

Odivaldo Cambraia Alves

**Equilíbrio Conformacional em Nitrosil
Hemoproteínas Desnaturadas.**

Tese de Doutorado

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro

Agosto de 1996

Para Isabel, Diego e Pedro

Agradecimentos

- À Eliane Wajnberg, pela dedicação e confiança.
- Aos funcionários do CBPF: Geraldo, Eduardo, Alexandre, Cesar, Henrique, Ivanildo, Betânia, Geilson, Marcelo, Vera, Denise e Myriam, pela apoio técnico, administrativo ou burocrático.
- A Sonia Regina de Sá, pelas sugestões na redação.
- Aos amigos Flavio, Marcia, Helio, Francisco, Marcos, Armando, Luis, Carlos, Cristiane, Roberto, Vitor, Francisco (in memorian), Lea, Mioco, Marcello, Ana, Sebastião, Claudio, Marcello, José Luiz, Alvaro, Acácio, Ladário, Pedro, Wagner, Bartolomeu, Sonia, Lucas, Bernadete, Roberto, Selma, Katia, Fatima, Martha, Alfredo, Luci e Fernando pelas sugestões de programas, utilização de micros, empréstimo de dinheiro, sugestões didáticas, etc.
- Aos meus pais e irmãos que mesmo à distância sempre me apoiaram.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo

Os espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de nitrosil hemoglobina (NOHb) e mioglobina (NOMb) em diferentes condições (nativa, desnaturada e liofilizada), e de hematina-NO foram obtidos no intervalo de temperatura de 80-280 K. Acima de 150 K observa-se um decréscimo inesperado das áreas dos espectros das amostras de hemoglobina. Este resultado sugere a existência de um equilíbrio térmico entre dois estados conformacionais, dos quais somente um é observado por RPE. Os parâmetros termodinâmicos para os estados hexa e penta-coordenados são determinados.

A dependência com a temperatura da taxa de relaxação spin-rede para NOHb e NOMb desnaturada, NOHb liofilizada e hematina-NO foi determinada entre 4 K e 70 K. Os resultados podem ser descritos pelos modelos T^n e $e^{-\Delta/T}$. No primeiro o processo de relaxação é mediado por modos de tunelamento de um sistema de dois níveis. Observou-se uma correlação entre os valores de n e o estado funcional da proteína. A coincidência dos níveis excitados de baixa energia, Δ , com a faixa de temperatura onde ocorre mudanças espectrais reforça a hipótese de equilíbrio conformacional. Os resultados evidenciam a importância da presença e estrutura da globina para a relaxação.

Experiências de fotodissociação de NOHb desnaturada foram realizadas a temperaturas abaixo de 26 K. As curvas de cinética normalizadas foram ajustadas com os modelos de exponencial dupla, de subestados conformacionais e fractal. Os parâmetros destes modelos estão diretamente relacionados com a estrutura da proteína. O modelo de exponencial dupla supõe a existência de duas populações de ligantes, com diferentes taxa de recombinação. As alterações da globina cau-

sadas pela desnaturação afetam principalmente o processo de ligação mais lento, não sendo importantes para para o processo de ligação rápido. Os valores do fator pré-exponencial e da energia do pico da função distribuição do modelo de subestados conformacionais indicam, respectivamente, um aumento de entropia e diminuição da mobilidade das amostras desnaturadas em relação às amostras nativas, causados pelo rompimento da estrutura proteica. Os parâmetros obtidos para o modelo fractal reforçam a hipótese que a flexibilidade da cadeia proteica é importante para o funcionamento da proteína.

Abstract

The Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectra of nitrosyl hemoglobin (HbNO) and myoglobin (MbNO) in different conditions (native, denatured and lyophilized), as well as of hematin-NO were obtained in the temperature range of 80-280 K. There is a substantial and reversible decrease of the areas of the EPR spectra of all the hemoglobin samples above 150 K. The interpretation of the results implies the existence of two conformational states in thermal equilibrium, only one of which is EPR detectable. Thermodynamical parameters are determined for the hexa- and penta-coordinated cases.

The temperature dependence of the spin-lattice relaxation (SLR) of denatured HbNO, denatured MbNO, powdered HbNO and hematin-NO was studied between 4K and 70K. The results were fitted with both T^n and $e^{-\Delta/T}$ models. In the first one the relaxation is mediated by tunneling modes of a two level system. A correlation between the n values and the functional state of the protein was observed. The striking coincidence of the range of the low lying energy level, Δ , and the temperature range where EPR spectra change strenghts the hypothesis of conformational equilibrium. The importance of the presence and structure of the globin is revealed in the difference between relaxation parameters of native, denatured proteins and hematin.

Photolysis of denatured HbNO were performed at temperatures below 26K. The normalized kinetic curves were fitted using either two exponentials or a conformational substate energy distribution or a fractal model. The parameters are related to the protein structure. The two exponentials model assumes the existence of two fractions of photolysed molecules that rebind with slow and fast reaction rates. Only

the slow reaction rate is sensitive to the denaturation process. The pre-exponential factor and the peak energy of the substate distribution values suggest an increase in the entropy and a decrease of the flexibility in the denatured samples, respectively. The fractal model parameters strengthened the functional relevance of the flexibility of the protein chain.

Índice

Resumo	iii
Abstract	v
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xiv
Introdução	16
1 Nitrosil Hemoproteínas	19
1.1 Caraterísticas químicas do óxido nítrico	20
1.2 Mecanismo de ligação de nitrosil hemoproteínas	22
1.3 Ressonância paramagnética eletrônica de nitrosil hemoproteínas	23
1.3.1 Nitrosil mioglobina	23
1.3.2 Nitrosil hemoglobina	26
1.3.3 Transição R-T em NOHb	29
1.3.4 Desnaturação de NOHb	30
1.4 Estrutura eletrônica de NOHb	33
2 Relaxação Spin-rede em Hemoproteínas	36
2.1 Mecanismos de relaxação spin-rede	38
2.1.1 Processo direto	38
2.1.2 Processo Raman	39
2.1.3 Processo Orbach	41

2.1.4	Relaxação cruzada	42
2.1.5	Engarrafamento de fónons	44
2.1.6	Sistemas com Estados de Tunelamento Localizado (ETL)	45
2.2	Mecanismos de relaxação spin-rede em hemoproteínas	47
2.2.1	Hemoproteínas férricas	47
2.2.2	Nitrosil hemoproteínas	49
3	Dinâmica de Hemoproteínas	52
3.1	Cinética das reações químicas	52
3.1.1	Reações de primeira ordem	53
3.1.2	Reações de segunda ordem	54
3.2	Transições de Arrhenius e efeito tunel	55
3.3	Fotodissociação em hemoproteínas	57
3.3.1	Carboxihemoproteínas e oxihemoproteínas	58
3.4	Modelos para dinâmica de hemoproteínas	59
3.4.1	Modelo de soma de exponenciais	59
3.4.2	Modelo de Subestados Conformacionais	60
3.5	Nitrosil hemoproteínas	63
3.5.1	Modelo de soma de exponenciais	66
3.5.2	Modelo de subestados conformacionais	70
4	Estrutura Fractal de Hemoproteínas	72
4.1	Fractal	72
4.2	Exemplos da estrutura fractal de proteínas	74
4.2.1	Relaxação Spin-rede	74
4.2.2	Capacidade Calorífica	77
4.2.3	Raios-X	78
4.2.4	Dinâmica de hemoproteínas	79
4.3	Modelos microscópicos para a estrutura fractal	82
4.3.1	Modelo hierárquico	82
4.3.2	Modelo da difusão de defeitos	82

5	Procedimentos Experimentais	83
5.1	Preparação de amostras	83
5.2	Medidas de RPE	85
5.3	Relaxação spin-rede	85
5.4	Fotodissociação	87
6	Resultados	88
6.1	RPE de NOHb e NOMB desnaturadas, pó de NOHb e NO-hematina	88
6.2	Intensidade do sinal de RPE a temperaturas maiores que 80K	91
6.3	Relaxação spin-rede	95
6.4	Fotodissociação de NOHb desnaturada	98
6.4.1	Modelo de exponencial simples	100
6.4.2	Modelo de exponencial dupla	102
6.4.3	Modelo de subestados conformacionais	104
6.4.4	Modelo Fractal	107
7	Discussão dos Resultados	109
7.1	Dependência do sinal de RPE com a temperatura	109
7.2	Relaxação spin-rede	111
7.3	Fotodissociação	115
	Conclusões	123
	Bibliografia	127

Lista de Figuras

1.1	Níveis de energia dos orbitais moleculares do NO (a) e O ₂ (b).	21
1.2	Dependência com a temperatura dos espectros de RPE de NOMb equina [13].	24
1.3	Dependência com a temperatura dos espectros de RPE de pó de NOMb de baleia [14].	25
1.4	Amplitude do sinal de RPE em função do inverso da temperatura de NOMb de <i>Aplysia brasiliiana</i> . Adaptado de [15]	25
1.5	Espectros de RPE de NOMb equina em função da concentração do gás NO [12].	26
1.6	Espectros de RPE de várias nitrosil hemoproteínas a temperatura ambiente (a) e 77K (b) [16].	27
1.7	Espectros de RPE das cadeias isoladas α_{NO} e β_{NO} a 77 K e 4.2 K [17].	28
1.8	Espectros de RPE de hemoglobina híbrida $\alpha_{NO}\beta$ a 77K. Nas amostras do grupo I o Fe da β tem estado de spin baixo, e as do grupo II spin alto [16].	29
1.9	Dependência com a temperatura de NOHb humana. AB e AC são os espectros compostos [19].	29
1.10	Espectros de RPE de NOHb humana com e sem IHP [21].	30
1.11	Espectros de RPE de NOHb humana modificada por SDS (a) Heme:SDS=0,26:4 (b)Heme:SDS=0,26:6,7 (c)Heme:SDS=0,3:200 [22].	31
1.12	Espectros de RPE de NOHb humana desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes [1].	32
1.13	Comparação dos espectros experimentais com os obtidos por combinação dos espectros inicial e final da desnaturação térmica [1].	33
1.14	(a) Níveis de energia dos elétrons do Fe e do NO em nitrosil-heme. (b) Interação com o nitrogênio da histidina [9].	34
2.1	Processo de relaxação spin-rede direto.	38

2.2	Processo de relaxação spin-rede Raman.	39
2.3	Processo de relaxação spin-rede Orbach.	41
2.4	Processo de relaxação spin-rede cruzada.	42
2.5	Diagrama dos níveis de energia e funções de onda para um sistema de spin acoplado a um sistema com ETL.	46
2.6	Relaxação spin-rede de metaMbF [37].	47
2.7	Relaxação spin-rede de hemoproteínas férricas spin baixo. Os símbolos e as linhas representam os resultados experimentais com os respectivos ajustes, e a linha separada representa T^9 . □ citocromo c; Δ Mb; \circ MbN ₃ ; \diamond citocromo P450 [39].	48
2.8	Relaxação spin-rede de hemoproteínas férricas com mistura de spin baixo e alto. □ spin alto e \times spin baixo [40].	49
2.9	Relaxação spin-rede de pó de NOMb [44].	50
2.10	Relaxação spin-rede da componente A de NOHb [19].	51
3.1	Estados envolvidos em um processo de ligação simples	56
3.2	Religação de CO à Mb de baleia abaixo de 160 K (a) e acima de 190 K (b) [48].	58
3.3	Espectros de RPE de NOHb com e sem IHP e sob iluminação contínua. T:4,2K [17].	63
3.4	Fração de moléculas de NO fotodissociadas, sob iluminação contínua, para três diferentes estruturas quaternárias [58].	64
3.5	Amplitudes dos espectros óticos dos fotoprodutos de NOHb dissociados por pulsos de picosegundos [54].	65
3.6	Recombinação de NO a mutantes de Mb humana [66].	66
3.7	Distribuição de energia para religação de NO à Hb em tres diferentes conformações [58].	70
4.1	Estrutura fractal da rede de tubos dos pulmões [69].	73
4.2	Desvio percentual dos ajustes de relaxação spin-rede de plastocianina [75].	76
4.3	Fotodissociação de NOHb usando o modelo fractal e exponencial simples (a) e o modelo de subestados conformacionais (b) [78].	80
6.1	Espectros de RPE das amostras desnaturadas e NOHb desidratada. T: 6K. Pot.: 20 dB.	89
6.2	Espectros de RPE de NOHb desnaturada em função da temperatura. Pot.: 22 dB.	89
6.3	Espectros de RPE de NOHb desidratada em função da potência de microonda. Os detalhes em 0 e 10 dB mostram o espectro sem o sinal do radical livre. T: 4.2 K	90

6.4	Espectros de RPE de NO-hematina em função da temperatura. Pot.: 22 dB.	90
6.5	Espectros de RPE de NO-hematina em função da potência de microonda. T: 4.2 K . . .	91
6.6	Espectros de RPE de NOHb em diferentes conformações. T: 80K e Pot.: 20 dB.	92
6.7	Dependência da intensidade dos sinais de RPE com a temperatura.	93
6.8	Dependência com a temperatura da intensidade do sinal de RPE de NOHb em diferentes estados. As linhas sólidas representam os resultados dos ajustes.	94
6.9	Dependência com a temperatura da potência a meia-saturação, que é proporcional a taxa de relaxação spin-rede. As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos ajustes das equações 6.2 e 6.3, respectivamente.	96
6.10	Resíduos dos ajustes dos dados experimentais da taxa de relaxação spin-rede.	97
6.11	Espectros de RPE de NOHb desnaturada antes e depois da fotodissociação. T: 4.2 K. . .	99
6.12	Frações de NO dissociadas da Hb desnaturada durante a fotodissociação.	99
6.13	Ajuste com o modelo de exponencial simples das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.	100
6.14	Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo de exponencial simples.	101
6.15	Ajuste com o modelo de exponencial dupla das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.	103
6.16	Resíduos dos ajustes com o modelo de exponencial dupla das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.	103
6.17	Ajuste com o modelo de subestados conformacionais das curvas de fotodissociação. . .	105
6.18	Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo de subestados conformacionais.	106
6.19	Função distribuição da energia de ativação de NOHb desnaturada.	106
6.20	Ajuste com o modelo fractal das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada. . . .	107
6.21	Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo fractal. . . .	108
7.1	Comparação dos resíduos dos modelos utilizados para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	116
7.2	Comparação dos valores das constantes de reassociação lenta para NOHb. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].	117

7.3	Comparação dos valores das constantes de reassociação rápida para NOHb. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].	118
7.4	Comparação dos valores do fator pré-exponencial do modelo de subestados conformacionais para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].	119
7.5	Comparação dos valores da largura de barreira geminada para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].	120
7.6	Comparação dos valores do fator pré-exponencial do modelo fractal para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [78]. .	122

Lista de Tabelas

3.1	Constantes de velocidade para recombinação de NOHb de elefante e baleia. $T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adaptada de [54].	66
3.2	Recombinação de NOHb humana em três diferentes conformações. Adaptada de [58].	68
3.3	Recombinação geminada de NO a Mb mutantes. Adaptada de [66].	69
3.4	Parâmetros para religação de NO a Hb humana em diferentes conformações. Adaptada de [58].	71
3.5	Recombinação de NOHb humana em tres diferentes conformações. Adaptada de [58].	71
4.1	Dimensão fractal de algumas proteínas obtidos por relaxação e raios-X. Adaptado de [39].	75
4.2	Parâmetros de relaxação spin-rede de plastocianina. Adaptado de [75].	76
4.3	Dimensão fractal da lisosoma c obtidos por medidas de C_p . Adaptado de [76].	77
4.4	Dimensão fractal da superfície, d_{fs} , de algumas proteínas obtidas por análise de raios-X. Adaptado de [77].	78
4.5	Parâmetros do modelo fractal para a recombinação de NOHb humana em três diferentes conformações. Adaptada de [78]. (A e D da equação 4.17 e B da equação 4.18)	81
6.1	ΔH e ΔS para nitrosil hemoproteínas em diferentes conformações segundo a equação 6.1.	94
6.2	ΔH e ΔS para nitrosil hemoproteínas segundo a equação 6.1 (vide texto).	95
6.3	Valores absolutos de T_1^{-1} (s^{-1}) de acordo com a equação 6.2.	97
6.4	Constantes de dissociação do modelo de exponencial simples para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	101
6.5	Parâmetros do ajuste do modelo de exponencial dupla para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	102
6.6	Parâmetros livres do modelo de subestados conformacionais para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	105

6.7	Parâmetros fixos (vide cap. 5) do modelo de subestados conformacionais para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	105
6.8	Parâmetros do modelo fractal para a fotodissociação de NOHb desnaturada.	107
7.1	Parâmetros do ajuste de T_1^{-1} com as equações 6.2 e 6.3. ^a Nas referencias 19 e 44 somente o melhor ajuste foi considerado e o termo constante não foi observado.	112

Introdução

As hemoproteínas têm como função biológica o armazenamento e transporte de oxigênio através dos organismos (hemoglobina - Hb e mioglobina - Mb) e o transporte de elétrons durante a respiração (citocromos). Para a ligação ou dissociação de oxigênio a proteína altera sua conformação e o estado de spin do ferro do centro ativo (heme).

A presença de um átomo de ferro na heme, que é um metal com propriedades magnéticas bem conhecidas, permite a utilização de várias técnicas físicas no estudo das hemoproteínas, como por exemplo, a ressonância paramagnética eletrônica (RPE), uma técnica espectroscópica associada à absorção de energia por um elétron desemparelhado durante a transição induzida entre dois estados Zeeman adjacentes.

Em geral o átomo de ferro tem seis ligantes em uma simetria octaedral. Nas hemoproteínas quatro ligantes são os átomos de nitrogênio da própria heme e o 5º é o grupo imidazol da histidina proximal. A 6ª posição corresponde ao sítio de ligação do oxigênio no caso fisiológico, a qual pode também ser ocupada por outras moléculas tais como H₂O, CO, NO, etc.

Quando o sexto ligante é uma molécula de água o derivado é chamado metaHb, o estado de spin é 5/2 e a valência +3. A molécula de H₂O ligada ao ferro forma ponte de hidrogênio com a histidina distal E₇.

O óxido nítrico (NO) se liga reversivelmente nas hemoproteínas com o ferro na forma Fe⁺² em atmosfera anaeróbica, e é usado como um modelo para a ligação do oxigênio, com a vantagem de poder ser estudado por RPE, uma vez que o grupo NO apresenta um elétron desemparelhado.

O estudo do processo de desnaturação das proteínas, através do qual a molécula perde sua função, é importante na compreensão das forças que estabilizam as moléculas na sua

conformação nativa.

Utilizamos a técnica de RPE para analisar o processo de desnaturação de metaHb e NOHb em função do tempo de desnaturação [1,2].

Os espectros de metaHb apresentam o sinal de spin alto devido ao íon Fe^{+3} estado de spin 5/2, característico da forma nativa, e os sinais de spin baixo (Fe^{+3} estado de spin 1/2) característico das espécies chamadas hemicromos e associados a ocupação do 5º e 6º sítios do ferro por átomos da própria globina. Observamos a formação de um novo hemicromo que não tinha sido descrito anteriormente e propomos para a sua estrutura o complexo histidina-Fe-cisteína [2].

O processo de desnaturação de NOHb apresenta duas fases: uma caracterizada pelo espectro da amostra nativa, e outra caracterizada por um espectro que apresenta um triplete hiperfino devido ao enfraquecimento ou rompimento da ligação entre o ferro e a histidina proximal das subunidades α nas Hb ou da própria globina na Mb.

O objetivo deste trabalho é caracterizar, usando RPE, a estrutura e o processo de ligação do NO às hemoproteínas no estado desnaturado. Os resultados podem ser comparados com os da amostra nativa, visando um maior conhecimento da relação estrutura-função destas proteínas.

Utilizando um espectrômetro de RPE convencional podemos obter informações sobre a estrutura da hemoproteína de duas maneiras: através da dependência com a temperatura do tempo de relaxação spin-rede, e da dependência com a temperatura do próprio espectro de RPE.

A análise da dependência com a temperatura do espectro de RPE de diferentes amostras de NOHb e NOMb (nativa, desnaturada, liofilizada e em glicerol) indica as diferentes conformações destas hemoproteínas e os parâmetros termodinâmicos de equilíbrio entre as mesmas [3].

A investigação do mecanismo de relaxação spin-rede de NO-hemoproteínas desnaturadas fornece informações sobre excitações e dinâmicas de sua estrutura rompida, que podem ser comparados com os resultados para as estruturas nativas [4].

O funcionamento de uma proteína pode também ser estudado em função de sua dinâmica. Em hemoproteínas estes estudos são realizados através de experimentos de

fotodissociação. A cinética de fotodissociação e recombinação de NO-hemoproteínas pode ser feita através do monitoramento da intensidade do sinal de RPE, cujos resultados para amostras desnaturadas esclarecem melhor a influência da estrutura nativa no processo de ligação Fe-NO.

Objetivando uma maior compreensão dos resultados descritos nos três últimos parágrafos estruturou-se este trabalho como se segue. No capítulo 1 apresenta-se os resultados e características, obtidos principalmente por RPE, de NO-hemoproteínas, enquanto que no capítulo 2 é descrito o processo de relaxação spin-rede em hemoproteínas. O processo de ligação dos ligantes a hemoproteínas e sua descrição com modelos baseados na teoria da cinética de reações químicas são mostrados no capítulo 3. O conceito de fractal, que é utilizado para a análise dos resultados de relaxação spin-rede em hemoproteínas férricas spin baixo e para o processo de fotodissociação em NO-hemoproteínas, é apresentado no capítulo 4. E, finalmente, os procedimentos experimentais, os resultados e a discussão dos mesmos serão apresentados nos capítulos 5, 6 e 7, respectivamente.

Capítulo 1

Nitrosil Hemoproteínas

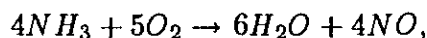
Uma das propriedades características das hemoproteínas ferrosas é sua habilidade para reagir com ligantes não-proteicos adicionados externamente. Ocasionalmente alguns desses ligantes têm significado fisiológico, porém, é também possível fazer com que o ferro da heme reaja com ligantes escolhidos para facilitar a investigação experimental da hemoproteína.

Um bom exemplo desses ligantes é o monóxido de carbono (CO), pois além deste reagente ligar-se rápida e facilmente à maioria das heme ferrosas, o sistema resultante é altamente fotosensível, o que pode ser explorado no estudo da dinâmica proteica, como será descrito no capítulo 3.

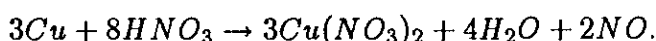
Um outro ligante muito utilizado como sonda para a caracterização da estrutura e funcionamento das hemoproteínas é o óxido nítrico (NO). Além das propriedades que descreveremos neste capítulo, verificou-se recentemente que este gás apresenta uma importante função fisiológica, pois o mesmo liga-se à cisteína $\beta 93$ quando a hemácia é oxigenada nos pulmões e libera-se nos tecidos, funcionando como vaso-dilatador e controlador da pressão sanguínea [5].

1.1 Características químicas do óxido nítrico

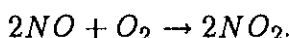
O NO gasoso pode ser preparado pela união direta de nitrogênio e oxigênio a altas temperaturas, pela oxidação de amônia através da reação de Ostwald:



ou pela ação de ácido nítrico diluído em cobre [6]

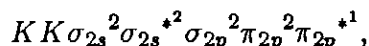


Sob condições atmosférica o NO é um gás incolor com temperatura de fusão e vaporização iguais a $-151,8^\circ C$ e $-163,7^\circ C$, respectivamente, sendo de difícil manutenção em laboratório devido a facilidade para reagir com oxigênio segundo a reação:



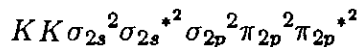
A molécula de NO apresenta uma estrutura de radical livre, ou seja, possui um elétron desemparelhado que a torna paramagnética e altamente reativa. Entretanto este gás não reage com alcalinos e água, o que facilita sua purificação em relação ao NO_2 .

Um diagrama representando os níveis de energia dos orbitais moleculares do NO é mostrado abaixo (figura 1.1a). Neste diagrama observa-se que a configuração eletrônica é

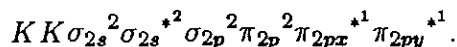


onde os orbitais com e sem asteriscos representam os orbitais de ligação e antiligação, respectivamente. O elétron desemparelhado do NO ocupa um par degenerado de orbitais de antiligação $p\pi^*$, que apresentam simetria cilíndrica em relação ao eixo da ligação N–O [7].

A molécula fisiologicamente importante O_2 apresenta configuração eletrônica



ou de acordo com a regra de Hund (figura 1.1b)



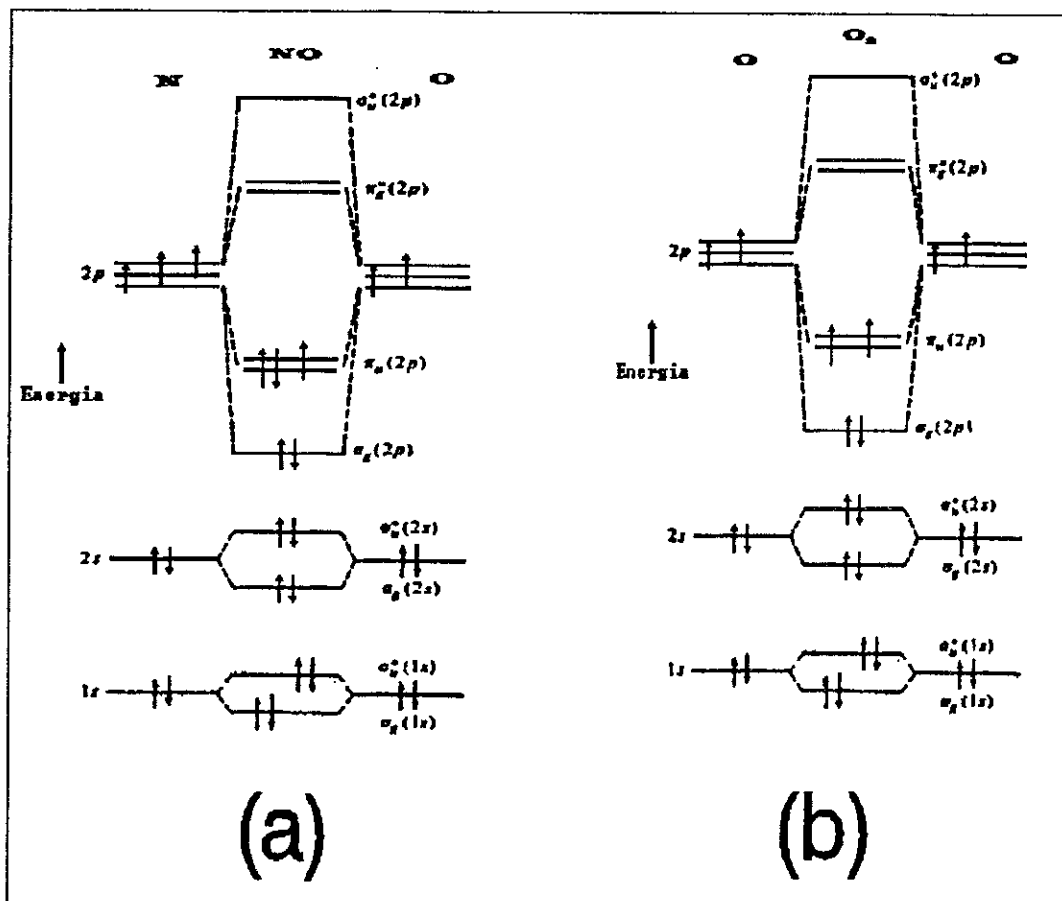


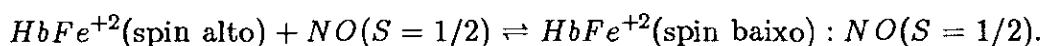
Figura 1.1: Níveis de energia dos orbitais moleculares do NO (a) e O₂ (b).

Os dois gases apresentam estrutura molecular muito semelhante, diferindo somente pela ausência de elétron desemparelhado no O_2 . Além desta semelhança, resultados espectroscópicos na região de infravermelho [8] e raios-X [9] mostram que ambos os ligantes apresentam estrutura física e distribuição de cargas semelhantes quando ligados a hemoproteínas. Portanto nitrosil-hemoproteínas podem servir como um modelo paramagnético para oxi-hemoproteínas.

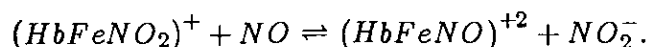
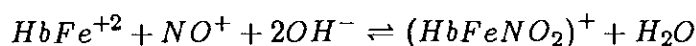
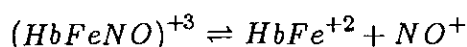
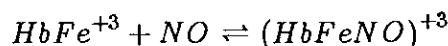
1.2 Mecanismo de ligação de nitrosil hemoproteínas

O NO se liga em hemoproteínas tanto no estado ferroso Fe^{+2} como no férrico Fe^{+3} . As reações precisam ser realizadas anaerobicamente, já que o NO é facilmente reduzido pelo O_2 .

No estado ferroso (spin alto) o mecanismo de ligação é simplesmente [10]



Para o estado férrico o mecanismo de reação foi proposto por Chien [11] e confirmado recentemente por Martins Neto et al [12]:



Neste mecanismo o ferro Fe^{+3} é reduzido para Fe^{+2} e o NO oxidado para NO^+ , resultando na espécie diamagnética $HbFe^{+2}$. A conversão desta espécie para a paramagnética $(HbFeNO)^{+2}$ requer a presença de excesso de NO e OH^- na solução. Portanto, em pH baixo o segundo passo deste mecanismo não acontece tão eficientemente como em pH alto.

A configuração eletrônica do produto da reação poderia ser representada simplesmente como $3d^7(S = 1/2)$, na qual o íon metálico receberia um elétron adicional do NO ligado.

Entretanto, a descrição precisa do sistema é muito mais complexa, conforme veremos mais adiante.

1.3 Ressonância paramagnética eletrônica de nitrosil hemoproteínas

Espectros de RPE de solução congelada de nitrosil hemoproteínas dependem do tipo de proteína, mas de uma forma geral são típicos de um sistema com simetria rômica em torno do centro paramagnético. Eles são caracterizados por três absorções, cada uma correspondendo, em primeira aproximação, a um eixo principal do fator g . A primeira a campo baixo com $g_x = 2.07 - 2.08$, é relativamente insensível ao tipo de proteína e associado a orientação da molécula com o campo magnético na direção do plano da heme. Algumas hemoproteínas tais como Hb, Mb, citocromo *c* e citocromo oxidase apresentam valores de g_y no intervalo 1.98 - 2.01, enquanto outras como peroxidase apresentam absorções a campos mais altos, com $g_y = 1.95 - 1.96$. A terceira absorção com g_z invariavelmente próximo ao valor do elétron livre (2.003 - 2.005) é interpretada como sendo aquela paralela à normal à heme [13-19]. Entretanto estes espectros dependem também de vários outros fatores tais como estado físico, valência do ferro, grau de hidratação, etc.

1.3.1 Nitrosil mioglobina

A dependência com a temperatura (31 - 157.5 K) do espectro de RPE de solução de NOMb equina é consistente com o equilíbrio térmico entre duas espécies com espectros distintos [13]. Um dos quais com tensor g de simetria rômica (2.080, 1.988, 1.979) denominado tipo I e o outro, tipo II, com um tensor g axial (2.041, 1.983) (figura 1.2). Ambas as espécies são hexa-coordenadas. O desdobramento de nove linhas observados no tipo I (mais claramente observado em complexos modelos Imidazol-heme-NO) sugere que o elétron desemparelhado apresenta considerável interação com o nitrogênio da histidina

proximal nesta espécie e muito pouca interação na espécie II. Portanto a distância entre o Fe e o N do imidazol é maior em II do que em I, e a distância Fe-NO é maior em I do que em II.

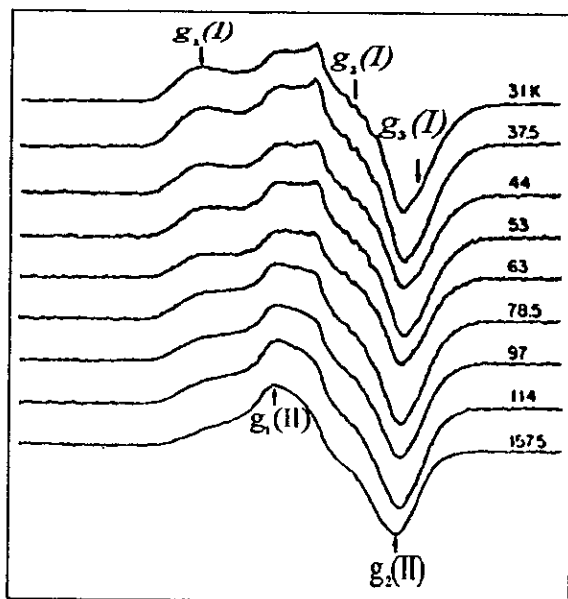


Figura 1.2: Dependência com a temperatura dos espectros de RPE de NOMb equina [13].

A existência de duas espécies também foi observada em cristais de NOMb de baleia [14]. Neste caso a baixas temperaturas (5 K) o sinal predominante apresenta um tensor g rômico (2.076, 2.002, 1.979), e um tensor hiperfino $A(^{14}\text{N})$ (15,17,19 G) para o tipo I. Enquanto que para o tipo II, observado a altas temperaturas (298 K), o tensor g é ligeiramente axial (2.050, 2.022, 1.993) (figura 1.3). As pequenas variações na forma do espectro em função da temperatura são explicadas por uma mudança na conformação da ligação da molécula de NO em relação ao plano da heme.

A existência do equilíbrio térmico nestas amostras é atribuído a modulação da estrutura eletrônica pela histidina distal.

A análise do comportamento com a temperatura do sinal de RPE de NOMb de *Aplysia brasiliana*, um molusco marítimo, foi realizado considerando a dependência da amplitude da linha g_x na faixa de 100 K a 310 K [15]. Esta dependência é essencialmente linear e apresenta boa concordância com a distribuição de Boltzmann (figura 1.4). O desvio em

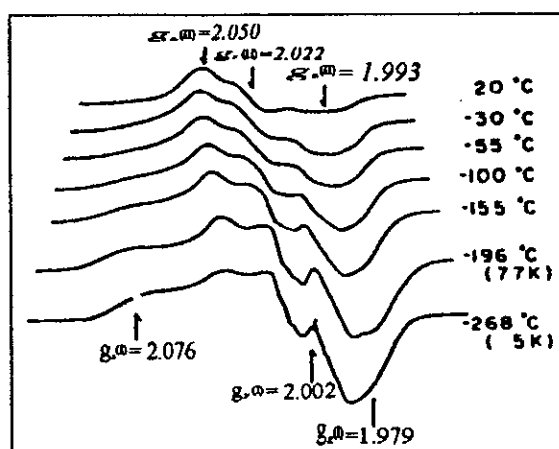


Figura 1.3: Dependência com a temperatura dos espectros de RPE de pó de NOMb de baleia [14].

temperaturas baixas (abaixo de -40°C) é devido ao congelamento da água de hidratação. Portanto, neste caso, apenas uma espécie é observada em todo intervalo de temperatura. Uma vez que esta mioglobina não apresenta histidina ou qualquer resíduo básico no lado distal, foi proposto que o efeito de modulação deste resíduo na estrutura eletrônica do complexo $N_{\epsilon} - Fe - NO$ é reduzido. Diminuindo-se a temperatura o Fe é deslocado na direção da histidina proximal, mas a molécula de NO também se desloca na mesma direção de tal forma que a distância relativa em $N_{\epsilon} - Fe - NO$ não é modificada.

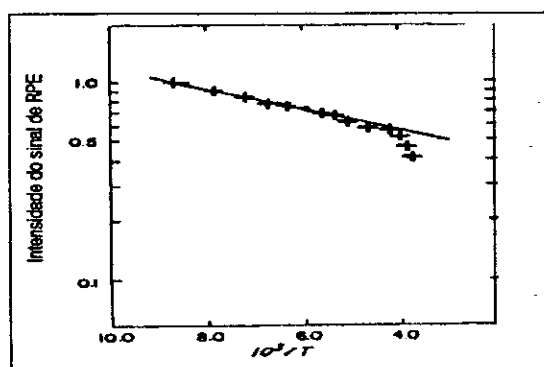


Figura 1.4: Amplitude do sinal de RPE em função do inverso da temperatura de NOMb de *Aplysia brasiliana*. Adaptado de [15]

Todos os resultados descritos acima foram obtidos em concentração de grande excesso

de NO, ou seja, sob concentrações de saturação. No entanto, recentemente mostrou-se que os espectros de NOMB são fortemente dependentes da concentração de NO [12]. Em baixas concentrações o espectro é característico de Fe pentacoordenado, e aumentando-se a concentração de NO o espectro gradualmente se modifica para um espectro de Fe hexacoordenado (figura 1.5). NOMB foi obtida inicialmente deoxigenando a amostra original, que era constituída de aproximadamente 85% de Mb férrica e 15% de MbO₂. O espectro de Fe pentacoordenado foi associado à reação do NO com a pequena fração de MbO₂ presente na amostra inicial, enquanto que o hexacoordenado à reação da fração de metaHb com NO.

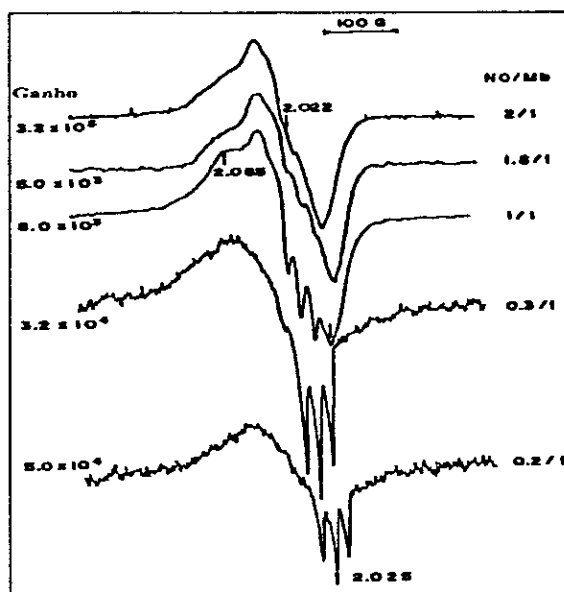


Figura 1.5: Espectros de RPE de NOMB equina em função da concentração do gás NO [12].

1.3.2 Nitrosil hemoglobina

As cadeias da hemoglobina humana isoladas e ligadas a NO, α_{NO} e β_{NO} , apresentam espectros e dependência com a temperatura completamente diferentes.

A temperatura ambiente os sinais são ligeiramente assimétricos e não apresentam resolução da estrutura hiperfina (figura 1.6a). A temperatura de nitrogênio líquido

(77 K) a cadeia α_{NO} apresenta um sinal assimétrico e uma estrutura hiperfina na região de $g = 1.99 - 2.02$ (mais facilmente observada quando a região em torno de $g=2.0$ é expandida), enquanto que a cadeia β_{NO} apresenta um sinal simétrico centrado em $g=2.013$, com uma absorção fraca próxima a $g=2.06$ e nenhuma estrutura hiperfina (figura 1.6b) [16].

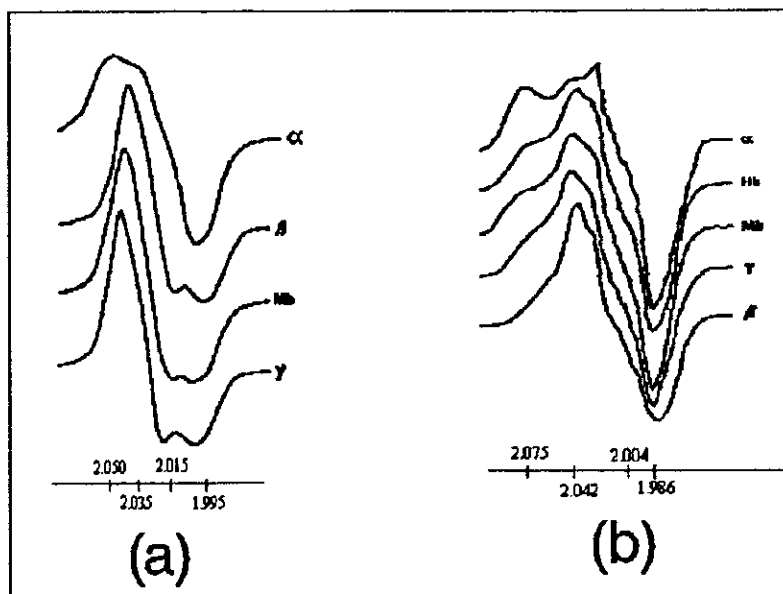


Figura 1.6: Espectros de RPE de várias nitrosil hemoproteínas a temperatura ambiente (a) e 77K (b) [16].

Baixando a temperatura até 4.2 K o espectro de α_{NO} não se modifica, enquanto o de β_{NO} torna-se assimétrico, assemelhando-se ao de α_{NO} (figura 1.7) [17]. Estes resultados levaram a conclusão que as estruturas da globina das cadeias α e β influenciam de diferentes maneiras a mobilidade do NO ligado a heme.

Os espectros de HbNO em qualquer temperatura podem ser obtidos como a soma dos espectros das cadeias α_{NO} e β_{NO} [18]. Na região em torno de $g=2.01$ as nove linhas são fracamente observadas, indicando que as linhas hiperfinas da cadeia α_{NO} são obscurecidas pelos três ombros da cadeia β_{NO} .

Ao contrário da cadeia α_{NO} , o espectro da β_{NO} na molécula de Hb não depende significativamente da estrutura quaternária. Em híbridos do tipo $\alpha_2(X)\beta_2(NO)$ ou

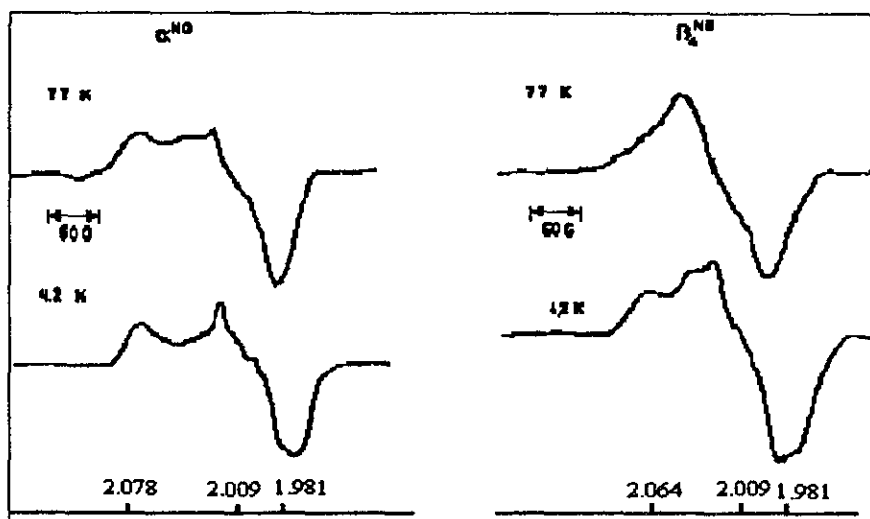


Figura 1.7: Espectros de RPE das cadeias isoladas α_{NO} e β_{NO} a 77 K e 4.2 K [17].

$\alpha_2(NO)\beta_2(X)$, onde X significa deoxi, oxi, carboxi ou férrico (H_2O , F^- , N_3^- ou CN^-), o espectro de $\alpha_2(NO)\beta_2(X)$ depende significativamente do estado de spin da heme da cadeia β . Para X do tipo spin baixo o espectro é idêntico ao da cadeia separada, mas para X spin alto o espectro se modifica (figura 1.8). O espectro de $\alpha_2(X)\beta_2(NO)$ é independente do estado de spin de X [16].

A baixas temperaturas o espectro de RPE de NOHb humana depende fortemente da temperatura e da potência de microonda. A 7.5 K e baixas potências prevalece um tipo de sinal, chamado A, que satura facilmente e decresce em potências mais altas, enquanto um outro sinal, muito fraco em baixas potências (sinal B), aumenta com a potência e torna-se predominante. Elevando-se a temperatura a forma do espectro sofre uma mudança semelhante a observada em baixas temperaturas devido ao aumento da potência de microonda. A temperaturas menores que 32 K todos os espectros de HbNO podem ser reproduzidos através da combinação apropriada dos espectros A e B, entretanto a temperaturas maiores que 32 K a reprodução do espectro é feita combinando-se o espectro A com um outro chamado C, que substitui B (figura 1.9). Ou seja, os espectros de HbNO são compostos de no mínimo três componentes que apresentam diferentes dependências com a temperatura e com a potência de microonda. Embora exista uma forte semelhança entre o sinal A e o de α_{NO} e entre o sinal B e C e o de β_{NO} , estes espectros não estão

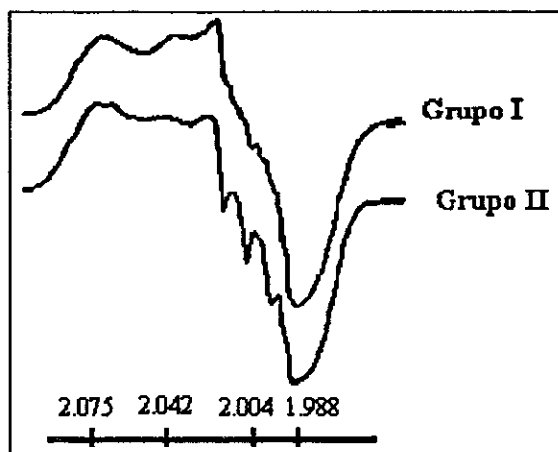


Figura 1.8: Espectros de RPE de hemoglobina híbrida $\alpha_{NO}\beta$ a 77K. Nas amostras do grupo I o Fe da β tem estado de spin baixo, e as do grupo II spin alto [16].

necessariamente relacionados [19].

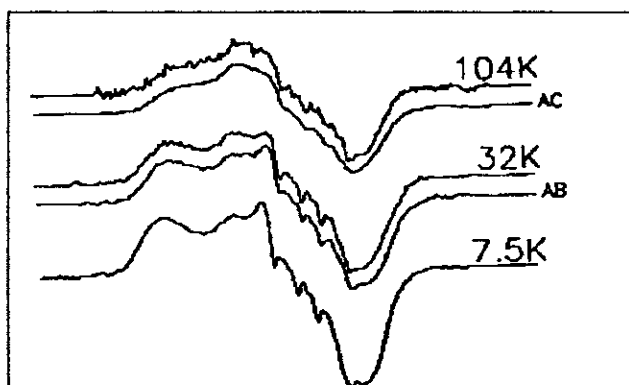


Figura 1.9: Dependência com a temperatura de NOHb humana. AB e AC são os espectros compostos [19].

1.3.3 Transição R-T em NOHb

A molécula de Hb pode assumir duas diferentes conformações: uma T ou “tensa” com baixa ou nenhuma afinidade para o ligante, e outra R ou “relaxada” com alta afinidade.

Na ausência de fosfatos orgânicos, como o inositol hexafosfato (IHP) e alta concentração de NO, NOHb está essencialmente na conformação R. Entretanto, ao contrário de outros ligantes como CO ou O₂, a presença de IHP em baixas concentrações de NO modifica o estado de equilíbrio para a estrutura T, sem dissociar o NO. Esta mudança é acompanhada de grandes variações no espectro ótico, infravermelho, Raman e RPE (figura 1.10) [9,20,21]. Na conformação R os espectros de RPE são característicos de Fe hexacoordenados, enquanto que para o estado T são de Fe pentacoordenados. Experimentos de hemoglobinas híbridos levaram a conclusão que esta transição na coordenação ocorre somente nas cadeias α [17].

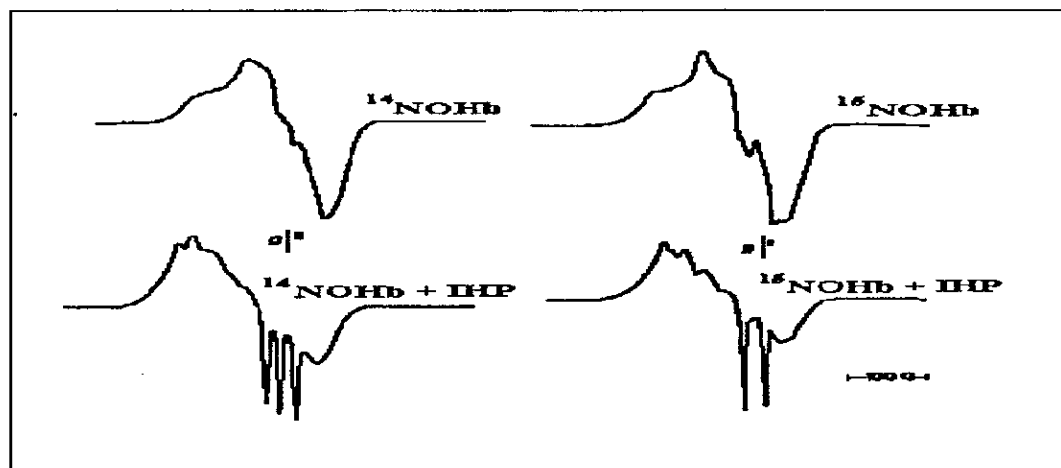


Figura 1.10: Espectros de RPE de NOHb humana com e sem IHP [21].

1.3.4 Desnaturação de NOHb

O efeito de detergentes (duodecil sulfato de sódio (SDS) e salicinato de sódio) no espectro de NOHb no estado R é mostrado na figura 1.11. Com o aumento das concentrações dos detergentes o pico em $g = 1,986$ decresce, e aparece um tripleto hiperfino com centro em $g = 2,009$ e um pico em $g = 2,094$. O estado final desta etapa é estável em uma certa faixa de concentração (6,7 a 200 mM para SDS e 0,5 a 0,7 M para salicinato de sódio). Tais mudanças são consequência da perda da conformação proteica devido

aos efeitos combinados das atrações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas dos detergentes e da proteína [22].

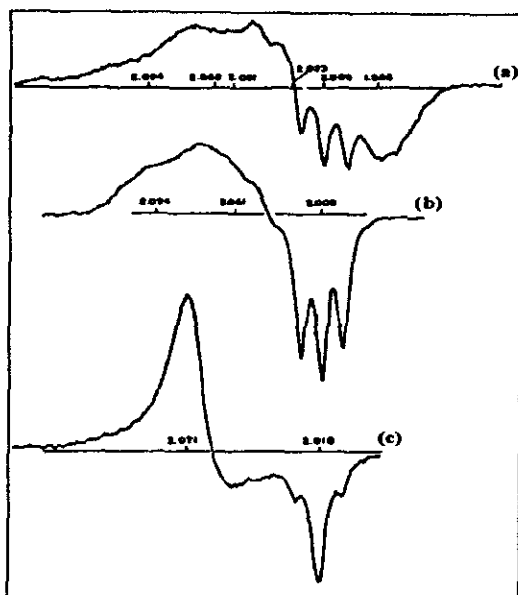


Figura 1.11: Espectros de RPE de NOHb humana modificada por SDS (a) Heme:SDS=0,26:4 (b)Heme:SDS=0,26:6,7 (c)Heme:SDS=0,3:200 [22].

A forma do espectro mostra que a simetria rômbrica em torno do centro paramagnético se mantém. Concentrações superiores a 200 mM de SDS e 0,7 M de salicato de sódio levam a uma nova transformação no espectro que passa a apresentar uma forma característica de uma molécula com simetria axial. Portanto o tratamento da proteína com altas concentrações de detergentes tem como efeito eliminar a diferença que existia entre os dois valores de g no plano xy .

A desnaturação térmica de NOHb e NOMb obsevada por RPE apresenta uma só etapa, caracterizada pela mudança na forma do espectro. O tempo necessário para o número de moléculas de NOHb e NOMb atingir a metade de sua mudança máxima, t_x^{NO} , depende da temperatura de desnaturação [2]. O espectro de RPE inicial característico é o da amostra nativa na forma R de NOHb, alargado com extremos em $g = 2,038$ e $g = 1,986$ e simetria rômbrica em torno do centro paramagnético. O espectro que caracteriza o estado final da transformação da molécula é o obtido com maior tempo de desnaturação a

80°C (maior temperatura de desnaturação usada), e associado àquele com $g = 2,07$ e um triplete hiperfino com centro em $g = 2,011$ (figura 1.12), que é semelhante ao dado como característico do estado desnaturado de NOHb produzido por detergentes. Este triplete também está relacionado à quebra de ligação entre o imidazol da histidina proximal e o ferro.

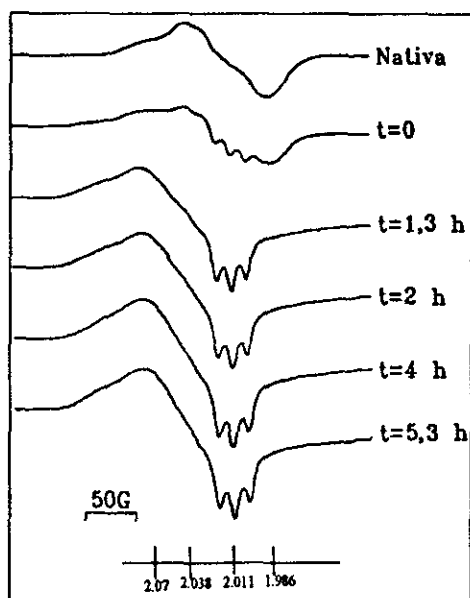


Figura 1.12: Espectros de RPE de NOHb humana desnaturada termicamente a 80°C com tempos de desnaturação diferentes [1].

A modificação espectral na transição R-T é associada somente às cadeias α . Já que a mudança do espectro de RPE observada na desnaturação é semelhante àquela da transição R-T, e como nenhum espectro de cadeias β apresenta o triplete, é provável que também na desnaturação esta característica esteja associada somente à cadeia α [2].

Os estados finais em temperaturas de desnaturação mais baixa são estados intermediários do processo a temperaturas mais altas, ou seja, o processo é qualitativamente equivalente em qualquer temperatura. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que os espectros das amostras para qualquer tempo e temperatura de tratamento são descritos como combinação dos espectros da amostra nativa e do estado final a $T = 80^\circ\text{C}$ (figura 1.13).

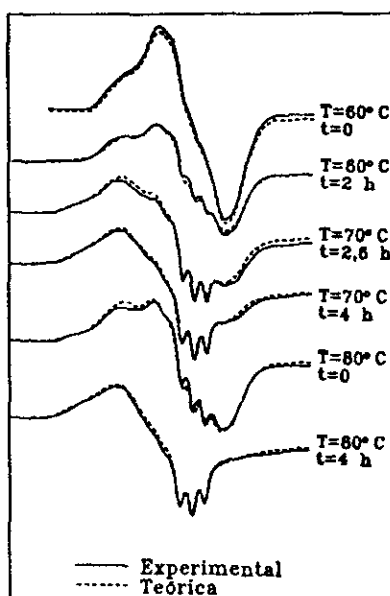


Figura 1.13: Comparação dos espectros experimentais com os obtidos por combinação dos espectros inicial e final da desnaturação térmica [1].

1.4 Estrutura eletrônica de NOHb

Uma completa compreensão da ligação nitrosil-heme e a suposição de que esta pode servir como um modelo para a ligação O_2 -heme requer uma detalhada descrição de sua estrutura eletrônica.

A maioria das conclusões sobre a estrutura eletrônica dos complexos NO são obtidas a partir da interpretação de resultados experimentais, principalmente os de RPE citados anteriormente.

A análise do aparecimento do desdobramento hiperfino e a comparação com complexos modelos levou à sugestão do diagrama de orbitais moleculares mostrado na figura 1.14. Este diagrama indica que uma fração substancial da densidade de spin eletrônica desemparelhada é transferida do NO para o orbital d_{z^2} do Fe. Isto implica em um en-

fraquecimento da ligação entre o Fe e o N_ϵ da histidina proximal, e pode ser o motivo para a observação dos efeitos da transição R-T somente em NOHb e não em outros ligantes, como CO ou O_2 , que não apresentam elétron desemparelhado e a ligação Fe- N_ϵ é pouco alterada [9].

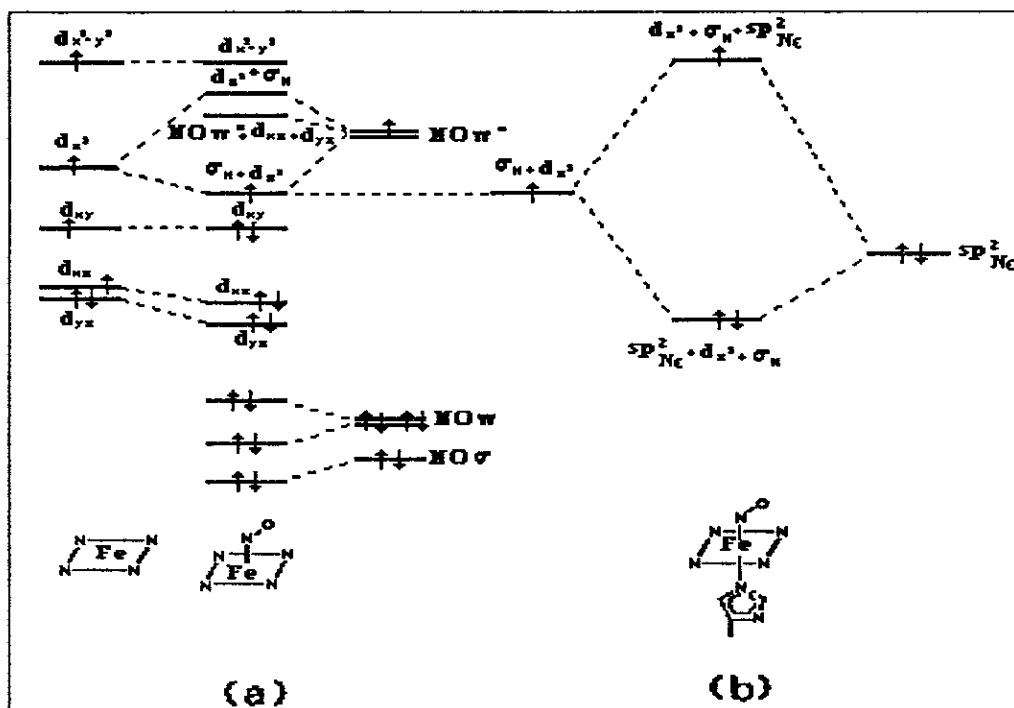


Figura 1.14: (a) Níveis de energia dos elétrons do Fe e do NO em nitrosil-heme. (b) Interação com o nitrogênio da histidina [9].

Apesar das previsões acima serem confirmadas experimentalmente, ainda existe considerável discordância sobre a extensão da deslocalização do spin eletrônico e natureza da ligação Fe-NO.

Com base em medidas de ressonância Raman conclui-se que os orbitais $3d_{x^2-y^2}$ (vazio) e $3d_{xy}$ (preenchido) do Fe no plano da heme são pouco importantes para a interação com os ligantes axiais, e que a ligação Fe-X, onde X representa NO, CO ou O_2 é feita principalmente através de uma interação do tipo $3d_\pi(Fe) - 2p\pi(X)$ [23].

As contribuições dos orbitais do ligante e do Fe foram ajustadas de forma a descreverem os valores experimentais de g e do desdobramento hiperfino. Estes cálculos indicam a

seguinte distribuição para a densidade de spin: 24% e 23% para os orbitais $3d_{xz}$ e $3d_{z^2}$ respectivamente, resultando em 47% para o orbital 3d do Fe e 53% para o orbital $2p\pi^*$ do NO [24].

Em outros trabalhos os níveis de energia eletrônicos e as funções de onda são obtidas a partir de método *ab initio*, usadas para calcular os componentes do tensor g que são comparados com os valores experimentais. Os resultados indicam que a distribuição do spin desemparelhado é axialmente simétrica em torno da direção z , perpendicular ao plano da heme, de modo que espera-se que o valor do tensor g seja próximo ao do elétron livre. A densidade de spin obtida para o orbital do Fe é próxima a 65%, o que não é suficiente para o modelo prever os valores experimentais de g_x e g_y . Por outro lado, a diminuição da densidade de spin nos orbitais do N(NO) e N_ϵ ajusta os valores de g mas deixa de explicar o desdobramento hiperfino na região de g_z [25].

Cálculos semi-empíricos mais gerais indicam que os espectros de RPE podem ser analisados em termos de uma mistura eletrônica ou térmica de dois estados eletrônicos de uma única espécie, não havendo necessidade de um equilíbrio entre duas espécies diferentes como sugerido anteriormente. A diferença entre os dois estados é a localização do spin desemparelhado, em um o spin está localizado principalmente no NO, enquanto que no outro ele está no orbital d_{z^2} do Fe. Dependendo das condições externas a proteína pode estabilizar preferencialmente um dos dois estados eletrônicos e apresentar propriedades característica do mesmo. As variações no espectro de RPE podem ser explicadas em função de mudanças induzidas pela globina na geometria (distância e ângulo) do ligante e distância entre o N da histidina proximal e o Fe [26].

Capítulo 2

Relaxação Spin-rede em Hemoproteínas

Uma vez que o processo de relaxação spin-rede é ampla e detalhadamente discutido na literatura, neste capítulo discutiremos brevemente os aspectos físicos deste processo sem apresentarmos detalhes do formalismo matemático. Para os leitores interessados indicamos as referências [27,28].

RPE é uma técnica espectroscópica associada a absorção de energia por um elétron desemparelhado durante a transição induzida entre dois estados Zeeman adjacentes. Sabe-se que transições induzidas entre um dado par de estados de energia ocorrem com igual probabilidade nas duas direções. Em experimentos de RPE podemos observar absorção de energia se as populações dos dois estados são diferentes. A população de cada estado é dada pela distribuição de Boltzmann, e o número de transições de um nível para outro por unidade de tempo é igual a população de cada nível multiplicada pela probabilidade de transição. Desse modo existe uma absorção de energia do campo de radiofrequência incidente.

Se a absorção de energia fosse o único processo ocorrendo, as populações dos dois

estados rapidamente se igualariam e a absorção cessaria. Entretanto, o sistema sempre tende a retornar à distribuição de Boltzmann original, o que restaura o equilíbrio térmico, através de um processo chamado de relaxação.

Dois tipos de relaxação participam desta restauração do equilíbrio. Dentro do próprio sistema de spin, a interação mútua entre seus membros leva a relaxação spin-spin, que tende a estabelecer condições para que o sistema permaneça no equilíbrio térmico internamente. Interações com as vibrações da rede (fónons) são responsáveis pelo processo de relaxação spin-rede, que ocorre devido as vibrações da rede serem capazes de modular as funções de onda que descrevem os estados de spins.

Nos processos de relaxação spin-rede há um fluxo de energia do sistema de spin para a rede que restaura o equilíbrio da magnetização na direção paralela ao campo magnético aplicado. Ao contrário, os processos de relaxação spin-spin não modificam a energia do sistema e restauram o equilíbrio da magnetização nas direções transversais ao campo externo.

Se um cristal paramagnético apresenta somente dois níveis de energia, a diferença de população ΔN entre os dois níveis se aproxima do seu valor de equilíbrio ΔN_o de acordo com a equação

$$\frac{d}{dt}(\Delta N - \Delta N_o) = -\frac{(\Delta N - \Delta N_o)}{T_1}, \quad (2.1)$$

onde T_1 é o tempo de relaxação spin-rede. Isto implica que todos os sistemas de spins relaxam na mesma razão, de uma forma exponencial no tempo.

Sistemas com mais de dois níveis são mais complicados, mas não essencialmente diferentes [27].

O processo de relaxação é limitado pela taxa de transferência de energia dos spins para os modos da rede, que pode ocorrer através de diferentes processos. O mecanismo de relaxação dominante pode ser obtido através do estudo da dependência com a temperatura da taxa de relaxação.

2.1 Mecanismos de relaxação spin-rede

2.1.1 Processo direto

Nesse tipo de processo o sistema de spin interage com somente um fónon da rede. A transição de um spin entre os estados \underline{a} e \underline{b} é induzida pelas vibrações da rede com frequência

$$\omega_{ab} = \frac{E_a - E_b}{\hbar}, \quad (2.2)$$

onde E_a e E_b são as energias dos estados \underline{a} e \underline{b} , respectivamente, e \hbar é a constante de Planck.

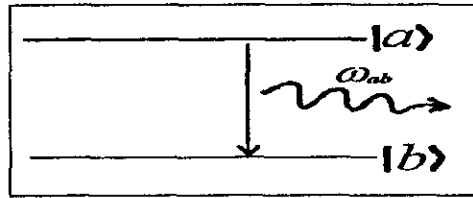


Figura 2.1: Processo de relaxação spin-rede direto.

Este mecanismo domina o processo de relaxação somente quando a temperatura é muito baixa (não mais que uns poucos K).

A dependência com a temperatura para o processo direto é dada por [29]

$$\frac{1}{T_1} = R_o [2p_o(\hbar\omega) + 1] = R_o \coth\left(\frac{\hbar\omega}{2KT}\right), \quad (2.3)$$

onde R_o é a taxa de emissão espontânea de um fónon e $p_o(\hbar\omega) = e^{-\frac{\hbar\omega}{KT}}$ é o fator de Bose-Einstein, que deve ser considerado duas vezes para levar em conta contribuições para emissão e absorção estimulada de fónons.

No limite de altas temperaturas, isto é, quando $KT \gg \hbar\omega$, temos que

$$\frac{1}{T_1} \propto T. \quad (2.4)$$

A temperaturas mais altas processos de multifónons, especialmente aqueles envolvendo dois fónons, tornam-se mais prováveis devido à maior densidade de fónons com energia muito maior que a energia de ressonância $\hbar\omega_{ab}$.

2.1.2 Processo Raman

Um fónon é espalhado inelasticamente e a diferença entre a energia do fónon emitido, $\hbar\omega_\beta$, e do fónon absorvido, $\hbar\omega_\alpha$, é igual a diferença de energia dos estados de spin envolvidos $\hbar\omega_{ab}$.

$$\omega_{ab} = \omega_\beta - \omega_\alpha \quad (2.5)$$

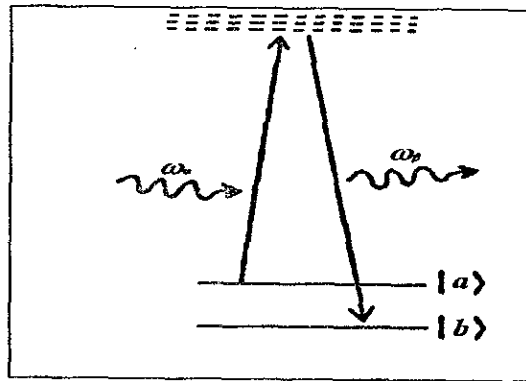


Figura 2.2: Processo de relaxação spin-rede Raman.

O cálculo da taxa de relaxação do processo Raman pode ser resumido da seguinte forma: este cálculo envolve uma soma ou integração sobre a densidade de estados inicial

e final. Considerando os dois estados com a mesma faixa de frequência, um termo do tipo $\rho^2(w)dw$ deve estar presente. Como um fónon é absorvido e outro emitido, um segundo fator é $w^2 p_o(w)[p_o(w) + 1]$. E finalmente como os fónons e o sistema de spins estão acoplados por uma interação do tipo spin-órbita, o integrando deve conter um termo devido a esta interação, $|M(w^2)|^2$, que no caso de dubletos de Kramer é proporcional a w^2 . Portanto, para o processo Raman [30],

$$\frac{1}{T_1} = \int_0^{w_{max}} \frac{\rho^2 w^4 e^{\frac{\hbar w}{kT}}}{(e^{\frac{\hbar w}{kT}} - 1)^2} dw. \quad (2.6)$$

Na aproximação de Debye $\rho(w) = w^{d-1}$ quando $0 \leq w \leq w_{max}$ e $\rho(w) = 0$ para $w > w_{max}$, onde d é a dimensão da amostra. Então:

$$\frac{1}{T_1} = T^{3+2d} J_{2+2d} \left(\frac{\theta}{T} \right) \quad (2.7)$$

onde

$$\theta = \frac{\hbar w_{max}}{k},$$

e

$$J_n(x) = \int_0^x \frac{z^n e^x}{(e^z - 1)^2} dz,$$

é uma integral de transporte que apresenta o seguinte comportamento na região de altas e baixas temperaturas:

$$J_n \left(\frac{\theta}{T} \right) = \text{constante} \quad \text{para } T \ll \theta,$$

e

$$J_n \left(\frac{\theta}{T} \right) = \left(\frac{\theta}{T} \right)^{n-1} \quad \text{para } T \gg \theta.$$

No caso de sólidos, a dimensão do material é 3 e o resultado esperado é

$$\frac{1}{T_1} = T^9 \quad \text{para } T \ll \theta, \quad (2.8)$$

$$\frac{1}{T_1} = T^9 J_8 \left(\frac{\theta}{T} \right) \quad \text{para } T \text{ intermediárias,} \quad (2.9)$$

$$\frac{1}{T_1} = T^2 \quad \text{para } T \gg \theta. \quad (2.10)$$

2.1.3 Processo Orbach

Neste caso a relaxação spin-rede ocorre por uma transição de troca de spin acoplada a emissão e absorção de um fónon com diferença de energias, Δ , igual a do primeiro estado excitado \underline{c} .

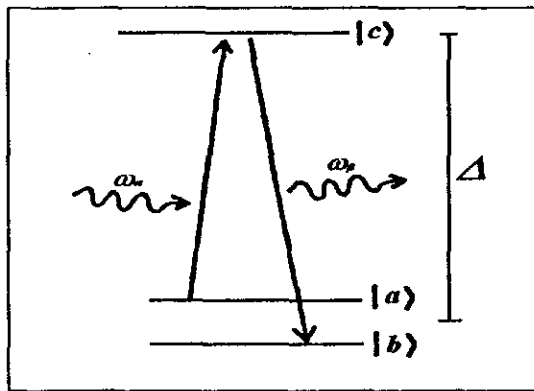


Figura 2.3: Processo de relaxação spin-rede Orbach.

A transição do nível \underline{a} para o \underline{c} é estimulada, levando a uma dependência com a temperatura da forma $e^{-\Delta/kT}$, se $\Delta \gg kT$. Já a transição direta de \underline{c} para \underline{b} é acompanhada pela emissão espontânea de um fónon e, portanto, ocorre em um processo independente de T.

A taxa de relaxação do processo total é dada pela soma das taxas de relaxação para as duas transições. Como a taxa de relaxação para a transição estimulada é muito mais

lenta que para a transição espontânea, segue-se que a taxa de relaxação para o processo Orbach é

$$\frac{1}{T_1} \propto e^{-\frac{\Delta}{kT}} \quad \text{quando} \quad \Delta \gg kT. \quad (2.11)$$

2.1.4 Relaxação cruzada

Interações dipolo-dipolo entre sistemas de spin diferentes podem induzir transições Zeeman simultâneas de dois ou mais íons. Neste caso, dizemos que ocorre um processo de relaxação cruzada. A baixas temperaturas e concentrações bastantes altas, nas quais a intensidade da interação dipolar é forte, este processo pode dominar o processo de relaxação. Sob estas circunstâncias a espécie paramagnética pode relaxar transferindo energia para a rede ou através da difusão de energia para outro centro paramagnético, que, então, relaxa para a rede.

A difusão de energia através de um sistema de spin interagindo fracamente pode ser vista como consistindo de várias trocas mútuas de spin que conservam energia. Como exemplo para este tipo de processo consideremos o diagrama mostrado na figura 2.4.

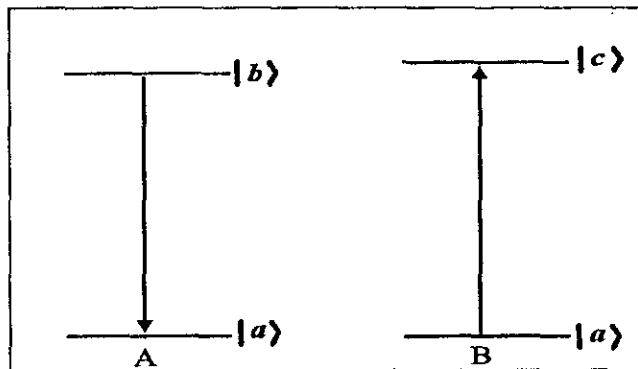


Figura 2.4: Processo de relaxação spin-rede cruzada.

Uma transição para o nível inferior ocorre para o dipolo A, acompanhada por uma transição para o nível superior para o dipolo B. Se A e B são da mesma espécie, o processo conserva energia e nenhum fónon é envolvido. Este é o modelo mais simples para troca de spin nestes processos, que podem também ocorrer para mais de dois spins e para espécies iguais ou diferentes, podendo inclusive, envolver mais de uma transição para uma mesma espécie.

A probabilidade de transição pode ser escrita como [31]

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{\hbar^2} |\langle \psi(E_A, E_B) | \mathcal{H}_{AB} | \psi(E_A + \hbar\omega_{ab}, E_B - \hbar\omega_{ca}) \rangle|^2 g(\nu)_{ab,ca}, \quad (2.12)$$

onde E_A e E_B são as energias dos sistemas de spin A e B respectivamente, \mathcal{H}_{AB} é a hamiltoniana de interação entre dois spins e $g(\nu)_{ab,ca}$ é a função forma de linha que descreve o processo.

Em termos das formas de linhas individuais $g(\nu)_{ab}$ e $g(\nu)_{ca}$, podemos escrever a probabilidade de transição como

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{\hbar^2} |\mathcal{H}_{AB}|^2 \int \int g(\nu')_{ab} g(\nu'')_{ca} \delta(\nu' - \nu'') d\nu' d\nu'', \quad (2.13)$$

onde a integral dupla representa a superposição entre as duas linhas ressonantes.

Para duas linhas gaussianas, a integral dupla resulta em [32]

$$\frac{1}{(2\pi)^{1/2}} \frac{1}{[(\Delta\nu_{ab})^2 + (\Delta\nu_{ca})^2]^{1/2}} \exp \frac{(\nu_{ab} - \nu_{ca})^2}{2[(\Delta\nu_{ab})^2 + (\Delta\nu_{ca})^2]} \quad (2.14)$$

onde $(\Delta\nu_{ab})^2$ e $(\Delta\nu_{ca})^2$ são os segundos momentos de van Vleck da linha de absorção entre os níveis a e b e entre os níveis c e a, respectivamente.

Quando estamos lidando com sinais na mesma região, podemos considerar que a superposição das linhas é total, valor da integral dupla torna-se

$$\frac{1}{2(\pi(\Delta\nu)^2)^{1/2}}, \quad (2.15)$$

e o valor do segundo momento

$$(\Delta\nu)^2 = \frac{g^2 \mu_B^2 H^2}{\hbar^2}. \quad (2.16)$$

Assim,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{2\pi^{1/2} \hbar g \mu_B H} |\mathcal{H}_{AB}|^2. \quad (2.17)$$

Como a interação entre os dois spins é do tipo dipolo-dipolo, \mathcal{H}_{AB} se expressa como

$$\mathcal{H}_{AB} = \frac{\boldsymbol{\mu}_A \cdot \boldsymbol{\mu}_B}{r_{AB}^3} - \frac{3(\boldsymbol{\mu}_A \cdot \boldsymbol{r}_A)(\boldsymbol{\mu}_B \cdot \boldsymbol{r}_B)}{r_{AB}^5}, \quad (2.18)$$

e substituindo $\boldsymbol{\mu}_A = -g_A \mu_B \mathbf{S}_A$ obtemos:

$$\mathcal{H}_{AB} = \frac{g_A g_B \mu_B^2 \mathbf{S}_A \cdot \mathbf{S}_B}{r_{AB}^3} - \frac{3g_A g_B \mu_B^2 (\mathbf{S}_A \cdot \boldsymbol{r}_A)(\mathbf{S}_B \cdot \boldsymbol{r}_B)}{r_{AB}^5} \quad (2.19)$$

Se os dois spins forem iguais $\mathbf{S}_A = \mathbf{S}_B$, e $g_A \simeq g_B$, então

$$\mathcal{H}_{AB} = \frac{g^2 \mu_B^2}{r_{AB}^3} S(S+1)[1 - 3 \cos^2 \theta], \quad (2.20)$$

onde θ é o ângulo entre os raios vetores dos íons nos sítios A e B.

2.1.5 Engarrafamento de fónons

Uma maneira pela qual a energia dos modos vibracionais da rede pode ser perdida é através de espalhamento na fronteira da rede, quando a energia é transferida para um reservatório térmico maior (banho térmico). Geralmente o contato térmico banho-rede é eficiente, de modo que toda a energia transferida para a rede é imediatamente transferida para o banho, ou seja, normalmente o processo de relaxação ocorre em uma situação de equilíbrio térmico entre a rede e o banho.

Eventualmente este equilíbrio pode não ocorrer, isto é, pode acontecer de o fluxo de energia dos spins para os fónons da rede ser muito mais rápido do que o fluxo da

rede para o banho, fazendo com que o processo de relaxação seja mais lento do que o esperado, uma vez que os spins comportam-se como se estivessem relaxando para uma rede a uma temperatura maior do que a sua temperatura real. Este efeito é conhecido como engarrafamento de fónons e dá origem a uma dependência com a temperatura da forma [29]

$$\frac{1}{T_1} \propto \coth^2 \left(\frac{\hbar\omega}{2kT} \right) \quad (2.21)$$

Em espectrometros de banda-X, cuja frequência de microonda é da ordem de 10 GHz, para temperaturas maiores que 1K a equação (2.21) reduz-se a

$$\frac{1}{T_1} \propto T^2. \quad (2.22)$$

2.1.6 Sistemas com Estados de Tunelamento Localizado (ETL)

Sólidos amorfos apresentam um certo número de átomos ou grupos de átomos, que podem ocupar igualmente duas posições de equilíbrio. A energia do sistema apresenta, então, dois mínimos locais separados por uma barreira, através da qual pode ocorrer tunelamento [33].

A interação entre fónons e ETL foi usada para explicar a grande largura de linha fluorescente [34] e a taxa de relaxação spin-rede [35] em vidros.

Dois características importantes de um sistema com ETL são: (1) a existência de uma larga distribuição de valores da energia de desdobramento entre os dois mínimos e, (2) um valor desta energia muito maior que o desdobramento Zeeman $\hbar\omega_{ab}$. Foi proposto que esta distribuição é constante até um limite E_{max}/k na faixa de 10 – 100 K

O mecanismo de relaxação é representado esquematicamente a seguir [34]. As taxas de relaxação rápidas entre os estados de tunelamento ψ_+ e ψ_- , $\frac{1}{\tau}$, são representadas pelas linhas sólidas. Este mecanismo é suficientemente eficiente para manter o sistema

de ETL em equilíbrio com o banho térmico. As taxas de relaxação do sistema de spin são representadas pelas linhas pontilhadas. Este processo ocorre através das transições mútuas nos estados do ETL (ψ_+ e ψ_-) e de spin (+ e -), induzidas pela fraca interação entre os dois sistemas, com consequente emissão ou absorção de um fónon.

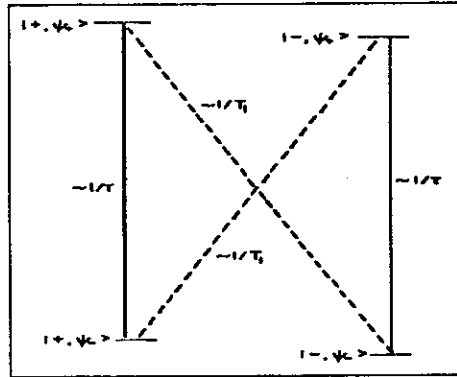


Figura 2.5: Diagrama dos níveis de energia e funções de onda para um sistema de spin acoplado a um sistema com ETL.

A taxa de relaxação é calculada usando a teoria de perturbação de 2ª ordem envolvendo \mathcal{H}_{ES} e \mathcal{H}_{EF} , as hamiltonianas ETL-spin e ETL-fónons, respectivamente. \mathcal{H}_{EF} cria ou destrói um fónon de energia E e modifica ETL. Enquanto que \mathcal{H}_{ES} troca o spin e o ETL. Desta forma a taxa de relaxação calculada é dada por [36]:

$$\frac{1}{T_1} = \int_0^{E_{max}} \frac{E \rho(E)}{\sinh(E/kT)} dE \quad (2.23)$$

onde $\rho(E)$ é a densidade de estados do sistema ETL. O fator adicional E é utilizado para se levar em consideração a criação ou destruição de um fónon, e E_{max} é o valor limite anteriormente citado.

Se a densidade de estados for parametrizada da forma $\rho(E) = E^\lambda$

$$\frac{1}{T_1} = \int_0^{E_{max}} \frac{E^{1+\lambda}}{\sinh(E/kT)} dE. \quad (2.24)$$

Assim,

$$\frac{1}{T_1} \propto T^{2+\lambda} \quad \text{quando } E_{max} \gg kT, \quad (2.25)$$

e

$$\frac{1}{T_1} \propto T \quad \text{quando } E_{max} \ll kT. \quad (2.26)$$

2.2 Mecanismos de relaxação spin-rede em hemoproteínas

2.2.1 Hemoproteínas férricas

O mecanismo de relaxação depende do estado de spin do íon Fe^{+3} . Se a proteína estiver no estado spin alto ($S = 5/2$), o mecanismo de relaxação dominante é o processo Orbach, com a energia característica Δ igual ao desdobramento de campo zero $2D$, cujo valor depende do 6º ligante, como por exemplo 12 cm^{-1} e 21 cm^{-1} para *metaMbF* (figura 2.6) e *metaMb*, respectivamente [37,38].

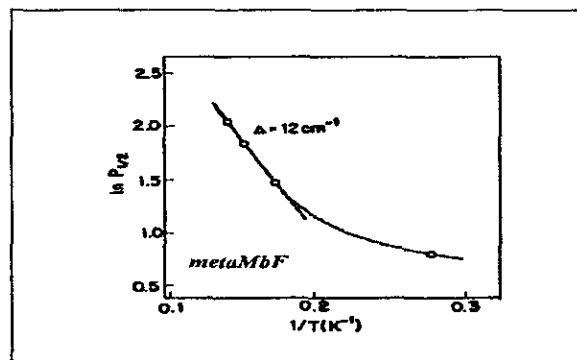


Figura 2.6: Relaxação spin-rede de *metaMbF* [37].

No estado spin baixo ($S=1/2$) o mecanismo de relaxação dominante é um processo Raman. Entretanto, à baixas temperaturas (3 a 11K) observa-se uma dependência da forma $T^{6,22-6,33}$ (figura 2.7), diferente da esperada T^9 (equação 2.8) para este mecanismo. Conforme veremos no capítulo 4, esta dependência pode ser explicada considerando-se a estrutura fractal da proteína, com a dimensão física sendo substituída pela dimensão fractal da cadeia proteica.

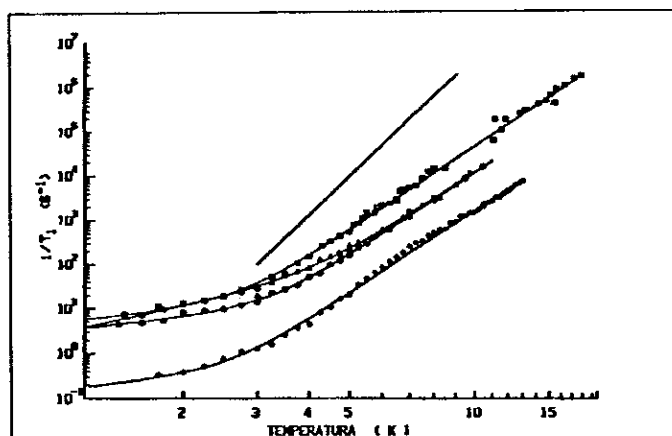


Figura 2.7: Relaxação spin-rede de hemoproteínas férricas spin baixo. Os símbolos e as linhas representam os resultados experimentais com os respectivos ajustes, e a linha separada representa T^9 . □ citocromo c; Δ Mb; \circ MbN₃; \diamond citocromo P450 [39].

Quando a proteína apresenta uma mistura de spin alto e spin baixo, este último não relaxa via um processo Raman. Ao invés disso, ambos os estados relaxam através do mecanismo Orbach (figura 2.8). Nesse caso, o estado de spin baixo relaxa para a rede via interconversão para o estado spin alto que sofre relaxação Orbach antes de voltar para o estado de spin baixo [40].

Além dos mecanismos descritos acima, observou-se que a temperaturas muito baixas (próximas a 1 K), algumas hemoproteínas apresentavam taxa de relaxação proporcional a

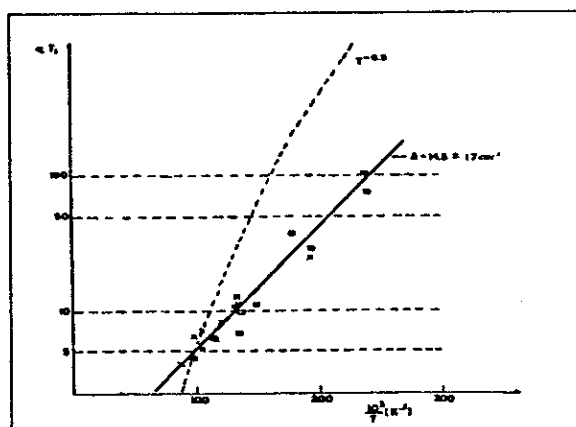


Figura 2.8: Relaxação spin-rede de hemoproteínas férricas com mistura de spin baixo e alto. □ spin alto e × spin baixo [40].

T^2 . Esta dependência foi associada a um processo de relaxação direta com engarrafamento de fónons [29].

O processo de relaxação cruzada e as equações propostas por Blombergem et al [31] foram recentemente modificadas para análise da relaxação de porfirinas e hemoproteínas férricas spin baixo ligadas a spin-marcadores (spin-label) [41,42]. Os dados foram utilizados para determinar a distância entre o spin-marcador e o Fe em Im-metaHb e CN-metaHb, e os valores encontrados estão na faixa de 15 a 15,5 Å.

2.2.2 Nitrosil hemoproteínas

Os mecanismos observados em complexos hemoproteicos férricos, não foram observados em nitrosil hemoproteínas.

Estudos iniciais de nitrosil mioglobina (NOMb) no intervalo de 4.2 a 20 K mostraram uma dependência linear do tempo de relaxação spin-rede com a temperatura, mas nen-

huma tentativa para identificação do mecanismo foi feita [43]. Posteriormente observou-se que em uma faixa mais larga de temperatura (9 a 310 K), o mecanismo de relaxação de NOMb poderia ser descrito pelo modelo ETL com $\lambda = 0,2 \pm 0,3$ (figura 2.9), o que corresponde a um valor de E_{max} menor do que o valor observado para sólidos amorfos. Os dois níveis do ETL podem estar relacionados com duas diferentes orientações da molécula de NO ligada [44].

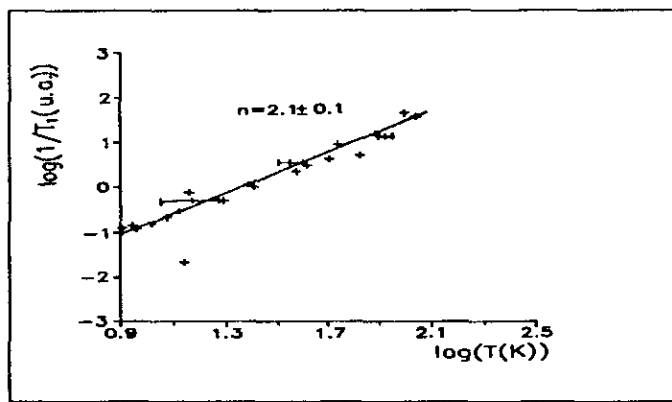


Figura 2.9: Relaxação spin-rede de pó de NOMb [44].

Em cristais de nitrosil hemoglobina (NOHb), na faixa de temperaturas de 1.6 a 4.2 K, os valores muito próximos das taxas de relaxação spin-rede e spin-spin e o comportamento da saturação, levaram a hipótese de que a relaxação spin-rede é dominada pela relaxação cruzada entre as hemes das cadeias. Para temperaturas maiores que 80-85 K, a dependência da forma do sinal com a temperatura, indicou que a relaxação spin-rede torna-se muito mais efetiva e a relaxação cruzada deixa de ser observada [45].

Mais recentemente, foi observado que a componente A, associada a uma das conformações de HbNO em solução, relaxa via um mecanismo tipo Orbach com $\Delta = 28 \text{ cm}^{-1}$ (figura 2.10) [19]. As outras componentes, B e C, descritas no capítulo anterior, apresentam valor de $P_{1/2}$ muito alto de modo que não foi possível determinar o mecanismo de

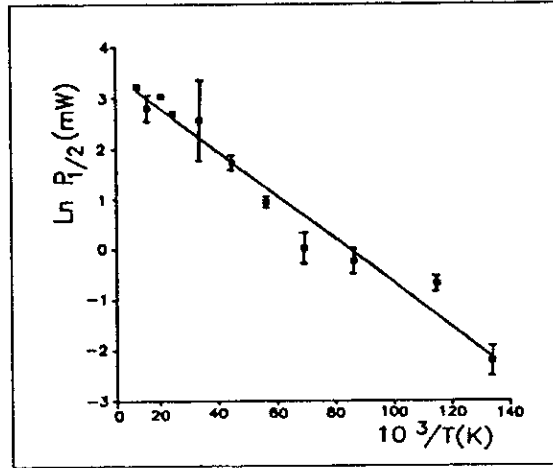


Figura 2.10: Relaxação spin-rede da componente A de NOHb [19].

relaxação através da técnica de saturação contínua.

Capítulo 3

Dinâmica de Hemoproteínas

O processo de ligação do ligante à heme ocorre através de uma reação química, portanto a compreensão deste processo baseia-se na teoria da cinética de reações químicas.

Neste capítulo descrevemos brevemente algumas das principais características desta teoria e analisamos-as para o processo de ligação heme-ligante.

3.1 Cinética das reações químicas

Os dados experimentais da cinética química são registros da concentração dos reagentes e dos produtos de uma reação em função do tempo. As expressões teóricas para as velocidades das reações em função das concentrações de produtos e reagentes são equações diferenciais do tipo

$$\frac{dc_1}{dt} = f(c_1, c_2, \dots, c_n), \quad (3.1)$$

onde c_1, c_2, \dots, c_n são as concentrações dos produtos ou reagentes que estão sendo usadas para medir a velocidade da reação.

Em muitos casos verifica-se que a velocidade, escrita em termos do decréscimo da concentração de um reagente, depende do produto de potências das concentrações das outras espécies presentes da seguinte forma:

$$-\frac{dc_1}{dt} = kc_1^a c_2^b \cdots c_n^n, \quad (3.2)$$

onde k é a constante de velocidade que independe do número de espécies.

A ordem da reação é então definida como a soma dos expoentes dos termos de concentração que aparecem nesta equação. Se a soma dos expoentes for igual a 1, a reação é de primeira ordem, se for 2 de segunda e assim por diante.

A ordem de uma reação não precisa ser um número inteiro, podendo ser nula ou fracionária, e é determinada unicamente pelo melhor ajuste da equação da velocidade com os dados experimentais.

3.1.1 Reações de primeira ordem

As reações de 1ª ordem mais simples são reações irreversíveis da forma



Nestes casos, a velocidade de formação de B ou de consumo de A é dada por

$$\frac{dA(t)}{dt} = -\frac{dB(t)}{dt} = -k(T)A(t)dt, \quad (3.4)$$

onde $k(T)$ é a constante de velocidade da reação independente do tempo mas dependente da temperatura, $A(t)$ e $B(t)$ são as concentrações das espécies A e B no tempo t .

A evolução temporal da reação é descrita por

$$A(t) = A(0)e^{-k(T)t}, \quad (3.5)$$

onde $A(0)$ é a concentração de A no tempo 0, ou seja, antes de iniciar a reação.

As reações de 1ª ordem mais gerais são reações reversíveis do tipo



Se chamarmos de k_{AB} e k_{BA} as constantes de velocidade de primeira ordem nos sentidos direto e inverso, a equação diferencial da velocidade é dada por

$$\frac{dA(t)}{dt} = -k_{AB}A(t) + k_{BA}B(t) = -k_{AB}A(t) + k_{BA}[1 - A(t)] \quad (3.7)$$

Se considerarmos que $A(0) = 1$ e $B(0) = 0$, e definirmos a constante de equilíbrio $k' = \frac{k_{AB}}{k_{BA}}$, obtemos

$$A(t) = \frac{1}{k' + 1} + \frac{k'}{k' + 1} e^{-(k_{AB} + k_{BA})t} \quad (3.8)$$

A reação ocorre com a taxa $k_{AB} + k_{BA}$, ou seja, alguns dos reagentes que passam para produtos (de A para B) são recuperados (retornam para A).

3.1.2 Reações de segunda ordem

Consideremos agora as reações do tipo



Para estes processos a equação diferencial de velocidade se escreve:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} = -\frac{dP}{dt} = -kAB. \quad (3.10)$$

Se A e B desaparecerem com a mesma taxa, podemos escrever

$$B - A = \alpha, \quad (3.11)$$

onde α é o excesso (ou deficiência) de B em relação a A. Então,

$$\frac{dA}{dt} = -kA(A + \alpha). \quad (3.12)$$

A solução geral é dada por [46]

$$N(t) = \frac{L}{\left[1 + \frac{L}{N(0)}\right]e^{L\beta kt} - 1} \quad (3.13)$$

onde $N(t) = \frac{A(t)}{\beta}$, $\beta = A_o + P_o$ e $L = \frac{\alpha}{\beta}$.

Podemos notar através das equações (3.9) e (3.13) que os coeficientes de velocidade apresentam diferentes dimensões em reações de diferentes ordens. Para a reação de 1ª ordem k tem dimensão do inverso do tempo, enquanto que na de segunda ordem tem dimensão do inverso do produto entre tempo e concentração.

3.2 Transições de Arrhenius e efeito tunel

Vamos agora analisar o processo de ligação em mais detalhes utilizando um caso simples. Consideremos uma partícula de massa M em equilíbrio térmico com a sua vizinhança. A partícula está em um poço de potencial B separado de um poço mais profundo A por uma barreira de energia E_{BA} (figura 3.1).

Assumiremos que a partícula está inicialmente no poço B e que existem muitos sistemas idênticos, de modo que podemos considerar o valor médio de suas propriedades.

A uma temperatura T , os níveis no poço B são ocupados de acordo com uma distribuição de Boltzmann e duas situações podem ocorrer. A altas temperaturas, alguns níveis acima da barreira são ocupados e as partículas podem mover-se sobre a barreira classicamente, com a taxa sendo descrita pela equação de Arrhenius

$$k(T) = A \exp\left(-\frac{E_{BA}}{k_B T}\right), \quad (3.14)$$

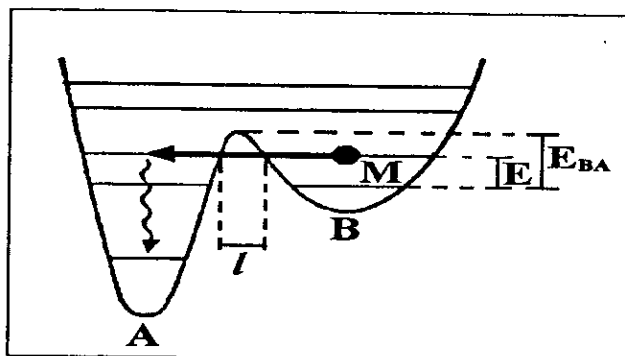


Figura 3.1: Estados envolvidos em um processo de ligação simples

onde A é o fator de frequência ou pré-exponencial independente de T , k_B é a constante de Boltzmann e E_{BA} é a energia de ativação. A partir de medidas da taxa de reassociação, os valores de A e E_{BA} podem ser obtidos da curva de $\log k \times 1/T$.

A temperaturas muito baixas, somente os níveis mais baixos são ocupados, para mover-se para o poço A, a partícula deve tunelar quanticamente através da barreira. O tunelamento quântico pode também ser dependente da temperatura, mas, no limite de $T \rightarrow 0$, permanece finito e torna-se independente de T . Para uma barreira com altura $E_{BA} \gg k_B T$ o limite de baixa temperatura da taxa de reassociação pode ser escrito como [47]

$$k_t(E) = A_t \exp \frac{-\gamma(2ME)^{1/2}l(E)}{\hbar}, \quad (3.15)$$

onde A_t é o fator pré-exponencial, $l(E)$ a largura da barreira na energia E e γ um fator numérico que depende da forma da barreira. Para uma barreira triangular, $\gamma = 4/3$, para uma parabólica $\gamma = \pi/2$ e para uma quadrada $\gamma = 2$.

3.3 Fotodissociação em hemoproteínas

Nas últimas duas décadas estudos da cinética de reação de ligantes a hemoproteínas tem sido realizado principalmente através de experiências de fotodissociação [17, 48-58]. Na hemoproteína H com o ligante L ligado, HL, a ligação é rompida através de um pulso de luz. A reação de dissociação



ou de religação



pode então ser acompanhada através da variação de alguma propriedade característica do estado de ligação ou não da hemoproteína. Os resultados esperados baseando-se na teoria da cinética de reações químicas são resumidos abaixo.

Inicialmente o ligante está covalentemente ligado à heme. A ligação é então rompida e o ligante move-se para o bolso da heme. Em temperaturas inferiores a 200 K o ligante não pode sair do bolso da heme para o solvente, pois não tem energia suficiente para vencer a barreira imposta pela matriz proteica. Então, deveria religar-se à heme em uma reação de primeira ordem, ou seja, a fração de moléculas não ligadas após a fotodissociação dependeria exponencialmente do tempo t (eq. 3.9).

Acima de 200 K o ligante sai do bolso da heme para o solvente onde passa a competir para religar-se com os outros ligantes presentes. Neste caso, a taxa de moléculas não ligadas dependeria também das concentrações dos ligantes e a reação seria de segunda ordem (equação 3.13).

Entretanto, os resultados experimentais são muito mais complexos e não estão de acordo com estas previsões, conforme veremos a seguir.

3.3.1 Carboxihemoproteínas e oxihemoproteínas

O processo de religação das moléculas de O_2 e CO a hemoproteínas pode ser acompanhado por técnicas óticas, pois os picos característicos dos estados deoxi e ligado são facilmente isolados e esses ligantes são muito fotossensíveis [46,48-51,55,56].

Nas figuras 3.2a e 3.2b são mostradas as variações temporais da fração de moléculas de Mb de baleia que não se religam ao ligante no tempo t , $N(t)$, após fotodissociação. Os resultados indicam a existência de 4 diferentes processos caracterizados por suas dependências com a concentração e temperatura.

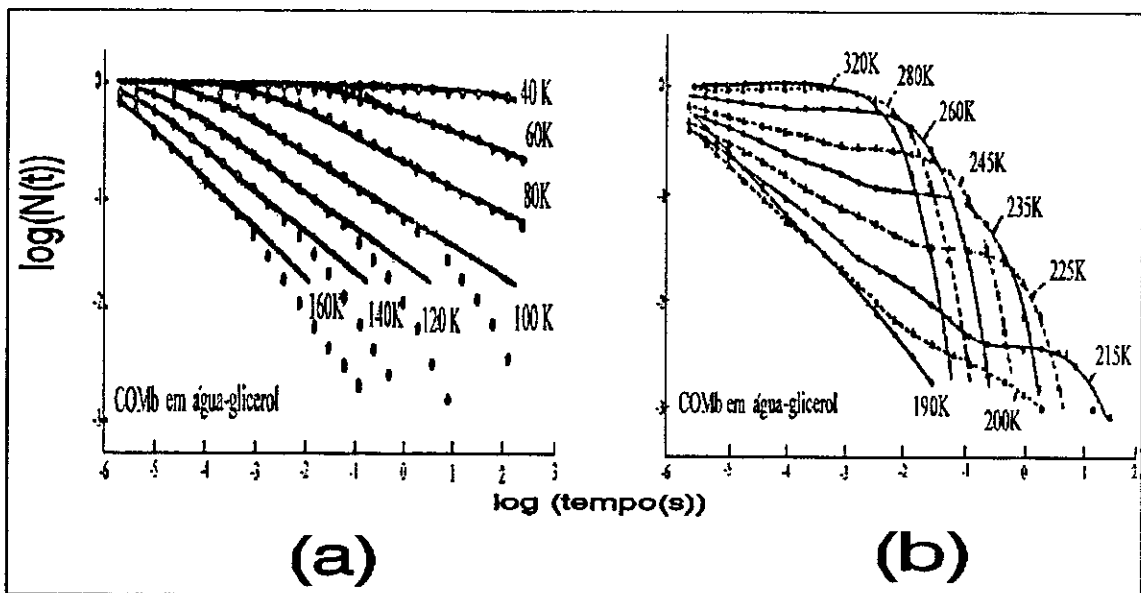


Figura 3.2: Religação de CO à Mb de baleia abaixo de 160 K (a) e acima de 190 K (b) [48].

O processo I, chamado processo interno e também conhecido como geminado, ocorre isoladamente abaixo de temperaturas menores que aproximadamente 180 K, e para tempos curtos acima de 240 K. Este processo não depende exponencialmente do tempo, e a

dependência temporal de $N(t)$ pode ser ajustada por uma potência do tipo

$$N(t) \simeq \left(1 + \frac{t}{t_0}\right)^{-n}, \quad (3.18)$$

onde t_0 e n são parâmetros que só dependem da temperatura para $T > 20$ K.

A temperaturas intermediárias, entre 180 e 240 K, pode-se observar todos os quatro processos em uma mesma temperatura.

O processo IV, também chamado de S (solvente), é observado à temperaturas maiores que 240 K, sendo, conforme esperado, aproximadamente exponencial no tempo e proporcional a concentração do ligante no solvente após a fotodissociação.

3.4 Modelos para dinâmica de hemoproteínas

Podemos observar dos resultados citados acima que a cinética de reação do ligante à heme em hemoproteínas não segue as equações previstas pela teoria da cinética das reações químicas. Vários modelos foram propostos para explicar este comportamento. Nesta seção discutimos dois modelos que propõe modificações àquela teoria. Apresentaremos principalmente as características dos modelos que explicam a fase geminada que pode ser isolada a baixas temperaturas, na qual trabalharemos.

3.4.1 Modelo de soma de exponenciais

O modelo exponencial baseia-se na observação que uma lei de potência do tipo da equação (3.18) pode ser gerada por uma soma de exponenciais. Assim os resultados experimentais que não podem ser ajustados por uma equação do tipo (3.9), que descreve

a cinética de reações de 1ª ordem, poderão ser descritos por um somatório destas equações da forma [55,59]

$$N(t) = N(0) \sum_q A_q e^{-k_q t}. \quad (3.19)$$

Ou seja, o modelo propõe que nem todas as moléculas da proteína reagem com os ligantes de forma idêntica, mas que existem as populações principais que reagem aproximadamente da mesma maneira, isto é, com a mesma constante de velocidade.

3.4.2 Modelo de Subestados Conformacionais

No modelo de subestados conformacionais o somatório de exponenciais é substituído pela integral [48]

$$N(t) = \int dE_{BA} g(E_{BA}) \exp -k_{BA}(E_{BA}, t) t \quad (3.20)$$

onde $g(E_{BA}) dE_{BA}$ é a probabilidade da proteína apresentar uma barreira para a religação do ligante com altura entre E_{BA} e $E_{BA} + dE_{BA}$.

Este modelo baseia-se na hipótese de que as proteínas apresentam uma distribuição de energias conformacionais complexa, com um grande número de mínimos ou vales separados por barreiras energéticas. Os mínimos de energia são chamados de subestados conformacionais (SC), os quais são aproximadamente isoenergéticos e correspondem à mesma estrutura total da proteína, com diferença apenas em pequenos detalhes. Os SC são arranjados hierarquicamente, isto é, o perfil energético de uma proteína consiste de vales dentro de vales com várias camadas de subestados. Os subestados na camada mais alta são chamados SC0, na seguinte SC1, e assim por diante. As barreiras de energia entre os SC são maiores na camada 0 e diminuem a medida que o número das camadas aumentam. Cada SC é caracterizado por uma barreira E_{BA} , a religação é exponencial e é dada pela constante de velocidade $k_{BA}(E_{BA}, T)$. Diferentes SC implicam em diferentes

barreiras, e conseqüentemente em diferentes $k_{BA}(E_{BA}, T)$.

A baixas temperaturas, cada molécula proteica permanece congelada em um SC diferente e conseqüentemente a religação total é não exponencial no tempo, sendo dada pela equação (3.20).

A temperaturas abaixo de 20K a recombinação ocorre via tunelamento e depende da massa do ligante (efeito isótopo) [48,49]. Neste caso k_{BA} é dada pela equação

$$k(E_{BA}, T) = A_{BA}(T) \exp\left(-\varepsilon E_{BA}^{\delta+1/2}\right), \quad (3.21)$$

onde δ é um parâmetro livre, normalmente escolhido igual a unidade e, considerando a barreira parabólica, ε é dado por

$$\varepsilon = \frac{\pi}{2 \hbar} \frac{(2M)^{1/2} d_o}{E_p}, \quad (3.22)$$

com M sendo a massa reduzida do Fe e ligante, e d_o a largura da barreira.

Na faixa aproximada de 20 a 240K o ligante cruza classicamente a barreira e a constante de velocidade é descrita pela relação de Arrhenius

$$k(E_{BA}, T) = A_{BA} \left(\frac{T}{T_o}\right) \exp\left(-\frac{E_{BA}}{k_B T}\right), \quad (3.23)$$

onde T_o é uma temperatura de referência escolhida como 100 K.

A equação 3.20 descreve a religação se a barreira em cada SC permanecer constante. Entretanto, as estruturas de hemoproteína ligada e desligada são diferentes e, após a fotodissociação, a proteína relaxa para a estrutura desligada. Esta relaxação envolve um deslocamento elástico muito rápido e uma mudança conformacional suave. Tais mudanças estruturais aumentam a altura da barreira, E_{BA} , resultando em uma recombinação mais lenta.

A baixas temperaturas a função distribuição $g(E_{BA})$ é independente do tempo e da temperatura, pois cada molécula proteica permanece congelada em um determinado SC.

Mas, com o aumento de temperatura, as transições entre SC são ativadas termicamente, levando a um estreitamento, e eventual colapso, de $g(E_{BA})$ para uma função δ no valor médio $\langle E_{BA} \rangle$.

Ambos os processos descritos acima, relaxação conformacional e flutuações térmicas, começam a ocorrer a temperaturas da ordem de 160K [51], de modo que abaixo de 160K, $g(E_{BA})$ independe do tempo e da temperatura, e pode ser obtido pela transformada de Laplace da equação 3.21, resultando em

$$g(E_{BA}) = g_o \exp[\alpha(E_{BA}^p - E_{BA}) - \eta \exp \frac{\alpha}{\eta}(E_{BA}^p - E_{BA})], \quad (3.24)$$

com

$$\int_0^\infty g(E_{BA}) dE_{BA} = 1, \quad (3.25)$$

onde g_o é a constante de normalização, α e η determinam a forma da distribuição e E_{BA}^p é a energia do pico da distribuição.

Outros modelos foram propostos para a distribuição de energia $g(E_{BA})$. Dois destes tratam o problema do ponto de vista microscópico e assumem que os SC obedecem a estatística de Boltzmann, resultando em uma distribuição de energia $g[E(x)]$, onde x é a coordenada conformacional da proteína que parametriza cada SC [60,61]. As diferenças entre estes modelos estão no potencial conformacional, $V(x)$, que descreve as flutuações entre os subestados proteicos, e na rigidez conformacional, f . Um deles apresenta $V(x)$ harmônico e f independente do estado de ligação da proteína [60], enquanto que para o outro $V(x)$ é anarmônico e f depende do estado de ligação [61].

As curvas de cinética de hemoglobina de carpa a 100, 140 e 180 K podem ser igualmente ajustados por qualquer uma das três distribuições acima [62]. As diferenças entre os mesmos levam a diferentes formas para a distribuição de energia, entretanto, verificou-se que a energia do pico e o fator de frequência de Arrhenius são independentes do modelo.

3.5 Nitrosil hemoproteínas

A fotodissociação de NO-hemoproteínas a baixas temperaturas pode ser observada tanto por técnicas óticas como por RPE [17, 52-54,57,58].

A temperaturas da ordem de 10 K, inicia-se a reassociação da molécula de NO à Mb de baleia. Uma reassociação inicial muito rápida pode ocorrer, seguida de uma mais lenta que pode durar horas. Conseqüentemente à medida que a temperatura aumenta a fotodissociação de NOMB torna-se progressivamente mais difícil, até que, a 24 K, somente 20% dos sítios fotodissociáveis a baixas temperaturas podem ser fotodissociados [53].

Iluminando-se continuamente, a 4,2 K, uma amostra de NOHb humana observa-se um decréscimo gradual na intensidade do espectro de RPE devido a fotodissociação de NO, tanto na presença como na ausência de IHP (figura 3.3). Após 30 minutos deixa de ocorrer fotodissociação, algumas moléculas permanecem ligadas e não ocorre reassociação [17].

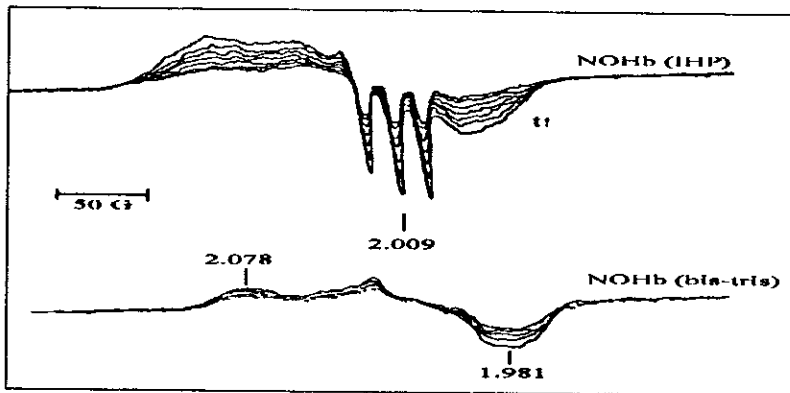


Figura 3.3: Espectros de RPE de NOHb com e sem IHP e sob iluminação contínua. T:4,2K [17].

O processo de fotodissociação também depende da estrutura quaternária da molécula

(figura 3.4). A fração de moléculas fotodissociadas, medidas por RPE, sob as mesmas condições, diminui conforme a afinidade do ligante aumenta, ou seja, é menor no estado R do que no estado T [58].

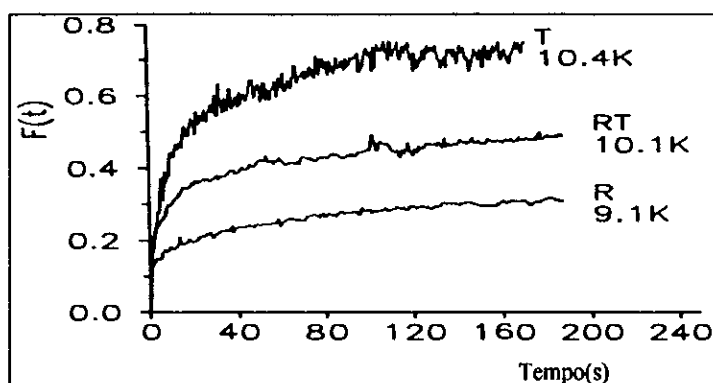


Figura 3.4: Fração de moléculas de NO fotodissociadas, sob iluminação contínua, para três diferentes estruturas quaternárias [58].

A fotodissociação de NO-hemoproteínas pode ser observada a temperatura ambiente por espectroscopia ótica usando pulsos de picosegundos para dissociar o ligante [52,54]. A vantagem desta técnica é a possibilidade de observação de mudanças em uma escala de tempo na qual grandes mudanças conformacionais são improváveis. A evolução temporal do fotoproduto de NOHb mostrada na figura 3.5, permite identificar duas componentes: X_1 , com um tempo de vida de 17 ps e, X_2 , com um tempo de vida de aproximadamente 100 ps. Após 400 ps todo NO religa-se com o Fe da heme.

O advento da técnica de mutação proteica em um sítio específico possibilita criar proteínas mutantes que, ao contrário de proteínas de diferentes origens, apresentam um único amino ácido diferente da proteína nativa. Torna-se então possível compreender qual o papel desempenhado pelo amino ácido que foi substituído nas mudanças estruturais que ocorrem durante a reação do ligante a heme [63-67].

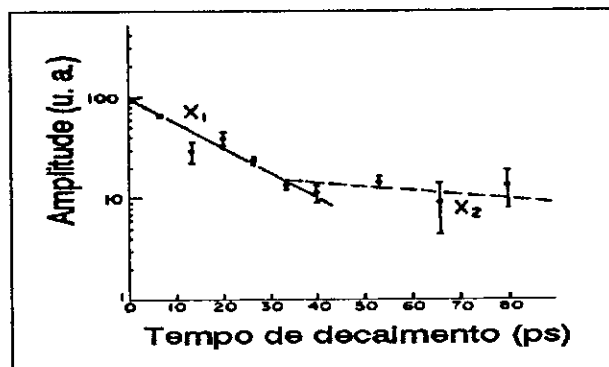


Figura 3.5: Amplitudes dos espectros óticos dos fotoprodutos de NOHb dissociados por pulsos de picosegundos [54].

As posições mais estudadas em Mb humana são as de superfície que formam pontes salinas na forma ligada, que são a lisina na posição 45 e o aspartato na posição 60, e os resíduos no lado distal da heme, valina 68 e histidina distal 64.

A figura 3.6 permite uma comparação do processo de religação de NO entre Mb mutantes e nativa. A proteína usada como nativa é, na verdade, uma outra mutante chamada “wild tipe” (WT), na qual a cisteína 110 é substituída por uma alanina. Esta substituição simplifica a purificação da proteína, pois a cisteína pode oxidar-se e a alanina não, esta última não altera qualquer uma das propriedades utilizadas para observação da cinética de religação [64]. As cinéticas para todas as proteínas são não exponenciais, sendo muito diferentes quando o resíduo modificado é o da posição 68, e muito semelhantes para modificações na posição 45, exceto a mutante K45R [66].

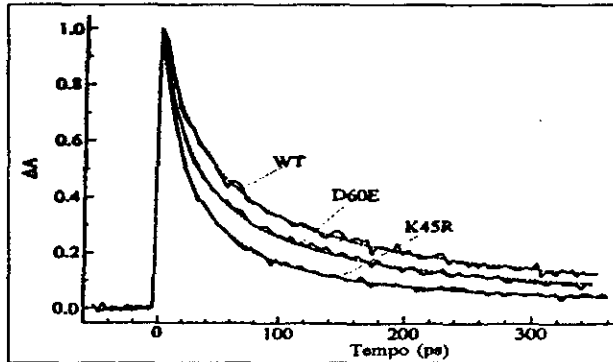


Figura 3.6: Recombinação de NO a mutantes de Mb humana [66].

3.5.1 Modelo de soma de exponenciais

A recombinação geminada na faixa de picosegundos de NO com Mb de baleia e elefante foi analisada pelo modelo exponencial. Observou-se que a reassociação de NO com Mb de elefante pode ser ajustada por somente uma exponencial, enquanto que para a Mb de baleia são necessárias duas exponenciais [54]. As constantes de velocidade são mostrados na tabela 3.1.

Amostra	$k \text{ s}^{-1}$
NOMb de elefante	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{11}$
NOMb de baleia	$1.6 \pm 0.9 \times 10^{11}$
	$1.4 \pm 0.7 \times 10^{10}$

Tabela 3.1: Constantes de velocidade para recombinação de NOHb de elefante e baleia. $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$. Adaptada de [54].

A diferença encontrada entre a recombinação de NO às duas proteínas foi associada ao resíduo distal. Na Mb de baleia este resíduo é uma histidina enquanto que na Mb de

elefante é uma glutamina. A histidina possui um anel heterocíclico de cinco membros que está posicionado sobre o Fe no bolso da heme. As duas componentes da recombinação geminada corresponderiam às conformações de entrada aberta ou restrita da histidina distal. A glutamina não apresenta anel e não poderia representar uma restrição para a recombinação de NO.

A religação após fotodissociação em baixos pH de NO a Mb de baleia ou cavalo também pode ser descrita por uma exponencial simples com uma constante de velocidade da ordem de $10^{11} s^{-1}$ [68]. A explicação sugerida foi que as alterações que ocorrem na cadeia proteica após dissociação, e que dão origem a recombinação geminada bifásica, não são transferidas para a heme, pois a forte ligação entre a histidina proximal e o ferro é enfraquecida ou rompida nesta faixa de pH.

O modelo exponencial foi usado para análise dos resultados de fotodissociação de HbNO a baixas temperaturas (5 a 20K), estudada por RPE. A fração normalizada de NO dissociado sob iluminação foi ajustada pela equação [57,58]

$$N(t) = 1 - \left[\frac{A}{F_{\infty}} \exp(-(k_{\nu} + k_1)t) + \frac{B}{F_{\infty}} \exp(-(k_{\nu} + k_2)t) \right], \quad (3.26)$$

onde $F_{\infty} = A + B$ é o valor estacionário de NO fotodissociado, A e B as amplitudes fracionárias de cada conformação, k_1 e k_2 as constantes de reassociação e k_{ν} a constante de dissociação.

Os resultados para as conformações R, T e uma mistura de R e T, chamada RT, são mostrados na tabela 3.2. Observou-se que para cada conformação a fração normalizada que se religa rápida, $(\frac{A}{F_{\infty}})$, ou lentamente, $(\frac{B}{F_{\infty}})$, é independente da temperatura (tabela 3.2). A fraca dependência com a temperatura de k_1 e k_2 sugeriu que a reassociação ocorre via tunelamento quântico.

A recombinação de NO com mutantes (figura 3.6) foi ajustada com o modelo expo-

T (K)	k_1	k_2
Conformação R - $\frac{A}{F_\infty} = 0.55 \pm 0.02$		
5.9	0.0191	0.9512
7.0	0.0080	1.4512
9.1	0.0093	1.2082
12.3	0.0527	3.4402
Conformação RT - $\frac{A}{F_\infty} = 0.40 \pm 0.05$		
6.5	0.0003	0.2616
10.1	0.0022	0.3716
13.4	0.0110	0.8786
15.5	0.0142	1.0266
Conformação T - $\frac{A}{F_\infty} = 0.50 \pm 0.10$		
10.4	0.0097	0.2772
16.2	0.0279	0.9662
17.4	0.0329	1.8482
19.6	0.0683	1.8612

Tabela 3.2: Recombinação de NOHb humana em três diferentes conformações. Adaptação de [58].

nencial da seguinte forma [66]

$$\Delta A(t) = A_1 \exp[-k_1 t] + A_2 \exp[-k_2 t] + \text{linha de base}, \quad (3.27)$$

onde a linha de base foi introduzida para normalizar os resultados e pode, para mutantes cuja ligação é mais lenta, representar uma terceira exponencial.

Os resultados dos ajustes são mostrados na tabela 3.3. As mutações afetam substancialmente os parâmetros tanto para os mutantes de superfície como os do bolso da heme. Essas mudanças na cinética de religação ocorrem na escala de picosegundos, e foram explicadas como sendo devidas à comunicação rápida entre os resíduos da cadeia proteica, ou à existência de diferenças sutis na estrutura que exercem grande controle sobre os parâmetros da dinâmica.

Proteína	A_1	$k_1 \times 10^{10}(s^{-1})$	A_2	$k_2 \times 10^9(s^{-1})$	linha de base
WT	0.44	4.08	0.49	7.14	0.08
D60E	0.45	5.98	0.49	9.05	0.07
K45Q	0.41	9.21	0.44	7.62	0.13
K45A	0.49	5.66	0.42	7.62	0.12
K45R	0.58	5.94	0.39	11.5	0.04
V68A	0.65	8.98	0.32	11.9	0.01
V68N	0.51	9.17	0.36	13.5	0.12
H64Q	0.48	11.2	0.43	8.20	0.07

Tabela 3.3: Recombinação geminada de NO a Mb mutantes. Adaptada de [66].

Como mencionado anteriormente a religação de NO a Mb de elefante, a qual possui uma glutamina na posição da histidina distal, foi ajustada por uma exponencial simples [54]. Este comportamento não foi observado para a mutante H64Q, que apresenta a mesma alteração. Entretanto este mutante possui somente esta alteração, o que levou à

conclusão que o comportamento de Mb de elefante está relacionado com outras diferenças na globina.

3.5.2 Modelo de subestados conformacionais

Observou-se que os parâmetros e a distribuição de energia de ativação $g(E)$ do modelo de subestados conformacionais dependem da conformação da proteína para NOHb humana (tabela 3.4 e 3.5 e figura 3.7). Os ajustes obtidos são bons somente se d_o e A_{BA} dependerem da temperatura [58].

Os parâmetros que caracterizam a barreira foram diretamente relacionados com a estrutura quaternária da proteína. Os valores de d_o e E_{BA}^p aumentam mudando da forma R para a T, em concordância com a maior afinidade do ligante com a forma R.

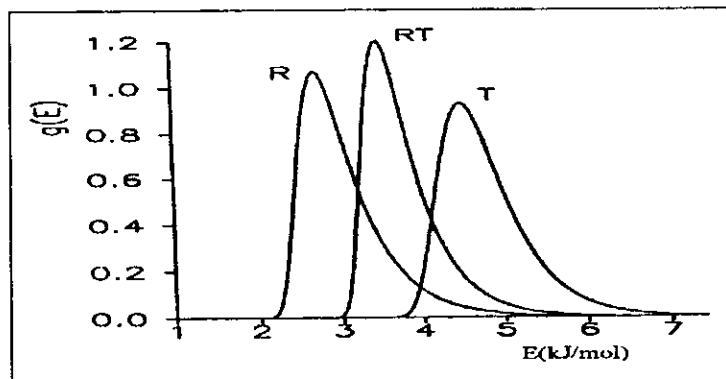


Figura 3.7: Distribuição de energia para religação de NO à Hb em tres diferentes conformações [58].

Parametro	R	RT	T
$E_{BA}^p(kJ/mol)$	2.71 ± 0.02	3.50 ± 0.20	4.50 ± 0.10
$\alpha(mol/kJ)$	2 ± 0.3	2.30 ± 0.2	2.20 ± 0.5
η	0.39 ± 0.03	0.40 ± 0.9	0.7 ± 0.1
$k_\nu(s^{-1})$	0.0098 ± 0.0002	0.0084 ± 0.0004	0.0188 ± 0.003

Tabela 3.4: Parâmetros para religação de NO a Hb humana em diferentes conformações. Adaptada de [58].

T (K)	d_o (nm)	$\log[A(s^{-1})]$
Conformação R		
5.9	0.0142	3.84
7.0	0.0145	3.87
9.1	0.0142	3.84
12.3	0.0111	4.29
Conformação RT		
6.5	0.0197	5.75
10.1	0.0182	5.75
13.4	0.0162	5.92
15.5	0.0157	5.92
Conformação T		
10.4	0.0247	3.84
16.2	0.0214	7.5
17.4	0.0207	7.5
19.6	0.0204	7.5

Tabela 3.5: Recombinação de NOHb humana em tres diferentes conformações. Adaptada de [58].

Capítulo 4

Estrutura Fractal de Hemoproteínas

Mencionamos no capítulo 2 que a dependência anômala do tempo de relaxação spin-rede com a temperatura para hemoproteínas férricas no estado de spin baixo poderia ser explicada considerando a geometria fractal da proteína.

Neste capítulo discutiremos mais detalhadamente este modelo e veremos como o conceito de fractal pode ser utilizado na descrição de outras estruturas ou processos biológicos, em especial a cinética de ligação do ligante a heme.

4.1 Fractal

Em muitos sistemas físicos o valor L de uma propriedade varia com a escala ϵ , na qual a propriedade L é medida, tal que

$$L = A\epsilon^{d_f-d}, \quad (4.1)$$

onde A é uma constante, d é a dimensão topológica ou euclidiana e d_f a dimensão fractal.

Como consequência imediata a propriedade descrita pela equação 4.1 é auto-similar,

isto é, apresenta invariância sob transformação de escala.

$$L(a\epsilon) = A(a\epsilon)^{d_f-d}$$
$$L(a\epsilon) = kL(\epsilon), \quad (4.2)$$

onde a é constante. Ou seja, L medido na escala ϵ é proporcional a L medido na escala $a\epsilon$.

Relações que dependem da escala podem ter importantes implicações para sistemas biológicos. Podemos citar como exemplo as redes de tubos dos pulmões [69], cuja característica principal é a sua assimetria. A traquéia divide-se em dois ramos de diferentes tamanhos, e esta divisão assimétrica continua em todas as regiões dos tubos dos brônquios (figura 4.1). O diâmetro médio da n -ésima geração é

$$r(n) = \frac{A(n)}{n^{d_f}}, \quad (4.3)$$

onde $A(n)$ é uma função periódica e d_f é a dimensão fractal associada a variação do diâmetro.

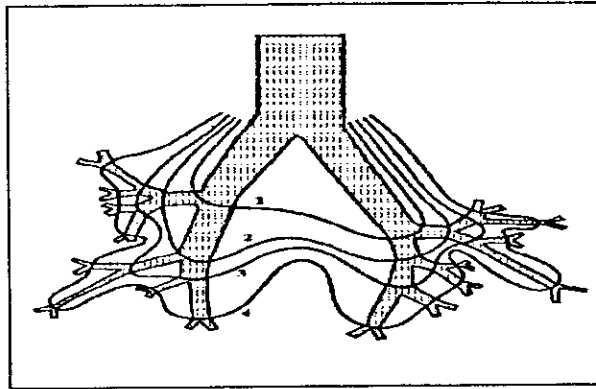


Figura 4.1: Estrutura fractal da rede de tubos dos pulmões [69].

Além dos pulmões muitas outras estruturas anatômicas são fractais, entretanto descreveremos em maiores detalhes somente a estrutura fractal de proteínas.

4.2 Exemplos da estrutura fractal de proteínas

4.2.1 Relaxação Spin-rede

Observou-se que o tempo de relaxação spin-rede em hemoproteínas férricas no estado de spin baixo apresenta uma dependência com a temperatura da forma

$$\frac{1}{T_1} \propto T^n, \quad (4.4)$$

com n variando de 5.6 a 6.3 [39,70], muito diferente do resultado esperado para este caso que é dado por (figura 2.2)

$$\frac{1}{T_1} = T^{3+2d} \quad \text{para } T \text{ baixas} \quad (4.5)$$

onde d é a dimensão euclidiana e portanto igual a 3, resultando em

$$\frac{1}{T_1} = T^9. \quad (4.6)$$

Os resultados experimentais coincidem com a previsão teórica se a proteína ocupar um espaço de dimensão fractal d_f e não um de dimensão euclidiana $d = 3$ [70]. Neste caso a dependência com a temperatura torna-se

$$\frac{1}{T_1} = T^{3+2d_f}, \quad (4.7)$$

uma vez que a densidade de estados em fractais é dada por

$$\rho(w) = w^{d_f-1}. \quad (4.8)$$

Entretanto, cálculos teóricos mostraram que [71]

$$\rho(w) = w^{d_f r-1}, \quad (4.9)$$

onde d_{fr} é o fracton, o estado vibracional quantizado em um fractal, que reflete o aspecto topológico do sistema e geralmente é diferente de d_f .

Considerando a estrutura secundária da proteína a questão levantada acima foi solucionada. Diferentes porções da cadeia proteica são unidas por pontes de hidrogênio sem massa que não alteram o valor de d_f mas mudam o valor de d_{fr} , pois alteram a topologia da cadeia proteica. Se o número de pontes de hidrogênio é grande, como nas hemoproteínas, $d_{fr} = d_f$, e o resultado experimental pode novamente ser descrito pela equação 4.7 [72]. Por outro lado, se não existe pontes de hidrogênio, isto é, se a cadeia é linear $d_{fr} = 1$, independente do valor de d_f , o expoente na equação 4.7 será igual a 5. Posteriormente mostrou-se que as interações relevantes para o cálculo de d_{fr} são somente aquelas ao longo da cadeia proteica, e que a ausência de hélices α e conectividade entre aminoácidos diminui o valor de d_{fr} [73]. A ruptura da estrutura secundária diminui o valor de d_{fr} , conforme observou-se em amostras desnaturadas de azida metahemoglobina [74].

Os valores de d_f obtidos através de medidas de relaxação estão de acordo com os resultados obtidos a partir de dados de raios-X da posição dos aminoácidos (tabela 4.1)

Proteína	Relaxação	Raios-X
Mioglobina	1.63 ± 0.04	1.66 ± 0.04
Citocromo c	1.67 ± 0.03	1.66 ± 0.05
Ferredoxina	1.34 ± 0.06	1.34 ± 0.05
Lisosoma	1.76 ± 0.05	1.76 ± 0.05

Tabela 4.1: Dimensão fractal de algumas proteínas obtidos por relaxação e raios-X. Adaptado de [39].

A região de baixas temperaturas, na qual o modelo fractal pode ser utilizado para descrever o processo de relaxação, é melhor analisada quando se utilizam proteínas que contém cobre, como a plastocianina, pois estas relaxam mais lentamente que as proteínas

férricas. Drews et al [75] estudaram a relaxação spin-rede de plastocianina usando duas amostras parecidas com somente uma pequena diferença na concentração (tabela 4.2). Os resultados para a amostra chamada I foram ajustados pela integral de Raman (equação 2.7) com a temperatura de Debye θ infinita, o que leva a uma lei de potência do tipo T^n . Entretanto observou-se que para a amostra II a lei de potência é inadequada para descrever os resultados, os quais podem ser descritos pela integral de Raman considerando θ um parâmetro ajustável (figura 4.2).

Amostra	Cu^{2+} (mM)	Cu total (mM)	n	θ (K)
I	0.62	0,97	4.81	∞
I	0.62	0,97	4.98	99.7
II	0.18	0.54	5.14	∞
II	018	0.54	5.47	89.5

Tabela 4.2: Parâmetros de relaxação spin-rede de plastocianina. Adaptado de [75].

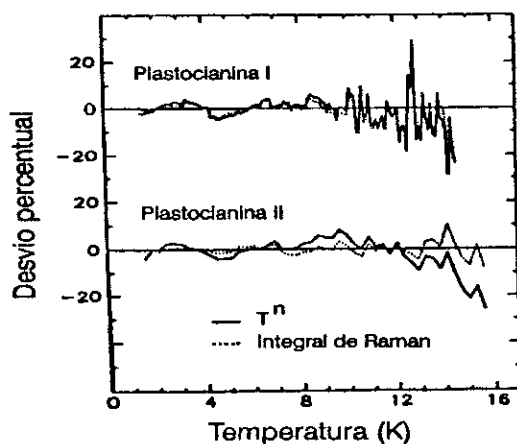


Figura 4.2: Desvio percentual dos ajustes de relaxação spin-rede de plastocianina [75].

Além disso, a grande variação nos valores de n para amostras com poucas diferenças tanto na concentração como na preparação, e a obtenção de somente um destes valores próximo ao valor calculado baseado em estimativas da dimensão fractal (5.64 ± 0.08), levou a conclusão que a dimensão fractal não está relacionada com o processo de relaxação para estas proteínas.

Os resultados do tempo de relaxação spin-rede para porfirinas Fe^{+3} spin baixo podem também ser descritos por uma lei de potência com $n = 7$ [41]. A semelhança no valor de n para porfirinas e hemoproteínas levou a hipótese que este valor depende mais do meio local da heme do que da estrutura proteica total, como anteriormente sugerido [39,70-74].

4.2.2 Capacidade Calorífica

Utilizando a densidade de fónons dada pela equação (4.8) pode-se obter a dependência da capacidade calorífica com a temperatura [76]

$$C_p \propto T^{d_f}, \quad (4.10)$$

e através do gráfico de $\log C_p \times \log T$, determinar-se o valor de d_f .

Os valores para a lisosoma c no intervalo de 4 a 40K mostraram uma grande dependência de d_f com o grau de hidratação proteica (tabela 4.3).

g H_2O /g de proteína	d_f
0.000	1.1
0.143	1.7
0.250	1.9

Tabela 4.3: Dimensão fractal da lisosoma c obtidos por medidas de C_p . Adaptado de [76].

A dimensão fractal reflete a natureza e o caráter das interações intramoleculares na proteína, pois a formação da estrutura proteica depende da cooperação entre interações intramoleculares fracas, tais como pontes de hidrogênio, e interações hidrofóbicas, para as quais as moléculas de água são fundamentais.

Uma vez que

$$C_p = \frac{\partial U}{\partial T}, \quad (4.11)$$

a energia interna da proteína é dada por

$$U \propto T^{d_f+1}, \quad (4.12)$$

isto é, a energia interna possui estrutura fractal pois apresenta auto-similaridade

$$U(\lambda T) \propto \lambda^{d_f+1}U(T). \quad (4.13)$$

4.2.3 Raios-X

Análise estrutural dos resultados de raios-X de cristais de proteínas globulares mostraram que as superfícies das mesmas apresentam uma estrutura fractal. A dimensão fractal da superfície foi obtida para várias proteínas de diferentes tamanhos, peso molecular ou função biológica. Alguns resultados são mostrados na tabela 4.4 [77].

Proteína	d_{fs} sem água	d_{fs} com água
Pepsina	2.124	2.113
Mioglobina	2.121	2.095
Citocromo c	2.106	2.100

Tabela 4.4: Dimensão fractal da superfície, d_{fs} , de algumas proteínas obtidas por análise de raios-X. Adaptado de [77].

Os valores de d_{fs} estão todos no mesmo intervalo (2.10-2.15) independentemente do tipo de proteína. Quando a camada de hidratação é considerada os valores de d_{fs} diminuem, pois a água preenche as depressões da superfície proteica.

Os valores das dimensões fractais proteicas obtidos por relaxação e calculados a partir da posição dos aminoácidos (tabela 4.1) são muito diferentes dos obtidos por análise de raios-X das superfícies das mesmas (tabela 4.4). Entretanto, estes valores estão relacionados com duas diferentes grandezas. O primeiro mede a dimensão fractal da cadeia polipeptídica total, enquanto que o segundo a rugosidade da superfície proteica.

4.2.4 Dinâmica de hemoproteínas

O processo de religação de NO a hemoglobina pode ser analisado por um modelo baseado na estrutura fractal da proteína, que foi inicialmente desenvolvido para descrever a cinética dos canais iônicos na superfície da membrana celular [78]. O conceito de fractal pode ser relacionado com o processo de religação porque o mesmo requer trajetórias estatísticas múltiplas [79].

Uma das imposições do modelo é que a proteína deve permanecer em uma conformação por um tempo suficientemente longo para ser medido, o qual define uma escala de tempo efetiva t_{ef} . A constante de velocidade efetiva k_{ef} , neste caso, é definida como a probabilidade por unidade de tempo para a proteína mudar o estado conformacional e é dada por

$$k_{ef}(t_{ef}) = -\frac{d}{dt} \ln P(t)_{t=t_{ef}} \quad (4.14)$$

Se a cinética é auto-similar

$$k_{ef}(t_{ef}) = A t_{ef}^{1+d_{fr}-d_f}, \quad (4.15)$$

onde A é o fator de frequência constante.

Desta forma:

$$P(t) = \exp\left(-\frac{A}{1 + d_{fr} - d_f} t^{1+d_{fr}-d_f}\right). \quad (4.16)$$

O modelo pode ser usado para ajustar os resultados de fotodissociação de NOHb na faixa de 5 a 20 K, relacionando a fração normalizada de NO desligada com $1 - P(t)$, então

$$N(t) = 1 - \exp\left(-\frac{A}{1 + d_{fr} - d_f} t^{1+d_{fr}-d_f}\right). \quad (4.17)$$

A equação 4.17 ajusta os resultados experimentais para $t < 100$ s. Para $t > 100$ s, os resultados são ajustados por uma exponencial simples

$$N(t) = 1 - B \exp(-kt), \quad (4.18)$$

como observa-se na figura 4.3, que também evidencia que para estes sistemas o modelo fractal e exponencial simples é mais adequado do que o modelo de subestados conformacionais.

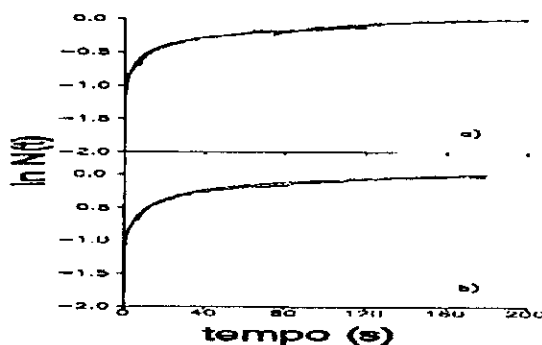


Figura 4.3: Fotodissociação de NOHb usando o modelo fractal e exponencial simples (a) e o modelo de subestados conformacionais (b) [78].

Da tabela 4.5, que mostra os resultados dos ajustes, podemos ver que os valores de $D = d_{fr} - d_f$, para cada conformação, independe da temperatura. Se a hipótese de

que somente as ligações longitudinais ao longo da cadeia proteica são importantes para o cálculo do fracton for válida , então $d_{fr}=1$ e o valor de d_f obtido para a conformação R (1.65) está de acordo com os valores obtidos por relaxação para hemoproteínas férricas spin baixo (1.48 a 1.65). Os valores para as conformações RT e T não puderam ser comparados por não encontrarem-se disponíveis na literatura.

T (K)	D	$A(s^{-1})$	$B(s^{-1})$	$k(s^{-1})$
Conformação R				
5.9	0.65 ± 0.03	0.140	0.965	0.023
7.0	0.65 ± 0.03	0.128	0.774	0.020
9.1	0.65 ± 0.03	0.132	0.565	0.160
12.3	0.65 ± 0.03	0.205	0.893	0.035
Conformação RT				
6.5	0.61 ± 0.01	0.116	0.470	0.010
10.1	0.61 ± 0.01	0.147	1.501	0.023
13.4	0.61 ± 0.01	0.174	4.289	0.038
15.5	0.61 ± 0.01	0.162	1.476	0.030
Conformação T				
10.4	0.56 ± 0.04	0.165	3.344	0.064
16.2	0.56 ± 0.04	0.203	0.283	0.027
17.4	0.56 ± 0.04	0.194	0.476	0.035
19.6	0.56 ± 0.04	0.216	0.150	0.010

Tabela 4.5: Parâmetros do modelo fractal para a recombinação de NOHb humana em três diferentes conformações. Adaptada de [78]. (A e D da equação 4.17 e B da equação 4.18)

Os valores de d_f estão na ordem decrescente indo da conformação R para T, indicando que a estrutura R é mais fechada do que a T, o que é consistente com os movimentos das

hélices observados por raios-X na transição $R \rightarrow T$.

4.3 Modelos microscópicos para a estrutura fractal

Três diferentes modelos microscópicos podem gerar o comportamento fractal, entretanto somente dois podem ser aplicados à proteínas [80].

4.3.1 Modelo hierárquico

Este modelo é qualitativamente similar ao modelo de subestados conformacionais. Baseia-se na hipótese de que existe uma hierarquia de eventos, isto é, um conjunto de procesos rápidos ocorrem antes que um conjunto de processos mais lentos se iniciem. Os eventos dentro de um determinado conjunto não estão relacionados, entretanto o tempo de mudança de um conjunto para outro estão relacionados por uma lei empírica e isto estabelece a forma final da função que descreve o processo total.

4.3.2 Modelo da difusão de defeitos

Este modelo está associado aos movimentos funcionalmente importantes (MFI): movimentos dentro da proteína que são chaves para a funcionalidade da mesma. A difusão de defeitos através da proteína até as regiões associadas aos MFI's pode disparar uma mudança conformacional. Muitos defeitos se difundem na proteína e cada um possui diferente probabilidade de atingir as regiões dos MFI's. Esta distribuição paralela do tempo de "espera" estabelece o comportamento fractal da proteína.

Capítulo 5

Procedimentos Experimentais

5.1 Preparação de amostras

As amostras de hemoglobina foram preparadas a partir de sangue humano fresco usando os procedimentos padrões. Sangue humano foi coletado em heparina (anti-coagulante) e as hemácias foram lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. As células empacotadas foram hemolizadas com água destilada e clorofórmio (concentração final de clorofórmio: 10%). Depois de 18 h a solução foi centrifugada e a solução de Hb retirada e estocada a -20°C em solução com 50% de glicerol (v/v) em tampão Tris pH 8,5.

Para retirar o glicerol da solução de Hb e ajustar o pH dois procedimentos foram utilizados, dependendo do volume da amostra. Para pequenas quantidades usamos colunas de filtração (Sephadex G-25, Sigma Co.) equilibradas com tampão fosfato pH 7 e força iônica 0,066M, e para grandes quantidades (mais de 5 ml), que saturam as colunas, foi feita diálise a 4°C durante aproximadamente 12 horas.

Para determinar as concentrações de ferro das amostras, uma pequena quantidade (0,1 ml) de Hb foi transformada em cianometahb, usando KCN 1M e $K_3[Fe(CN)_6]$ 1M em

excesso. A concentração em mM Fe foi então determinada pela relação

$$[Fe] = \frac{A_{540} f}{\epsilon l}$$

onde: $l = 1,0\text{cm}$ é o caminho ótico, largura da cubeta, $\epsilon = 11,0$ é o coeficiente de extinção molar, f é o fator de diluição, volume de H_2O mais volume de Hb/volume de Hb e A_{540} é a absorção ótica em 540 nm, banda característica de cianometaHb, medida em um espectrofotômetro Cary modelo 17.

As amostras de mioglobina equina (Sigma) foram completamente oxidadas com $K_3Fe(CN)_6$ e o excesso foi removido por colunas de filtração nas mesmas condições descritas acima.

As amostras de pó de Hb foram obtidas com um liofilizador Labconco 75200.

Hematina foi dissolvida em piridina, reduzida com ditionito de sódio em excesso e mantida em condições anaeróbicas com um fluxo de N_2 .

NOHb e NOMB em condições saturadas (NOHb na conformação R) foram preparadas através da reação do gás NO (obtido da reação de ácido nítrico com cobre metálico) com a solução deoxigenada. A adição do NO foi feita em atmosfera anaeróbica (N_2) usando um saco com luvas. NOHb na conformação T foi obtida na presença de inositol hexafosfato (IHP), dois por heme. 10% em volume de uma solução de NOHb na conformação R foram adicionados a amostras de Hb-IHP previamente deoxigenadas. As amostras foram utilizadas com no mínimo 1 hora após preparação, tempo suficiente para a redistribuição do NO entre as moléculas. As amostras dissolvidas em 75% de glicerol foram preparadas como as da conformação R após diluição da solução de Hb com glicerol 3:1 (glicerol:solução). NOHb em pó foram obtidas injetando gás NO nos tubos contendo as amostras.

Amostras desnaturadas foram preparadas tratando-as termicamente usando o banho ultratermostático Fanen-111, que mantém a temperatura estável e uniforme com erro de 1°C . As amostras demoram um período de tempo muito pequeno ($\approx 1\text{min}$) para atingir a temperatura e entrar em equilíbrio com o banho. A desnaturação das amostras foi feita a 80°C por 5 horas. Nestas condições a proteína atinge o estado final de desnaturação térmica observado por RPE [1].

As amostras utilizadas em medidas de RPE em função da temperatura foram transferidas para os tubos contendo um capilar com marcador de g, $MgCr^{+2}$.

5.2 Medidas de RPE

Medidas de RPE para os estudos da dependência do sinal com a temperatura e de relaxação spin-rede foram feitas utilizando um espectrômetro banda-X modelo Varian E-9, modificado para aquisição de dados digitalizados usando lock-in EG&G 5206, com uma cavidade retangular Bruker. Medidas de fotodissociação de NOHb foram realizadas no espectrômetro Bruker ESP 300E, com cavidade de transmissão ótica.

As medidas de temperatura entre 80 e 240K foram feitas usando um termopar Chromel×constantan e o resfriamento das amostras foi obtido através de fluxo controlado de N_2 .

Na faixa de 4K e 100 K as medidas foram feitas utilizando criostatos de fluxo de hélio (HELITRAN LTR-3-110 e Oxford GFS 600). Em ambos as temperaturas foram medidas com um termopar Au-Fe × chromel, colocado um pouco abaixo da amostra.

5.3 Relaxação spin-rede

A potência a meia-saturação, $P_{\frac{1}{2}}$, e a taxa de relaxação spin-rede T_1^{-1} foram estimadas usando o método de saturação contínua [37,39].

Foram monitoradas as intensidades das linhas $g = 2.07$ e $g = 2.011$ para as amostras desnaturadas e somente a de $g = 2.07$ para hematina.

O valor de $P_{\frac{1}{2}}$ e o parâmetro de inomogeneidade b para uma determinada temperatura foram obtidos através do ajuste dos valores experimentais da intensidade da linha I e da potência de microonda P com a equação

$$\frac{I}{\sqrt{P}} = \frac{I_{max}}{(1 + P/P_{\frac{1}{2}})^{b/2}} \quad (5.1)$$

onde I_{max} é o valor limite de I/\sqrt{P} para potências muito baixas.

O valor de T_1 foi estimado a partir do valor de b e medidas da largura de linha pico

a pico do sinal ΔH_{pp} . Utilizamos as curvas de Castner [81] com $b = a$ para obtermos o parâmetro

$$K(a) = \frac{\Delta H_{pp}}{\Delta H_L} \quad (5.2)$$

que relaciona ΔH_{pp} com ΔH_L , a largura de linha do pacote de Lorentzianas.

T_1 foi calculado a partir da equação

$$T_1 = \frac{\sqrt{3}\hbar\Delta H_{pp}}{16g\mu_B P_{\frac{1}{2}} K(a)} \quad (5.3)$$

onde μ_B é o magnetom de Bohr e \hbar a constante de Planck.

O erro na suposição de que $b=a$ é no máximo de um fator de 2 [40], e como trabalharemos principalmente com os valores relativos de T_1 em função da temperatura, essas incertezas não são importantes.

Embora o método de saturação contínua não seja muito preciso para obtenção dos valores de T_1 , ele é adequado para determinar a dependência com a temperatura e os valores relativos dos mesmos, e tem sido muito utilizado em sistemas biológicos [82]. Este método não é normalmente aplicável para determinar tempos de relaxação de spins com acoplamento dipolar, entretanto, pode ser usado para estimar a ordem do aumento na taxa de relaxação devido a este acoplamento. O valor de b menor que 1 indica a presença da interação dipolar, e, neste caso, a expressão (5.1) leva a valores de $P_{\frac{1}{2}}$ distorcidos que dependem do fator de inhomogeneidade e da extensão de saturação [83].

Neste trabalho somente as amostras de hematina apresentaram valores de b ligeiramente menores que 1. Para estas amostras os ajustes foram feitos assumindo o limite de inhomogeneidade ($b=1$), e, neste caso, a interação dipolar é somada ao mecanismo de relaxação como na referência [83].

As condições de saturação não permitiram a determinação de $P_{\frac{1}{2}}$ para temperaturas maiores que 70K.

5.4 Fotodissociação

Experimentos de fotodissociação foram realizados iluminando a amostra através da janela da cavidade de transmissão ótica com uma lâmpada de Xenônio de 1000 W (Oriental Corp. of America, Stanford, CA) colimada e filtrada por uma solução saturada de sulfato de cobre.

Os espectros de RPE foram medidos antes e depois da iluminação. A dissociação foi acompanhada por um tempo suficientemente longo para a intensidade do sinal atingir um valor estacionário.

Antes de repetir a experiência em uma temperatura diferente a amostra foi aquecida até 77K de modo que o sinal original é restaurado.

Não observou-se nenhuma evidência de que o espectro de RPE de NOHb desnaturada é composto por mais de um componente e, além disso, mostrou-se anteriormente que mesmo quando o espectro é composto, como em NOHb nativa, as curvas cinéticas independem do valor de g [57,58]. Então as curvas cinéticas foram obtidas monitorando a intensidade do sinal de RPE no valor de $g=2.07$ fixo. As curvas do número de NO dissociados foram normalizadas para o valor de equilíbrio em cada temperatura pela equação

$$N(t) = \frac{I_o - I(t)}{I_o - I_\infty} \quad (5.4)$$

onde I_o e I_∞ são as intensidades inicial e estacionária, respectivamente.

As curvas normalizadas foram ajustadas com os quatro modelos: exponencial simples, exponencial dupla, subestados conformacionais e fractal. Os parâmetros ajustáveis foram determinados utilizando o program SigmaPlot para os modelos exponencial simples, exponencial dupla e fractal. Já para o modelo de subestados conformacionais, os mesmos foram obtidos através de um programa em linguagem C utilizando um método tipo Monte Carlo (números aleatórios) e minimizando o erro quadrático médio. Todos os ajustes foram feitos progressivamente diminuindo o número de parâmetros. Em cada passo o parâmetro que apresentava menor dispersão era fixo no seu valor médio e um novo ajuste dos parâmetros livres é realizado.

Capítulo 6

Resultados

6.1 RPE de NOHb e NOMb desnaturadas, pó de NOHb e NO-hematina

Os espectros de RPE foram obtidos em função da temperatura e da potência de microonda. Na figura 6.1 apresentamos os espectros de NOHb e NOMb desnaturadas e pó de NOHb a 6 K e 20 dB ($\simeq 1.3$ mW). Os espectros são assimétricos e apresentam uma estrutura hiperfina bem definida. Esta estrutura é característica do Fe da heme pentacoordenado [84]. A forma espectral não depende da potência de microonda ou da temperatura, como pode ser observado nas figuras 6.2 e 6.3, onde são mostrados os espectros de NOHb desnaturada em função da temperatura e os espectros de pó NOHb em função da potência de microonda a 4.2K.

Podemos observar nos espectros de NOHb desidratada um sinal muito intenso em $g \simeq 2.0$. Este sinal foi anteriormente observado e associado a formação de um radical livre durante a desidratação [85].

Os espectros de NO-hematina, grupo heme sem cadeia polipeptídica, em função da temperatura e da potência de microonda são mostrados nas figuras 6.4 e 6.5, respectivamente. Observamos que, para temperaturas maiores que 77 K, o espectro sofre uma mudança na forma semelhante àquela observada nas amostras de NOHb nativa a tem-

peraturas menores, aproximadamente 30K [19]. Para temperaturas menores que 77 K, os espectros não dependem da temperatura e apresentam uma desprezível dependência com a potência de microonda.

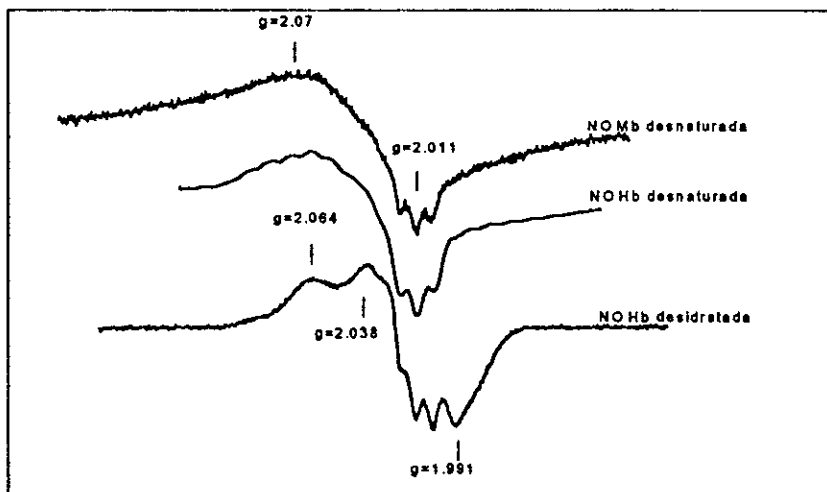


Figura 6.1: Espectros de RPE das amostras desnaturadas e NOHb desidratada. T: 6K. Pot.: 20 dB.

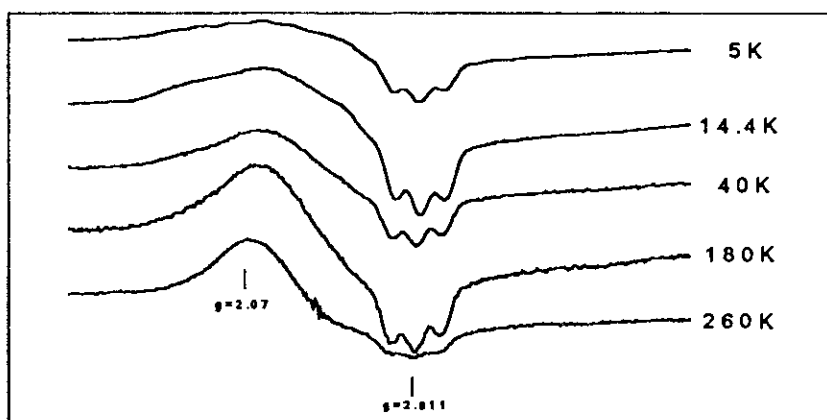


Figura 6.2: Espectros de RPE de NOHb desnaturada em função da temperatura. Pot.: 22 dB.

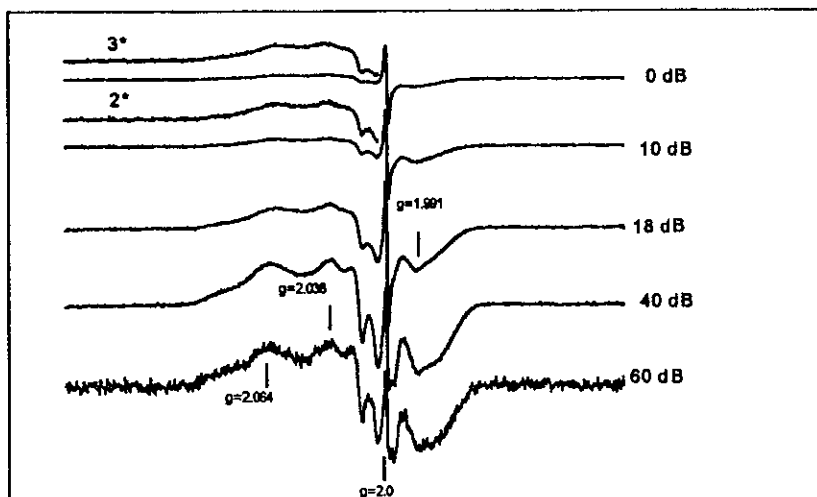


Figura 6.3: Espectros de RPE de NOHb desidratada em função da potência de microonda. Os detalhes em 0 e 10 dB mostram o espectro sem o sinal do radical livre. T: 4.2 K

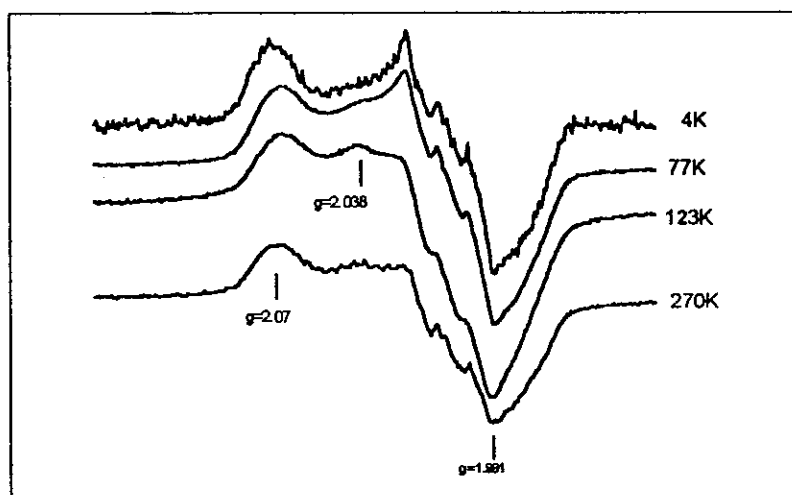


Figura 6.4: Espectros de RPE de NO-hematina em função da temperatura. Pot.: 22 dB.

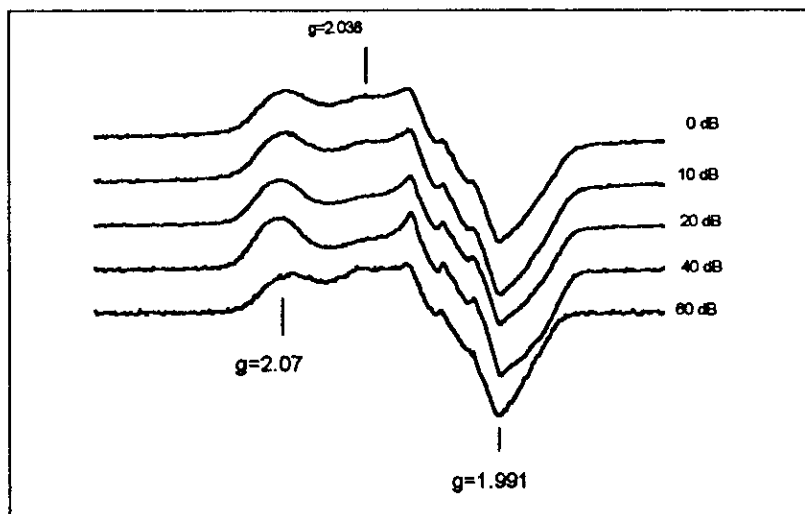


Figura 6.5: Espectros de RPE de NO-hematina em função da potência de microonda. T: 4.2 K

6.2 Intensidade do sinal de RPE a temperaturas maiores que 80K

A figura 6.6 mostra os espectros de RPE dos cinco tipos de NOHb para as quais a intensidade do sinal em função da temperatura foram monitorados: conformação R em solução tampão, conformação R em solução a 75% glicerol, conformação T em solução, pó e solução desnaturada. As linhas verticais indicam as posições nas quais as amplitudes das linhas foram medidas para análise. As intensidades em outros pontos, bem como a integral dupla do espectro (área), foram também medidas, e apresentaram a mesma dependência com a temperatura.

O espectro da conformação R é idêntico a componente C, que é observada a altas temperaturas [19], como foi descrito no capítulo 2. A amostra com 75% de glicerol apresenta um espectro muito semelhante, exceto pela ausência de uma suave indicação das três linhas do desdobramento hiperfino observado na conformação R.

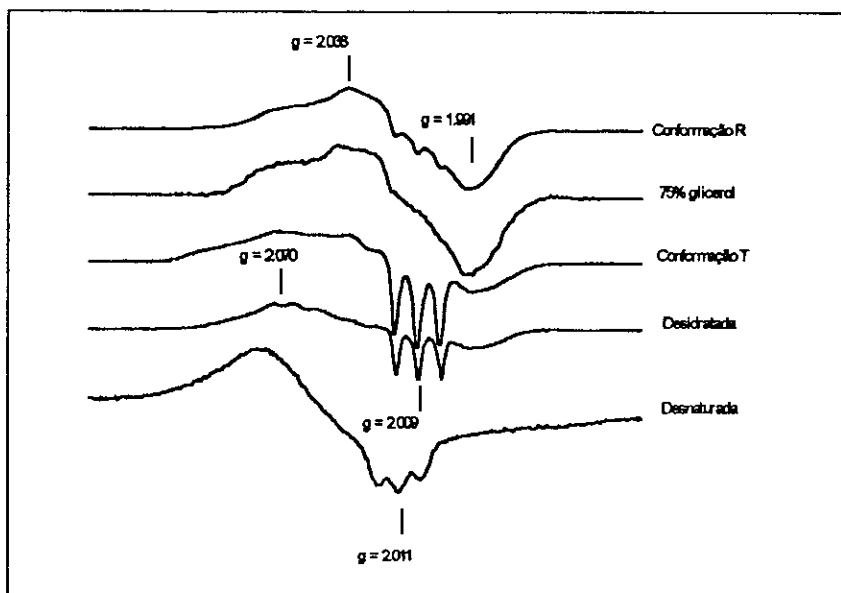


Figura 6.6: Espectros de RPE de NOHb em diferentes conformações. T: 80K e Pot.: 20 dB.

A interação hiperfina do nitrogênio, característica de sistemas pentacoordenados, é claramente notada nos espectros de pó e desnaturada anteriormente citados e no da conformação T. A presença ou ausência desta estrutura tem sido atribuída a mudanças na distância entre o Fe da heme e o nitrogênio da histidina proximal [84].

Enquanto a baixas temperaturas ($< 100K$) os efeitos de saturação precisam ser considerados [19], a temperaturas maiores esses efeitos não são importantes porque a forma do espectro permanece a mesma independente da potência de microonda utilizada. A largura de linha permanece constante, enquanto que sua intensidade aumenta com o aumento da potência, sem indicação de saturação. A análise dos espectros de NOHb fica, então, simplificada no intervalo de temperatura deste estudo (80 a 280 K).

A figura 6.7 é a comparação da dependência das intensidades dos sinais com a temperatura para as diferentes amostras estudadas. A medida da intensidade do marcador de g mostra que o efeito das mudanças do fator Q da cavidade com a temperatura sobre a intensidade do sinal é desprezível. Com exceção de NO-hematina e NOMb nativa as curvas apresentam uma diminuição brusca de intensidade na faixa de 150 a 220 K. Esses resultados são independentes dos ciclos de aquecimento ou resfriamento que foram

variados de diversas maneiras. Em uma experiência típica uma amostra preparada a temperatura ambiente foi congelada tanto para a temperatura mais baixa (80K) como para uma temperatura ligeiramente inferior à ambiente (273K). A temperatura é então aumentada ou diminuída com intervalos de aproximadamente 5K e o espectro medido após cinco minutos de equilíbrio. Os ciclos de temperatura são todos perfeitamente reproduzíveis.

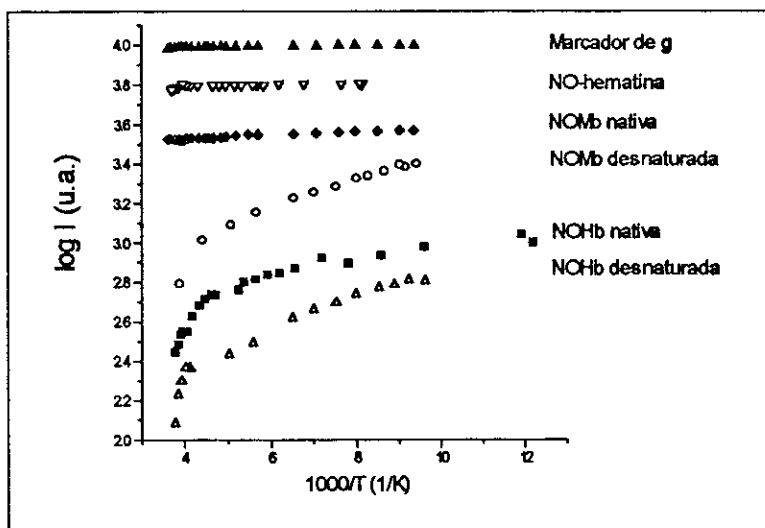


Figura 6.7: Dependência da intensidade dos sinais de RPE com a temperatura.

As curvas experimentais podem ser ajustadas com uma expressão da forma

$$I = \frac{I_o}{T} \left[1 + \exp - \left(\frac{\Delta G}{kT} \right) \right]^{-1} \quad (6.1)$$

onde ΔG é a diferença de energia livre entre dois estados conformacionais, I_o é um fator de normalização e $1/T$ é o fator associado ao limite de altas temperaturas da distribuição de Boltzman do dubleto de Zeeman dominante a baixas temperaturas (figura 6.8).

Este ajuste sugere um equilíbrio térmico com uma segunda espécie não detectável por RPE, correspondendo a suaves alterações na geometria da heme, histidina proximal e o NO ligado.

Considerando $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ com ΔH e ΔS independente da temperatura, obtemos os resultados mostrados na tabela 6.1

Os desvios grandes observados na tabela sugerem que um único conjunto de ΔH e ΔS poderia ajustar todo o conjunto de amostras utilizados. No entanto as curvas

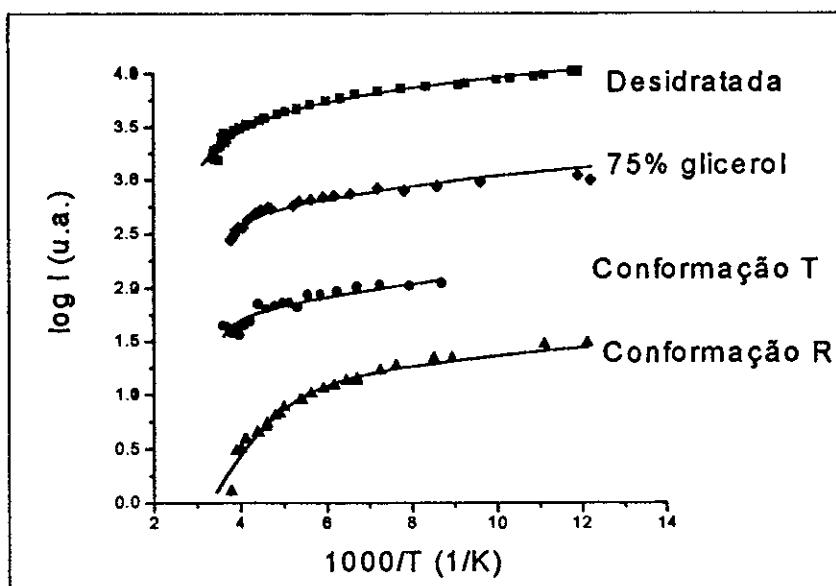


Figura 6.8: Dependência com a temperatura da intensidade do sinal de RPE de NOHb em diferentes estados. As linhas sólidas representam os resultados dos ajustes.

Proteína	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K.mol)
Conformação R de NOHb	32.9 ± 10	123 ± 15
NOHb em 75% de glicerol	17.7 ± 7	53 ± 26
Conformação T de NOHb	12.8 ± 5.2	55.7 ± 6.7
Pó de NOHb	21.9 ± 8	72.3 ± 16.6
NOHb desnaturada	4.7 ± 1.4	24.9 ± 8.3
NOMb desnaturada	15.7 ± 6.8	63.2 ± 25

Tabela 6.1: ΔH e ΔS para nitrosil hemoproteínas em diferentes conformações segundo a equação 6.1.

experimentais não podem ser ajustadas fixando o valor de ΔH médio para todas as amostras. Em vista destes resultados, consideramos, então, os valores de ΔH médio para as amostras hexacoordenadas (conformação R e 75% glicerol) e para as pentacoordenadas (conformação T, pó de NOHb e, NOHb e NOMb desnaturadas). Para tal, as médias foram refeitas considerando todos os resultados experimentais e não somente os valores médios da tabela 6.4, a boa concordância do modelo com os resultados experimentais é recuperada, refazendo os ajustes com ΔS como parâmetro. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Conformação	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K.mol)
Hexacoordenada	29.3 ± 0.9	105 ± 6
Pentacoordenada	12 ± 2	42.4 ± 0.8

Tabela 6.2: ΔH e ΔS para nitrosil hemoproteínas segundo a equação 6.1 (vide texto).

6.3 Relaxação spin-rede

Na figura 6.9 apresentamos a dependência com a temperatura da taxa de relaxação spin-rede para NOHb e NOMb desnaturada, pó de NOHb e NO-hematina.

Conforme vimos nos capítulos 2 e 4, os mecanismos de relaxação observados em hemoproteínas são descritos por funções da forma T^n (Raman com dimensão fractal ou ETL) ou $\exp\left(-\frac{\Delta}{T}\right)$ (tipo-Orbach). Então considerando estes modelos os resultados experimentais podem ser ajustadas pelas expressões abaixo no intervalo de temperatura de 4 a 70K.

$$T_1^{-1} = AT^n + C \quad (6.2)$$

$$T_1^{-1} = B \exp\left(-\frac{\Delta}{T}\right) + D \quad (6.3)$$

onde n , A e C , B , Δ e D são parâmetros dos ajustes. O resultado experimental e o procedimento de ajuste indicaram a necessidade dos termos independentes da temperatura C e D .

As linhas cheias e pontilhadas representam os melhores ajustes das equações 6.2 e 6.3, respectivamente. Observamos que, exceto para hematina, ambos os ajustes são equivalentes dentro do erro experimental. A análise do resíduo, dado pela diferença entre o valor experimental e o valor calculado pelo ajuste, confirma que os ajustes são idênticos, a menos para NO-hematina que é melhor ajustada pela expressão (T^n) (figura 6.10).

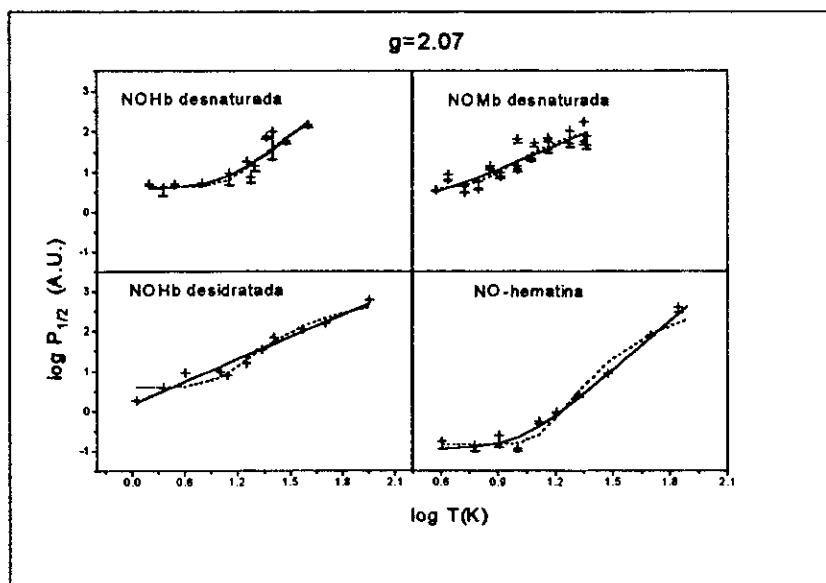


Figura 6.9: Dependência com a temperatura da potência a meia-saturação, que é proporcional a taxa de relaxação spin-rede. As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos ajustes das equações 6.2 e 6.3, respectivamente.

Vamos considerar a equação 6.2 para estimar os valores absolutos de T_1 . Este modelo foi escolhido porque ajusta todas as amostras analisadas. O uso da equação 6.3 daria aproximadamente o mesmo resultado, pois os ajustes são equivalentes. Na tabela 6.3 apresentamos os valores de $T_1^{-1}(s^{-1})$ a três diferentes temperaturas, com os dois termos da equação 6.2 sendo calculados separadamente.

Da tabela observamos que a baixas temperaturas o termo constante é dominante. Da figura 6.9 podemos verificar que a temperaturas menores que 11 ± 3 K a principal contribuição para a relaxação das amostras desnaturadas e hematina é devida ao termo constante nas equações dos ajustes. Este termo não foi observado para pó de NOHb, para

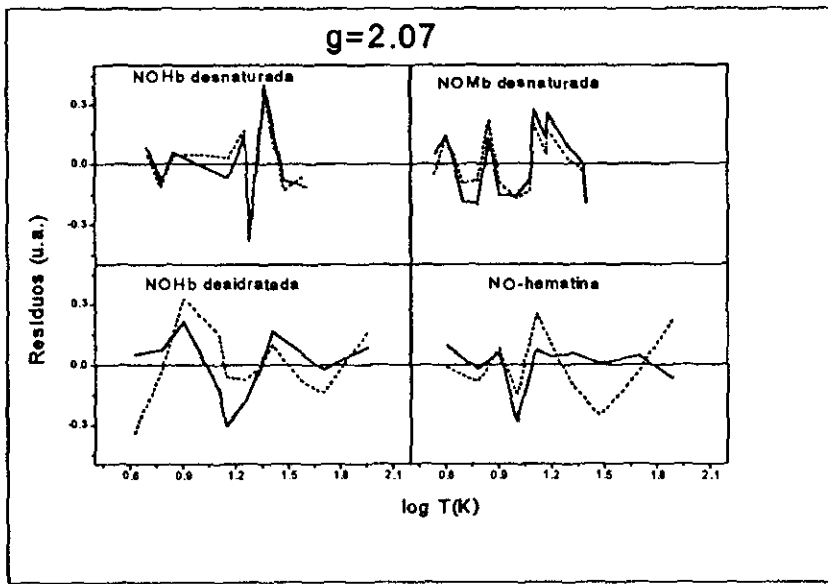


Figura 6.10: Resíduos dos ajustes dos dados experimentais da taxa de relaxação spin-rede.

	$AT^n \times 10^6$	$C \times 10^6$	$T_1^{-1} \times 10^6$
NO-hematina — $g = 2.07$			
5K	0.4	1.4	1.8
10K	2.1	1.4	3.5
15K	7.8	1.4	9.2
NOMb desnaturada — $g = 2.07$			
5K	5.9	25	30.9
10K	69	25	94
15K	288	25	313
NOHb desnaturada — $g = 2.07$			
5K	0.6	24	24.6
10K	7.1	24	31.1
15K	30	24	54

Tabela 6.3: Valores absolutos de T_1^{-1} (s^{-1}) de acordo com a equação 6.2.

o qual o termo constante do ajuste é desprezível em relação as outras amostras, ou em estudos anteriores de relaxação de NO hemoproteínas [19,44].

A taxa de relaxação independente da temperatura é característica do processo de relaxação cruzada [86]. Na estrutura modificada das proteínas desnaturadas, e na hematina, as distâncias interhemes podem ser suficientemente pequenas para a relaxação spin-rede ser dominada, a baixas temperaturas, pela relaxação cruzada.

Utilizando os valores experimentais para o termo constante e a expressão para a taxa de relaxação cruzada (eq. 2.17) podemos obter os valores médios das distâncias entre hemes nas amostras. O resultado é 21 Å para NO-hematina e 12 Å para NOHb e NOMb desnaturadas.

6.4 Fotodissociação de NOHb desnaturada

Na figura 6.11 mostramos os espectros de RPE a 5 K de NOHb desnaturada, antes e após a fotodissociação. Observamos que não existe mudança espectral na forma da linha devido a fotodissociação em qualquer temperatura estudada.

As curvas de cinética das frações de NO dissociadas (figura 6.12) podem ser separadas em dois grupos, que dependem da temperatura. O valor médio da fração dissociada no estado estacionário no primeiro grupo, composto pelas temperaturas de 5K, 8K e 10 K é aproximadamente 0.11, enquanto que para o outro (13K, 16K e 25K) é de 0.05.

As curvas de cinética normalizadas foram ajustadas com os modelos de exponencial simples, exponencial dupla, subestados conformacionais e fractal.

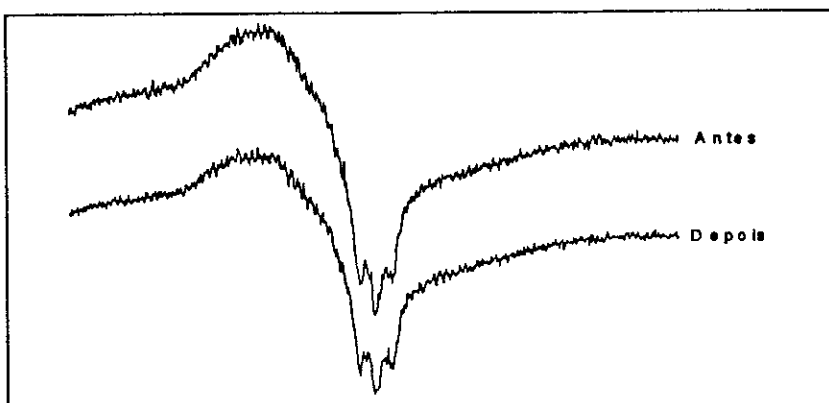


Figura 6.11: Espectros de RPE de NOHb desnaturada antes e depois da fotodissociação. T: 5 K.

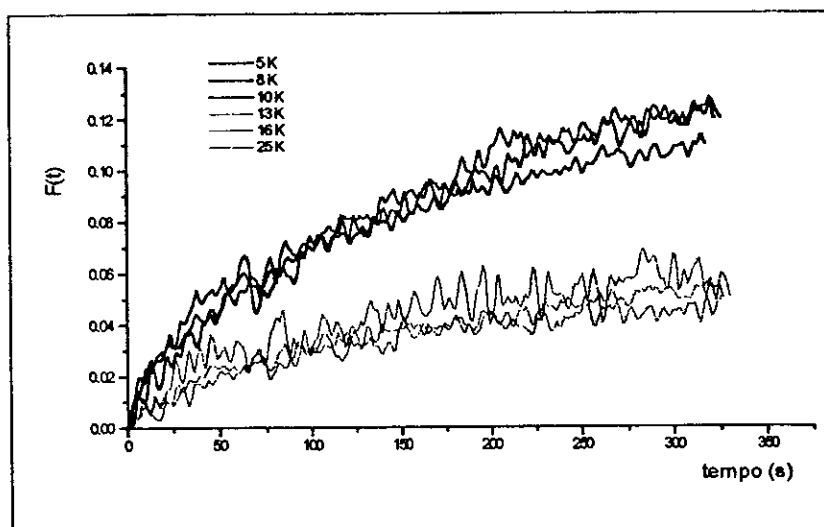


Figura 6.12: Frações de NO dissociadas da Hb desnaturada durante a fotodissociação.

6.4.1 Modelo de exponencial simples

Conforme descrito no capítulo 3, observou-se que a temperatura menores que 200K a reassociação dos ligantes à hemoproteínas é geminada e não exponencial com o tempo. Estes resultados foram explicados considerando que nestas temperaturas o ligante é retido no bolso da heme após fotodissociação e cada molécula proteica é congelada em um determinado subestados conformaccional com uma energia de ativação para a religação característica.

As alterações ocorridas durante o processo de desnaturação poderiam causar mudanças no bolso da heme, de forma que a barreira imposta pela matriz proteica deixaria de existir e o processo de dissociação, mesmo a baixas temperaturas, poderia ser descrito por uma exponencial simples. As curvas de cinética normalizadas e os ajustes com este modelo com

$$N(t) = 1 - \exp(-kt)$$

são apresentados na figura 6.13 para 5K e 25K. Os resíduos e as constantes de dissociação são mostrados na figura 6.14 e tabela 6.4, respectivamente.

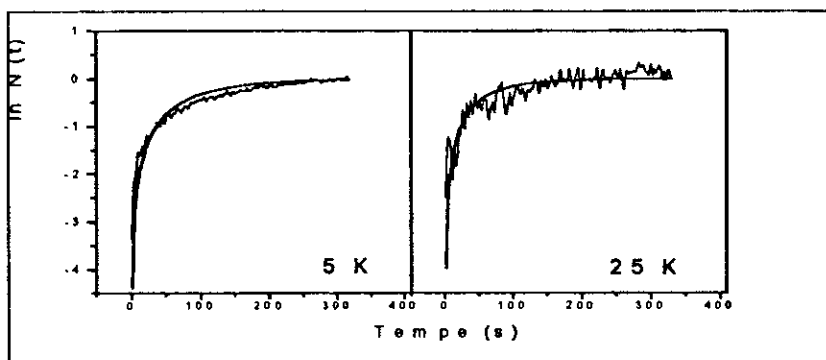


Figura 6.13: Ajuste com o modelo de exponencial simples das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.

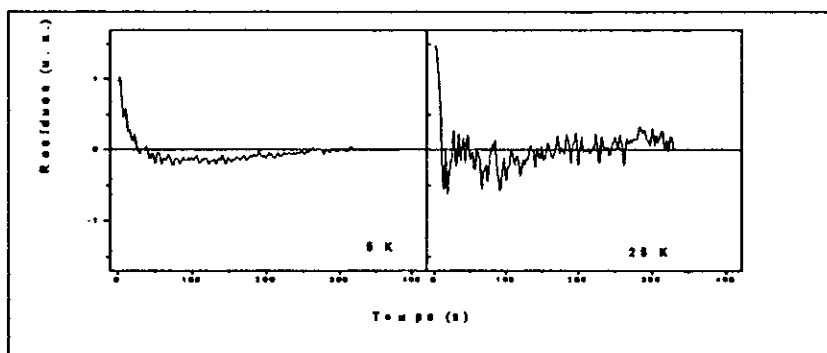


Figura 6.14: Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo de exponencial simples.

T(K)	$k_1(s^{-1})$
5	0,0128
8	0,0097
10	0,0123
13	0,0118
16	0,0094
25	0,0195

Tabela 6.4: Constantes de dissociação do modelo de exponencial simples para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

6.4.2 Modelo de exponencial dupla

As figuras 6.15 a 6.16 mostram respectivamente o ajuste e os resíduos obtidos usando o modelo de exponencial dupla com

$$N(t) = 1 - \left[\frac{A}{F_\infty} \exp(-(k_\nu + k_1)t) + \frac{B}{F_\infty} \exp(-(k_\nu + k_2)t) \right] \quad (6.4)$$

onde $F_\infty = A + B$ é o valor estacionário da fração de NO fotodissociado, A e B as frações de cada conformação, k_1 e k_2 as constantes de reassociação e k_ν a constante de dissociação.

Observamos que as frações normalizadas das moléculas dissociadas que se religam rapidamente $\frac{A}{F_\infty} = 0,0879$ ou lentamente $\frac{B}{F_\infty} = 0,9121$ são independentes da temperatura. Os resultados são mostrados na tabela 6.5.

T(K)	$k_\nu + k_1(s^{-1})$	$k_\nu + k_2(s^{-1})$
5	0,43	0,0094
8	0,042	0,0084
10	0,29	0,0092
13	0,21	0,0091
16	0,63	0,0071
25	2,26	0,0140

Tabela 6.5: Parâmetros do ajuste do modelo de exponencial dupla para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

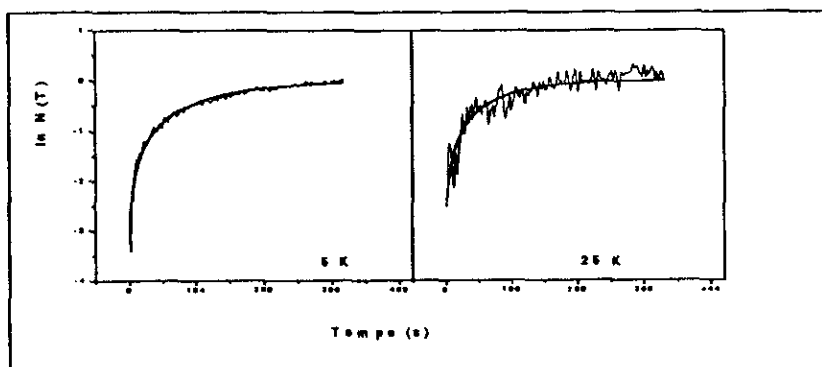


Figura 6.15: Ajuste com o modelo de exponencial dupla das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.

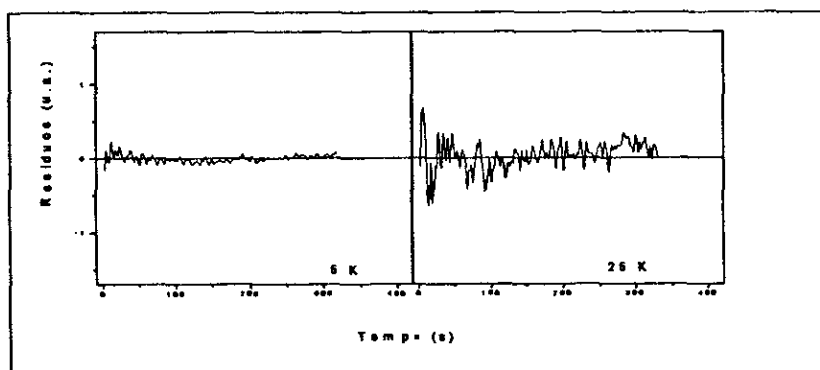


Figura 6.16: Resíduos dos ajustes com o modelo de exponencial dupla das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.

6.4.3 Modelo de subestados conformacionais

Para o modelo de subestados conformacionais foi utilizada a expressão

$$N(t) = \frac{\int_0^\infty dE g(E) \frac{k}{k+k_l(E)} \{1 - \exp\{-[k + k_l(E)]t\}\}}{\int_0^\infty dE g(E) \frac{k}{k+k_l(E)}} \quad (6.5)$$

onde k e $k_l(E)$ são as constantes de dissociação e reassociação, respectivamente, e a função distribuição é dada por

$$g(E) = g_o \exp[\alpha(E^p - E) - \eta \exp \frac{\alpha}{\eta}(E^p - E)] \quad (6.6)$$

onde g_o é a constante de normalização, α e η definem a forma e E_p é a energia do pico da distribuição. Conforme discutido no capítulo 3, existem outras funções distribuições que, no entanto, levam a resultados equivalentes [68].

Como estamos na faixa de temperatura na qual a recombinação ocorre via tunelamento e assumimos uma barreira parabólica [49,57], temos

$$k_l(E) = A \exp(-\varepsilon E^{3/2}) \quad (6.7)$$

com

$$\varepsilon = \frac{\pi}{2\hbar} \frac{(2M)^{1/2} d_o}{E_p}, \quad (6.8)$$

e onde M é a massa reduzida do Fe e NO, d_o a largura da barreira e A o fator de frequência.

Melhores ajustes são obtidos se estes dois últimos parâmetros dependem da temperatura (tabela 6.6). Os outros (α, η, E_p e k_1) são fixos nos valores médios dos ajustes (conforme descrição no cap. 5) e mostrados na tabela 6.7.

Os resultados dos ajustes, os resíduos e a função distribuição são mostrados nas figuras 6,17, 6,18 e 6,19, respectivamente.

T(K)	A (s^{-1})	d_o (nm)
5	0,0613	0,0055
8	0,0088	0,0045
10	0,0203	0,0023
13	0,8653	0,0168
16	1,5467	0,0207
25	1,2240	0,0077

Tabela 6.6: Parâmetros livres do modelo de subestados conformacionais para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

Parâmetros	Valores
E_p (KJ/mol)	1,3972
α	1,0810
η	0,5491
k (s^{-1})	0.0019

Tabela 6.7: Parâmetros fixos (vide cap. 5) do modelo de subestados conformacionais para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

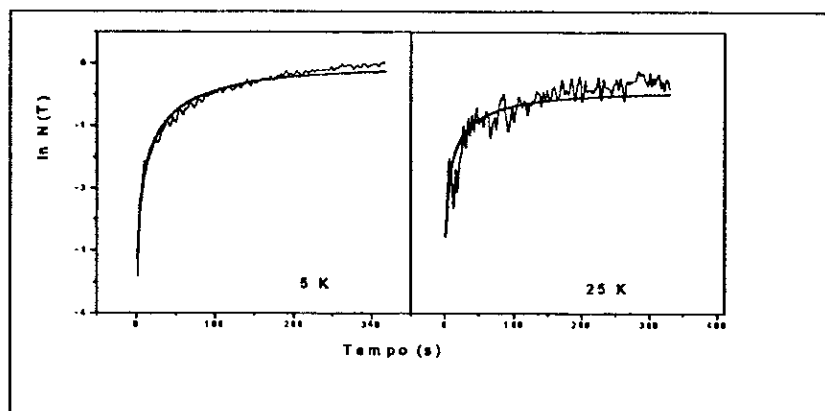


Figura 6.17: Ajuste com o modelo de subestados conformacionais das curvas de fotodissociação.

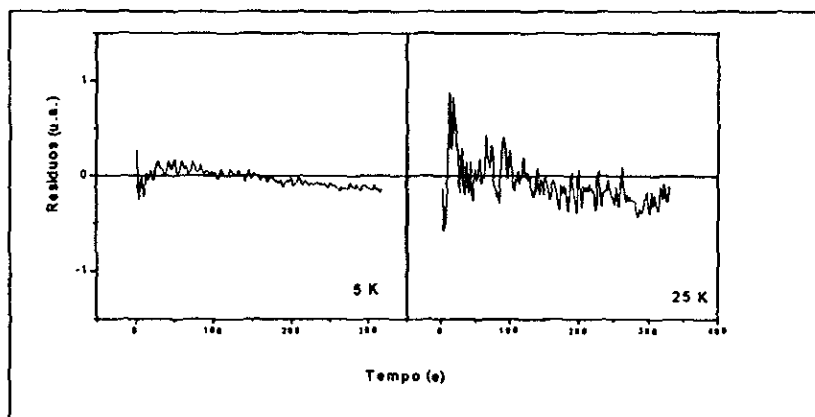


Figura 6.18: Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo de subestados conformacionais.

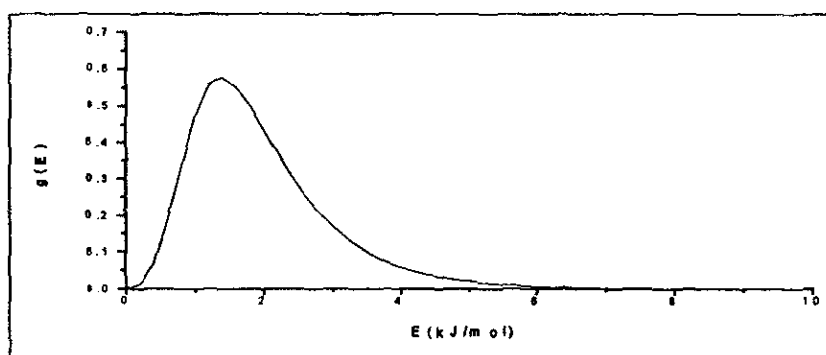


Figura 6.19: Função distribuição da energia de ativação de NOHb desnaturada.

6.4.4 Modelo Fractal

No modelo fractal a fração de NO dissociada é dada por

$$N(t) = 1 - \exp \frac{At^{1-D}}{1-D} \quad (6.9)$$

Tomando o parâmetro D fixo em $0,19 \pm 0,02$, obtemos para NOHb desnaturada os resultados mostrados na tabela 6.7 e nas figuras 6.20 e 6.21.

T(K)	A (s^{-1})
5	0,021
8	0,017
10	0,021
13	0,020
16	0,016
25	0,030

Tabela 6.8: Parâmetros do modelo fractal para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

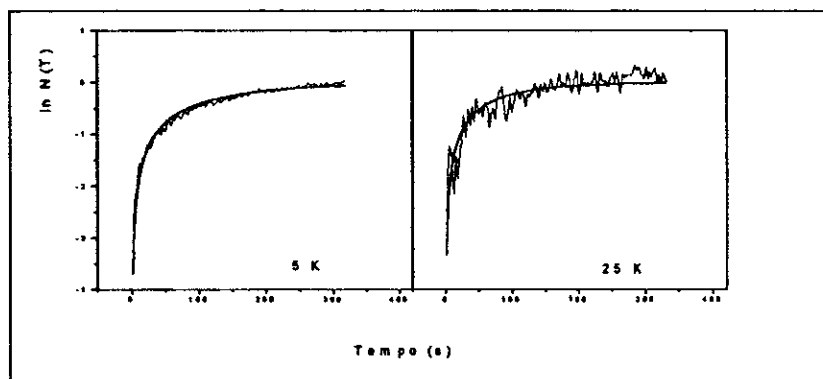


Figura 6.20: Ajuste com o modelo fractal das curvas de fotodissociação de NOHb desnaturada.

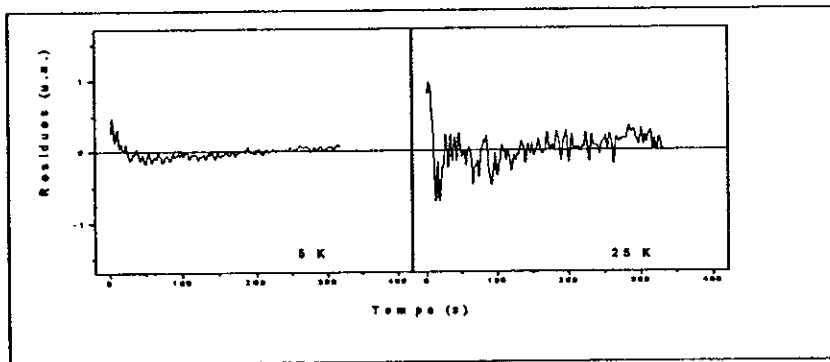


Figura 6.21: Resíduos dos ajustes da dissociação de NOHb desnaturada com o modelo fractal.

Capítulo 7

Discussão dos Resultados

7.1 Dependência do sinal de RPE com a temperatura

A forma dos espectros de RPE de NOHb desnaturada e desidratada, e de NOMb desnaturada não sofrem nenhuma alteração em todo o intervalo de temperatura estudado (4K a aproximadamente 273K). Por outro lado NOHb na conformação R, que apresenta uma forte dependência com a temperatura e potência de microonda em baixas temperaturas [19], não apresenta mudanças espectrais para temperaturas maiores que 80 K, da mesma forma que a mesma conformação dissolvida em 75% glicerol ou a conformação T. A única amostra que apresenta mudança espectral a temperaturas acima de 80 K é a NO-hematina.

A temperaturas acima de aproximadamente 150K observou-se um grande e reversível decréscimo das intensidades (ou áreas) dos espectros da maioria das nitrosil hemoproteínas, com exceção para NOMb nativa e NO-hematina.

O desvio da linearidade da intensidade do sinal observado a temperaturas mais altas (aproximadamente 230 K) foi anteriormente atribuído ao congelamento da água de hidratação [87]. Esta não pode ser a explicação no nosso caso, pois o resultado foi observado também em amostras desidratadas e em amostras dissolvidas em glicerol, para as quais os efeitos de agregação do solvente durante seu congelamento estão eliminados.

Desvios no comportamento do fator Lamb-Mössbauer com a temperatura também foram observados em metaMb e deoxiMb, mas estes resultados invariavelmente indicam que acima de 200K existe um decréscimo no excesso de $\langle x^2 \rangle$ em amostras liofilizadas quando comparadas com cristais ou soluções [88-90]. Tais diferenças entre amostras não são observadas neste trabalho. Portanto a perda de flexibilidade do segmento da proteína que envolve a heme e NO, que é importante para interpretação dos resultados de espectroscopia Mössbauer, não é observado em nossos resultados.

Como não existe mudança espectral poderíamos assumir a existência de níveis de energia eletrônicos mais altos. No caso de metaHb (Fe^{+3} , $S=5/2$) o desvio observado no decréscimo da amplitude do sinal de RPE com o aumento de temperatura foi atribuído à existência de níveis devido ao desdobramento de campo zero do nível de energia mais baixo ($\pm 1/2$, $\pm 3/2$, $\pm 1/2$) [91]. Entretanto esta possibilidade é normalmente rara em hemoproteínas ferrosas (Fe^{+2}) por causa da grande separação de energia entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado. De fato a expressão que descreve este modelo não ajusta as curvas experimentais.

As curvas experimentais foram ajustadas pela equação 6.8. Este ajuste sugere um equilíbrio térmico com uma segunda espécie que não é detectada por RPE, e está associada a pequenas alterações na geometria da heme, envolvendo a ligação do Fe com a histidina proximal e o NO ligado.

A diferença de entalpia e entropia entre os dois estados conformacionais são respectivamente $29,3 \pm 0,9$ kJ/mol e 105 ± 6 J/K.mol para a conformação R, e 12 ± 2 kJ/mol e $42,4 \pm 0,8$ J/K.mol para as amostras pentacoordenadas.

Trabalhos anteriores utilizando resultados de susceptibilidade paramagnética sugerem o equilíbrio térmico de duas espécies em ambos os estados R e T de metaHb azida de carpa [92,93]. As duas configurações estereoquímicas diferem na distância Fe-N (porfirina) e na rigidez do Fe a temperaturas abaixo de 220K. Nossos resultados evidenciam efeitos que ocorrem a temperaturas mais baixas com diferenças no comportamento para as duas estruturas quaternárias. Os valores de ΔH sugerem que as mudanças são favorecidas nas conformações pentacoordenadas que possuem distâncias Fe-N (histidina proximal) maiores. Os valores de ΔH são da mesma ordem de grandeza que aqueles obtidos por RPE

para NOMb equina [13] e para NO-eritrocruorina entre 100K e 300K [15], respectivamente. Nossos resultados diferem por não observamos nenhuma mudança espectral, ou seja, uma das espécies não é observável por RPE.

Waleh et al mostraram que em nitrosil porfirinas ferrosas o diagrama de energia eletrônica depende da geometria local próxima da heme e pode variar entre duas situações: uma com o spin localizado fortemente no NO (a situação “normalmente” observada por RPE) e a outra com o spin localizado no orbital d_{z^2} do ferro [26]. Variações pequenas na distância ou no ângulo de ligação afeta a diferença de energia e a ordem relativa dos dois níveis. Estes deslocamentos do spin podem ser causados por fatores estéricos resultantes do aumento de temperatura e a localização do spin no ferro poderia refletir-se num aumento da taxa de relaxação, que leva a um alargamento da linha tornando impossível a detecção deste estado por RPE.

NOMB não apresenta o decréscimo na intensidade do sinal de RPE. Este comportamento anômalo indica a estabilização de uma espécie conformacional como anteriormente observado em citocromo c oxidase [13] e em *Aplysia Brasiliana* [15]. No último caso a proteína não possui histidina distal o que tem forte efeito na estrutura eletrônica do complexo. Diferenças na ligação da histidina com o Fe de Hb e Mb são também observados em complexos férricos ligados a H_2O , apesar da estreita similaridade entre as cadeias das duas proteínas [94]. Outros resultados experimentais inesperados têm sido observados para NOMb, como por exemplo, a complexidade das cinéticas mostradas pela religação não-exponencial após fotodissociação a temperatura ambiente [95].

7.2 Relaxação spin-rede

Com exceção de NOHb em solução todas as amostras de nitrosil hemoproteínas estudadas apresentam uma dependência com a temperatura da forma T^n para a taxa de relaxação spin-rede. O valor de n para amostras nativa e desidratadas é 2.2 ± 0.2 , e para amostras desnaturadas e hematina este valor aumenta para 3.8 ± 0.4 (tabela 7.1). Esta dependência com a temperatura está associada a um modelo que supõe um processo de

Proteína	g	A	n	C	B	Δ (cm ⁻¹)	D	Ref ^a .
NOHb nativa	—	—	—	—	10 ^{5.1}	28	—	19
pó de NOHb	2.064	0.11	1.9	—	928	51	4.2	4
	2.003	0.048	2.2	—	1120	47	2.3	4
NOHb desnaturada	2.07	0.0003	3.6	3.9	1566	65	4.4	4
	2.011	0.0002	3.6	2.0	785	65	2.3	4
NOMb nativa	2.007	—	2.4	—	—	—	—	44
pó de NOMb	2.064	—	2.4	—	—	—	—	44
	2.003	—	2.1	—	—	—	—	44
NOMb desnaturada	2.07	0.003	3.5	3.8	618	51	4.4	4
	2.011	0.00001	4.5	1.3	1836	77	1.0	4
NO-hematina	2.07	0.00015	3.2	0.2	115	76	0.2	4

Tabela 7.1: Parâmetros do ajuste de T_1^{-1} com as equações 6.2 e 6.3. ^a Nas referencias 19 e 44 somente o melhor ajuste foi considerado e o termo constante não foi observado.

relaxação mediado por modos de tunelamento de um sistema de dois níveis. A existência de estados de tunelamento localizados (ETL) proposto para NOMb em pó [44] pode ser estendida para NOHb em pó, uma vez que soluções deste complexo também exibem mais que uma conformação de ligação associada ao sistema de dois níveis [19].

Neste modelo, o expoente n é dado por $n = 2 + \lambda$, onde λ dá a relação entre a densidade de estados e a energia na forma $\rho(E) \simeq E^\lambda$, e está associado ao valor da energia característica E_{max} , a energia máxima do ETL ou o limite na distribuição do parâmetro de assimetria do poço duplo de potencial. Existe uma correlação entre os valores obtidos para λ e o estado funcional da proteína. Amostras nativas e desidratadas, que são reversíveis para nativa, apresentam valores de λ pequenos (0.2 a 0.4) quando comparados com os valores para proteínas desnaturadas (1.5 a 2.5), hematina (1.7 ± 0.1) ou materiais inorgânicos amorfos (1.5 a 1.6) [14].

Se considerarmos a dependência da forma $\exp(-\frac{\Delta}{T})$, obtemos evidências para um nível de energia mais baixo de 65 cm⁻¹ para NOHb desnaturada, 51 e 75 cm⁻¹ para NOMb desnaturada e 76 cm⁻¹ para NO-hematina. Esses valores são maiores que o valor obtido

para o componente A (potência mais baixa) da NOHb nativa, 28 cm^{-1} [19], mais é ainda bastante menor que a diferença de energia entre os estados fundamentais e eletrônico excitado no diagrama dos níveis de energia proposto para nitrosil hemoproteínas [96].

É interessante observar que NOHb nativa apresenta um nível excitado de baixa energia de 28 cm^{-1} para o componente A e seu espectro de RPE muda a temperaturas próximas de 32K (22.4 cm^{-1}) [19], enquanto nossos resultados indicam um nível de baixa energia de $76 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ para NO-hematina com mudanças espectrais a temperaturas da ordem de 80K (56 cm^{-1}). A semelhança destes valores sugerem uma correlação entre si, devido à existência de duas conformações (geometria) da heme ligada, associadas a diferentes ângulos ou distâncias da ligação com os ligantes axiais. Os valores de energia obtidos estão em boa concordância com os valores previstos e observados por espalhamento de neutrons inelástico para os modos dos fónons de baixa frequência do meio exterior para Mb [96,97]. As variações na geometria do ligante podem, então, ser induzidas por esses fónons.

Embora amostras desnaturadas de NOHb e NOMb e de NOHb em pó não apresentem mudanças espectrais, a evidência de um nível excitado de baixa energia sugere a existência de uma segunda conformação não detectável por RPE, o que está de acordo com a dependência com a temperatura das intensidades dos sinais de RPE discutida na seção anterior.

Os valores de λ obtidos acima para o modelo ETL estão correlacionados com a diferença de energia entre as conformações no equilíbrio. Um maior limite do parâmetro de assimetria do poço duplo é associado a um valor maior de energia do estado excitado (tabela 7.1).

O efeito da desidratação de NOMb é aumentar a taxa de relaxação de $5.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ em solução para $1.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ em amostras em pó a 20K [13]. Este efeito é mais intenso em NOHb com o aumento de $1.6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ em solução para $1.8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ em pó na taxa de relaxação nesta temperatura. Observamos que a taxa de relaxação aumenta ainda mais nas amostras desnaturadas em relação as amostras desidratadas. Os valores de T_1^{-1} a 20K são $1.1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ e $7.9 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para NOMb e NOHb desnaturadas, respectivamente. Esta variação deve estar relacionado com o fato de o processo de desnaturação causar

alterações adicionais as do processo de desidratação, como foi anteriormente observado em metaHb [2]. Em ambos os processos foi observado a formação do hemicromo P, mas na desnaturação existe mais uma mudança estrutural distorcendo o hemicromo P em outro chamado P', que possui espectro de RPE diferente.

Este efeito pode também ser observado na forma dos espectros de RPE de nitrosil hemoproteínas. O triplete hiperfino é centrado em $g=2.09$ nas amostras desidratadas ou conformação T, enquanto que nas desnaturadas é centrado em $g=2.011$. Além disso os espectros da conformação T ou desidratada apresentam valores de $g_x=2.07$ e $g_y=2.038$ bem definidos e nas amostras desnaturadas somente um ombro em $g=2.064$ é claramente observado, indicando uma simetria mais axial.

A observação do processo de relaxação cruzada em nitrosil hemoproteínas desnaturada e NO-hematina permite estimar os valores médios das distâncias entre hemes. Os resultados são 21 \AA e 12 \AA para NO-hematina e, NOHb e NOMB desnaturadas, respectivamente.

Considerando a concentração de hematina utilizada (5mM) a distância estimada entre os átomos de ferro em solução de hematina é 86 \AA , que é muito maior do que a distância prevista baseando-se na taxa de relaxação cruzada. Entretanto sabe-se que amostras de porfirinas em solução tendem a formar dímeros [41]. Portanto, o valor médio da distância encontrada por relaxação cruzada reforça a hipótese de formação de dímeros.

A distância entre os átomos de ferro na estrutura R de NOHb é $Fe(\alpha_1 - \alpha_2) = 36 \text{ \AA}$ e $Fe(\beta_1 - \beta_2) = 33 \text{ \AA}$, enquanto que na estrutura T as distâncias correspondentes são 35 \AA e 40 \AA [98]. Um decréscimo relativo nas distâncias entre grupos heme nas amostras desnaturadas e hematina em comparação com os valores nas estruturas R e T, juntamente com a superposição total das funções espectrais fazem com que a relaxação cruzada seja possível nestas amostras.

Podemos estimar, a partir das mudanças no volume e dados cristalográficos, as distâncias entre as hemes durante o processo de desnaturação e desidratação. Se não consideramos nenhuma mudança nas posições relativas das hemes e no volume da proteína, a distância média entre as hemes nas amostras desidratadas seria menor ou igual do que nas amostras desnaturadas, entretanto o termo constante relacionado com a relaxação

cruzada não é observado nas amostras desidratadas. Estes resultados estão em concordância com uma mudança drástica na estrutura da proteína durante o processo de desnaturação, deixando os grupos hemes mais próximos nas amostras desnaturadas do que nas desidratadas.

7.3 Fotodissociação

O processo de ligação geminada do NO a hemoproteínas, estudadas por absorção ótica na faixa de picosegundos a temperatura ambiente, foi anteriormente ajustado por uma exponencial simples em dois casos: para Mb de elefante [54] e Mb de baleia ou cavalo em baixos pH [68].

No primeiro deles a explicação inicial foi que a substituição da histidina distal por uma glutamina, que não apresenta um anel heterocíclico, não poderia representar nenhuma restrição para a recombinação do NO e esta seria uma reação de 1^o ordem [54]. Posteriormente verificou-se, utilizando Mb mutantes [66], que somente a substituição do amino ácido na posição distal não é suficiente para explicar este comportamento, e que o mesmo deve estar associado a outras diferenças na cadeia proteica.

A religação exponencial simples, em baixos pH, foi explicada associando a recombinação geminada bifásica com a transferência para a heme das mudanças que acontecem na matriz proteica. Esta transferência ocorre através da forte ligação com a histidina proximal que é rompida em pH baixos, levando a uma recombinação exponencial simples.

Nas amostras desnaturadas termicamente a ligação entre o Fe da heme e a histidina proximal é enfraquecida ou rompida, entretanto a recombinação geminada do NO não pode ser ajustada por uma exponencial simples. Dos modelos utilizados para explicar os resultados de fotodissociação, este é o que apresenta o maior resíduo, como podemos observar na figura 7.1. Então a hipótese de que o rompimento da ligação Fe-N (histidina proximal) está associada a uma religação exponencial simples não foi verificada em nossos resultados.

Os ajustes utilizando os outros três modelos são aproximadamente equivalentes, com

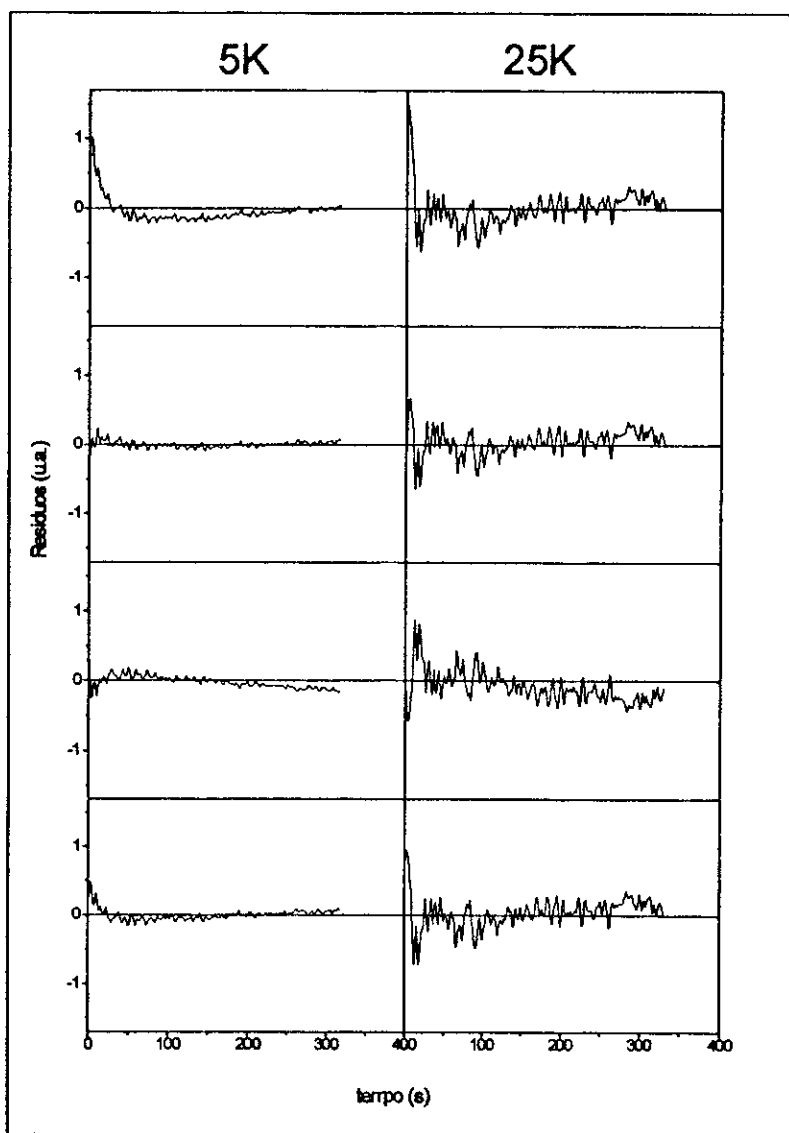


Figura 7.1: Comparação dos resíduos dos modelos utilizados para a fotodissociação de NOHb desnaturada.

maior resíduo para o modelo fractal em tempos mais curtos.

Considerando o valor da constante de dissociação k obtida através do modelo de subestados conformacionais ($0,0019 \text{ s}^{-1}$) podemos calcular os valores das constantes de reassociação k_1 e k_2 no modelo de exponencial dupla. Os resultados são mostrados nas figuras 7.2 e 7.3.

As taxas de recombinação lenta (k_1) ou rápida (k_2) estão associadas a duas diferentes populações de ligantes que estão mais próximos ou mais afastados do ferro após a fotodissociação [57].

A temperaturas menores que 10 K vemos que o comportamento com a temperatura da constante de reassociação mais lenta é idêntico ao comportamento das conformações nativas (figura 7.2). Entretanto, com o aumento da temperatura as conformações apresentam um aumento deste valor, que não é observado na amostra desnaturada, mesmo a 26 K.

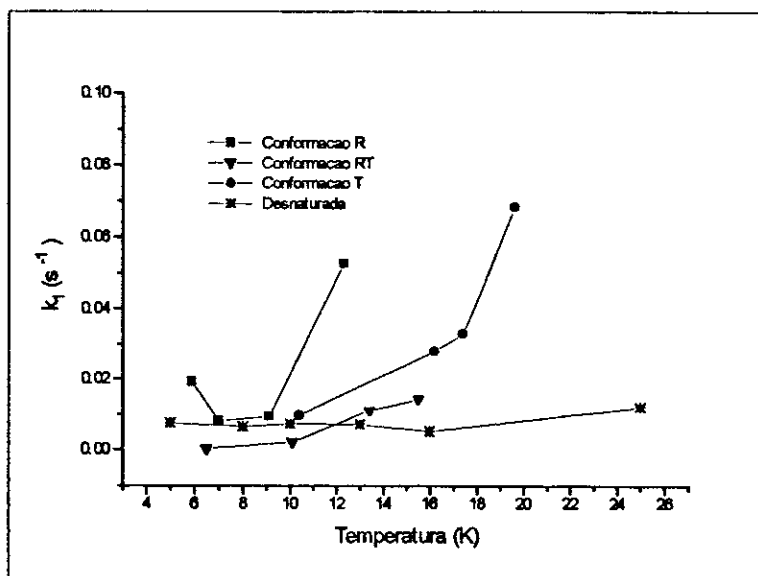


Figura 7.2: Comparação dos valores das constantes de reassociação lenta para NOHb. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].

Os ligantes dissociados que estão distantes do ferro encontram obstáculos para a sua reassociação. O aumento de temperatura permite a molécula na forma nativa pequenos

rearranjos de sua estrutura que facilita o acesso do ligante ao ferro. Este rearranjo ocorre a aproximadamente 10 K para a conformação R, em temperaturas mais altas (16 a 20K) para as conformações RT e T, e não é observado até 26 K nas amostras desnaturadas.

O comportamento com a temperatura da taxa de recombinação mais rápida é bastante semelhante entre as conformações pentacoordenadas (conformações RT, T e desnaturada), diferindo da conformação R, hexacoordenada (figura 7.3). Este comportamento pode ser explicado considerando que a ligação com a histidina proximal aumenta o bolso da heme no lado distal facilitando a religação dos ligantes próximos nas amostras hexacoordenadas em comparação com as amostras pentacoordenadas.

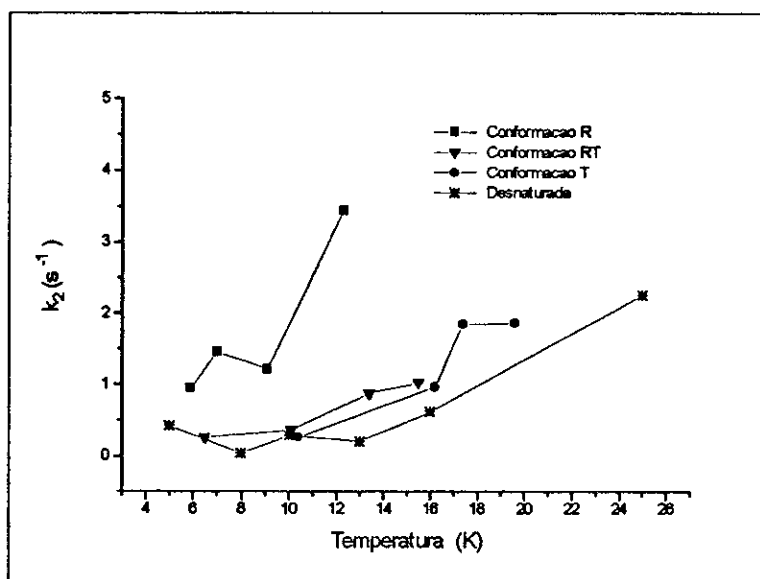


Figura 7.3: Comparação dos valores das constantes de reassociação rápida para NOHb. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].

Podemos notar que, em comparação com uma dependência tipo Arrhenius, os valores de k_1 não dependem e os de k_2 dependem muito fracamente da temperatura, o que reforça a hipótese que a recombinação, na faixa de temperatura da experiência, ocorre via tunelamento quântico.

Os parâmetros que dependem da temperatura no ajuste com o modelo de subestados conformacionais são o fator pré-exponencial A e a largura da barreira d_0 .

Comparando os seus valores para NOHb desnaturada e para as conformações R, RT e T, vemos que os valores do fator pré-exponencial são bem menores nas amostras desnaturadas do que nas conformações nativas em qualquer temperatura (figura 7.4). Estes valores podem ser associados ao aumento da entropia do sistema ligante-proteína no estado desnaturado, no qual a organização polipeptídica é quebrada, como anteriormente sugerido para a ligação de CO a Mb mutante [68].

Para amostras nativas d_0 diminui com a temperatura. Este comportamento foi explicado baseando-se na hipótese de que temperaturas maiores favorecem a transição para estados excitados com barreiras mais estreitas do que as do estado fundamental. No entanto, os valores da largura da barreira para amostra desnaturada apresenta um desvio neste comportamento, com aumento de d_0 na região de 10-17 K (figura 7.5). Nas faixas de temperatura abaixo e acima (até 25 K) desta região, o comportamento pode ser interpretado da mesma forma que nas amostras nativas.

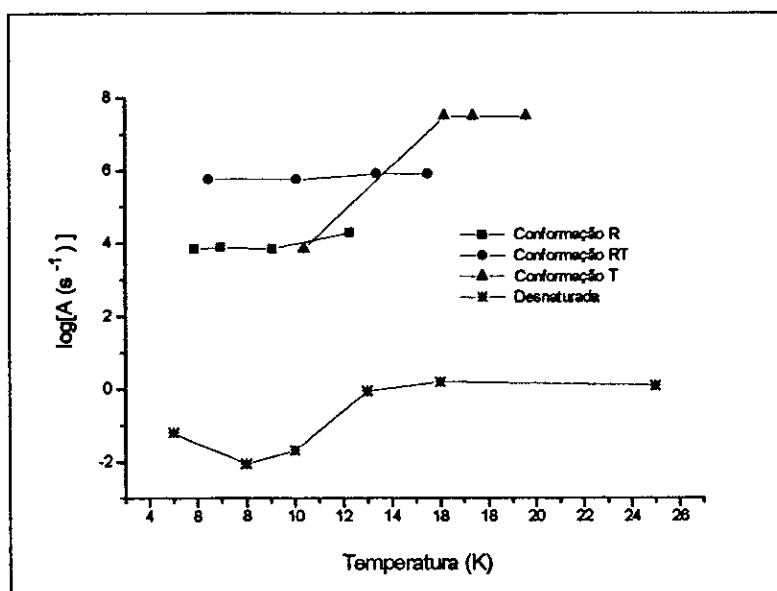


Figura 7.4: Comparação dos valores do fator pré-exponencial do modelo de subestados conformacionais para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].

O valor da energia do pico da função distribuição E_p é menor para a amostra desnaturada ($1,4 \pm 0,5$ kJ/mol) do que para a amostra nativa nas conformações R, RT e T

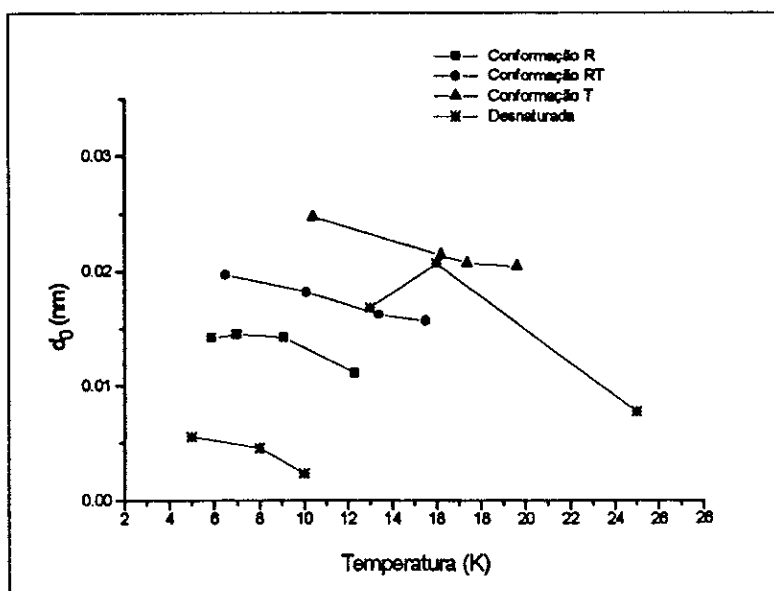


Figura 7.5: Comparação dos valores da largura de barreira geminada para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [58].

($2,71 \pm 0,02$ kJ/mol; $3,5 \pm 0,2$ kJ/mol e $4,5 \pm 0,1$ kJ/mol).

Observou-se na religação de CO com Mb que o valor de E_P diminui com o decréscimo do pH [51] ou se a proteína é colocada em um solvente com ponto de fusão alto, como álcool polivinil (PVA) [48]. A dependência com o pH foi interpretada em termos de uma interação carga-dipolo entre a molécula dipolar CO e a carga positiva da histidina distal. O decréscimo de E_P para Mb imersa na matriz sólida PVA em relação a Mb em água-glicerol que, por sua vez, é ligeiramente menor do que o valor para Mb em solução tampão, pode estar relacionada com a perda de mobilidade, ou aumento de rigidez, da cadeia polipeptídica.

Uma vez que não observamos evidências para mudanças de pH, ou mudanças na carga da histidina distal, podemos supor que o valor de E_P nas amostras desnaturadas está associado com o diminuição da mobilidade da cadeia proteica como consequência principalmente da retirada de água durante o processo de desnaturação.

O valor de $k_\nu(0,0019s^{-1})$ para NOHb desnaturada é menor do que os valores para as conformações R, RT e T que são, respectivamente, $0,0098 \pm 0,0002s^{-1}$, $0,0084 \pm$

$0,0004s^{-1}$ e $0,0188 \pm 0,0003s^{-1}$. Estes valores pequenos foram anteriormente explicados considerando as concentrações altas e as características de absorção e espalhamento das amostras congeladas. O valor obtido para amostra desnaturada é consistente com esta explicação, pois estas se precipitam durante o processo de desnaturação e portanto aumentam a concentração e espalhamento.

Diferentemente do ajuste para amostras nativas [78], o modelo fractal serve para descrever o processo de fotodissociação para NOHb desnaturada em todo o intervalo de tempo observado. O valor obtido para D, a diferença entre as dimensões fractal e fracton, $d_f - d_{fr}$, independe da temperatura.

O valor da dimensão fractal não pode ser determinado diretamente de nossos resultados, porque o parâmetro relevante para o ajuste é D. Para determinar o valor de d_f devemos utilizar os valores de d_{fr} da literatura.

Se considerarmos que as pontes de hidrogênio entre as hélices são rompidas pelo processo de desnaturação, $d_{fr} = 1$ [72], levando a uma dimensão fractal de $1,19 \pm 0,02$. Por outro lado, utilizando o valor encontrado para metaHb azida desnaturada, $d_{fr} = 1,15$ [74], obtemos $d_f = 1,34 \pm 0,02$.

Os dois valores encontrados são menores do que os valores para as conformações R, RT e T, que são $1,65 \pm 0,03$, $1,61 \pm 0,01$ e $1,56 \pm 0,03$, respectivamente, e são menores do que os valores experimentais de raios-X para a dimensão fractal da cadeia proteica, que varia de 1.48 a 1.68 [39].

O decréscimo no valor de d_f quando a proteína passa da estrutura R para a estrutura T, foi associado a estrutura R mais fechada do que a estrutura T [78]. O valor para amostra desnaturada indica que o processo de desnaturação causa um rompimento das ligações que estabilizam a globina, deixando a estrutura mais aberta do que nas amostras nativas.

O fator pré-exponencial é o parâmetro dependente da temperatura neste modelo. Observamos da figura 7.6 que os valores para amostras desnaturadas são aproximadamente constantes, quando comparados com os da conformações nativas, que independente da afinidade, apresentam um aumento com a temperatura.

Uma vez que o fator pré-exponencial está diretamente relacionado com a constante de

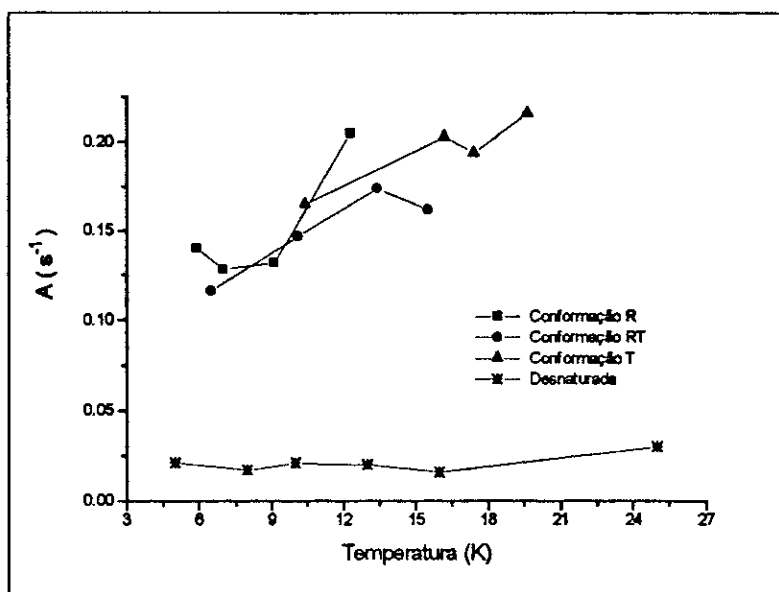


Figura 7.6: Comparação dos valores do fator pré-exponencial do modelo fractal para NOHb em diferentes estados. Os valores para as conformações R, RT e T foram obtidos de [78].

velocidade efetiva k_{ef} (equação 4.15), definida como a probabilidade por unidade de tempo para a proteína mudar o estado conformacional, podemos concluir que esta probabilidade aumenta com a temperatura nas amostras nativas e permanece constante na amostra desnaturada, ou seja, o comportamento com a temperatura deste modelo também está relacionado com a relação estrutura-função da proteína. Este resultado reforça a hipótese, discutida nos dois modelos anteriores, de que a flexibilidade da cadeia polipeptídica é importante para a função fisiológica da proteína.

Conclusões

Neste trabalho são caracterizados a estrutura e o processo de ligação de nitrosil hemo-proteínas desnaturadas termicamente usando RPE.

Acima de 80 K a dependência com a temperatura do espectro de RPE indica a existência de dois estados conformacionais em equilíbrio térmico para a maioria das amostras analisadas, com exceção de NO-hematina e NOMB nativa. A existência de várias espécies conformacionais em equilíbrio foi anteriormente sugerida como uma propriedade característica das proteínas na sua forma nativa, que tem papel fisiológico. Os resultados deste trabalho sugerem que esta é uma propriedade geral das hemoglobinas, independente de sua estrutura quaternária, do solvente, ou estado de desnaturação. Os valores dos parâmetros termodinâmicos do equilíbrio indicam que os mesmos estão relacionados com as estruturas hexa ou penta-coordenados, e não com o estado funcional da proteína.

O efeito das mudanças estruturais irreversíveis devido ao processo de desnaturação é facilmente observado nos resultados de relaxação spin-rede. Amostras desnaturadas apresentam um processo diferente a baixas temperaturas, relaxação cruzada, e um aumento no valor da taxa de relaxação em comparação com amostras nativas ou desidratadas, que são reversíveis para as nativas.

Acima de aproximadamente 10 K a dependência da taxa de relaxação com a temperatura pode ser descrita por dois modelos diferentes: ETL e tipo-Orbach. Consequentemente, os parâmetros característicos, parâmetro de assimetria (λ) para ETL e a energia

do nível excitado mais baixo (Δ) para Orbach, estão relacionados. Estes processos de relaxação dependem da estrutura da globina, como pode ser claramente observado na tabela 7.1. Estes modelos reforçam a hipótese de equilíbrio conformacional.

Os resultados de fotodissociação a baixas temperaturas de NOHb desnaturada podem ser descritos pelos mesmos modelos utilizados para NOHb nativa: exponencial dupla, subestados conformacionais e fractal. Os valores dos parâmetros e suas dependências com a temperatura indicam quais as diferenças no processo de ligação para as diferentes estruturas.

O modelo de exponencial dupla baseia-se na hipótese que existem duas populações de moléculas fotodissociadas, caracterizadas por taxas de recombinação mais lenta ou mais rápida, e que podem estar associada a duas diferentes simetrias do NO ligado como recentemente observado para NOHb e NOMB utilizando RPE com banda Q [99]. O processo de desnaturação modifica a taxa de recombinação dos ligantes que se religam mais lentamente, que estão distantes do ferro, e não são importantes para o processo de ligação rápido, devido a proximidade entre o ligante e o ferro.

O efeito das mudanças causadas pela desnaturação pode ser analisado pelos valores de três parâmetros no modelo de subestados conformacionais: o fator pré-exponencial, a energia do pico da distribuição e a largura da barreira.

A diminuição do fator pré-exponencial em relação aos valores das conformações nativas pode ser explicado como consequência do aumento de entropia da hemoproteína ligada, já que no estado desnaturado a estrutura organizada é rompida.

A diminuição da energia do pico nas amostras desnaturadas pode ser relacionada com a perda da flexibilidade da proteína como consequência da retirada de água durante o processo de desnaturação.

A largura da barreira apresenta um comportamento anômalo com a temperatura. Este é constituído por duas regiões (5 a 10K e 13 a 25K) onde temperaturas mais altas

favorecem a transição para estados excitados com barreiras mais estreitas.

O valor da dimensão fractal na amostra desnaturada é menor do que os valores nas conformações R, RT e T, e mais próximo ao da conformação T indicando uma estrutura mais aberta do que as amostras nativas. As ligações que estabilizam a estrutura nativa na forma globular são rompidas durante a desnaturação, então a forma da cadeia pode estar determinada principalmente por interações hidrofóbicas fazendo com que a amostra se precipite com uma estrutura mais aberta.

O comportamento do fator pré-exponencial com a temperatura pode estar associado a estrutura funcional da proteína, pois este parâmetro está relacionado com a mudança conformacional por unidade de tempo, que é consistentemente favorecida com o aumento da temperatura nas amostras nativas em relação as amostras desnaturadas.

A análise dos modelos para recombinação do ligante às amostras desnaturadas poderia indicar qual é o mais adequado para descrever o processo de ligação do ligante à hemoproteína nativa. A escolha deste melhor modelo levaria em consideração dois aspectos. O processo de ligação do ligante às hemoproteínas desnaturadas não pode ser descrito por um modelo criado para descrever o funcionamento da mesma na forma nativa; ou, os valores dos parâmetros que estão associados às diferentes conformações nativas devem modificar-se coerentemente de forma a descreverem as mudanças estruturais devidas ao processo de desnaturação.

Nossos resultados indicam que os três modelos são equivalentes para descrever os resultados da fotodissociação em hemoproteínas, independente de sua estrutura quaternária, e que os parâmetros dos mesmos se alteram de forma a descreverem as novas condições.

Neste trabalho a técnica de RPE foi extensivamente utilizada para caracterização do equilíbrio conformacional de nitrosil hemoproteínas. Como continuidade do mesmo sugerimos que outras técnicas sejam utilizadas para análise das hipóteses e questionamento apresentadas. Como, por exemplo, a existência de duas conformações, uma das quais

não observável por RPE acima de 80 K, pode ser analisada utilizando espectroscopia Mössbauer. Medidas do calor específico de nitrosil hemoproteínas em diferentes estados e condições podem esclarecer as diferenças nas suas estruturas e confirmar o caráter fractal observado em experimentos de fotodissociação.

Bibliografia

1. Alves, O.C. *Tese de Mestrado*, CBPF, 1991.
2. Alves, O.C. and Wajnberg, E. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 273, 1993.
3. Wajnberg, E., Bemski, G., El-jaick, L.J. and Alves, O.C. *Notas de Física CBPF-NF-019/95. Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 231, 1996.
4. Wajnberg, E. and Alves, O.C. *Notas de Física CBPF-NF-003/96*. Submetido para publicação em *J. Magn. Reson.*
5. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. and Stanler, J.S. *Nature* **380**, 221, 1996.
6. Huthinson, E. *The elements and their reactions* W.B. Saunders Company, 1959.
7. Huheey, J.E. *Inorganic Chemistry. Principles of structure and reactivity* Harper International, SI edition, 1983.
8. Barlow, C.H., Maxweel, J.C., Wallace, W.C. and Caughey, W.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 91 (1973).
9. Perutz, M.F., Kilmattim, J.V., Nagai, W.C., Szabo, A. and Simon, S.R. *Biochemistry* **15**, 378 (1976).
10. Palmer, G. *Electron Paramagnetic Resonance of Hemoproteins in Iron Porphyrins*. Part two (Lever, A.B.P. and Gray, H.B. eds) Addison-Wesley Publishing Company, 1983.
11. Chien, J.C.W. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2166 (1969).

12. Martin Neto, L., Nascimento, O.R., Tabak, M. and Caracelli, I. *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 189 (1988).
13. Morse, R.H. and Chan, S.I. *J. Biol. Chem.* **255**, 7876, (1980).
14. Hori, H., Ikeda-Saito, M. and Yonetani, T. *J. Biol. Chem.* **256**, 7849 (1981).
15. Caracelli, I., Meirelles, N.C., Tabak, M., Baffa Filho, O. and Nascimento, O.R. *Biochim. Biophys. Acta* **955**, 315 (1988).
16. Henry, Y. and Banerjee, R. *J. Mol. Biol.* **73**, 469 (1973).
17. Nagai, K., Hori, H., Yoshida, S., Sakamoto, H. and Morimoto, H. *Biochim. Biophys. Acta* **532**, 17 (1978).
18. Reisberg, P., Olson, J.S. and Palmer, G. *J. Biol. Chem* **251**, 4379 (1976).
19. Wajnberg, E., Linhares, M.P., El-Jaick, L.J. and Bemski, G. *Eur. Biophys. J* **21**, 57 (1992).
20. Maxwell, J.C. and Caughey, W.S. *Biochemistry* **15**, 388 (1976).
21. Scholler, D.M., Wang, M.R. and Hoffman, B.M. *J. Biol. Chem.* **254**, 4072 (1979).
22. Kon, H. *J. Biol. Chem.* **243**, 4350 (1968).
23. Kitagawa, T., Kyogoku, Y., Iizuka, T. and Saito, M.I. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5169 (1976).
24. Doetschman, D.C., Schwartz, S.A. and Utterback, S.G. *Chem. Phys.* **49**, 1 (1980).
25. Mishra, K.C., Mishra, S.K., Roy, J.N., Ahmad, S. and Das, T.P. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7898 (1985).
26. Waleh, A., Ho, N., Chantranupong, L. and Loew, G.H. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2767 (1989).
27. Orbach, R. and Stapleton, H.J. *Electron spin-lattice relaxation in Electron paramagnetic resonance*, ed. Geschwind, S., Plenum-Press, New York-London, 1972.

28. Pake, G.E. and Estle, T.L. *The physical principles of electron paramagnetic resonance*, 2^a ed., W. A. Benjamin Inc., Massachusetts, 1973.
29. Muench, P.J., Askew, T.R., Colvin, J.T. and Stapleton, H.J. *J. Chem. Phys.* **81**, 63, 1984.
30. Herrick, R.C. and Stapleton, H.J. *J. Chem. Phys.* **65**, 4778, 1976.
31. Blombergem, V., Shapiro, S., Persham, P.S. and Artman, J. *Phys. Rev.* **114**, 45, 1929.
32. Standley, K.J. and Vaughan, R.A. *Electron spin relaxation phenomena in solids*, Plenum-Press, New York, 1969.
33. Anderson, P.W., Halperin, B.T. and Varma, C.M. *Philos. Mag.* **25**, 1, 1972.
34. Kurtz, S.R. and Stapleton, H.J. *Phys. Rev. B* **22**, 2195, 1980.
35. Lyo, S.K. and Orbach, R. *Phys. Rev. B* **22**, 4223, 1980.
36. Askew, T.R., Muench, P.J., Stapleton, H.J. and Brower, K.L. *Sol. Stat. Commu.* **49**, 667, 1984.
37. Scholes, C.P., Issacson, R.A. and Feher, G. *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 206, 1971.
38. Yim, M.B., Kuo, K.C. and Makinem, M.W. *J. Magn. Res.* **46**, 247, 1982.
39. Allen, J.P., Colvin, J.T., Stinson, D.G., Flynn, C.P. and Stapleton, H.J., *Biophys. J.* **38**, 299, 1982.
40. Wajnberg, E., Kalinowski, H.J., Bemski, G. and Helman, J.S. *Biophys. J.* **49**, 1195, 1986.
41. Rakowsky, M.H., More, K.M., Kulikov, A.V., Eaton, G.R., and Eaton, S.S. *J. Ame. Chem. Soc.* **117**, 2049, 1991.
42. Budker, V., Du, J.-L., Seiter, M., Eaton, G.R. and Eaton, S.S. *Biophys. J.* **68**, 2531, 1995.

43. Muench, P.J. and Stapleton, H.J. *J. Chem. Phys.* **82**, 2828, 1985.
44. Nascimento, O.R., Martin Neto, L. and Wajnberg, E. *J. Chem. Phys.* **95**, 2265, 1991.
45. Doetschman, D.C. and Utterback, S.G. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2847, 1981.
46. Frauenfelder, H. *Protein Dynamics*. College on Methods and Experimental Techniques in Biophysics, Trieste, It, 1992 - Notas de Aula.
47. Landau, L.D. and Lifshitz, E.M. *Mecânica Quântica - Teoria não relativista* Editora Mir, Moscou, 1985.
48. Austin, R.H., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Gunsalus, I.C. *Biochemistry* **14**, 5355, 1975.
49. Alberding, N., Austin, R.H., Beeson, K.W., Chan, S.S., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. and Nordlund, T.M. *Science* **192**, 1002, 1976.
50. Alben, J.O., Beece, D., Bowne, S.F., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, D., Marden, M.C., Moh, P.P., Reinisch, L., Reynolds, A.H. and Yue, K.T. *Phys. Rev. Lett* **44**, 1157, 1986.
51. Doster, W., Beece, D., Bowne, S.F., DiIorio, E.E., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Reinisch, L., Shyamsunder, E., Winterhalter, K.H. and Yue, K.T. *Biochemistry* **21**, 4831, 1982.
52. Cornelius, P.A., Hochstrasser, R.M. and Steele, A.W. *J. Mol. Biol.* **163**, 119, 1983.
53. LoBruto, R., Wei, Y., Yoshida, S., Van Camp, H.L., Scholes, C.P. and King, T.E. *Biophys. J.* **45**, 473, 1984.
54. Jongeward, K.A., Marsters, J.C., Mitchell, M.J., Magde, D. and Sharma, V.S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**, 962, 1986.
55. Powers, L., Chance, B., Chance, M., Campbell, B., Friedman, J., Khalid, S., Kumar, C., Naqui, A., Reddy, K.S. and Zhou, Y. *Biochemistry* **26**, 4785, 1987.

56. Young, R.D., Frauenfelder, H., Johnson, J.B., Lamb, D.C., Nienhaus, G.U., Philipp, R. and Scholl, R. *Chem. Phys.* **158**, 315-327, 1991.
57. Linhares, M.P., El-Jaick, L.J., Bemski, G. and Wajnberg, E., *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 59, 1990.
58. El-Jaick, L., Wajnberg, E. and Linhares, M.P. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 289, 1991.
59. Powers, L.S. and Blumberg, W.E. *Biophys. J.* **54**, 181-185, 1988.
60. Agmon, N. and Hopfield, J.J. *J. Chem. Phys.* **79**, 2042, 1983.
61. Young, R.D. and Bowne, S.F. *J. Chem. Phys.* **81**, 3730, 1984.
62. El-Jaick, L.J., Wajnberg, E., Bemski, G. and Linhares, M.P., *Int. J. Biol. Macromol.* **10**, 185, 1989.
63. Braunstein, D., Ansari, A., Berendzen, J., Cowen, B.R., Egeberg, K.D., Frauenfelder, H., Hong, M.K., Ormos, P., Sauke, T.B., Scholl, R., Schulte, A., Sliger, S.G., Springer, B.A., Steinbach, P.J. and Young, R.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8497, 1988.
64. Lambright, D.G., Balasubramaniam, S., and Boxer, S.G. *J. Mol. Biol.* **207**, 289-299, 1989.
65. Balasubramaniam, S., Lambright, D.G., Marden, M.C. and Boxer, S.G. *Biochemistry* **32**, 2202-2212, 1993.
66. Petrich, J.W., Iambry, J.C., Balasubramaniam, S., Lambright, D.G., Boxer, S.G. and Martin, J.L. *J. Mol. Biol.* **238**, 437-444, 1994.
67. Abadan, Y., Chien, E.Y.T, Chu, K., Eng, C.D., Nienhaus, U. and Sliger, S.G. *Biophys. J.* **68**, 2497-2504, 1995.
68. Duprat, A.F., Traylor, T.G., Wu, G.-Z., Colleta, M., Sharma, V.S., Walda, K.N. and Magde, D. *Biochemistry* **34**, 2634-2644, 1995.

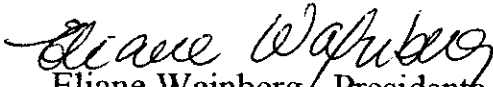
69. West, B.J. and Goldberg, A.L. *Ame. Sci.* **75**, 354-365, 1987.
70. Stapleton, H.J., Allen, J.P., Flynn, C.P., Stinson, D.G. and Kurtz, S.R. *Phys. Rev. Lett.* **45**, 1456-1459, 1980.
71. Alexandre, S. and Orbach, R. *J. Phys.-lett.* **43**, L625-L631, 1982.
72. Helman, J.S., Coniglio, A. and Tsallis, C. *Phys. Rev. Lett.* **53**, 1195-1197, 1984.
73. Elber, R. and Karplus, M. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 394-397, 1986.
74. Wajnberg, E. and Bemski, G. *Phys. Lett. A* **132**, 4-8, 1988.
75. Drews, A.R., Thayer, B.D., Stapleton, H.J., Wagner, G.G., Giugliarlli, G. and Cannistraro, S. *Biophys. J.* **57**, 157-162, 1990.
76. Mrevlishvili, G.M., Kamushadze, Y.G. and Tatishvili, D.A. *Biophysics* **38**, 601-605, 1993.
77. Fedorov, B.B. and Fedorov, B.A. *Biophysics* **38**, 629-635, 1993.
78. El-jaick, L.J. and Wajnberg, E. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 119-123, 1993.
79. Liebovitch, L.S., Fischbarg, J., Komiarek, J.P., Todorova, I. and Wang, M. *Biophys. Biochi. Acta* **896**, 173-180, 1987.
80. Dewey, F.G. and Spencer, D.B. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **7**, 155-171, 1991.
81. Castner, T.E. *Phys. Rev.* **130**, 58-75, 1963.
82. Bradvig, G.W. *Methods Enzymol.* **240**, 536, 1995.
83. Galli, C., Innes, J.B., Hirsh, D.J. and Bradvig, G.W. *J. Magn. Reson.* **110**, 284, 1996.
84. Szabo, A. and Perutz, M.F. *Biochemistry* **15**, 4427, 1976.
85. Martins Neto, L., Tabak, M. and Nascimento, O.R. *J. Inorg. Biochem.* **40**, 309, 1990.

86. Wajnberg, E., Alonso, A., Nascimento, O.R. and Tabak, M. *Chem. Phys. Lett.* **199**, 111, 1992.
87. Wittenberg, B.A., Briehl, R.W. and Wittenberg, J.B. *Biochem. J.* **96**, 363, 1965.
88. Krupyanskii, Yu.F., Parak, F., Goldanski, V.I., Mössbauer, R.L., Gaubman, E.E., Engelmann, H. and Suzdalev, I.P. *Z. Naturforsch* **37c**, 57, 1982.
89. Bauminger, E.R., Cohen, S.G., Nowik, J., Ofer, S. and Yariv, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1983.
90. Parak, F., Heidemeier, J. and Nienhaus, U. *Hiper. Inter.* **40**, 147, 1988.
91. Feher, G. *Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology* Gordon and Breach publish, 1969.
92. Messana, C., Cerdonio, M., Shenkin, P., Noble, R., Fermi, G. and Perutz, R.N. *Biochemistry* **17**, 3652, 1978.
93. Perutz, R.N. *Nature* **358**, 548, 1992.
94. Steinhoff, H.J., Lieutenant, K. and Redhardt, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 49 (1989).
95. Petrich, J.W., Lambry, J.C., Kuczera, K., Karplus, M., Poyart, C. and Martin, J.L. *Biochemistry* **30**, 3975, 1991.
96. Jortner, J. *J. Chem. Phys.* **64**, 4860 (1986)
97. Cusack, S. and Doster, W. *Biophys. J.* **58**, 243 (1990)
98. Fermi, G. *J. Mol. Biol.* **97**, 237 (1975)
99. Rivera, M.A.F. *Tese de Mestrado*, CBPF, 1996.


**“EQUILÍBRIO CONFORMACIONAL EM NITROSIL
HEMOPROTEÍNAS DESNATURADAS”**

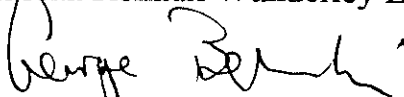
Odivaldo Cambraia Alves

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

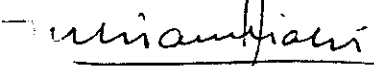

Eliane Wajnberg - Presidente


Maria Teresa Lamy Freund


Sonia Renaux Wanderley Louro


George Bemski


Susana Isabel Zanette de Caride


Mario Giambiagi - Suplente

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 1996