

Braulio Rafael Pujada Bermúdez

**Estudo dos espectros de RPE de nitrosil
hemoglobina de vertebrados**

Tese de Mestrado

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rio de Janeiro

Agosto de 1999

Dedicatória

A mis padres : Andrea y Urbano.

Agradecimentos

- Aos orientadores George Bemski e Eliane Wajnberg pelas orientações e paciência a mim dedicadas neste trabalho.
- Aos Doutores Valdir Ramos Jr. e Luiz Paulo L. Fedullo do Jardim Zoológico do RJ, à Dr. Carmen Nogueira do Hospital Universitario da UFRJ, e ao Dr. Carlos Henrique de Mello Souza do Instituto Nacional de Proteção Animal (INPA).
- Ao Marco Flores pelos ensinamentos no uso do programa QPOWA, na preparação das amostras, nas medidas de RPE em banda X e banda Q, e sobretudo pelo apoio e estímulo.
- À Myriam S. Coutinho, à Celia Monteiro, ao CFC, ao pessoal do DME e a todo apoio e estrutura oferecidos pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas.
- Aos amigos em especial : Lucimary, Marco, Ricardo, Leida, Adriana, Georgia, Jorge Luis, Cambraia, Rodolfo, Juan, Victor, Luis, Fernando, Julio, Jorge M., Dalber.
- À minha família: Miguel, Omar, Luisa, Viviana, Jeny, Mariela, Miguel Z., Katty, Hellen, Jose Carlo, Veco, Celia, Susana, Jorge, Gabriel, Manuel, Mario, Poncotes e todos os demais.
- À CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida.

Resumo

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em banda X de nitrosil hemoglobina (HbNO) de 10 vertebrados foram obtidos a temperatura de nitrogênio líquido (77 K). Encontrou-se que os espectros de HbNO de 8 vertebrados que não apresentam uma estrutura hiperfina bem resolvida, podem ser simulados como a soma de duas componentes, uma com simetria axial e outra com simetria rômica. Para a componente rômica a interação com só um nitrogênio (N do NO) deve ser considerada.

Os espectros de HbNO de dois vertebrados apresentam uma estrutura hiperfina resolvida a 77 K. Estes espectros foram simulados como a soma de três componentes, uma com simetria axial e duas com simetria rômica. A segunda componente rômica considera a interação com dois nitrogênios (N do NO e possivelmente o N da histidina proximal F8). A análise dos espectros HbNO destes dois vertebrados (variação térmica) na faixa entre 10 K e 200 K mostrou que a variação com a temperatura das frações axial e rômicas é pequena.

Medidas de RPE em banda Q de HbNO de cabra confirmou a presença de três componentes nos seus espectros.

Os resultados são discutidos em função das diferenças nas seqüências de aminoácidos da Hb na região do bolso da heme e do sitio de ligação do Difosfato glicerol (DPG).

ÍNDICE

Resumo	III
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VIII
Introdução	9
Capítulo 1: Hemoglobina	11
1.1 Biomoléculas	1
1.2 Hemoproteínas	12
1.2.1 Grupo Heme	13
1.2.2 Mioglobina	15
1.2.3 Hemoglobina	16
1.3 Funções Fisiológicas da Hemoglobina	19
1.4 Evolução das proteínas de globina	20
Capítulo 2 : Ressonância paramagnética eletrônica de nitrosil hemoproteínas	25
2.1 Hamiltoniano de Spin	26
2.2 Ion Ferro em Hemoproteínas	28
2.3 Nitrosil hemoglobina	29
2.4 Transição R-T em HbNO	33

Capitulo 3: Materiais e Métodos	35
3.1 Preparação de amostras	35
3.2 Medidas de RPE	37
3.3 Simulação de espectros	38
Capitulo 4 : Resultados	40
4.1 Espectros de RPE de HbNO dos vertebrados em banda X	40
4.2 Variação com temperatura dos espectros de HbNO de capivara e cabra em banda X	48
4.3 Variação com temperatura dos espectros de RPE de HbNO de cabra em banda Q	53
Capitulo 5 : Discussão e Conclusões	54
Conclusões	65
Apendice	67
Bibliografia	70

Lista de Figuras

1.1	Representação do grupo heme com o sexto ligante (esfera) e as histidinas proximal (F8) e distal (E7) ^[9] .	14
1.2	A estrutura terciária da mioglobina ^[10] .	12
1.3	Estrutura quaternária da hemoglobina ^[7] .	17
1.4	Curva de saturação para a Mb e Hb a diferentes pH.	19
1.5	Evolução das globinas ^[3] .	24
2.1	Possíveis ocupações dos orbitais d pelos elétrons do íon Fe ²⁺ e Fe ³⁺ .	29
2.2	Dependência com a temperatura dos espectros de EPR de HbNO a $1,3 \times 10^{-3}$ mW. AB é o espectro composta a 32 K e AC a 104 K ^[29] .	32
4.1	Espectros de HbNO dos vertebrados em banda X a 77 K.	40
4.2	Espectro de RPE de HbNO das cadeias isoladas: a, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, na conformação T; b, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$, na conformação R; c, $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ na conformação R ^[31] .	41
4.3	Simulação do espectro de RPE de HbNO de humano a 77 K, como a soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ com frações de 0.06, 0.42 e 0.52, respectivamente.	42
4.4	Simulação do espectro de RPE de HbNO de cabra a 77 K, como a soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ com frações de 0.15, 0.42 e 0.43, respectivamente.	42
4.5	Espectro de HbNO de gato em banda X a 77 K.	43
4.6	Componentes Axial e Rômbica dos espectros em banda X a 77 K.	44
4.7	Espectros de capivara e cabra simulados com só dois componentes, axial e rômbica que interage só com N do NO, a 77 K.	46
4.8	Espectro de capivara simulado como a soma de três componentes, uma axial e duas rômbicas a 77 K.	47

VII

4.9 Espectros de EPR em banda X de HbNO da capivara em função da temperatura.	48
4.10 Espectros de EPR de HbNO em banda X da cabra em função da temperatura	49
4.11 Espectros de RPE de HbNO de cabra, em banda Q, em função da temperatura.	53
5.1 Geometria e g-eixos da componente axial de NO-Fe-N(histidina) ^[16] .	55
5.2 Geometria e g-eixos da componente rômica de NO-Fe-N(histidina) ^[16] .	56
5.3 Aminoácidos em contato com a heme na cadeia α em oxi-Hb ^[39] .	57
5.4 Aminoácidos em contato com a heme na cadeia α em oxi-Hb ^[39] .	58
5.5 Representação esquemática do enlaçamento do DPG	62
5.6 Espectros de RPE de complexos de nitrosil na presença de DPG (a) homem ; (b) vaca; e (c) búfalo ^[42] .	63
A1 Espectro EPR de HbNO de cavalo tanto experimental como os simulados.	68

Lista de Tabelas

1.1	Diferenças na seqüência de aminoácidos ^[3] .	22
3.1	Vertebrados obtidos para nosso trabalho.	35
4.1	Valores das componentes do fator g , interação hiperfina A (MHz) e larguras de linha ΔH (MHz)	45
4.2	Valores dos parâmetros da componente axial da capivara.	50
4.3	Valores dos parâmetros da componente rômbrica da capivara que interage com só um nitrogênio	50
4.4	Valores dos parâmetros da componente rômbrica da capivara que interage com dois nitrogênios	50
4.5	Frações das componentes em função da temperatura em HbNO da capivara	51
4.6	Valores dos parâmetros da componente axial da cabra.	51
4.7	Valores dos parâmetros da componente rômbrica da cabra que interage com só um nitrogênio	51
4.8	Valores dos parâmetros da componente rômbrica da cabra que interage com dois nitrogênios	52
4.9	Frações das componentes em função da temperatura em HbNO da cabra.	52
5.1	Seqüência dos aminoácidos perto da heme nas cadeias α e β ^[39] .	58
5.2	Variação dos aminoácidos perto da heme para as Hbs dos vertebrados Em relação ao homem.	60
5.3	Variação dos aminoácidos que interage com o 2,3-DPG em relação ao homem.	61
A.1	Valores nas componentes axial e rômbrica de cavalo com os erros considerados.	67

Introdução

As hemoproteínas hemoglobina (Hb) e mioglobina (Mb), têm como função biológica o transporte e armazenamento de oxigênio nos organismos. A presença de um átomo de ferro na heme destas proteínas, com propriedades magnéticas bem conhecidas, permite o uso de várias técnicas físicas tais como a ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

As hemoglobinas de uma grande variedade de vertebrados diferem nas seqüências de seus aminoácidos e conformação da globina mas o grupo heme é idêntico em todas as hemoglobinas dos vertebrados.

Este trabalho tem por objetivo estudar a influência das variações de aminoácidos nas propriedades paramagnéticas de hemoglobinas de vertebrados. Os trabalhos de ressonância paramagnética em hemoglobinas são quase exclusivamente de hemoglobinas humanas. O número de trabalhos feitos com Hb não-humanas é mínimo. Alguns destes poucos trabalhos indicam que a substituição de um determinado amino ácido por outro (mutação) produz mudanças no espectro de RPE.

Nosso trabalho consiste, primeiramente, em comparar os espectros de RPE de nitrosil hemoglobina (HbNO) de vários vertebrados e reconstruir cada espectro como a soma de componentes: rômica e axial. Os espectros de HbNO de dois vertebrados, capivara e cabra, se diferenciam fortemente dos demais estudados. Seus espectros de RPE foram estudados em função da temperatura em banda X e em banda Q para a cabra.

No capítulo 1 temos uma revisão da hemoglobina e mioglobina, e as características da heme. Também é apresentada uma revisão da evolução da globina de hemoproteínas.

O segundo capítulo apresenta uma breve revisão da técnica espectroscópica de RPE e os trabalhos que foram feitos em HbNO usando esta técnica.

Os materiais e métodos utilizados, são apresentados no capítulo 3.

O capítulo 4 refere-se aos resultados obtidos neste trabalho.

No capítulo 5 temos as discussões e conclusões.

Capítulo 1: Hemoglobina

1.1 Biomoléculas

Dois tipos de biomoléculas são responsáveis pelos muitos fenômenos biológicos nos sistemas vivos, os ácidos nucleicos (ADN e ARN) e as proteínas.

As duas biomoléculas são formadas de relativamente poucos componentes: no caso de ácidos nucleicos são quatro bases purinas e piriminas (adenina, timina, guanina e citocina) e em proteínas são vinte aminoácidos. Estes componentes formam cadeias. No caso do ADN as cadeias têm forma de dupla hélice, com as bases formando pares A-T e G-C, perpendiculares ao eixo da hélice e distando 3.4 °A entre si. Tripletes de bases são fundamentais na informação genética para a formação de aminoácidos. As quatro bases podem produzir 64 tripletes diferentes. Considerando que existem mais tripletes que aminoácidos, o código genético é degenerado e a vários aminoácidos correspondem mais que um triplete^[1, 2].

As proteínas têm peso molecular de no mínimo 10000. A hemoglobina contém da ordem de 140 aminoácidos nas suas cadeias polipeptídicas. O gene que é a porção do ADN que codifica um tipo de proteína, consiste, no caso da hemoglobina, de aproximadamente 1800 pares de bases que correspondem a aproximadamente 1.5×10^{-5} cm. de comprimento da gene. Existem também porções de ADN que não parecem codificar as proteínas. Os humanos tem da ordem de 100,000 proteínas diferentes, principalmente enzimas e proteínas estruturais. Em conseqüência destes grandes números a molécula de ADN chega a mais de 1mm. de comprimento o que produz complicados problemas topográficos no momento de desenrolamento e enrolamento.

O ARN é também importante no processo de translação de informação genética às proteínas e existem vírus cujo núcleo está formado de ARN no lugar de ADN.

1.2 Hemoproteínas

A transição entre a vida anaeróbica e a aeróbica foi um passo importante na evolução, porque revelou um rico reservatório de energia. Cerca de 18 vezes mais energia é extraída da glicose, na presença de oxigênio, do que na sua ausência. Os vertebrados desenvolveram dois mecanismos principais para suprir suas células com o fluxo contínuo e adequado do oxigênio. O primeiro é um sistema circulatório que entrega ativamente o oxigênio às células, as veias e artérias. O segundo é o uso de moléculas que carregam e estocam o oxigênio, para contornar a limitação imposta pela baixa solubilidade do oxigênio na água. As moléculas que carregam e estocam o oxigênio nos vertebrados são as proteínas hemoglobina e mioglobina, respectivamente. A hemoglobina, que está contida nos glóbulos vermelhos do sangue, serve como carregadora de oxigênio no sangue e também desempenha um papel vital no transporte de dióxido de carbono e íons de hidrogênio. A mioglobina, proteína abundante no músculo, provê um suprimento de oxigênio e facilita o movimento de oxigênio dentro do músculo. O estudo da mioglobina e a hemoglobina é revelador da conformação, dinâmica e função das proteínas. Suas estruturas tridimensionais, conhecidas com detalhes atômicos, facilitam a compreensão da sua função. A ligação do O_2 à hemoglobina é regulada por H^+ , CO_2 , fosfatos orgânicos e NO , descoberto recentemente, e que atua não só como um regulador fisiológico na troca de oxigênio pelo dióxido de carbono, como também no controle da pressão sanguínea^[4]. Estes reguladores afetam a ligação do oxigênio mesmo ao se ligarem em locais na proteína bem distantes de onde o O_2 está ligado. Interações entre locais espacialmente

distintos, chamadas de interações alostéricas, ocorrem em muitas proteínas. Efeitos alostéricos desempenham um papel crítico no controle e na integração de eventos nos sistemas biológicos. A hemoglobina é a proteína alostérica mais estudada, e portanto sua estrutura e função são conhecidas com certo detalhe. Além disso, a descoberta de mutantes de hemoglobina foi a primeira a revelar que uma doença pode ter origem molecular devido a uma única mutação ^[5]. O conceito de doença molecular, agora parte integrante da medicina, originou-se nestes estudos.

1.2.1 Grupo Heme

A capacidade da mioglobina ou da hemoglobina de se ligar ao oxigênio depende da presença de uma unidade não peptídica, o agrupamento heme. O grupo heme dá à hemoglobina e à mioglobina as suas cores características. Varias proteínas requerem unidades não peptídicas específicas, fortemente ligadas, para as suas atividades biológicas. Tais unidades são chamadas de agrupamentos prostéticos. Uma proteína sem o seu agrupamento prostético característico é chamada de apoproteína^[6,7].

O grupo heme consiste de um átomo de ferro unido a uma estrutura orgânica planar, pertencente a uma classe de componentes conhecidas como porfirinas. Existem muitos derivados possíveis de porfirina, o que se encontra na hemoglobina é a protoporfirina IX, a qual contém quatro grupos metila ($-\text{CH}_3$), duas vinilas ($-\text{C}=\text{CH}_2$) e dois ácidos propiônicos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)^[8]. No plano da heme o átomo de ferro está ligado a quatro nitrogênios do grupo pirrol. O ferro pode formar duas ligações adicionais, perpendiculares ao plano da heme, denominados de quinta e sexta posição de coordenação. Na quinta posição o ferro vai se ligar covalentemente ao nitrogênio do grupo imidazol da histidina proximal (F8) e na sexta posição podem se ligar a moléculas, como o O_2 , o NO ou um aminoácido da globina

(hemicromos). Na maioria das hemoglobinas próximo ao sexto ligante existe a histidina distal (E7) que nas condições fisiológicas não se liga diretamente com o ferro mas que pode fazer ponte de hidrogênio com o sexto ligante (figura 1.1).

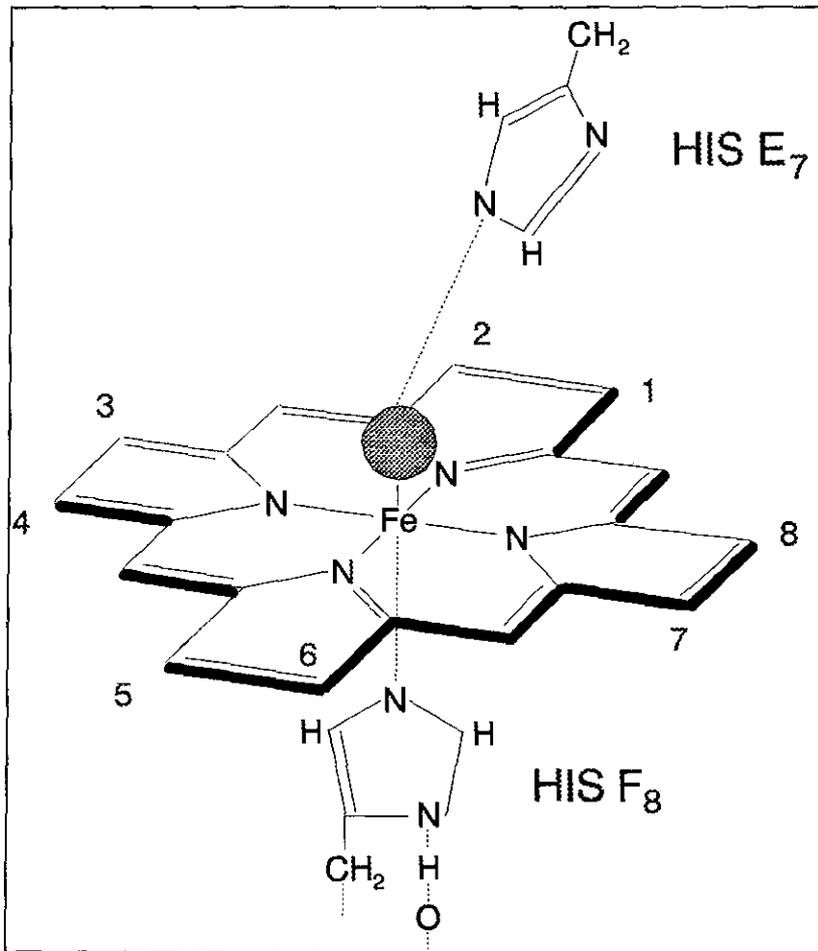


Figura 1.1.- Representação do grupo heme com o sexto ligante (esfera) e as histidinas proximal (F8) e distal (E7) ^[9].

O átomo de ferro pode estar no estado de oxidação ferroso (Fe^{2+}) ou no férrico (Fe^{3+}), e as formas correspondentes de hemoglobina são chamadas de ferrohemoglobina e ferrihemoglobina respectivamente. O estado de ligação do Fe depende do ligante. Tanto o

estado oxigenado como a forma deoxigenada da Hb tem o ferro no estado ferroso. A mesma nomenclatura se aplica à mioglobina.

A heme está localizada numa região da cadeia polipeptídica, chamada bolso da heme, que está situada perto da superfície da molécula. Além da ligação covalente entre o ferro e a histidina F8, temos contatos do tipo van-der-Waals entre os átomos do anel porfirínico e aproximadamente 60 átomos da cadeia polipeptídica.

1.2.2 Mioglobina

A mioglobina é a proteína localizada no músculo dos vertebrados cuja função é armazenar oxigênio. É constituída de uma só cadeia polipeptídica e sua seqüência de aminoácidos é similar à cadeia β da hemoglobina. A mioglobina liga-se ao oxigênio liberado das células vermelhas, armazenando e transportando o O_2 a uma organela subcelular chamada mitocôndria, onde o oxigênio participa da reação química da combustão de glicose a dióxido de carbono e água.

A mioglobina do músculo esquelético de cachalote foi utilizada por John Kendrew em 1962 para a determinação da estrutura da proteína usando difração de raios X, por ser pequena e formar excelentes cristais^[10]. Os músculos esqueléticos de mamíferos aquáticos, tais como baleias, focas e toninhas são particularmente rico em mioglobina, já que precisam estocar O_2 por períodos relativamente longos (figura 1.2).

A estrutura tridimensional da mioglobina é a mesma para as diferentes espécies estudadas até o presente. Isso confirma que apesar da microheterogeneidade (mutações) na composição dos aminoácidos alguns devem ter suas posições conservadas na estrutura primária (seqüência) de modo a determinar a estrutura terciária da proteína.

A molécula da hemoglobina é composta de cadeias polipeptídicas, estas cadeias são de duas classes: alfa (α) e beta (β) e que diferem primeiramente no número e seqüência de amino ácidos.

Segundo Perutz^[11] as quatro cadeias se arranjam em uma molécula quase esférica com dimensões 64 x 55 x 50 A°, e agrupadas de maneira que existe pouco contato entre cadeias iguais e muito entre cadeias diferentes (figura 1.3). Os contatos entre cadeias diferentes são de dois tipos: fixos e os que se movem quando ocorre a transição da forma desoxigenada para oxigenada.

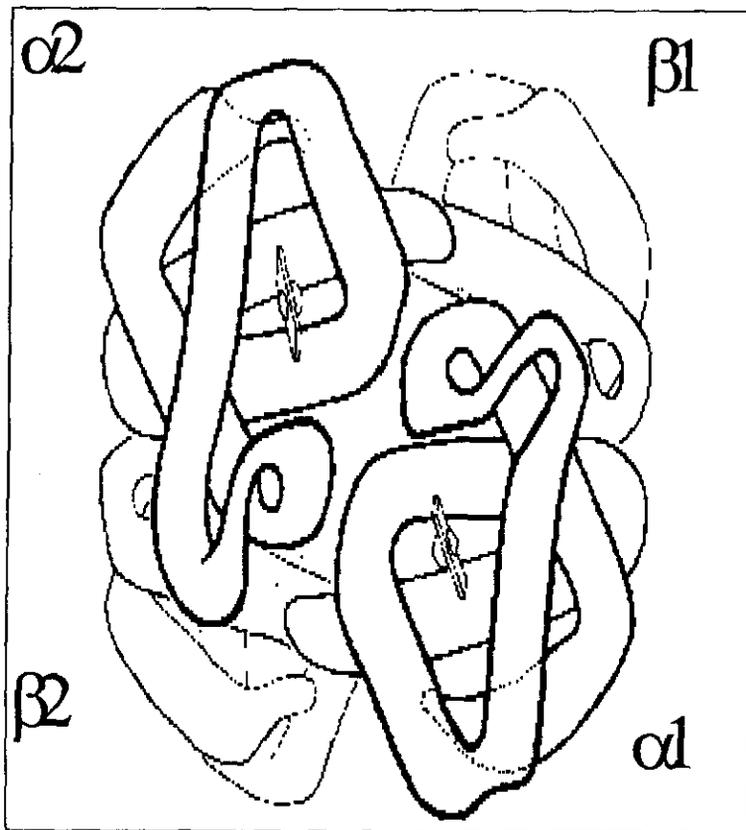


Figura 1.3.- Estrutura quaternária da hemoglobina^[7].

As subunidades α e β da hemoglobina têm a mesma estrutural geral que a mioglobina. Contudo surgem novas propriedades de profunda importância biológica, resultantes da

formação do tetrâmero. Por esta razão a hemoglobina é uma molécula muito mais complicada do que a mioglobina. A hemoglobina é uma proteína alostérica, enquanto que a mioglobina não e esta diferença se expressa de três formas:

1. A ligação de uma molécula de O_2 facilita a ligação de outras moléculas de O_2 , à mesma molécula de hemoglobina. Em outras palavras, o O_2 se liga cooperativamente à hemoglobina. A ligação do O_2 à mioglobina não é cooperativa.
2. A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio depende do pH, enquanto que a da mioglobina é independente do pH. Tanto o H^+ quanto o CO_2 promovem a liberação de O_2 ligado. Reciprocamente, o O_2 promove a liberação de H^+ e CO_2 .
3. A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, dentro das células vermelhas, é menor do que aquela da hemoglobina em solução. O responsável por este fato é o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), um fosfato orgânico altamente aniônico presente nas hemácias humanas e de muitos outros mamíferos. Benesch and Benesch^[12] e Chanutin and Cuenish^[13] demonstraram que o DPG abaixa a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, se ligando entre as cadeias β na deoxihemoglobina.

1.3 Funções Fisiológicas da Hemoglobina

Uma outra característica importante da Hb e Mb é dada pela curva de saturação em função da pressão parcial de oxigênio (figura 1.4). A porcentagem de saturação é definida como a razão entre o número de sítios ocupados e o número total de sítios disponíveis. A pressões parciais típicas dos pulmões (aprox. 100 mmHg), a Hb (figura 1.4) está quase

totalmente saturada com o oxigênio. A pressões parciais baixas, como nos tecidos, grande parte do oxigênio é liberado.

O O_2 se liga a Mb também de forma reversível mas a curva de saturação é diferente da Hb. A pressões parciais de O_2 de aproximadamente de 80 mmHg, a Hb e Mb estão quase totalmente saturadas, mas quando a pressão é reduzida a 20 mmHg, a saturação da Hb é no máximo 0.5 (dependendo do pH) enquanto que a da Mb é da ordem de 0,8. Esta propriedade da Hb é de grande importância para sua função fisiológica já que um transportador de oxigênio não só deve ligar oxigênio como também deve liberá-lo de forma que os tecidos sejam adequadamente abastecidos de oxigênio. Para o caso da Mb, mesmo podendo ligar-se facilmente ao oxigênio, precisa de uma pressão muito mais baixa para liberá-lo. A diferença entre o comportamento da Hb e Mb está relacionada com as interações das subunidades na Hb. A curva sigmoideal na Hb, em contraste com a curva na forma de hipérbole da Mb, implica a existência de efeitos cooperativos entre as quatro subunidades. O modelo mais simples usado para explicar este comportamento é o modelo alostérico proposto por Monod, et al.^[14].

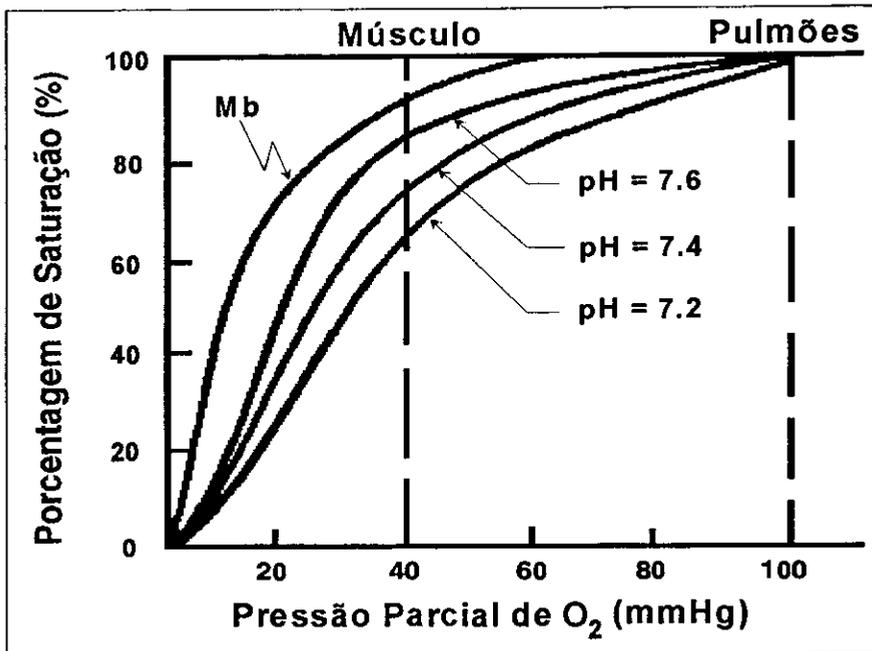


Figura 1.4 .- Curva de saturação para a Mb e Hb a diferentes pH.

1.4 Evolução das proteínas de globina

Nos últimos 50 anos, devido ao aperfeiçoamento das análises das seqüências e estruturas das proteínas mostrou-se que toda proteína globular leva um registro de sua evolução e estrutura. O estudo na seqüência de amino ácidos de proteínas equivalentes de diferentes espécies ou de proteínas relacionadas das mesmas espécies, permitiu estabelecer com uma grande precisão a relação entre as espécies e os detalhes evolucionários. A estrutura tridimensional de duas proteínas também pode mostrar uma conexão evolucionária que não é muito fácil de se reconhecer a partir da seqüências dos seus amino ácidos.

Um exemplo da análise da evolução das proteínas é o da família das globinas (hemoglobina e mioglobina). A grande similaridade na seqüência de aminoácidos e no

dobramento tridimensional de todas as globinas, sugerem que seus genes evoluíram por divergência a partir de um ancestral comum a todos eles.

A hemoglobina humana é composta de duas cadeias alfa (α) e duas beta (β). A cadeia α é formada por 141 amino ácidos e a β por 146. Apesar de as duas cadeias serem similares em sua conformação tridimensional, elas diferem consideravelmente em composição. Quando comparadas as seqüências das duas cadeias, elas tem 77 posições onde seus aminoácidos são diferentes, e só 64 posições que coincidem.

O argumento para um ancestral comum nestas globinas é reforçado pelo fato que nas hemoglobinas humanas, a cadeia beta é ocasionalmente substituída por cadeias com diferentes seqüências de aminoácidos, conhecidas como cadeias gama (γ), delta (δ) e épsilon (ϵ). A cadeia épsilon é produzida somente durante um curto período de tempo no início da vida embrionária. A cadeia gama substitui a cadeia beta numa grande parte do desenvolvimento fetal e desaparece quase totalmente durante o primeiro ano de vida. Durante a vida adulta, uma pequena fração da hemoglobina contém cadeias delta no lugar da beta. As cadeias beta, gama e delta contém 146 amino ácidos e são muito semelhantes. Existem 39 diferenças na seqüência de amino ácidos entre as cadeias beta e gama, e só 10 entre a beta e delta, na Hb humana.

A mioglobina consiste de uma única cadeia polipeptídica de 153 amino ácidos e tem a mesma configuração tridimensional que as cadeias de hemoglobina.

Tomemos, por exemplo, as cadeias de hemoglobina humana, de cavalo e a mioglobina de cachalote. Num estudo comparativo entre suas seqüências de aminoácidos^[3], observa-se que, considerando só o comprimento da cadeia, a mioglobina parece estar numa classe própria, as cadeias α do homem e de cavalo são semelhantes, e as cadeias β , γ e δ , do homem e β de cavalo formam uma terceira classe. Uma comparação nas seqüências de aminoácidos de

Hb humana e de cavalo, e mioglobina de cachalote pode ser observado na tabela 1.1 (já que nem todas as cadeias têm o mesmo número de aminoácidos, as ausências de aminoácidos nas cadeias forem tratados, formalmente, como um tipo especial de amino ácido, sendo diferente dos demais).

Tabela 1.1 .- Diferenças na seqüência de amino ácidos ^[1].

Total de Resíduos	Cavalo (α) 141	Homem (α) 141	Cavalo (β) 146	Homem (β) 146	Homem (δ) 146	Homem (γ) 146	Cachalote (Mb) 153
Cavalo (α)	0	18	84	86	87	87	118
Homem (α)	18	0	87	84	85	89	115
Cavalo (β)	84	87	0	25	26	39	119
Homem (β)	86	84	25	0	10	39	117
Homem (δ)	87	85	26	10	0	41	118
Homem (γ)	87	89	39	39	41	0	121
Cachalote (Mb)	118	115	119	117	118	121	0

Da tabela podemos notar que, considerando a semelhança na seqüência de aminoácidos, as cadeias β e δ do homem são muito semelhantes, e que as cadeias α do homem e cavalo são também bastante similares. As cadeias humanas β e δ diferem da cadeia γ. As cadeias β, γ e δ, estão muito afastadas da cadeia α, e todas as cadeias da hemoglobina, independente do tipo ou da espécie, têm da ordem de 80 % de aminoácidos diferentes da mioglobina de cachalote.

Uma interpretação que pode ser dada a estes dados é esquematizada na figura 1.5. Em algum tempo no passado distante, uma proteína ancestral primitiva, comum a dos cachalotes, cavalos e homens, tinha só uma heme capaz de ligar uma molécula de O_2 , que, provavelmente, tinha uma forma aproximada semelhante à mioglobina. Esta proteína foi codificada por um determinado gene.

Em algum ponto da história das espécies, este gene particular foi dobrado ou duplicado. Com dois genes produzindo, possivelmente, a mesma proteína, apresentaram-se vantagens. A mutação em só um dos genes poderia, agora, não ser fatal, e os dois genes poderiam então, evoluir lentamente ao longo de caminhos independentes. Uma destas proteínas tornou-se gradualmente mais apropriada a ser transportadora e a outra um depósito de oxigênio

Num tempo posterior, o gene da hemoglobina foi duplicado novamente e divergiu na produção das cadeias α e β . Desenvolvimentos a partir desta divergência tornando-se vantajosa para o organismo, levaram a construção de quatro cadeias numa unidade transportadora de oxigênio mais eficiente.

Mais tarde, o gene da cadeia β divergiu em β e γ , e, algum tempo depois, os primata se ramificaram do resto dos mamíferos separando as cadeias do homem da do cavalo. Finalmente, no último período na história da evolução dos primata, acontece um outro desdobramento do gene da cadeia β , com o conseguinte aparecimento da cadeia δ no homem.

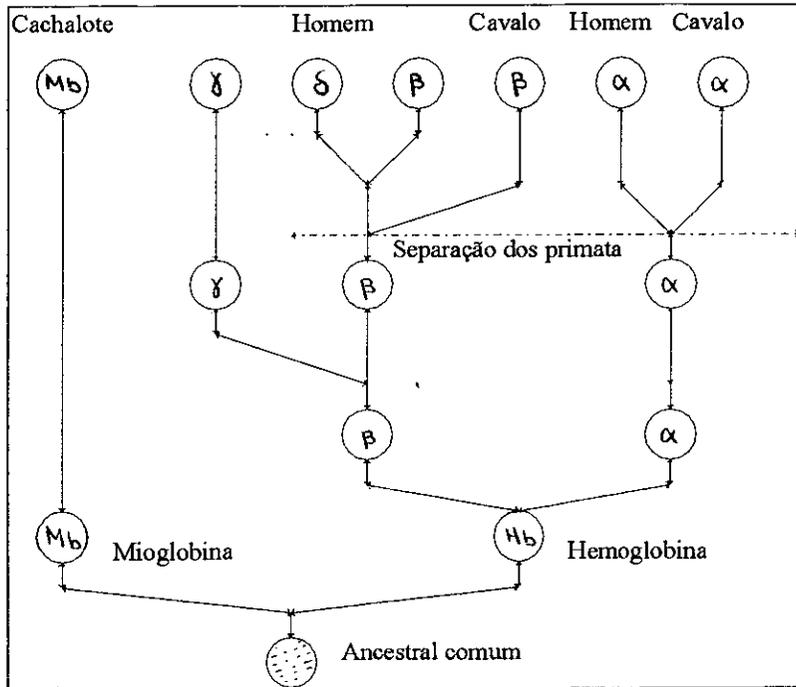


Figura 1.5.- Evolução das globinas ^[3].

Capítulo 2 : Ressonância paramagnética eletrônica de nitrosil hemoproteínas

A Ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é o fenômeno de absorção de energia pelos sistemas atômicos ou moleculares com um elétron desemparelhado quando estes se acham sujeitos à aplicação de um campo magnético H e um campo de microondas.

Certas proteínas apresentam átomos paramagnéticos em sua estrutura. Em certos casos é possível a introdução de moléculas chamadas “marcador de spin” que são radicais livres estáveis, em algumas macromoléculas que não apresentam absorção intrínseca de RPE, ou para observar diferentes sítios. O “marcador de spin” ligado à macromolécula pode refletir no seu espectro de RPE alterações na sua vizinhança. O mais utilizado dos “marcador de spin” são derivados do radical nitróxido (NO)^[15].

No caso das hemoproteínas, a técnica de RPE pode ser utilizada para observação do Fe para alguns ligantes como F, H₂O, NO e outros. O gás de NO pode se ligar muito facilmente à mioglobina (MbNO), hemoglobina (HbNO), a suas cadeias isoladas α e β (α_{NO} , β_{NO}) e alguns derivados de porfirina^[16].

Uma das características do NO é a estrutura de radical livre que ela apresenta, ou seja, possui um elétron desemparelhado que torna paramagnético e altamente reativo. Tanto o NO como o O₂ apresentam configuração eletrônica muito semelhante, diferindo somente pela ausência de elétron desemparelhado no O₂. Resultados espectroscópicos mostram que ambos os ligantes apresentam estrutura física e distribuição de cargas semelhantes quando ligados a hemoproteínas^[15].

2.1 Hamiltoniano de Spin

O momento magnético μ de um elétron desemparelhado pode ser escrito em função do momento angular de spin como:

$$\mu = -g \beta S. \quad (1)$$

onde g é o fator giromagnético e β é o magnéton de Bohr. A energia de interação do momento magnético com um campo externo \mathbf{H} de intensidade uniforme H_0 é calculada pelo hamiltoniano, H

$$H = -\mu \cdot \mathbf{H}$$

$$H = g \beta S \cdot \mathbf{H} \quad (2)$$

$$H = g \beta H_0 S_z.$$

onde S_z é o operador correspondente à projeção do momento angular de spin ao longo da direção do campo. A técnica de RPE consiste em irradiar uma amostra sujeita a um campo eletromagnético com energia $h\nu$ que pode ser absorvida e induzir transições entre estados com $\Delta S = \pm 1$. A diferença de energia entre estados é $g\beta H_0$. Por tanto a condição de ressonância, levando a absorção de energia pela amostra, é dada por

$$h\nu = g \beta H_0 \quad (3)$$

Embora teoricamente seja possível atingir a condição de ressonância variando tanto o campo magnético como a frequência, existem várias razões práticas para o uso de espectrômetros de frequência fixa^[17].

As equações anteriores são válidas para o caso de elétron livre para o qual o fator g vale 2,0023. Já em moléculas o fator g depende da orientação em relação a um sistema associado à molécula, no caso mais geral este é representado por um tensor anisotrópico simétrico com seis componentes. É sempre possível encontrar o sistema de referência adequado onde o tensor g é diagonal, com elementos g_{xx} , g_{yy} e g_{zz} .

Para uma orientação arbitrária da amostra em um campo magnético obtemos a ressonância caracterizada pelo fator g :

$$g = [g_{xx}^2 \cos^2\theta_x + g_{yy}^2 \cos^2\theta_y + g_{zz}^2 \cos^2\theta_z]^{1/2} \quad (4)$$

onde, por exemplo θ_x é o ângulo entre o eixo x e a direção do campo magnético. Em coordenadas esféricas:

$$g = [g_{xx}^2 \sin^2\theta \cos^2\varphi + g_{yy}^2 \sin^2\theta \sin^2\varphi + g_{zz}^2 \cos^2\theta]^{1/2} \quad (5)$$

Se o tensor g tem simetria axial, tendo o eixo z como eixo de simetria, temos:

$$g_{//} = g_{zz}$$

$$g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy} \quad (6)$$

$$g = (g_{\perp}^2 \sin^2\theta + g_{\parallel}^2 \cos^2\theta)^{1/2}$$

No entanto, estuda-se casos mais complexos, onde os elétrons desemparelhados estão sujeitos a interações no átomo ou íon e com os átomos vizinhos. Algumas destas interações são: interação spin-órbita, interação hiperfina e superhiperfina. Estas interações modificam o espectro de RPE que pode fornecer informações sobre o sistema contendo o elétron desemparelhado.

2.2 Ion Ferro em Hemoproteínas

Um átomo de ferro tem 26 elétrons, sendo que 18 estão em camadas fechadas e 8 na configuração orbital $3d^64s^2$. Na hemoglobina o ferro pode aparecer no estado férrico Fe^{3+} , ou ferroso Fe^{2+} . No primeiro caso a configuração orbital é $3d^5$ e no último $3d^6$.

A camada 3d consiste de cinco orbitais que podem acomodar no máximo dez elétrons, levando-se em conta seus spins paralelos e antiparalelos como é requerido pelo princípio de Pauli. Quando há menos de dez elétrons, vários arranjos são possíveis, como mostra a figura 2.1.

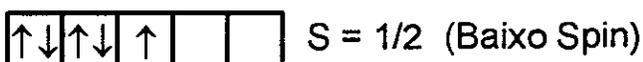
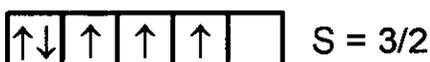
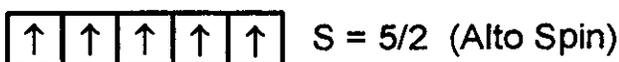
FERRICO (Fe^{3+}).($3d^5$)**FERROSO (Fe^{2+}).($3d^6$)**

Figura 2.1.- Possíveis ocupações dos orbitais d pelos elétrons do íon Fe^{2+} e Fe^{3+} .

2.3 Nitrosil hemoglobina

O Hamiltoniano de spin para sistemas $\text{NO} - \text{Fe}^{2+}$ é dado por:

$$H = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} \quad (7)$$

onde \mathbf{g} é um tensor anisotrópico simétrico com seis componentes e \mathbf{A} o tensor de interação hiperfina, que surge da interação entre o spin eletrônico desemparelhado e o spin nuclear (\mathbf{I}) dos átomos vizinhos de nitrogênio. Em nosso caso o N do próprio NO e N_ϵ do grupo imidazol da histidina próxima (F8).

Dependendo do número de átomos de ^{14}N (spin nuclear $I=1$) que interagem com o elétron desemparelhado, devemos esperar diferentes desdobramentos hiperfinos: a interação com um núcleo resulta num sinal com três linhas, com dois núcleos equivalentes um sinal com cinco linhas e com dois núcleos inequivalentes um sinal com nove linhas^[18].

Bennett et al.^[19] foram os primeiros a observar uma sinal de RPE em nitrosil hemoglobina (HbNO), onde o O_2 foi substituído pelo óxido nítrico (NO). A vantagem na utilização de HbNO é o seu carácter paramagnético a qual faz possível seu estudo por RPE [20].

As cadeias de hemoglobina humana isoladas e ligadas a NO α^{NO} e β^{NO} , apresentam espectros de RPE e dependência com a temperatura bastante diferentes. Shiga et al.^[21] mostraram que a temperatura ambiente, os espectros de RPE das cadeias isoladas α^{NO} e β^{NO} , são ligeiramente assimétricos e não apresentam estrutura hiperfina. A temperatura de nitrogênio líquido (77 K) a cadeia α^{NO} apresenta uma sinal assimétrico com uma estrutura hiperfina, indicando que seu centro paramagnético tem uma simetria rômbrica, enquanto que a cadeia β^{NO} apresenta um sinal simétrico e nenhuma estrutura hiperfina [22].

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} [23]. Estudos por difração de raios X mostram que a geometria da heme das cadeias α e β não são equivalentes, a heme da α tem mais liberdade de movimento que a heme da β ^[24]. Portanto, é de se esperar que os espectros de RPE das cadeias α^{NO} e β^{NO} sejam diferentes.

Os espectros de RPE de HbNO humana a temperatura ambiente e a 77 K podem ser obtidos como a soma dos espectros das cadeias isoladas α^{NO} e β^{NO} [22].

É possível obter informação adicional dos espectros de RPE relacionado a outros aspectos conformacionais das hemoproteínas, além dos proporcionados pelas cadeias individuais α e β .

Morse e Chan ^[25] estudaram a dependência com a temperatura do espectro de RPE, em banda X, na faixa entre 30 K e 180 K dos complexos heme nitrosil ferrosos: Im-Heme-NO em dimethylsulfoxide (Me_2SO) e dimethylformamide (DMF), de MbNO equina, de citocromo C e citocromo C oxidase. Os espectros de RPE de Im-Heme-NO tanto em Me_2SO como DMF, MbNO e citocromo C em solução tampão, mostram uma dependência com temperatura similar ao observado por Yoshimura et al. ^[26], na qual a variação dos espectros de RPE com temperatura é devido a um equilíbrio entre duas espécies, uma com tensor g axial e outra com tensor g rômboico, predominando para altas temperaturas a primeira espécie (espécie I) e para baixas temperaturas a espécie II. O citocromo C oxidase apresenta uma sinal de RPE independente da temperatura, a estabilização da espécie I sobre a espécie II neste complexo poderia ser devido à interação entre o ion cobre e o oxigênio do NO.

Hori et al. ^[27] estudou o espectro de RPE de nitrosil mioglobina de baleia (MbNO) em banda X, e encontrou que tanto em cristais como em solução congelada, a forma do espectro muda drasticamente quando a temperatura varia da ambiente para 77 K; esta mudança do espectro pode ser correlacionada com a mudança do angulo de ligação do NO com o heme, de 153° a temperatura ambiente para 109° em 77 K.

Nascimento et al. ^[28] estudaram os espectros de RPE em banda X, de HbNO de Annelidae *Glossiscolax paulistus* e de MbNO de *Aplysia brasiliana*, na faixa de temperatura entre 103 K e 309 K. Para o primeiro caso encontrou-se que os espectros são formados por duas espécies em equilíbrio, predominando uma delas para baixas temperaturas (espécie I) e a outra a altas temperaturas (espécie II). No outro caso é observado a presença de uma espécie para todo o intervalo de temperatura.

A baixas temperaturas o espectro de RPE de HbNO humana depende da temperatura e 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 de 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 dos espectros é feita combinando-se o espectro A com outro chamado C, que substitui B (figura 2.2). 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 [29].

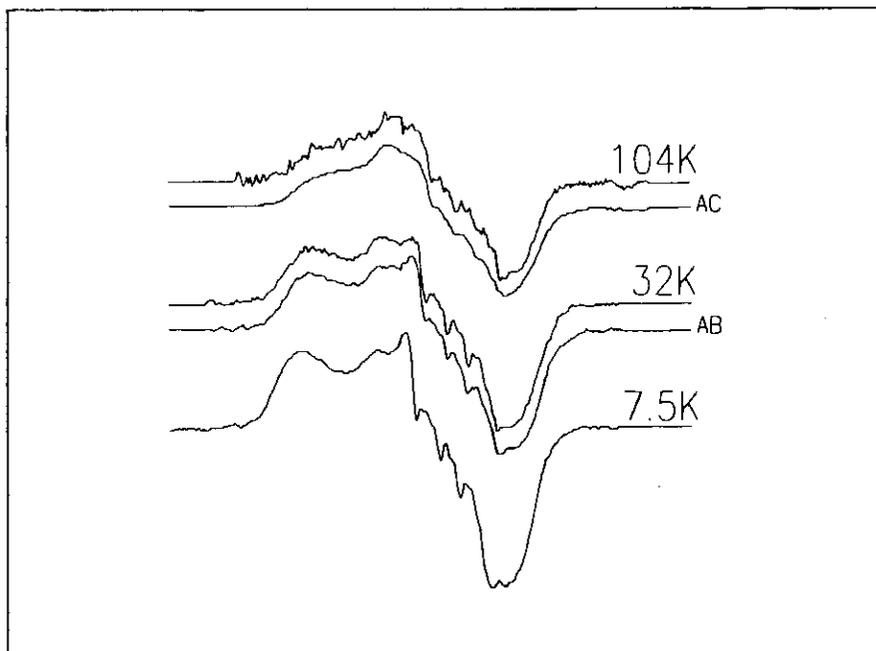


Figura 2.2 .- Dependência com a temperatura dos espectros de EPR de HbNO a $1,3 \times 10^{-3}$ mW. AB é o espectro composta a 32 K e AC a 104 K [29].

Hüttermann et al.^[16], usando Ressonância Dupla, Eletrônica e Nuclear (ENDOR) e RPE em banda Q na faixa de temperatura entre 150 K e 398 K, determinaram por meio de simulação teórica, que os espectros tanto de NO-TPP-Im (humana) e das cadeias isoladas α^{NO} e β^{NO} apresentam duas estruturas, uma axial e outra rômica. Também foi estudada a transição R-T, a qual envolve só contribuições da cadeia α .

Flores et al.^[30] estudaram os espectros de RPE de HbNO de homem e MbNO de cavalo, em banda Q, na faixa de temperatura entre 19 K e 200K, e determinaram a presença de duas estruturas, uma axial e outra rômica, além disso, mostraram que tanto os valores de fator g como as larguras de linha mudam com temperatura.

2.4 Transição R-T em HbNO

A molécula de hemoglobina pode assumir duas diferentes conformações: Na ausência do oxigênio, a hemoglobina tem uma estrutura quaternária T (tensa). Quando a hemoglobina esta totalmente oxigenada (com o oxigênio ligado as quatro cadeias), a estrutura é chamada R (relaxada). Estas duas diferentes estruturas foram observadas em mapas de difração de raios X e correspondem a consideráveis deslocamentos dos amino ácidos da cadeia polipeptídica, uma em relação a outra. Tais transições alostéricas são muito bem descritas pelo modelo proposto por Monod, et al.^[14].

Na HbNO a transição entre as estruturas quaternárias R e T podem ser obtidas variando a concentração de NO^[31]. Além disso pode-se mostrar que o pH e a adição de substâncias que estabiliza o estado T da hemoglobina, tais como o inositol hexafosfato (IHP),

induzem mudanças na estrutura da HbNO, comparáveis àquelas usualmente associadas com a transição R-T da oxi-hemoglobina (HbO₂) a deoxi-hemoglobina, com a vantagem das mudanças na HbNO poderem ser monitoradas por RPE [16, 32, 33].

O complexo hexacoordenado NO-heme dá um espectro de RPE similar ao de HbNO sem IHP, enquanto que o complexo pentacoordenado NO-heme dá um espectro com uma estrutura hiperfina de três linhas muito bem pronunciada e centrado em $g=2,009$ e que também está presente no espectro de HbNO com IHP [34, 35].

Tanto Kon^[35] como Szabo and Perutz^[36] concluíram que o IHP produz uma distorção ou ruptura de alguma das ligações heme-imidazole dentro da HbNO, obtendo um carácter pentacoordenado, ou seja, o espectro de RPE de HbNO com IHP representa uma superposição dos espectros penta- e hexa-coordenados do sistema NO-hemes.

Henry and Banerjee^[22] mostraram, em seus estudos de espectros de RPE das cadeias isoladas α^{NO} e β^{NO} como também de híbridos de HbNO, que o triplete de estrutura hiperfina presente nos espectros de RPE podem ser atribuídos à cadeia α no HbNO. Nagai et al.^[23] conferiu estas observações e mostrou, ademais, que a intensidade da estrutura hiperfina nos espectros de RPE, induzido pelo IHP é proporcional à fração do NO na cadeia α no estado T da HbNO.

Capítulo 3 : Materiais e Métodos

3.1 Preparação de amostras

Os vertebrados estudados estão listados na tabela 3.1. As amostras de sangue foram colhidas em heparina. Sangue humano foi obtido de bolsas de transfusão no dia que são descartadas pelo banco de sangue do Hospital Universitario da UFRJ pedidas pela Dr. Carmen Nogueira. Sangue de peixe elétrico foi gentilmente cedido pelo instituto de bioquímica da UFRJ. Sangue de gato foi gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Henrique de Mello Souza do INPA. As outras amostras foram colhidas e cedidas pelo Dr. Valdir Ramos Jr. E Dr. Luiz Paulo L. Fedullo, do Jardim Zoológico do RJ.

Tabela 3.1 .- Vertebrados obtidos para nosso trabalho.

Vertebrado	Espécie
Gato	Felis Silvestris Catus
Audade	Ammotragus Laervia
Jacaré	Caimam Latirostris
Atobá	Sula Leucogastes
Peixe Elétrico	Electrophorus Electricus (L)
Cavalo	Equus Caballus
Pinguim	Spheriscus Magallanicus
Homem	Homo Sapiens
Capivara	Hidrochoeris Hidrochaeris
Cabra	Capra Hircus

O atobá é uma ave semelhante a gaivota e audade é uma cabra das montanhas.

A solução de hemoglobina dos vertebrados foi obtida de acordo com o procedimento padrão^[31]. O sangue com anticoagulante foi lavado três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0.9 % . As células precipitadas foram hemolisadas com água destilada e clorofórmio (concentração final do clorofórmio 10% v/v) durante a noite, a 4 °C. A solução foi centrifugada para separar a fase lipídica. Parte da solução de hemoglobina foi imediatamente convertida a nitrosil hemoglobina, e o restante estocada a -20 °C em solução com 50 % de glicerol v/v em tampão Tris pH 8.5 .

Gás de óxido nítrico (NO) foi preparado reagindo ácido nítrico a 30 % com cobre metálico, na ausência de oxigênio, lavado em solução de KOH e armazenado em balão contendo água destilada para evitar que pequenas quantidades de NO₂ permanecessem no gás.

Aproximadamente 1.5 ml de solução de Hb foram desoxigenada por fluxo de nitrogênio. Esta desoxigenação é verificada visualmente pela mudança de coloração do vermelho para o púrpura. NO em excesso é injetado com seringa no frasco de Hb, deixando reagir por 30 minutos. 80 ul de solução de hemoglobina são então transferidos para um porta-amostra de teflon parcialmente com nujol. As amostras, foram imediatamente colocadas e congeladas a nitrogênio líquido para ser medidas em banda X.

Os valores de pH das amostras foram posteriormente medidas: peixe elétrico 6.0, atobá 5.5, capivara 5.5, cabra 6.5, pingüim 6.0, cavalo 6.5 e homem 7.0, não conseguimos medir os pH das demais vertebrados devido à pouca quantidade de amostra obtida.

3.2 Medidas de RPE

Medidas de RPE em banda X a 77 K, foram feitas (a exceção de HbNO de jacaré) utilizando um espectrômetro modelo Bruker ESP300E e um criostato de nitrogênio líquido. A HbNO do jacaré foi medida no espectrômetro de banda X da Varian modelo E-101.

As medidas de RPE de HbNO em banda X de capivara e cabra, em função da temperatura, foram feitas com uma cavidade retangular (ER 4102 ST), na faixa de temperatura de 10 K a 200 K. Para as medidas em banda Q utilizamos uma cavidade cilíndrica para baixa temperatura (ER 5106 QT), na faixa de temperatura de 50 K e 100 K.

A temperatura destas amostras (capivara e cabra) foi controlada por um criostato de fluxo de hélio líquido (ER 4118 CF) para banda X e banda Q, com um controlador de temperatura Oxford ICT4. As temperaturas foram medidas com um termopar Chromelx Au-Fe 0,07% localizado logo abaixo da amostra flutuação na leitura indica que a variação na temperatura foi de cerca de ± 0.1 K para altas temperaturas (maiores de 77 K) e ± 0.3 para baixas temperaturas.

Nas medidas em banda X, utilizamos para Hb de jacaré uma potência de microondas de 150 mW. e 5 gauss de amplitude de modulação. Para as demais amostras foi utilizada uma potência de microondas de 20.1 mW. e amplitude de modulação de 1.0 gauss.

Nas medidas em banda Q, utilizamos as seguintes potências de microondas: 1,59 mW. para 100 K, 2,09 mW. para 77 K e 1,66 mW. para 50 K. A amplitude de modulação foi de 1 G. para todas as temperaturas.

3.3 Simulação de espectros

Os espectros foram simulados usando o programa QPOWA^[37] de simulação de espectros RPE para sistemas policristalinos de íons paramagnéticos de spin $1/2$. Este programa permite variar uma grande quantidade de parâmetros: campo central, componentes de fatores g , varredura de campo, larguras de linha, constante hiperfina, interações superhiperfinas, interação quadrupolar e g -strain.

O primeiro parâmetro a ser identificado são as componentes dos fatores g . O programa é então utilizado para simular independentemente cada uma das componentes (o programa só simula uma de cada vez), considerando como parâmetros fixos: campo central, varredura de campo, g -strain. Foram considerados como parâmetros variáveis: componentes de fator g , constantes hiperfinas, e larguras de linha. As componentes são então, multiplicadas por um fator de escala, somadas e o espectro resultante é comparado com o espectro experimental. Para obter as frações de cada componente simulada, todos os espectros simulados foram normalizados pelas suas segundas integrais.

Nós tomamos como critério básico para a simulação dos espectros, a utilização da menor quantidade de parâmetros possível para a obtenção do melhor ajuste.

Os espectros, para o caso das medidas feitas a 77 K (a exceção da capivara e cabra), foram ajustados considerando dois tipos de componentes, um com simetria axial, e outro com simetria rômbrica. Para a capivara e cabra forem utilizados três componentes, uma axial e duas rômbricas.

Para a manipulação dos espectros, normalização, cálculo da segunda integral, filtragem do espectro pelo método da transformada rápida de Fourier, foi utilizado o programa Microcal Origin 5.0 .

As seqüências de aminoácidos das hemoglobinas dos vertebrados foram obtidas do CD-ROM “Atlas of Protein and Genomic Sequences” da National Biomedical Research Foundation.

Capítulo 4 : Resultados

4.1 Espectros de RPE de HbNO dos vertebrados em banda X

Os espectros de RPE de HbNO dos vertebrados a temperatura de nitrogênio líquido (77 K) são mostrados na figura 4.1. A frequência de microondas utilizada foi de 9.523 MHz para o jacaré, e 9.314 MHz para os demais vertebrados.

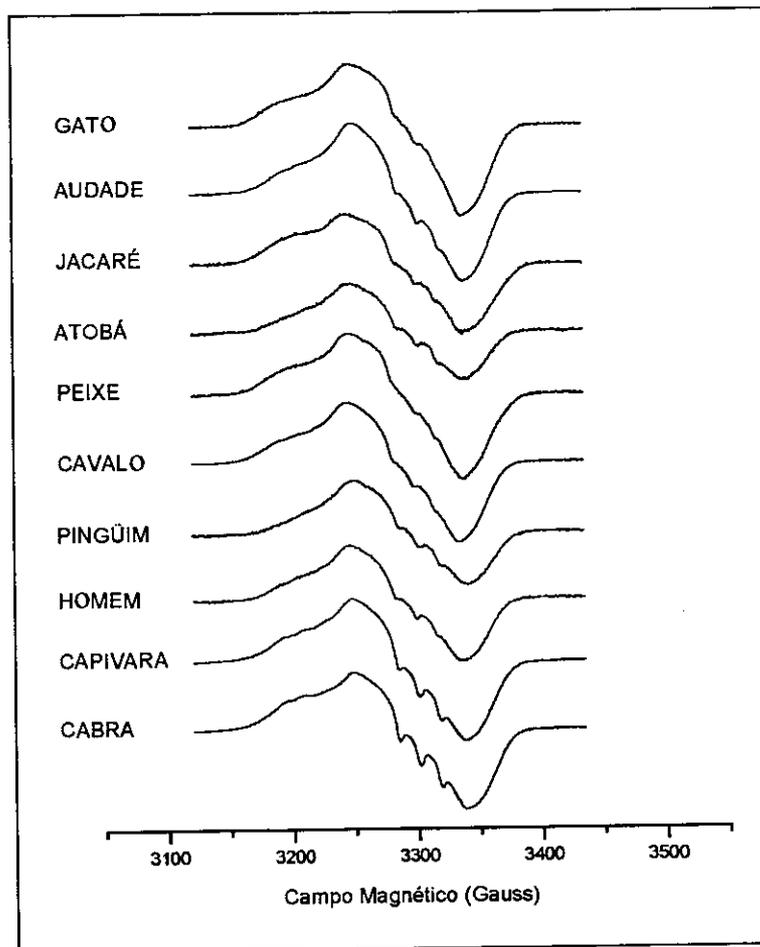


Figura 4.1.- Espectros de HbNO dos vertebrados em banda X a 77 K.

Da figura 4.1 podemos observar que os espectros de HbNO da capivara e cabra apresentam uma estrutura hiperfina de três linhas mais bem resolvida que os demais espectros. Comparando estes espectros com aqueles obtidos para Hb humana com concentração controlada de NO^[31], estima-se grosseiramente uma fração de aproximadamente um 20% da HbNO no estado T. Os demais espectros não apresentam uma estrutura hiperfina muito bem resolvida.

Uma primeira tentativa para a reconstrução dos espectros de RPE de HbNO dos vertebrados foi feito a partir das sinais dos espectros da cadeia isolada α^{NO} tanto no estado R como no estado T e da cadeia β^{NO} no estado R, de hemoglobina humana. Estes espectros são mostrados na figura 4.2. Nas figuras 4.3 e 4.4 temos os espectros de RPE de HbNO humana e de cabra reconstruídos a partir da soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$.

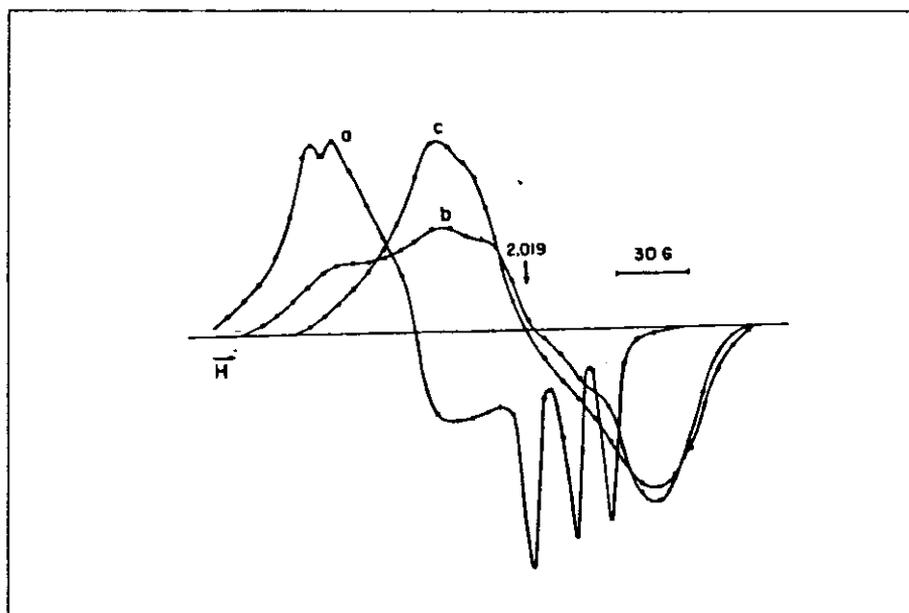


Figura 4.2.- Espectro de RPE de HbNO das cadeias isoladas: a, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, na conformação T; b, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$, na conformação R; c, $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ na conformação R^[31].

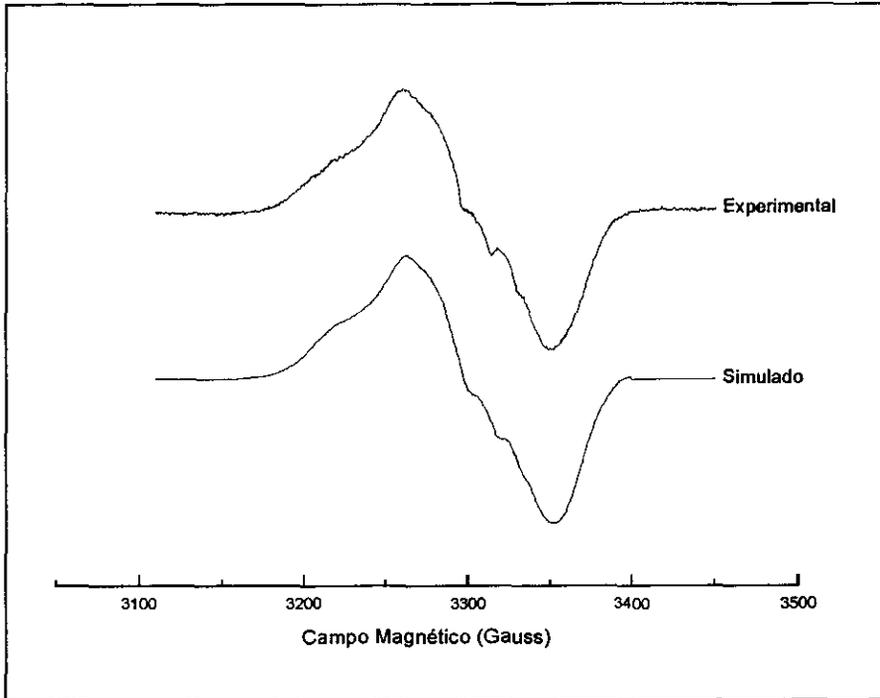


Figura 4.3.- Simulação do espectro de RPE de HbNO de humano a 77 K, como a soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ com frações de 0.06, 0.42 e 0.52, respectivamente.

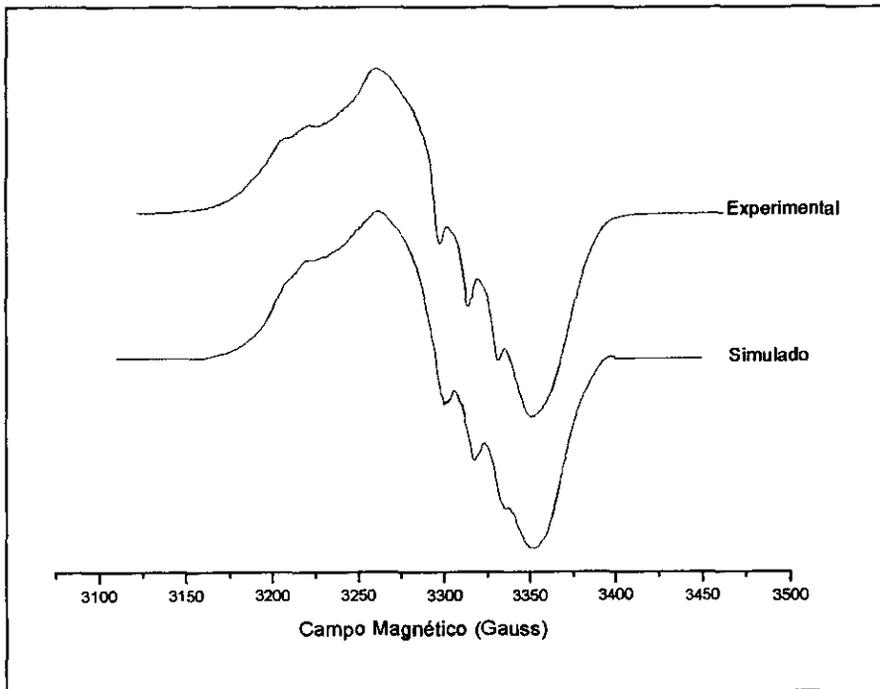


Figura 4.4.- Simulação do espectro de RPE de HbNO de cabra a 77 K, como a soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ com frações de 0.15, 0.42 e 0.43, respectivamente.

Da figura 4.3 podemos observar que o espectro de RPE de HbNO humana é muito bem simulado como a soma das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$. Este tipo de soma não dá um resultado satisfatório para o caso do espectro de HbNO de cabra, por exemplo, tal como poder ser apreciado na figura 4.4, o mesmo acontece para o caso dos demais vertebrados.

Uma nova tentativa de simulação foi feita como a soma de componentes com simetria axial e rômbrica.

A exceção da capivara e cabra, os espectros dos demais vertebrados foram reproduzidos pela soma destas duas como obtido por exemplo para HbNO de gato (figura 4.5).

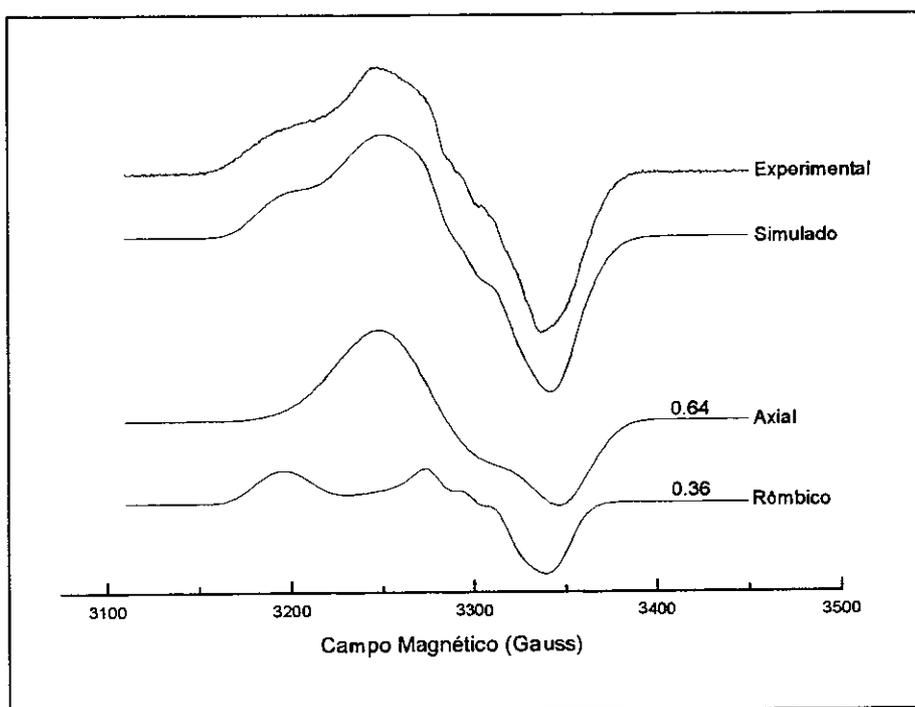


Figura 4.5 .- Espectro de HbNO de gato em banda X a 77 K.

Na figura 4.6 são mostrados, a exceção da capivara e cabra, as componentes axial e rômica simuladas para os espectros de HbNO dos vertebrados. Para simulação da componente axial não foi necessário considerar a interação com nitrogênios perto da heme (figura 1.1). Simulações feitas na componente axial considerando alguma interação com os nitrogênios não melhoram o espectro simulado. A componente rômica, por outro lado, considera a interação com o nitrogênio do NO ligante, já que ela permite uma reprodução das estruturas hiperfinas observados nestes espectros. Observa-se que na metade dos espectros, a fração da componente axial é maior que a rômica.

Na tabela 4.1 temos os parâmetros obtidos desta simulação: componentes do fator g , da interação hiperfina A e larguras de linha (ΔH).

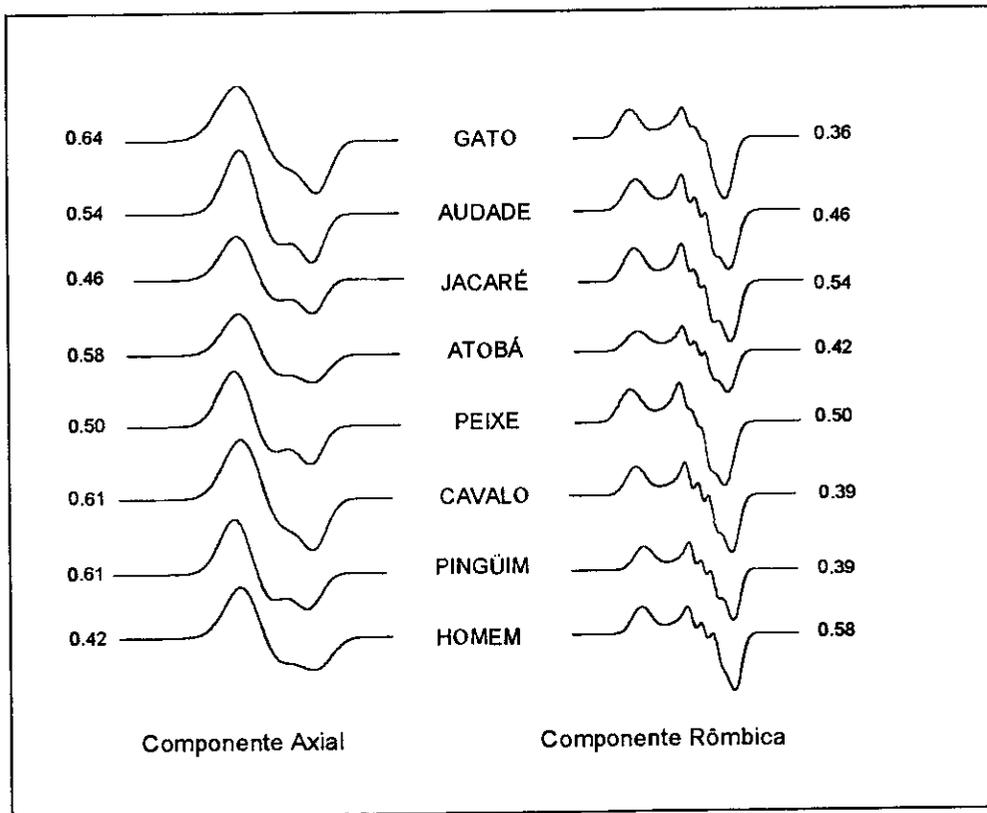


Figura 4.6.- Componentes Axial e Rômica dos espectros em banda X a 77 K.

Tabela 4.1 .- Valores das componentes do fator g, interação hiperfina A (MHz) e larguras de linha ΔH (MHz).

Espécies	Componente Rômbica									Componente Axial			
	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	ΔH_{xx}	ΔH_{yy}	ΔH_{zz}	g_{\perp}	g_{\parallel}	ΔH_{\perp}	ΔH_{\parallel}
Gato	2.083	1.992	2.017	30	10	50	30	30	24	2.040	1.989	92	50
Audade	2.078	1.989	2.018	30	10	51	40	35	21	2.040	1.992	72	45
Jacaré	2.073	1.984	2.014	25	10	48	40	32	21	2.038	1.989	75	45
Atobá	2.077	1.991	2.019	30	10	48	40	30	20	2.041	1.991	76	55
Peixe	2.079	1.989	2.017	30	10	46	40	35	22	2.040	1.989	73	47
Cavalo	2.080	1.990	2.018	24	10	50	38	28	20	2.040	1.993	80	50
Pingüim	2.075	1.991	2.018	23	10	46	37	22	19	2.041	1.992	70	50
Homem	2.077	1.990	2.017	30	10	54	30	25	22	2.040	1.991	80	60

A faixa de erros nos parâmetros ajustados são estimados em: ± 0.02 para as frações; ± 0.0005 para as componentes do fator g; ± 2.0 MHz para A_{xx} , A_{yy} , ΔH_{xx} , e ΔH_{yy} da componente rômica e ΔH_{\perp} e ΔH_{\parallel} da componente axial, e ± 1.0 MHz para as componentes A_{zz} e ΔH_{zz} da componente rômica (ver apêndice para descrição desta estimativa).

A tentativa de simular os espectros de Hb de capivara e cabra com a soma de componentes axial e rômica com as mesmas interações que os espectros anteriores não deram resultados satisfatórios (figura 4.7). Uma nova tentativa de simulação foi feita utilizando três componentes: as mesmas componentes axial e rômica com interação hiperfina com um nitrogênio como no caso anterior e outra componente rômica que toma em consideração a interação com dois nitrogênios. Esta composição resulta numa melhor simulação do espectro experimental. Esta simulação foi feita buscando melhorar a forma do espectro na direção x, região de campo baixo onde 3 ombros estão evidentes (figura 4.8).

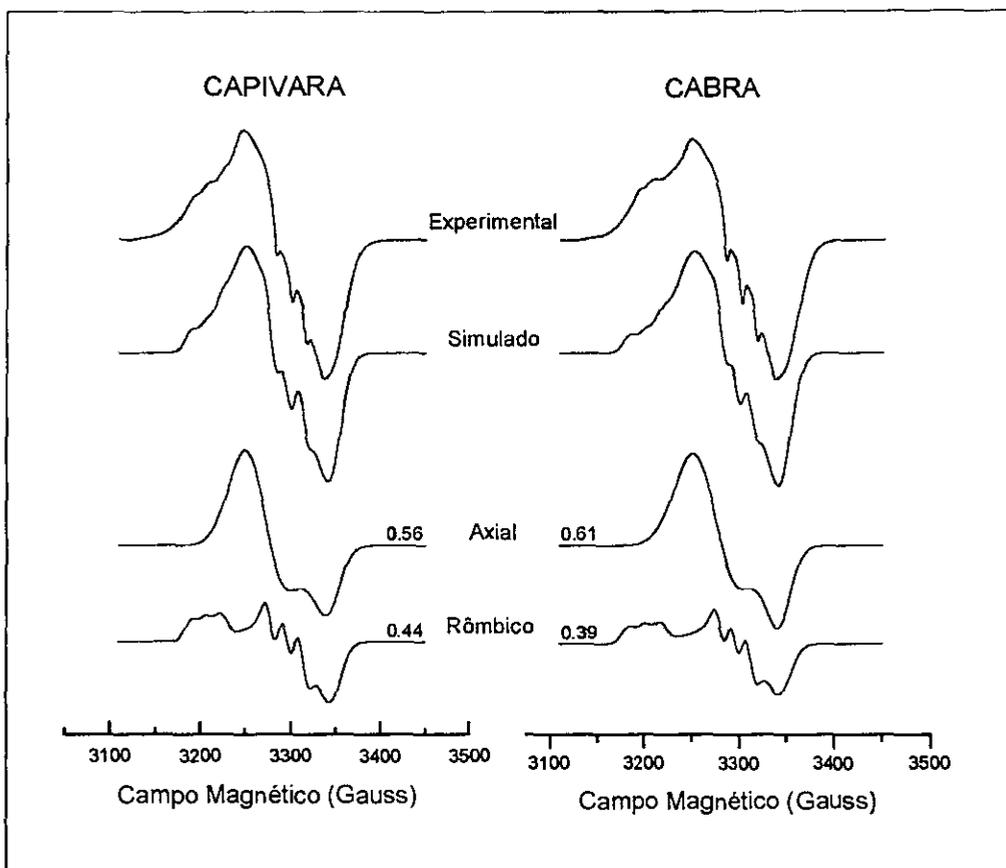


Figura 4.7 .- Espectros de capivara e cabra simulados com só dois componentes, axial e rômbico que interage só com N do NO, a 77 K.

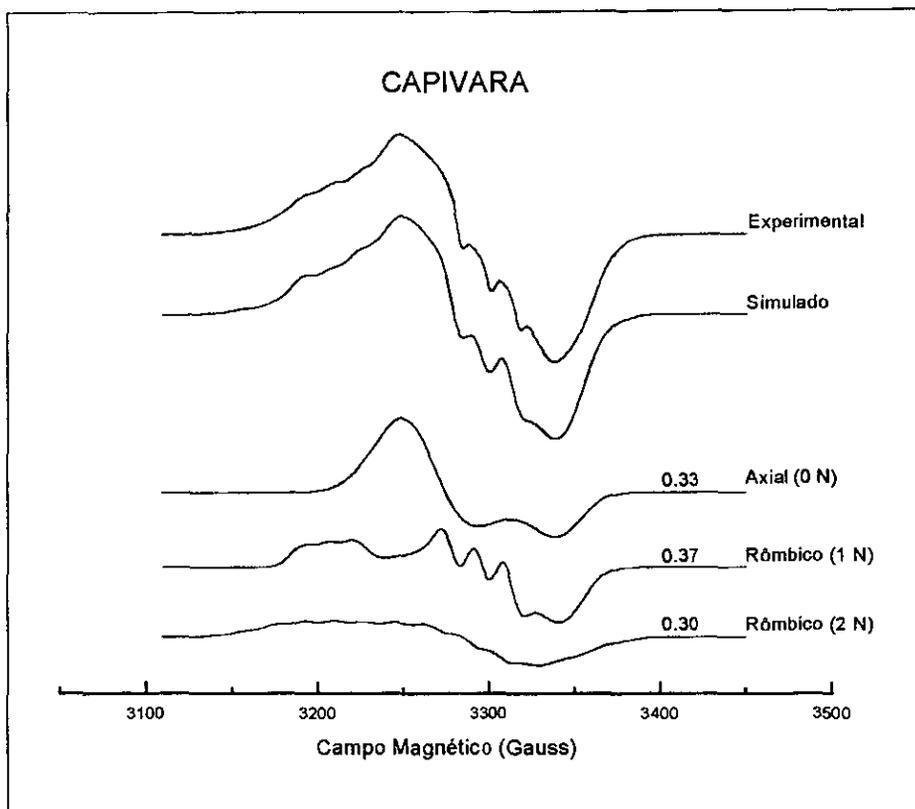


Figura 4.8 .- Espectro de capivara simulado como a soma de três componentes, uma axial e duas rômbicas a 77 K.

4.2 Variação com temperatura dos espectros de HbNO da capivara e cabra em banda X.

Para poder compreender melhor a presença destas três componentes nos espectros da HbNO de capivara e cabra, fizemos um estudo dos espectros de RPE de HbNO em banda X, em função da temperatura. A figura 4.9 e figura 4.10 mostram a variação térmica dos espectros de HbNO de capivara e cabra respectivamente. Os espectros, tanto para a capivara como para a cabra, foram medidos numa faixa de temperatura entre 10 K e 200 K, e uma potência de 0.5 mW. e 1.0 gauss de amplitude de modulação.

Das figuras 4.9 e 4.10 não é fácil inferir visualmente a predominância de uma determinada componente, em cada temperatura, só a simulação das mesmas poderá dar nos informação sobre as frações de cada componente.

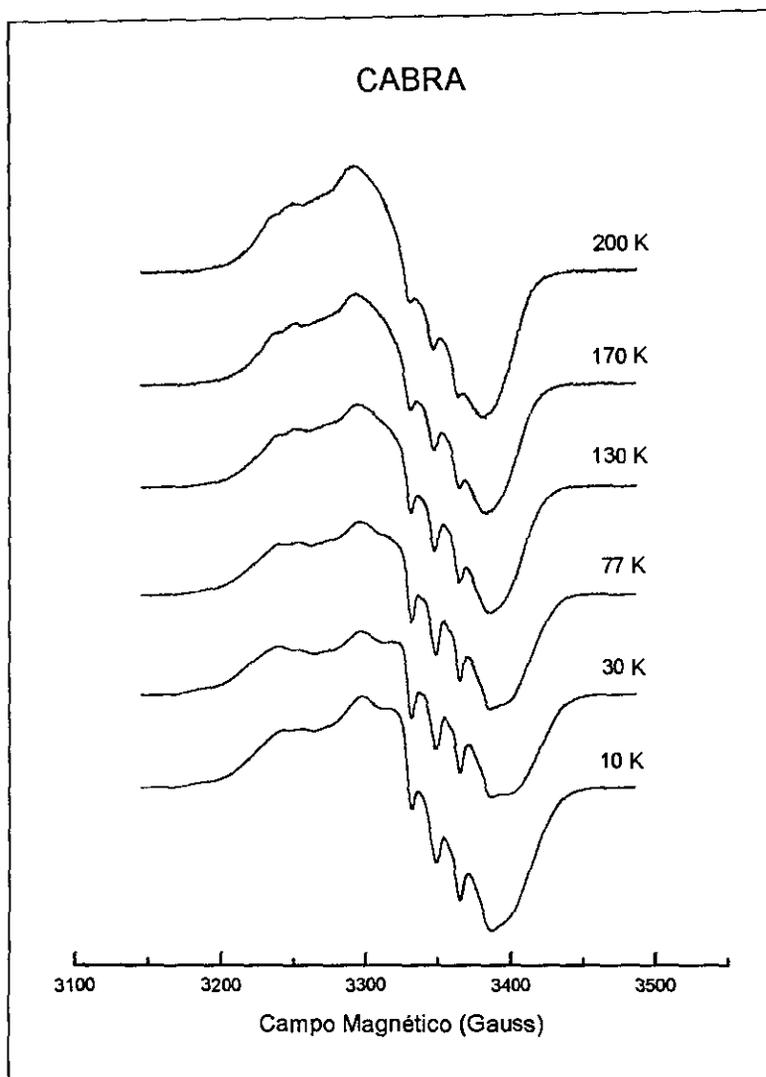


Figura 4.10.- Espectros de EPR de HbNO em banda X da cabra em função da temperatura

Nas tabelas 4.2 a 4.9 mostramos os parâmetros utilizados nas simulações tanto para a capivara como para a cabra. Nestas tabelas A indica a constante hiperfina da componente rômica resultante da interação com um nitrogênio (N do NO), e B a outra constante hiperfina que considera a interação com o outro nitrogênio (possivelmente N da histidina próxima F8).

Tabela 4.2.- Valores dos parâmetros da componente axial da capivara.

Componente Axial				
Temp. (K)	g_{\perp}	$g_{//}$	ΔH_{\perp}	$\Delta H_{//}$
10	2.040	1.992	85	18
30	2.041	1.994	85	20
77	2.042	1.992	68	25
200	2.043	1.994	58	30

Tabela 4.3.- Valores dos parâmetros na componente rômica da capivara que interage com um só nitrogênio.

Componente Rômica (1 N)									
Temp. (K)	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	ΔH_{xx}	ΔH_{yy}	ΔH_{zz}
10	2.083	1.981	2.018	35	20	50	42	25	17
30	2.084	1.980	2.018	30	20	50	35	23	17.5
77	2.083	1.984	2.018	33	20	51	42	25	17
200	2.077	1.991	2.019	50	20	54	15	35	19

Tabela 4.4.- Valores dos parâmetros na componente rômica da capivara que interage com dois nitrogênios.

Componente Rômica (2 N)												
Temp. (K)	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	B_{xx}	B_{yy}	B_{zz}	ΔH_{xx}	ΔH_{yy}	ΔH_{zz}
10	2.087	1.986	2.029	30	30	54	30	30	70	55	40	25
30	2.097	1.987	2.030	45	30	54	45	30	70	15	25	20
77	2.084	1.985	2.028	54	35	54	50	35	40	18	40	18
200	2.085	1.999	2.029	54	60	54	50	40	50	17	15	25

Tabela 4.5.- Frações das componentes em função da temperatura em HbNO da capivara.

Temperatura	Axial	Rômbo (1 N)	Rômbo (2 N)
10	0.21	0.47	0.32
30	0.18	0.49	0.33
77	0.15	0.43	0.42
200	0.20	0.40	0.40

Tabela 4.6.- Valores dos parâmetros na componente axial da cabra.

Componente Axial				
Temp. (K)	g_{\perp}	$g_{//}$	ΔH_{\perp}	$\Delta H_{//}$
30	2.041	1.992	70	18
77	2.042	1.992	70	25
200	2.043	1.995	60	28

Tabela 4.7.- Valores dos parâmetros na componente rômbo da cabra que interage com um nitrogênio.

Componente Rômbo (1 N)									
Temp. (K)	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	ΔH_{xx}	ΔH_{yy}	ΔH_{zz}
30	2.083	1.982	2.017	35	12	50	35	15	16.5
77	2.080	1.982	2.018	40	10	51	30	25	17
200	2.076	1.989	2.019	48	20	51	15	35	19

cavidade de banda Q, levando a uma diminuição da relação sinal-ruído fazendo necessário a filtragem dos espectros. O sinal de manganês (Mn), devido a impurezas na cavidade, também está presente nos espectros e são indicados na figura 4.11. Desta figura podemos observar, na região g_{xx} do espectro, a presença de duas estruturas típicas (indicadas por setas) de componentes rômbricas e que elas mudam com a temperatura, tal como foi observado em banda X. É ainda observada a presença de uma estrutura hiperfina na direção z, de acordo com os espectros em banda X. Considerando a baixa relação sinal-ruído, não foi possível realizar a simulação dos espectros na banda Q.

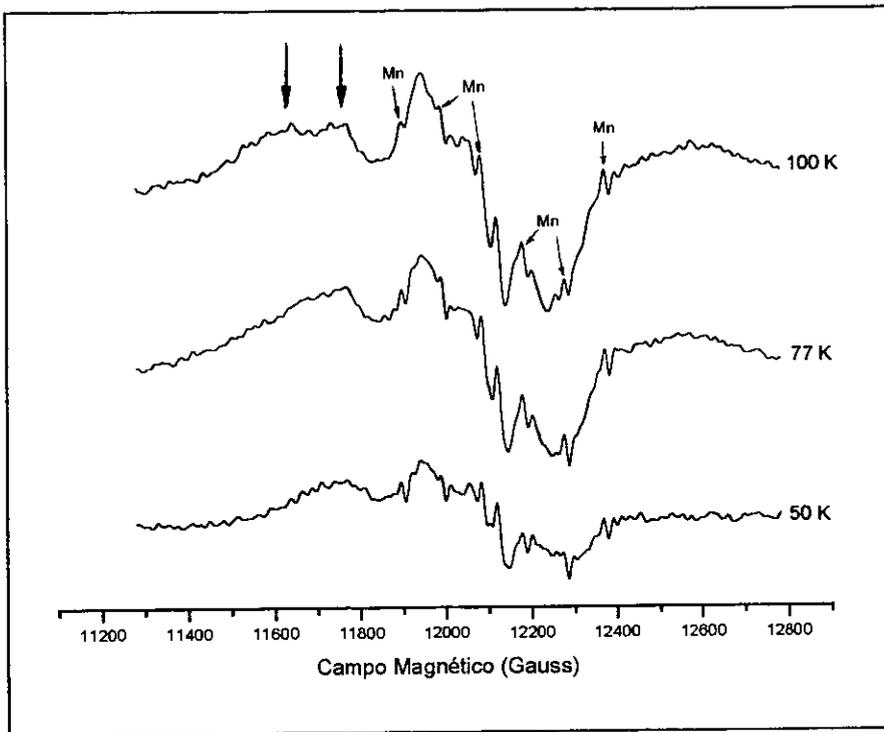


Figura 5.11 .- Espectros de RPE de HbNO de cabra, em banda Q, em função da temperatura.

Capítulo 5 : Discussão e Conclusões

Os espectros de HbNO dos diferentes vertebrados obtidos a temperatura de nitrogênio líquido em banda X mostram duas conformações bem diferenciadas, aqueles como a capivara e cabra que apresentam uma estrutura hiperfina de três linhas pronunciadas com possivelmente uma fração em torno de 20% no estado T, e os restantes que não apresentam presença significativa do estado T e que podem ser associados a espectros com forte presença no estado R.

A primeira tentativa de simulação mostra que os espectros das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ de hemoglobina humana, podem reconstruir muito bem o espectro de RPE de HbNO de homem num estado fortemente R. Louro et al.^[31] mostraram que isto também é válido para espectros de HbNO de homem na transição R-T . A simulação não dá um resultado satisfatório para os demais espectros dos vertebrados, independentemente do estado da hemoglobina. Uma possível explicação é a não equivalência dos espectros de RPE das cadeias isoladas $\alpha^{\text{NO}}_{\text{T}}$, $\alpha^{\text{NO}}_{\text{R}}$ e $\beta^{\text{NO}}_{\text{R}}$ dos vertebrados.

Na segunda tentativa os resultados mostram que no estado R, é sempre possível reconstruir os espectros como a soma de duas componentes que podem ser associadas a duas diferentes estruturas estereoquímicas do N(histidina)-Fe-N(NO) com respeito ao plano da heme. Uma é representada por um espectro de RPE com simetria axial, com a direção da ligação coincidindo com o fator $g_{//}$, paralelo à normal do plano da heme. A outra componente apresenta um espectro de RPE com simetria rômica, onde a direção da ligação é inclinada em relação ao plano da heme (figuras 5.1 e 5.2).

Observamos as seguintes características dos espectros das HbNO no grupo dos vertebrados estudados:

- 1) Todos os espectros são compostos de componentes axial e rômica (observadas anteriormente na HbNO humana pelo Huttermann et al.^[16] e Flores et al.^[30] em seus estudos em banda Q).

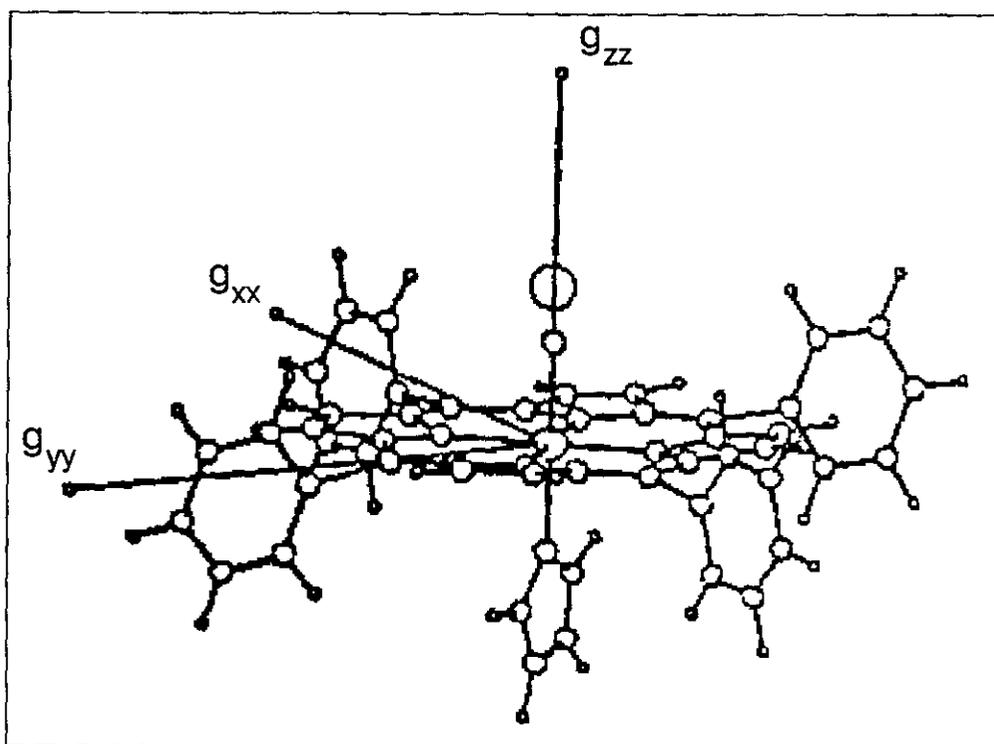


Figura 5.1.- Geometria e g-eixos da componente axial de NO-Fe-N(histidina)^[16].

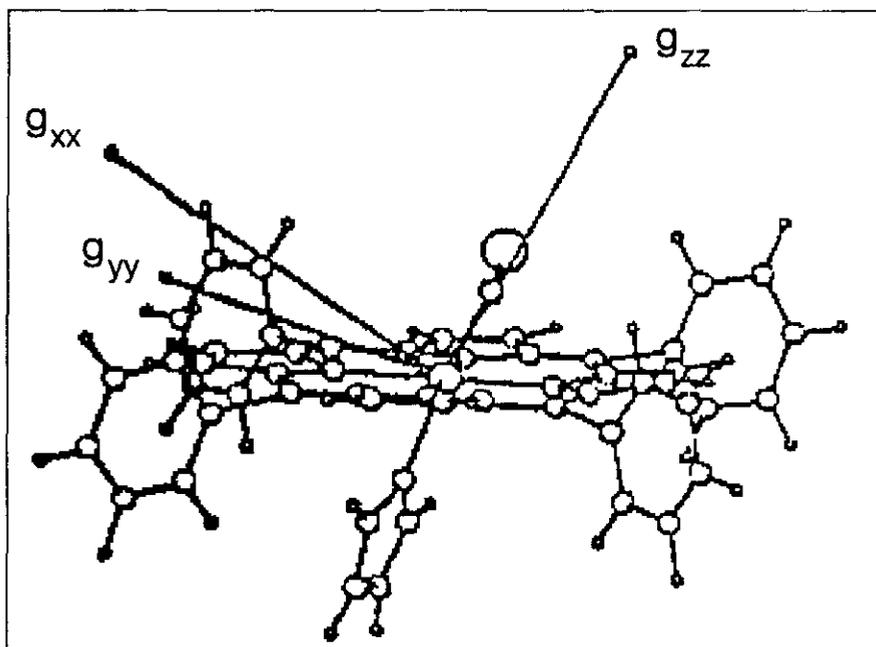


Figura 5.2 .- Geometria e g-eixos da componente rômbrica de NO-Fe-N(histidina)^[16].

- 2) No caso da capivara e cabra se observa uma estrutura hiperfina bem definida. Esta estrutura está associada a soma de duas componentes rômbricas: uma que inclui interação hiperfina com um nitrogênio (N do NO), e outra com dois nitrogênios (N do NO e outro N possivelmente da histidina próxima F8). Nossos resultados não podem relacionar estas duas componentes rômbricas as estruturas penta- e hexa-coordenadas do ferro na heme, respectivamente, achados na literatura.
- 3) A variação térmica das frações axial e rômbricas é pequena, muito menor que a observada por Flores et al.^[30] na HbNO humana em banda Q. A faixa de erro nas componentes não foi estimada, mas devido à grande quantidade de parâmetros simulados, nos achamos que os erros poderiam ser um pouco maiores que os mencionados no caso anterior.

Plonka et al.^[38] utilizaram HbNO de porco em seus estudos de fotólise a baixas temperaturas por RPE, e apresentaram a variação térmica com comportamento similar ao da capivara e cabra mostrados neste trabalho. Nenhuma análise da forma de linha dos espectros foi apresentada.

Uma primeira tentativa para identificar o responsável pelas pequenas diferenças nos espectros de Hb dos vertebrados foi feita analisando a composição nas seqüências de aminoácidos na vizinhança da heme. Nas figuras 5.3 e 5.4 temos os aminoácidos em contato com a heme nas cadeias α e β , respectivamente da Hb de cavalo segundo Perutz et al.^[39]. Na tabela 5.1 temos as seqüências de aminoácidos em contato com a heme, para o caso de Hb de humano e que foi obtido substituindo os aminoácidos correspondentes nas figuras 5.3 e 5.4.

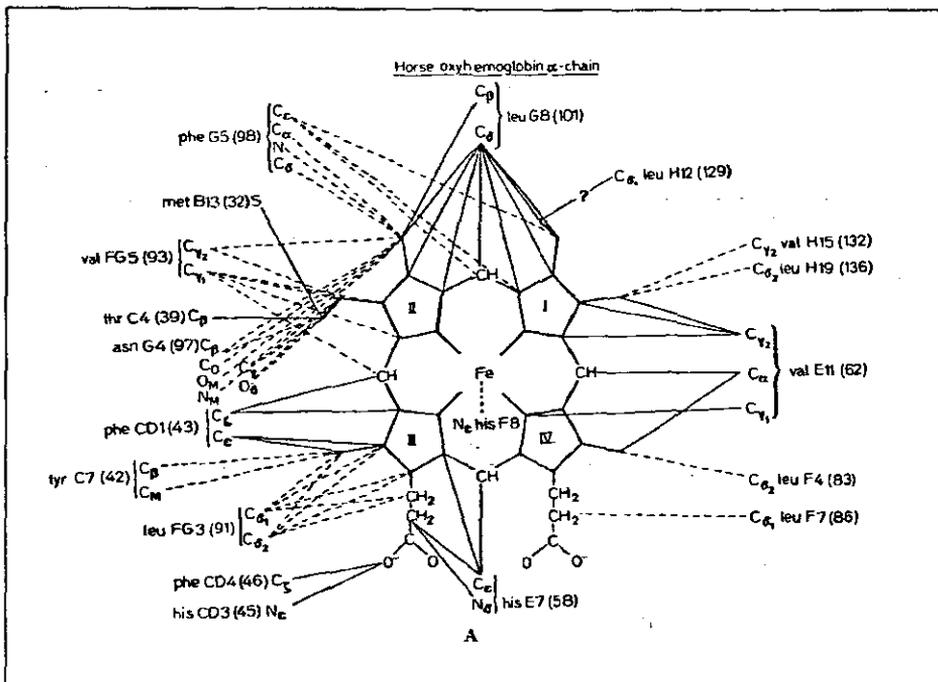


Figura 5.3.- Aminoácidos em contato com a heme na cadeia α em oxi-Hb ^[39].

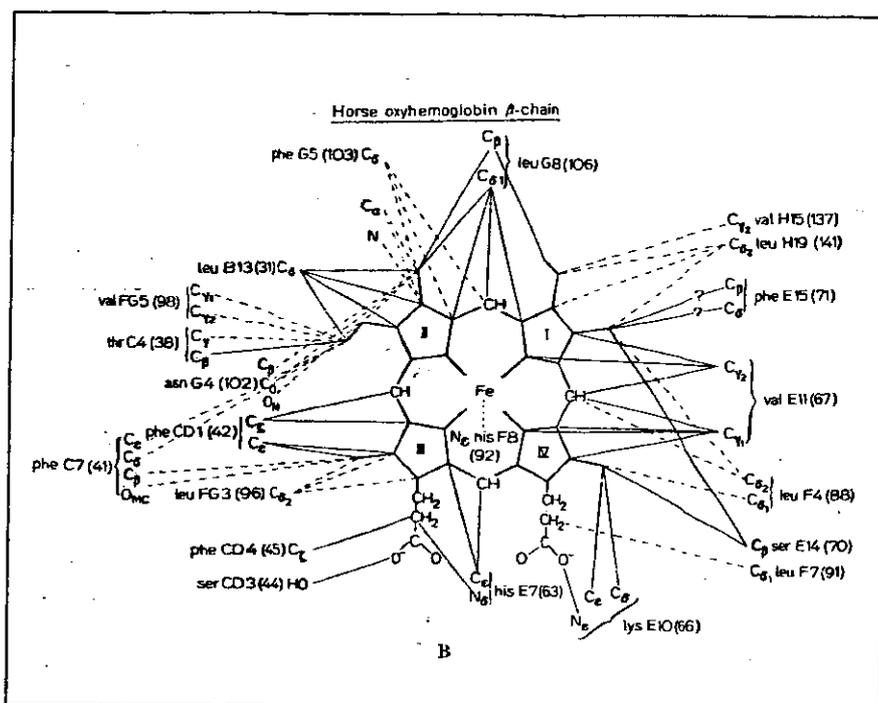


Figura 5.4. - Aminoácidos em contato com a heme na cadeia β em oxi-Hb [39].

Tabela 5.1. - Sequência dos amino ácidos perto da heme nas cadeias α e β [39].

Cadeia α		Cadeia β	
Phe G5 (98)	His E7 (58)	Phe G5 (103)	His E7 (63)
Met B13 (32)	His F8 (87)	Leu B13 (31)	His F8 (92)
Val FG5 (93)	Leu F7 (86)	Val FG5 (98)	Lys E10 (66)
Thr C4 (39)	Leu F4 (83)	Thr C4 (38)	Leu F7 (91)
Asn G4 (97)	Val E11 (62)	Asn G4 (102)	Ser E14 (70)
Phe CD1 (43)	Leu H19 (136)	Phe CD1 (42)	Leu F4 (88)
Tyr C7 (42)	Val H15 (132)	Phe C7 (41)	Val E11 (67)
Leu FG3 (91)	Leu H12 (129)	Leu FG3 (96)	Phe E15 (71)
Phe CD4 (46)	Leu G8 (101)	Phe CD4 (45)	Leu H19 (141)
His CD3 (45)		Ser CD3 (44)	Val H15 (137)
			Leu G8 (106)

Na tabela 5.2 temos as variações dos aminoácidos das hemoglobinas na vizinhança da heme dos vertebrados em relação ao homem. Só foi possível achar as seqüências dos aminoácidos de 7 dos vertebrados estudados, além da heme do bovino. Nesta tabela devemos tomar em conta algumas considerações importantes. Nas hemoglobinas da cabra e bovino foi detectada a ausência do amino terminal da cadeia β . Estas apresentam, portanto, 145 aminoácidos em lugar dos 146 dos demais vertebrados. Esta ausência, Val NA1 (1), não foi considerada na determinação das variações dos aminoácidos, ou seja, sua posição espacial foi considerada e a numeração feita a partir do aminoácido ausente, caso contrário teríamos toda a cadeia deslocada por um aminoácido e as variações na cadeia incluiriam as histidinas proximal (F8) e distal (E7). Por outro lado, sabemos que estas histidinas são invariantes em todas as espécies estudadas e são fundamentais para o funcionamento fisiológico das hemoglobinas.

O peixe elétrico apresenta 142 aminoácidos na cadeia α em lugar dos 141 dos demais vertebrados com a inserção de um aminoácido entre as posições 44 e 47 em relação ao homem. O problema que se apresenta aqui é que a partir da posição 47 todos os aminoácidos estarão deslocados e o número de alterações seria muito maior. A cadeia β do peixe elétrico apresenta 146 aminoácidos em lugar dos 145 e a inserção é entre as posições 100 e 110 em relação a cadeia humana. Da mesma forma partir da posição 110 todos os aminoácidos estariam deslocados. Na tabela 5.2 ignoramos as variações advindas de tais inserções para o peixe elétrico. Uma variação muito próxima da heme é a ausência da valina E11 (62) na cadeia α , substituída pela isoleucina (Ile) se consideramos a presença do aminoácido extra. Nagai et al.^[40] mostraram que a substituição da valina E11 pela isoleucina na cadeia α , não afeta as propriedades de ligação da hemoglobina, e portanto é possível que esta variação não tenha efeito substancial sobre o espectro de RPE de HbNO de peixe elétrico.

Tabela 5.2.- Variação dos amino ácidos perto da heme para as Hbs dos vertebrados em relação ao homem.

ANIMAL	VARIAÇÃO NA CADEIA α (Em relação ao Homem)	VARIAÇÃO NA CADEIA β (Em relação ao Homem)
GATO	Met B13 (32) \rightarrow Thr Leu H12 (129) \rightarrow Phe	Ala E14 (70) \rightarrow Ser
JACARÉ	Não tem variação	Leu B13 (31) \rightarrow Met Leu FG3 (96) \rightarrow Phe Thr C4 (38) \rightarrow Lys Ser CD3 (44) \rightarrow His Phe C7 (41) \rightarrow Tyr Ala E14 (70) \rightarrow Ser
ATOBA	Não tem variação	Ala E14 (70) \rightarrow Ser
PEIXE	Leu H12 (129) \rightarrow Phe Val E11 (62) \rightarrow Ile	Phe C7 (41) \rightarrow Tyr Lys E10 (66) \rightarrow Val
CAVALO	Não tem variação	Ala E14 (70) \rightarrow Ser
CABRA	Não tem variação	Ala E14 (70) \rightarrow Ser Ser CD3 (44) \rightarrow His
BOVINO	Não tem variação	Ala E14 (70) \rightarrow Ser

Uma outra região importante a ser considerada é a da ligação 2,3 Difosfoglicerato (2,3-DPG) que estabiliza a forma T. Nós analisamos as variações dos aminoácidos nesta região. Os aminoácidos que interagem com o 2,3-DPG são : os dois amino terminais da cadeia β , His 2 (NA2) das duas cadeias β , Lys 82 (EF6) de uma das cadeias β e His 143 (H21) das duas cadeias β ^[41]. Na tabela 5.3 temos as mutações destes amino ácidos em relação ao homem.

Também foi analisada a região de contato entre as cadeias e não foi observada mudanças nos pontos relacionados com a transição T-R. Nesta transição a ponte de hidrogênio entre a tirosina C7 ($42\alpha_1$) e aspartato G1 ($99\beta_2$) muda a uma posição entre a aspartate G1 ($92\alpha_1$) e asparagina G4 ($102\beta_2$)^[7].

**Tabela 5.3 .- Variação dos amino ácidos que interage com o 2,3-DPG
Em relação ao homem.**

ANIMAL	VARIAÇÃO DOS AMINO ÁCIDOS PERTOS DO 2,3-DPG
GATO	His NA2 (2)→Phe
JACARÉ	His NA2 (2) →Pro His H21 (143) →Ala
ATOBA	His H21 (143) →Arg
PEIXE	His NA2 (2) →Val His H21 (143) →Lys
CAVALO	His NA2 (2) →Gln
CABRA	His NA2 (2) →Met Ausência do primeiro aminoácido
BOVINO	His NA2 (2) →Met Ausência do primeiro aminoácido

Dos espectros da figura 4.1 e da tabela 5.2 observamos que não há relação entre as mutações dos aminoácidos na vizinhança da heme com a presença ou ausência de estruturas hiperfinas pronunciadas nas hemoglobinas dos vertebrados. Um detalhe interessante foi observado para o caso da mutação da Alanina E14 (70) pela Serina, na cadeia β , os vertebrados que apresentam este único tipo de mutação (gato, atobá e cavalo) também

apresentam uma menor fração da sua componente rômica tal como pode ser observado na figura 4.6 .

O 2,3-DPG abaixa a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Na figura 5.3 temos uma representação esquemática mostrando o enlaçamento do DPG à deoxi-Hb humana. A estereoquímica do 2,3-DPG é tal que complementa os resíduos básicos da cavidade central ao formar pontes salinas com os dois amino terminais das valina 1 (NA1), histidinas 2 (NA2) e 143 (H21) das duas cadeias β , e com a Lisina 82 (EF6) de só uma cadeia β . Quando a deoxi-Hb muda para o estado oxi-Hb as porções das cadeias β perto do sitio de ligação 2,3-DPG ficam mais próximas uma de outra, deslocando o 2,3-DPG para fora da cavidade central.

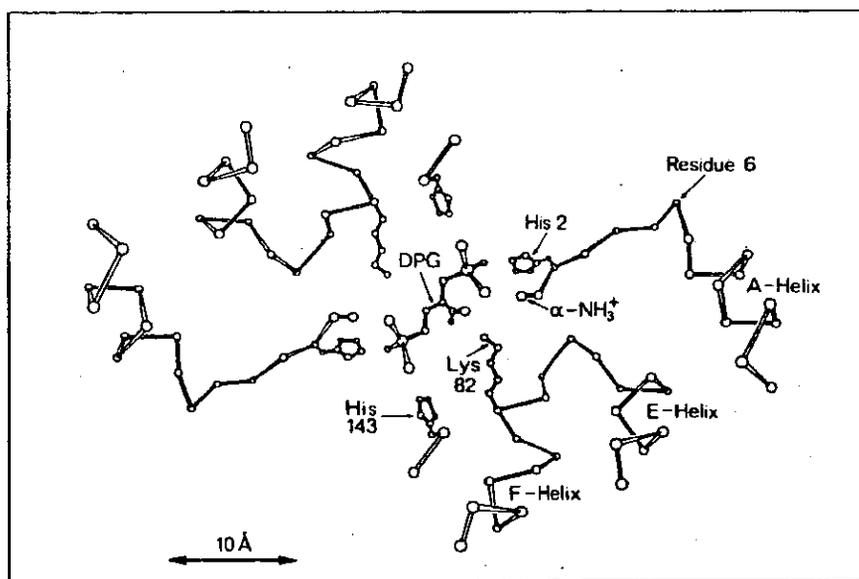


Figura 5.5 .- Representação esquemática do enlaçamento do DPG À deoxi-Hb humana na cadeia $\beta^{[41]}$.

Na figura 5.6 apresentamos os espectros de RPE de HbNO de bovino (vaca e búfalo) a 77 K e um pH de 7.4 . Nesta figura podemos observar presença de estruturas hiperfinas na região Z e X do espectro e que são muito semelhantes as observadas na cabra e capivara.

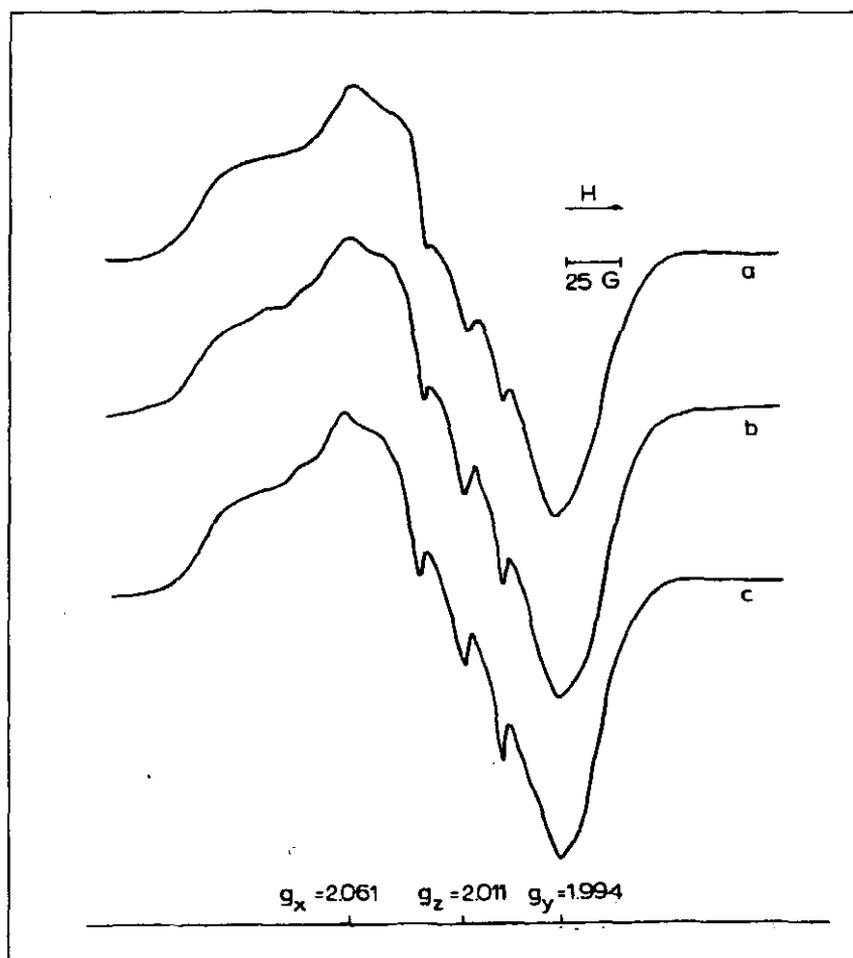


Figura 5.6.- Espectrosde RPE de nitrosil hemoglobina na presença de DPG (a) homem ; (b) vaca ; (c) búfalo^[42]..

Estudos feitos na Hb de bovino indicavam que esta apresenta uma baixa afinidade pelo oxigênio^[42]. Os fosfatos orgânicos, os quais normalmente abaixam a afinidade pelo oxigênio numa grande quantidade de mamíferos, não influenciam de maneira importante a Hb de bovino. Neste tipo de Hb, os íons de cloro surgem como o efector fisiológico de maior relevância na pouca afinidade pelo oxigênio^[42, 43, 44].

Fronticelli et al.^[45] propuseram que a Hb de bovino não apresenta um sitio específico para a ligação do íon cloro e que o efeito do cloro é o resultado do aumento da cavidade central na transição R-T. Este aumento poderia permitir a difusão de íons de cloro para

neutralizar o excesso de cargas positivas no revestimento da cavidade central, sendo ligado exteriormente a quaisquer delas.

Marta et al.^[46] mostraram que o 2,3-DPG liga-se a Hb de bovino, não só na ausência de ions de cloro, como também na presença de concentrações saturadas de íons de cloro. O baixo efeito funcional do 2,3-DPG na Hb de bovino poderia ser devido ao modo de ligação do 2,3-DPG à cadeia β da hemoglobina. Da tabela 5.3 podemos observar a ausência do primeiro aminoácido e a substituição da histidina NA2 pela metionina, na cadeia β . O 2,3-DPG vai-se ligar de uma forma assimétrica dentro desta cavidade e portanto induz um aumento da cavidade central de 13,5 a 17,8 Å^o [46].

Conclusões

- 1) De nossos resultados e das referências mencionadas, concluímos que é sempre possível reconstruir os espectros de RPE de HbNO dos vertebrados, como a soma de componentes axial e rômica.
- 2) Aqueles espectros que não apresentam uma estrutura hiperfina muito bem resolvida, foram simulados com a soma de duas componentes, uma axial e outra rômica interagindo com um só nitrogênio.
- 3) Os espectros de RPE de HbNO da capivara e cabra, com estrutura hiperfina mais resolvida na região Z e X, e com aproximadamente 20 % no estado T, foram simulados como a soma de três componentes, uma axial e duas rômicas, uma interagindo com um nitrogênio e outra com dois nitrogênios. As variações das frações das componentes destas espectros em função da temperatura não apresentam um comportamento monótono.
- 4) Medidas feitas em banda Q de HbNO de cabra, confirmaram a existência das três componentes achadas na banda X.
- 5) Não conseguimos correlacionar as diferenças entre os espectros de RPE de HbNO dos vertebrados com as mutações existentes na vizinhança da heme das cadeias α e β da Hb.
- 6) A semelhança nos espectros de HbNO de cabra e capivara, sugere que a Hb de capivara apresenta a mesma alteração de aminoácidos perto do 2,3-DPG na Hb de cabra. A

determinação da seqüência de aminoácidos da Hb de capivara poderá confirmar esta hipótese.

- 7) O pH na qual trabalhamos varia entre 5.5 e 7.0, uma controle interessante seria trabalhar com pH ajustado e distinguir os efeitos estruturais devido ao pH dos devidos a seqüência de aminoácidos.
- 8) Outro parâmetro interessante a ser variado é a fração do NO ligadas à Hb dos vertebrados, que influência de maneira importante a transição R-T.
- 9) Devido à forte influência dos íons cloro na baixa afinidade da Hb de bovino pelo ligante, seria interessante estudar o efeito da concentração destes íons sobre a afinidade das Hb de cabra e capivara.
- 10) Nossos resultados abrem a possibilidade a estudos com sistemas mais controlados e com mutantes produzidos artificialmente.

Apendice

Erros nos espectros simulados

Devido principalmente à grande quantidade de parâmetros utilizados na simulação, não é fácil poder definir um critério básico para achar os erros dos espectros simulados. Nosso critério está baseado tanto na existência como na posição da estrutura hiperfina observada nos espectros. Os erros dos valores dos tensores g e A , e larguras de linha ΔH das simulações foram estimados para o espectro de HbNO de cavalo. Os parâmetros de cada componente foram mudados de tal forma que podemos obter novamente o espectro experimental. A variação de cada parâmetro leva a pequenas mudanças na forma do espectro. Os erros obtidos foram os seguintes:

Componente rômica:

Fatores g : ± 0.0005

$A_{xx} = A_{yy} = \pm 2.0$ MHz.

$A_{zz} = \pm 1.0$ MHz.

$\Delta H_{xx} = \Delta H_{yy} = \pm 2.0$ MHz.

$\Delta H_{zz} = \pm 1.0$ MHz.

Componente Axial:Fatores g : ± 0.0005 $\Delta H_{\perp} = \Delta H_{//} = \pm 2.0$ MHz.

Uma característica importante destes erros é que o pares de componentes (A_{xx} , ΔH_{xx}) e (A_{yy} , ΔH_{yy}) variam simultaneamente da seguinte forma: um aumento no valor A_{xx} deve ser acompanhado de um decréscimo no valor de ΔH_{xx} nas mesmas quantidades e ate um valor máximo de 2.0 MHz. Desta forma pode-se manter a forma do espectro. Os valores de A_{zz} e ΔH_{zz} podem variar de ate 1.0 MHz., um valor maior que este não apresenta a estrutura hiperfina resolvida nos espectros.

Para estimar os erros nos valores das frações das componentes axial e rômbrica, nós simulamos novamente o espectro de HbNO de cavalo com os parâmetros mostrados na tabela A1, e que tomam em consideração a faixa de erros mostrados anteriormente.

Tabela A1. Valores nas componentes axial e rômbrica de cavalo com os erros considerados.

Componente Rômbrica									Componente Axial			
g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	ΔH_{xx}	ΔH_{yy}	ΔH_{zz}	g_{\perp}	$g_{//}$	ΔH_{\perp}	$\Delta H_{//}$
2.0805	1.9895	2.0185	26	12	51	36	26	19	2.0405	1.9935	82	52

Na figura A1 temos tanto o espectro experimental como o espectro simulado com os parâmetros da tabela A1, com frações 0.60 para a componente axial e 0.40 para a componente rômbrica (simulação 2). Na figura A1 é mostrado o ajuste inicial, apresentado no texto, tabela 4.1 (simulação 1).

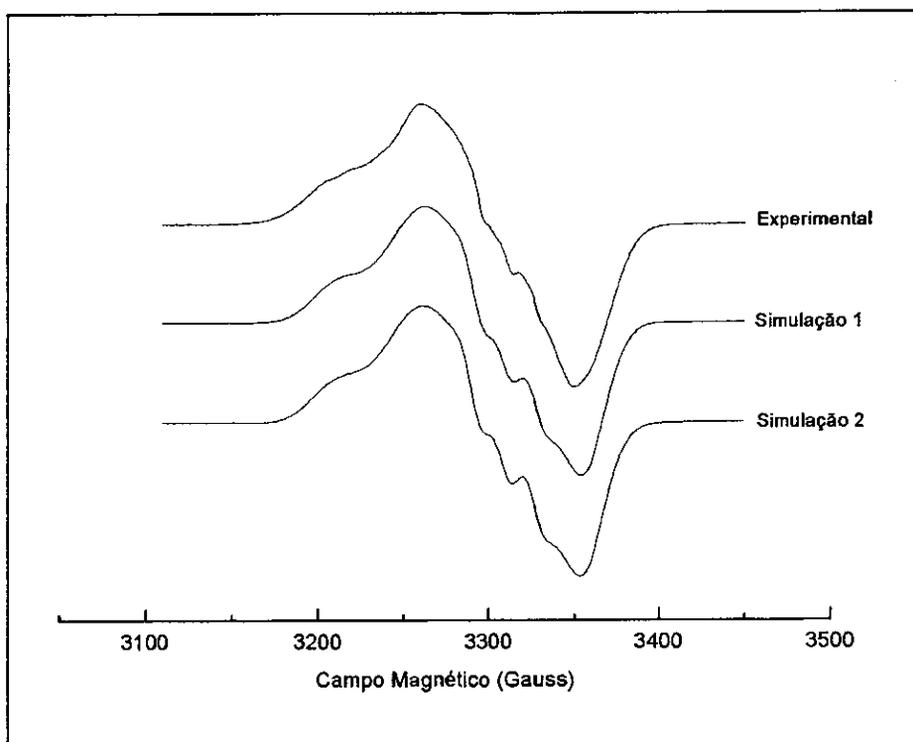


Figura A1 .- Espectro EPR de HbNO de cavalo tanto experimental como o simulados.

Erros nas frações das componentes também foram estimadas sem modificar os parâmetros da simulação inicial. Esta variação resultou num erro de ordem de ± 0.02 no valor das componentes.

Consideramos então os erros nas frações das componentes axial e rômica da ordem de ± 0.02 .

Bibliografia

1. J.D. Wattson, N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz and A.M. Weiner, "Molecular Biology of the Gene", 4ta. Ed., The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 1987.
2. J. Darnell, H. Lodish and D. Baltimore, "Molecular Cell Biology", Scientific American Books, Inc. 1990.
3. R.E. Dickerson and I. Geis, "The Structure and Action of Proteins", The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 1969.
4. L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura and J.S. Stamler, *Nature*, 380, 221 (1996).
5. L. Pauling, R. Corey and H. Branson, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 37, 205 (1951).
6. L. Stryer, "Biochemistry", W.H. Freeman, San Francisco 3rd. Ed., 1988.
7. R. Dickerson and I. Geis, "Hemoglobin", The Benjamin/Cumming Publishing Company, 1983.
8. Mo Kotani, "Advances in Quantum Chemistry", vol. 4 , 227 (1968).
9. G. Bemski, *Mol. Biol. Reports*, 24, 263 (1997).
10. J. C. Kendrew, *Scientific American* (December) 96 (1961).
11. M. F. Perutz, *Scientific American*, 211, 64 (1964).
12. R. Benesch and R.E. Benesch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 162 (1967).
13. A. Chanutin and R.R. Curnish, *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 96 (1967).
14. J. Monod, J. Wyman and J.P. Changeaux, *J. Mol. Biol.*, 12, 88 (1965).
15. P.F. Knowles, D. Marsh and H.W.E. Rattle, "Magnetic Resonance of Biomolecules", John Wiley & Sons Ltd., 1976.

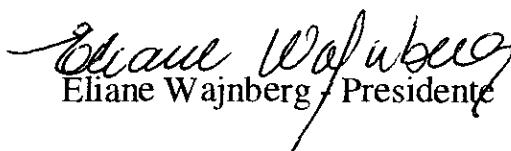
16. J. Hüttermann, C. Burgard and r. Kappl, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 90 (20), 3077 (1994).
17. C.P. Poole Jr., "Electron Spin Resonance", John Wiley & Sons, 1983.
18. M. Chevion, J.M. Salhany, J. Peisach, C.L. Castillo and W.E. Blumberg, *Israel J. Chem.*, 15, 311 (1976).
19. D.J.E. Ingram and J.E. Bennett, *Dis. Faraday Soc. A.*, 240, 67 (1955).
20. W. Gordy, H.N. Rexrod "Free Radical in Biology Systems", Blois, M.S., Ed., Academic Press: New York, 1961.
21. T. Shiga, K.J. Hwang and J. Tyuma, *Biochemistry*, 8, 378 (1969).
22. Y. Henry and R. Banerjee, *J. Mol. Biol.* 73, 469 (1973).
23. K. Nagai, h. Hori, S. Yishida, H. Sakamoto and H. Morimoto, *Biochim, Biophys. Acta*, 532, 17 (1978).
24. M. F. Perutz, *Quart. Ver. Bioph.* 22, 139 (1989).
25. R.H. Morse and S.I. Chan, *J. Biol. Chem.* 255, 7876(1980).
26. T. Yoshimura, T. Ozaki, Y. Shintani and H. Watanabe, *Arch. Biochem. Biophys.* 193, 301 (1979).
27. H. Hori, M. Ikeda-Saito and T. Yonetani, *J. Biol. Chem.* 256, 7849 (1981).
28. I. Caracelli, N.C. Meirelles, M. Tabak, O. B. Filho and O. R. Nascimento, *Biochim. Biophys. Acta* 955, 315 (1988).
29. E. Wajnberg, M.P. Linhares, L.J. El-Jaick and G. Bemski, *Eur. Biophys. J.*, 21, 57 (1992).
30. M. Flores, E. Wajnberg and G. Bemski, *Biophys. J.* 73, 3225 (1997).
31. S.R.W. Louro, P.C. Ribeiro and G. Bemski, *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 56 (1981).
32. J. C. Maxwell and W.S. Caughey, *Biochemistry* 15, 388 (1976).
33. M. A. Perutz, J.V. Kilmartin, K. Nagai, A Szabo and S.R. Symon. *Biochemistry*, 15, 378 (1976).

34. B.B. Wayland and L.W. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 6037 (1974).
35. H. Kon, *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 103 (1975).
36. A. Szabo and M. F. Perutz, *Biochemistry* 15, 4427 (1976).
37. R.L. Belford and M.J. Nilges, "Computer Simulation of powder Spectra", *EPR Symp.*, Colorado (august, 1979).
38. A. Plonca, J. Bednarek, A. Zgirski and M. Hilewicz-Grabska, *Chem. Phys. Letters* 232, 581 (1995).
39. M.F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Goaman, *Nature* 219, 131 (1968b).
40. K. Nagai, B. Luisi, D. Shih, G. Miyazaki, K. Imai, C. Poyart, A. DeYoung, L. Kwiatkowski, R.W. Noble, S. -H. Lin and N. -T. Yu, *Nature* 329, 858 (1987).
41. A. Arnone, *Nature* 237, 146 (1972).
42. A. Bhuyan, A. Lemtur, J. Subramanian and R. Lalthantluanga, *Biochim. Biophys. Acta*, 997, 36 (1989).
43. C. Fronticelli, E. Bucci and A. Razynska, *J. Mol. Biol.*, 202, 343 (1988).
44. M. F. Perutz, G. Fermi, C. poyart, J. Pagnier and J. Kister, *J. Mol. Biol.* 233, 536 (1993).
45. C. Fronticelli, M. Sanna, G. Perez-Alvarado, M. Karavitis, A. Lu and W. Brinnigar, *J. Biol. Chem.* 270, 30588 (1995).
46. M. Marta, M. Patamia, A. Colella, S. Sacchi, M. Pomponi, K. Kovacs, C. Lydersen and B. Giardina, *Biochemistry* 37, 14024 (1998).

**“ESTUDO DOS ESPECTROS DE RPE DE NITROSIL
HEMOGLOBINA DE VERTEBRADOS”**

Braulio Rafael Pujada Bermudez

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


Eliane Wajnberg / Presidente


Odivaldo Cambraia Alves


Alexandre Malta Rossi


Darci Motta de Souza Esquivel - Suplente

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 1999