

Maria Bernadete Ruggiero Colombo

Efeito de Água no Potencial de Oxi-Redução de
Hemoglobina Humana e Mioglobina Equina

1910000734





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

MARIA BERNADETE RUGGIERO COLOMBO

**EFEITO DE ÁGUA NO POTENCIAL DE OXI-REDUÇÃO DE
HEMOGLOBINA HUMANA E MIOGLOBINA EQÜINA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Física, Área de Concentração - Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO FRANCISCO COLOMBO

São José do Rio Preto - SP

1996



734/97



Meus agradecimentos sinceros,

Ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo, pela orientação segura, dedicação e postura científica com que acompanhou este trabalho,

Ao corpo docente do Departamento de Física, cujo empenho e dedicação foi fundamental para a implantação e desenvolvimento desta pós-graduação,

Aos Profs. Drs. Elizeu Trabuco, Gustavo Bonilla e Marcelo Fossey, pelas sugestões e colaboração prestadas no aperfeiçoamento deste trabalho,

Aos colegas de pós-graduação, à quem atribuo o clima harmonioso que desfrutamos no convívio do dia-a-dia,

Às minhas companheiras de sala, Sandra e Dulcinéia, cuja troca de experiências e amizade no decorrer desse tempo, contribuíram para fortalecer convicções,

Aos meus companheiros de laboratório: Flávio, André, Renato, Alexandre ("Mac"), Sandra, Lucimara e Osmar, pela gostosa cumplicidade com que amadurecemos juntos cientificamente e pelo carinho e incentivo constantes.

Aos queridos colegas dos outros grupos: Fátima, Adriana, Raquel, Cecília, Alexandre, Artur, Benati,, Ulderlei, Fábio e Fernanda, pelo companheirismo e carinho ,

Aos técnicos Paulinho e Barbosa, pela presteza e dedicação com que contribuíram para este trabalho,

Às funcionárias D^a Cida, D^a Luíza, Toninha e Francisca, pelo carinho com que acompanham nosso trabalho diário,

À secretária do departamento Ivoa e aos funcionários da seção de pós-graduação, pela colaboração em todos os momentos,

Ao meu pai, Alberto, cujo objetivo de vida era deixar aos seus filhos , um diploma universitário como herança,

À minha mãe Elisa, cuja presença física e moral nos momentos mais importantes de minha vida foi fundamental,

Aos meus irmãos: Roberto, Reinaldo, Rolando e Beth, pela perseverança com que lutaram para que o sonho de meu pai não morresse com ele,

Às minhas maravilhosas e amadas filhas Máira, Mariana e Natalia , pela compreensão da ausência, pelo carinho e estímulo dedicados durante esse período,

Ao meu querido esposo e amigo Marcio, pela paciência, carinho , amizade e confiança, sem os quais certamente não teria chegado até aqui.

À Deus, pela vida.

RESUMO

A ligação de O_2 e a oxi-redução dos grupos heme de Hemoglobinas, são exemplos de reações controladas pela ação de efetores alostéricos, como H^+ e ânions diversos. Estes ligantes modulam o equilíbrio entre distintas conformações desta proteína com diferentes afinidades pelo ligante gasoso ou pelo elétron.

Particularmente, foi recentemente demonstrado que a afinidade da Hb por O_2 depende linearmente da atividade da água da solução (Colombo, et.al., 1992), indicando que a mudança de hidratação proteica que acompanha a mudança conformacional entre os estados desoxi-Hb e oxi-Hb desempenha um papel energético importante no mecanismo de controle alostérico desta proteína.

Dado que tem se demonstrado em vários exemplos que a reação de oxi-redução de hemoproteínas e a reação de ligação de O_2 estão sujeitas à um mecanismo de controle comum, propuzemo-nos à determinar a dependência do potencial de oxi-redução da Hb e da Mioglobina com o potencial químico da água.

Potenciais de oxi-redução, medidos por titulação potenciométrica destas hemoproteínas, foram obtidos em soluções à diversas concentrações de sacarose, utilizada como tampão para a atividade de água. Para a Hb, o potencial de oxi-redução aumenta linearmente com a diminuição do logaritmo da atividade de água. Este resultado encontra-se em paralelismo com a diminuição da afinidade da Hb por O_2 com a diminuição da atividade

a conformação desoxi-Hb. Para Mioglobina, o potencial de oxi-redução é aparentemente invariante com a atividade de água do meio, refletindo a conhecida ausência de regulação heterotrópica desta proteína monomérica.

Estes resultados originais, reforçam a proposição inicial de que o controle alostérico está sujeito à modulação energética devido à solvatação macromolecular.

It has been recently shown that Hb oxygen affinity varies linearly with solution water activity. This result was interpreted as an indication that the hydration change following the quaternary transition between deoxy and oxy Hb, also contributes to the allosteric control of the Hb oxygenation.

With this work, we decided to investigate the possible role of hydration on redox potential of the hemoglobin and myoglobin. Oxidation-reduction potential of these proteins were measured at varied concentrations of sucrose, solute used to buffer the solution water activity (a_w). We found that the redox potential of Mb is insensitive to changes in a_w , while the redox potential of Hb increases linearly with the decrease of $\ln(a_w)$. These effects of a_w on $E_{1/2}$ follow a close parallelism with the previously reported effect of a_w on Mb and Hb O_2 affinity. Moreover, the linkage between $E_{1/2}$ and $\ln(a_w)$ reinforces the proposition that differential water binding to different allosteric conformations of Hb has an important role on the functional control of this protein.

Abstract

The binding of O_2 to the heme groups of Hemoglobins, as well as the oxi-reduction of their heme irons, are examples of reactions that are controlled by the binding of allosteric effectors such H^+ and anions. These ligands bind with different affinities and stoichiometries to different protein conformations thus modulating the overall oxygen and electron affinity of the protein.

It has been recently shown that Hb oxygen affinity varies linearly with solution water activity. This result was interpreted as an indication that the hydration change following the quaternary transition between deoxy and oxy Hb, also contributes to the allosteric control of the Hb oxygenation.

With this work, we decided to investigate the possible role of hydration on redox potential of the hemoglobin and myoglobin. Oxidation-reduction potential of these proteins were measured at varied concentrations of sucrose, solute used to buffer the solution water activity (a_w). We found that the redox potential of Mb is insensitive to changes in a_w , while the redox potential of Hb increases linearly with the decrease of $\ln(a_w)$. These effects of a_w on $E_{1/2}$ follow a close parallelism with the previously reported effect of a_w on Mb and Hb O_2 affinity. Moreover, the linkage between $E_{1/2}$ and $\ln(a_w)$ reinforces the proposition that differential water binding to different allosteric conformations of Hb has an important role on the functional control of this protein.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O MECANISMO DE AÇÃO ALOSTÉRICA	11
1.2 EFEITO BOHR	13
1.3 EFEITO DO CO_2	14
1.4 EFEITO DO DPG	15
1.5 EFEITO DO ÍON CLORETO	17
1.6 EFEITO DA ÁGUA	17
1.7 TEORIA DO EQUILÍBRIO DE OXI-REDUÇÃO	20
1.8 PROPRIEDADES DE OXI-REDUÇÃO DE HEMOPROTEÍNAS	27
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1- HEMOGLOBINA	1
FIGURA 2- CURVAS DE LIGAÇÃO DE OXIGÊNIO	5
FIGURA 3- GRÁFICO DE HILL PARA LIGAÇÕES DE Hb E Mb	6
FIGURA 4- EFEITO BOHR EM Hb	14
FIGURA 5- EFEITO DE CO ₂ E DPG EM Hb	16
FIGURA 6- DIAGRAMA DE UMA CELA ELETROQUÍMICA	23
FIGURA 7- GRÁFICO DE LOG(KO ₂) EM FUNÇÃO DE E _{1/2} PARA O COMPLEXO Co(bezacen)B	31
FIGURA 8- POTENCIAIS REDÓX DE Hb _s E Mb _s EM FUNÇÃO DA AFINIDADE POR O ₂	32
FIGURA 9- APARATO UTILIZADO NAS MEDIDAS DESTE TRABALHO	36
FIGURA 10- TITULAÇÃO DE DESOXI-Hb COM K ₃ Fe(CN) ₆	37
FIGURA 11- PRIMEIRA DERIVADA DO GRÁFICO ANTERIOR	38
FIGURA 12- FRAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA Hb EM FUNÇÃO DO POTENCIAL MEDIDO	39
FIGURA 13- GRÁFICO DE HILL PARA A Hb	40
FIGURA 14- TITULAÇÃO DE META-Mb COM Na ₂ S ₂ O ₄	41
FIGURA 15- GRÁFICO DE HILL PARA A Mb	42



1. INTRODUÇÃO

FIGURA 16- GRÁFICO DE HILL À DIFERENTES OSMOLALIDADES PARA A Hb	43
TABELA 1- DEPENDÊNCIA DO $E_{1/2}$ DA Hb COM n EM FUNÇÃO DE $\ln(a_w)$	44
FIGURA 17- GRÁFICO DE $E_{1/2}$ EM FUNÇÃO DA OSMOLALIDADE PARA A Hb, MEDIDO DE DIFERENTES FORMAS	45
FIGURA 18- GRÁFICO DE $E_{1/2}$ EM FUNÇÃO DE $\ln(a_w)$ PARA A Hb, MEDIDO DE DIFERENTES FORMAS	47
FIGURA 19- GRÁFICO DE HILL PARA TITULAÇÕES DE Mb EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE	48
FIGURA 20- GRÁFICO DE $E_{1/2}$ EM FUNÇÃO DE $\ln(a_w)$ PARA A Mb	49



Figura 1- Hemoglobina tetramérica. Cadeias alfa em laranja, cadeias beta em verde e grupo heme em vermelho. Extraído de Mathews e van Holde, 1990.

No grupo heme livre, em ambiente aquoso, o íon ferroso é facilmente oxidado para o estado férrico por reação com oxigênio,

1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina é uma proteína transportadora de oxigênio, que está presente nas células vermelhas do sangue dos vertebrados. Suas funções fisiológicas são transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e contribuir com o transporte de dióxido de carbono no sentido inverso. A maior parte do CO_2 que é expelido dos tecidos, é transportado aos pulmões dissolvido no sangue como ácido carbônico. Em mamíferos, essa proteína possui peso molecular de cerca de 64.500 unidades e é tetramérica, ou seja, exibe quatro subunidades, cada uma delas tendo uma cadeia polipeptídica e um grupo prostético: o grupo heme, que é um anel de protoporfirina cujo centro é um íon ferroso, ao qual o oxigênio molecular se liga.

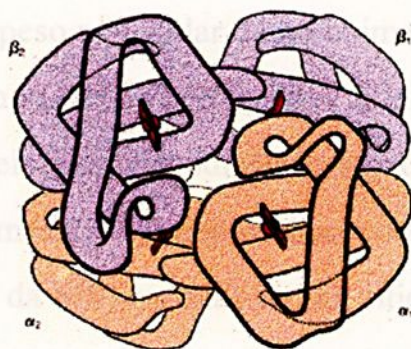


Figura 1- Hemoglobina tetramérica. Cadeias alfa em laranja, cadeias beta em lilás e grupo heme em vermelho. Extraído de Mathews e van Holde, 1990.

No grupo heme livre, em ambiente aquoso, o íon ferroso é facilmente oxidado para o estado férrico por reação com oxigênio,

enquanto que na hemoglobina (Hb) o íon ferroso permanece nesse estado tanto na forma oxigenada como na forma desoxigenada. Essa combinação termodinamicamente reversível com o oxigênio é possível porque as cadeias de polipeptídeos que circundam os grupos heme, têm um enovelamento tal, que criam bolsos hidrofóbicos, que os protegem contra a auto-oxidação. As quatro cadeias polipeptídicas possuem comprimentos similares: a Hb de um ser humano adulto (HbA₀), por exemplo, é constituída de duas cadeias idênticas, as cadeias alfa (α), cada uma contendo 141 resíduos de amonoácidos e duas outras cadeias idênticas, as cadeias beta (β), cada uma contendo 146 resíduos de aminoácidos (Baldwin, 1975).

A hemoglobina capta o oxigênio dos pulmões, onde a pressão de oxigênio é alta, e transporta-o aos tecidos, onde a pressão de oxigênio é baixa. Nos músculos, o oxigênio é retirado e é entregue a mitocôndria pela mioglobina (Mb), que é uma hemoproteína monomérica, que em vertebrados possui peso molecular de aproximadamente 17.000 unidades.

A ligação reversível de ligantes à Hb e Mb, pode ser descrita no equilíbrio por relações termodinâmicas padrão envolvendo aplicação da lei de ação das massas. Hemoproteínas podem ter um sítio de ligação ao ligante (no caso da Mb) ou mais de um sítio de ligação ao ligante (no caso da Hb), por macromolécula; no caso de vários sítios, a teoria geral de equilíbrio múltiplo é aplicada (Antonini e Brunori, 1971), como veremos a seguir.

Para facilitar a abordagem da descrição do equilíbrio, iniciaremos com a mioglobina, que possui um único grupo heme e, portanto, um único sítio de ligação para oxigênio. Sendo assim, o equilíbrio pode ser descrito da seguinte forma:





onde a constante de equilíbrio de associação é dada por :

$$K = \frac{(PX)}{(P)(X)} \quad (2)$$

onde (PX), (P) e (X) representam as atividades da proteína ligada ao ligante, da proteína livre e do ligante livre, respectivamente. A baixas concentrações de proteína (<1%) a atividade da mesma pode ser substituída pela sua concentração (Antonini e Brunori, 1971). Para ligantes gasosos, a atividade na fase líquida é expressa pela pressão parcial na fase gasosa, segundo a lei de Henry. Dessa forma, (X) pode ser substituído por $K'p_x$ (onde $p_x = pO_2$) na equação 2,

$$K'' = \frac{[PX]}{[P] \times pO_2} \quad (3)$$

onde K' é a constante de solubilidade do O_2 na solução, ou a constante de Henry e $K'' = KK'$.

Com a finalidade de tratar dados experimentais, é comum o uso da fração de saturação da proteína com o ligante, $\bar{Y}$ ou θ , definida como:

$$\bar{Y} = \frac{(PX)}{(P) + (PX)} \quad (4)$$

Das equações 2 e 4 temos:

$$\bar{Y} = \frac{K(P)(X)}{(P) + K(P)(X)} = \frac{K(X)}{1 + K(X)} \quad (5)$$

Substituindo (X) por pO_2 , teremos

$$\bar{Y} = \frac{K'' pO_2}{1 + K'' pO_2} \quad (6)$$

Se representarmos graficamente $\bar{Y}$ em função de pO_2 para a mioglobina, teremos uma curva hiperbólica. A ligação de O_2 à Mb, onde os sítios de ligação para oxigênio são independentes uns dos outros, é chamada "não-cooperativa" (Figura 1, curva 1, azul). A curva 2 da figura 1 (vermelho) representa a ligação de O_2 à Hb, cujos sítios de ligação para O_2 são dependentes uns dos outros, e por essa razão é chamada "cooperativa".

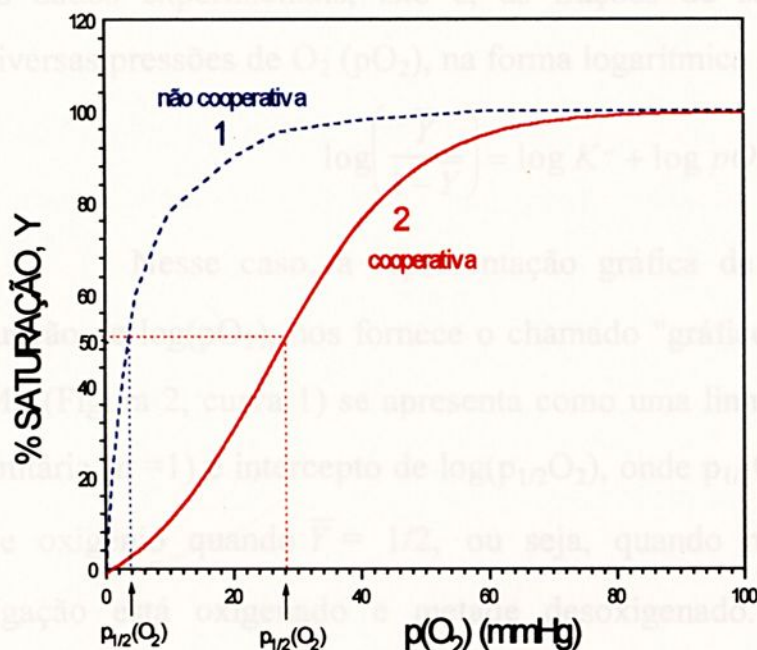


Figura 2- Curvas de ligação de oxigênio. (1) Mb (2) Hb, onde a porcentagem de saturação da proteína por oxigênio esta representada em função da pressão de oxigênio, e $p_{1/2}(O_2)$ é a pressão de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios de ligação, adaptado de Bertini *et al*, 1994.

As equações 5 e 6 nos fornecem a expressão da lei de ação das massas para $\bar{Y}$ como função de (X) (ou p_x) no caso da Mb.

Da equação 5,

$$(1 - \bar{Y}) = 1 - \frac{K(X)}{1 + K(X)} = \frac{1}{1 + K(X)} \quad (7)$$

então,

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K(X) \text{ ou } \frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K'' p_x \quad (8)$$

A equação 8 indica que é conveniente representar graficamente os dados experimentais, isto é, as frações de saturação, medidas a diversas pressões de O_2 (pO_2), na forma logarítmica dessa equação.

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = \log K'' + \log pO_2 \quad (9)$$

Nesse caso, a representação gráfica de $\log(\bar{Y} / 1 - \bar{Y})$ em função de $\log(pO_2)$, nos fornece o chamado "gráfico de Hill", que para a Mb (Figura 2, curva 1) se apresenta como uma linha reta com inclinação unitária ($n=1$) e intercepto de $\log(p_{1/2}O_2)$, onde $p_{1/2}O_2$ é a pressão parcial de oxigênio quando $\bar{Y} = 1/2$, ou seja, quando metade dos sítios de ligação está oxigenado e metade desoxigenado. O valor de $p_{1/2}O_2$ corresponde ainda ao valor da constante de equilíbrio de dissociação da Mb.

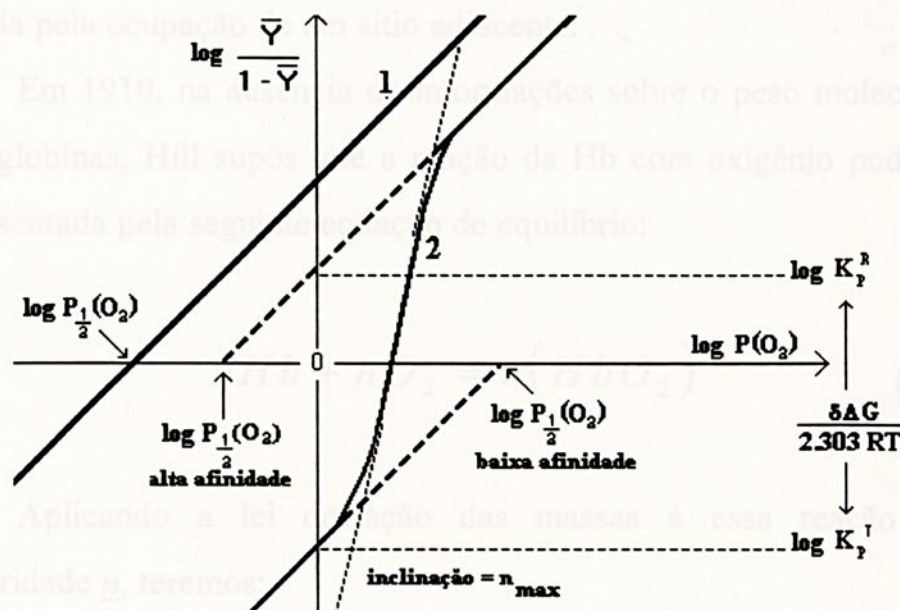
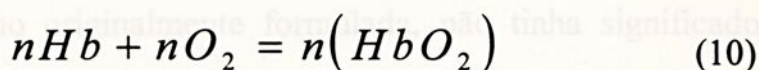


Figura 3 - Gráfico de Hill para ligações de O_2 a mioglobina (1) e a hemoglobina (2), onde a inclinação das curvas fornece a cooperatividade da reação (n) e o intercepto com o eixo x fornece a pressão de O_2 quando metade dos sítios de ligação da proteína estão saturados; adaptado de Bertini, *et al.*, 1994.

A maioria das proteínas que fazem ligação com o oxigênio não são monoméricas, mas espécies oligoméricas contendo duas ou mais subunidades similares (Antonini e Brunori. 1971). As subunidades são mantidas juntas por forças de Van der Waals ou por interações fortes, tais como pontes de hidrogênio ou pontes salinas. No caso das Hbs tetraméricas tanto nenhum, como um ou até todos os quatro sítios, podem ser ocupados pelo oxigênio. Dessa forma, a ligação ou o desligamento de oxigênio em um sítio pode afetar a afinidade e a cinética da ligação e do desligamento do ligante num sítio vizinho. Esse comportamento, onde a ligação de uma molécula influencia a ligação de sucessivas moléculas do mesmo tipo, é chamada de “interação alostérica homotrópica”. De fato, como resultado dessa interação, a curva de saturação para Hb tem um formato sigmoidal sendo, portanto, “cooperativa” (Figura 1, curva 2). Quando a cooperatividade é positiva, a afinidade de um sítio vazio é aumentada pela ocupação de um sítio adjacente.

Em 1910, na ausência de informações sobre o peso molecular de hemoglobinas, Hill supôs que a reação da Hb com oxigênio poderia ser representada pela seguinte equação de equilíbrio:



Aplicando a lei de ação das massas à essa reação de molecularidade n , teremos:

$$\frac{[HbO_2]^n}{[Hb]^n} = K(pO_2)^n \quad (11)$$

ou de uma forma mais geral:

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = K(X)^n \quad (12)$$

onde $\bar{Y} = \frac{(\text{HbO}_2)_n}{\text{Hb}_{\text{total}}}$

ou na forma logarítmica,

$$\log \left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} \right) = \log K + n \log(X) \quad (13)$$

Caso o valor da constante de associação, K , permanecesse constante no transcurso da reação de oxigenação ou desoxigenação, um gráfico de $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y})$ em função de $\log p_x$ ou $\log (X)$, deveria fornecer uma linha reta com inclinação igual a n , ou seja, a molecularidade aparente da reação em qualquer ponto da curva. A hipótese de Hill, como originalmente formulada, não tinha significado físico direto, desde que foi mostrado posteriormente (Hartridge e Roughton, 1925), que a reação da Hb com ligantes não é uma reação de molecularidade n . Apesar disso, o gráfico de Hill continua válido para uso geral nos dias atuais, para representar dados de equilíbrio em reações de Hb pelas seguintes razões:

I) Para a maioria das Hbs, a curva de equilíbrio fornece uma linha reta quando $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y})$ é representado graficamente em função de $\log pO_2$ ou $\log (X)$, para valores de $\bar{Y}$ que são facilmente acessíveis às medidas, ou seja, entre 0,10 e 0,90 (Figura 2, curva 2). Além disso, a equação de Hill descreve a curva com apenas dois parâmetros: $\log p_{1/2}$, indicando a afinidade pelo ligante e n , que está relacionado com o formato da curva de dissociação e, portanto, à cooperatividade. Dessa forma, $n = 1$ corresponde a uma curva de dissociação hiperbólica não cooperativa; $n > 1$ a uma curva sigmoidal e, portanto, à presença de interações heme-heme positivas. O valor de n para o equilíbrio de oxigênio de hemoglobinas de mamíferos sob condições normais está entre 2,8 e 3,0. Um valor menor de n indica a presença de sítios independentes com diferentes afinidades pelo ligante, ou interações negativas.

II) Como mencionado anteriormente, a equação de Hill não tem significado físico direto, o valor de n é usado simplesmente como uma medida das interações heme-heme, e está relacionado com a energia livre total de interação (Wyman, 1964). Portanto,

$$n = \frac{d \ln \left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} \right)}{d \ln(X)} = \frac{1}{\bar{Y}(1 - \bar{Y})} \frac{d \bar{Y}}{d \ln(X)} \quad (14)$$

A ocorrência de interações heme-heme na Hb é responsáável pela modulação da energia livre de ligação do O_2 a essa proteína. Enquanto na ausência de cooperatividade a variação de energia livre de ligação é simplesmente proporcional ao logarítmo da constante de

dissociação, como ocorre com a Mb, a determinação da variação de energia livre para saturar uma proteína alostérica com seu ligante, como a Hb com O₂, requer que se considere a energia de cooperação armazenada na macromolécula. Para levar em conta todas estas contribuições de origem local (ligação de ligante ao sítio específico) e difusa (na macromolécula) para a variação de energia livre de saturação de O₂ a Hb, Wyman propôs calcular o trabalho para transferir δn moléculas de O₂ de um estado de referência para a proteína. Como no estado de referência, o potencial químico do ligante é μ_0 , o trabalho requerido para ligar δn moléculas do ligante a proteína, sendo o potencial do ligante μ_x , é dado por

$$dG = \delta n (\mu_x - \mu_0)$$

ou

$$\Delta G = \int_{desoxi}^{oxi} dG = \int_0^1 \delta n RT \ln x = -4 RT \ln x_m$$

que é a variação de energia livre total da proteína entre seu estado saturado e seu estado totalmente insaturado, x_m na equação acima corresponde à atividade média do ligante na qual a concentração da macromolécula não ligadas e da totalmente ligada é a mesma (Wyman, 1964).

Desta forma, pode-se perguntar como a energia livre de interação do ligante com a proteína varia com a saturação $\bar{Y}$, isto é;

$$\frac{d\Delta G_x}{d\bar{Y}} = RT \frac{d \ln(x)}{d\bar{Y}} \quad (15)$$

e, finalmente, relacionar esta variação de energia livre de interação do ligante com o coeficiente de Hill, substituindo a equação 14 na equação 15;

$$\frac{d\Delta G_x}{d\bar{Y}} = \frac{RT}{n\bar{Y}(1 - \bar{Y})} \quad (16)$$

Esta equação mostra como a energia de interação é modulada pela cooperatividade da proteína, medida pelo coeficiente de Hill.

O valor de n , bem como o de $p_{1/2}(O_2)$, são sensíveis à natureza e concentrações de efetores alostéricos (moléculas e íons que se ligam a sítios, específicos ou não, da hemoglobina, influenciando a ligação de oxigênio) (Imai, 1982). São eles: H^+ , CO_2 , fosfatos orgânicos, Cl^- e, como mostrado mais recentemente, H_2O (Colombo *et al*, 1992). Esse tipo de interação não-heme, é chamada interação alostérica heterotrópica.

1.1 O MECANISMO DE AÇÃO ALOSTÉRICA

O efeito desses efetores alostéricos, e de que maneira a cooperatividade aparece nestes sistemas, é bem explicado pelo modelo alostérico proposto por Monod, Wyman and Changeux (1965), que atribuíu à existência de diferentes estruturas conformacionais quaternárias

da macromolécula, a origem das interações homotrópicas e heterotrópicas em proteínas oligoméricas. Nesse modelo, as subunidades podem se associar em duas diferentes estruturas quaternárias que estão em equilíbrio entre si em todos os estágios da ligação. Essas estruturas diferem em suas ligações inter-subunitárias, e as alterações na estrutura quaternária produzidas por essas ligações alteram a conformação das subunidades, de forma que em um dos estados a afinidade das subunidades pelo ligante oxigênio é maior do que no outro estado. Na ausência de O_2 , a estrutura de baixa afinidade por O_2 , o estado T (Tenso), é mais estável. A ligação de O_2 à proteína necessariamente dirige o equilíbrio para a estrutura de alta afinidade, o estado R (Relaxado), resultando num aumento da afinidade pelo O_2 à medida que a reação prossegue. A simetria é conservada em todas as subunidades cuja estrutura quaternária tem a mesma afinidade por O_2 , e a afinidade de uma subunidade não é diretamente influenciada pelo estado de ligação de suas subunidades vizinhas. Esse modelo prediz que modificações na proteína devem influenciar as interações cooperativas, através de seus efeitos sobre a afinidade dos estados R e T, e sobre o equilíbrio entre as duas estruturas quaternárias. Em particular, moléculas que se ligam mais fortemente a uma ou outra forma, afetarão o equilíbrio alostérico. Uma propriedade desse modelo é que o equilíbrio entre as conformações R e T na ausência de O_2 é alterado por variação na concentração de um efetor alostérico ou por modificação na proteína; a cooperatividade medida pelo coeficiente de Hill “n” é alterada. A cooperatividade máxima é obtida quando o equilíbrio está tão distante em direção a T na Hb não ligada, como está em direção a R na Hb totalmente ligada. Se o equilíbrio estiver



totalmente deslocado em direção a T ou em direção a R, não existirá mudança quaternária na ligação e, portanto, nenhuma cooperatividade.

1.2 EFEITO DO PRÓTON (EFEITO BOHR)

Tanto a oxi-Hb como a desoxi-Hb ligam íons H^+ , mas a pH fisiológico (6,8), a desoxi-Hb tem uma afinidade maior por esses íons. Portanto, íons H^+ são ligados quando a oxi-Hb perde oxigênio e são desligados quando a desoxi-Hb liga O_2 . O efeito termodinâmico relacionado a isso é que o equilíbrio entre O_2 e Hb é influenciado pela concentração de íons H^+ em solução, ou seja, o pH da solução. No intervalo fisiológico de pH, a afinidade por O_2 diminui quando o pH diminui, e aumenta quando o pH é elevado, mas o grau de cooperatividade é pouco alterado. A interação entre ligação de O_2 e de íons Hidrogênio é conhecida como efeito Bohr. Ele é responsável pela eficiente captação e liberação de oxigênio nos pulmões e nos tecidos respectivamente, como pode ser aferido nos gráficos de saturação de O_2 à diferentes pHs, mostrado na figura 4.

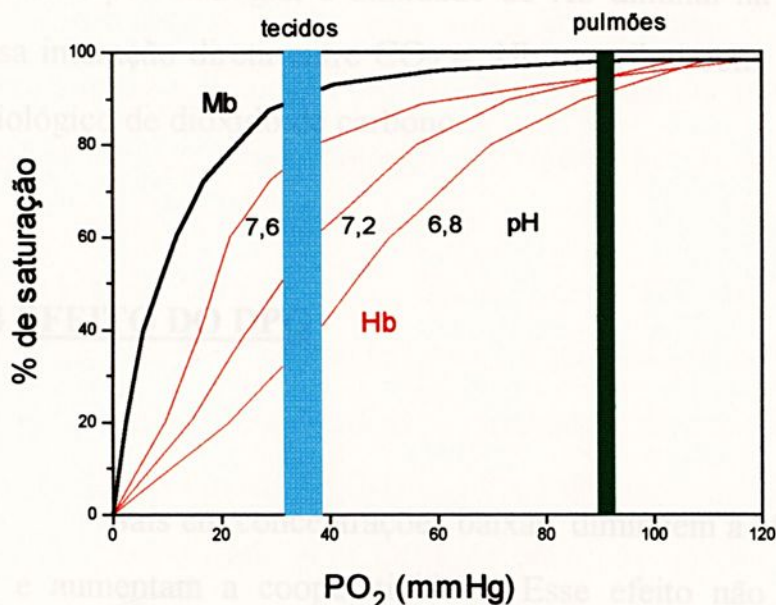


Figura 4- Efeito Bohr em hemoglobina. Curvas de ligação de O₂ são mostradas a pH 7,6; 7,2 e 6,8. Nota-se que a eficiência de remoção de oxigênio da hemoglobina (Hb, linhas vermelhas), quando medida pela diferença entre as curvas a pO₂ = 30 mmHg, aumenta muito quando o pH diminui. A mioglobina (Mb, linha preta) tem um pequeno efeito Bohr, portanto a curva mostrada é aproximadamente a mesma para os tres valores de pH.

1.3 EFEITO DO CO₂

O dióxido de carbono liga-se diretamente aos amino-grupos N-terminais das cadeias polipeptídicas da Hb (Baldwin, 1975) formando carbamatos; bem como interage com a proteína, alterando o pH da solução. Tanto a oxi-Hb como a desoxi-Hb liga dióxido de carbono em sítios específicos da proteína, mas a desoxi-Hb tem maior afinidade por CO₂. Portanto, de forma análoga à ligação de íons H⁺, CO₂ é ligado pela desoxi-Hb nos tecidos e liberado quando a Hb é oxigenada nos pulmões.

Também por analogia, a afinidade de Hb diminui na presença de CO_2 . Essa interação direta entre CO_2 e Hb contribui com 10% do transporte fisiológico de dióxido de carbono.

1.4 EFEITO DO DPG

Sais em concentrações baixas, diminuem a afinidade da Hb por O_2 e aumentam a cooperatividade. Esse efeito não é devido a força iônica, mas à ligação de ânions à Hb. A diminuição da afinidade por O_2 é atribuída a uma ligação preferencial por ânions à desoxi-Hb, tal como ocorre com prótons e dióxido de carbono (Imai, 1982). Existe uma tendência de o efeito de ânions com um número maior de cargas negativas ser maior que o de ânions com menor número de cargas negativas. Os fosfatos, poli-ânions comuns em sistemas biológicos, exibem um efeito marcante na afinidade da Hb de várias espécies por O_2 , quando comparado a outros sais. Dentre os fosfatos orgânicos presentes nos eritrócitos humanos, o DPG (2,3-difosfoglicerato) é o mais importante. Algumas espécies de aves e tartarugas possuem inositol pentafofato (IPP), ao invés de DPG como o efector regulatório principal da Hb. Os peixes apresentam ATP (adenosina trifosfato) como efector regulatório da Hb. O inositol hexafofato (IHP) (que é análogo ao inositol pentafofato) apresenta um efeito ainda maior sobre o equilíbrio da Hb com O_2 . O poder de ânions diminuírem a afinidade da Hb humana por O_2 , segue a seguinte ordem: $\text{Cl}^- < \text{ortofosfato} < \text{DPG} < \text{IHP}$ (Imai, 1982).



Na ausência de ligantes aniônicos, a Hb liga oxigênio muito fortemente, dificultando a liberação deste aos tecidos. O DPG diminui significativamente a afinidade por O_2 dentro de um intervalo apropriado de pressões de O_2 , sendo também modulado por H^+ , CO_2 , e outros fosfatos orgânicos.

O sítio específico de ligação para DPG na desoxi-Hb está localizado na entrada da cavidade central. Sete resíduos de aminoácidos das cadeias beta que são carregados positivamente formam este sítio. Estes resíduos são: as valinas 1, as histidinas 2 e 143 e uma das lisinas 82. O sítio para IHP é o mesmo que para DPG. O efeito da ligação de DPG e CO_2 sobre a curva de saturação da Hb por O_2 está mostrado na figura 5.

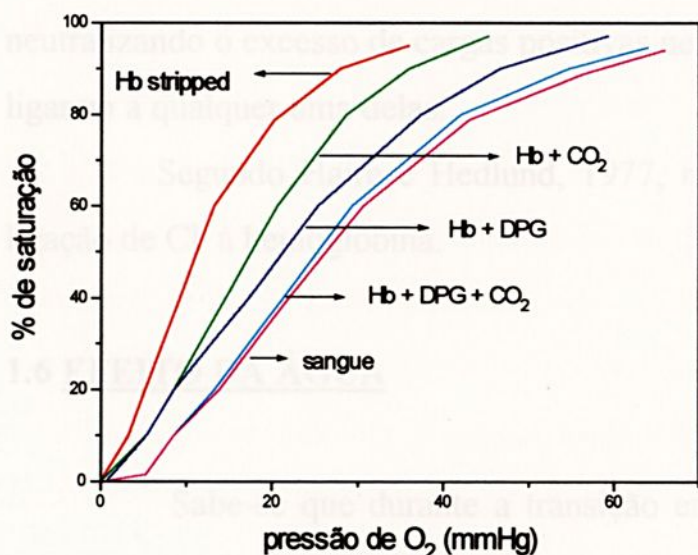


Figura 5- Efeitos combinados de CO_2 e DPG na curva de ligação de O_2 da hemoglobina. Hb sem CO_2 e DPG (stripped) tem muito alta afinidade por O_2 . A adição de ambos, aos níveis encontrados no sangue emergindo dos capilares, reproduz quase que exatamente a curva de ligação observada para o sangue total.

1.5 EFEITO DO ÍON CLORETO

Experimentos de equilíbrio de O_2 , indicam que a molécula de Hb tem pelo menos dois sítios de ligação para Cl^- relacionados à oxigenação por tetrâmero. Os possíveis sítios de ligação para Cl^- são: grupos carregados positivamente de α -aminas e de subunidades β , ϵ -amina da β -Lys82; imidazol da β -His143 e imidazol da β -His146. O Cl^- se liga à α -amina, Lys82 e His143 do sítio de ligação de fosfato das subunidades β , explicando a ligação competitiva de Cl^- e DPG.

Perutz, 1993, sugere porém, que não existem sítios específicos para íons cloreto. Os efeitos desse íon seriam devidos simplesmente ao alargamento da cavidade central que ocorre na transição entre a estrutura R e a estrutura T, que permitiria que íons cloreto adicionais se difundissem, neutralizando o excesso de cargas positivas nessa região, sem no entanto, se ligarem a qualquer uma delas.

Segundo Haire e Hedlund, 1977, não existe cooperatividade na ligação de Cl^- à hemoglobina.

1.6 EFEITO DA ÁGUA

Sabe-se que durante a transição entre as estruturas das duas conformações limites da Hb, do estado totalmente desoxigenado para o estado totalmente oxigenado, vários contatos diretos entre as subunidades da Hb são quebrados e expostos ao solvente. Essa mudança na estrutura da proteína implica numa diferença de hidratação ou de ligação de água entre estas conformações. A influência da água no equilíbrio conformacional entre as formas R e T da Hb foi demonstrada



através da determinação da dependência da afinidade da Hb por O₂ com a atividade da água ou, equivalentemente, com a pressão osmótica (Colombo *et al.*, 1992, 1994 e 1996). A adição de solutos inertes (açúcares e polióis) a diferentes concentrações à solução de Hb, constitui um bom sistema para se estudar a variação da afinidade por O₂ com a variação da atividade da água.

Aumentando-se a concentração dos solutos neutros (e conseqüentemente diminuindo a atividade da água), a afinidade da Hb por O₂ decresce. Considerando-se o “linkage” (conexão) entre atividade de água e afinidade por O₂, foi determinado que aproximadamente 65 moléculas adicionais de água estão envolvidas na transição de desoxi para oxi-Hb. Esse valor concorda com a diferença na área de superfície acessível à água, registrada para as duas conformações (Colombo *et al.*, 1992).

Portanto, moléculas de água agem termodinamicamente como um ligante alostérico.

Para todos os efetores alostéricos descritos acima, o equilíbrio deve ser tratado com equações de “linkage”, que descrevam a dependência entre a saturação da Hb por oxigênio e a atividade do ligante alostérico e, inversamente, a saturação da proteína pelo efector alostérico com a atividade do oxigênio (Wyman, 1948 e 1964).

A base dessas equações de “linkage”, pode ser descrita da seguinte forma:

Suponhamos que um mol de Hb esteja saturado por n moléculas de O₂ (n_{O_2}), e n moléculas de um ligante alostérico x (n_x). A energia livre total deste sistema é dada por (Colombo *et al.*, 1992, 1994) :

$$G = \mu_{Hb} + n_{O_2}\mu_{O_2} + n_x\mu_x \quad (17)$$



onde $\mu_{O_2} = \mu_{O_2}^0 + RT \ln p_{O_2}$ é o potencial químico do O_2
 $\mu_x = \mu_x^0 + RT \ln x$ é o potencial químico do x e
 μ_{Hb} é o potencial químico da Hb

A equação de Gibbs Duhem associada à variação de energia livre total do sistema descrito acima, é dada por:

$$d\mu_{Hb} + n_{O_2}d\mu_{O_2} + n_x d\mu_x = 0 \quad (18)$$

e expressa a forma com que o potencial químico da proteína varia com a saturação e com a atividade dos ligantes, isto é:

$$- d\mu_{Hb} = n_{O_2}d\mu_{O_2} + n_x d\mu_x ,$$

ou substituindo os potenciais químicos por suas dependências na atividade (equação acima),

$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2}d\ln(p_{O_2}) + n_x d\ln(x)$$

Dado que μ é uma propriedade de estado (pois a ligação de O_2 e de x à Hb é um processo reversível), $d\mu_{Hb}$ é uma diferencial exata e a seguinte relação de Maxwell (derivadas cruzadas) é válida:

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln x} \right|_{\ln(p_{O_2})} = \left. \frac{\partial n_x}{\partial \ln(p_{O_2})} \right|_{\ln x} \quad (19)$$

que é uma das equações de “linkage” de Wyman. Como antecipado, esta relação nos indica a variação da saturação da Hb por O_2 quando se muda a atividade de x mantendo-se pO_2 constante, com a variação da saturação da Hb por x quando se muda a atividade de pO_2 mantendo-se a atividade de x constante.

Outras relações de Wyman podem ser derivadas a partir desta (Wyman, 1964; Wyman e Gill, 1990; Colombo e Bonilla Rodriguez, 1996). Entre elas, uma que é bastante usada, tem a seguinte forma:

$$\left. \frac{d \ln p_{1/2} O_2}{d \ln x} \right|_{\bar{Y}=1/2} = - (n_x^{oxi} - n_x^{desoxi}) \quad (20)$$

onde $p_{1/2} O_2$ é a pressão de O_2 a 50% de saturação,

n_x^{oxi} é o número de moléculas de x ligadas à forma oxi e

n_x^{desoxi} é o número de moléculas de x ligadas à forma desoxi.

1.7 TEORIA DO EQUILÍBRIO DE OXI-REDUÇÃO

Com a intenção de apresentar uma descrição mais detalhada dos princípios que fundamentam o equilíbrio de oxi-redução (redox), achamos interessante incluir a teoria clássica que impulsionou a eletroquímica aos avanços conquistados atualmente, bem como a aplicação desses conceitos a sistemas biológicos. Para tanto, foram consultados o clássico “New Instrumental Methods in Electrochemistry”, de Paul Delahay (1954), uma edição moderna do “Physical Chemistry”

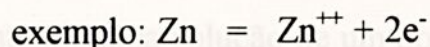


de P.W. Atkins (1994) e "Biochemistry" de Christopher K. Mathews e K.E. van Holde (1990).

A química redox é comparável à química ácido-base. Em um equilíbrio protônico, tem-se um ácido e sua base conjugada, que representa um doador e um acceptor de prótons respectivamente.



De forma similar, em uma reação redox, tem-se um doador e um acceptor de elétrons.



As reações acima são simples meia-reações, que fazem parte da reação total de equilíbrio ácido-base ou redox. Uma reação completa deve mostrar como um acceptor de elétrons se reduz quando ganha elétrons. Dos dois substratos, o doador de e^- é um redutor, que se torna oxidado enquanto transfere elétrons para outro substrato, o oxidante.



O redutor, portanto, é comparável ao ácido num equilíbrio protônico.

Na química ácido-base, é crítico entender o conceito de pK_a , que representa uma medida quantitativa da tendência de um ácido perder um próton. Da mesma forma, para entender oxidações biológicas, é



necessária uma medida comparável da tendência de um redutor perder elétrons. Tal tendência é representada pelo potencial padrão de redução, ou E^0 .

Em equilíbrios ácido-base, definimos arbitrariamente a água com pK_a 7.0, como neutra. Qualquer composto com pK_a abaixo de 7.0, que tende a protonar a água, é chamado de ácido; e compostos que tendem a ser protonados pela água são chamados de bases. A química redox também emprega um padrão de referência, chamado Eletrodo Normal (ou padrão) de Hidrogênio (que a 25°C , 1 atm de pressão de H_2 e a concentração de 1 molar, atribui-se arbitrariamente e por convenção o potencial zero) numa cela eletroquímica.

Uma cela eletroquímica consiste de duas meia-celas, cada uma delas contendo uma solução de um doador de e^- e seu acceptor conjugado. Imersos nessas soluções, encontram-se os eletrodos (ou condutores metálicos) do mesmo metal ou de diferentes metais (1 e 2). As meia-celas são conectadas por uma ponte salina, a fim de manter a neutralidade elétrica. (Figura 6). Os eletrodos são conectados a um galvanômetro (P), que mede a passagem de corrente elétrica pela cela. Elétrons são retirados do anodo, onde ocorre oxidação, e são transportados ao catodo, onde ocorre redução. O fluxo de elétrons ocorre numa ou noutra direção, dependendo do potencial da meia cela em estudo com relação à de referência. A eletricidade é transportada através da cela pela migração de íons, desde que elétrons livres geralmente não existem em eletrólitos.



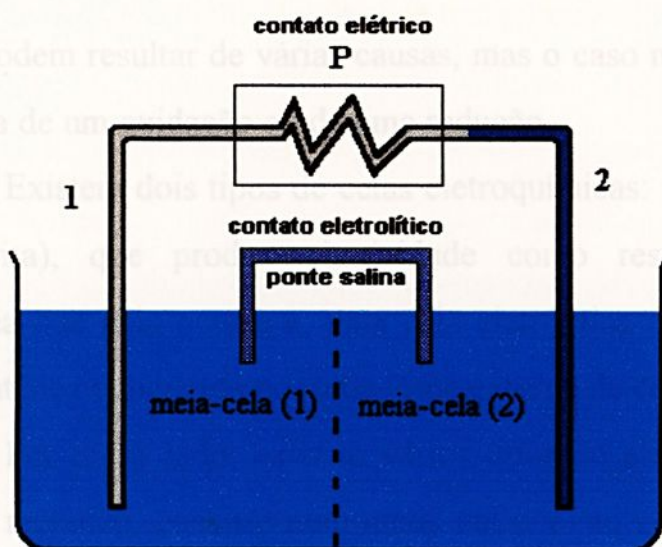


Figura 6 - Diagrama esquemático de uma célula eletroquímica.

A voltagem lida no galvanômetro P, é a soma algébrica das diferenças de potencial ao longo do circuito elétrico. Essas diferenças provêm de várias junções no circuito elétrico: no contato metal-metal, nas duas interfaces metal-líquido e na junção líquido-líquido. Um potencial elétrico num dado ponto é definido como o trabalho necessário para trazer uma carga positiva unitária do infinito até o ponto onde o potencial é definido. Esse trabalho geralmente não é o mesmo dos dois lados da interface, e conseqüentemente, uma diferença de potencial elétrico existe na junção.

Diferenças de potencial entre metais podem ser da ordem de alguns volts, e não são afetadas pelas reações do eletrodo em celas eletroquímicas. Diferenças de potencial nas junções líquido-líquido, podem ser evitadas, por exemplo, por imersão dos dois eletrodos de uma cela na mesma solução. Diferenças de potencial nas interfaces metal-

líquido, podem resultar de várias causas, mas o caso mais importante é a ocorrência de uma oxidação ou de uma redução.

Existem dois tipos de células eletroquímicas: uma célula galvânica (já descrita), que produz eletricidade como resultado da reação espontânea que nela ocorre e, uma célula eletrolítica na qual uma reação não espontânea é induzida por uma fonte externa de corrente.

Por outro lado, existem vários tipos de eletrodos. O eletrodo metal-íon metálico, consiste num metal em contato com uma solução de seu sal, por exemplo: $\text{Cu}^0 / \text{Cu}^{++}(\text{aquoso})$. O eletrodo gasoso consiste num gás em equilíbrio com uma solução de seus íons, na presença de um metal inerte (geralmente platina), que age como um poço de elétrons, mas não faz parte da reação, apenas atua como um catalisador. Um exemplo de eletrodo gasoso é o eletrodo de hidrogênio, no qual gás hidrogênio é borbulhado em uma solução de íons hidrogênio, e o par redox é H^+ / H_2 . O eletrodo metal-sal insolúvel consiste de um metal (M) coberto por uma camada porosa de sal insolúvel (MX), imerso numa solução contendo íons (X) (por exemplo: $\text{Ag} / \text{AgCl} / \text{Cl}^-$).

Uma célula na qual a reação total não atingiu o equilíbrio químico, pode realizar trabalho elétrico (w_e) enquanto a reação transporta elétrons através do circuito externo. O trabalho que uma dada transferência de elétrons pode fazer depende da diferença de potencial entre dois eletrodos. Essa diferença de potencial é chamada potencial da célula e é medida em volts. Uma célula na qual a reação total está em equilíbrio, não pode realizar trabalho e portanto, a diferença de potencial da célula é zero.



O trabalho elétrico máximo ($w_{e\text{máx}}$) que uma cela pode realizar é dado por ΔG (energia livre do sistema) e para um processo espontâneo, $w_e = -\Delta G$ a pressão e temperatura constantes.

Portanto, quando se deseja fazer medidas termodinâmicas na cela, medindo o trabalho que ela pode realizar, deve-se garantir que ela esteja operando reversivelmente. Somente nestas condições pode-se relacionar w_e com ΔG . Essas condições são encontradas medindo o potencial da cela quando esta está balanceada por uma força exatamente oposta ao potencial, então a reação da cela ocorre reversivelmente e a composição é constante. A diferença de potencial resultante é chamada potencial da cela a zero de corrente (E) ou força eletromotriz da cela (f.e.m.).

A relação entre a reação de energia livre de Gibbs e o potencial da cela a zero de corrente é:

$$-nF \Delta E = \Delta G$$

onde F é o produto entre e^- (carga elétrica) e NA (número de Avogadro) e é chamado de Faraday ($F = 96.485 \text{ J.Mol}^{-1}.\text{volt}^{-1}$) que é a magnitude de carga por mol de elétron.

Pode-se relacionar a diferença de potencial da cela a zero de corrente com as atividades das substâncias participantes da reação da cela. A energia livre de Gibbs está relacionada com a composição da mistura pela relação:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$$



onde Q expressa a composição dos eletrodos para a reação e é dado por unitário e portanto $Q = 1$ e $\ln Q = 0$.

$$Q = \prod_j a_j^{n_j} \quad \text{ou seja,}$$

Q é o produto das atividades (elevadas ao seu respectivo coeficiente estequiométrico) dos produtos da reação, dividido pelo produto das atividades (elevadas ao seu coeficiente estequiométrico) dos reagentes.

dividindo ambos os lados por $-nF$,

$$\Delta E = \frac{-\Delta G^0}{nF} - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln Q$$

O primeiro termo do lado direito da equação é chamado potencial padrão da cela e é denotado por E^0

$$-nF\Delta E^0 = \Delta G^0$$

isto é, o potencial padrão da cela é a energia padrão de Gibbs da reação expressa como potencial. Portanto,

$$E = E^0 - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln Q$$

A diferença de potencial padrão da cela, é portanto, o potencial da cela a zero de corrente quando todos os reagentes e produtos

estão em seus estados padrão, ou seja, todas as atividades tem valor unitário e portanto $Q = 1$ e $\ln Q = 0$.

A equação acima é conhecida como equação de Nernst e é válida para diferenças de potenciais de cela a zero de corrente para qualquer composição da cela.

Como mencionado anteriormente, numa cela galvânica, cada eletrodo dá uma contribuição característica para o potencial total da cela. Desde que não é possível medir a contribuição de um único eletrodo, elegeu-se aleatoriamente o Eletrodo Normal de Hidrogênio (ENH), como tendo zero de potencial para todas as temperaturas. Dessa forma, torna-se possível medir a contribuição do potencial de um único par redox com relação ao ENH. Nesse caso, dizemos que o ENH é um eletrodo de referência. Outros eletrodos de referência que não o ENH, são frequentemente utilizados em medidas de potencial, devido à facilidade de manuseio, como por exemplo, o eletrodo de calomelano ou o eletrodo de prata/cloreto de prata. Nesse caso, todos os potenciais medidos com relação a esse outro eletrodo, devem ser convertidos com relação ao ENH (Clark, 1960).

1.8-PROPRIEDADES DE OXIDO-REDUÇÃO DE HEMOPROTEÍNAS

Da mesma forma que a afinidade da Hb por O_2 depende do equilíbrio entre as conformações desta proteína, e são reguladas por ligantes heterotrópicos, o mesmo comportamento é observado com o



potencial de oxi-redução, como se verá a seguir. Há um grande paralelismo entre as propriedades oxi-redutivas e as propriedades de ligação de O_2 a hemoproteínas.

Todas as hemoproteínas estão sujeitas a sofrer oxidação e redução reversíveis que envolvem o átomo de ferro. Porém, somente no caso de citocromos e provavelmente de catalases, a transição entre as formas reduzidas e oxidadas acompanha a funcionalidade fisiológica normal. Portanto, as proteínas transportadoras de O_2 (Hb, Mb, eritrocruorinas) funcionam exclusivamente na condição ferrosa, sendo que a forma oxidada é incapaz de se combinar com O_2 .

O equilíbrio de oxidação-redução ou equilíbrio redox de interesse, é geralmente estudado, admitindo uma reação eletroquímica reversível na interface metal inerte/ par redox, e o seu potencial é medido em relação a um eletrodo de referência.

O equilíbrio redox de um grupo simples, é dado por:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{oxidante}]}{[\text{redutor}]} \quad (21)$$

que é a equação de **Nernst**, onde:

R = constante dos gases, $R = 8,31441 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$

T = temperatura absoluta, $T = 298,15 \text{ K}$

F = constante de Faraday, $F = 96.485 \text{ J.mol}^{-1}.\text{volt}^{-1}$

n = número de elétrons simultaneamente transferidos,

E = potencial do sistema com relação ao Eletrodo Normal de Hidrogênio (E.N.H.)



E° = potencial padrão formal de redução, que é uma constante para cada eletrólito suporte, previamente escolhido e a uma dada força iônica constante, dada por E quando as concentrações do oxidante e redutor são iguais, ou seja $[\text{oxidante}] / [\text{redutor}] = 1$. Também é chamado de $E_{1/2}$.

Para hemoproteínas, o equilíbrio de oxi-redução envolve a mudança do estado de oxidação do ferro-heme, de acordo com a reação escrita para um único sítio:



onde Fe^{2+} se refere à hemoproteína no estado ferroso e Fe^{3+} ao estado férrico.

A pH constante a equação acima pode ser escrita como:

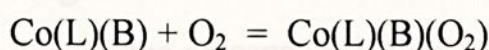
$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]} \quad (23)$$

Os primeiros experimentos de equilíbrio de oxi-redução com hemoproteínas, foram feitos com Hb eqüina e canina, a 30°C e com a proteína dissolvida em solução de uréia 4M, onde as moléculas se separam em duas partes iguais (split). O intervalo de pH estudado foi de 6,23 a 7,67. (Taylor e Hastings, 1939). Nesse caso, define-se $\bar{Y}$ como a fração de oxidação da proteína com o ligante, $\bar{Y} = [\text{Fe}^{3+}] / ([\text{Fe}^{3+}] + [\text{Fe}^{2+}])$. O gráfico da porcentagem de oxidação da Hb em função do potencial medido, mostrou que a qualquer pH, o equilíbrio redox era indistinguível do equilíbrio de oxigenação, a curva de porcentagem de

oxidação em função de E era simétrica com a variação do pH e o valor de n encontrado variava de 1,9 a 2,0 . Pensando em termos do conceito clássico de oxidação orgânica, que envolve a transferência simultânea de 2 elétrons, o autor concluiu de seus dados, que a molécula de hemoglobina separada continha dois grupos hemes oxidáveis, correspondendo a um valor exato de $n = 2$; entretanto, um gráfico cuidadoso de $\log [\text{oxi}] / [\text{red}]$ mostrou que, na realidade , n tinha um valor significativamente menor do que 2 (Wyman, 1964). Wyman notou posteriormente que esses resultados, eram uma evidência de que na molécula de hemoglobina intacta, os hemes ocorriam em pares idênticos com interações fortes (da ordem de 5 Kcal) entre os membros do mesmo par e, portanto, n era um índice dessas interações, exatamente como ocorria na oxigenação. Portanto, estabeleceu-se um paralelismo entre os dois fenômenos e uma correlação entre $\log(pO_2)$ e EF/RT .

Alguns autores (Antonini e Brunori, 1971) compararam os potenciais de oxi-redução de várias Hbs, normal e modificadas, com os potenciais de oxi-redução calculados das diferenças observadas em $\log p_{1/2}(O_2)$, usando a relação $E_{1/2} = (2,303 RT/F) \log p_{1/2}(O_2)$ e encontraram valores muito similares na maioria dos casos, sugerindo que os mecanismos que controlam os dois processos são os mesmos. Antonini *et al*, (1963b) e Perutz, (1949 e 1969); mostraram que as conformações de ferri-hemoglobina e oxi-hemoglobina são similares.

Constantes de equilíbrio foram também determinadas para reações de O_2 com complexos de cobalto (II), em diferentes meios.



Para uma dada base de cobalto(II) quelatada $[\text{Co(L)}]$, foi encontrada uma correlação linear entre K_{O_2} e a facilidade de oxidação do Co(II) para Co(III), quando a base B varia. (Basolo *et al.*, 1975). Quanto mais facilmente o centro metálico Co(II) pode ser oxidado, maior é a afinidade por O_2 (Figura 7).

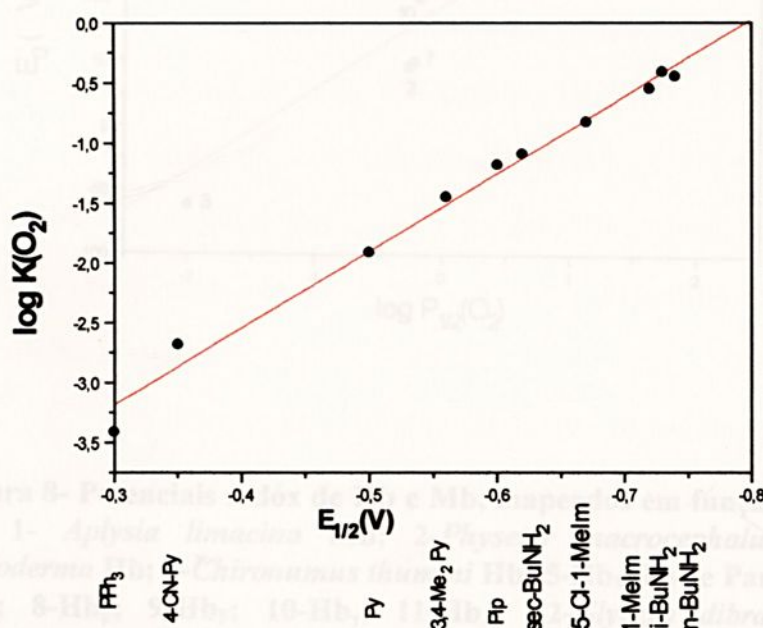


Figura 7- Comparação entre $\log (K_{\text{O}_2})$ a 21°C para $\text{Co}(\text{bezacen})\text{B}$ com potenciais polarográficos ($E_{1/2}$) para $\text{Co}^{\text{II-III}}(\text{bezacen})\text{B}_2$, onde B = PPh_3 ; CNpy; py; 3,4-lutidina; piperidina; sec-BuNH₂; 5-Cl-N-Melm; i-BuNH₂; n-BuNH₂. Bezacen = íon benzoilacetilacetionato; PPh_3 = trifenilfosfato; py = piridina; e, Bu = butil. Extraído de Basolo *et al*, 1975.

A mais forte evidência desse paralelismo, porém, foi mostrada através de um mapeamento de potenciais redox de mioglobinas e hemoglobinas em função da afinidade por oxigênio (Addison e Burman, 1985), como se observa na Figura 6. Tomando-se a inclinação (66 ± 16 mV) da regressão através dos pontos da espécie 1 até a espécie 12 [$E_{1/2}$

$= 96 + 66 \log (pO_2)_{1/2}$], nota-se que esse valor não difere muito do valor obtido através da relação $E_{1/2} = E^* + [RT/nF] \ln (pO_2)_{1/2}$ (onde E^* se refere a um heme arbitrário com $(pO_2)_{1/2} = 1$ Torr), que é de 59 mV.

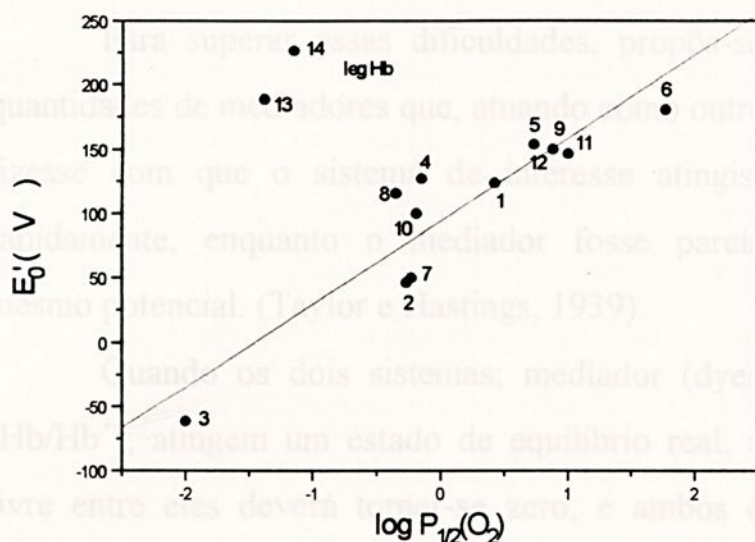


Figura 8- Potenciais redóx de Hb e Mb, mapeados em função da afinidade por O₂. 1- *Aplysia limacina* Mb; 2-*Physeter macrocephalus* Mb; 3-*Candida mycoderma* Hb; 4-*Chironomus thummi* Hb; 5-Hb_M Hyde Park; 6-Hb_M Iwate; 7-Hb_α; 8-Hb_β; 9-Hb_F; 10-Hb_γ; 11-Hb_A; 12-*Glycera dibranchiata* Hb_m; 13-Leghemoglobin-a e 14-Leghemoglobin-c. Adaptado de Addison e Burman, 1985.

CONDIÇÕES NECESSÁRIAS AO ESTABELECIMENTO DO EQUILÍBRIO DE OXI-REDUÇÃO DE HEMOPROTEÍNAS

Todos os investigadores que trabalharam com sistemas de Hb experimentaram dificuldades na obtenção de potenciais estáveis dentro de um intervalo de tempo razoável, devido ao fato de que o eletrodo demorava muito tempo para atingir o equilíbrio com o sistema. O longo

período necessário para obter leituras constantes de potencial (2 ou 3 horas) levava à decomposição das espécies presentes e também impedia que se obtivesse um número suficientemente grande de pontos na curva de titulação, dificultando a caracterização correta do sistema.

Para superar essas dificuldades, propôs-se o uso de pequenas quantidades de mediadores que, atuando como outro par redox reversível, fizesse com que o sistema de interesse atingisse o equilíbrio mais rapidamente, enquanto o mediador fosse parcialmente reduzido no mesmo potencial. (Taylor e Hastings, 1939).

Quando os dois sistemas; mediador (dye/dye^+) e hemoglobina (Hb/Hb^+); atingem um estado de equilíbrio real, a variação de energia livre entre eles deverá tornar-se zero, e ambos deverão ter o mesmo potencial para as condições usadas.

Como toda a dependência de se estabelecer um potencial de eletrodo estável é colocada no mediador, é importante que se faça uma seleção cuidadosa desse sistema. Além disso, o mediador deve apresentar uma concentração muito menor do que a da hemoglobina, de modo que o volume do titulante gasto na oxidação do mediador seja desprezível comparado com o empregado na oxidação de Hb/Hb^+ .

2. OBJETIVOS DESTE TRABALHO

Estudos recentes de oxigenação de hemoglobina humana (HbA_0), na presença de solutos neutros tais como glucose, sacarose, frutose, etc., demonstraram que a diferença de hidratação entre as



conformações alostéricas R e T, é um fator importante no controle da função dessa proteína (Colombo *et al.*, 1992).

Com base nesses trabalhos, pareceu-nos interessante utilizarmos medidas de $E_{1/2}$ como uma alternativa para o aprofundamento do estudo do efeito da solvatação no controle do mecanismo alostérico da HbA₀, uma vez que este mecanismo também parece controlar o potencial de oxi-redução de cada átomo de ferro contido no tetrâmero desta macromolécula. A fim de confirmar esse mecanismo, fizemos como contra-prova medidas de potencial de óxido- redução da mioglobina eqüina, cujas características de oxigenação não estão sujeitas ao controle de água como um efetor alostérico (Colombo *et al.*, 1992).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Hemoglobina humana, HbA₀, foi purificada por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex com gradiente de pH e desionizada em coluna de troca iônica mista AMBERLITE MB-1 (SIGMA). Mioglobina de cavalo, adquirida da USB, foi dissolvida em água destilada e filtrada. A concentração de HbA₀ (por heme) em todas as medidas ficou em torno de 100 μ M, e a de Mb eqüina em torno de 150 μ M, ambas determinadas espectrofotometricamente. Todos os reagentes empregados foram de pureza analítica.

As medidas de potencial elétrico foram feitas de duas maneiras diferentes:



1- Desoxi-Hb (no caso da Hb) ou meta-Mb (no caso da Mb) contidas numa cela de vidro hermeticamente fechada com tionina como agente mediador em concentrações que não ultrapassaram 4% da concentração das proteínas, fosfato de sódio e potássio 0,1M como tampão e NaCl 0,1M ; foram tituladas com a adição de agentes oxidante e redutor, respectivamente.

2- A medida de potencial de oxido-redução $E_{1/2}$ para a Hb foi também realizada numa solução contendo igual concentração de desoxi e meta hemoglobina. O potencial medido nesta solução corresponde ao $E_{1/2}$, pois 50% da Hb está oxidado e 50% está reduzido. Utilizando esse procedimento, a dependência de $E_{1/2}$ com a concentração de sacarose pode ser determinada da seguinte forma: alíquotas dessa solução, que estava a uma concentração alta de sacarose, eram retiradas e alíquotas de uma segunda solução, nas mesmas condições porém sem sacarose, eram acrescentadas, de modo que pudessemos medir o $E_{1/2}$ a medida que a concentração de sacarose diminuía na cela de medida. As alíquotas retiradas foram usadas para aferir espectrofotometricamente as concentrações da Hb oxidada e reduzida, o pH da solução e para medir a osmolalidade.

Todos os experimentos foram feitos sob atmosfera inerte, mantida com um fluxo de N_2 pré lavado em solução de NaOH 2M passando pela amostra e pela solução do titulante ($K_3Fe(CN)_6$ 5mM para a Hb e $Na_2S_2O_4$ 5mM para a Mb) nas medidas descritas no item 1. Ambos, amostra e titulante, foram mantidos sob agitação constante. A cela foi termostatzada a 30°C com banho térmico Neslab mod. RTE 111.



Nas medidas descritas no item 2, as duas soluções de Hb também foram termostatzadas, mantidas sob atmosfera inerte e agitação constante.

O potencial foi medido empregando-se como eletrodos de trabalho e de referência, fio de platina e calomelano saturado, respectivamente, conectados a um pHmetro/analizador de íons Corning mod.350. Os potenciais medidos foram convertidos usando como referência o potencial do Eletrodo Normal de Hidrogênio ($E = 0,238$ volts).

A osmolalidade das soluções foi variada pela adição de sacarose (adquirida da SIGMA e GIBCO) e medida com um osmômetro Osmette mod. 5002. As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis, Varian Cary-3.

Um esquema do aparato utilizado nas medidas descritas no item 1 é mostrado na figura 9.

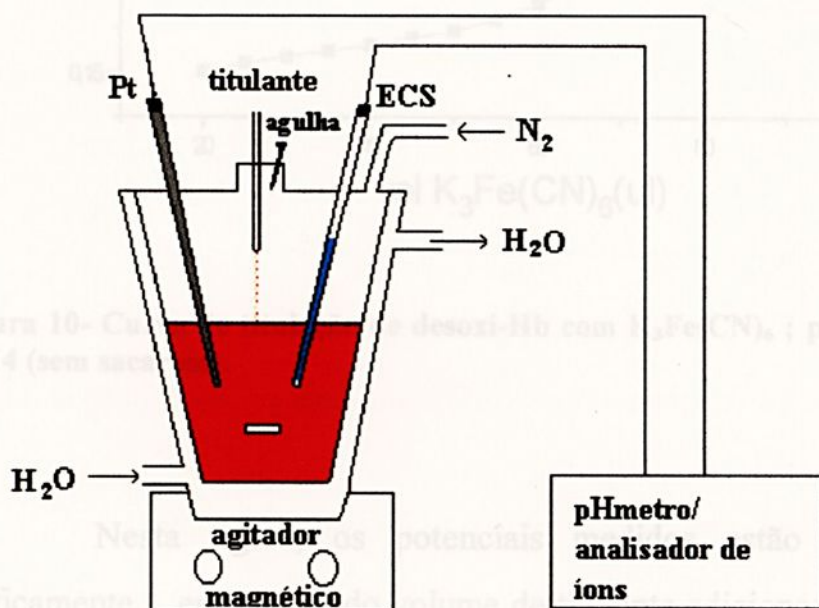


Figura 9- Diagrama esquemático do aparato utilizado nas medidas de potencial de oxi-redução de Hb e Mb para as medidas descritas no item 1.

4. RESULTADOS

A- Titulação de desoxi-hemoglobina com ferricianeto de potássio, em 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6,9 e T = 30°C.

A figura 10 mostra uma curva típica de titulação de desoxi-Hb com $K_3Fe(CN)_6$ (titulante), na ausência de sacarose.

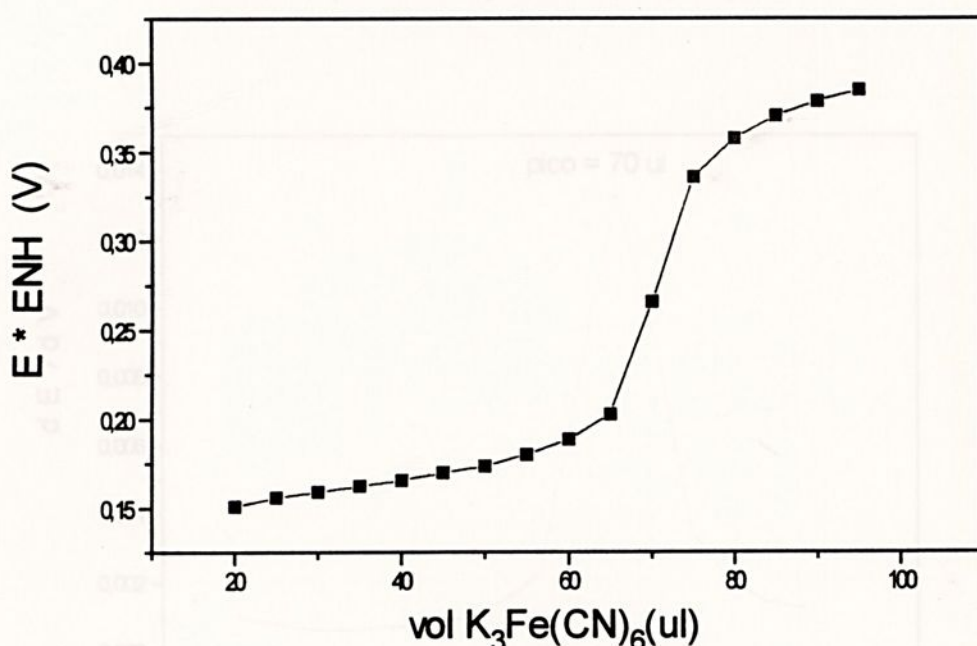


Figura 10- Curva de titulação de desoxi-Hb com $K_3Fe(CN)_6$; pH = 6,9; Osm = 0,414 (sem sacarose).

Nesta figura, os potenciais medidos estão representados graficamente em função do volume de titulante adicionado. O início da curva de titulação, até a adição de $\sim 65 \mu l$ de titulante, corresponde ao potencial do par desoxi/meta Hb. Depois disso, o potencial que está

sendo medido sofre um aumento brusco. Nessa região, se encontra o ponto de equivalência (p_e), que corresponde justamente ao volume de titulante necessário para oxidar toda a desoxi-Hb. A partir daí, o potencial medido corresponde ao do par redox do titulante (ferro/ferri cianeto de potássio). O ponto de equivalência foi determinado graficamente usando o pico da primeira derivada da curva de titulação, que é mostrado na figura 11, onde o ponto de equivalência se deu quando foram adicionados 70 μl de solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

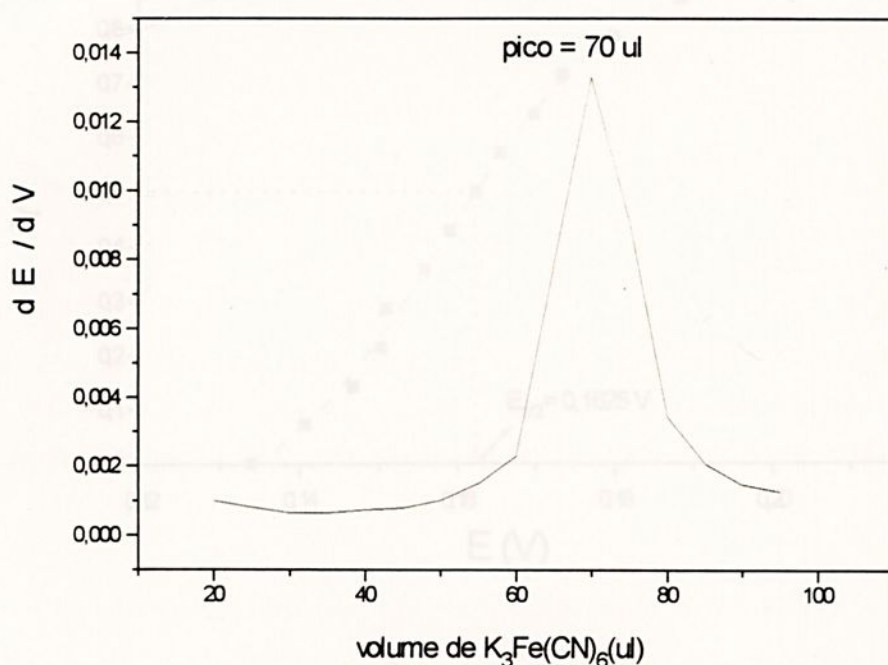


Figura 11- Primeira derivada, obtida com os dados da figura anterior.

Uma vez determinado o volume do ponto de equivalência, V_{p_e} , pode-se calcular a fração de Hb oxidada, $\bar{Y}$, em cada ponto da titulação, dado que

$$V_{p_e} * [\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]_{\text{estoque}} = [\text{Hb}]_{\text{total}}$$

$$V_E * [K_3Fe(CN)_6]_{\text{estoque}} = [Hb]_{\text{oxidada em E}} \quad \text{e, portanto,}$$

$$\bar{Y}(E) = [Hb]_{\text{oxidada em E}} / [Hb]_{\text{total}} = V_E / V_{pe}$$

onde V_E é o volume total de solução de titulante adicionado para cada potencial medido.

Com os valores de $\bar{Y}$ podemos construir dois gráficos típicos. O primeiro deles é o gráfico da fração oxidada em função do potencial medido mostrado na figura 12.

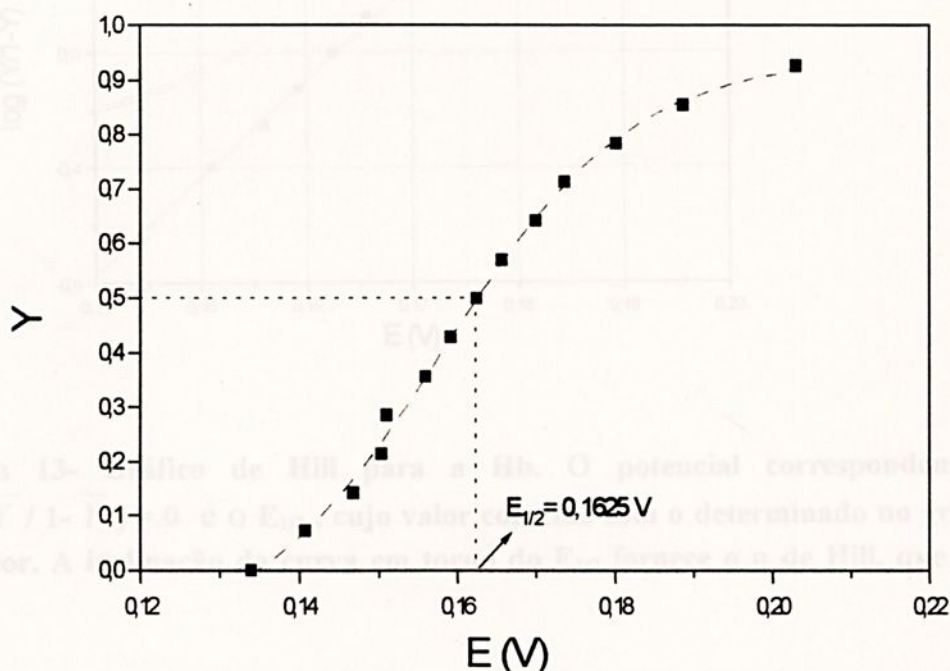


Figura 12- Gráfico da fração de oxidação da Hb em função do potencial de oxirredução medido. O potencial correspondente a 50% de oxidação nos fornece o valor de $E_{1/2}$ que é de 0,1625 volts.

O comportamento da curva acima é sigmoide, indicando que a oxidação e a redução da Hb segue um comportamento cooperativo, como

o observado na oxigenação dessa proteína. Essa cooperatividade é confirmada quando os dados experimentais são analisados por um segundo gráfico, o gráfico de Hill, que é apresentado na figura 13.

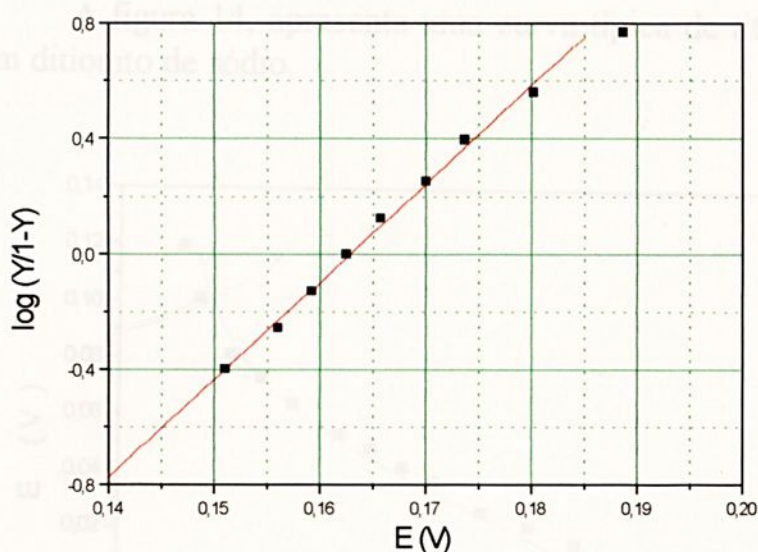


Figura 13- Gráfico de Hill para a Hb. O potencial correspondente a $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y}) = 0$ é o $E_{1/2}$, cujo valor coincide com o determinado no gráfico anterior. A inclinação da curva em torno do $E_{1/2}$ fornece o n de Hill, que é de 2,04.

O gráfico de Hill nos fornece dois parâmetros importantes. Um deles é o potencial de oxi-redução $E_{1/2}$ que corresponde ao potencial medido quando $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y}) = 0$, ou seja quando a proteína está 50% no estado oxidado e 50% no estado reduzido. Esse valor está em boa concordância com o descrito na literatura ($E_{1/2} = 0,150$ V, pH 7, 30°C, Antonini *et al*, 1964). O outro é o n de Hill, que indica a existência ou não de interações entre os grupos heme, determinado pela inclinação da curvas de titulação da Mb foram ajustadas com a equação de Nernst

reta multiplicado por RT/F . O valor encontrado de $n = 2,04$, confirma a cooperatividade do sistema.

B- Titulação de meta mioglobina com ditionito de sódio, em 100mM de tampão fosfato de sódio, pH 7 e $T = 30^{\circ}\text{C}$.

A figura 14, apresenta uma curva típica de titulação de meta-Mb com ditionito de sódio.

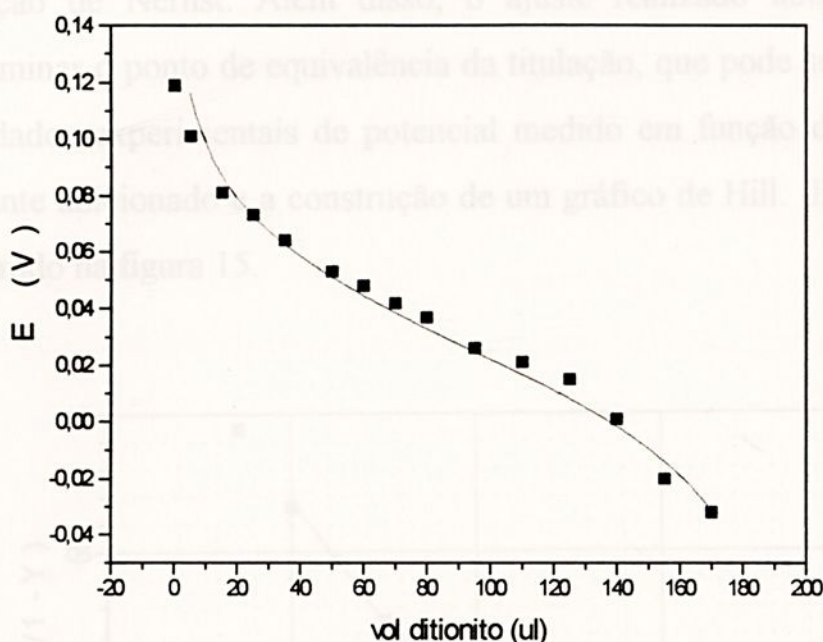


Figura 14- Titulação de meta-Mb com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,0; $T = 30^{\circ}\text{C}$, sem sacarose; $\text{osm} = 0.389$.

A curva acima foi ajustada pela equação de Nernst. Devido ao fato do ditionito de sódio reagir com o oxigênio, tanto durante sua armazenagem como na preparação da solução so titulante, a concentração equivalente do redutor é difícil de ser determinada. Por esse motivo, as curvas de titulação da Mb foram ajustadas com a equação de Nernst:

$$E = P_1 + \frac{RT}{\mathcal{F}} \times \ln \left[\frac{V + v}{P_2 \times v} - 1 \right],$$

onde P_1 e P_2 correspondem a $E_{1/2}$ e concentração de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ respectivamente, e são os parâmetros ajustáveis.

A fração de saturação $\bar{Y}$ em função do potencial fica, então, diretamente determinada com a determinação destes parâmetros pela equação de Nernst. Além disso, o ajuste realizado também permite determinar o ponto de equivalência da titulação, que pode ser comparado aos dados experimentais de potencial medido em função do volume de titulante adicionado e a construção de um gráfico de Hill. Esse gráfico é mostrado na figura 15.

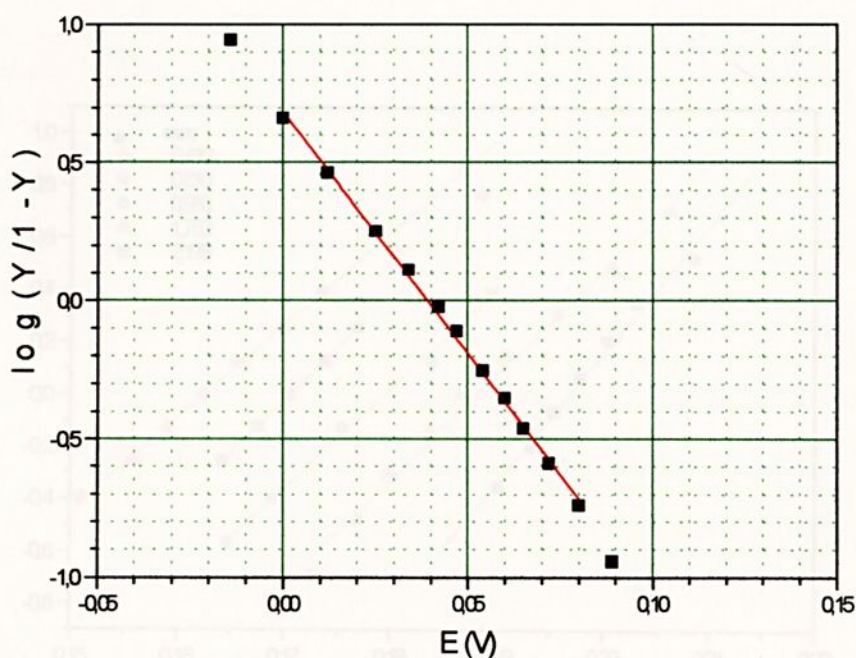


Figura 15- Gráfico de Hill para a Mb. O valor do $E_{1/2}$ encontrado foi de 0,039 volts.

Nota-se que existe uma boa linearidade através dos pontos experimentais. O valor de $E_{1/2}$, 0,039 volts, encontra-se em concordância com o valor descrito na literatura ($E_{1/2} = 0,05$ volts, pH 7, $T = 30^\circ$) (Cassatt *et al*, 1975).

EFEITO DE SACAROSE NO $E_{1/2}$ DA HEMOGLOBINA

Com o objetivo de se estudar o efeito de um soluto neutro, e consequentemente da atividade de água, no potencial de oxi-redução da Hb, foram feitas diversas medidas de $E_{1/2}$ com concentrações crescentes de sacarose. Inicialmente, estas medidas foram feitas com o titulante $K_3Fe(CN)_6$. A figura 16, mostra gráficos de Hill a diferentes concentrações de sacarose, expressas em osmolalidades das soluções.

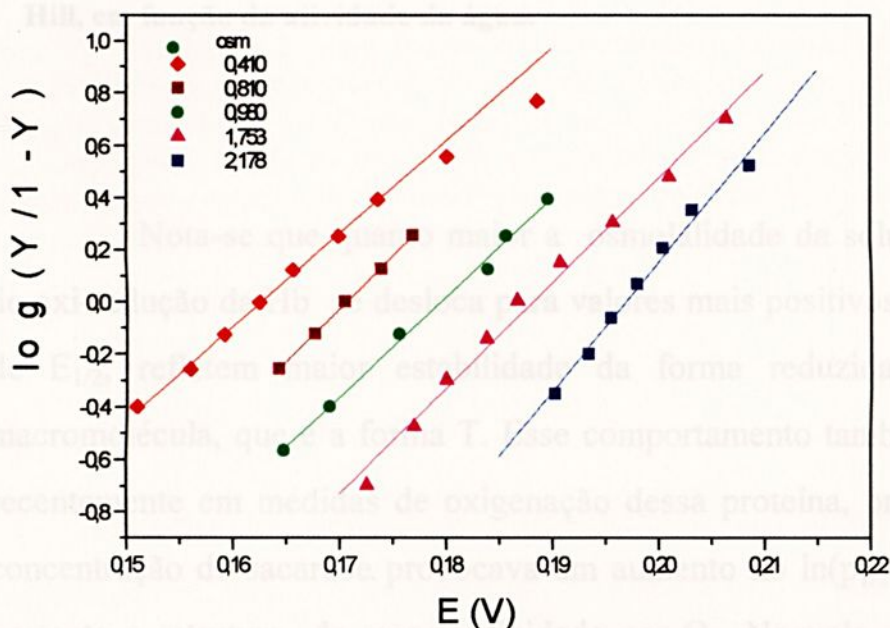


Figura 16- Gráfico de Hill à diferentes osmolalidades da solução. $E_{1/2}$ varia de 0,1625 a 0,1970 volts. Tampão fosfato de sódio 100mM, pH 6,9 e $T=30^\circ\text{C}$.

Na tabela 1 são mostrados os valores de $E_{1/2}$ e os n de Hill, determinados nas diversas osmolalidades, onde $\ln(a_w) = -\text{osm} / 55,5$.

OSM	$E_{1/2}$ (V)	$\ln(a_w)$	n de Hill
0.414	$0.1628 \pm 0,004$	-0.0075	1,76
0.810	$0.1707 \pm 0,006$	-0.0146	2,40
0.980	$0.1795 \pm 0,012$	-0.0176	2,27
1.753	$0.1871 \pm 0,013$	-0.0316	2,81
2.178	$0.1970 \pm 0,010$	-0.0392	2,95

Tabela 1 - Dependência do potencial de oxi-redução da HbA₀ e do coeficiente de Hill, em função da atividade da água.

Nota-se que quanto maior a osmolalidade da solução, o potencial de oxi-redução da Hb se desloca para valores mais positivos. Valores maiores de $E_{1/2}$, refletem maior estabilidade da forma reduzida (desoxi-Hb) da macromolécula, que é a forma T. Esse comportamento também foi observado recentemente em medidas de oxigenação dessa proteína, onde o aumento da concentração de sacarose provocava um aumento no $\ln(p_{1/2}O_2)$, estabilizando portanto a estrutura de menor afinidade por O_2 . Naquela oportunidade, este efeito foi analisado via a relação entre $\ln(p_{1/2}O_2)$ e $\ln(a_w)$ (Colombo *et al*, 1992, 1994, 1996). Análise equivalente é apresentada nas figuras 17 e 18.



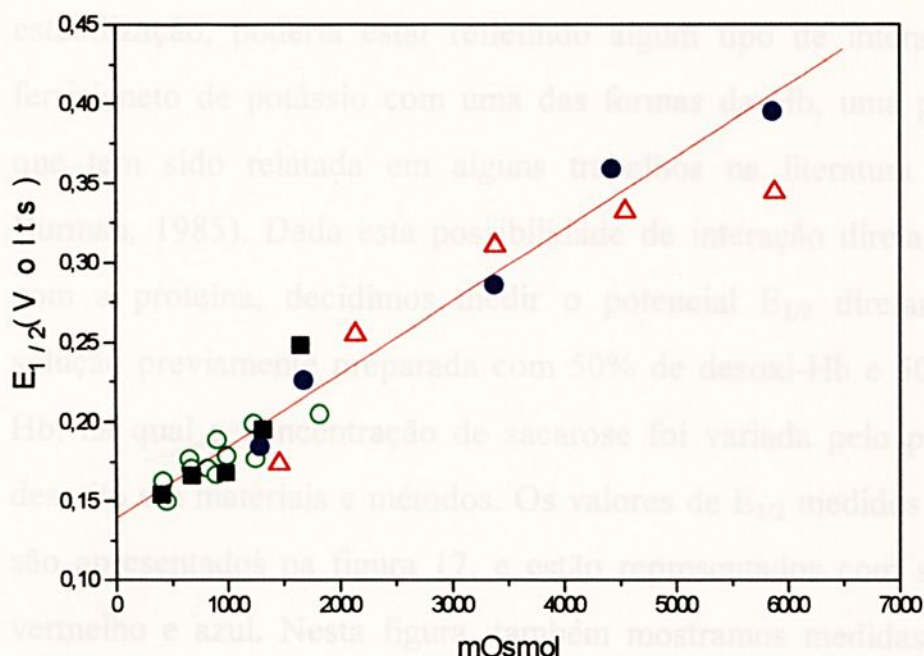


Figura 17- Gráfico de $E_{1/2}$ em função da osmolalidade da solução(mili osmol), onde os círculos verdes foram obtidos de titulações com $K_3Fe(CN)_6$; os triângulos vermelhos e os círculos azuis, de medidas diretas de $E_{1/2}$ em soluções de concentrações iguais de desoxi-Hb e meta-Hb; e os quadrados pretos, de titulação de uma solução de concentrações iguais de desoxi-Hb e meta-Hb com sacarose. Tampão fosfato de sódio, pH 7, T = 30°C.

Na figura 17, mostramos a dependência de $E_{1/2}$ em função da concentração de sacarose, expressa em concentração osmolal. Os valores de $E_{1/2}$ foram determinados de três formas distintas. Os círculos verdes correspondem à titulação da Hb com ferricianeto de potássio. Desde os

primeiros experimentos feitos dessa forma, notamos que com o aumento da concentração de sacarose ($\text{osm} > 1,2$) existia uma tendência do potencial medido atingir um patamar em torno de 200 mV. Esta possível estabilização, poderia estar refletindo algum tipo de interação entre o ferricianeto de potássio com uma das formas da Hb, uma possibilidade que tem sido relatada em alguns trabalhos na literatura (Addison e Burman, 1985). Dada esta possibilidade de interação direta do titulante com a proteína, decidimos medir o potencial $E_{1/2}$ diretamente numa solução previamente preparada com 50% de desoxi-Hb e 50% de meta-Hb, na qual a concentração de sacarose foi variada pelo procedimento descrito em materiais e métodos. Os valores de $E_{1/2}$ medidos desta forma são apresentados na figura 17, e estão representados com símbolos em vermelho e azul. Nesta figura, também mostramos medidas de $E_{1/2}$ em solução 50% de desoxi-Hb / 50% de meta-Hb em tampão, que foi titulada com sacarose. Estes dados estão representados por símbolos pretos.

Observa-se, que existe uma boa correlação linear entre os valores de $E_{1/2}$ com a osmolalidade da solução, determinados pelos diferentes métodos. Esta linearidade indica que o sistema é reversível, visto que as primeiras medidas de 50%/50% de cada espécie, foram feitas com concentrações decrescentes de sacarose, enquanto que a última foi feita no sentido inverso.

A figura 18, mostra um gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\ln(a_w)$.



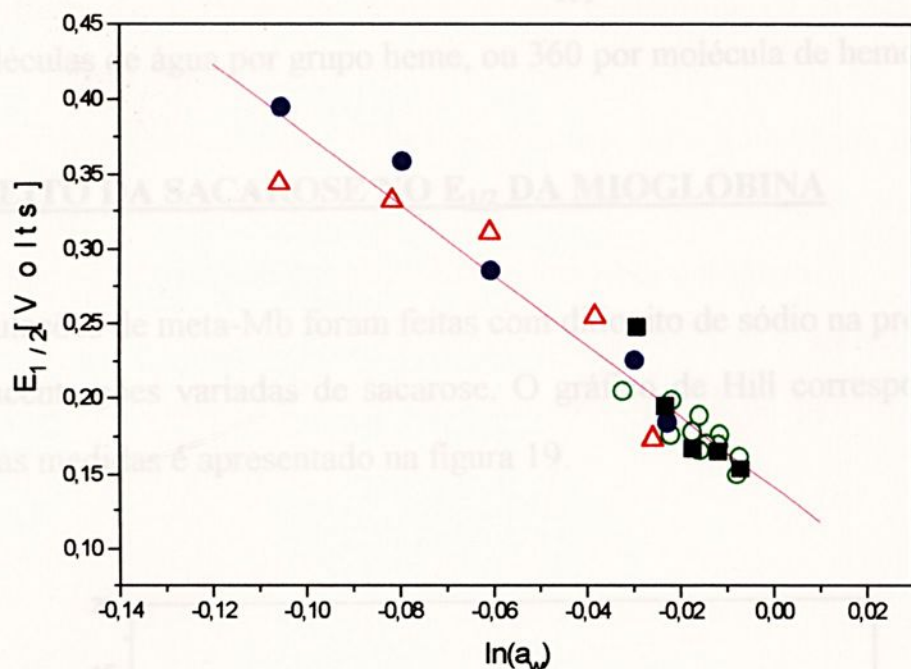


Figura 18- Gráfico de potencial redox da Hb em função da atividade de água. Os símbolos verdes correspondem à titulação de desoxi-Hb com $K_3Fe(CN)_6$; os símbolos vermelhos e azuis correspondem à medida de $E_{1/2}$ de uma solução contendo 50% de desoxi-Hb e 50% de meta-Hb; os símbolos pretos correspondem à titulação de 50% de desoxi-Hb e 50% de meta-Hb com solução de sacarose. Tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7, T = 30°C.

Face à essa linearidade, temos condições de estimar o número de moléculas de água que estão envolvidas no processo redox, utilizando para isso uma equação de “linkage” análoga àquela usada para estimar a variação de hidratação no processo de oxigenação, ou seja

$$\frac{\mathcal{F}}{RT} \frac{\partial E}{\partial \ln(a_w)} = -(n_{H_2O}^{oxidado} - n_{H_2O}^{reduzido}).$$

A inclinação da curva da figura 18,

corresponde à $\frac{dE}{d\ln(a_w)} = 2,35 \pm 0,124$, com um coeficiente de correlação

de 0,97. Esse valor multiplicado por $\frac{\mathcal{F}}{RT}$ nos fornece um $\Delta n_w = 90$ moléculas de água por grupo heme, ou 360 por molécula de hemoglobina.

EFEITO DA SACAROSE NO $E_{1/2}$ DA MIOGLOBINA

Titulações de meta-Mb foram feitas com ditionito de sódio na presença de concentrações variadas de sacarose. O gráfico de Hill correspondente à essas medidas é apresentado na figura 19.

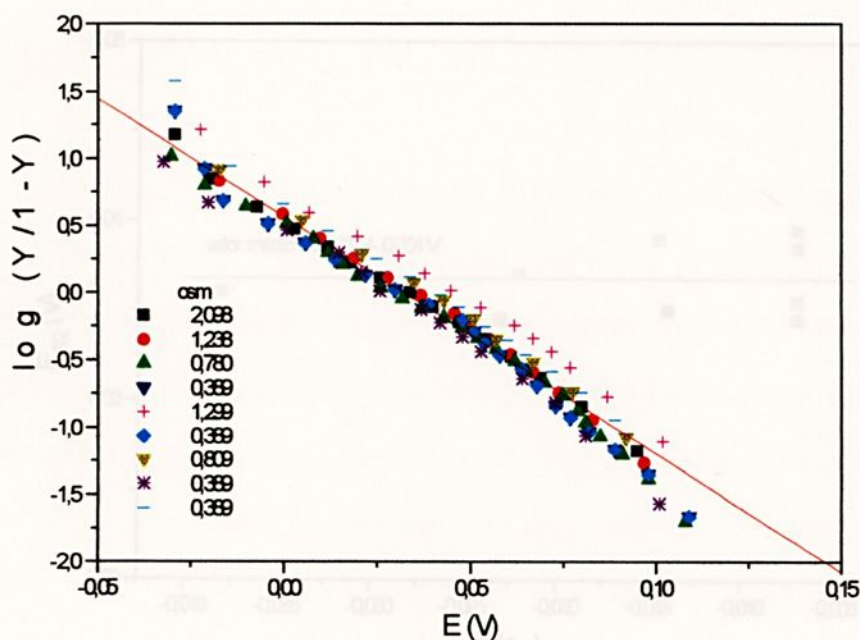


Figura 19- Gráfico de Hill para titulações de meta-Mb com ditionito de sódio, na presença de variadas concentrações de sacarose.

Notamos que existe uma superposição entre as curvas de Hill determinadas às diversas osmolalidades entre os valores de 0,389 e 2,098. Este resultado difere substancialmente daquele apresentado na figura 16, página 43, onde mostramos o gráfico de Hill para a oxidação da Hb à diversas osmolalidades. Naquele caso, $E_{1/2}$ varia cerca de 30 mV para uma variação de osmolalidade equivalente àquela mostrada no gráfico da figura 19. Neste intervalo de variação de osmolalidade, o potencial de oxi-redução da Mb permaneceu praticamente constante.

Valores de $E_{1/2}$ determinados à diferentes osmolalidades, ou equivalentemente, à diferentes atividades de água para a mioglobina, estão mostrados na figura 20.

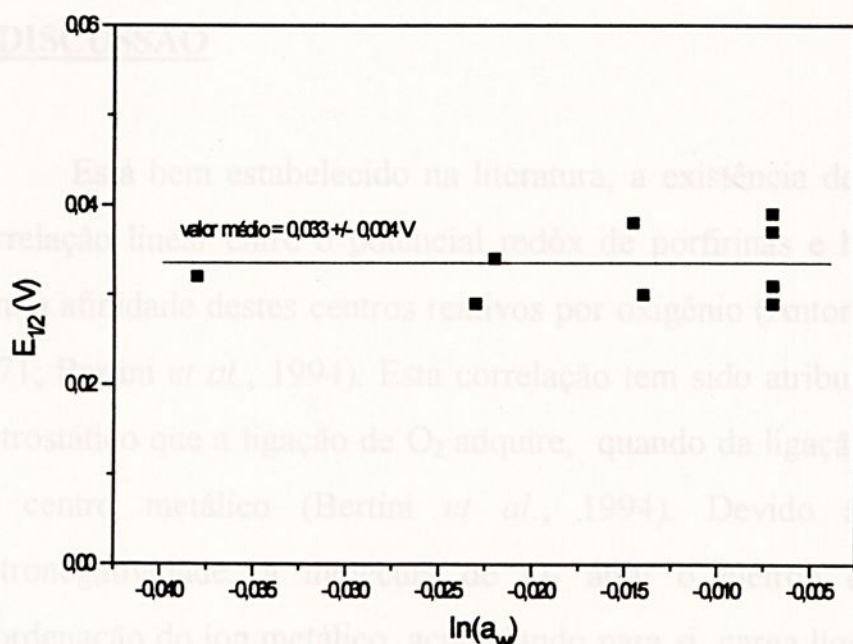


Figura 20- Gráfico de $E_{1/2}$ em função do logaritmo da atividade de água para a mioglobina.

As diferenças nos valores de $E_{1/2}$ encontram-se dentro do erro experimental. Portanto, podemos afirmar que, o $E_{1/2}$ no caso da

mioglobina, não varia significativamente com a variação da osmolalidade da solução. O valor médio dos potenciais medidos às várias osmolalidades é de $0,033 \pm 0,004$ V.

Um outro aspecto a ser notado, é que os coeficiente de Hill (n) determinados são unitários em todos os experimentos, refletindo uma reação de oxi-redução que envolve um único elétron.

A independência de $E_{1/2}$ com $\ln(a_w)$ para a Mb, contrasta, como já observamos, com a dependência entre estas variáveis observadas para a Hb, e reafirma a importância do controle alostérico da oxi-redução exercido por esta última proteína.

5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido na literatura, a existência de uma estreita correlação linear entre o potencial redox de porfirinas e hemoproteínas com a afinidade destes centros reativos por oxigênio (Antonini e Brunori, 1971; Bertini *et al.*, 1994). Esta correlação tem sido atribuída ao caráter eletrostático que a ligação de O_2 adquire, quando da ligação do oxigênio ao centro metálico (Bertini *et al.*, 1994). Devido à sua maior eletronegatividade, a molécula de O_2 atrai o elétron da esfera de coordenação do íon metálico, acumulando para si, carga líquida negativa. Aparentemente, quanto menor for o potencial redox do centro metálico, maior será a facilidade do elétron ser deslocado em direção ao O_2 , aumentando portanto, sua afinidade de ligação.

No caso de hemoproteínas alostéricas, a afinidade do O_2 pelo ferro do grupo heme é dependente do grau de saturação da proteína,

devido às interações heme-heme, que são moduladas pelo equilíbrio entre distintas conformações quaternárias da macromolécula. Este mecanismo possibilita, por exemplo, a ligação cooperativa do O_2 à hemoglobina, onde a afinidade pelo O_2 aumenta com a saturação da proteína.

Face à correlação entre a afinidade do oxigênio e o potencial de oxi-redução, espera-se que a reação redóx também apresente cooperatividade para hemoproteínas alostéricas, tais como a hemoglobina humana, e não apresente cooperatividade para hemoproteínas monoméricas, como a mioglobina de coração de cavalo. Nossas medidas de potencial de oxi-redução destas duas proteínas demonstram estas características, quando analisamos a dependência da fração de heme oxidado com o potencial medido, na forma de gráficos de Hill. A inclinação do gráfico de $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y})$ em função de E, obtido para a HbA₀ e mostrado na figura 13, corresponde à $n \sim 2$. Como já comentado na página 24, este n , que na equação de Nernst significa número de elétrons transferidos na reação, passa a representar no caso do sistema Hb/Hb⁺, um índice das interações intramoleculares, ou seja, a cooperatividade do sistema.

Por outro lado, a inclinação da curva do gráfico de Hill para a mioglobina, correspondeu a um $n = 1$. Neste caso, como não existe cooperatividade na oxi-redução da mioglobina, o equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida desta proteína, segue exatamente a equação de Nernst, com $n = 1$. Este comportamento também é concordante com dados publicados na literatura, para várias Mbs e cadeias isoladas de Hb (Antonini e Brunori, 1971; Banerjee e Cassoly, 1969).

Esta característica do equilíbrio redox da Mb pode ser apreciada em diversas medidas do equilíbrio de oxi-redução da meta-Mb por



titulação com ditionito de sódio, à diversas concentrações de sacarose. Todos os conjuntos de dados, foram bastante bem ajustados com a equação de Nernst com $n = 1$. Um exemplo de quão bom é esse ajuste, é mostrado na figura 19.

Os valores de $E_{1/2}$ e os de n determinados para a Hb e a Mb, em tampão fosfato de sódio 100mM, à 30°C e a pH 7,0 obtidos neste trabalho, encontram-se em boa concordância com os valores que estão na literatura, obtidos em condições experimentais semelhantes (Antonini *et al.*, 1964; Cassatt *et al.*, 1975).

O fato da reação redóx da Hb ser cooperativa, faz com que suas características oxi-redutivas também sejam moduladas pelos mesmos efetores que regulam o transporte de oxigênio, como prótons e DPG, por exemplo. O efeito da ligação preferencial destes efetores à conformação da desoxi-Hb (T) sobre $E_{1/2}$ e n , tem sido bastante estudada (Antonini *et al.*, 1964; Santuci *et al.*, 1984). Neste trabalho, apresentamos o efeito da diminuição da atividade da água, pela adição de diversas concentrações de sacarose na solução, sobre $E_{1/2}$ e n da Hb e Mb.

Nossas medidas com Mb demonstraram que o potencial de oxirredução desta proteína é insensível, dentro do erro experimental, às variações da atividade da água, promovidas pela adição de até 1,5 molal de sacarose à solução. Visto que a mudança na atividade de água sonda as diferenças de hidratação proteica entre as conformações proteicas envolvidas na reação, o fato de $E_{1/2}$ não variar com a atividade de água indica que as estruturas desoxi-Mb e meta-Mb, não diferem significativamente. Este resultado é concordante com os dados de difração de Raios-X destas duas espécies, que mostram que não existem diferenças estruturais significativas entre elas. Também a afinidade da Mb



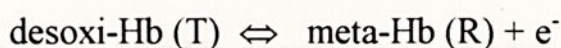
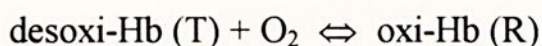
por O_2 é insensível à mudanças na atividade de água (Colombo *et al.*, 1992). Este dado revela que para a Mb, o paralelismo entre $E_{1/2}$ e $\ln(p_{1/2}O_2)$ é mantido em relação à mudanças no potencial químico da água.

O potencial redox da hemoglobina, entretanto, apresenta uma susceptibilidade muito grande à adição de sacarose à solução e à mudanças no potencial químico da água. Como pode ser observado na figura 16, o potencial redox do par desoxi-Hb/meta-Hb, aumenta linearmente com a concentração de sacarose e consequente diminuição do potencial químico da água. Dois aspectos devem ser notados. O primeiro é que o aumento de $E_{1/2}$ com a adição de sacarose, implica na estabilização do estado funcional da Hb, ou seja, o estado ferroso. Este resultado pode ter uma aplicação importante na melhoria das condições de preparo e armazenamento de hemoglobinas. Há muito tempo sabe-se que sacarose e outros açúcares e polióis promovem a estabilização de enzimas protegendo-as contra a desnaturação (Yancey *et al.*, 1982; Santoro *et al.*, 1992; Lee e Timasheff, 1981). Por este motivo, estes solutos, conhecidos por osmólitos (Yancey *et al.*, 1982), tem sido popularmente adicionados à soluções de proteínas durante sua estocagem. Porém, parece-nos que a possibilidade de açúcares promoverem a estabilização do estado de oxidação de hemoglobinas, como demonstram nossas medidas, ainda não foi relatada.

O segundo aspecto notável revelado pelo gráfico da figura 18, é que o aumento do potencial redox da Hb varia linearmente com a atividade de água. Este resultado nos permite sugerir que o mecanismo para a estabilização do estado ferroso da desoxi-Hb em relação ao estado férrico (oxidado) da meta-Hb, está relacionado à menor hidratação do



primeiro estado em relação ao segundo. Este mecanismo é equivalente àquele proposto para explicar o decréscimo da afinidade da Hb por oxigênio com a diminuição da atividade de água. Estas duas reações envolvem a transição entre os estados conformacionais T e R, representados abaixo:



Esta transição conformacional, é caracterizada pela exposição de superfície proteica ao solvente, devido à rotação do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao dímero $\alpha_2\beta_2$ e à variações nos contatos $\alpha_1\alpha_2$ (Chothia *et al.*, 1976; Janin e Wodak, 1985; Lesk *et al.*, 1985). Portanto, tanto a ligação de O_2 , quanto a oxidação da proteína, que levam a hemoglobina à um estado mais hidratado, são acompanhadas pela ligação de moléculas de água ao novo estado conformacional induzido pela reação. A diminuição da atividade de água impõe, portanto, um débito energético para a formação do estado R da proteína. Consequentemente, para a Hb atingir o mesmo nível de saturação por O_2 ou de oxidação à baixas atividade de água, o valor da atividade de O_2 ou do potencial aplicado, deve ser maior que aquele requerido à maior atividade de água. Este aumento de $p_{1/2\text{O}_2}$ ou de $E_{1/2}$ para um certo grau de saturação ou de oxidação ser atingido à menores atividades de água, é o débito energético pago pela estabilização do estado T da Hb.

O efeito das variações da atividade de água sobre as características de oxigenação da Hb foi analisado com a seguinte equação de “linkage” (Colombo *et al.*, 1992, 1994, 1996):

$$\frac{d\ln(p_{1/2}O_2)}{d\ln(a_w)} = - (n_{H_2O}^{oxi} - n_{H_2O}^{desoxi})$$

onde: $n_{H_2O}^{oxi}$ = número de moléculas de água ligadas à forma oxigenada, e

$n_{H_2O}^{desoxi}$ = número de moléculas de água ligadas à forma desoxigenada

O uso desta equação permitiu que, através da inclinação da reta do gráfico de $\ln(p_{1/2}O_2)$ em função de $\ln(a_w)$, fosse determinado que aproximadamente 70 moléculas de água ligavam-se à mais no estado totalmente oxigenado em relação ao estado totalmente desoxigenado (Colombo *et al.* 1992).

Com o objetivo de calcular a variação de hidratação entre os estados reduzido (desoxi-Hb) T e oxidado (meta-Hb) R, fizemos uso da relação de “linkage”análoga:

$$\frac{\mathcal{F}}{RT} \frac{\partial E}{\partial \ln(a_w)} = -(n_{H_2O}^{oxidado} - n_{H_2O}^{reduzido})$$

que pode ser derivada à partir da relação entre $E_{1/2}$ e $\ln(p_{1/2}O_2)$, proposta originalmente por Wyman e Ingalls, onde $E_{1/2} \times \frac{\mathcal{F}}{RT} \sim \ln p_{1/2}(O_2)$.

Visto que $E_{1/2}$ mantém uma relação linear com $\ln(p_{1/2}O_2)$, o fato de $E_{1/2}$ aumentar linearmente com a atividade de água na solução, indica que o mecanismo de estabilização do estado reduzido da Hb é equivalente àquele que controla a afinidade da Hb por O_2 . Portanto, o aumento de $E_{1/2}$, à menores valores de atividade de água, indica que o estado reduzido da Hb é menos hidratado que o estado oxidado, em concordância com os dados de efeito de água sobre a oxigenação da Hb.

Se a concordância qualitativa entre o efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb por O_2 , com este mesmo efeito sobre o potencial redox é boa, a análise quantitativa revela distinções. A inclinação média da curva do gráfico de $E_{1/2}$ em função de $\ln(a_w)$, determinados tanto pela titulação potenciométrica com $K_3Fe(CN)_6$, como pela medida direta do potencial numa solução contendo 50% de desoxi-Hb e 50% de meta-Hb, foi de

$$\frac{dE}{d\ln(a_w)} = 2,35 \pm 0,124 \text{ volts}$$

Este valor, multiplicado por $\mathcal{F}/RT$, nos fornece o número de moléculas de água que existem à mais na hidratação do estado oxidado, em relação ao estado reduzido. O valor que obtivemos foi de cerca de 90 moléculas de água por elétron, que corresponde à ~ 360 moléculas de água por 4 elétrons da molécula de Hb. Este valor é cerca de 5 vezes maior que o determinado na oxigenação ($\sim 70/\text{Hb}$)



Embora tenha sido possível relacionar a variação de hidratação da Hb, determinada na oxigenação, com a variação da superfície proteica na transição de T para R, não temos uma interpretação para a maior variação de hidratação determinada à partir da dependência de $E_{1/2}$ com $\ln(a_w)$.

6. CONCLUSÕES

Até o presente momento, não temos uma explicação para a variação de hidratação aparente entre os estados da desoxi-Hb e da meta-Hb ser tão maior que a encontrada nas medidas de oxigenação entre os estados da desoxi-Hb e oxi-Hb. No entanto, parece ser possível relacionar o efeito estabilizador da sacarose sobre o estado reduzido da Hb com o equilíbrio alostérico que regula tanto a afinidade desta proteína pelo oxigênio, quanto pelo elétron. Enquanto o potencial redox da Mb, uma proteína monomérica, é insensível à mudanças na atividade de água, a susceptibilidade do potencial de oxi-redução da Hb com a atividade de água é inesperadamente alta. Que este efeito tenha origem em outras propriedades da solução alteradas pela adição de sacarose, como por exemplo, a diminuição da constante dielétrica do meio ou o aumento da viscosidade da solução, são hipóteses que provavelmente podem ser descartadas pela ausência do efeito sobre o $E_{1/2}$ da mioglobina. Parece-nos, portanto, que este efeito deve estar relacionado aos diferentes estados de hidratação entre desoxi-Hb e meta-Hb, cujo equilíbrio está intrinsicamente acoplado à atividade do solvente em solução.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addison, A.W. e Burman, S.**(1985). *Biochim. Biophys. Acta.* **828**, 362.
- Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Bucci, E., Fronticelli, C. e Rossi Fanelli, A.** (1963a) *J. Biol. Chem.* **238**, 2950.
- Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Taylor, J.F., Fanelli, A. R., Caputo, A.**(1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 907.
- Antonini, E., Brunori, M.,** *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands* (1971) North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Atkins, P. W.** (1994) *Physical Chemistry*, Oxford University Press.
- Baldwin, J. M.** (1975) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **29**, 255. Pergamon Press, Great Britain.
- Banerjee, R., e Cassoly, R.** (1969), *J. Mol. Biol.* **42**, 337
- Basolo, F., Hoffman, B. M., Ibers, J. A.** (1975) *Acc. Chem. Res.* **8**, 384.
- Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S.** (1994) *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, USA.
- Cassatt, J. C., Marini, C. P. e Bender, J. W.** (1975) *Biochemistry* **14**, 5470.
- Colombo, M. F., Rau, D. C., Parsegian, V.A.** (1992) *Science* **256**, 655.
- Colombo, M. F., Rau, D. C., Parsegian, V.A.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**, 10517.
- Colombo, M. F., Bonilla-Rodriguez, G. O.** (1996) *J. Biol. Chem.* **271** 4895-4899.
- Clark, W. M.**(1960) *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*, Willians & Wilkins, Baltimore, MD.



Chothia, C., Wodak, S.J. e Janin, J.(1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3793; **Janin, J. e Wodak, S. J.**(1985) *Biopolymers* **24**, 509; **Lesk, A. M., Janin, J., Wodak, S., Chothia, C., *J. Mol. Biol.* **183**, 267.**

Delahay, P.(1954) *New Instrumental Methods in Electrochemistry*, Interscience, New York.

Haire, R. N. e Hedlund, B. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4135-8.

Hartridge, H. e Roughton, F. J. W. (1925) *Proc. Roy. Soc. A* **107**, 654.

Hill, A. V. (1910) *J. Physiol.*, **40**, IV-VII.

Imai, K. (1982) *Allosteric effects in haemoglobin*, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.

Lee, J. C., Timascheff, S. N. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7193-7201.

Mathews, C. K., van Holde, K. E. (1990) *Biochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.. Redwood City, CA.

Monod, J., Wyman, J. e Changeux, J. P. (1965) *J. Mol. Bio.* **12**, 88-118.

Perutz, M. F. (1949) em: *Haemoglobin* (Butterworths, London) pág. 135.

Perutz, M. F. (1969) *Harvey Lectures* **63**, 213.

Perutz, M. F., Fermi, G., Poyart, C., Pagnier, J. e Kister, J. (1993) *J. Mol. Biol.* **233**, 536-455.

Santoro, M. M. , Liu, Y., Khan, S. M. A., Hou, L.-X, e Bolen, D. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 5278-5283.

Taylor, J. F. e Hastings, A. B. (1939) *J. Biol. Chem.* **131**, 649.

Williams, R. C. e Tsay, K. Y. (1973) *Anal. Biochem.* **54**, 137.

Wyman, J., (1964) *Adv. Prot. Chem.* **19**, 407.



Wyman, J. e Gill, S. J. (1990) *Binding and linkage functional chemistry of biological macromolecules*, University Science Books, Mill Valley, CA.

Wyman, J. e Ingalls, E.N. (1941) *J. Biol. Chem.* **139**, 877

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S.C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982) *Science* **217**, 1214-1222.



