mostram a ação seletiva do DPG sobre as cadeias β ; a energia padrão de oxigenação das cadeias α (ΔG_{α}^0) pouco varia com a concentração de DPG, mas a energia livre padrão de oxigenação das cadeias β decresce (em valor absoluto) cerca de 50% quando a concentração de DPG atinge o maior valor da ta

bela. A diferença entre ΔG_{α}^0 em ΔG_{β}^0 é uma função crescente da concentração de DPG.

A energia livre de oxigenação $\Delta G_{\alpha\beta}^{0'}$ = $\Delta G_{\alpha_I\beta_{II}}^0$ = $\Delta G_{\alpha\alpha\beta}^0$ representa a adição da segunda e da terceira molécula de oxigênio; o seu valor absoluto é decrescido em cerca de 30% quando a concentração de DPG é máxima. A energia livre de oxigenação $\Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ = $\Delta G_{\beta_I\alpha_I\beta_{II}}^0$ = $\Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0$, que representa a adição da terceira e da quarta moléculas de oxigênio, mantém-se praticamente inalterada. Isto se deve a que, como mostram os valores da TABELA 2.4.2, na última etapa de oxigenação a maior parte das moléculas de DPG já foi deslocada das interfaces $\beta\beta$. $\Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ é, em todas as concentrações de DPG, menor do que a energia livre de oxigenação das cadeias β isoladas; este efeito³⁷, denominado "quaternary enhancement", foi comentado no capítulo I.

Uma comparação entre as duas últimas colunas da TABELA 4.4.1 mostra que a interação alostérica $G_{\alpha\beta}^{0''}$ é menor do que a interação alostérica efetiva $G_{34,12}^0$ e que esta diferença aumenta com a concentração de DPG. De acordo com as aproximações "fortes" e "fracas" da Primeira Aproximação, as equações para os parâmetros termodinâmicos de interação alostérica (equações (4.2.44), (4.2.45) e (4.2.46)) transformam-se em

$$H_{34,12}^0 = H_{\alpha\beta}^{0'} + H_{\alpha\beta}^{0''} + 2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta H_{\beta}^0 - \Delta H_{\alpha}^0) - 2n_{\alpha_I\beta_{II}} H_{\alpha\beta}^{0'} \quad (4.4.1)$$

$$S_{34,12}^0 = S_{\alpha\beta}^{0'} + S_{\alpha\beta}^{0''} + 2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta S_{\beta}^0 - \Delta S_{\alpha}^0) - 2n_{\alpha_I\beta_{II}} S_{\alpha\beta}^{0'} + 2\mu S_2 - R(n_{\alpha_I\beta_I} + n_{\alpha_I\beta_{II}})2\ln 2 + R\ln 36 \quad (4.4.2)$$

$$G_{34,12}^0 = G_{\alpha\beta}^{0'} + G_{\alpha\beta}^{0''} + 2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta G_{\beta}^0 - \Delta G_{\alpha}^0) - 2n_{\alpha I \beta II} G_{\alpha\beta}^{0'} +$$

$$- 2\mu G_2 + (n_{\alpha I \beta I} + n_{\alpha I \beta II}) RT 2 \ln 2 - RT \ln 36 \quad (4.4.3)$$

onde

$$H_{\alpha\beta}^{0'} = \Delta H_{\alpha\beta}^{0'} - \Delta H_{\beta}^0, \quad H_{\alpha\beta}^{0''} = \Delta H_{\alpha\beta}^{0''} - \Delta H_{\beta}^0 \quad (4.4.4)$$

$$S_{\alpha\beta}^{0'} = \Delta S_{\alpha\beta}^{0'} - \Delta S_{\beta}^0, \quad S_{\alpha\beta}^{0''} = \Delta S_{\alpha\beta}^{0''} - \Delta S_{\beta}^0 \quad (4.4.5)$$

$$G_{\alpha\beta}^{0'} = \Delta G_{\alpha\beta}^{0'} - \Delta G_{\beta}^0, \quad G_{\alpha\beta}^{0''} = \Delta G_{\alpha\beta}^{0''} - \Delta G_{\beta}^0 \quad (4.4.6)$$

$$n_{\alpha\alpha} = \frac{k_{\alpha}^2}{(k_{\alpha} + k_{\beta})^2 + 2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta}} \quad (4.4.7)$$

$$n_{\beta\beta} = \frac{k_{\beta}^2}{(k_{\alpha} + k_{\beta})^2 + 2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta}} \quad (4.4.8)$$

$$n_{\alpha I \beta I} = \frac{2k_{\alpha}k_{\beta}}{(k_{\alpha} + k_{\beta})^2 + 2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta}} \quad (4.4.9)$$

$$n_{\alpha I \beta II} = \frac{2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta}}{(k_{\alpha} + k_{\beta})^2 + 2k_{\alpha}k'_{\alpha\beta}} \quad (4.4.10)$$

Na TABELA 4.4.2 estão expostos os termos dominantes da equação (4.4.3). A associação entre os termos cooperativos e antikooperativos permite que a interação alostérica $G_{\alpha\beta}^{0''}$ seja grande comparada à interação alostérica efetiva $G_{34,12}^0$. O termo 3 (antikooperativo) resulta da não equivalência funcional das cadeias α e β . O termo 4 (antikooperativo) resulta de

a energia livre de formação da espécie $\alpha_1 O_2 \alpha_2 \beta_1 \beta_2 O_2$ ($\Delta G_{\alpha\beta}^{0'}$) a partir da espécie $\alpha_1 O_2 \alpha_2 \beta_1 \beta_2$ ser menor do que a energia livre de formação da espécie $\alpha_1 O_2 \alpha_2 \beta_1 O_2 \beta_2$ ($\Delta G_{\alpha\beta}^0$), o que dá origem a uma não equivalência funcional das cadeias β . A soma dos termos anticooperativos da TABELA 4.4.2 aumenta com a concentração de DPG; apesar disso, a hemoglobina torna-se mais cooperativa em concentrações de DPG crescentes porque, segundo a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu a cooperatividade aumenta com concentração de DPG, de forma a sobrepujar a anticooperatividade. A Primeira Aproximação não pôde ser aplicada aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu sem que fossem feitas correções às constantes de Adair (dentro do erro experimental) que estão indicados na TABELA 4.4.1.

Na TABELA 4.4.3 estão expostos os resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani³³ em que a concentração de H^+ varia na faixa do efeito Bôhr ácido. Em concentrações crescentes de H^+ (valores decrescentes de pH) tanto o parâmetro de Hill quando $G_{34,12}^0$ tendem a ter a sua magnitude aumentada, i.e., a hemoglobina torna-se mais cooperativa. Os valores das interações alostéricas $G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$ acompanham esta tendência. As energias livres de oxigenação ΔG_{α}^0 , ΔG_{β}^0 , $\Delta G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $\Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ diminuem (em valor absoluto) com a concentração de H^+ ; como já foi visto na seção 1.4, a hemoglobina libera oxigênio quando o pH diminui. $G_{\alpha\beta}^{0''}$ mantém-se praticamente insensível a uma variação de pH, o que está de acordo com o fato de que, similarmente ao que ocorre com DPG, ΔH_4^+ (TABELA 2.4.1) mantém-se constante em diferentes valores de pH. A segunda e terceira colunas da TABELA 4.4.3 mos-

tram que tanto ΔG_{α}^0 quanto ΔG_{β}^0 variam com o pH, mas a variação ΔG_{β}^0 é maior, ou seja, os resultados obtidos com a primeira aproximação indicam que, assim como os efetores DPG e IHP, o efector H^+ age mais intensamente sob as subunidades β do que sob as subunidades α .

Na TABELA 4.4.4 estão expostos os resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani⁴² na presença de Cl^- e ausência de DPG e IHP. Como este trabalho experimental fornece a variação das constantes de Adair entre 10 e 35°C, foi possível obter as constantes de equilíbrio intermediárias k_{α} , k_{β} , $k'_{\alpha\beta}$ e $k''_{\alpha\beta}$ nesta faixa de temperatura e, conseqüentemente, os parâmetros termodinâmicos ΔH_{α}^0 , ΔH_{β}^0 , $\Delta H_{\alpha\beta}^{0'}$, $\Delta H_{\alpha\beta}^{0''}$, ΔS_{α}^0 , ΔS_{β}^0 , $\Delta S_{\alpha\beta}^{0'}$ e $\Delta S_{\alpha\beta}^{0''}$.

Na FIGURA 4.4.1 estão expostos os gráficos de Van't Hoff das constantes de equilíbrio k_{α} , k_{β} , $k'_{\alpha\beta}$ e $k''_{\alpha\beta}$ e as retas ajustadas com o auxílio do método dos mínimos quadrados. Na TABELA 4.4.5 estão expostas as respectivas entalpias e entropias de oxigenação. Na TABELA 4.4.6 estão expostos os termos dominantes das equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3). Os termos entálpicos de interação alostérica ($H_{\alpha\beta}^{0'}$ e $H_{\alpha\beta}^{0''}$) são grandes (em valor absoluto) comparados aos termos de energia livre $G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$. Os termos entálpicos anticooperativos, por sua vez, também envolvem diferenças de energia maiores do que os respectivos termos de energia livre. A curva de saturação fracional fornece informações sobre as trocas de energia ($G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$ se tomarmos como exemplo a Primeira Aproximação) envolvidas na in

teração alostérica descontadas as contribuições entrópicas; não há dados experimentais sobre as entalpias de interação alostérica dos equilíbrios intermediários, mas uma análise como a que fizemos permite mostrar que estas são grandes comparadas com aquelas.

Na TABELA 4.4.7 estão expostos os resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação a seis casos do trabalho de Imai²⁷, as condições experimentais de cada caso estão indicadas na TABELA 4.4.8. Não foi possível obter os erros teóricos associados aos erros experimentais das constantes de Adair porque os dados de Imai não estão na forma de constantes de Adair mas de entalpias e entropias de oxigenação. As energias livres da TABELA 4.4.7 concordam, de forma geral com os resultados obtidos com os dados de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵. Uma diferença importante entre estes dois conjuntos de resultados é que, como se pode ver comparando as TABELAS 4.4.4 e 4.4.7, no segundo caso $\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_{\beta}^0$, $G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$ são maiores do que no primeiro; isto indica que os resultados obtidos com o trabalho de Imai são melhores do que os obtidos com o trabalho de Tyuma, Imai e Shimizu pois, como veremos adiante, uma das falhas da Primeira Aproximação está em superestimar a magnitude da diferença $\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_{\beta}^0$. Um exame das TABELAS 4.4.7 e 4.4.8 mostra que $\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_{\beta}^0$ toma o seu menor valor absoluto quando são mínimas as concentrações de Cl^{-} e H^{+} e os efetores DPG e IHP estão ausentes. Os resultados obtidos com o trabalho de Tyuma, Imai e Shimizu indicavam que DPG causa um aumento na magnitude dos termos cooperativos e anticooperativos, sendo que estes são superados por aqueles. Uma tendência oposta é indicada, pelos pre

sentos resultados, para o efeito de IHP em pH 6,5; a comparação dos casos 5 e 7 da TABELA 4.4.7 mostra que o efector IHP causa um drástico decréscimo nas magnitudes de $G_{\alpha\beta}^{O'}$, $G_{\alpha\beta}^{O''}$ e $G_{34,12}^O$, o que está de acordo com o efeito, ilustrado na FIGURA 2.4.1, que este agente heterotrópico tem sobre a afinidade da hemoglobina por oxigênio.

Os dados recentes de Imai têm uma característica que não está presente em trabalhos anteriores. Como mostra a TABELA 4.4.9, em todos os sete casos experimentais as entalpias ($H_{34,12}^O$) e entropias ($S_{34,12}^O$) efetivas de interação alostérica são positivas, ou seja, a interação alostérica efetiva é um processo endotérmico. Na FIGURA 4.4.2 estão ilustrados os gráficos da Van't Hoff de $(k_4 k_3)/(k_1 k_2)$ para 4 casos de Imai; as retas têm inclinação negativa e, quanto maior é $G_{34,12}^O$, menor é a inclinação (em valor absoluto); esta tendência é oposta ao que foi previsto com base no modelo dimérico do capítulo anterior para uma proteína alostérica que tenha subunidades idênticas.

Utilizando as entalpias e entropias de oxigenação fornecidas pelo trabalho de Imai pudemos calcular as constantes de Adair entre 10 e 35°C; estes resultados, por sua vez, permitem calcular as constantes de equilíbrio k_α , k_β , $k'_{\alpha\beta}$ e $k''_{\alpha\beta}$ em várias temperaturas. Fazendo gráficos de Van't Hoff destas constantes de equilíbrio obtivemos, como fizemos com os dados de Imai e Yonetani⁴², os parâmetros termodinâmicos dos equilíbrios intermediários (ΔH_α^O , etc ... e ΔS_α^O , etc...) segundo a Primeira Aproximação.

Na TABELA 4.4.10 estão expostos os termos dominantes das equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3) assim obtidos para os casos 4 e 5 de Imai (TABELA 4.4.8). No caso 5 os resultados são semelhantes aos expostos na TABELA 4.4.6 com a diferença : que agora os termos antiooperativos se opõem aos termos cooperativos, fazendo que $H_{34,12}^0$ e $S_{34,12}^0$ sejam positivos. No caso 4 todos termos que contribuem para $H_{34,12}^0$ e $S_{34,12}^0$, excetuando-se os da última coluna, são positivos, de forma que as energias livres de interação alostérica $G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$ são determinadas en trôpicamente.

As aproximações "fortes" e "fracas" que fizemos na seção 3.1 impõem cinco restrições aos sistemas de equações (4.3.1) ... (4.3.4). Na FIGURA 4.4.3 estão expostas as energias livres que levam da deoxi ã tetraoxihemoglobina. Uma característica marcante desta figura é que $\Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 = \Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ e $\Delta G_{\beta\beta\alpha\alpha}^0 = G_{\beta\alpha}^{0''}$ estão de acordo com o valor experimental para a oxigenação da espécie $Hb(O_2)_3$ que é o limite superior para as energias livres de oxigenação, mas $\Delta G_{\beta\beta\alpha}^0$ está bem acima deste limite. Isto ocorre devido ã aproximações "fracas" $\Delta G_{\beta}^0 = \Delta G_{\beta\beta}^0$ e $\Delta G_{\alpha\alpha\beta\beta}^0 = \Delta G_{\beta I \alpha I \beta II}^0 = \Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$. Como consequência das aproximações "fracas" a relação $\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_{\beta}^0$ e as interações alostéricas $G_{\alpha\beta}^{0'}$ e $G_{\alpha\beta}^{0''}$ foram superestimadas.

Na TABELA 4.4.11 estão expostos os resultados obtidos com a aplicação da Segunda Aproximação aos dados experimentais de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵. A principal diferença entre estes resultados e os resultados obtidos com a aplicação da aproxima

ção anterior aos mesmos dados experimentais é que, como se pode verificar comparando a quinta coluna da TABELA 4.4.11 e a sexta coluna da TABELA 4.4.1, a diferença entre ΔG_{α}^0 e ΔG_{β}^0 é, para a Segunda Aproximação, menor (em valor absoluto) do que para a Primeira Aproximação. Comparando-se a sexta coluna TABELA 4.4.11 e a quarta coluna da TABELA 4.4.1, verificamos que os valores de $\Delta G_{\alpha I \beta II}^0$ (que na Primeira Aproximação corresponde a $\Delta G_{\alpha \beta}^0$) são aproximadamente iguais. Não é possível, com a Segunda Aproximação, obter separadamente os valores de $\Delta G_{\alpha \alpha \beta}^0$ e $\Delta G_{\alpha \alpha \beta \beta}^0$ mas, mesmo assim, o decréscimo de 2 Kcal/mol no valor absoluto de $\Delta G_{\alpha \alpha \beta \beta}^0 + \Delta G_{\alpha \alpha \beta}^0$, entre $[DPG] = 0,0$ mM e $[DPG] = 1,0$ mM, deve ser atribuído a $\Delta G_{\alpha \alpha \beta}^0$, já que espera-se que $\Delta G_{\alpha \alpha \beta \beta}^0$, por serem pequenos os valores experimentais de M_4 , não seja sensível à variação de $[DPG]$. A especificidade do efetor DPG sobre a interface $\beta\beta$ é uma condição imposta a Segunda Aproximação, ao passo que para a Primeira Aproximação é um resultado decorrente dos valores das constantes de Adair; a comparação entre a segunda e a quarta colunas da TABELA 4.4.11 e a segunda e a terceira colunas da TABELA 4.4.1 mostra que os valores de ΔG_{α}^0 são aproximadamente iguais para as duas aproximações, mas os valores de ΔG_{β}^0 obtidos com a Segunda Aproximação são significativamente menores do que os valores de ΔG_{β}^0 obtidos com a Primeira Aproximação; isto ocorre porque a Segunda Aproximação não contém a aproximação "fraca" $\Delta G_{\alpha \alpha \beta \beta}^0 = \Delta G_{\beta I \alpha I \beta II}^0 = \Delta G_{\alpha \beta}^0$ que, como já foi comentado, constrange o valor de ΔG_{β}^0 .

TABELA 4.4.1

$ DPG $ mM	ΔG_{α}^0 Kcal/mol	ΔG_g^0 Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha\beta}^{0'}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_g^0$ Kcal/mol	$G_{\alpha\beta}^{0'}$ Kcal/mol	$G_{\alpha\beta}^{0''}$ Kcal/mol	$G_{34,12}^0$ Kcal/mol
0,0	-6,24±0,05	-3,41±0,53	-6,60±0,17	-9,06±0,27	-2,83±0,54	-3,19±0,56	-5,65±0,60	-3,48±0,52
0,2	-6,13±0,04	-2,17±0,55	-5,38±0,42	-9,52±0,45	-3,96±0,55	-3,21±0,69	-7,35±0,71	-4,23±0,52
0,5	-5,89±0,11	-1,72±1,02	-5,24±0,71	-9,27±0,76	-4,17±0,10	-3,52±1,2	-7,55±1,3	-3,57±0,90
1,0	-5,88±0,09	-1,53±0,94	-4,76±0,86	-9,66±0,88	-4,34±0,95	-3,23±1,27	-8,12±1,29	-4,70±1,06

Resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵.

Nos seguintes casos as constantes de Adair foram corrigidas dentro de erro experimental

$$|DPG| = 0,5: k_1 = 0,0147 - 0,0013 ; k_2 = 0,0213 - 0,0065 ; k_3 = 0,0195 + 0,0089$$

$$|DPG| = 1,0: k_1 = 0,0139 - 0,0010 ; k_2 = 0,00719 + 0,00405$$

DPG mM	Termo 1 (Kcal/mol)	Termo 2 (Kcal/mol)	Termo 3 (Kcal/mol)	Termo 4 (Kcal/mol)	-RT ln(36) (Kcal/mol)
0,0	-3,19±0,56	-5,65±0,60	+1,19±0,23	+4,98±0,90	-2,12
0,2	-3,21±0,69	-7,35±0,71	+5,07±0,70	+2,31±0,50	
0,5	-3,52±1,20	-7,55±1,30	+5,01±0,12	+2,82±0,96	
1,0	-3,23±1,27	-8,12±1,29	+6,69±1,50	+1,49±0,60	

TABELA 4.4.2

Termos dominantes da equação(4.4.3)

$$\text{Termo 1} = G_{\alpha\beta}^{\circ 1}$$

$$\text{Termo 2} = G_{\alpha\beta}^{\circ 2}$$

$$\text{Termo 3} = 2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta}) (\Delta G_{\beta}^{\circ} - \Delta G_{\alpha}^{\circ})$$

$$\text{Termo 4} = -2 \sum_{I} n_{\alpha I} \beta_{II} G_{\alpha\beta}^{\circ I}$$

pH	ΔG_{α}^0	ΔG_B^0	$\Delta G_{\alpha B}^{0'}$	$\Delta G_{\alpha B}^{0''}$	$\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_B^0$	$G_{\alpha B}^{0'}$	$G_{\alpha B}^{0''}$	$G_{34,12}^0$	n
8,8	-7,08	-5,62	-7,65	-9,83	-1,46	-2,03	-4,21	-3,27	2,73
8,4	-6,92	-5,46	-7,72	-9,69	-1,46	-2,26	-4,25	-3,13	2,75
B,0	-6,87	-4,86	-7,15	-9,57	-2,01	-2,28	-4,71	-3,41	2,83
7,65	-6,67	-4,24	-6,70	-9,44	-2,42	-2,45	-5,20	-3,61	2,91
7,4	-6,35	-3,67	-6,40	-9,40	-2,68	-2,73	-5,73	-3,88	3,05
7,2	-6,35	-2,80	-6,14	-9,10	-3,55	-3,36	-6,30	-3,64	2,99
7,0	-6,34	-1,53	-5,88	-8,78	-4,81	-4,35	-7,25	-3,35	2,86
6,8	-6,19	-2,37	-5,68	-8,71	-3,82	-3,32	-6,35	-3,44	2,88
6,7	-5,97	-1,64	-5,79	-8,80	-4,33	-4,15	-7,16	-3,82	3,04

TABELA 4:4.3

Resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani³³:

As energias livres são dadas em Kcal/mol.

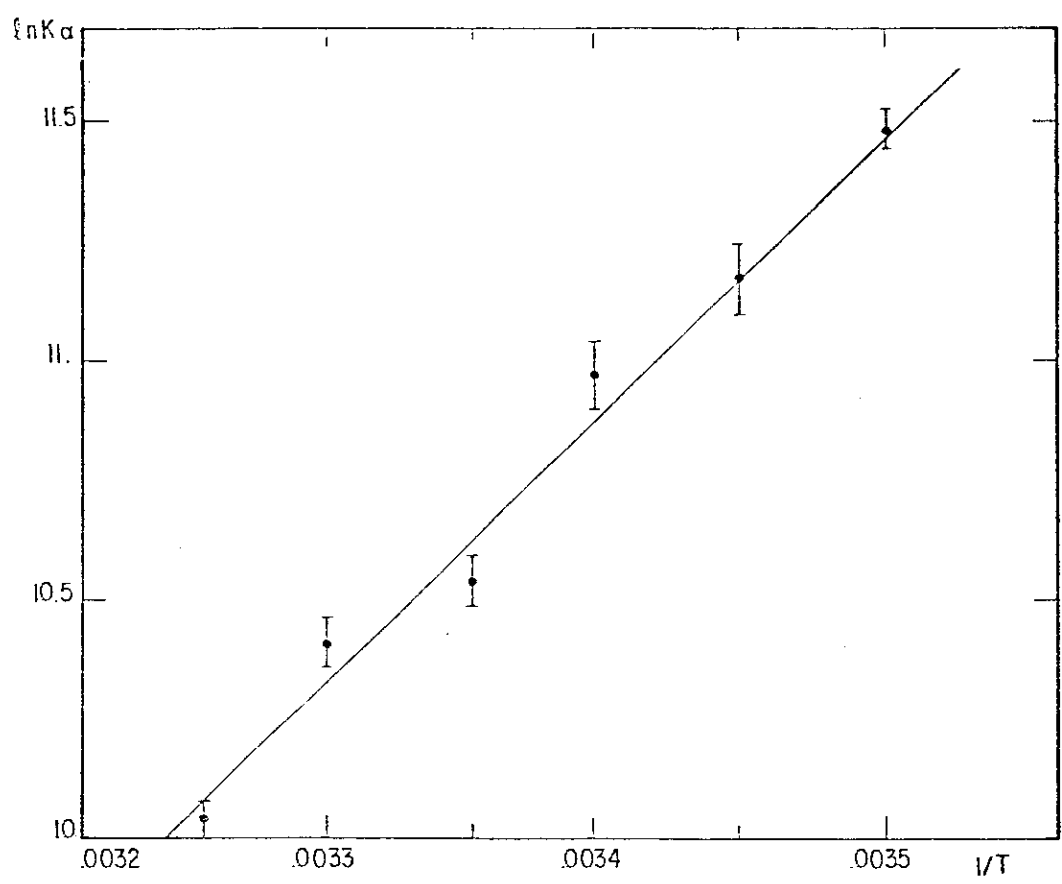
TABELA 4.4.4

T (°K)	ΔG_{α}^0 Kcal/mol	ΔG_{β}^0 Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha\beta}^{0'}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha\beta}^{0''}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_{\beta}^0$ Kcal/mol	$G_{\alpha\beta}^{0'}$ Kcal/mol	$G_{\alpha\beta}^{0''}$ Kcal/mol	$G_{34,12}^0$ Kcal/mol
283	-6,44±0,02	-3,88±0,28	-6,96±0,11	-9,69±0,19	-2,56±0,29	-3,08±0,30	-5,80±0,34	-3,76±0,60
288	-6,38±0,04	-3,81±0,45	-7,12±0,13	-9,43±0,25	-2,57±0,25	-3,30±0,47	-5,62±0,52	-3,43±1,12
293	-6,37±0,04	-4,17±0,31	-6,99±0,13	-9,29±0,20	-2,19±0,31	-2,82±0,33	-5,12±0,37	-3,40±0,08
298	-6,23±0,03	-3,93±0,33	-6,83±0,13	-9,23±0,21	-2,29±0,33	-2,89±0,35	-5,30±0,39	-3,51±0,70
303	-6,25±0,03	-3,94±0,27	-6,57±0,12	-9,06±0,27	-2,31±0,27	-2,63±0,30	-5,12±0,33	-3,44±0,71
308	-6,13±0,03	-4,04±0,25	-6,77 0,08	-8,78±0,14	-2,09±0,25	-2,74±0,27	-4,75±0,29	-3,05±0,64

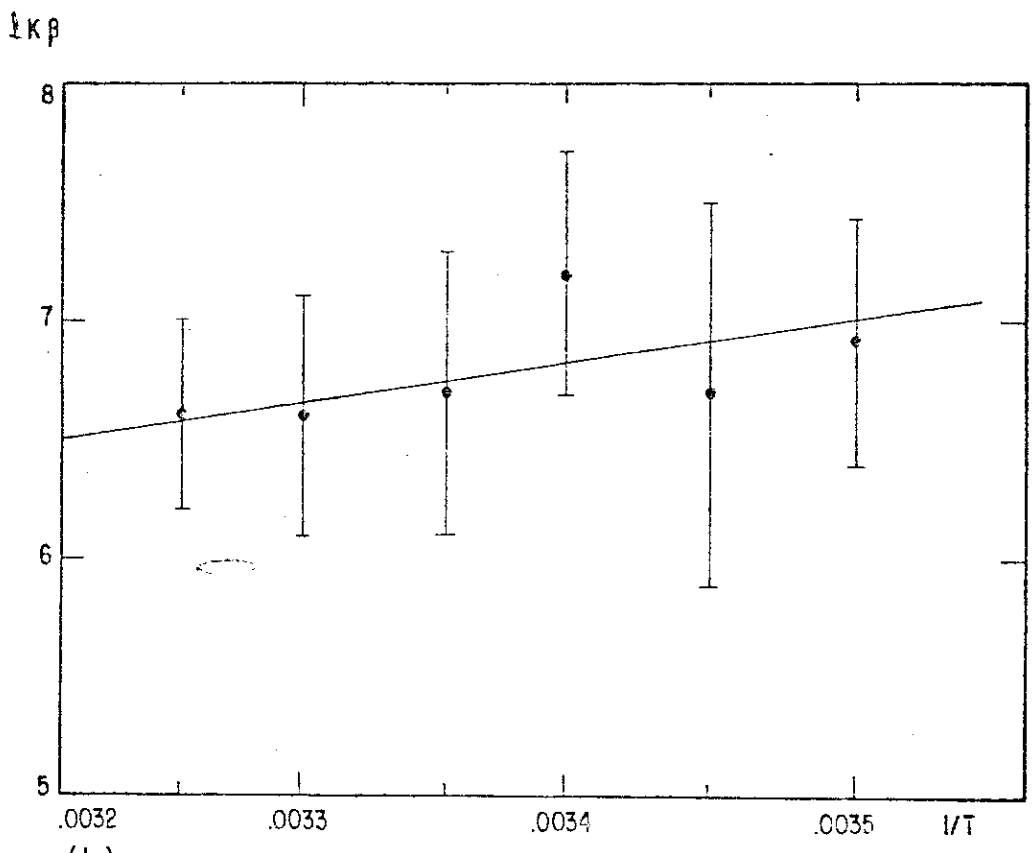
Resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani.⁴²

FIGURA 4.4.1

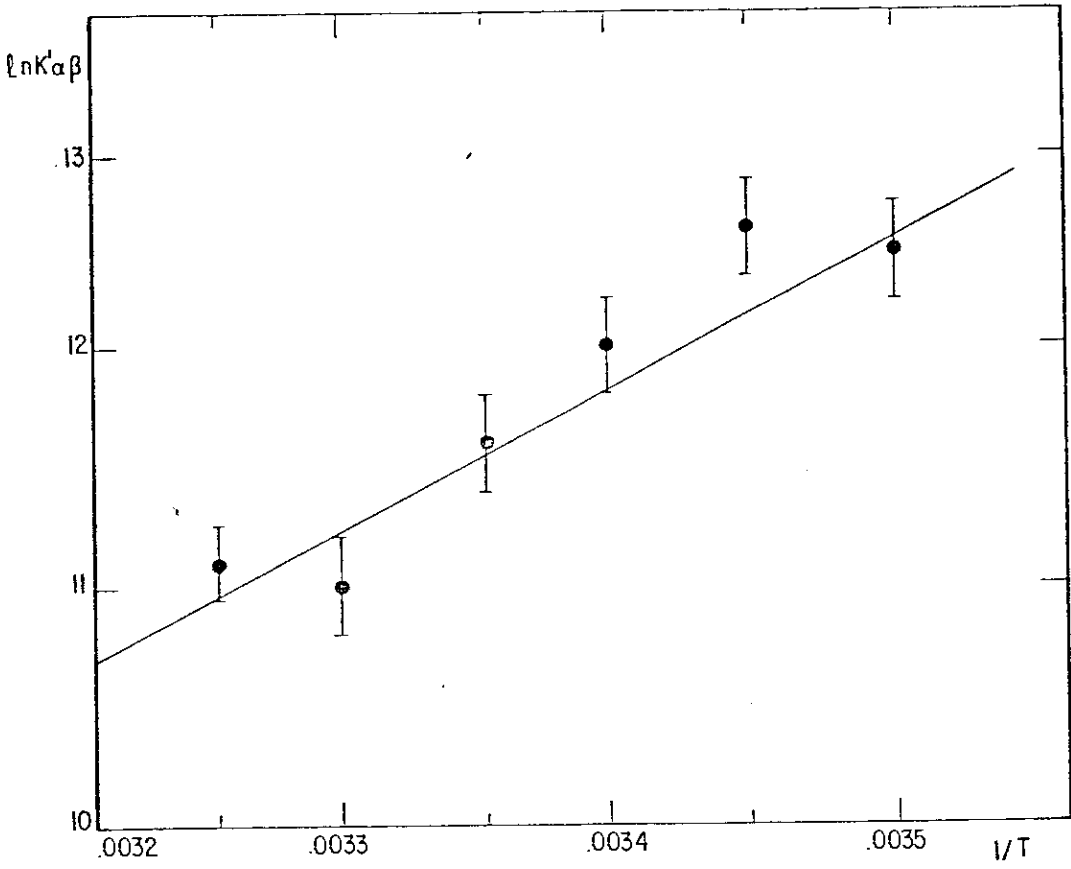
Gráficos de Van't Hoff obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani³³: (a) k_{α} , (b) k_{β} , (c) $k'_{\alpha\beta}$, (d) $k''_{\alpha\beta}$.



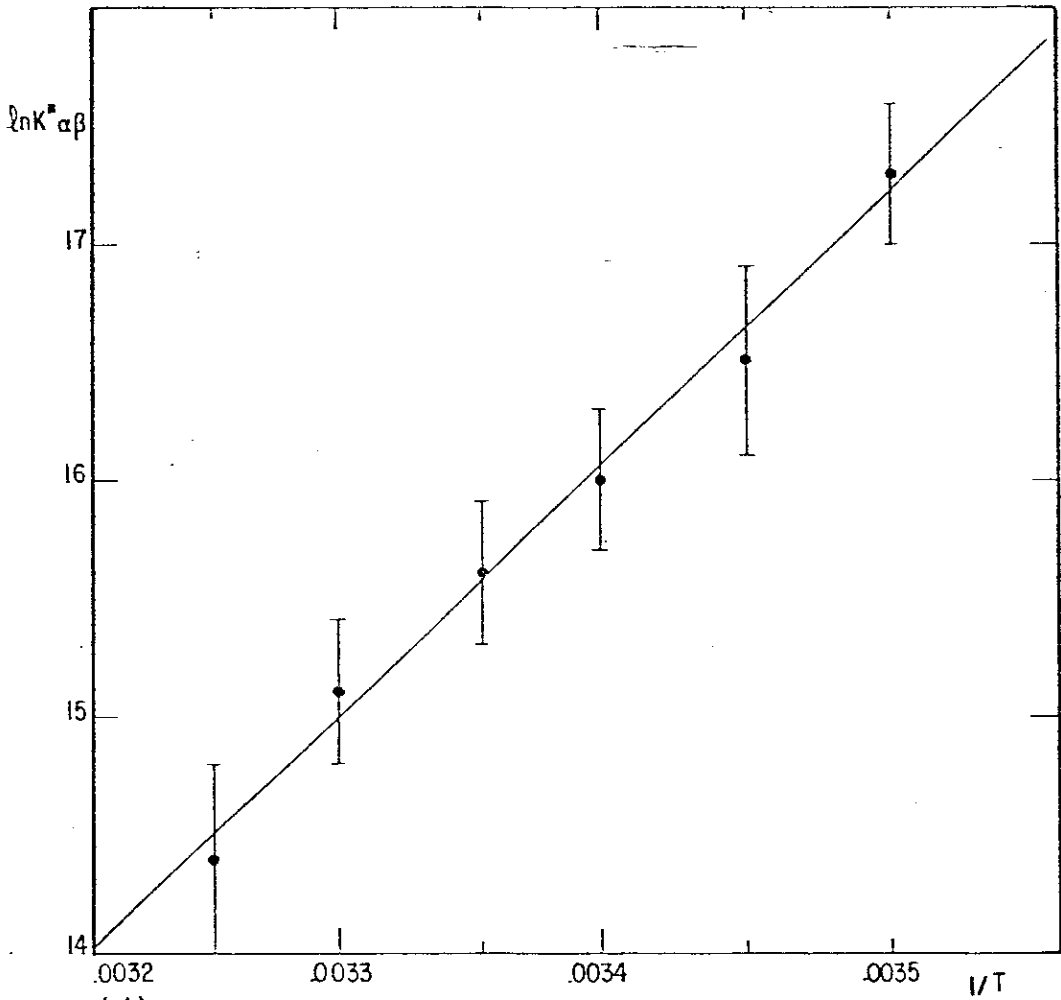
(a)



(b)



(c)



(d)

TABELA 4.4.5

$\Delta H_{\alpha}^0 = -9,80 \pm 0,37$	$\Delta H_{\beta}^0 = -2,79 \pm 4,06$
$\Delta S_{\alpha}^0 = -12 \pm 1$	$\Delta S_{\beta}^0 = +4 \pm 14$
$\Delta H_{\alpha\beta}^{0'} = -10,77 \pm 1,45$	$\Delta H_{\alpha\beta}^{0''} = -19,32 \pm 2,51$
$\Delta S_{\alpha\beta}^{0'} = -13 \pm 5$	$\Delta S_{\alpha\beta}^{0''} = -34 \pm 8$
$(\Delta H_{\alpha}^0 - \Delta H_{\beta}^0) = -7,01 \pm 4,45$	$(\Delta S_{\alpha}^0 - \Delta S_{\beta}^0) = -16 \pm 14$
$H_{\alpha\beta}^{0'} = -7,98 \pm 5,50$	$H_{\alpha\beta}^{0''} = -16,53 \pm 6,57$
$S_{\alpha\beta}^{0'} = -17 \pm 19$	$S_{\alpha\beta}^{0''} = -38 \pm 22$

Parâmetros Termodinâmicos de oxigenação obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani.⁴²

As entalpias são dadas em Kcal/mol e as entropias em cal/(mol °K)

Termos	$H_{\alpha\beta}^0 = -7,98 \pm 5,50$	$H_{\alpha\beta}^0 = -16,53 \pm 6,57$
Cooperativos	$S_{\alpha\beta}^0 = -17 \pm 19$	$S_{\alpha\beta}^0 = -38 \pm 22$
	$G_{\alpha\beta}^0 = -2,90 \pm 0,35$	$G_{\alpha\beta}^0 = -5,30 \pm 0,40$

Termos	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta H_{\beta}^0 - \Delta H_{\alpha}^0) = +2,10 \pm 2,48$
Anticooperativos	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta S_{\beta}^0 - \Delta S_{\alpha}^0) = +5 \pm 7$
	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta G_{\beta}^0 - \Delta G_{\alpha}^0) = +0,69 \pm 0,36$
	$-2 n_{\alpha_I \beta_{II}} H_{\alpha\beta}^0 = +13,41 \pm 13,5$
	$-2 n_{\alpha_I \beta_{II}} S_{\alpha\beta}^0 = +29 \pm 43$
	$-2 n_{\alpha_I \beta_{II}} G_{\alpha\beta}^0 = +4,86 \pm 1,63$

Interação	$H_{34,12}^0 = -8,90 \pm 3,70$
Alostérica	$S_{34,12}^0 = -19 \pm 12$
Efetiva	$G_{34,12}^0 = -3,51 \pm 0,70$

TABELA 4.4.6

Termos dominantes das equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3) calculados com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai e Yonetani⁴² em $[Cl^-] = 0,1M$, ausência de DPG e IHP e $T = 298^{\circ}K$. As entalpias e energias livres são dadas em Kcal/mol e as entropias em cal/(mol⁰K).

TABELA 4.4.7

Caso	ΔG_{α}^0 Kcal/mol	ΔG_B^0 Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha B}^0$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha B}^0$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha}^0 - \Delta G_B^0$ Kcal/mol	$G_{\alpha B}^0$ Kcal/mol	$G_{\alpha B}^0$ Kcal/mol	$G_{34,12}^0$ Kcal/mol
1	-7,31	-6,53	-7,65	-9,63	-0,78	-1,12	-3,10	-2,85
2	-6,78	-5,37	-7,02	-9,72	-1,42	-1,65	-4,35	-3,61
3	-6,18	-4,36	-6,69	-9,21	-1,82	-2,32	-4,85	-2,22
5	-5,60	-2,70	-6,02	-8,58	-2,90	-3,32	-5,88	-3,60
4	-5,72	-3,61	-5,72	-8,19	-2,11	-2,11	-4,58	-3,28
7	-5,19	-3,63	-4,26	-6,30	-1,56	-0,629	-2,67	-1,67

Resultados obtidos com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai ver na TABELA 4.4.8 as condições experimentais dos sete casos deste trabalho.

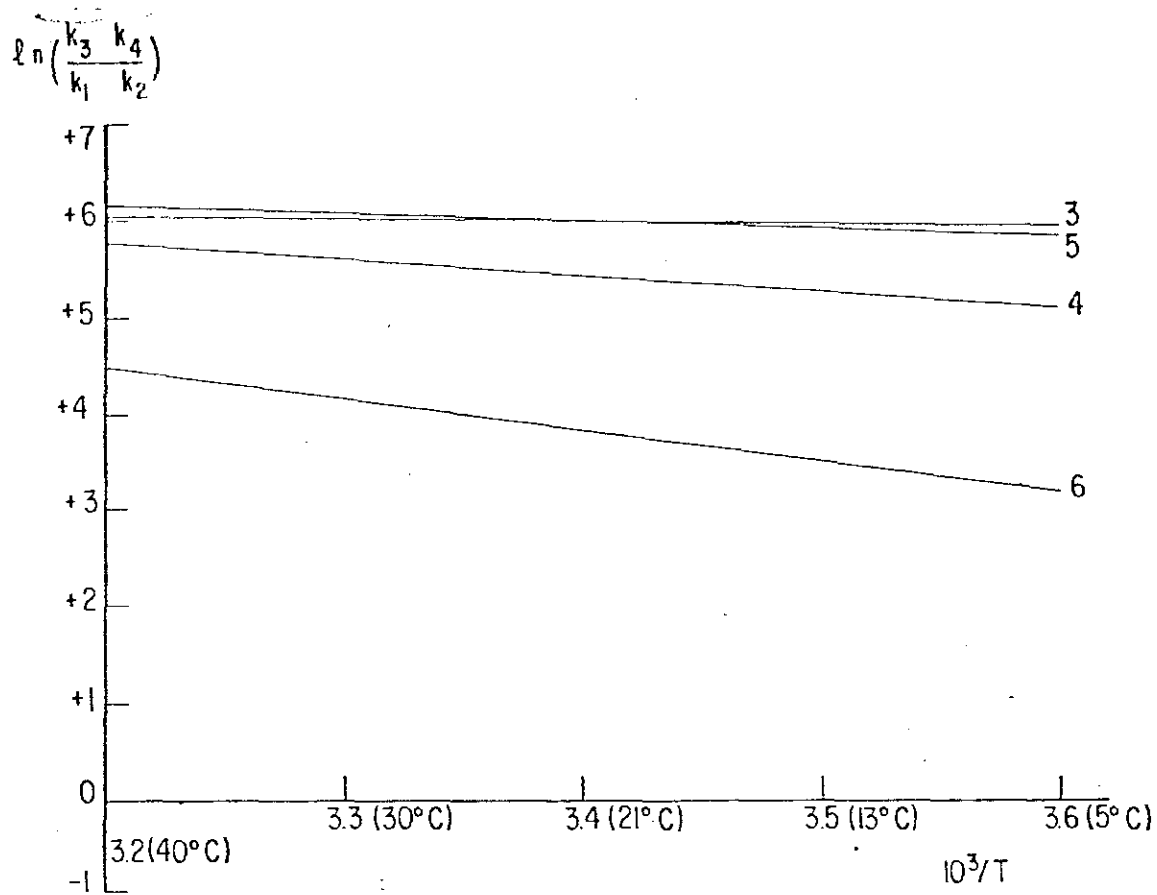


FIGURA 4.4.2

Gráficos de Van't Hoff da interação alostérica efetiva referentes a quatro casos de Imai²⁷ (ver TABELA 4.4.8).

TABELA 4.4.8

Ânions	pH 9,1	pH 7,4	pH 6,5
2,6 mM Cl^-	1		
0,1 M Cl^-	2	3	4
0,1 M Cl^- , 2 mM DPG		5	
0,1 M Cl^- , 2 mM IHP		6	7

Condições experimentais dos sete casos do trabalho de Imai²⁷.

CASO	1	2	3	4	5	6	7
$H_{34,12}^0$ (Kcal/mol)	+9,1	+12,6	+0,5	+3,4	+1,1	+6,4	+0,7
$S_{34,12}^0$ (cal/(mol ^o K))	+40	+54	+14	+22	+16	+30	+ 8
$G_{34,12}^0$ (Kcal/mol)	-2,8	-3,5	-3,7	-3,2	-3,7	-2,5	-1,7

TABELA 4.4.9

Valores dos parâmetros termodinâmicos de interação alostérica efetivos segundo o trabalho de Imai²⁷. Ver na TABELA 4.4.8 as condições experimentais dos sete casos de Imai.

CASO	$H_{\alpha\beta}^{O'}$	$H_{\alpha\beta}^{O''}$	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta H_{\beta}^{O'} - \Delta H_{\alpha}^{O'})$	$-2n_{\alpha\beta} H_{\beta\beta}^{O'}$	$H_{34}^{O'}$
4	+0,19	+1,84	+1,39	-0,24	+3,40
5	-14,00	-13,60	+6,37	+22,4	+1,10
	$S_{\alpha\beta}^{O'}$	$S_{\alpha\beta}^{O''}$	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta S_{\beta}^{O'} - \Delta S_{\alpha}^{O'})$	$-2n_{\alpha\beta} S_{\beta\beta}^{O'}$	$S_{34}^{O'}$
4	+8	+22	0	-10	+22
5	-35	-25	+17	+56	+16
	$G_{\alpha\beta}^{O'}$	$G_{\alpha\beta}^{O''}$	$2(n_{\alpha\alpha} - n_{\beta\beta})(\Delta G_{\beta}^{O'} - \Delta G_{\alpha}^{O'})$	$-2n_{\alpha\beta} G_{\beta\beta}^{O'}$	$G_{34}^{O'}$
4	-2,11	-4,58	+1,39	+2,74	-3,29
5	-3,31	-5,88	+1,16	+5,30	-3,61

TABELA 4.4.10

Principais termos das equações (4.4.1), (4.4.2) e (4.4.3), calculados com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Imai²⁷. As entalpias e energias livres são dadas em kcal/mol e as entropias em cal/(mol⁰K)

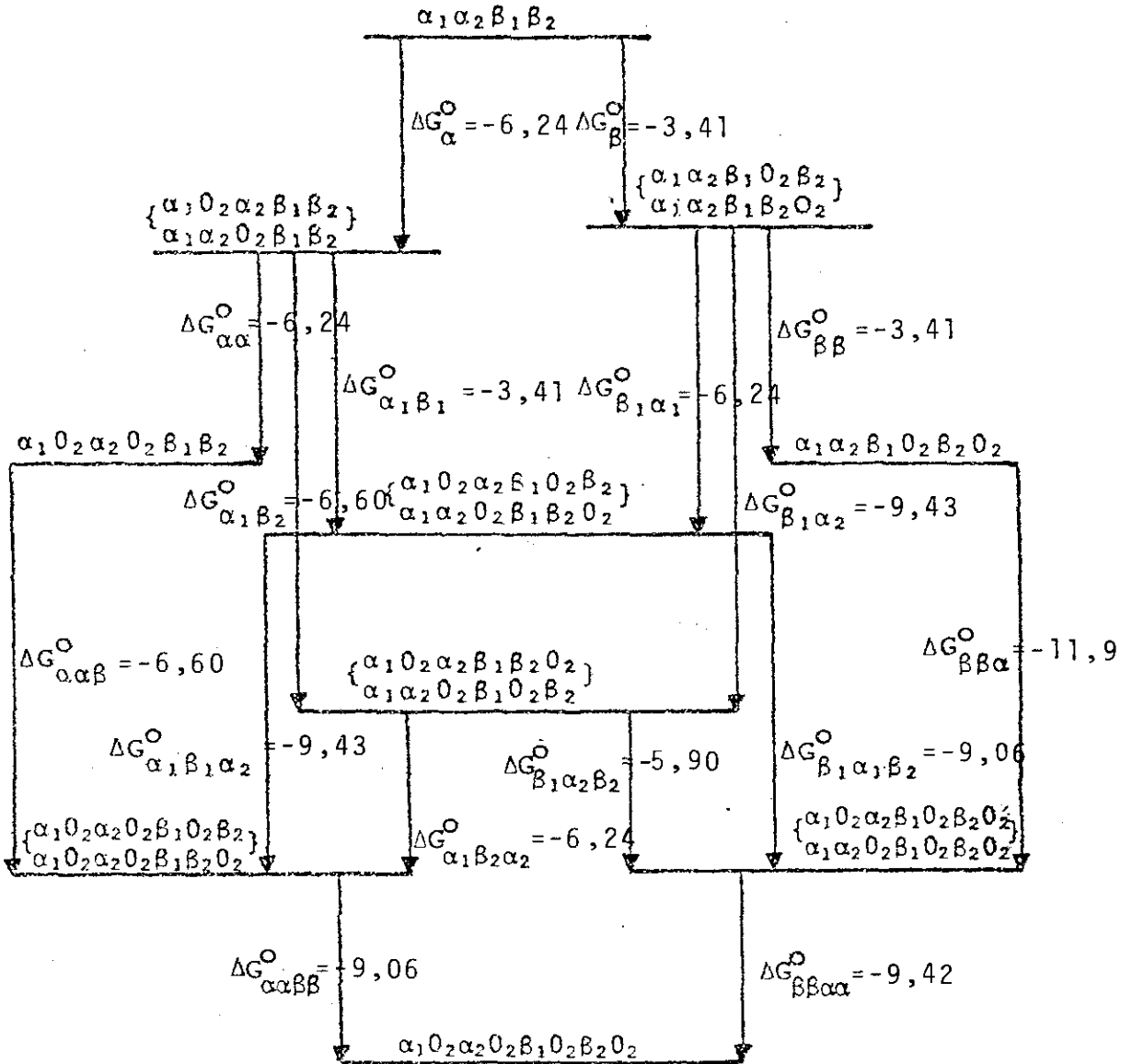


FIGURA 4.4.3

Valores das energias livres de oxigenação dos equilíbrios intermediários determinados com a aplicação da Primeira Aproximação aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵, na ausência de DPG.

TABELA 4.4.11

$ DPG $ mM	$\Delta G_{\alpha}^{\circ}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\beta}^{\circ} (DPG =0)$ Kcal/mol	ΔG_{β}° Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha}^{\circ} - \Delta G_{\beta}^{\circ}$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha}^{\circ} / \beta$ Kcal/mol	$\Delta G_{\alpha\beta}^{\circ} + \Delta G_{\alpha\beta\beta}^{\circ}$ Kcal/mol
0,0	$-5,94 \pm 0,1$	$-5,74 \pm 0,18$	$-5,74 \pm 0,18$	$-0,20 \pm 0,28$	$-6,93 \pm 0,20$	$-16,33 \pm 0,25$
0,2	$-5,94 \pm 0,1$	$-5,74 \pm 0,18$	$-5,43 \pm 0,24$	$-0,51 \pm 0,34$	$-5,54 \pm 0,50$	$-15,35 \pm 0,26$
0,5	$-5,94 \pm 0,1$	$-5,74 \pm 0,18$	$-4,16 \pm 0,96$	$-1,78 \pm 1,06$	$-5,67 \pm 0,33$	$-14,55 \pm 0,32$
1,0	$-5,94 \pm 0,1$	$-5,74 \pm 0,18$	$-3,82 \pm 1,27$	$-2,12 \pm 1,37$	$-4,45 \pm 1,20$	$-14,42 \pm 0,44$

Resultados obtidos com a aplicação da Segunda Aproximação aos dados de Tyuma, Imai e Shimizu²⁵.

Nos seguintes casos as constantes de Adair foram corrigidas dentro de erro experimental:

$$|DPG| = 1,0: \quad k_1 = 0,0139 \pm 0,0005; \quad k_2 = 0,00719 \pm 0,00405$$

4.5-Conclusões

O nosso trabalho sobre o equilíbrio Hb/O_2 , que tem sido intensivamente estudado, foi feito de um ponto de vista ainda não abordado. Nós nos preocupamos com as consequências que a diferenciação entre as cadeias α e β têm sobre a variação das constantes de Adair e, conseqüentemente, da curva de saturação fracional, com a temperatura.

É sabido que a aptidão para "fitar" a curva de saturação fracional não é um bom critério para avaliar a qualidade de um modelo, pois, tanto o modelo sequencial de Adair³, que é o mais geral, quanto os modelos de Monod, Wyman e Changeux⁵ e Koshland, Nemety e Filmer⁶ e até mesmo a equação de Hill²⁶, que não tem fundamento físico, e os modelos de Pauling⁴⁰ e Coryell⁴¹, baseados em interações heme-heme diretas, são capazes de fitar a curva de saturação fracional. Recentemente, Peller⁸ e Weber⁹ mostraram que a assimetria da curva de saturação fracional, cuja medida é o parâmetro $\Lambda = \ln(k_1 k_4 / k_2 k_3)$, é explicável pela diferenciação entre as cadeias α e β sendo que a argumentação é desenvolvida com base no modelo sequencial de Adair.

A introdução da temperatura como uma variável a ser estudada revela aspectos importantes do nosso problema. A diferença entre as energias livres de adição das duas últimas moléculas de oxigênio e das duas primeiras $G_{34,12}^0$ (equação 4.2.30) é, segundo dados experimentais recentes, uma função crescente da temperatura. Como a interação alostérica representa uma mu

dança na afinidade de uma subunidade pelo ligante induzida pela ocupação de outra subunidade, o seu cálculo é usualmente feito através de uma diferença entre energias livres. Há muitas diferenças a que se pode atribuir um significado físico e, portanto, muitos modos de definir a interação alostérica. A ação da temperatura sobre o equilíbrio Hb/O₂ se revela de uma forma peculiar, tanto nos dados experimentais quanto na forma funcional das equações que deduzimos, sobre os parâmetros termodinâmicos, que denominamos de interação alostérica efetiva, $H_{34,12}^0$, $S_{34,12}^0$ e $G_{34,12}^0$.

Os gráficos de Van't Hoff das constantes de Adair são, dentro de uma boa aproximação, retas. Isto implica em que, de acordo com a equação de Van't Hoff ($\ln(k) = -\Delta H/RT + \Delta S/R$), as entalpias de oxigenação não variam apreciavelmente com a temperatura no intervalo em que são medidas (5-40°C). Este resultado permitiu que tratássemos as entalpias de aproximação das subunidades (ΔH_α , ΔH_β , etc...) como sendo independentes da temperatura; mesmo assim, as equações para as entalpias de oxigenação, tanto do dímero hipotético $\delta\gamma$ quanto do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, foram deduzidas a partir das equações (3.3.1)...(3.3.4), que são muito gerais, e permanecem válidas mesmo se considerarmos as entalpias de oxigenação dos equilíbrios intermediários como funções da temperatura.

As equações (3.3.30)...(3.3.67) e (4.2.32)...(4.2.46) são uma contribuição para o estudo do equilíbrio Hb/O₂ e o problema das funções correlacionadas que ainda não havia sido estudado com a ênfase que dedicamos aos aspectos termodinâmicos. A

questão que nos preocupou é a seguinte: seja uma proteína que tenha subunidades sendo que cada subunidade combina-se com um ligante com entalpia de adição ΔH_i ($i=1, \dots, m$); como é, por exemplo, a entalpia da primeira adição de ligante como função das entalpias ΔH_i ? A resposta que encontramos é uma expansão do tipo $\Delta H_1 = \sum_{i=1}^m n_i \Delta H_i$, aonde cada coeficiente n_i é a fração molar da espécie com uma molécula de ligante adicionada à i ésima subunidade. As equações para os parâmetros termodinâmicos de oxigenação dos capítulos 3 e 4 são, portanto, muito gerais. Na forma em que estão escritas se referem a quaisquer proteínas do tipo $\delta\gamma$ ou $\alpha_2\beta_2$ podendo ser facilmente generalizadas para outros casos.

O detalhamento, tanto das equações para adição de oxigênio quanto das equações em que foi incluída a participação de um agente heterotrópico, está além do que pode ser medido até agora pois as energias envolvidas são menores do que o poder de resolução dos métodos experimentais; todavia, esperamos que no futuro estas equações possam ser aplicadas diretamente a dados experimentais.

Nós desenvolvemos uma boa parte da argumentação com o auxílio de um modelo dimérico que permitiu chegar a equações simples, comparadas às do capítulo IV, em que estão presentes os principais aspectos do problema. Neste modelo, a ambiguidade na definição da cooperatividade não ocorre; a energia livre de interação alostérica é dada pela comparação, de acordo com a equação (3.5.2), entre a segunda e a primeira etapas de oxigenação.

As equações para os parâmetros termodinâmicos de interação alostérica ((2.3.47), ..., (2.3.49) e (2.3.56), ..., (2.3.58)) contem os termos $H_{\delta\gamma}^0$, $S_{\delta\gamma}^0$ e $G_{\delta\gamma}^0$ que podem ser denominados de interação alostérica intersítio. A própria definição de cooperatividade nos levou a concluir que $G_{\delta\gamma}^0 < 0$ (eq. 3.5.4). Com base no que se conhece sobre o mecanismo da cooperatividade na hemoglobina nós assumimos que $H_{\delta\gamma}^0 < 0$ e $S_{\delta\gamma}^0 < 0$ (equações (3.5.5) e (3.5.6)); isto foi confirmado pela aplicação da Primeira Aproximação e dados experimentais (TABELAS 4.4.6 e 4.4.10), com exceção do caso 4 de Imai. Os demais termos das equações acima mencionadas, que denominamos de anticooperatividade não alostérica, são devidos à não equivalência funcional das cadeias δ e γ e à participação do efector L.

O comportamento predito para a variação da interação alostérica de um dímero $\delta\delta$ com a temperatura é o oposto do que se verifica nos dados experimentais de Imai. Nós argumentamos, com base no modelo dimérico e mostramos, com os resultados obtidos com a Primeira Aproximação (TABELA 4.4.10), que isto se deve ao papel dos termos de anticooperatividade não alostérica.

O fato de o número de incógnitas das equações (4.4.1) ... (4.4.4) exceder o número de variáveis que podemos conhecer nos levou a fazer as duas aproximações do capítulo 4. Além dos resultados que comentamos acima, estas aproximações permitiram mostrar a ação específica dos efetores DPG e IHP sobre a interface $\beta\beta$. É importante notar que esta especificidade não é uma condição *a priori* da Primeira Aproximação mas o é da Segunda Aproximação.

mação. Em ambas aproximações, se invertermos os índices α e β , as equações permanecem as mesmas, isto é, as duas aproximações nos dizem que as cadeias β tem um comportamento distinto do das cadeias α mas não nos dizem a que cadeia atribuir um determinado comportamento; isto foi feito com base em evidências experimentais. A Primeira Aproximação levou a resultados que indicam que, sem ter a especificidade de DPG e IHP, o efetor H^+ age mais intensamente sobre as cadeias β do que sobre as cadeias α ; como não há dados experimentais sobre a oxigenação preferencial com relação a H^+ , esta questão permanece em aberto.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Stryer L., "Biochemistry" (W.H. Freeman and Co.) (1981), pag. 106.
- (2) Stryer L., "Biochemistry" (W.H. Freeman and Co.) (1981), pag. 36
- (3) Adair G.S., J. Biol. Chem. 63 (1925) 529.
- (4) Guidotti G., J. Biol. Chem. 242 (1967) 3673.
- (5) Monod J., Wyman J. e Changeux J.P., J. Mol. Biol. 12 (1965) 88.
- (6) Koshland D.E., Nemethy G. e Filmer D., Biochemistry 5 (1966) 365.
- (7) Ingram V.M., Nature 180 (1957) 1477.
- (8) Peller L., Nature 300 (1982) 661.
- (9) Weber G., Nature 300 (1982) 603.
- (10) Koshland D.E., Goldbeter A. Stock J.B., Science 217 (1982) 220.
- (11) Stryer L., "Biochemistry" (W.H. Freeman and Co.) (1981), pag. 27
- (12) Bonaventura J., Bonaventura C. e Sullivan B., J. Exp. Zool. 194 (1976) 155.
- (13) Cantor C.R. e Schimmel P.R., "Biophysical Chemistry" (W.H. Freeman and Co., vol. I) (1980) pag. 139.
- (14) Antonini E. e Brunori M., "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands" (North-Holland Publishing Co.) (1971) pag. 1.
- (15) Wood E.J., Cayley G.R. e Pearson J.S., J. Mol. Biol. 109 (1977) 1.

- (16) Baldwin J.M., Prog.Biophys.Molec.Biol., 29(1975)225,pag. 227.
- (17) Antonini E. e Brunori M., "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands" (North-Holland Publishing Co.)(1971) pag. 179.
- (18) Dickerson R.E. e Geis I., "Hemoglobin Structure, Function, Evolution and Pathology"(The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.)(1982), pag.42.
- (19) Stryer L., "Biochemistry"(W.H.Freeman and Co.)(1981), pag. 110.
- (20) Weissbluth M., "The Physics of Hemoglobin", (Springer-Verlag)(1974)pag.15.
- (21) Dickerson R.E. e Geis I., "The Structure and Action of Proteins"(Harper and Row, New York)(1969), pag. 5B.
- (22) Dickerson R.E. e Geis I., "Hemoglobin Structure, Function, Evolution and Pathology"(The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc.)(1982), pag. 38.
- (23) Perutz M.F., Nature 228(1970)726.
- (24) Dickerson R.E. e Geis I., "Hemoglobin Structure, Function, Evolution and Pathology"(The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.)(1982), pag.49.
- (25) Tyuma I., Imai K. e Shimizu K., Biochemistry 12(1973)1491.
- (26) Hill A.V., J.Physiol. 40(1910)IV-VII.
- (27) Imai K., J.Mol.Biol. 133(1979)233.
- (28) Antonini E. e Brunori M., "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands"(North-Holland Publishing Co.)pag. 395.
- (29) Imai K., comunicação pessoal.
- (30) Arnone A. e Perutz M.F., Nature 249(1974)34.

- (29) Imai K., comunicação pessoal(1982),
- (30) Arnone A. e Perutz M.F., Nature 249(1974)34.
- (31) Antonini E. e Brunori M., "Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands" (North-Holland Publishing Co.)(1971) pag.179.
- (32) Wyman J., Adv.Protein Chem. 19(1964)223.
- (33) Imai K. e Yonetani T., J.Biol.Chem. 250(1975)2227.
- (34) Wyman J., J.Biol. Chem. 127(1939)581.
- (35) Imaizumi K., Imai K., e Tyuma I., J. Biochem. 86(1979)1829.
- (36) Johnson M.L., H.R.Halvorson e Ackers G.K., Biochemistry 15 (1976)5363.
- (37) Mills F.C. e Ackers G.K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76(1979) 273;
- (38) Lindstrom T.R. e Chien H., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972)1707; Johnson M. e Chien H., Biochemistry 13(1974) 3653.
- (39) Asakura T. e Pui-Wah L., Proc. Nat. Acad. Sci USA 75(1978) 5462.
- (40) Pauling L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 21(1935)186.
- (41) Coryell C.D., J. Phys. Chem. 48(1939)841.
- (42) Imai K. e Yonetani T., J. Biol. Chem. 250(1975)7093
- (43) Baldwin J.M., Prog. Biophys. Molec. Biol.,29(1975)225, pag 266.
- (44) Wyman J., Advan. Protein Chem., 19(1964)223.

“NÃO EQUIVALÊNCIA DE CADEIAS NA INTERAÇÃO ALOSTÉRICA DE EMOGLOBINA”

SAUL GDANSKI JACCHIERI

Tese apresentada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, fazendo parte da Banca Examinadora os seguintes Professores:

Ricardo de Carvalho Ferreira/CBPF

George Bemski (CBPF)

Takeshi Kodama (CBPF)

Humberto Siqueira Brandi/PUC

Leopoldo de Meis/UFRJ

Rio de Janeiro, 11 de maio de 1983