

GILBERTO WEISSMÜLLER

PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS E CINÉTICAS
DO TRANSPORTE ATIVO EM BIOMEMBRANAS:
EFEITOS DE COOPERATIVIDADE

TESE DE
MESTRADO

CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS
RIO DE JANEIRO
1989

AGRADECIMENTOS

- A Paulo Mascarello Bisch, pela orientação dedicada, pelo estímulo e pela amizade.
- Ao Grupo de Biofísica do CEPF, pelo estímulo com relação à área de Biofísica.
- À Myriam, pelos inúmeros favores.

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	v
INTRODUÇÃO	1
<u>CAPÍTULO I</u> - Princípios Termodinâmicos do Transporte Ativo	9
I.1 - Potencial Eletroquímico e Reações de transporte	9
I.2 - Equilíbrio Termodinâmico	15
I.3 - Fluxos Próximos do Equilíbrio	17
I.4 - Forças Motrizes	19
<u>CAPÍTULO II</u> - Propriedades Termodinâmicas e Cinéticas do Modelo de Acesso Alternado	21
II.1 - Modelo Mínimo para o Acesso Alternado	21
II.2 - Efeitos do Potencial e Relações entre as Cons- tantes cinéticas	30
II.3 - Estados Estacionários de Não-Equilíbrio	36
II.4 - Dependência dos Fluxos com a Diferença de Po- tencial, Concentrações e Densidade Superficial de Cargas	42
II.4.1 - Caso Geral	43
II.4.2 - Efeitos da Densidade Superficial de Cargas da Membrana	49
II.4.3 - Estados Estacionários em Sistemas Fi- nitos. Efeitos do Transporte Passivo .	56

<u>CAPÍTULO III</u> - Efeitos da Cooperatividade no Transporte Ativo .	59
III.1 - Esquemas Cinéticos com Cooperatividade	62
III.2 - Modelo Cooperativo Mínimo	63
III.3 - Modelo de Lotka Adaptado	69
III.4 - Modelo de Edelstein Adaptado	75
CONCLUSÕES	89
APÊNDICE A	93
APÊNDICE B	97
BIBLIOGRAFIA	103

RESUMO

Apresentamos uma discussão das propriedades físicas dos sistemas de Transporte Ativo, em particular das ATPases, para duas classes de modelos baseados no modelo de Acesso Alternado: (i) modelos não cooperativos e (ii) modelos nos quais supomos a existência de cooperatividade nas transições conformacionais das proteínas transportadoras.

As propriedades dos modelos de transporte são estudadas do ponto de vista geral da termodinâmica de não equilíbrio e da cinética química.

Analisamos o comportamento dos fluxos de Transporte Ativo no estado estacionário em função da afinidade da reação de ATPase, da diferença de potencial elétrico através da membrana e em função do gradiente de concentração do íon transportado. Para o modelo não cooperativo mostramos a dependência específica destes fluxos para cada uma das variáveis; discutimos em particular o efeito da densidade superficial de cargas da membrana sobre estes fluxos.

A análise das propriedades cinéticas dos modelos cooperativos mostra a dependência sigmoidal dos fluxos em função das concentrações de ATP e do íon transportado. Mostramos ainda que um dos modelos (modelo adaptado de Edelstein) apresenta estados estacionários múltiplos. A estabilidade destes estados é investigada através da análise de estabilidade linear.

INTRODUÇÃO

Os seres vivos são constituídos por células, as quais são pequenos compartimentos delimitados por uma membrana contendo uma solução aquosa concentrada de substâncias químicas (citoplasma). A função básica desta membrana é impedir a dissolução entre o citoplasma e o meio no qual a célula está imersa, geralmente mantendo as composições químicas destes dois meios bastante diferenciadas.

As células em alguns casos podem conter outras estruturas subcelulares (organelas) também delimitadas do resto do citoplasma por membranas, em geral diferentes para cada organela.

As propriedades e funções das membranas são fundamentais para o funcionamento e manutenção da vida da célula. Estas funções são muito diversificadas, não se resumindo apenas à função discutida acima, podendo variar entre as células e entre as diversas membranas de uma mesma célula. A função pode variar ainda com a face, interna ou externa, e a posição na membrana. Por exemplo, a função da membrana pode estar intimamente ligada à produção de energia pela célula, como no caso da mitocôndria e do cloroplasto ou estar relacionada aos mecanismos de recepção de estímulos externos. A membrana pode servir também como um

regulador seletivo da passagem de substâncias entre a célula ou organela e o meio externo.

O modelo aceito atualmente para a estrutura básica de todas as membranas celulares é o que vemos na figura 1.1.

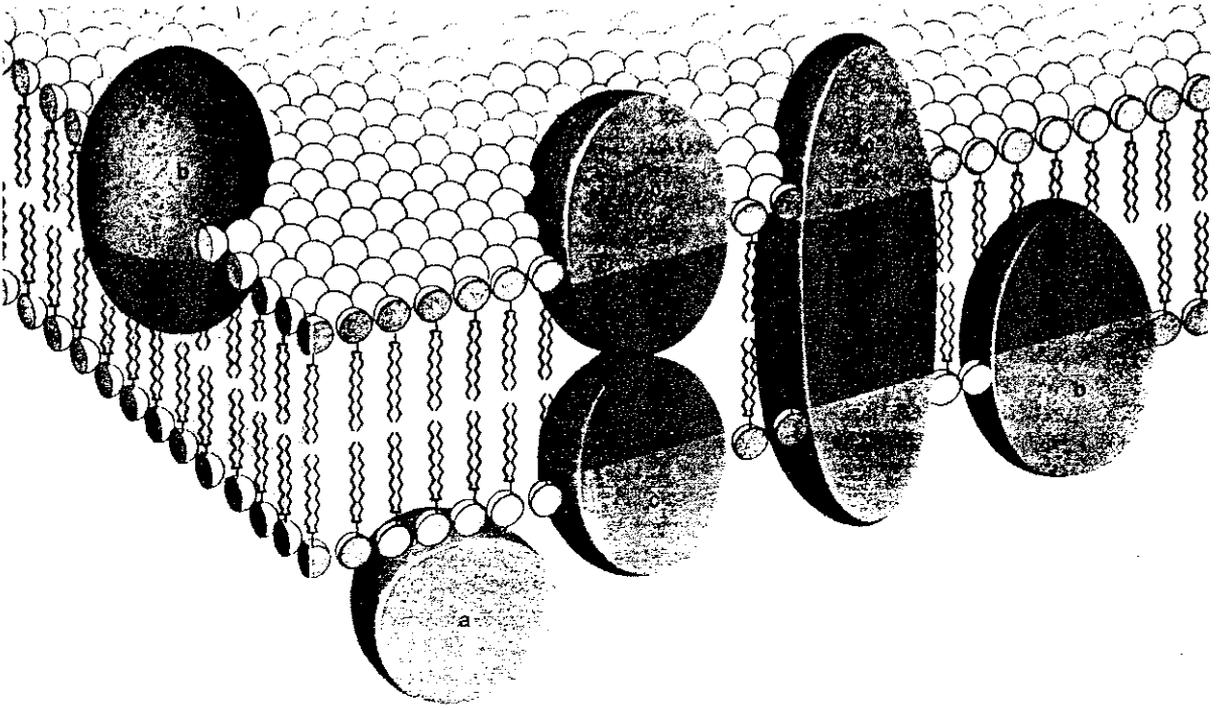


Figura 1.1 - Estrutura lipoproteica comum a todas as membranas celulares. Uma bicamada de lipídios constitui a estrutura básica da membrana, servindo como suporte para as moléculas de proteínas a ela associadas. Os glóbulos de proteína associados à bicamada de lipídios podem ficar presos à bicamada (a), parcialmente imersos (b) ou mesmo atravessar toda a extensão da bicamada (c).

As membranas diferem tanto pelo tipo de fosfolipídios que compõe a bicamada, quanto pelo tipo de proteína a ela associada. Porém, é de grande aceitação que as funções biológicas da membrana estejam essencialmente caracterizadas pelo tipo de proteína presente.

Em particular, com relação aos processos de transporte,

sabemos ser a bicamada de fosfolípidios altamente impermeável a ions e moléculas polares, entretanto para um grande número de células observa-se um fluxo intenso de ions através da membrana. As proteínas agiriam então como mediadores do transporte desses ions.

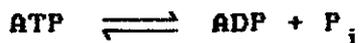
Neste trabalho estaremos interessados em um particular tipo de transporte, chamado de Transporte Ativo, no qual a membrana induz a passagem de um soluto no sentido de aumentar a diferença de potencial eletroquímico entre os dois lados da membrana ou simplesmente no sentido de aumentar a diferença de concentração, no caso de um soluto eletricamente neutro. Como esperado da termodinâmica, este tipo de transporte requer alguma fonte de energia e portanto podemos falar neste caso de um bombeamento de matéria através da membrana. O transporte que ocorre no sentido de anular o gradiente eletroquímico é denominado de Transporte Passivo.

É bem aceito na literatura [1] que o Transporte Ativo deve estar associado às grandes proteínas que atravessam a membrana (tipo o na fig. 1.1), as quais serviriam como bombas do Transporte Ativo. Proteínas deste tipo poderiam servir também como canais seletivos para o Transporte Passivo.

As fontes de energia do Transporte Ativo podem ser por exemplo luz, hidrólise de ATP (Trifosfato de Adenosina), o gradiente eletroquímico de outra substância ou a energia de reações de oxi-redução. Os sistemas de Transporte Ativo são diferentes e específicos para cada fonte de energia. Do ponto de vista teórico, a análise das propriedades destes sistemas exige considerações específicas, de modo que uma abordagem geral se torna difícil. Neste trabalho analisaremos

principalmente as proteínas que utilizam como fonte de energia a hidrólise do ATP, e brevemente as que usam a energia proveniente do gradiente eletroquímico de uma outra substância.

Normalmente grande parte da energia adquirida pelas células é transferida para a forma de energia livre da reação de hidrólise do ATP,



com a produção de ATP a partir de ADP (Difosfato de Adenosina) e P_i (Fosfato inorgânico), isto é, deslocando do equilíbrio a reação acima. A proteína para realizar o Transporte Ativo deve então agir como um catalizador da reação de hidrólise do ATP e deve acoplar o seu ciclo de reações de transporte a esse processo catalítico, isto é, deve ter no mínimo um passo do ciclo de reação de transporte comum aos passos da reação catalítica.

Sistemas de Transporte Ativo são extremamente comuns nas membranas das células e em um grande número de organelas. Sabe-se atualmente que estes sistemas tem funções essenciais no metabolismo das células e de organismos superiores. Por exemplo, na entrada de nutrientes tais como aminoácidos [2,3] ou na excreção de metabólitos indesejados. Nos músculos, o Transporte Ativo de Cálcio da membrana do Reticulo Sarcoplasmático controla o processo de contração e relaxamento da fibra muscular [4]. O transporte através da membrana regula também a composição iônica e molecular do citoplasma para a manutenção de diferentes ambientes dentro de uma mesma célula.

Na *Halobacterium halobium* a proteína Bacteriorhodopsin da membrana citoplasmática é responsável pelo Transporte Ativo de prótons para o exterior da célula quando há incidência de luz

sobre ela, gerando assim um gradiente eletroquímico [2]. A volta desses prótons através de outras proteínas para dentro do citoplasma é utilizada para a síntese de ATP. O processo de transporte nestas proteínas é reversível, isto é, as proteínas podem realizar o Transporte Ativo a partir do consumo de ATP.

Foi observado também que nos cloroplastos e mitocôndrias existem proteínas capazes de sintetizar ou hidrolizar ATP utilizando ou criando um gradiente de potencial eletroquímico respectivamente [5-7]. A idéia da produção de ATP nos cloroplastos e mitocôndrias a partir de um gradiente eletroquímico foi introduzida por Mitchel em 1966 com a conhecida "Hipótese Quimiosmótica", ligando fortemente a teoria do Transporte Ativo ao estudo da bioenergética celular.

Assim, temos justificado o enorme esforço teórico e experimental despendido no sentido de uma melhor compreensão deste processo, o qual pode ser verificado pela extensão da bibliografia disponível.

Existe atualmente uma grande quantidade de células ou organelas cujo sistema de Transporte Ativo já foi estudado com bastante detalhe. Podemos citar por exemplo artigos de revisão sobre a classe de Proteínas transportadoras F_0F_1 (proteínas existentes nos cloroplastos, mitocôndrios e algumas bactérias) [8], sobre o transporte iônico em células de vertebrados [9], sobre o transporte de aminoácidos em microorganismos eucariotos [10] e sobre as proteínas transportadoras das membranas plasmáticas de plantas e fungos [11].

No entanto esses trabalhos não conseguiram levantar um conhecimento completo de todas as propriedades estruturais ou

cinéticas de nenhuma bomba de Transporte Ativo, não permitindo ainda uma descrição microscópica do mecanismo pelo qual a proteína realiza o transporte. Provavelmente este mecanismo varia de acordo com o organismo, a organela e o soluto a ser transportado.

Do ponto de vista teórico, existem esforços no sentido de propor modelos específicos de transporte, assim como no sentido de obter uma abordagem formal a partir dos princípios gerais da termodinâmica e da cinética química [12-16].

Modelos específicos são por exemplo os de Dragomir [17] e Nagle et al [18-20]. Jardetzki [21] propôs em 1966 um modelo alostérico, no qual a bomba alterna, em um ciclo de reação, entre dois estados conformacionais nos quais a proteína pode trocar íons com as soluções, primeiro com uma das fases e depois com a outra, mas nunca simultaneamente com as duas.

Segundo Tanford [1] que denomina este modelo de Modelo de Acesso Alternado, é questionável se existem outros mecanismos viáveis para o Transporte Ativo. Provavelmente devido à sua simplicidade, quase todos os modelos propostos na literatura são variantes deste modelo.

Além disso, trabalhos recentes tem obtido algumas evidências da validade deste modelo. Por exemplo, inúmeros trabalhos recentes comprovam a existência de diferentes estados conformacionais para as proteínas transportadoras [22-25].

O objetivo deste trabalho é analisar as propriedades termodinâmicas e cinéticas do Transporte Ativo de duas classes de Modelos de Acesso Alternado: modelos não cooperativos e modelos nos quais supomos a existência de cooperatividade nas transições

conformacionais das proteínas.

Expomos a seguir um breve roteiro deste trabalho.

No capítulo I apresentamos uma discussão do Transporte Ativo de forma independente do modelo cinético suposto para a proteína, a partir dos conceitos básicos da termodinâmica. Inicialmente introduzimos o conceito do potencial eletroquímico, o qual permite a identificação das forças termodinâmicas que atuam no sistema: o gradiente de potencial eletroquímico do íon transportado e a afinidade da reação de ATPase.

Com estes conceitos estabelecidos discutimos então algumas propriedades gerais do sistema de Transporte Ativo no equilíbrio e em estados de não equilíbrio.

Entretanto, várias propriedades do Transporte Ativo são dependentes do mecanismo de transporte suposto para a proteína. Essas propriedades são, por exemplo, a dependência dos fluxos de transporte com a diferença de potencial através da membrana ou com a afinidade da reação de ATPase. No capítulo II procuramos analisar as propriedades termodinâmicas e cinéticas do Transporte Ativo para a classe de Modelos de Acesso Alternado a qual não apresenta efeitos de cooperatividade no mecanismo de transporte. O modelo analisado corresponde a um dos modelos mais simples (modelo mínimo) dos vários Modelos de Acesso Alternado propostos na literatura. A partir deste modelo mínimo analisamos a dependência dos fluxos de transporte com as variáveis: diferença de potencial através da membrana, as concentrações dos íons transportados e a afinidade da reação de ATPase. Analisamos também o efeito da densidade superficial de cargas da membrana

sobre estes fluxos.

Analisamos ainda, os estados estacionários no caso em que os sistemas são finitos e o potencial não é controlado externamente.

No capítulo III analisamos as propriedades cinéticas de modelos de Transporte Ativo nos quais supomos a existência de cooperatividade durante as transições conformacionais das proteínas. O tipo de cooperatividade suposto neste trabalho corresponde a uma interação do tipo autocatalítica nas transições conformacionais das proteínas.

Neste capítulo estaremos interessados no comportamento cinético dos modelos cooperativos, pois alguns destes modelos apresentam propriedades que podem explicar os fenômenos oscilatórios ou os diferentes regimes de transporte nas células. Destas propriedades estaremos particularmente interessados na existência de estados estacionários múltiplos.

O primeiro modelo discutido é o modelo cooperativo mínimo, o qual é uma modificação do Modelo Mínimo definido no capítulo II, e corresponde ao modelo mais simples no qual existe cooperatividade. O segundo esquema de transporte analisado é adaptado do modelo de Lotka [26] e corresponde ao Modelo Mínimo com dois passos cooperativos. Veremos que estes dois modelos acima não apresentam estados estacionários múltiplos.

O terceiro modelo analisado corresponde a uma adaptação ao nosso ciclo de transporte do modelo cinético analisado por Edelstein [26], o qual apresenta estados estacionários múltiplos. A estabilidade destes estados é investigada através da análise de estabilidade linear.

CAPÍTULO I

PRINCÍPIOS TERMODINÂMICOS DO TRANSPORTE ATIVO

Neste capítulo apresentaremos os conceitos termodinâmicos necessários à compreensão dos fenômenos de transporte através de uma membrana biológica, em particular, para a compreensão do Transporte Ativo. A partir desses conceitos, analisaremos as propriedades do transporte que podem ser discutidas de forma independente do modelo cinético da proteína mediadora deste transporte, tais como as propriedades do equilíbrio e perto do equilíbrio.

1.1-Potencial Eletroquímico e Reações Transporte

Os processos de transporte através da membrana podem ser discutidos de maneira formal pela termodinâmica a partir do potencial químico definido pela relação de Gibbs. O potencial químico, no caso de substâncias iônicas, deve ser entendido como o potencial eletroquímico.

O potencial eletroquímico é definido em termos da energia livre de Gibbs a temperatura e pressão constantes:

$$\tilde{\mu}_j = \left[\frac{dG}{dn_j} \right]_{n_k} \quad (1.1)$$

$\tilde{\mu}_j$ é a variável termodinâmica associada à variável n_j (número de mol da espécie química x_j na solução). Esta variável é de particular interesse quando estão envolvidos os fenômenos de

transporte e reações químicas, com os quais n_j pode variar.

O transporte através da membrana pode ser analisado formalmente por um esquema semelhante a uma reação química, isto é, podemos pensar o transporte como uma transformação entre espécies químicas, que serão apenas diferenciadas pela fase em que estão. Em ambos os casos, de transporte e reações químicas, o equilíbrio do sistema se dá quando a energia livre do sistema é mínima.

Em uma reação química entre duas espécies A e B,



costuma-se denominar os elementos representados a esquerda como "reagentes", e os elementos a direita como "produtos". Transferindo todos os termos para a direita obtemos



onde o sinal negativo de A indica que este elemento é um "reagente". A identificação dos reagentes e produtos em uma reação não é única, já que a reação pode ocorrer em qualquer sentido. Portanto, a escolha de uma sentido é uma pura convenção.

Seja um conjunto de r reações químicas ou de transporte das N espécies químicas x_j .



onde v_j^i é o coeficiente estequiométrico da espécie química x_j na i-ésima reação. Se x_j for um reagente, v_j^i deve ser negativo. v_j^i expressa também o número de moléculas j que são consumidas (ou produzidas) na reação i.

Se n_j é o número de mol de x_j , então

$$dn_j = \sum_i dn_j^i \quad (1.3)$$

já que cada reação se processa a uma velocidade diferente provocando uma variação própria de n_j .

Podemos também definir para cada reação um grau de avanço $d\xi^i$. Utilizando o coeficiente estequiométrico v_j^i , obtemos para cada espécie química na reação i :

$$dn_j^i = v_j^i d\xi^i \quad (1.4)$$

que indica a existência de uma variação proporcional no consumo e produção de espécies químicas em uma reação. O sinal do grau de avanço da reação deve ser coerente com o sentido adotado para esta reação.

A energia livre pode ser calculada através da relação

$$dG = \sum_j \tilde{\mu}_j dn_j \quad (1.5)$$

e usando-se as relações (1.4) e (1.5) vem

$$dG = \sum_i d\xi^i \left[\sum_j \tilde{\mu}_j v_j^i \right] \quad (1.6)$$

onde os $d\xi^i$ são todos independentes.

Logo, no equilíbrio, onde $dG = 0$,

$$\sum_j \tilde{\mu}_j v_j^i = 0 \quad i = 1, \dots, r \quad (1.7)$$

Este conjunto de equações caracterizará o equilíbrio do transporte através da membrana e das reações químicas do sistema.

Para uma solução ideal o potencial químico do soluto pode ser escrito como:

$$\tilde{\mu}_j = \mu_j^o + RT \ln \frac{n_j}{n} + zF\varphi \quad (1.8)$$

onde n é o número de mol total na solução, μ_j^o reflete as propriedades inerentes de uma molécula isolada do soluto, φ é o potencial elétrico, F é a constante de Faraday e z é a carga do íon x_j .

Um coeficiente de atividade (γ_j) deve acompanhar a fração molar do soluto na relação acima ($\ln \gamma_j \frac{n_j}{n}$) para dar conta de desvios da idealidade da solução, levando em consideração as interações entre o soluto e o solvente e as interações entre as moléculas do soluto.

Usualmente se escreve a relação (1.8) em termos de concentração molar. Para uma solução aquosa obtemos

$$\tilde{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln c_j + zF\varphi \quad (1.9)$$

onde

$$\mu_j^* = \mu_j^o + RT \ln \gamma_j - RT \ln 55 \quad (1.10)$$

já que existem 55 mol de água em 1 litro.

A diferença de potencial eletroquímico entre os dois lados da membrana será então

$$\Delta \tilde{\mu}_j = \tilde{\mu}_j' - \tilde{\mu}_j'' = \Delta \mu^* + RT \ln \frac{c_j'}{c_j''} + zFA\varphi \quad (1.11)$$

onde $\Delta \mu^* = RT \ln \gamma_j$

Ao final de um ciclo de reações de transporte, as proteínas transportadoras não são alteradas. Portanto, em um esquema de

reação global, correspondente a um ciclo de reações de transporte, não aparecem os termos correspondentes a estas proteínas.

Para o Transporte Passivo que não envolva gastos de energia, mesmo que mediado por moléculas transportadoras, o esquema da reação global será simplesmente



onde (') e (')' indicam fases diferentes para uma mesma espécie química x_j .

Assim, pelo formalismo anterior, o equilíbrio do Transporte Passivo deve se caracterizar por

$$\tilde{\mu}_j'' - \tilde{\mu}_j' = 0 \quad (1.13)$$

ou, supondo que as duas fases da solução possam ser consideradas suficientemente semelhantes para que $\Delta\mu_j^* = 0$,

$$\frac{c'}{c''} = e^{z\Delta u} \quad (1.14)$$

onde

$$u \equiv \frac{F\psi}{RT} \quad \text{e} \quad \Delta u \equiv u' - u''$$

Normalmente nos referimos à relação (1.14) como o Equilíbrio eletroquímico do sistema. O valor de equilíbrio do potencial e das concentrações dependerá de fatores como o transporte de outros elementos e das cargas da membrana, como veremos adiante.

No estudo do Transporte Ativo devemos considerar pelo menos os seguintes três elementos: a fonte de energia, as proteínas transportadoras e a bicamada de fosfolipídios que serve como suporte das proteínas e separa as duas fases da solução.

No caso mais geral, estão ocorrendo três reações neste sistema:

1. Hidrólise do ATP levando ao transporte de n moléculas x_j através da membrana,



2. Degradação da fonte de energia. No nosso caso, a hidrólise direta do ATP, isto é, hidrólise que não leva ao transporte



3. Transporte Passivo de íons pela membrana,



Como vimos na introdução, a proteína deve acoplar a reação de hidrólise do ATP com o transporte de íons através da membrana. Este acoplamento está representado pela reação (1.15).

Se os três processos descritos acima estão ocorrendo, da relação (1.6) podemos mostrar que

$$dG = dG_1 + dG_2 + dG_3 = dG_a + dG_b \quad (1.17)$$

onde

$$dG_a = (\tilde{\mu}''_j - \tilde{\mu}'_j) d\xi^a \quad (1.18)$$

$$dG_b = (\tilde{\mu}_{\text{ADP}} + \tilde{\mu}_{P_i} - \tilde{\mu}_{\text{ATP}}) d\xi^b \quad (1.19)$$

e

$$d\xi^a = nd\xi^1 + d\xi^3$$

$$d\xi^b = d\xi^1 + d\xi^2$$

Na linguagem da Termodinâmica de Não Equilíbrio, podemos identificar nestas expressões as duas forças termodinâmicas que atuam no sistema: a diferença de potencial eletroquímico

$(\tilde{\mu}_j'' - \tilde{\mu}_j')$ entre as duas fases da solução e a afinidade da reação de ATPase:

$$A_{ATP} = \frac{dG_2}{d\xi^2} = \Delta G^0 + RT \ln \frac{c_D c_P}{c_T} = RT \ln \frac{c_D c_P / c_T}{\bar{c}_D \bar{c}_P / \bar{c}_T} \quad (1.20)$$

onde \bar{c}_D , \bar{c}_P e \bar{c}_T indicam concentrações de equilíbrio para ADP, P_i e ATP respectivamente, e $\Delta G^0 = RT \ln(\bar{c}_T / \bar{c}_D \bar{c}_P)$.

Se apenas o processo descrito pela reação (1.15) ocorre no sistema, as relações (1.18) e (1.19) se reduzem a uma única relação:

$$dG = (n\tilde{\mu}_j'' - n\tilde{\mu}_j' + \tilde{\mu}_{ADP} + \tilde{\mu}_{P_i} - \tilde{\mu}_{ATP})d\xi$$

Portanto existe uma única força termodinâmica neste caso:

$$F = n\Delta\tilde{\mu}_X - A$$

Esta força termodinâmica depende da estequiometria da proteína (estequiometria = n = número de ions transportados por molécula de ATP hidrolisada).

1.2-Equilíbrio Termodinâmico

Das equações (1.12), (1.15) e (1.16) vemos que o equilíbrio do Transporte Ativo no caso mais geral é dado por:

$$\tilde{\mu}_j'' - \tilde{\mu}_j' = 0 \quad (1.21)$$

$$\tilde{\mu}_{ADP} + \tilde{\mu}_{P_i} - \tilde{\mu}_{ATP} = 0 \quad (1.22)$$

Neste caso teremos o equilíbrio eletroquímico e o equilíbrio da reação de hidrólise de ATP.

A constante de equilíbrio K_T da reação de Hidrólise de ATP é conhecida experimentalmente [27]:

$$K_T = \frac{\bar{c}_D \bar{c}_P}{\bar{c}_T} \cong 10^5 \text{ Molar} \quad (1.23)$$

Acoplamento Perfeito

Se a hidrólise de uma molécula de ATP sempre leva ao transporte de íons (apenas a reação 15) diremos que a proteína faz o acoplamento perfeito entre a hidrólise e o transporte. Na realidade espera-se que as proteínas possam também realizar a hidrólise sem realizar o transporte, diminuindo a eficiência da bomba. Podemos supor que este processo tenha sido minimizado ao longo da evolução dos organismos, aproximando o sistema de Transporte Ativo de uma situação ideal, de máxima eficiência termodinâmica.

Para que o sistema de Transporte Ativo tenha máxima eficiência, a bicamada de fosfolípidios deve ser impermeável aos íons e a proteína do Transporte Ativo não deve funcionar como um canal de Transporte Passivo ou como um catalizador da hidrólise direta de ATP. Além destas condições, a fonte de energia não deve sofrer degradação espontânea, o que corresponde a supor uma grande energia de ativação da reação de hidrólise direta (1.16), ($E_a \gg RT$).

Do esquema (1.15), nesta idealização o equilíbrio será alcançado quando,

$$\tilde{\mu}_{ADP} + \tilde{\mu}_{P_i} + n\tilde{\mu}_j'' - \tilde{\mu}_{ATP} - n\tilde{\mu}_j' = 0 \quad (1.24)$$

ou, com $\Delta\mu_j^* = 0$

$$nRT \ln \frac{C'}{C''} + nzF(\varphi' - \varphi'') = A \quad (1.25)$$

Neste caso (somente a relação 1.15), o equilíbrio é caracterizado pela compensação entre estas duas forças termodinâmicas conforme indica a relação (1.25), e em todos os casos não idealizados (onde os processos 1.16 e 1.12 são possíveis), estas forças se anulam separadamente.

I.3-Fluxos Próximos do Equilíbrio

Existem 2 fluxos associados às duas forças termodinâmicas: o fluxo de transporte através da membrana (ϕ_x) e a taxa de hidrólise de ATP (ϕ_c). O sinal algébrico de ϕ_x determina o sentido do transporte e o sinal de ϕ_c determina se está ocorrendo a hidrólise ou a síntese de ATP. Portanto, no caso em que valem as relações lineares entre fluxos e forças termodinâmicas, obteremos as seguintes relações fenomenológicas:

$$\phi_x = L_{xx} \Delta\tilde{\mu}_x - L_{xc} A \quad (1.26)$$

$$\phi_c = L_{cx} \Delta\tilde{\mu}_x - L_{cc} A \quad (1.27)$$

Em geral, estas equações são válidas somente quando o sistema está próximo do equilíbrio, isto é, para pequenos valores das forças termodinâmicas. Os coeficientes L serão calculados no capítulo II e dependem do mecanismo de transporte da molécula bomba.

No caso de acoplamento perfeito, a partir das relações (1.26) e (1.27), obtemos

$$\phi_x = nL(n\Delta\tilde{\mu}_x - A) \quad (1.28)$$

$$\phi_c = L(n\Delta\tilde{\mu}_x - A) \quad (1.29)$$

Assim podemos concluir que no caso de maior eficiência do mecanismo de transporte:

$$L_{xx} = nL_{xc} \quad (1.30)$$

$$L_{cc} = \frac{L_{cx}}{n} \quad (1.31)$$

No caso em que o acoplamento não é perfeito podemos esperar que:

$$L_{xx} > nL_{xc} \quad (1.32)$$

$$L_{cc} > \frac{L_{cx}}{n} \quad (1.33)$$

Essas relações são particulares para os sistemas de Transporte Ativo. De forma geral, para sistemas quaisquer, pode-se provar somente que: $L_{xc}L_{cx} < L_{xx}L_{cc}$ [28].

Na introdução vimos que algumas bombas de Transporte Ativo funcionam reversivelmente sintetizando ou hidrolisando ATP. Este fato é coerente com as equações fenomenológicas (1.26) e (1.27), das quais podemos concluir que assim como a ATPase pode ser a fonte de energia para o processo de transporte, o gradiente eletroquímico pode servir como fonte de energia para a síntese de ATP.

I.4-Forças Motrizes

Para a análise das propriedades de um sistema de Transporte Ativo é útil considerar a situação na qual, embora as forças termodinâmicas sejam não nulas, o fluxo de Transporte Ativo através da membrana é nulo. Neste caso podemos introduzir a seguinte definição:

$$\text{Força Motriz de } x \equiv fm_x \equiv \left[\frac{\Delta \tilde{\mu}_x}{F} \right]_{\phi_x = 0} \quad (1.34)$$

Note que nesse caso os efeitos da afinidade da reação de ATPase deve compensar o efeito do gradiente de potencial eletroquímico, tornado o fluxo nulo.

De acordo com a definição do gradiente eletroquímico a fm_x pode ser dividida em uma parte puramente elétrica e outra puramente osmótica:

$$\text{Força Eletromotriz de } x \equiv fem_x \equiv z_x (\varphi' - \varphi'')_{\phi_x = 0} \quad (1.35)$$

$$\text{Potencial de Nerst} \equiv \left[\frac{RT}{F} \ln \frac{X'}{X''} \right]_{\phi_x = 0} \quad (1.36)$$

No caso de acoplamento perfeito a fm_x pode ser deduzida da relação (1.25):

$$fm_x = \frac{A}{nF}$$

No caso de acoplamento não perfeito o $|fm_x|$ deverá ter um valor menor, pois a eficiência da bomba diminui. Portanto de forma geral temos:

$$|fm_x| \leq \frac{A}{nF} \quad (1.37)$$

O valor exato de fm_x da bomba não perfeitamente acoplada

depende do mecanismo de transporte. Este valor será calculado no capítulo II para um modelo específico.

CAPÍTULO II

PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS E CINÉTICAS DO MODELO DE ACESSO ALTERNADO

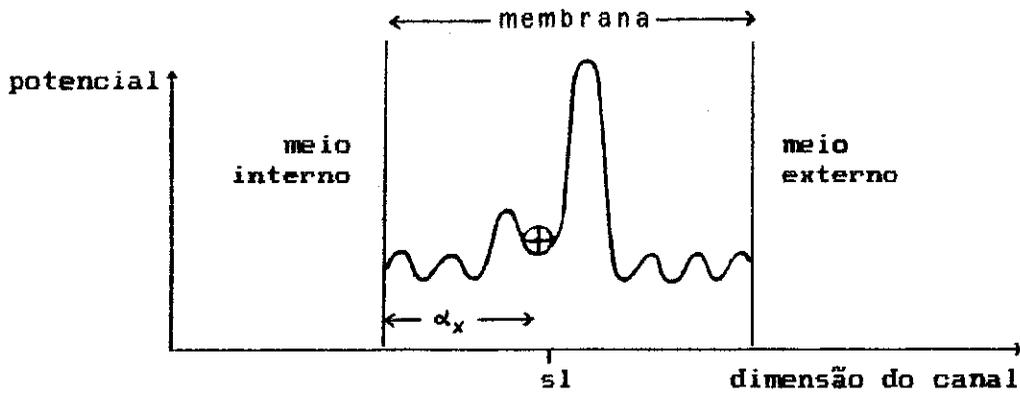
Como vimos no capítulo I, existem propriedades do Transporte Ativo que são dependentes do modelo cinético suposto para a proteína. Em particular, o fluxo de transporte e a taxa de hidrólise de ATP, dependem deste modelo. Entretanto, o Modelo de Acesso Alternado pode ser representado por inúmeros esquemas cinéticos. Portanto, definiremos neste capítulo um esquema cinético mínimo para o Modelo de Acesso Alternado (Modelo Mínimo). A partir deste Modelo Mínimo discutiremos as propriedades termodinâmicas e cinéticas do Transporte Ativo. Analisaremos em particular, as propriedades dos estados estacionários de não equilíbrio.

II.1-Modelo Mínimo para o Acesso Alternado

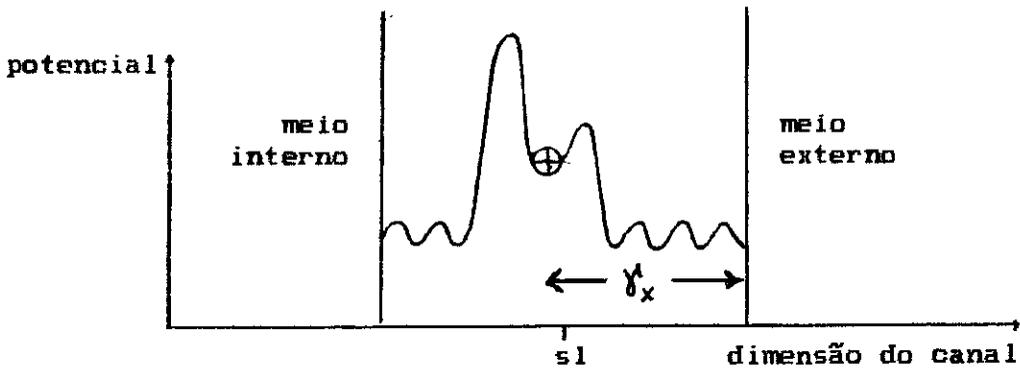
No modelo de acesso alternado a proteína deve ter um sítio de ligação específico para a espécie a ser transportada. Considera-se em geral que este pode estar localizado a uma certa profundidade no interior da proteína [1]. Neste caso, o íon terá acesso ao sítio de ligação por meio de um canal da proteína. De forma geral podemos supor que este canal de acesso é formado por

sucessivos sítios que a espécie a ser transportada deve ocupar até alcançar o sítio de ligação.

Portanto, podemos representar a proteína do tipo (c) na figura 1 como um canal com múltiplos estados conformacionais e que apresenta uma curva de energia potencial do canal (para a espécie química transportada) característica para cada estado, conforme a figura 2.1 [14].



(a)



(b)

Figura 2.1: Forma geral para a energia potencial de um íon no canal da proteína para um dado estado conformacional. "sl" representa o sítio de ligação da proteína. O sítio de ligação pode estar acessível: (a) pelo lado intracelular ou (b) pelo lado extracelular. α_x e γ_x correspondem às profundidades do canal de acesso quando o sítio de ligação está acessível pela face interna e pela face externa da membrana, respectivamente.

O estudo das bombas de Transporte Ativo que carregam ions através da membrana é particularmente interessante já que neste caso o transporte depende do potencial elétrico da membrana, podendo converter energia química em energia elétrica. Quando existe esta conversão de energia, o transporte é dito eletrogênico. Veremos adiante que a existência de cargas na proteína também pode levar a uma dependência do Transporte Ativo com este potencial, mesmo que o transporte não seja eletrogênico..

Conforme a figura 2.1 o transporte de um ion para o meio externo se dá quando ocorre a transformação $a \rightarrow b$ com o sítio ligante carregado com o ion proveniente do meio intracelular e a posterior transformação $b \rightarrow a$ com o sítio ligante vazio, sendo o ion deixado no meio externo.

Pelo princípio da reversibilidade microscópica, o ciclo de reação contrário ($a \rightarrow b$ com o sítio vazio e $b \rightarrow a$ com o sítio carregado) também ocorre e transporta um ion para o meio interno.

Podemos deduzir do capítulo I que se esta proteína não estiver acoplada a nenhuma fonte de energia, o gradiente de potencial eletroquímico determina o ciclo predominante: o transporte deve ocorrer no sentido deste gradiente, assim como no caso de difusão em meio homogêneo.

Como vimos na introdução, no modelo de Acesso Alternado, uma fonte específica de energia faz com que a proteína sofra um ciclo de transições conformacionais durante a qual carrega um ou mais ions através da membrana em sentido contrário ao gradiente eletroquímico.

Com essa idéia podemos construir um "Modelo Mínimo" para a bomba, que envolva somente os quatro passos fundamentais: transformação conformacional com e sem o íon e as reações do íon com o sítio de ligação ocorrendo do lado interno e externo da membrana.

A atividade da bomba fora do equilíbrio é essencialmente caracterizada por duas quantidades de fluxo, o fluxo do íon transportado, ϕ_x , e a taxa de hidrólise de ATP, que pode ser considerada um fluxo químico, ϕ_G .

Em contraste com a situação de equilíbrio, a atividade da bomba fora do equilíbrio depende fortemente do modelo cinético (esquema de reação) suposto para a proteína, além das características do acoplamento. No entanto, ainda aqui, é desejável uma análise que derive propriedades que sejam válidas para um grande número de modelos, isto é, propriedades não associadas a características específicas do modelo usado nos cálculos.

O ciclo conformacional pode ser representado pela curva de potencial do canal.

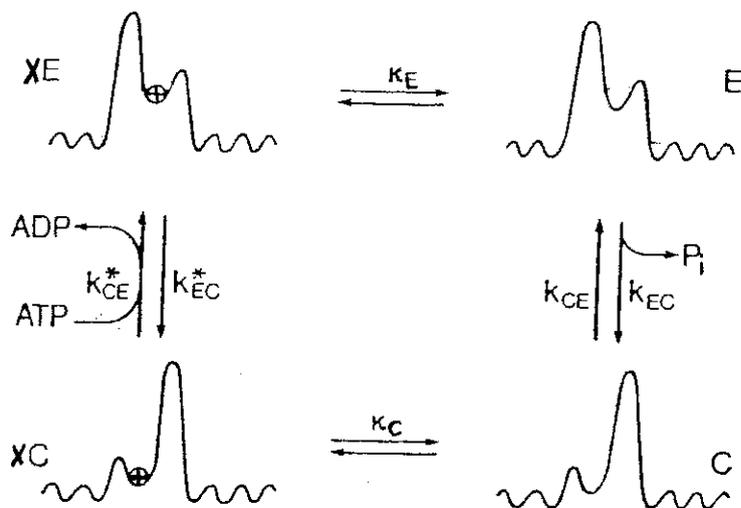


Figura 2.2: Representa os estados conformacionais de uma proteína transportadora. O lado esquerdo da curva representa o meio interno e o direito o meio externo. Logo, durante o ciclo "XC \rightarrow XE \rightarrow ... \rightarrow XC", um íon x é transportado para fora da célula. Os passos "XC/C" e "XE/E" da reação são supostos em equilíbrio (velocidade desses passos muito maior do que a do ciclo). Observe que nos estados "XE" e "E" o íon tem acesso somente ao meio externo e em "XC" e "C" somente ao interno.

Por generalidade podemos supor uma bomba que realiza o transporte simultâneo de dois tipos diferentes de íons (x e y) em sentidos opostos. Veremos que as expressões obtidas neste caso para as quantidades de fluxo tem como caso particular as expressões para: (1) transporte dos íons no mesmo sentido, (2) transporte de apenas um íon, (3) o caso em que a fonte de energia é o gradiente eletroquímico de uma outra substância, e (4) para um canal de transporte passivo. Vamos supor também que a enzima no estado XC, além de poder ser fosforilada por reação com o ATP, pode ser também fosforilada ou desfosforilada por reação direta com um fósforo inorgânico. Em consequência desta hipótese, a

enzima pode atuar como um catalizador da hidrólise puramente dissipativa do ATP. Como vimos no capítulo I, este é o caso no qual a proteína não faz o acoplamento perfeito entre a hidrólise e o transporte. Utilizaremos esta hipótese porque, além de existir algumas evidências experimentais do acoplamento não perfeito, também nos interessa neste trabalho a análise de mecanismos não idealizados.

Para levar adiante o modelo no sentido de uma análise matemática detalhada, podemos fazer também algumas hipóteses simplificadoras desde que essas não eliminem propriedades importantes e gerais da bomba.

1. Nos estados XC/C da proteína os sítios de ligação para os dois íons são somente acessíveis pelo citoplasma e nos estados XE/E somente pelo meio extracelular.
2. As taxas de ligação/desligamento dos íons com os sítios são muito mais rápidas que as taxas de transição conformacional. Logo os estados XC/C e XE/E podem ser considerados em equilíbrio.
3. Podemos supor que existam n sítios de ligação para o íon x , m sítios para y e que as transições conformacionais não ocorrem se estes n ou m sítios de ligação estiverem apenas parcialmente ocupados ou parcialmente desocupados.

A hipótese 1 pode ser omitida sem levar a uma grande complicação nos cálculos [14]. Esta hipótese simplesmente evita que a bomba funcione constantemente como um canal de Transporte Passivo. Para que esta hipótese seja válida devemos ter uma

grande diferença de altura entre as duas barreiras de energia potencial da figura 2.

Em geral o fluxo de transporte para uma única proteína fica em torno de 100 íons por segundo [14,11]. Portanto, segundo o modelo de acesso alternado, o tempo característico para cada ciclo de transporte é muito grande com relação a cinética de ligação de alguns íons como o próton (dados referentes a outros cátions não estão ainda disponíveis [29]). Entretanto, a hipótese 2 pode ser considerada somente como uma hipótese simplificadora que não altera as propriedades mais gerais da bomba.

A hipótese 3 sugere que a bomba tenha uma estequiometria (número de íons transportados por ciclo) fixa, embora existam na literatura evidências de estequiometria variável para algumas proteínas [1]. Esta hipótese implica também um comportamento cooperativo dos sítios com relação ao processo de transporte (ver página 47).

Com essas hipóteses o conjunto de reações químicas que levam ao transporte será:

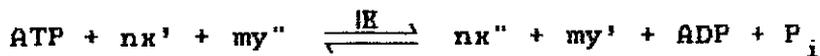
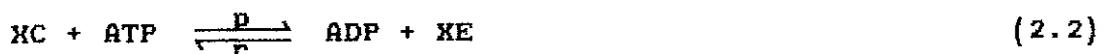


Kc e Ke são as constantes de equilíbrio de ligação dos íons com os sítios de ligação conforme a hipótese 2.

Este esquema de reações contém os três processos descritos na seção 1.1: (1) hidrólise do ATP levando ao transporte de moléculas através da membrana (reação 1.15), (2) hidrólise direta

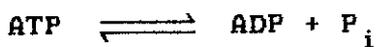
do ATP, isto é, hidrólise que não leva ao Transporte (reação 1.16) e (3) Transporte Passivo de íons pela membrana (reação 1.12).

(1) - O processo de transporte acoplado à hidrólise é realizado quando a reação ocorre através das etapas (2.1), (2.2), (2.4) e (2.5), correspondendo à seguinte reação global:



Onde IE é a constante de equilíbrio da reação global (ver seção II.2).

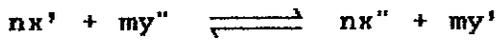
(2) - O processo de hidrólise direta do ATP, o qual implica o acoplamento não perfeito definido no capítulo I, é realizado através das etapas (2.2) e (2.3), e corresponde à seguinte reação global:



As constantes q e s representam quantitativamente o tipo de acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte dos íons: q = s = 0 indica acoplamento perfeito, uma vez que eliminada a etapa (2.3) o único esquema possível para a hidrólise do ATP é o esquema (1).

(3) - O transporte passivo através da membrana corresponde as

etapas (2.1) e (2.3)-(2.5), levando à seguinte reação global:



Observamos que este processo, o qual acopla o transporte dos dois íons, não leva, em geral, ao equilíbrio eletroquímico correspondente ao transporte individual dos íons x e y.

Podemos escrever o conjunto de reações (2.1)-(2.5) de forma mais compacta:



onde

$$k_{ce}^* = pc_T + qc_P \quad (2.10)$$

$$k_{ec}^* = rc_D + s \quad (2.11)$$

$$k_{ce} = wc_P \quad (2.12)$$

$$k_{ec} = k \quad (2.13)$$

Cada etapa do ciclo (inclusive as transições conformacionais) pode ser considerada como uma reação química que obedece a lei de ação das massas (A velocidade de uma reação, em um determinado sentido, é diretamente proporcional ao produto das concentrações dos reagentes, ficando cada concentração elevada ao

coeficiente estequiométrico do reagente considerado.).

Portanto, o fluxo total ϕ_x

ϕ_x = número líquido de íons x que atravessam a membrana por segundo através de N bombas, para o meio externo.

é dado por

$$\phi_x = n (k_{ce}^* N_{KC} - k_{ec}^* N_{XE}) \quad (2.14)$$

onde n é ao número de sítios de ligação para o íon x em cada proteína e N_k representa o número de bombas no estado k. O número de bombas na membrana é considerado fixo, isto é,

$$N = N_{KC} + N_{XE} + N_E + N_C = \text{constante}$$

O fluxo ϕ_y tem definição análoga a ϕ_x e é dado por

$$\phi_y = - \frac{m}{n} \phi_x \quad (2.15)$$

O fluxo químico ϕ_c

ϕ_c = Número de moléculas de ATP hidrolisadas por segundo pelas N proteínas transportadoras.

é dado por

$$\phi_c = p_{cT} N_{KC} - r_{cD} N_{XE} \quad (2.16)$$

O fluxo positivo indica a conversão de ATP em ADP, e o fluxo negativo corresponde à síntese de ATP.

II.2-Efeitos do Potencial e relações entre as Constantes Cinéticas:

As constantes cinéticas de cada passo de reação deverão ter uma dependência complexa com a estrutura da proteína e sua interação com a bicamada de fosfolípidios. Podemos esperar também

uma dependência com a diferença de potencial elétrico através da membrana a qual pode ser analisada a partir da teoria de taxas [30].

A dependência das constantes cinéticas com o potencial elétrico da membrana é analisado no apêndice-A (de acordo com o trabalho de Läuger [14]) e apresentamos aqui somente as hipóteses e os resultados.

No capítulo I definimos a grandeza,

$$\Delta u \equiv u' - u''$$

onde (') e (')' representam o meio interno e o meio externo respectivamente, e $u \equiv \frac{F\psi}{RT}$. Entretanto, veremos na seção II.4.2 que o potencial elétrico pode variar dentro de uma mesma fase na proximidade da membrana (em condições fisiológicas, esta variação se deve principalmente a densidade de cargas na superfície desta membrana). Portanto, devemos definir (') e (')' de forma mais precisa: (') indica a posição da entrada do canal de acesso no meio interno e (')', no meio externo.

Portanto, supondo que todos os sítios de ligação para ions do mesmo tipo estejam aproximadamente a uma mesma profundidade no interior da proteína e que o campo elétrico no seu interior é constante, obteremos (equações A.1-A.4 do apêndice A):

$$K_c = \tilde{K}_c e^{-\alpha \Delta u} \quad (2.17)$$

$$K_e = \tilde{K}_e e^{\gamma \Delta u} \quad (2.18)$$

com

$$\alpha \equiv n z_x \alpha_x - m z_y \alpha_y \quad (2.19)$$

$$\gamma \equiv n z_x \gamma_x - m z_y \gamma_y \quad (2.20)$$

onde

α_x ($0 \leq \alpha_x \leq 1$) mede a profundidade relativa do sítio ligante de x no interior da proteína, quando a bomba está nos estados XC/C.

α_y ($0 \leq \alpha_y \leq 1$) tem definição análoga. Por exemplo, se $\alpha_x = \frac{1}{2}$ o sítio de ligação de x está no centro da proteína.

ν_x e ν_y ($0 \leq \nu_x, \nu_y \leq 1$) tem definições análogas à α_x e α_y respectivamente, para a bomba nos estados XE/E.

\tilde{K}_c e \tilde{K}_e são os valores das constantes de equilíbrio para potencial elétrico nulo, z_x e z_y são as cargas dos íons x e y respectivamente. No caso em que a proteína transporta apenas um íon, estes parâmetros geométricos, α_x e ν_x , estão indicados na figura 2.1.

A transição conformacional pode levar a deslocamentos de grupos de cargas ou rotações de dipolos. Supondo que uma carga q_i tenha um deslocamento Δx_i na direção do campo externo durante a transição conformacional, podemos definir a grandeza (relação A.5 do apêndice A),

$$\eta \equiv \sum \frac{q_i \Delta x_i}{e_0 d} \quad (2.27)$$

onde e_0 é a carga elementar e d é a distância entre as entradas dos canais da proteína (figura 2.1), a qual em geral pode ser maior que a espessura da membrana [11,29].

Portanto, levando este movimento de cargas em conta, para as demais constantes cinéticas obtemos (equações A.7-A.12 do apêndice A),

$$p = \tilde{p} e^{(\eta + n z_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad q = \tilde{q} e^{(\eta + n z_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad (2.21)$$

$$r = \tilde{r} e^{-\left(\eta + nz_x \theta_x\right) \frac{\Delta u}{2}} \quad s = \tilde{s} e^{-\left(\eta + nz_x \theta_x\right) \frac{\Delta u}{2}} \quad (2.22)$$

$$k_{ce} = \tilde{k}_{ce} e^{\left(\eta + mz_y \theta_y\right) \frac{\Delta u}{2}} \quad (2.23)$$

$$k_{ec} = \tilde{k}_{ec} e^{-\left(\eta + mz_y \theta_y\right) \frac{\Delta u}{2}} \quad (2.24)$$

onde

$$\theta_x \equiv 1 - \alpha_x - \gamma_x \quad (2.25)$$

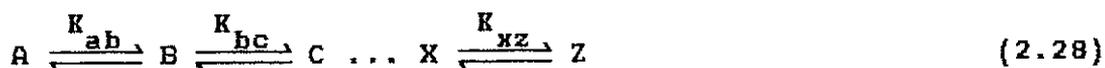
$$\theta_y \equiv 1 - \alpha_y - \gamma_y \quad (2.26)$$

onde

θ_x ($-1 \leq \theta_x \leq 1$) dá o deslocamento do sítio de ligação de x na direção do campo elétrico (direção perpendicular à membrana) durante a transição conformacional. θ_y ($-1 \leq \theta_y \leq 1$) tem interpretação análoga.

As constantes cinéticas envolvidas em um ciclo de reações não são sempre independentes entre si. Sabemos da Termodinâmica que um sistema é totalmente caracterizado por suas variáveis de estado, no nosso caso, as concentrações. Logo, podemos concluir que o estado de equilíbrio entre espécies químicas reagentes deve independe dos passos de reação intermediários entre essas espécies químicas. Portanto, se existir dois caminhos de reação para uma mesma transformação química, teremos uma relação entre as constantes cinéticas destes dois caminhos.

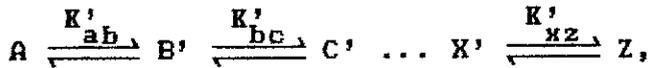
Em uma cadeia de reações,



onde K_{ab} , K_{bc} ... são as constantes de equilíbrio para cada passo da reação, podemos definir uma constante de equilíbrio global

$$K = \frac{[Z]_{eq}}{[A]_{eq}} = K_{ab} K_{bc} \dots K_{xz} \quad (2.29)$$

Se houver outro caminho de reação entre A e Z,



este deve levar a mesma constante de equilíbrio global:

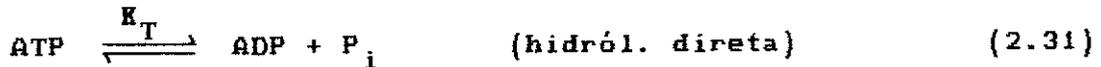
$$K' = K'_{ab} K'_{bc} \dots K'_{xz} = K$$

Para a bomba não perfeitamente acoplada, temos os dois processos: (1) hidrólise de ATP não acoplada ao transporte e (2) hidrólise acoplada. Para cada um desses processos temos dois caminhos de reação possíveis.

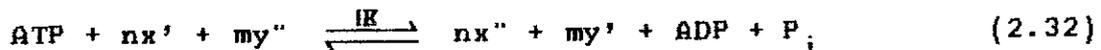
Para o primeiro processo temos a hidrólise direta de ATP catalizado pela proteína:



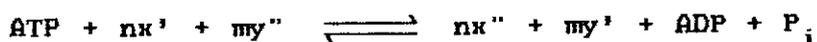
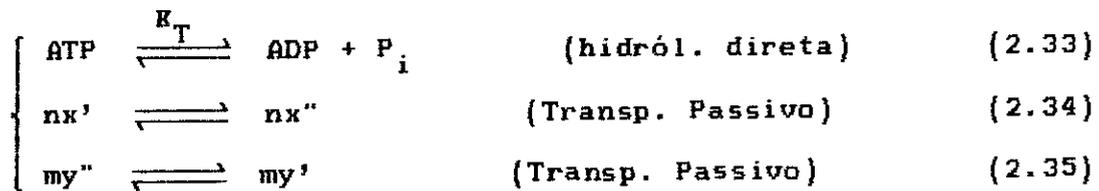
o qual deve ser equivalente a qualquer outro processo de hidrólise direta que ocorra nas mesmas condições:



Para o segundo processo, de hidrólise acoplada, temos o caminho definido pelas etapas (2.1), (2.2), (2.4) e (2.5) que leva a seguinte reação global:



Este caminho deve ser equivalente a reação global resultante de etapas de Transporte Passivo dos íons separadamente e da hidrólise direta que ocorram nas mesmas condições.



A constante de equilíbrio K pode ser obtida das relações (2.1), (2.2), (2.4) e (2.5).

$$K = \frac{K_{ek} k_{ec} p}{K_c w r}$$

Do primeiro processo obtemos,

$$\frac{ps}{qr} = K_T = \frac{\bar{c}_D \bar{c}_P}{\bar{c}_T} \quad (2.36)$$

No segundo processo as reações de Transporte Passivo tem como constante de equilíbrio,

$$K_x = \frac{X''^n}{X'^n} = e^{nz_x \Delta u} \quad (2.37)$$

$$K_y = \frac{Y'^m}{Y''^m} = e^{-mz_y \Delta u} \quad (2.38)$$

Somando (2.33), (2.34) e (2.35), obteremos uma terceira reação que corresponde ao segundo caminho de reação deste segundo processo, e que tem como constante de equilíbrio: $K_x K_y K_T$,

Assim, com a reação (2.32), obteremos a relação:

$$K = \frac{K_{ek} k_{ec} p}{K_c w r} = K_x K_y K_T \quad (2.39)$$

ou, com as relações (2.36), (2.37) e (2.38),

$$\frac{K_{ek} k_{ec} q}{K_c w s} = e^{(nz_x - mz_y) \Delta u} \quad (2.40)$$

A relação (2.39) corresponde à relação entre as constantes cinéticas para o caso da bomba perfeitamente acoplada discutido no capítulo I. As relações (2.36) e (2.40) são válidas quando o mecanismo da proteína não realiza o acoplamento perfeito entre a hidrólise e o transporte (q e $s \neq 0$).

Estas relações podem ser consideradas como as restrições termodinâmicas à cinética do mecanismo de transporte, e serão

utilizadas na seção II.4 onde analisaremos numericamente os estados estacionários do modelo mínimo.

II.3-Estados Estacionários de Não-Equilíbrio:

Dos estados de não equilíbrio de um sistema, os estados estacionários são os que geralmente apresentam maior facilidade matemática e conceitual, e são importantes para a compreensão do comportamento dos sistemas quando fora do equilíbrio.

Por definição, um sistema está em um estado estacionário se as suas variáveis de estado, no nosso caso as concentrações, não variam no tempo. E como consequência, todas as grandezas associadas a estas variáveis também estarão em um estado estacionário.

Para estabelecer estados estacionários de não equilíbrio, temos sempre que impor vínculos externos ao sistema. Quanto a hidrólise do ATP, a condição mais simples que podemos supor, é que a célula mantém níveis constantes de ATP, ADP e P_i . As concentrações, externa e interna, dos íons e a diferença de potencial elétrico através da membrana dependerão, como veremos mais tarde, dos outros elementos existentes no sistema. Portanto, a condição mais simples é considerar as concentrações e o potencial como parâmetros ajustados externamente.

Nesse caso, das hipóteses do modelo, e considerando o número total de moléculas transportadoras constante, teremos o seguinte conjunto de equações para as variáveis N_k no estado estacionário:

$$N_{XC} + N_{XE} + N_E + N_C = N \quad (2.41)$$

$$\frac{N_C}{N_{XC}} = \frac{Y'^m}{X'^n} K_C \quad (2.42)$$

$$\frac{N_E}{N_{XE}} = \frac{Y''^m}{X''^n} K_E \quad (2.43)$$

$$\frac{d}{dt}[N_C + N_{XC}] = -k_{ce} N_C - k_{ce}^* N_{XC} + k_{ec} N_E + k_{ec}^* N_{XE} = 0 \quad (2.44)$$

onde X' e Y' são as concentrações de x e y no meio interno, e X'' e Y'' as concentrações no meio externo.

Deste conjunto de equações podemos encontrar todos os N_k e portanto, os fluxos ϕ_x , ϕ_y e ϕ_c em função dos parâmetros $\{\Delta\varphi, X', X'', Y', Y'', c_T, c_D, c_P\}$ e do conjunto de constantes cinéticas $\{k\}$,

$$\phi_x = nB [(\delta + s/rc_D)(v - 1) + (\delta - 1)] \quad (2.45)$$

$$\phi_c = B \left[(v - 1) + v \left[1 + \frac{sX''^n}{Y''^m k_{ec} K_C} \right] (\delta - 1) \right] \quad (2.46)$$

$$\delta = e^{-\frac{A}{RT}} \quad (2.47)$$

$$A \equiv RT \ln \frac{c_D c_P / c_T}{\bar{c}_D \bar{c}_P / \bar{c}_T} \quad (2.48)$$

$$v \equiv \exp\{ (n\Delta\tilde{\mu}_x - m\Delta\tilde{\mu}_y) / RT \} \quad (2.49)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_x = RT \ln(X'/X'') + z_x F \Delta\varphi \quad (2.50)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_y = RT \ln(Y'/Y'') + z_y F \Delta\varphi \quad (2.50)$$

$$B \equiv \frac{Y'^m K_C k_{ce} r c_D}{X'^n D} \quad (2.51)$$

$$D \equiv k_{ce}^* + k_{ec}^* + (k_{ec}^* + k_{ce}^*) \frac{Y',m}{X',n} Kc + (k_{ce}^* + k_{ec}^*) \frac{Y'',m}{X'',n} Ke + (k_{ce} + k_{ec}) \frac{Y',m Y'',m}{X',n X'',n} KcKe \quad (2.52)$$

O fluxo ϕ_y é dado em termos de ϕ_x pela relação (2.15). Reescrevendo as equações (2.41)-(2.44) para o caso de transporte de um só íon e para o caso do transporte de dois íons no mesmo sentido, verificamos que as novas expressões para o fluxo são idênticas as expressões (2.45)-(2.52), considerando $m = 0$ e $m < 0$ respectivamente. Portanto, temos

- i. $m < 0$ indica transporte de x e de y no mesmo sentido,
- ii. $m = 0$ transporte apenas de x e
- iii. $m > 0$ transporte de x e de y em sentidos contrários.

No caso em que a fonte de energia é o gradiente eletroquímico de uma outra substância, o fluxo ϕ_x pode ser obtido a partir dos valores particulares: $\lambda = s = q = 0$ e $c_T = c_D = c_P = 1$. Reescrevendo explicitamente as expressões para este caso, obteremos:

$$\phi_x = n \frac{Y',m Kcwr}{X',n_D} \left[\exp\{ (n\Delta\tilde{\mu}_x - m\Delta\tilde{\mu}_y) / RT \} - 1 \right] \quad (2.53)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_x = RT \ln(X'/X'') + z_x F\Delta\varphi \quad (2.54)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_y = RT \ln(Y'/Y'') + z_y F\Delta\varphi \quad (2.55)$$

$$D \equiv p + r + (r + w) \frac{Y',m}{X',n} Kc + (p + k) \frac{Y'',m}{X'',n} Ke + (w + k) \frac{Y',m Y'',m}{X',n X'',n} KcKe \quad (2.56)$$

O fluxo ϕ_y é dado em termos de ϕ_x pela relação (2.15).

O íon que é transportado ativamente tem o fluxo contrário ao gradiente de potencial eletroquímico. Portanto, da relação (2.53) podemos concluir que o íon transportado ativamente é aquele que possui o menor gradiente eletroquímico. Para que existam estados estacionários de não equilíbrio no sistema, é necessário uma fonte do íon de maior gradiente eletroquímico. Fisiologicamente esta fonte pode ser o Transporte Ativo deste íon, catalizado por uma ATPase [1].

Se nas expressões (2.53)-(2.56), considerarmos $m = 0$, obteremos a expressão do fluxo ϕ_x de uma proteína que faz a difusão facilitada de um único tipo íon x .

Portanto, a partir do Modelo Mínimo para o acesso alternado, podemos obter relações válidas para os vários tipos de transporte mencionados acima. Este resultado, além de ser importante do ponto de vista teórico, é coerente com alguns trabalhos [1,31] que discutem a possibilidade de um mecanismo único para todas as proteínas que catalizam reversivelmente o Transporte Ativo de pequenos cátions inorgânicos.

Estados Estacionários Próximos do Equilíbrio:

Das relações (2.45)-(2.52) para os fluxos ϕ_x e ϕ_o , os quais são válidos para qualquer distância do equilíbrio, podemos obter relações para os fluxos válidas quando o sistema se encontra próximo do equilíbrio. No caso de acoplamento não perfeito, se as variáveis estão perto dos seus valores de equilíbrio, teremos: $\Delta\tilde{\mu}_x/RT \ll 1$, $\Delta\tilde{\mu}_y/RT \ll 1$ e $A/RT \ll 1$. Através das expansões das

exponenciais nas relações (2.45)-(2.52) obtemos:

$$\phi_x = L_{xx} \Delta \tilde{\mu}_x - L_{xy} \Delta \tilde{\mu}_y - L_{xc} A \quad (2.57)$$

$$\phi_y = -L_{xy} \Delta \tilde{\mu}_x + L_{yy} \Delta \tilde{\mu}_y + L_{yc} A \quad (2.58)$$

$$\phi_c = L_{xc} \Delta \tilde{\mu}_x - L_{yc} \Delta \tilde{\mu}_y - L_{cc} A \quad (2.59)$$

onde

$$L_{xx} = \frac{n^2 \bar{Y}, m \bar{k} \bar{k}_{ce}^* \bar{k}_{ec}}{\bar{D} \bar{X}, n RT} \quad (2.60)$$

$$L_{xy} = \frac{m}{n} L_{xx} \quad (2.61)$$

$$L_{yy} = \frac{m^2}{n^2} L_{xx} \quad (2.62)$$

$$L_{xc} = \frac{n \bar{Y}, m \bar{k} \bar{k}_{ec} \bar{k}_{ec}}{\bar{D} \bar{X}, n RT} \quad (2.63)$$

$$L_{yc} = \frac{m}{n} L_{xc} \quad (2.64)$$

$$L_{cc} = \frac{\bar{p} \bar{c}_T}{\bar{D} RT} \left[\frac{\bar{Y}, m \bar{k} \bar{k}_{ec}}{\bar{X}, n} + \bar{s} \right] \quad (2.65)$$

onde $\{\bar{k}\}$ indica o conjunto de constantes cinéticas $\bar{k}_i = k_i(\bar{u})$ e $\{\bar{c}\}$, o conjunto de concentrações de equilíbrio: \bar{c}_p , \bar{c}_T , \bar{c}_D , \bar{X} , \bar{X}' , \bar{Y} e \bar{Y}' .

Portanto, os fluxos na região próxima ao equilíbrio tem a forma das equações fenomenológicas da termodinâmica de não-equilíbrio apresentadas no capítulo I, isto é, os fluxos dependem de uma combinação linear das forças termodinâmicas:

$$\phi_i = \sum_k L_{ik} F_k$$

As expressões (2.57)-(2.59) mostram também que as relações de simetria de Onsager são satisfeitas.

Para o sistema de Transporte Ativo perfeitamente acoplado ($\tilde{q} = \tilde{s} = 0$) as relações (2.57)-(2.65) transformam-se em

$$\phi_x = -\frac{m}{n} \phi_y = n\phi_c = L(\Delta\tilde{\mu}_x - \frac{m}{n} \Delta\tilde{\mu}_y - \frac{A}{n}) \quad (2.66)$$

$$L_{xx} = \frac{n^2 \bar{Y}, \bar{m} \bar{K}_{epc} \bar{T} \bar{k} \bar{e} c}{\bar{D} \bar{X}, n RT}$$

Neste caso o sistema está em equilíbrio se

$$\Delta\tilde{\mu}_x - \frac{m}{n} \Delta\tilde{\mu}_y = \frac{A}{n}$$

Porém, as forças termodinâmicas não são necessariamente nulas.

Das expressões (2.60)-(2.65) podemos verificar as relações (1.30)-(1.33) discutidas no capítulo I:

$$L_{xx} \geq nL_{xc} \quad e \quad L_{cc} \geq \frac{L_{cx}}{n}$$

onde a igualdade é válida para o caso de acoplamento perfeito.

Perto do equilíbrio, temos portanto,

$$\phi_x = \phi_x(\Delta\tilde{\mu}_x, \Delta\tilde{\mu}_y, A; \{\bar{k}\}, \{\bar{c}\}) \quad (2.67)$$

$$\phi_c = \phi_c(\Delta\tilde{\mu}_x, \Delta\tilde{\mu}_y, A; \{\bar{k}\}, \{\bar{c}\}) \quad (2.68)$$

No entanto, para as relações gerais (2.45) e (2.46) vemos que além das relações não serem lineares, não é evidente a forma da dependência dos fluxos com as forças termodinâmicas. Conforme discutiremos na seção II.4.2 podemos mostrar que os fluxos dependem separadamente da diferença de potencial elétrico e das concentrações, ou seja,

$$\phi_x = \phi_x(\Delta\psi, X', X'', Y', Y'', c_T, c_P, c_D; \{\tilde{k}\}) \quad (2.69)$$

$$\phi_c = \phi_c(\Delta\psi, X', X'', Y', Y'', c_T, c_P, c_D; \{\tilde{k}\}) \quad (2.70)$$

Podemos também verificar que quando a afinidade da ATPase não é nula, o fluxo depende separadamente das concentrações iônicas e da diferença de potencial, mesmo para valores pequenos destas variáveis. Nestas condições, considerando X'' como constante e apenas uma espécie de íon, obtemos relações lineares do tipo:

$$\phi = L_{\varphi}(A)\Delta\varphi + L_x(A)\left(\frac{X'}{X''} - 1\right) + L_A(A) \quad (2.71)$$

onde todos os coeficientes dependem da afinidade da reação de ATPase.

II.4-Dependência dos Fluxos com a Diferença de Potencial, Concentrações e Densidade Superficial de Cargas

Nos gráficos a seguir analisamos numericamente o comportamento dos fluxos ϕ_x e ϕ_c com as várias variáveis e parâmetros discutidos anteriormente. Por simplicidade consideraremos que a bomba transporta apenas uma espécie química e que a concentração externa do íon transportado é constante ($X'' = \text{cte}$). Estaremos considerando também que c_D e c_P são mantidos constantes e que a afinidade da reação de ATPase é controlada pela concentração de ATP (c_T).

Relacionamos na tabela 1 os valores dos vários parâmetros utilizados na confecção dos gráficos, exceto quando o valor do parâmetro é dado explicitamente no gráfico.

TABELA 1	
$n = 1$	$\tilde{r}_{cD} = 100 \text{ s}^{-1}$
$z_x = 1$	$\tilde{q}_{cP} = 10 \text{ s}^{-1}$
$\frac{\tilde{K}_c}{X'^n} = 1$	$\tilde{s} = 100 \text{ s}^{-1}$
$\frac{\tilde{K}_e}{X'^n} = 30$	$\eta = 0$
$\tilde{k}_{oe} = 100 \text{ s}^{-1}$	$\alpha_x = 0.5$
$\tilde{k}_{ec} = 100 \text{ s}^{-1}$	$\gamma_x = 0.5$
	$T = 25^\circ\text{C}$

A escolha $\eta = 0$ significa que durante a transição conformacional não há movimento líquido de cargas associadas a proteína transportadora. Da relação (2.36) entre as constantes cinéticas, podemos encontrar a relação entre a concentração de ATP e a afinidade da reação de ATPase:

$$\tilde{p}_{cT} = \frac{\tilde{r}_{cD} \tilde{q}_{cP}}{\tilde{s}} \delta = \frac{\tilde{r}_{cD} \tilde{q}_{cP}}{\tilde{s}} e^{-\frac{A}{RT}} \quad (2.72)$$

II.4.1-Caso Geral:

Neste caso vamos considerar como variáveis independentes a diferença de potencial, a concentração X' e a afinidade da reação de ATPase; e analisar o comportamento dos fluxos com relação a estas três variáveis.

Na figura 2.3 temos o comportamento do fluxo de transporte (ϕ_x) e da taxa de hidrólise de ATP (ϕ_c) com o potencial elétrico, no caso de acoplamento não perfeito. Neste gráfico consideramos a

afinidade da reação da ATPase tal que $\delta = \exp[-A/RT] = 100$.

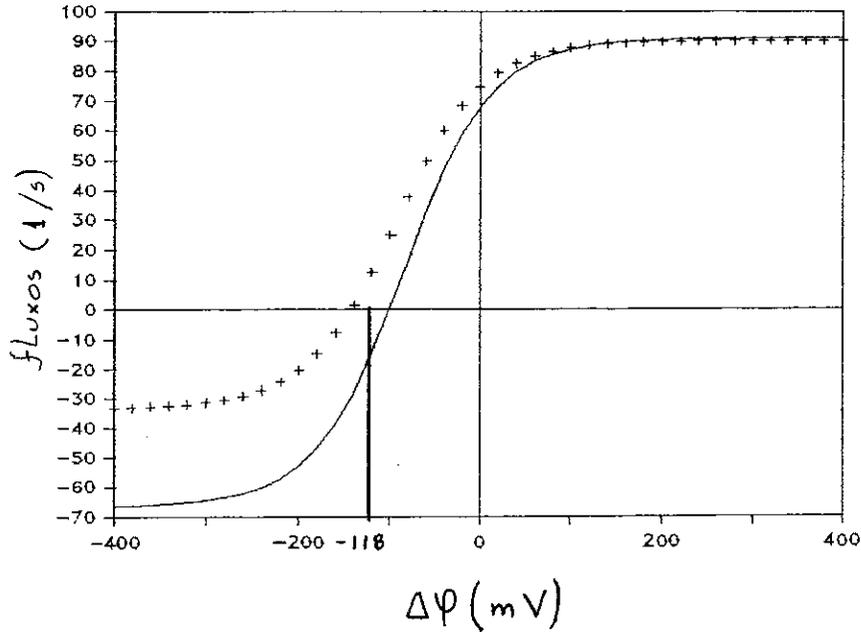


Figura 2.3: Taxa de hidrólise de ATP por molécula bomba, ϕ_c/N (+++), e fluxo de transporte por molécula bomba, ϕ_x/N (—), em função do potencial $\Delta\varphi = \varphi' - \varphi''$. Estamos considerando $X' = X''$ e $\delta = 100$. As constantes cinéticas e os demais parâmetros são dados na tabela 1. O valor da f_{m_x} para a bomba perfeitamente acoplada ($\tilde{q} = \tilde{s} = 0$) está indicada no gráfico.

Como podemos verificar nos gráficos acima, para grandes diferenças de potencial através da membrana, os fluxos tendem a valores limites. Para $\eta = \theta = 0$, $\alpha = \gamma = 0.5$, $X' = X''$ podemos mostrar analiticamente que estes valores são:

$$\lim_{\Delta\varphi \rightarrow -\infty} \phi_x = - \frac{\tilde{k}_{ce} \tilde{k}_{ec}^*}{\tilde{k}_{ce} + \tilde{k}_{ec}^*}$$

$$\lim_{\Delta\varphi \rightarrow +\infty} \phi_x = \frac{\tilde{k}_{ec} \tilde{k}_{ce}^*}{\tilde{k}_{ec} + \tilde{k}_{ce}^*}$$

$$\lim_{\Delta\varphi \rightarrow -\infty} \phi_C = - \frac{\tilde{k}_{oe} \tilde{r}_{cD}}{\tilde{k}_{ce} + \tilde{r}_{cD} + \tilde{s}}$$

$$\lim_{\Delta\varphi \rightarrow +\infty} \phi_C = - \frac{\tilde{k}_{ce} \tilde{p}_{cT}}{\tilde{k}_{ec} + \tilde{p}_{cT} + \tilde{q}_{cP}}$$

O valor da força motriz ($f_{m_x} = f_{em_x} \cong -118$ mV) para a bomba perfeitamente acoplada ($\tilde{q} = \tilde{s} = 0$) comparada com a f_{m_x} encontrada no gráfico ($\phi_x = 0$) exemplifica a desigualdade (1.37) discutida no capítulo I:

$$|f_{m_x}| \leq \frac{A}{nF}$$

Nas figuras 2.4 e 2.5 temos o comportamento da bomba com a concentração X' e com a afinidade da reação de ATPase, respectivamente.

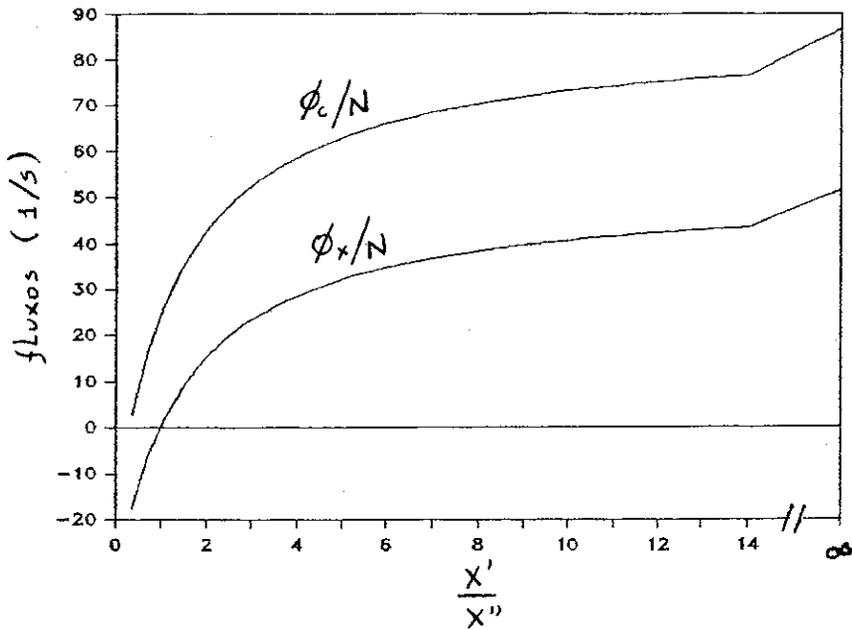


Figura 2.4: Fluxo químico por molécula bomba, ϕ_c/N , e fluxo de transporte por bomba, ϕ_x/N , em função da concentração de íons, X'/X'' . Neste gráfico consideramos $\delta = 100$ e $\Delta\psi = -100$ mV. As constantes cinéticas e os demais parâmetros são dadas na tabela 1.

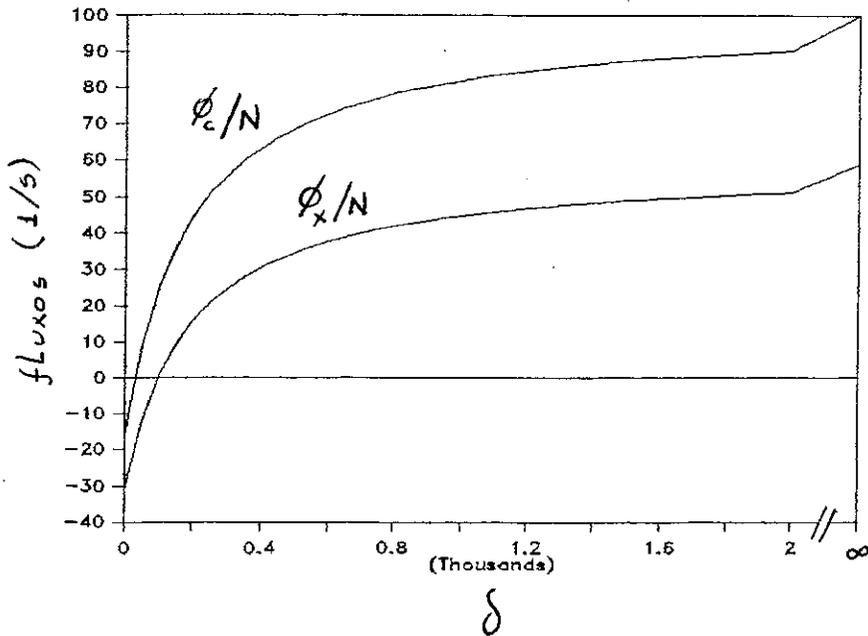


Figura 2.5: Fluxo químico por molécula bomba, ϕ_c/N , e fluxo de transporte por bomba, ϕ_x/N , como função de $\delta = \exp(-A/RT)$. Como estamos considerando c_D e c_P constantes, $\delta = \text{cte } c_T$. Neste gráfico consideramos $X'/X'' = 1$ e $\Delta\psi = -100$ mV. Os demais parâmetros são dadas na tabela 1.

Estas duas figuras sugerem que o comportamento da bomba seja Michaeliano, como esperado da teoria de cinética enzimática quando não há nenhum tipo de cooperatividade (observe que para estas figuras consideramos apenas um sítio de ligação por proteína, $n = 1$). Da expressão (2.45) podemos encontrar a seguinte expressão:

$$\phi_x = \frac{k_1 \left(\delta \left(\frac{X'}{X''} \right)^n - 1 \right)}{k_1 + k_2 \left(\delta \left(\frac{X'}{X''} \right)^n - 1 \right)}$$

válida considerando-se acoplamento perfeito ($q=s=0$), transporte de um tipo de íon ($m = 0$) e considerando o potencial e as

concentrações c_p , c_D e X'' constantes.

As quantidades k_1 , k_2 e k_3 dependem das constantes cinéticas e das concentrações mantidas constantes. A expressão acima (para $n = 1$) é análoga à equação de Michaelis-Menten para um processo enzimático normal:

$$\phi = \phi_{\text{máx}} \frac{S}{K_m + S}$$

onde S representa a concentração de substrato.

Na figura 2.6 temos o comportamento do fluxo de transporte ativo ϕ_x com o gradiente de potencial eletroquímico para os dois casos:

$$(1) \Delta\tilde{\mu}_x = RT \ln \frac{X'}{X''} \quad (\Delta\varphi = 0)$$

$$(2) \Delta\tilde{\mu}_x = F\Delta\varphi \quad (X' = X'')$$

Como os dois gráficos não coincidem podemos concluir que ϕ_x não é função apenas do gradiente de potencial eletroquímico, mas das variáveis X' e $\Delta\varphi$ separadamente. Os dois pontos de contato entre as curvas correspondem aos casos $\Delta\tilde{\mu}_x = 0$ e $\Delta\tilde{\mu}_x = Ff_{m_x}$. Da relação (2.45) podemos encontrar a f_{m_x}

$$f_{m_x} = - \frac{RT}{Fn} \ln \frac{\delta + s/rc_D}{1 + s/rc_D}$$

Desta expressão e da expressão (2.22) podemos concluir que a f_{m_x} depende apenas da afinidade da reação de ATPase e independe de estarmos variando X'/X'' ou o potencial. Observamos que nestes pontos a inclinação dos dois gráficos são diferentes. Quando a $A \rightarrow 0$, os dois pontos de contato tendem para a origem e a uma mesma inclinação, como esperado pelas relações (2.57)-(2.59).

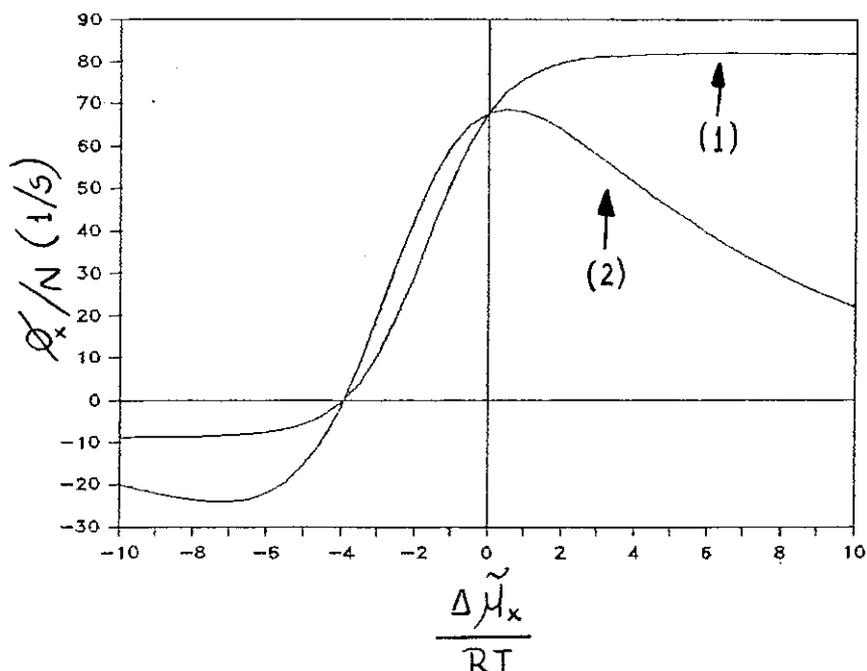


Figura 2.6: Fluxos de transporte ϕ_x/N em função de $\Delta\tilde{\mu}_x/RT$ para os dois casos:

$$(1) \Delta\tilde{\mu}_x = RT \ln \frac{X'}{X''} \quad (\Delta\psi = 0)$$

$$(2) \Delta\tilde{\mu}_x = F\Delta\psi \quad (X' = X'')$$

Isto é, quando o gradiente eletroquímico é (1) puramente osmótico ou (2) puramente elétrico. Neste gráfico consideramos $\alpha = \gamma = 0.25$, $\eta = 0.3$ e $\delta = 100$. Os demais parâmetros são dados pela tabela 1.

II.4.2-Efeito da densidade superficial de cargas da membrana

Como vimos na seção II.3, os fluxos do Transporte Ativo são funções somente das variáveis $\Delta\tilde{\mu}$ e ΔG , para os estados estacionários próximos do equilíbrio. Em geral os fluxos dependem das variáveis $\Delta\psi$ e $\frac{X'}{X''}$ separadamente. Além disso, sabemos que o potencial e as concentrações podem variar na região próxima da superfície da membrana (figura 2.7) onde a entrada do canal de acesso deve estar localizada. Portanto, se faz necessária uma

discussão mais detalhada a respeito do perfil do potencial e das concentrações na proximidade da membrana.

Na figura 2.7 mostramos os perfis típicos do potencial e das concentrações de cátion e ânions na região próxima de uma membrana biológica. Este perfil de potencial resulta da diferença de potencial entre as duas fases da solução, e também da densidade superficial de cargas da membrana.

Podemos supor que a difusão dos íons em cada fase é suficientemente rápida para que possamos desprezar gradientes de potencial eletroquímico dentro de cada fase. Portanto, para $\tilde{\mu}_K$ constante, da relação (1.9) observamos que diminuindo o potencial, a concentração de cátions deve crescer e a de ânions decrescer, isto ocorre próximo da membrana, esquematicamente ilustrado na Figura 2.7.

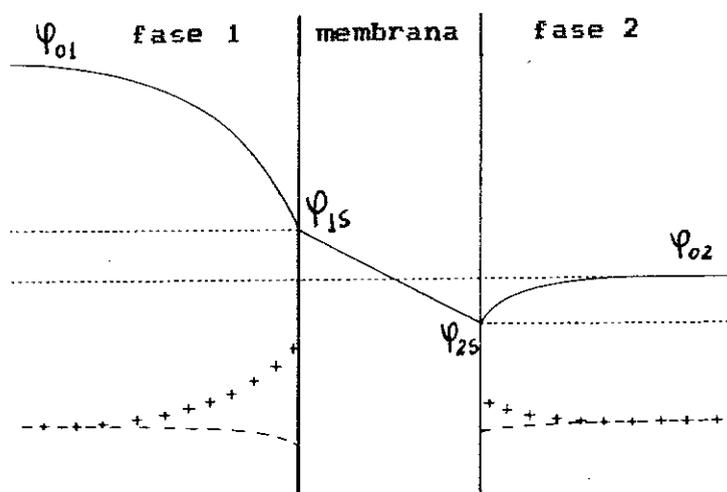


Figura 2.7: Perfil esquemático do potencial (—) e das concentrações dos íons (+ cátions, - ânions) na proximidade da membrana.

Deve-se notar que em condições fisiológicas (concentrações da ordem de 0.1 M) as variações no potencial e nas concentrações se limitam a uma região muito próxima da membrana (aproximadamente 0.1 nm). Em geral, os dados sobre a diferença de potencial e concentrações disponíveis e utilizados na literatura para comparações entre o modelo teórico e os dados experimentais, referem-se aos valores destas grandezas longe da superfície da membrana, isto é, φ_{01} e φ_{02} , segundo a figura 2.7 [1,8,29]. Nosso objetivo é calcular o perfil de potencial próximo à superfície da membrana e utilizar estes valores no cálculo do fluxo de Transporte Ativo.

Note que ao introduzirmos essas correções, o fluxo torna-se dependente de mais um parâmetro, a carga superficial da membrana.

Portanto, segundo o modelo descrito anteriormente, as variáveis $\Delta\varphi$, X' , X'' , Y' e Y'' que entram nas relações (2.45) e (2.46) devem ser calculadas na entrada do canal de acesso, a partir dos valores no volume das fases. Entretanto, isto exige o conhecimento de parâmetros geométricos não disponíveis sobre estas proteínas. Sabemos somente que algumas proteínas sobressaem, geralmente de forma assimétrica, da espessura da membrana e que outras, tais como a Bacteriorhodopsin, aparentemente quase não sobressaem, como podemos ver na figura 2.8.

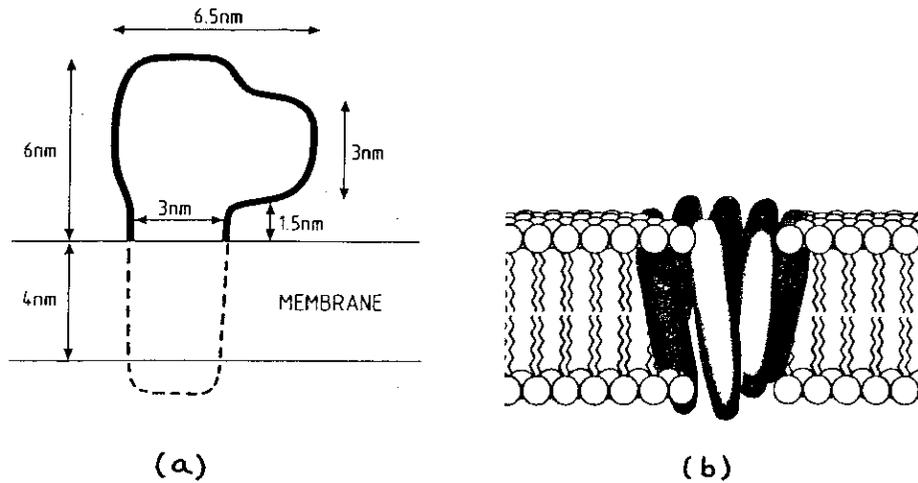


Figura 2.8: Geometria de dois tipos de proteínas transportadoras: (a) Ca²⁺-ATPase [32] a qual apresenta uma forma assimétrica e (b) Bacteriorhodopsin, a qual aparentemente não sobressai da espessura da membrana [33].

No apêndice-B calculamos o perfil de potencial através da membrana e o potencial de superfície a partir da teoria de Gouy-Chapman como função das concentrações iônicas das fases aquosas, da densidade de carga superficial e da diferença de potencial entre as duas fases longe da superfície da membrana. Por simplicidade consideramos apenas a presença de duas espécies de íons monovalentes. O cálculo do apêndice-B supõe também que a membrana é plana e infinita.

De acordo com a relação B.13 do apêndice B, para as fases aquosas o perfil de potencial é dado por,

$$\operatorname{tgh} \frac{1}{4} \left[u_{\alpha}(z) - u_{0\alpha} \right] = \operatorname{tgh} \frac{1}{4} (u_{s\alpha} - u_{0\alpha}) e^{k_{\alpha} \left(\frac{h}{2} \pm z \right)} \quad (2.73)$$

(+ se $\alpha = 1$ e - se $\alpha = 2$)

com

$$k_{\alpha}^2 = \frac{2F^2}{\kappa \epsilon_0 RT} X_{0\alpha} \quad (2.74)$$

onde α indica a fase da solução, k_{α} é o inverso do comprimento de Debye para a fase α , κ é a constante dielétrica da fase aquosa, ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo e $X_{0\alpha}$ é a concentração de cátions monovalentes em cada fase. A variável adimensional u é definida por:

$$u \equiv \frac{F\varphi}{RT} \quad (2.75)$$

onde φ é o potencial elétrico.

O potencial no interior da membrana é linear:

$$\varphi_m(z) = \frac{1}{h} (\varphi_{2s} - \varphi_{1s}) z + \frac{1}{2} (\varphi_{2s} + \varphi_{1s}) \quad (2.76)$$

De acordo com a expressão B.17 do apêndice B, a qual é válida para as condições fisiológicas, os potenciais de superfície são dados por,

$$\varphi_{as} = \varphi_{0\alpha} + \frac{2RT}{F} \ln \left[\frac{\sigma_{\alpha}}{\sigma_{0\alpha}} + \sqrt{\left[\frac{\sigma_{\alpha}}{\sigma_{0\alpha}} \right]^2 + 1} \right] \quad (2.77)$$

onde σ é a densidade superficial de cargas na membrana e

$$\sigma_{0\alpha} = \sqrt{8\kappa\epsilon_0 RT X_{0\alpha}} \quad (2.78)$$

A densidade superficial de carga pode ser diferente em cada lado da membrana, como por exemplo, nas membranas das células nervosas, onde a densidade de carga é maior na face externa do

que na face interna [34,35].

Valores típicos encontrados na literatura para a densidade de carga superficial e para as concentrações de íons são [34,35]:

$$\sigma \cong -0.05 \text{ ou } -0.27 \text{ C/m}^2$$

$$X_0 \cong 0.1 \text{ M}$$

Com relação a assimetria na densidade de cargas, encontramos na literatura [35], para células nervosas:

$$\sigma_1 = -0.02 \text{ C/m}^2$$

$$\sigma_2 = -0.16 \text{ C/m}^2$$

Da relação (2.77) podemos ver que no caso de densidades de carga superficiais iguais ($\sigma_1 = \sigma_2$), concentrações iônicas iguais no meio interno e no meio externo ($X_{01} = X_{02}$), a diferença de potencial superficial é idêntica à diferença de potencial longe da superfície da membrana $\Delta\varphi_s = \varphi_{1s} - \varphi_{2s} = \Delta\varphi_0$. Este resultado é válido somente em condições fisiológicas, onde é válida a relação 2.77. Entretanto, mesmo no caso de uma proteína que não sobressaia da superfície da membrana, o fluxo depende da densidade superficial de cargas já que as concentrações iônicas variam.

Na figura 2.9 temos uma análise comparativa da variação do fluxo com a carga da membrana. O gráfico (1) corresponde a situação em que a densidade superficial é nula. O gráfico (2) é válido para as situação na qual: i) $\sigma_1 = 0$ e $\sigma_2 = -0.05 \text{ C/m}^2$, ii) $X_{01} = X_{02}$, iii) a proteína não sobressai da superfície da membrana.

Nesta situação é fundamental a correção devido a densidade de cargas na membrana, como podemos concluir através da grande diferença nos fluxos de transporte entre os gráficos (1) e (2) da figura 2.9.

A diferença entre os dois gráficos se deve a diferentes potenciais e concentrações na entrada do canal, para cada caso. Para o gráfico (1) consideramos $\frac{K'}{K''} = 1$. Portanto, das relações (B.8) e (B.17) do apêndice-B, para o gráfico (2) teremos $\frac{K'}{K''} = 0.1$ pois K'' é dez vezes maior. Além disso, pela figura B-2 do apêndice-B, os dois gráficos diferem por uma translação de aproximadamente 56 mV.

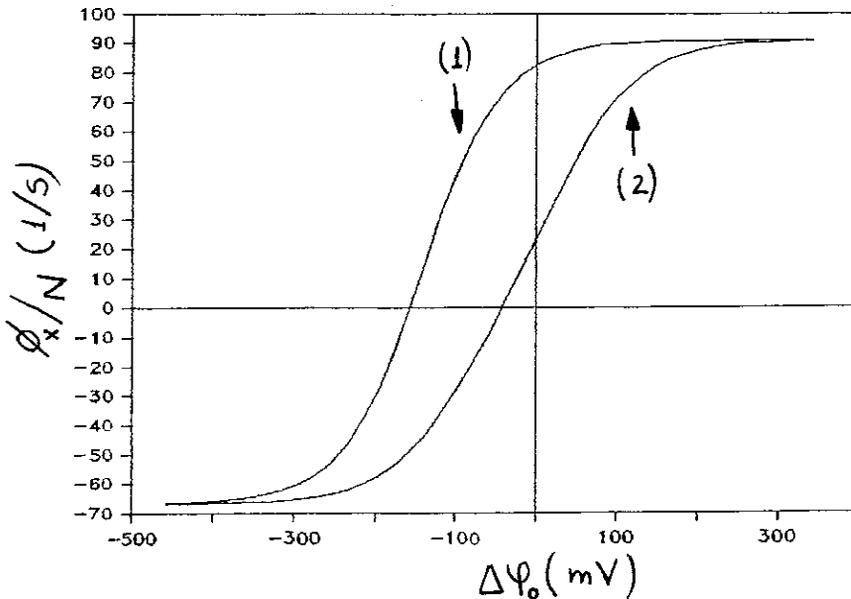


Figura 2.9: Neste gráfico temos a comparação entre fluxos de transporte ativo estabelecidos no estado estacionário quando, (1) a densidade superficial de carga não necessita ser levada em conta e (2) quando a assimetria da proteína ou da distribuição de cargas nas duas faces da membrana torna essa correção importante (veja o texto). Ambos os fluxos estão em função da diferença de potencial medida longe da superfície da membrana ($\Delta\psi_0$). Para ambos os gráficos utilizamos $\delta = 100$ e os valores da tabela 1.

II.4.3-Estados Estacionários em Sistemas Finitos. Efeitos do Transporte Passivo

Na seção II.4.1 consideramos o potencial e a concentração do íon transportado como parâmetros que podem ser variados de forma independente. Entretanto, como as células são compartimentos finitos, tanto o potencial como as concentrações variam continuamente e simultaneamente.

Se o potencial e as concentrações dos íons não forem controladas externamente, o estabelecimento dos estados estacionários dependerá das concentrações e dos transportes passivo e ativo de todas as substâncias existentes no meio externo e no meio interno. Em alguns casos, a diferença de potencial é principalmente estabelecida pelo gradiente de concentração do íon transportado ativamente.

Podemos esperar que em sistemas deste tipo, dada a afinidade da reação de ATPase, esta considerada como um vínculo externo, seja possível determinar no estado estacionário o valor do potencial e das concentrações dos íons transportados.

Como exemplo, podemos supor a existência de apenas 2 íons: w , com carga $-z_w$, o qual não é transportado pela bomba e está em equilíbrio através da membrana, e um íon x com carga z_x , que sofre transporte ativo.

Portanto, as variáveis u e $\frac{X'}{X''}$ satisfazem as relações:

$$\frac{\Delta \tilde{\mu}_w}{RT} = \ln \frac{W'}{W''} - z_w \Delta u = 0 \quad (2.79)$$

$$\frac{\Delta \tilde{\mu}_x}{RT} = \ln \frac{X'}{X''} + z_x \Delta u \quad (2.80)$$

Com a condição de eletroneutralidade:

$$z_x X'_0 = z_w W'_0 \quad \text{e} \quad z_x X''_0 = z_w W''_0 \quad (2.81)$$

obteremos,

$$\ln \left[\frac{W'}{W''} \right]_0 = \ln \left[\frac{X'}{X''} \right]_0 = \frac{z_w}{(z_x + z_w)} \frac{\Delta \tilde{\mu}_x}{RT} \quad (2.82)$$

$$\Delta u_0 = u_{10} - u_{20} = \frac{1}{(z_w + z_x)} \frac{\Delta \tilde{\mu}_x}{RT} \quad (2.83)$$

Estas expressões relacionam as concentrações e o potencial na região longe da superfície da membrana com o gradiente eletroquímico. Além disso, vimos na seção anterior, que o potencial e as concentrações dos ions na entrada do canal de acesso podem ser calculados em função de u_{01} , u_{02} , X_{01} e X_{02} .

Portanto, nestas condições, o fluxo de Transporte Ativo é apenas função do gradiente de potencial eletroquímico e das concentrações de ATP, ADP e P_i :

$$\phi_x = \phi_x(\Delta \tilde{\mu}_x, c_P, c_D, c_T; \{k\})$$

Como estamos supondo sistemas finitos é necessário que o Transporte Ativo seja compensado por alguma forma de Transporte Passivo através da membrana. Desde que se conheça a expressão para o Transporte Passivo, combinando as expressões (2.45), (2.82) e (2.83), pode-se encontrar o potencial e as concentrações

em função da afinidade da reação de ATPase.

Encontraremos explicitamente as expressões para Δu e X'/X'' no caso em que o Transporte Passivo pode ser desprezado. Neste caso teremos no estado estacionário: $\phi_x = 0$. Da relação (2.45) encontramos,

$$\Delta \tilde{\mu}_x = - \frac{RT}{n} \ln \frac{\delta + s/rc_D}{1 + s/rc_D} \quad (2.84)$$

e de (2.95) e (2.96) encontramos finalmente as variáveis u e $\frac{X'}{X''}$

$$\Delta u_0 = - \frac{1}{n(z_w + z_x)} \ln \frac{\delta + s/rc_D}{1 + s/rc_D} \quad (2.85)$$

$$\left[\frac{X'}{X''} \right]_0 = e^{z_w \Delta u_0} \quad (2.86)$$

Portanto, como esperado, todas as variáveis ficam determinadas em função da afinidade da reação de ATPase.

CAPÍTULO III

EFEITOS DA COOPERATIVIDADE NO TRANSPORTE ATIVO

Seguindo o objetivo inicial do nosso trabalho, que é uma análise teórica, a partir da termodinâmica e da cinética química, das propriedades dos sistemas de Transporte Ativo segundo o Modelo de Acesso Alternado; analisaremos agora o efeito sobre o Transporte Ativo da existência de cooperatividade nas transições conformacionais das proteínas durante o ciclo de reação de transporte. Para isso, introduziremos passos cooperativos no esquema de reação analisado anteriormente, procurando entretanto fazer sempre modificações mínimas a este modelo.

A motivação deste estudo se deve aos vários fenômenos não totalmente compreendidos que existem nas células vivas e à propriedade que alguns modelos cinéticos possuem de explicar a ocorrência de estruturas dissipativas, apresentando: ciclos limites, estados estacionários múltiplos, inomogeneidades espaciais, oscilações periódicas e transições tudo-ou-nada [28]. Os fenômenos que poderiam ser explicados com estes modelos nas células vivas são, por exemplo, os fenômenos oscilatórios (variações periódicas no potencial elétrico, nas concentrações e na pressão), as propriedades das membranas excitáveis e os mecanismos de regulação celular, em particular, da regulação do

Transporte Ativo. Analisaremos aqui a possibilidade dos mecanismos de controle sobre esses fenômenos estarem diretamente associados ao mecanismo do Transporte Ativo. Estaremos interessados em particular na existência de estados estacionários múltiplos, os quais podem estar associados aos diferentes regimes de transporte através da membrana.

A existência de efeitos cooperativos em enzimas é bem conhecido. A cinética dos estados estacionários freqüentemente difere da cinética que leva as curvas (veloc x substrato) tipo Michaelis-Menten encontradas na discussão anterior. E isso ocorre devido a existência de efeitos cooperativos entre os sítios de ligação das enzimas. Existem evidências de que este tipo de interação também ocorra nas bombas de Transporte Ativo [36].

Existem discussões na literatura sobre a possibilidade de uma estrutura dimérica ou oligomérica para as proteínas transportadoras [36,37]. Entretanto, estes estudos não são ainda definitivos, já que outros estudos mostram que os monômeros são ativos, isto é, são capazes de realizar o transporte, e que existe apenas um tipo de sítio de ligação nestas proteínas [36].

Em alguns trabalhos se discute a possibilidade de existirem estados estacionários múltiplos para sistemas de transporte passivo facilitado por proteínas transportadoras [38,39]. Nestes trabalhos se supõe que o transporte é facilitado por uma rede de proteínas que interagem entre si, modificando a energia dos estados conformacionais. A análise teórica deste modelo a partir de uma aproximação de campo médio mostra que em alguns casos aparece uma transição de fase semelhante àquela que ocorre na

mudança de estado líquido-gás [38].

No nosso estudo não vamos supor qualquer tipo de estrutura oligomérica, mas que existe uma interação do tipo autocatalítica nas transformações conformacionais. Esta interação pode ocorrer quando as proteínas imersas no fluido lipídico colidem entre si.

Para que o tipo de interação suposta acima seja válida para um modelo de transporte, a frequência com que ocorrem colisões entre as proteínas deve ser superior à taxa de transporte verificada experimentalmente, a qual é aproximadamente 100/s [11,14].

Uma estimativa do número de colisões pode ser obtida a partir do coeficiente de difusão destas proteínas (D), da seção de choque geométrica (σ) e da densidade superficial de proteínas (Γ) nas membranas:

$$n_c = 2\sigma D\Gamma^2$$

Os valores típicos para estes parâmetros são:

$$\sigma \cong 10^{-8} \text{ m} \quad [11,33]$$

$$D \cong 5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s} \quad [40]$$

$$\Gamma \cong 10^{16}/\text{m}^2 \quad [11]$$

Com estes valores encontramos

$$n_c = 10^3/\text{s}$$

que é um valor suficientemente grande (comparado com a taxa de transporte de 100/s), compatível com o tipo de cooperatividade suposto. É importante que o número de colisões seja muito maior que a taxa de transporte, pois a seção de choque de reação pode ser menor do que a seção de choque geométrica.

III.1-Esquemas Cinéticos com Cooperatividade:

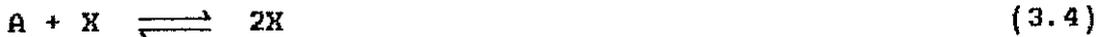
Existem vários esquemas de reação conhecidos que levam a algum tipo de estrutura dissipativa [26]. Destes, podemos adaptar facilmente ao ciclo de reações de Transporte Ativo analisado no capítulo II, os modelos de Lotka e o de Edelstein [41].

O modelo de Lotka,



corresponde a dois passos autocatalíticos consecutivos. Este modelo apresenta oscilações temporais marginalmente estáveis [26].

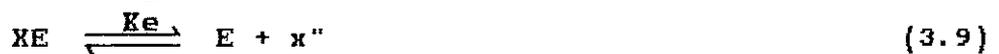
O modelo de Edelstein,



corresponde à produção autocatalítica de X seguida de um passo de transformação enzimática do tipo Michaelis-Menten. Este modelo apresenta estados estacionários múltiplos.

III.2-Modelo Cooperativo Mínimo

A adaptação dos dois modelos mencionados acima ao esquema de reação de transporte não resultará na possibilidade mais simples para um modelo cooperativo de Transporte Ativo. Podemos por exemplo examinar o seguinte modelo:



Este esquema de reação corresponde ao modelo de acesso alternado (2.6)-(2.9) com o passo (2.7) sendo autocatalizado por XE. Com o objetivo de simplificar a análise matemática introduzimos as seguintes simplificações no modelo de transporte: (i) apenas um tipo de íon é transportado pela bomba, (ii) apenas um íon é transportado para cada ATP hidrolisado e (iii) existe acoplamento perfeito entre a reação de transporte e a hidrólise de ATP ($m = 0$, $n = 1$ e $q = s = 0$).

A análise deste esquema de reações mostra que ele não apresenta estados estacionários múltiplos, porém o comportamento do fluxo de transporte com a afinidade da reação de ATPase apresenta a forma sigmoideal verificada experimentalmente.

Abaixo apresentamos o conjunto de equações correspondentes a este esquema cinético, segundo a lei de ação das massas. Todas as hipóteses e variáveis são idênticas àquelas adotadas na discussão

do Modelo Mínimo discutido no capítulo II.

$$N_{XC} + N_{XE} + N_E + N_C = N \quad (3.11)$$

$$\frac{N_C}{N_{XC}} = \frac{K_C}{X'} \quad (3.12)$$

$$\frac{N_E}{N_{XE}} = \frac{K_E}{X''} \quad (3.13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[N_C + N_{XC}] = & -k_{ce} N_C - p c_T N_{XC} N_{XE} \\ & + k_{ec} N_E + r c_D N_{XE}^2 = 0 \end{aligned} \quad (3.14)$$

onde X' é a concentração de x no meio interno e X'' é a concentração no meio externo.

Deste conjunto de equações podemos encontrar todos os N_k e portanto, os fluxos ϕ_x e ϕ_c em função dos parâmetros $\{\Delta\psi, X', X'', c_T, c_D, c_p\}$ e do conjunto de constantes cinéticas $\{k\}$,

$$\phi_x = \frac{d + b}{2(a + c)} \left[\sqrt{(b+d-cN)^2 + 4(a+c)Nd} - (b+d-cN) \right] - Nd \quad (3.15)$$

onde

$$a = \frac{r c_D}{(K_E/X'' + 1)^2} \quad (3.16)$$

$$b = k_{ec} \frac{K_E/X''}{(K_E/X'' + 1)} \quad (3.17)$$

$$c = \frac{p c_T}{(K_E/X'' + 1)(K_C/X' + 1)} \quad (3.18)$$

$$d = k_{oe} \frac{K_C/X'}{(K_C/X' + 1)} \quad (3.19)$$

Podemos supor que a dependência das constantes cinéticas com o potencial elétrico é a mesma dependência discutida anteriormente. Como a interação entre as bombas ocorre apenas por autocatálise, podemos mostrar que a relação entre as constantes

cinéticas é idêntica àquela do caso perfeitamente acoplado do modelo de acesso alternado não cooperativo:

$$\frac{K_{ek} \frac{p c_T}{e c_{rc_D}}}{K_{ck} \frac{r c_D}{c e}} = \delta e^{\Delta u} \quad (3.20)$$

onde δ é definido no capítulo II como

$$\delta = e^{-\frac{A}{RT}}$$

onde A é a afinidade da reação de ATPase.

Nas figuras abaixo analisamos numericamente o comportamento do fluxo ϕ_x com a afinidade da reação de ATPase, o gradiente de concentração e o potencial elétrico. Os vários parâmetros utilizados nos gráficos estão especificados nas legendas, exceto: $n = z = 1$, $\bar{s} = \bar{q} = 0$, $\eta = 0$ e $\alpha = \gamma = 0.5$, os quais são comuns a todos os gráficos. Novamente, estamos considerando que X'' , c_D e c_p são mantidos constantes. Portanto, a afinidade da reação de ATPase é controlada pela concentração de ATP (c_T) e o gradiente de concentração do íon x pela concentração X' (concentração do íon no meio interno).

Nas figuras 3.1 e 3.2 temos respectivamente o comportamento de ϕ_x por molécula bomba com a afinidade da reação de ATPase e com o gradiente de concentração do íon x através da membrana, para diferença de potencial nula.

Vemos que a introdução de cooperatividade por autocatálise também leva à forma sigmoideal das curvas (veloc \times substrato), assim como a cooperatividade discutida para o caso de dímeros ou oligômeros [36]. Observe que o modelo não cooperativo discutido anteriormente, nestas mesmas condições, não apresenta este tipo de comportamento.

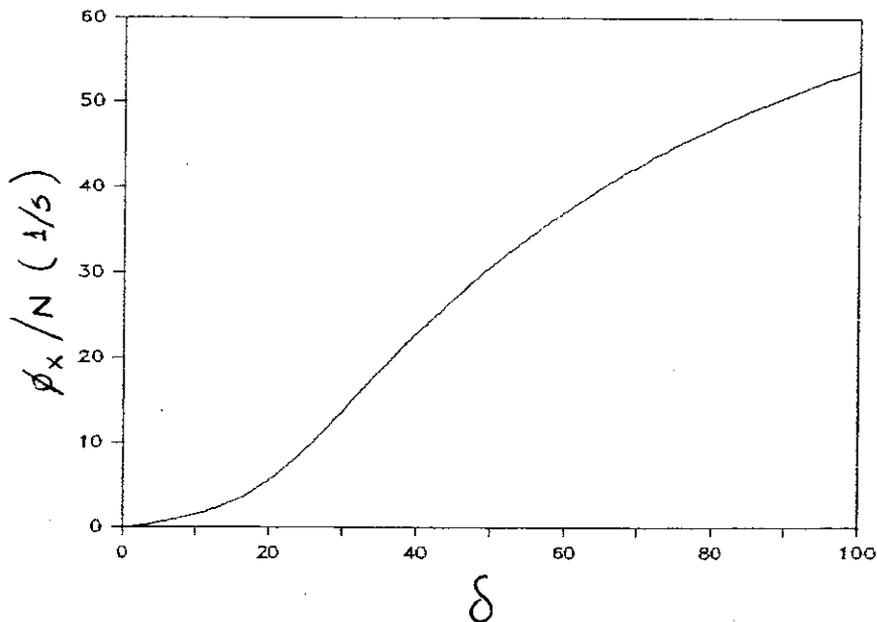


Figura 3.1: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função de $\delta \equiv \exp(-A/RT)$. Como estamos considerando c_D e c_P constantes, $\delta = cte \cdot c_T$. Neste gráfico consideramos

$rc_D N = 35000$ $1/s$, $\bar{k}_{ce} = 10$ $1/s$, $\bar{k}_{ec} = 100$ $1/s$, $\frac{\bar{k}_c}{\bar{X}''} = 0.4$, $\frac{\bar{k}_e}{\bar{X}''} = 15$,
 $\Delta u = 0$ e $K'/X'' = 1$.

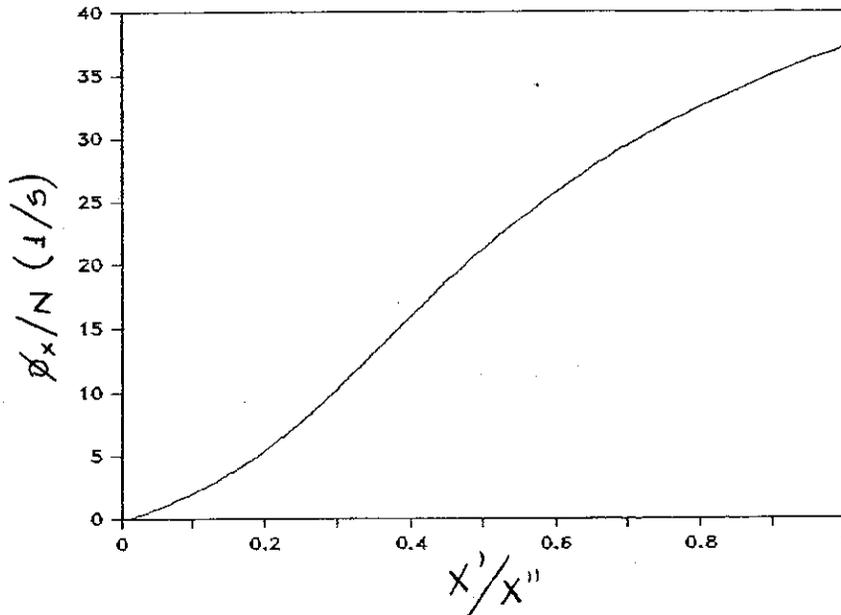


Figura 3.2: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função do gradiente de concentração X' do ion transportado. Neste gráfico consideramos $rc_D N = 20000$ 1/s, $\tilde{k}_{ce} = 5$ 1/s, $\tilde{k}_{ec} = 100$ 1/s, $\frac{\tilde{K}_c}{\tilde{X}''} = 1$, $\frac{\tilde{K}_e}{\tilde{X}''} = 100$, $\Delta u = 0$ e $\delta = 100$.

Na figura 3.3 temos uma comparação entre o Modelo Cooperativo Mínimo e o modelo não cooperativo discutido no capítulo II. Os gráficos mostram o comportamento dos fluxos em função da diferença de potencial através da membrana. Como estamos considerando $\alpha = \gamma = 0.5$ e $\eta = 0$, os únicos parâmetros dependentes do potencial são: $K_e = \tilde{K}_e e^{\gamma \Delta u}$ e $K_c = \tilde{K}_c e^{-\alpha \Delta u}$. O decréscimo do fluxo de transporte do modelo cooperativo para grandes diferenças de potencial ($\Delta u \rightarrow \infty$) é esperado já que neste limite $K_e \rightarrow \infty$ e portanto $N_{XE} \rightarrow 0$, sendo que XE é o estado da bomba que cataliza a transição conformacional.

Como estamos considerando a mesma afinidade da reação de

ATPase para ambos os gráficos e que ambos os modelos são perfeitamente acoplados, a força eletromotriz ($f m_x$), introduzida no capítulo I, deve ser a mesma para os dois casos:

$$|f m_x| = \frac{A}{RT}$$

Este fato é verificado na figura 3.3, onde para $\phi_x = 0$, as duas curvas coincidem no mesmo ponto.

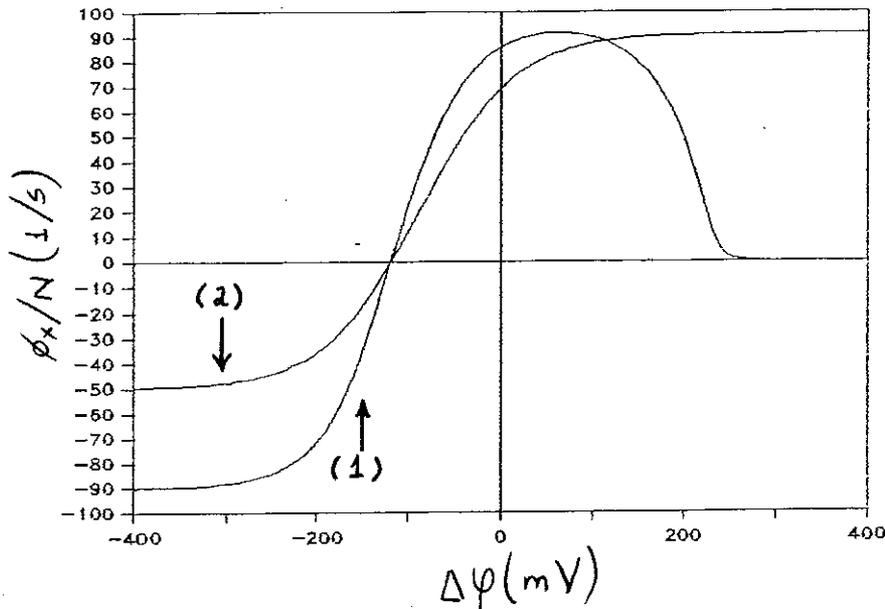


Figura 3.3: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função de $\Delta\varphi$ nos casos:

(1) Modelo cooperativo mínimo. Neste gráfico consideramos

$$r c_D N = 10000 \text{ 1/s}, \quad \tilde{k}_{ce} = 100 \text{ 1/s}, \quad \tilde{k}_{ec} = 100 \text{ 1/s}, \quad \frac{\tilde{K}_c}{X''} = 1, \\ \frac{\tilde{K}_e}{X''} = 10, \quad \delta = 100 \text{ e } X'/X'' = 1.$$

(2) Modelo não cooperativo, onde supomos acoplamento perfeito ($q = s = 0$), $r c_D = 100$ e os demais parâmetros idênticos ao caso (1).

III.3-Modelo de Lotka Adaptado:

A adaptação do modelo cinético de Lotka à reação de transporte leva ao seguinte esquema de reações:



Este esquema corresponde ao modelo mínimo de acesso alternado (2.6)-(2.9) com os passos (2.7) e (2.9) sendo autocatalizados por XE e XC respectivamente. Por simplicidade, estamos supondo o esquema de reação com as mesmas características do modelo cooperativo mínimo acima. A análise deste esquema mostra que ele, assim como o modelo cooperativo mínimo, também não apresenta estados estacionários múltiplos, mas que o comportamento do fluxo de transporte com a afinidade da reação de ATPase apresenta a forma sigmoideal verificada experimentalmente.

Abaixo apresentamos o conjunto de equações correspondentes a este esquema cinético, segundo a lei de ação das massas. Todas as hipóteses e variáveis são idênticas àquelas adotadas na discussão do modelo de acesso alternado não cooperativo.

$$N_{XC} + N_{XE} + N_E + N_C = N \quad (3.25)$$

$$\frac{N_C}{N_{XC}} = \frac{Kc}{X'} \quad (3.26)$$

$$\frac{N_E}{N_{XE}} = \frac{Ke}{X''} \quad (3.27)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[N_C + N_{XC}] = & -k_{ce}N_C^2 - pc_T N_{XC} N_{XE} + \\ & + k_{ec} N_E N_C + rc_D N_{XE}^2 = 0 \end{aligned} \quad (3.28)$$

onde X' é a concentração de x no meio interno e X'' é a concentração no meio externo.

Novamente, deste conjunto de equações podemos encontrar todos os N_k e portanto, os fluxos ϕ_x e ϕ_c em função dos parâmetros $\{\Delta\varphi, X', X'', c_T, c_D, c_p\}$ e do conjunto de constantes cinéticas $\{k\}$,

$$\phi_x = cNB - (a + c)B^2 \quad (3.29)$$

$$B = N \frac{\sqrt{(b-c+2d)^2 + 4(a-b+c-d)d} - (b-c+2d)}{2(a-b+c-d)} \quad (3.30)$$

onde

$$a = \frac{rc_D}{(Ke/X''+1)^2} \quad (3.31)$$

$$b = k_{ec} \frac{Ke/X''}{(Ke/X''+1)} \frac{Kc/X'}{(Kc/X'+1)} \quad (3.32)$$

$$c = \frac{pc_T}{(Ke/X''+1)(Kc/X'+1)} \quad (3.33)$$

$$d = k_{ce} \left[\frac{Kc/X'}{(Kc/X'+1)} \right]^2 \quad (3.34)$$

A dependência das constantes cinéticas com o potencial elétrico e a relação entre estas constantes é a mesma do modelo

cooperativo mínimo.

Nas figuras abaixo novamente analisamos numericamente o comportamento do fluxo ϕ_x com a afinidade da reação de ATPase, o gradiente de concentração e o potencial elétrico. Os vários parâmetros utilizados nos gráficos estão especificados nas legendas, exceto: $n = z = 1$, $\tilde{s} = \tilde{q} = 0$, $\eta = 0$ e $\alpha = \gamma = 0.5$, os quais são comuns a todos os gráficos. Novamente, estamos considerando que X'' , c_D e c_P são constantes. Portanto, a afinidade da reação de ATPase é controlada pela concentração de ATP (c_T) e o gradiente de concentração do íon x , pela concentração X' (concentração do íon no meio interno).

Nas figuras 3.4 e 3.5 temos respectivamente o comportamento de ϕ_x por molécula bomba com a afinidade da reação de ATPase e com o gradiente de concentração do íon x através da membrana, para diferença de potencial nula.

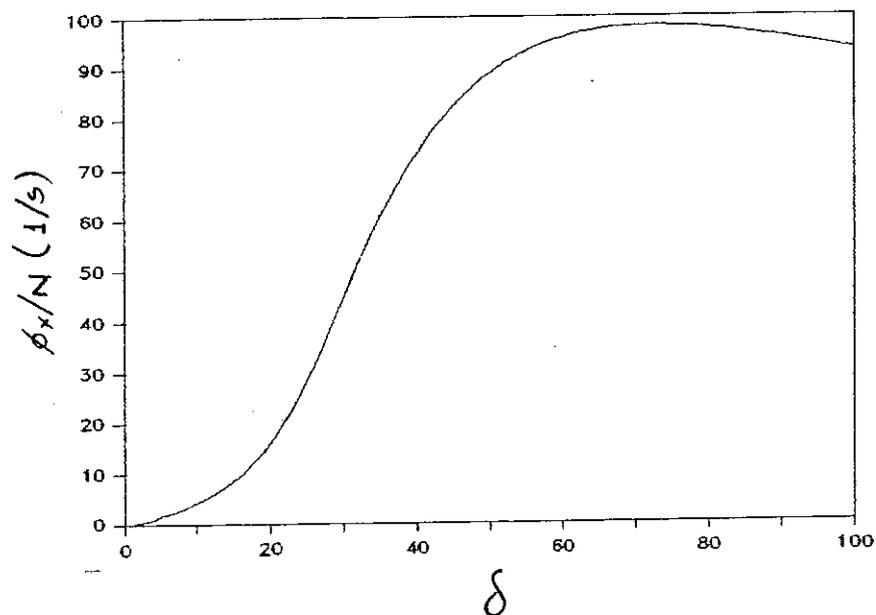


Figura 3.4: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função de $\delta \equiv \exp(-A/RT)$. Neste gráfico consideramos $rc_D N = 900$ 1/s, $N\tilde{k}_{ce} = 9$ 1/s, $N\tilde{k}_{ec} = 4500$ 1/s, $\frac{\tilde{K}_c}{K''} = 50$, $\frac{\tilde{K}_e}{K''} = 0.1$, $\Delta u = 0$ e $X'/X'' = 1$.

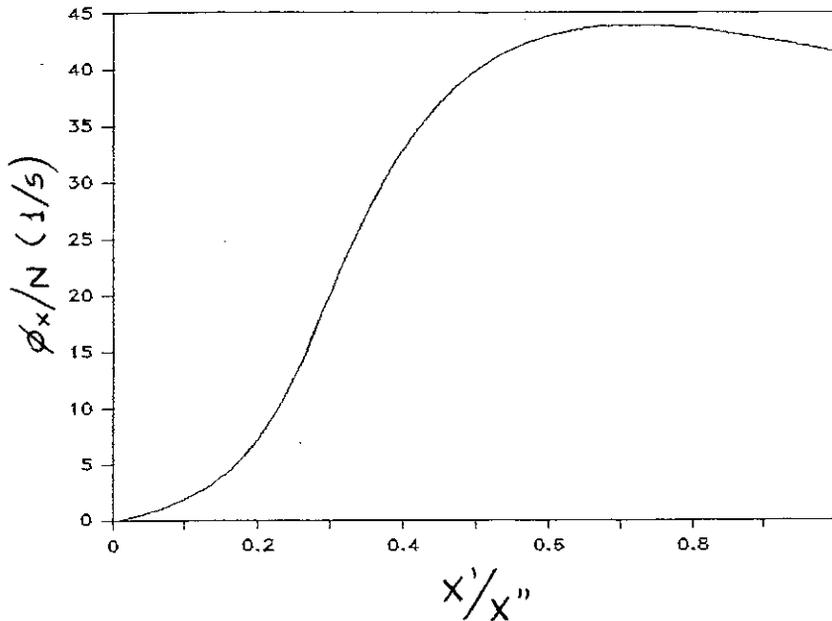


Figura 3.5: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função do gradiente de concentração X' do íon transportado. Neste gráfico consideramos $rc_D N = 400$ 1/s, $N\tilde{k}_{ce} = 4$ 1/s,

$$N\tilde{k}_{ec} = 2000 \text{ 1/s}, \quad \frac{\tilde{k}_c}{\tilde{X}''} = 50, \quad \frac{\tilde{k}_e}{\tilde{X}''} = 0.1, \quad \Delta u = 0 \quad \text{e} \quad \delta = 100.$$

Neste modelo, as curvas além de apresentarem a forma sigmoidal apresentam também um máximo. Este resultado corresponde a uma inibição por substrato, fato que é verificado experimentalmente [36,42]. A região de decréscimo do fluxo com a concentração de ATP, a qual surge para δ grande, se deve ao fato de que para grandes concentrações de ATP, $XC \rightarrow 0$ pois a reação (3.22) se desloca para a direita, e conseqüentemente pela reação (3.21), $N_C \rightarrow 0$, sendo que C é o catalizador de um dos passos da reação.

Na figura 3.6 temos o comportamento do fluxo ϕ_x/N com a

diferença de potencial através da membrana, para gradiente de concentração nulo. Novamente, os únicos parâmetros dependentes do potencial são: $K_e = \tilde{K}_e e^{\gamma \Delta u}$ e $K_c = \tilde{K}_c e^{-\alpha \Delta u}$. O decréscimo do fluxo para grandes diferenças de potencial ($\Delta u \rightarrow \infty$) também é esperado já que N_{XE} e N_C são inversamente proporcionais a K_e e $1/K_c$ respectivamente, e estes são os estados da bomba que catalizam as transições conformacionais.

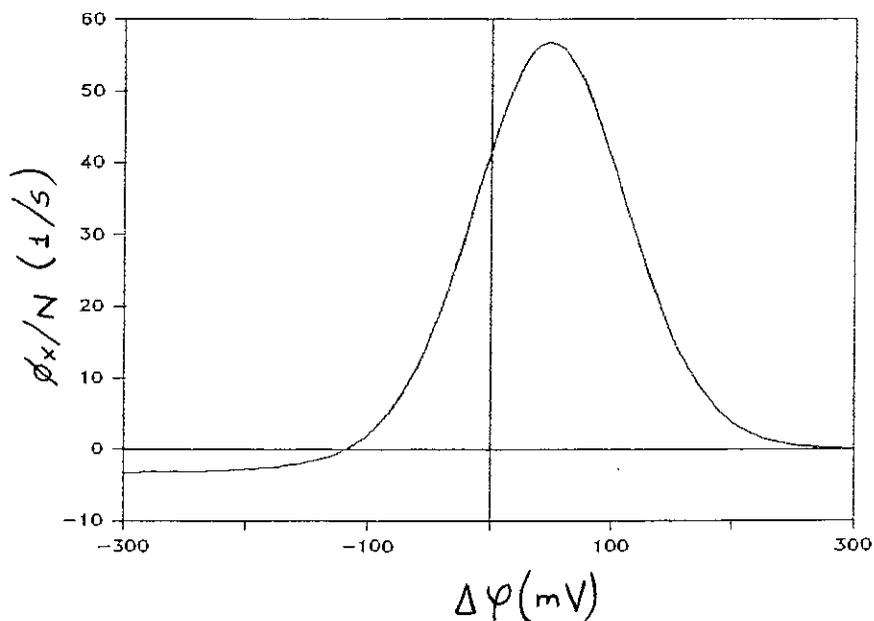


Figura 3.6: Fluxo de transporte ϕ_x por molécula bomba, como função de $\Delta\psi$. Neste gráfico consideramos $r_{c_D}N = 400$ 1/s, $N\tilde{k}_{ce} = 4$ 1/s, $N\tilde{k}_{ec} = 2000$ 1/s, $\frac{\tilde{K}_c}{X''} = 50$, $\frac{\tilde{K}_e}{X''} = 0.1$, $\delta = 100$ e $X'/X'' = 1$.

III.4-Modelo de Edelman Adaptado:

O esquema cinético de Edelman sugere o seguinte modelo para o ciclo de reação de transporte:



onde

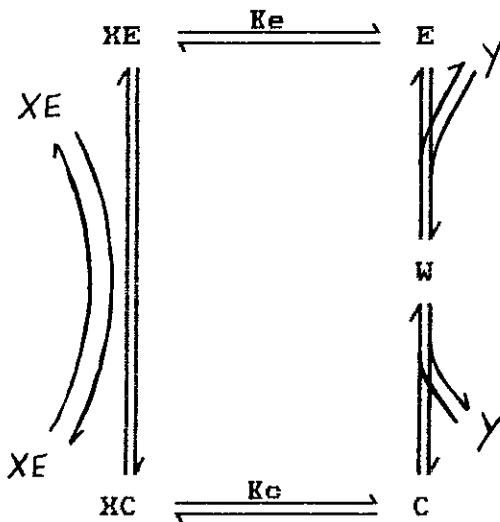
$$k_1 = p c_T$$

$$k_{-1} = r c_D$$

$$K'' = K'' K_e$$

$$K' = K' K_c$$

Podemos representar o esquema acima de forma esquemática,



Observe que a transformação $XC \rightarrow HE$ é suposta ocorrer unicamente por autocatálise. Esta hipótese é mantida aqui por simplicidade e pelo nosso interesse na análise qualitativa das propriedades.

No esquema cinético acima existe uma espécie química Y que serve como catalizador da transformação $E \rightarrow C$. Esta espécie Y pode ser por exemplo uma pequena proteína existente no citoplasma ou na membrana. Esta molécula se combina com a molécula bomba formando o complexo W. Para a nossa análise qualitativa não necessitamos fazer qualquer hipótese sobre esta espécie Y.

Do esquema de reação acima, vem as seguintes equações para o estado estacionário:

$$\frac{d}{dt}(XE+E) = k_1XC XE - k_{-1}XE^2 - k_2E Y + k_{-2}W = 0 \quad (3.40)$$

$$\frac{dY}{dt} = -k_2E Y + k_{-2}W + k_3W - k_{-3}C Y = 0 \quad (3.41)$$

$$Y + W = q_1 \quad (3.42)$$

$$XC + C + W + XE + E = N \quad (3.43)$$

$$E = KeXE \quad (3.44)$$

$$C = KcXC \quad (3.45)$$

ou, de forma mais compacta

$$(1+Ke)\frac{d}{dt}XE = k_1XC XE - k_{-1}XE^2 - Kek_2XE Y + k_{-2}W = 0 \quad (3.46)$$

$$\frac{dY}{dt} = -Kek_2XE Y + k_{-2}W + k_3W - Kck_{-3}XC Y = 0 \quad (3.47)$$

$$Y + W = q_1 \quad (3.48)$$

$$(1+Kc)XC + W + (1+Ke)XE = N \quad (3.49)$$

Vamos considerar as concentrações e o potencial como parâmetros que podem ser ajustados externamente, de forma análoga à seção II.3.1. Portanto, temos um conjunto de 4 equações a 4 variáveis (XE, Y, W, XC) com 10 parâmetros (Ke, Kc, k₁, k₂, k₃, k₋₁, k₋₂, k₋₃, q₁, N).

Podemos fazer uma transformação de escala nos parâmetros e nas variáveis tal que alguns parâmetros sejam eliminados das equações. Escolhemos eliminar o conjunto:

$$Ke, Kc, (1+Ke), (1+Kc), k_{-3} \text{ e } k_{-2} \quad (3.50)$$

embora outros conjuntos possam ser eliminados (inclusive q_1 ou N).

As transformações de escala para eliminar esse conjunto de parâmetros são:

$$Y \longrightarrow \frac{k_{-2}(1+Kc)}{Kck_{-3}} Y \quad (3.51)$$

e relações idênticas para q_1 , N , W

$$Kc \longrightarrow \frac{k_{-2}}{Kck_{-3}} Kc \quad (3.52)$$

$$KE \longrightarrow \frac{k_{-2}(1+Kc)}{(1+Ke)Kck_{-3}} KE \quad (3.53)$$

$$d_t \longrightarrow k_{-2}d_t \quad e \quad k_3 \longrightarrow k_{-2}(k_3 - 1) \quad (3.54)$$

$$k_2 \longrightarrow \frac{(1+Ke)Kc}{(1+Kc)Ke} k_{-3} k_2 \quad (3.55)$$

$$k_{-1} \longrightarrow \frac{(1+Ke)^2 Kc}{(1+Kc)} k_{-3} k_{-1} \quad (3.56)$$

$$k_1 \longrightarrow (1+Ke)Kck_{-3} k_1 \quad (3.57)$$

Com esta transformação obtemos

$$\frac{d}{dt} KE = k_1 Kc KE - k_{-1} KE^2 - k_2 KE Y + W = 0 \quad (3.58)$$

$$\frac{dY}{dt} = -k_2 KE Y + k_3 W - Kc Y = 0 \quad (3.59)$$

$$Y + W = q_1 \quad (3.60)$$

$$Kc + W + KE = N \quad (3.61)$$

Das equações (3.58), (3.60) e (3.61) podemos calcular XC, Y e W em função de XE:

$$XC = \frac{XE^2(k_{-1} + k_2) + XE(q_1 k_2 - N k_2 + 1) - N}{XE(k_1 - k_2) - 1} \quad (3.62)$$

$$Y = \frac{XE^2(k_{-1} + k_1) + XEk_1(q_1 - N) - q_1}{XE(k_1 - k_2) - 1} \quad (3.63)$$

$$W = \frac{-XE^2(k_{-1} + k_1) + XE(Nk_1 - q_1 k_2)}{XE(k_1 - k_2) - 1} \quad (3.64)$$

Substituindo XC, Y e W na equação (3.59) obtemos

$$\frac{P}{[XE(k_2 - k_1) + 1]^2} = 0 \quad (3.65)$$

onde P é um polinômio de quarto grau

$$P = a_4 XE^4 + a_3 XE^3 + a_2 XE^2 + a_1 XE + a_0 = 0 \quad (3.66)$$

cujos coeficientes são dados por

$$a_4 = -(k_{-1} + k_1 k_2 - k_2^2 + k_2)(k_{-1} + k_1) \quad (3.67)$$

$$a_3 = (N - q_1) \left[k_{-1}(k_1 + k_2) + k_1 k_2(k_1 - k_2 + 2) \right] + (k_1 + k_{-1}) \left[k_2^{-1} + k_3(k_2 - k_1) \right] \quad (3.68)$$

$$a_2 = k_3(q_1 k_2^2 + Nk_1^2 + k_1 + k_{-1}) + (q_1 + N)(k_{-1} - k_1 k_2 k_3) + k_1 k_2(q_1 - N)(1 + N - q_1) + q_1(k_2 - 1)(k_1 - k_2) + 2Nk_1 \quad (3.69)$$

$$a_1 = k_3(q_1 k_2 - Nk_1) + q_1 N(k_1 - k_2) + q_1(1 - k_2) + q_1^2 k_2 - N^2 k_1 \quad (3.70)$$

$$a_0 = -q_1 N \quad (3.71)$$

O caso em que o denominador de (3.65) se anula,

$$kE(k_2 - k_1) + 1 = 0 \quad (3.72)$$

só ocorre para particulares valores dos parâmetros, isto é,

$$(k_1 - k_2)(k_1 N - k_2 q_1) = k_1 + k_{-1} \quad (3.73)$$

sendo que para estes valores as equações (3.62), (3.63) e (3.64) acima levam a uma indeterminação do tipo $\left[\frac{0}{0}\right]$. Neste caso, é mais simples retornar às equações originais (3.58)-(3.61).

Utilizando as relações (3.72) e (3.73) obtemos:

$$Y^2 + Y \left[N - q_1 + k_3 + \frac{k_2^{-1}}{k_1 - k_2} \right] - q_1 k_3 = 0 \quad (3.74)$$

$$W = q_1 - Y \quad (3.75)$$

$$kC = N - q_1 + Y - \frac{1}{k_1 - k_2} \quad (3.76)$$

$$kE = \frac{1}{k_1 - k_2} \quad (3.77)$$

Portanto, a solução do conjunto de equações (3.58)-(3.61) está em geral dada pelas relações (3.62)-(3.64) e (3.66), exceto no caso em que os valores dos parâmetros satisfazem a relação (3.73), quando a solução é dada pelo conjunto de equações (3.74)-(3.75).

Vamos supor que a dependência das constantes cinéticas k_e , k_c , p e r com o potencial é a mesma dependência discutida no capítulo II. Por simplicidade vamos considerar também que as constantes k_2 , k_{-2} , k_3 e k_{-3} independem do potencial através da membrana, o que significa que não existe translação de cargas

associadas a proteína durante a transição conformacional ($\eta = 0$).

Podemos mostrar que a relação entre as constantes cinéticas originais (sem a transformação de escala), a qual será utilizada nos cálculos numéricos é dada por:

$$\frac{Kek_1k_2k_3}{Kok_{-1}k_{-2}k_{-3}} = \delta e^{\Delta u}$$

Nas figuras abaixo analisamos numericamente o comportamento do fluxo ϕ_x com a afinidade da reação de ATPase, o gradiente de concentração e o potencial elétrico. O fluxo ϕ_x é dado por

$$\phi_x = k_1XC.XE - k_{-1}XE^2$$

Os vários parâmetros utilizados nos gráficos estão especificados nas legendas, exceto: $n = z = 1$, $\tilde{s} = \tilde{q} = 0$, $\eta = 0$ e $\alpha = \nu = 0.5$, os quais são comuns a todos os gráficos. Novamente, estamos considerando que X'' , c_D e c_P são constantes. Portanto, a afinidade da reação de ATPase é controlada pela concentração de ATP (c_T) e o gradiente de concentração do íon x pela concentração X' (concentração do íon no meio interno).

Nas figuras 3.7 e 3.8 temos respectivamente o comportamento de ϕ_x por molécula bomba com a afinidade da reação de ATPase e com o gradiente de concentração do íon x através da membrana, para diferença de potencial nula.

Vemos que a introdução de cooperatividade segundo o modelo adaptado de Edelstein apresenta estados estacionários múltiplos. Como podemos facilmente verificar, todos os modelos discutidos anteriormente não possuem esta propriedade.

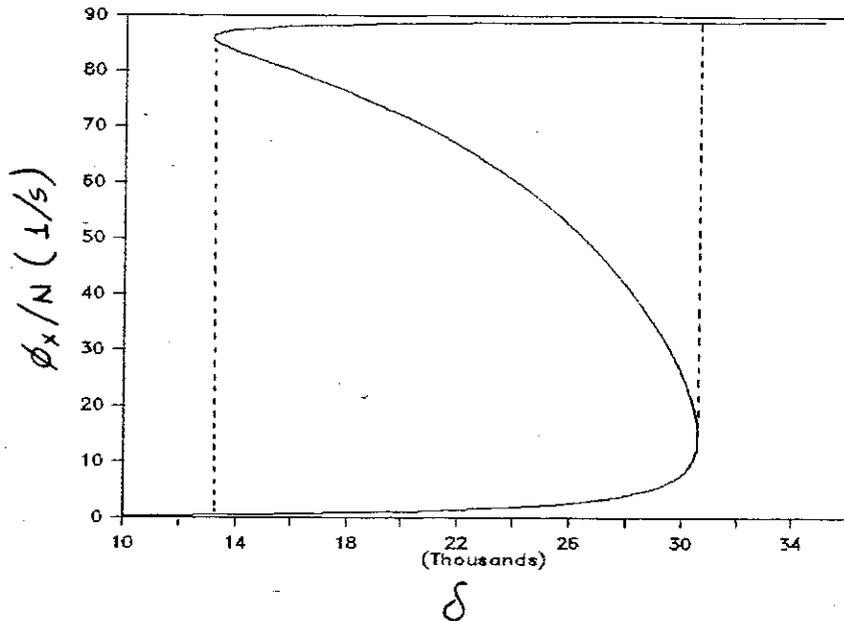


Figura 3.7: Fluxo de transporte por molécula bomba (ϕ_x/N), como função de $\delta \equiv \exp(-A/RT)$. Como estamos considerando c_D e c_T constantes, $\delta = \text{cte} \cdot c_T$. Neste gráfico consideramos $k_{-1}N = 80000$ 1/s, $k_2N = 320000$ 1/s, $k_{-2} = 1$ 1/s, $k_3 = 100$ 1/s, $k_{-3}N = 4000$ 1/s, $\frac{\tilde{K}c}{X''} = 1$, $\frac{\tilde{K}e}{X''} = 1$, $\Delta u = 0$, $X'/X'' = 1.5$, $q_1/N = 0.9$.

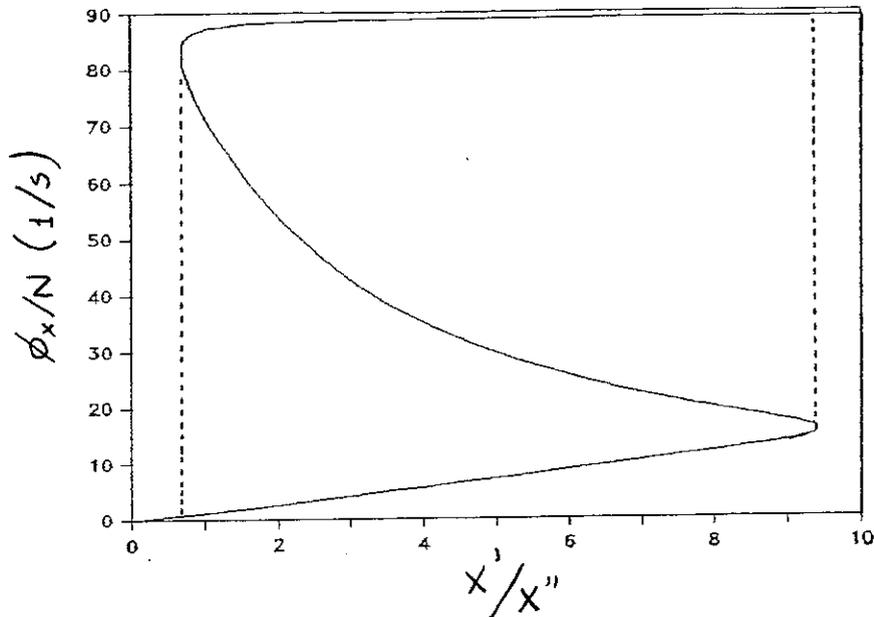


Figura 3.8: Fluxo de transporte por molécula bomba (ϕ_x/N), como função de $\frac{X'}{X''}$. Neste gráfico consideramos $k_{-1}N = 80000$ 1/s, $k_2N = 320000$ 1/s, $k_{-2} = 1$ 1/s, $k_3 = 100$ 1/s, $k_{-3}N = 4000$ 1/s, $\frac{\tilde{K}_c}{\tilde{X}''} = 1$, $\frac{\tilde{K}_e}{\tilde{X}''} = 1$, $\Delta\varphi = -12.5$ mV, $\delta = 20000$ e $q_1/N = 0.9$.

Na figura 3.9 temos o comportamento do fluxo em função da diferença de potencial através da membrana. Analogamente aos modelos cooperativos discutidos anteriormente, o decréscimo do fluxo de transporte para grandes diferenças de potencial ($\Delta u \rightarrow \infty$) é esperado já que neste limite N_{XE} é pequeno, e XE é o estado da bomba que cataliza a transição conformacional. Entretanto este decréscimo ocorre de forma abrupta.

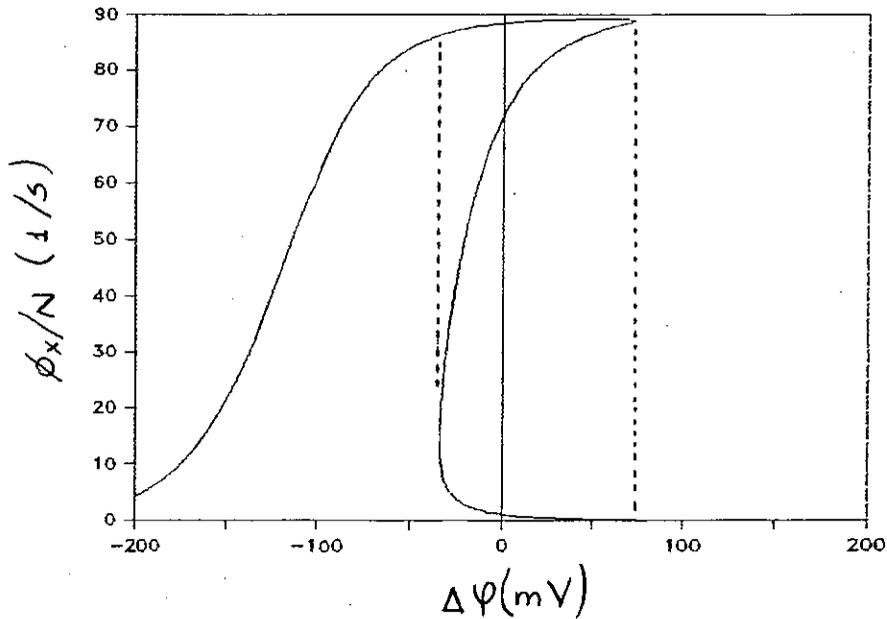


Figura 3.9: Fluxo de transporte por molécula bomba (ϕ_x/N), em função do potencial da membrana ($\Delta\varphi$). Neste gráfico consideramos $k_{-1}N = 800000$ 1/s, $k_2N = 3200000$ 1/s, $k_{-2} = 1$ 1/s, $k_3 = 100$ 1/s, $k_{-3}N = 4000$ 1/s, $\frac{\tilde{K}_c}{X''} = 1$, $\frac{\tilde{K}_e}{X''} = 1$, $\delta = 20000$, $X'/X'' = 1.5$, $q_1/N = 0.9$.

Destes três gráficos podemos concluir que os estados estacionários múltiplos existem apenas para determinados valores dos vários parâmetros do sistema de Transporte Ativo. Veremos abaixo que das três soluções obtidas nas regiões de estados estacionários múltiplos, a solução que leva ao fluxo de valor intermediário não é estável.

Análise de Estabilidade Linear:

De acordo com as figuras acima podemos verificar que neste modelo existe a possibilidade de três estados estacionários para um mesmo conjunto de parâmetros. Entretanto, é importante determinar quais destes estados estacionários são estáveis, pois apenas nestes estados estáveis é que o sistema pode permanecer indefinidamente enquanto forem mantidos os vínculos termodinâmicos.

Portanto, faremos agora a análise de estabilidade linear das soluções estacionárias obtidas para o modelo de transporte adaptado de Edelstein. Veremos que nem todas as soluções estacionárias obtidas são estáveis.

A análise de estabilidade linear consiste em verificar a evolução temporal do sistema para pequenas perturbações em torno do estado estacionário. As perturbações podem levar o sistema de volta ao estado estacionário (estado estacionário estável) ou para estados longe do estado estacionário (estado estacionário instável).

Perto do estado estacionário as equações podem ser linearizadas, e portanto as soluções são do tipo:

$$\begin{aligned}x &= x_0 + x' \\x &= Ae^{wt}\end{aligned}\tag{3.78}$$

Assim, o critério de estabilidade será dado por,

- i. $\text{Re } w > 0$ estado estacionário instável
- ii. $\text{Re } w < 0$ estado estacionário estável
- iii. $\text{Re } w = 0$ estado marginal (a análise linear não é suficiente para determinar a estabilidade deste estado).

Das equações (3.60) e (3.61) podemos obter W e XC em função de Y e XE ,

$$W = Q_1 - Y \quad (3.79)$$

$$XC = N - q_1 - XE + Y \quad (3.80)$$

Substituindo estas expressões em (3.58) e (3.59) e linearizando vem,

$$\frac{dXE'}{dt} = a_{11}XE' + a_{12}Y' \quad (3.81)$$

$$\frac{dY'}{dt} = a_{21}XE' + a_{22}Y' \quad (3.82)$$

onde,

$$a_{11} = Nk_2 - q_1k_1 + Y_0(k_1 - k_2) - 2XE_0(k_{-1} + k_1) \quad (3.83)$$

$$a_{21} = XE_0(k_1 - k_2) - 1 \quad (3.84)$$

$$a_{22} = Y_0(1 - k_2) \quad (3.85)$$

$$a_{12} = q_1 - N - 2Y_0 + XE_0(1 - k_2) - k_3 \quad (3.86)$$

onde XE_0 e Y_0 são as soluções do estado estacionário obtidos anteriormente do conjunto de equações (3.63) e (3.66).

Levando a dependência temporal das variáveis XE' e Y' , de acordo com a relação (3.78), nas equações (3.81) e (3.82) obtemos a equação secular para w :

$$\begin{vmatrix} a_{11} - w & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - w \end{vmatrix} = 0$$

ou,

$$w^2 - (a_{11} + a_{22})w + a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} = 0$$

$$w^2 + bw + c = 0$$

$$b = (1 - k_1)(N - q_1) + Y_0(k_2 - k_1 + 2) + \\ + XE_0(2k_{-1} + 2k_1 + k_2 - 1) + k_3$$

$$c = \left[Nk_2 - q_1k_1 + Y_0(k_1 - k_2) - 2XE_0(k_{-1} + k_1) \right] x \\ \left[q_1 - N - 2Y_0 + XE_0(1 - k_2) - k_3 \right] \\ - Y_0(1 - k_2) \left[XE_0(k_1 - k_2) - 1 \right]$$

onde Y_0 é dado pela relação (3.63) e XE_0 pela relação (3.66).

A análise numérica desta equação secular mostra que, na região de estados estacionários múltiplos, os estados estacionários estáveis são sempre aqueles que correspondem ao menor e ao maior valor dos três valores de fluxo obtidos nos gráficas acima. O valor intermediário do fluxo corresponde ao estado estacionário instável. Nas regiões onde existe apenas uma solução, o estado estacionário é sempre estável. Este resultado era esperado já que duas soluções estacionárias vizinhas não podem ser simultaneamente estáveis.

A análise dos gráficos 3.7, 3.8 e 3.9, combinada com a discussão acima sobre a estabilidade, nos leva a concluir que em quaisquer dos parâmetros considerados: δ , X'/X'' e $\Delta\varphi$, o sistema sofre transições abruptas (indicadas nas figuras) para determinados valores dos parâmetros. As figuras mostram ainda que existe o efeito de histerese, já que o valor em que ocorre a transição depende do caminho percorrido no espaço dos parâmetros. O efeito maior é observado no gráfico 3.9, onde existe uma transição abrupta, do tipo tudo ou nada, em função da variável $\Delta\varphi$. Além da histerese, segundo Katchalsky e Splanger [43], os estados estacionários múltiplos podem levar a oscilações.

Não existem dados na literatura identificando estes fenômenos nos sistemas de Transporte Ativo. Entretanto sabemos que em sistemas vivos existem vários fenômenos oscilatórios e diferentes regimes de transporte não totalmente compreendidos. Os resultados desta seção mostram que alguns destes fenômenos podem estar diretamente relacionados com o mecanismo da bomba de Transporte Ativo.

CONCLUSÕES

Neste trabalho analisamos as propriedades termodinâmicas e cinéticas do Transporte Ativo de duas classes de modelos de acesso alternado: modelos não cooperativos e modelos nos quais supomos a existência de cooperatividade nas transições conformacionais das proteínas.

Para isso introduzimos inicialmente os conceitos da afinidade da reação de ATPase e do gradiente de potencial eletroquímico, os quais representam as forças termodinâmicas em um sistema de Transporte Ativo.

Para analisar as propriedades dos modelos não cooperativos, supomos um modelo mínimo [14] para o acesso alternado a partir do qual encontramos os estados estacionários do fluxo de transporte e da taxa de hidrólise de ATP.

O modelo mínimo corresponde a um conjunto simplificado de reações, o qual acopla a reação de hidrólise de ATP à reação de transporte. Mostramos que as constantes cinéticas deste conjunto de reações podem depender da diferença de potencial através da membrana.

A partir da relação (2.40) podemos concluir que esta dependência sempre existe para o caso em que a bomba transporta carga líquida através da membrana. Entretanto, mostramos na seção II.2 que esta dependência pode também surgir devido a deslocamentos de cargas associados às proteínas durante a

transição conformacional. Em consequência da dependência das constantes cinéticas, os fluxos de Transporte Ativo também dependerão do potencial. O comportamento destes fluxos de Transporte Ativo em função do potencial está exemplificado na figura 2.3.

Os fluxos do Transporte Ativo dependem ainda do gradiente de concentração de íons através da membrana e da afinidade da reação de ATPase. As expressões (2.45)-(2.52) representam uma generalização dos resultados obtidos na literatura [14] sobre o modelo mínimo. Destas expressões podemos deduzir o Transporte Ativo de um único íon, o cotransporte de dois íons em sentidos opostos, assim como, desprezando a fonte de ATP, o Transporte Ativo de um íon induzido pelo potencial eletroquímico de outro íon.

As expressões obtidas para os fluxos, no caso em que a proteína transporta apenas um tipo de íon, permitem mostrar que a dependência destes fluxos em função da concentração de íons no meio interno ou no meio externo, apresenta um comportamento Michaeliano. O mesmo comportamento é encontrado para os fluxos em função da concentração de ATP. Estes resultados mostram a similaridade deste processo com os processos enzimáticos usuais.

Das expressões para os fluxos, obtidas na seção II.3, podemos concluir que somente no caso de estados estacionários próximos do equilíbrio, os fluxos de Transporte Ativo são funções apenas das forças termodinâmicas. Contrariamente ao que se considera na literatura [14], em geral, os fluxos de Transporte Ativo dependem do potencial e das concentrações separadamente, conforme a discussão nas seções II.3 e II.4.1. A figura 2.6 demonstra claramente este tipo de dependência.

Em consequência deste tipo de dependência dos fluxos de Transporte Ativo com as forças termodinâmicas, mostramos que estes fluxos dependem também da densidade superficial de cargas da membrana. Esta dependência surge porque as cargas da membrana modificam o perfil de potencial e de concentrações de íons na região próxima à superfície da membrana, onde estão localizadas as proteínas transportadoras. Este efeito em geral não é considerado na literatura [1,29], onde é usada a diferença de potencial entre as fases longe da superfície da membrana.

Segundo o modelo teórico (desenvolvido no apêndice-B e na seção II.4.2) utilizado para o cálculo do perfil de potencial nas proximidades da membrana, podemos concluir que, em condições fisiológicas, os fluxos de transporte dependem de forma significativa da densidade superficial de cargas na membrana. Este resultado está exemplificado na figura 2.9.

No capítulo III analisamos as propriedades cinéticas de modelos de Transporte Ativo cooperativos. O tipo de cooperatividade suposto neste trabalho corresponde a uma interação autocatalítica durante as transições conformacionais das proteínas. Neste capítulo analisamos 3 modelos cooperativos.

O modelo cooperativo mínimo e o modelo adaptado de Lotka são capazes de explicar algumas propriedades dos sistemas de Transporte Ativo, verificadas experimentalmente.

O modelo cooperativo mínimo apresenta o comportamento sigmoidal verificado experimentalmente para as curvas (fluxo x substrato) [36]. Este resultado pode ser verificado nas figuras 3.1 e 3.2.

O modelo adaptado de Lotka também apresenta a forma

sigmoideal das curvas (fluxo x substrato). Além disso, estas curvas apresentam um máximo, como podemos verificar nas figuras 3.4 e 3.5. Este resultado corresponde a uma inibição por substrato, o qual também é coerente com os resultados experimentais [36,42].

No capítulo III mostramos também a possibilidade de adaptarmos ao nosso esquema de reações de transporte, um modelo cinético que leva ao aparecimento de algum tipo de estrutura dissipativa.

A análise numérica das propriedades cinéticas do modelo adaptado de Edelstein mostra a existência de estados estacionários múltiplos para determinados valores de potencial, concentrações e afinidade da reação de ATPase. Apresentamos esse resultado nas figuras 3.7, 3.8 e 3.9, para uma escolha particular dos parâmetros.

Uma análise numérica sistemática do comportamento do fluxo com os parâmetros, nos levaria a estabelecer as regiões (no espaço de parâmetros) onde é possível a existência destes estados estacionários múltiplos. Este estudo seria uma extensão natural do nosso trabalho.

A existência de estados estacionários múltiplos possibilita os sistemas físicos a apresentarem determinadas propriedades características, tais como fenômenos de histerese, transições tudo-ou-nada ou oscilações [28,43]. Embora não se encontre na literatura nenhuma evidência da existência de estados estacionários múltiplos para sistemas de Transporte Ativo, o modelo discutido acima poderia explicar um possível mecanismo de regulação nas condições fisiológicas.

APÊNDICE A

EFEITOS DO POTENCIAL SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS

Neste apêndice analisaremos a dependência das constantes cinéticas com a diferença de potencial elétrico através da membrana. Esta análise está baseada nos trabalhos de Läuger [14,29].

De acordo com o modelo mínimo definido na seção II.1 o íon transportado pela proteína deve alcançar o sítio de ligação através de um canal de acesso com profundidade α_x , como indica a figura 2.1. Da hipótese 2 da seção II.1, K_c e K_e representam as constantes de equilíbrio da reação dos íons com o sítio de ligação.

Segundo Mitchel e Moyle (1974) [44] o sítio de ligação atua como um "poço iônico". Segundo este conceito, uma mudança na diferença de potencial elétrico entre o sítio de ligação e o meio externo ao canal tem um efeito similar a uma mudança na concentração externa sobre a ocupação do sítio de ligação. Para uma diferença de potencial entre o sítio e o meio externo igual a $\alpha\Delta\psi$, a constante de equilíbrio deve ser modificada pelo fator de Boltzman: $\exp[F\alpha\Delta\psi/RT]$, no caso de ligação de 1 íon.

Por simplicidade podemos supor que o potencial varia linearmente entre as entradas dos canais da proteína. O parâmetro α_x na figura 2.1 representa a fração da espessura da proteína

correspondente a profundidade do canal. Consequentemente se existe uma diferença de potencial $\Delta\psi$ entre as entradas dos canais, $\alpha_x \Delta\psi$ corresponde a diferença de potencial entre o sítio de ligação e o meio externo ao canal.

Portanto na situação mais geral em que existe a ligação de n íons x com carga z_x e a liberação de m íons y com carga z_y , podemos obter a dependência das constantes de equilíbrio com o potencial:

$$Kc = \tilde{K}c e^{-\alpha \Delta u} \quad (A.1)$$

$$Ke = \tilde{K}e e^{\gamma \Delta u} \quad (A.2)$$

onde

$$\alpha \equiv nz_x \alpha_x - mz_y \alpha_y \quad (A.3)$$

$$\gamma \equiv nz_x \gamma_x - mz_y \gamma_y \quad (A.4)$$

onde

($0 \leq \alpha_x \leq 1$) mede a profundidade relativa do sítio ligante de x no interior da proteína, quando a bomba está nos estados XC/C .

($0 \leq \alpha_y \leq 1$) tem definição análoga. Por exemplo, se $\alpha_x = \frac{1}{2}$ o sítio de ligação de x está no centro da proteína.

($0 \leq \gamma_x, \gamma_y \leq 1$) tem definições análogas à α_x e α_y respectivamente, para a bomba nos estados XE/E .

$\tilde{K}c$ e $\tilde{K}e$ são os valores das constantes de equilíbrio para potencial elétrico nulo, z_x e z_y são as cargas dos íons x e y respectivamente. No caso em que a proteína transporta apenas um íon, estes parâmetros geométricos, α_x e γ_x , estão indicados na figura 2.1.

A transição conformacional pode levar a deslocamentos de grupos de cargas ou rotações de dipolos associados à proteína.

Durante a transição conformacional os sítios de ligação podem também sofrer um deslocamento o que leva a um movimento de cargas adicional, correspondente ao movimento dos íons transportados.

Todos esses movimentos de cargas levam a uma mudança ΔU na energia conformacional da proteína durante a transição conformacional.

Podemos supor que durante a transição conformacional uma carga q_i , associada à proteína, tenha um deslocamento Δx_i na direção do campo externo. Podemos supor também que os sítios de ligação para os íons x e y tenham um deslocamento Δx_x e Δx_y na mesma direção, respectivamente. Com estas definições, a diferença de energia conformacional quando os sítios de ligação para o íon x estão ocupados (ΔU_x), é dada por:

$$\Delta U_x = \left[\eta + n z_x \theta_x \right] F \Delta \psi$$

$$\text{com } \eta \equiv \sum \frac{q_i \Delta x_i}{e_0 d} \quad \text{e } \theta_x = \frac{\Delta x_x}{d} \quad (\text{A.5})$$

onde e_0 é a carga elementar e d é a distância entre as entradas dos canais da proteína (figura 2.1), a qual em geral pode ser maior que a espessura da membrana [11,29].

De acordo com a teoria de taxas [45], supondo uma barreira de energia conformacional simétrica, as constantes cinéticas tem a seguinte dependência com ΔU :

$$k = \tilde{k} e^{-\frac{\Delta U}{2RT}} \quad (\text{A.6})$$

Portanto levando em conta os deslocamentos de cargas durante

a transição conformacional, obtemos para as demais constantes cinéticas:

$$p = \tilde{p} e^{(\eta + nz_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad q = \tilde{q} e^{(\eta + nz_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad (A.7)$$

$$r = \tilde{r} e^{-(\eta + nz_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad s = \tilde{s} e^{-(\eta + nz_x \theta_x) \frac{\Delta u}{2}} \quad (A.8)$$

$$k_{ce} = \tilde{k}_{ce} e^{(\eta + mz_y \theta_y) \frac{\Delta u}{2}} \quad (A.9)$$

$$k_{ec} = \tilde{k}_{ec} e^{-(\eta + mz_y \theta_y) \frac{\Delta u}{2}} \quad (A.10)$$

onde

$$\theta_x \equiv 1 - \alpha_x - \nu_x \quad (A.11)$$

$$\theta_y \equiv 1 - \alpha_y - \nu_y \quad (A.12)$$

onde

$(-1 \leq \theta_x \leq 1)$ dá o deslocamento do sítio de ligação de x na direção do campo elétrico (direção perpendicular à membrana) durante a transição conformacional. $(-1 \leq \theta_y \leq 1)$ tem interpretação análoga.

APÊNDICE B

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE POTENCIAL ATRAVÉS DE UMA MEMBRANA BIOLÓGICA:

O perfil de potencial elétrico através da membrana normalmente é descrito pela teoria de Gouy-Chapman [45,46]. Nesta teoria se supõe que as cargas estão uniformemente distribuídas na superfície da membrana e que a constante dielétrica varia abruptamente na interface entre a membrana e a fase aquosa.

Das equações de Maxwell na aproximação eletrostática podemos obter a equação de Poisson, a qual deve ser resolvida para cada fase da solução na figura 2.7 com as condições de contorno de interface entre dois meios diferentes:

$$\nabla^2 \varphi = - \frac{\rho}{\epsilon} \quad \epsilon = \kappa \epsilon_0 \quad (B.1)$$

com as condições de contorno:

$$z \rightarrow -\infty \quad \left\{ \begin{array}{l} \varphi_1 = \varphi_{01} \\ \mathbf{c}^i = \mathbf{c}_{01}^i \end{array} \right. \quad (B.2)$$

$$z \rightarrow -\frac{h}{2} \quad \left\{ \begin{array}{l} \varphi_1 = \varphi_m = \varphi_{1s} \\ (\epsilon_m \vec{E}_m - \epsilon_1 \vec{E}_1) \cdot \vec{n} = \sigma_1 \end{array} \right. \quad (B.3)$$

$$z \rightarrow +\infty \quad \left\{ \begin{array}{l} \varphi_2 = \varphi_{02} \\ \mathbf{c}^i = \mathbf{c}_{02}^i \end{array} \right. \quad (B.4)$$

$$z \rightarrow + \frac{h}{2} \left\{ \begin{array}{l} \varphi_2 = \varphi_m = \varphi_{2s} \\ (\epsilon_2 \vec{E}_2 - \epsilon_m \vec{E}_m) \cdot \vec{n} = \sigma_2 \end{array} \right. \quad (B.5)$$

onde os subíndices 1, m e 2 indicam as fases da figura 2.7, c^i indica a concentração do ion i , ρ é a densidade de carga local, σ é densidade superficial de cargas da membrana, ϵ_0 é a constante de permissividade elétrica do vácuo e κ é a constante dielétrica do material, no caso, a membrana ou a fase aquosa ($\kappa_{\text{água}} \cong 80$ e $\kappa_{\text{memb.}} \cong 2$).

Devemos ainda usar a condição de eletroneutralidade em cada fase da solução. Por simplicidade suporemos a existência de apenas 2 ions x e w com cargas 1 e -1 respectivamente. Assim,

$$X_{0\alpha} = W_{0\alpha} \quad \alpha = 1, 2 \quad (B.6)$$

e

$$\rho_\alpha = F(X_\alpha - W_\alpha) \quad (B.7)$$

onde X e W são as concentrações molares dos ions x e w respectivamente, e α indica a fase.

Supondo que cada fase está em equilíbrio eletroquímico obtemos

$$X = X_{0\alpha} e^{u_{0\alpha} - u_\alpha} \quad \alpha = 1, 2 \quad (B.8)$$

$$W = W_{0\alpha} e^{u_\alpha - u_{0\alpha}} \quad (B.9)$$

onde $u \equiv \frac{F\varphi}{RT}$. Logo,

$$\rho_\alpha = 2FX_{0\alpha} \sinh(u_\alpha - u_{0\alpha}) \quad (B.10)$$

Supondo que as variáveis são constantes no plano da membrana, a equação de Poisson, com a relação (B.10), fica

$$\frac{d^2 u_\alpha}{dz^2} = k_\alpha^2 \sinh u_\alpha \quad (\text{B.11})$$

onde

$$k_\alpha^2 = \frac{2F^2}{\varepsilon_\alpha RT} X_{0\alpha} \quad (\text{B.12})$$

onde k_α é o inverso do comprimento de Debye para a fase α .

A equação (B.11) pode ser resolvida exatamente:

$$\begin{aligned} \operatorname{tgh} \frac{1}{4}(u_\alpha - u_{0\alpha}) &= \operatorname{tgh} \frac{1}{4}(u_{s\alpha} - u_{0\alpha}) e^{k_\alpha \left(\frac{h}{2} \pm z\right)} \\ &(+ \text{ se } \alpha = 1 \quad \text{e} \quad - \text{ se } \alpha = 2) \end{aligned} \quad (\text{B.13})$$

Devido à baixa constante dielétrica da membrana, podemos supor que não existem cargas no seu interior, e portanto o potencial dentro da membrana é linear

$$\varphi_m = \frac{1}{h}(\varphi_{2s} - \varphi_{1s})z + \frac{1}{2}(\varphi_{2s} + \varphi_{1s}) \quad (\text{B.14})$$

Os potenciais de superfície serão obtidos pelas condições de contorno (B.3) e (B.5):

$$2k_1 \varepsilon_1 \sinh \frac{1}{2}(u_{1s} - u_{10}) = \frac{\varepsilon_m}{h} (u_{2s} - u_{1s}) + \frac{F\sigma_1}{RT} \quad (\text{B.15})$$

$$2k_2 \varepsilon_2 \sinh \frac{1}{2}(u_{2s} - u_{20}) = -\frac{\varepsilon_m}{h} (u_{2s} - u_{1s}) + \frac{F\sigma_2}{RT} \quad (\text{B.16})$$

Temos portanto, um sistema de equações transcendentais que pode ser resolvido numericamente. Entretanto, analisando numericamente este sistema de equações para $X_{01} = X_{02} = 0.1 \text{ M}$, podemos concluir que a espessura da membrana ($h \cong 40 \text{ \AA}$) é suficientemente grande para que possamos resolver este sistema no limite $h \rightarrow \infty$ (com erro no potencial de superfície $\leq .5\%$). Assim,

$$\varphi_{\alpha s} = \varphi_{0\alpha} + \frac{2RT}{F} \ln \left[\frac{\sigma_\alpha}{\sigma_{0\alpha}} + \sqrt{\left[\frac{\sigma_\alpha}{\sigma_{0\alpha}} \right]^2 + 1} \right] \quad (\text{B.17})$$

$$\sigma_{0\alpha} = \sqrt{8k\epsilon_0 RTX_{0\alpha}} \quad (B.18)$$

Valores típicos encontrados na literatura para a densidade de carga superficial e para as concentrações de íons são [35,36]:

$$\sigma \cong -0.05 \text{ ou } -0.27 \text{ C/m}^2$$

$$X_0 \cong 0.1 \text{ M}$$

Nas figuras (B1) e (B2) abaixo temos os perfis de potencial para os dois valores de densidade de carga superficial acima para $\varphi_{01} = 0$ e $\varphi_{02} = 0$ ou 100 mV. Em todos os casos consideramos $\sigma_1 = \sigma_2$.

Na figura (B3) temos os perfis de concentração para cátion e ânions segundo a hipótese de equilíbrio eletroquímico em cada fase, relações (B.8) e (B.9).

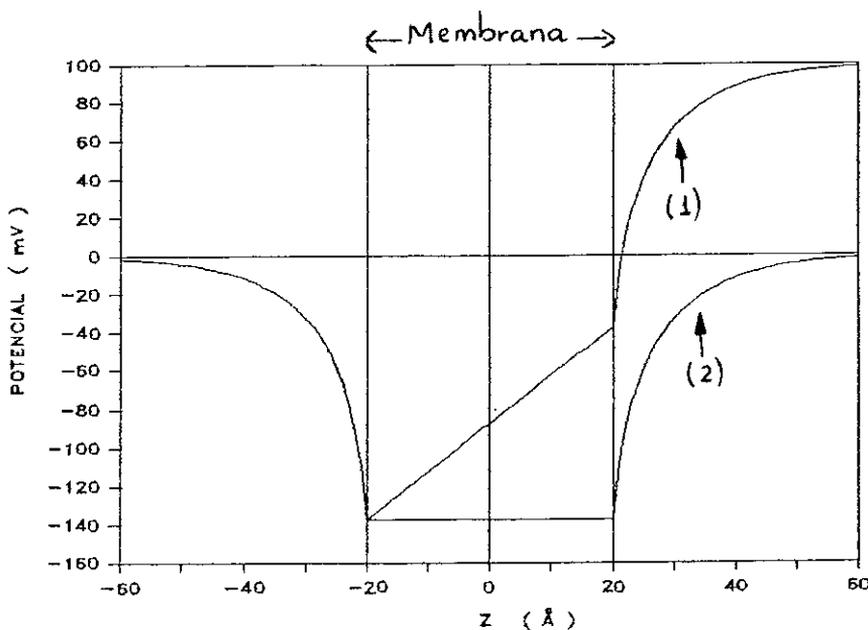


Figura B1: Perfil de potencial elétrico através da membrana segundo a teoria de Gouy-Chapman.

Perfil (1): $\varphi_{01} = 0$ mV e $\varphi_{02} = 100$ mV

Perfil (2): $\varphi_{01} = \varphi_{02} = 0$ mV

Para ambos os gráficos utilizamos uma densidade de carga superficial $\sigma_1 = \sigma_2 = -0.27 \text{ C/m}^2$ e $X_{01} = X_{02} = 0.1 \text{ M}$.

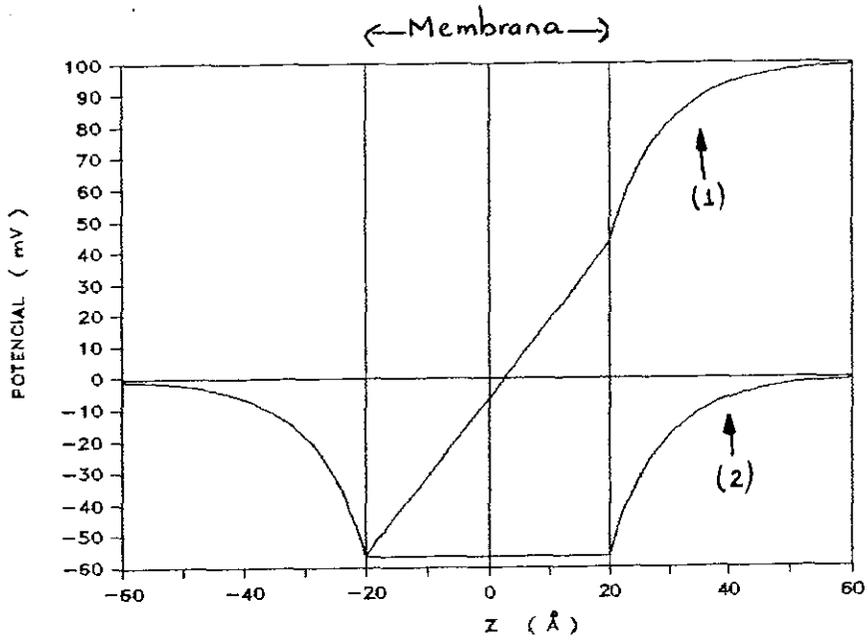


Figura B2: Gráficos análogos aos da figura anterior, para uma densidade de carga superficial $\sigma_1 = \sigma_2 = -0.05 \text{ C/m}^2$.

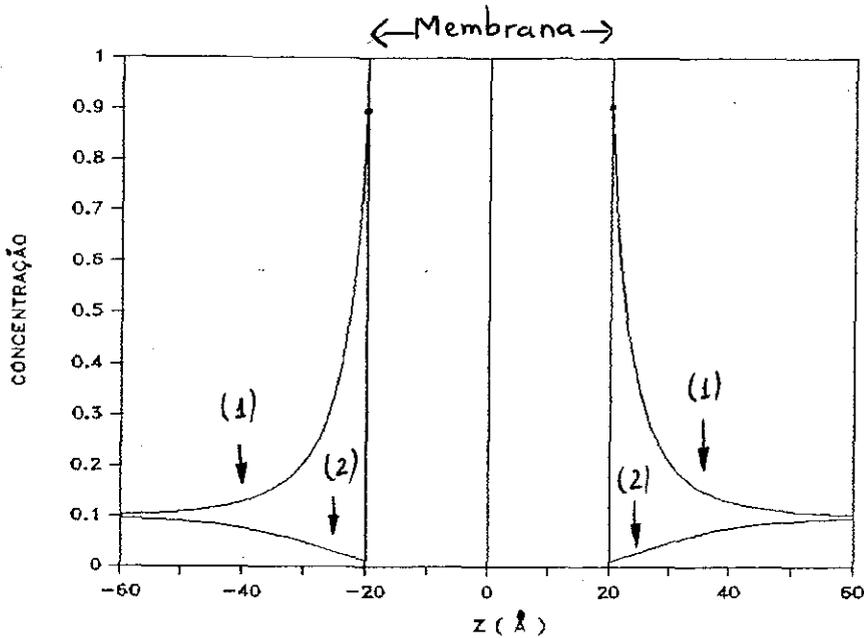


Figura E3: Perfil de concentração para cátions (1) e ânions (2) segundo as relações (b.8) e (b.9), para o perfil de potencial da figura E2, isto é, quando a carga superficial $\sigma_1 = \sigma_2 = -0.05 \text{ C/m}^2$. Note que o perfil de concentração é o mesmo para qualquer ψ_{02} .

Nas figuras acima, os potenciais e concentrações de superfície são dados por:

i) $\sigma_1 = \sigma_2 = -0.27 \text{ C/m}^2 \rightarrow \psi_{1s} = -137 \text{ mV}$

ii) $\sigma_1 = \sigma_2 = -0.05 \text{ C/m}^2 \rightarrow \psi_{1s} = -56 \text{ mV}, X_0 = 0.9 \text{ M}$ e
 $W_0 = 0.01 \text{ M}$

REFERÊNCIAS

- [1] - Tanford, C., *Ann. Rev. Biochem.*, Vol. 52, pp. 379-409 (1983)
- [2] - Stoeckenius, W., *Scientific American*, pp. 38-46, jun.(1976)
- [3] - Christensen, H., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 779, pp. 255-269 (1984)
- [4] - Tonomura, Y., *Energy Transducing ATPases - Struct. and Kinetics*, Cambridge Univ. Press (1986)
- [5] - Nicholls, D.G., *Bioenergetics - An Introduc. to the Chemiosmotic Theory*, Academic Press (1982)
- [6] - Miller, K.R., *Scientific American*, pp. 102-109 Oct.(1979)
- [7] - Hinkle, P.C., McCarty, R.E., *Scientific American*, pp. 104-123 Mar. (1978)
- [8] - Fillingame, R.H., *Ann. Rev. Biochem.*, Vol. 49, pp. 1079-1113 (1980)
- [9] - Hoffmann, E.K., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 864, pp. 1-31 (1986)
- [10] - Horak, J., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 864, pp. 223-256 (1986)
- [11] - Serrano, R., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 947, pp. 1-28 (1988)
- [12] - Jenks, W.P., *Adv. in Enzimology*, Vol. 51, pp. 75-106 (1980)
- [13] - Gradmann, D., Klieber, H.G., Hansen, U.P., *Biophys. J.*, Vol. 51, pp. 569-585 (1987)
- [14] - Lauger, P., *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 779, pp. 307-341 (1984)
- [15] - Paterson, R., em *Membranes and ions Transport - Vol 1* (ed. Bittak, E.E.), Willey & Interscience (1970)
- [16] - Mitchel, P., em *Membranes and ions Transport - Vol 1* (ed. Bittak, E.E.), Willey & Interscience (1970)
- [17] - Dragomir, C.T., *J. Theor. Biol.*, Vol. 31, pp. 453-468 (1971)
- [18] - Nagle, J.F., Mille, M., *J. Chem. Phys.*, Vol. 74, pp. 1367-1372 (1981)

- [19] - Nagle, J.F., Morowitz, H.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, pp. 298-302 (1978)
- [20] - Nagle, J.F., Mille, M., J. Chem. Phys., Vol. 72, pp. 3959-3971 (1980)
- [21] - Jardetzky, O., Nature, Vol. 211, pp. 969-970 (1966)
- [22] - Stein, W.D., Transport and Diffusion Across Cell Membranes, pp. 475-612, Acad. Press (1986)
- [23] - Tsuji, K, Müller, S.C., Hess, B., Eur. Biophys. J., Vol. 15, pp. 329-337 (1988)
- [24] - Tsuji, K., Hess, B., Eur. Biophys. J., Vol. 13, pp. 273-280 (1986)
- [25] - Holz, M., Lindau, M., Heyn, M.P., Biophys. J., Vol. 53, pp. 623-633 (1988)
- [26] - Pacault, A., Hanusse, P., De Kepper, P., Vidal, C., Boissonade, J., Acc. of Chem. Research, Vol. 9, pp. 438-445 (1976)
- [27] - Lehninger, A.L., Biochemistry, Worth Publishers, inc. (1970)
- [28] - Nicolis, G., Prigogine, I., Self-Organization in Nonequilibrium Systems, Willey-Interscience (1977)
- [29] - Läuger, P., Appel, H.J., Eur. Biophys. J., Vol. 13, pp. 309-321 (1986)
- [30] - Glasstone, S., Laidler, K.J., Eyring, H., The Theory of the Rate Processes, MacGraw-Hill, (1941)
- [31] - Hammes, G.G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 79, pp. 6881-6884 (1982)
- [32] - Taylor, K.A., Dux, L., Martonosi, A., J. Molecular Biology, Vol. 187, pp. 417-427 (1986)
- [33] - Unwin, N., Henderson, R., Scientific American, pp. 78-94 Feb. (1984)
- [34] - Läuger, P., em Membranes and Communication Intercelulaire (ed. Balian, R., Chabre, M., Devaux, P.F.), North Holland, (1979)
- [35] - Neumcke, B., em Membranes and Communication Intercelulaire (ed. Balian, R., Chabre, M., Devaux, P.F.), North Holland, (1979)
- [36] - Bowman, B.J., J. of Biological Chem., Vol. 258, pp. 13002-007 (1983)
- [37] - Klingenberg, M., Nature, Vol. 290, pp. 449-454 (1981)

- [38] - Changeux, J.P., Thiery, J., Tung, Y., Kittel, C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 57, pp. 335-341 (1967)
- [39] - Glansdorff, P., Prigogine, I., Structure Stabilité et Flutuations, Masson et Cie, (1971)
- [40] - Alberts, B., et all, Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing (1983)
- [41] - Edelstein, B.B., J. Theor. Biol., Vol. 29, pp. 57-62 (1970)
- [42] - Tanford, C., Biophys. J., Vol. 47, pp. 15-20 (1985)
- [43] - Katchalsky, A., Spangler, R., Quarterly Rev. of Biophys., Vol. 1, pp. 127-175 (1968)
- [44] - Mitchel, P., Moyle, J., Biochem. Soc. Spec. Publ., Vol. 4, pp.91-111 (1974)
- [45] - MacLaughlin, S., Curr. topics in Memb. and Transport, Vol. 9, pp. 71-144 (1977)
- [46] - Honig, B.H., Hubbell, W.L., Flewelling, R.F., Ann. Rev. Biophys. Biophys Chem., Vol. 15, pp. 163-193 (1986)

“PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS E CINÉTICAS DO
TRANSPORTE ATIVO EM BIOMEMBRANAS: EFEITOS DE
COOPERATIVIDADE”

GILBERTO WEISSMÜLLER

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

Paulo Mascarello Bisch - Presidente

Héctor Barrabin

Constantino Tsallis

George Besmki - Suplente

Rio de Janeiro, 01 de fevereiro de 1989