ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DIFEREN-
TES NITROSIL HEMOPROTEÍNAS POR
RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔ-
NICA.

Física - J

IGNEZ CARACELLI

*Tese apresentada ao Instituto de
Física e Química de São Carlos-USP,
para obtenção do título de DOUTOR
em CIÊNCIAS (Física Aplicada).*

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento

Departamento de Física e Ciência dos Materiais

São Carlos - 1987

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE _____

IGNEZ CARACELLI

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 27 DE novembro DE 1987.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Otaciro Rangel Nascimento - Orientador

Dr.^a Maria Cristina Terrile

Dr. José Pedro Donoso Gonzalez

Dr.^a Yassuco Iamamoto

Dr. João Ruggiero Neto

Agradeço à EMBRAPA, FAPESP, FINEP e CNPq pelo auxílio financeiro

Dedico

JULIO

"*Qué es poesia?*", *dices mientras*
clavas em mi pupila tu pupila azul
"Qué es poesia?" Y tú me lo pregun
tas? Poesia...eres tú.

(G.A.Bécquer)

JULIO HENRIQUE e JULIO EDUARDO

Pensamento é vida. Vida é criação.
Criação vem do desejo. Desejo é
semente. Semente plantada no ter-
reno da ação traz o fruto que lhe
corresponde. Toda semente produz.
A escolha é nossa. (Emmanuel)

João Ruggiero, Márcio F. Colombo, Ana Célia Ruggiero, Antonio Alonso, Janice R. Perussi, Silvério Crestana, Washington, L.B. Melo e Aparecido Augusto de Carvalho.

A todos os amigos que mesmo não fazendo parte do Laboratório de Biofísica, conviveram comigo no IFQSC: Áurea Tamae Inumaru, Maria Cristina G. Affonso, Maria Eulália R. Gonçalves, Carlos Alberto de Simone, Carlos de Oliveira Paiva Santos, Marcos Alcântara e Jussara Marques de Miranda.

Ao apoio técnico, imprescindível ao bom desempenho de qualquer trabalho, recebido do Sr. Salvador Sanches, Sra. Dermin da Isabel de Moraes e Sra. Wanda D. Perussi de Jesus, além do estímulo e amizade recebidos durante os vários anos de convivência no Laboratório de Biofísica.

Ao Dr. Fábio T.T. Oliveira, chefe da UEPAE de São Carlos, pelo apoio recebido durante minha estada na Fazenda Canchim.

As Dras. Lúcia L.L. Panepucci e Ana Rita A. Nogueira, pela amizade e convívio diário na Fazenda Canchim.

Aos Doutores Dgerson Gonçalves Novaes e Zelson Tenório, que possibilitaram minha vinda à Maceió, Dr. Luiz C. Ga lindo de Barroa, Dr. José H. de A. Rangel e Dr. Denis Medeiros Santos, pelas facilidades e apoio para concluir este trabalho e pela calorosa acolhida que recebi na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Alagoas - EPEAL

Ao Sr. Valdeci Massaro e Sr. Roni Aparecido Ferrari, pela imprescindível colaboração e assitência na parte computacional.

As Bibliotecárias do IFQSC-DFCM Srta. Maria Helena de Francisco, da Fazenda Canchim-EMBRAPA, Sra. Regina C.P. Ruzza e da EPEAL, Sra. Maria Ligia Toledo Cavalcante, e respectivas fun cionárias.

Aos funcionários da Oficina Mecânica, Vidraria e Baixa Temperatura do IFQSC, pelo auxílio no desenrolar deste trabalho.

As Secretárias do IFQSC-DFCM, Sras. Nêuri L. Mendonça e Sueli P. Sanches Dotta e da EPEAL, Sra. Gilce Vieira de Araújo pela paciência, apoio e amizade.

Ao Sr. Augusto Lopes da Rocha pelo preparo dos desenhos.

A Sra. Elmes Mafiz pelo excelente trabalho de datilografia.

A FAPESP, CNEN e EMBRAPA pelo apoio financeiro.

A meus pais Inre e Eva, pelo apoio, confiança, amor e estímulo recebidos durante toda a minha vida.

Aos "meus" três Julios. Ao Julio principalmente pelo apoio em todos os sentidos, inclusive na vida profissional; Julio Henrique e Julio Eduardo que deram um novo colorido às nossas vidas. Aos três, que de diferentes formas, fizeram com que eu pudesse dar e receber muito amor.

ÍNDICE

RESUMO	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>vii</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xi</i>
INTRODUÇÃO	<i>1</i>
CAPÍTULO I HEMOPROTEÍNAS	
1. Introdução	9
2. Descrição de moléculas constituintes de hemop.	11
3. Mioglobina (Mb) e Hemoglobina (Hb)	13
4. Mioglobina de "Aplysia brasiliana"	19
5. Eritrocruorina de "Annelidae Glossoscolex paulistus"	21
CAPÍTULO II, RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA EM HEMOPROTEÍNAS	
1. Introdução	27
2. Teoria de Campo Cristalino	30
3. Ressonância Paramagnética Eletrônica de Hemoproteínas	34
4. Estados Eletrônicos do Ferro	
1. Íon Livre	35
2. Ferrihemoproteínas de Spin Baixo.	35
3. Ferrihemoproteínas de Spin Alto	41
CAPÍTULO III ÓXIDO NÍTRICO: UMA Sonda PARA O ESTUDO DE HEMOPROTEÍNAS	
1. Introdução	49
2. Estrutura Eletrônica	51
3. Mecanismo de Reação do Óxido Nítrico com Hemoproteínas.	57

CAPÍTULO IV MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação de mioglobina de " <i>Aplysia</i> <i>brasiliiana</i> "	63
2. Preparação da eritrocruorina de " <i>Annelidae</i> <i>Glossoscolex paulistus</i> "	64
3. Mioglobina de Cavalo	64
4. Mioglobina de Cachalote	65
5. Preparação do gás NO	65
6. Preparação das soluções de nitrosil hemoproteínas	65
7. Medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica	67
8. Medidas de pH	67
9. Tampões	68
10. Ferricianeto de potássio	68
11. Medidas de Absorção Óptica	68

CAPÍTULO V RESULTADOS

1. Mioglobinas de Cavalo e de cachalote	71
2. Eritrocruorina de " <i>Annelidae Glossoscolex</i> <i>paulistus</i> ".	92
3. Mioglobina de " <i>Aplysia brasiliiana</i> ".	96

CAPÍTULO VI DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1. Mioglobinas de Cavalo e de Cachalote	103
2. Eritrocruorinas de " <i>Annelidae Glossoscolex</i> <i>paulistus</i> ".	120
3. Mioglobina de " <i>Aplysia brasiliiana</i> ".	128
4. Aspectos Gerais	132
5. Conclusões.	134
6. Sugestões	138

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	139
--	-----

RESUMO

As propriedades dos derivados nitrosilados de diferentes hemoproteínas em função da temperatura, da concentração de óxido nítrico (NO) e pH, foram investigadas utilizando a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

Nas hemoproteínas, o grupo heme está acomodado em um bolso: de um lado encontra-se a histidina proximal, de outro uma cavidade aberta onde pode ocorrer a ligação de O_2 (ou outras moléculas, tais como H_2O , NO, CO, etc.). Perto daí, encontra-se o sítio distal, que pode ou não estar ocupado por uma cadeia lateral de aminoácido, o qual pode influenciar a ligação do ligante. As proteínas estudadas, marcadas com NO, foram: mioglobinas de Cavalo e de Cachalote, que possuem o sítio distal ocupado por um resíduo de histidina, a mioglobina do molusco *Aplysia brasiliana* (Mb Apb) que não possui um resíduo de aminoácido no sítio distal e a eritrocruorina da minhoca *Annelidae Glossoscolex paulistus* (Ec AGp), cuja vizinhança do heme não está determinada.

Os resultados obtidos com as soluções de mioglobinas de Cavalo e de Cachalote, preparadas a partir de proteína liofilizada (Sigma) mostram que cerca de 13% de mioglobina está na forma oxi (MbA) e o restante na forma meta (MbB). A ligação de NO à MbA se faz por simples substituição da molécula de O_2 por NO, mantendo o ferro em seu estado ferroso. Já para a MbB, a ligação ocorre em duas etapas: na primeira reduzindo o Fe^{3+} a Fe^{2+} e, numa segunda, cuja extensão depende da concentração de NO, o óxido nítrico liga-se ao Fe^{2+} produto da redução do ferro da MbB. Se a razão NO/Mb é igual ou maior que 2/1, o espectro de RPE é uma linha larga (tipo B), como tem sido identi

ficado na literatura. Se a razão NO/Mb é da ordem de 0,2/1, o espectro de RPE (tipo A) apresenta um desdobramento hiperfino, similar ao da deoxiHb humana na conformação T. Se a razão NO/Mb varia entre 0,2 e 2, o espectro de RPE é uma mistura dos dois tipos (AB). Os espectros tipo A e AB apresentam uma clara dependência com a temperatura, ao passo que o espectro tipo B não. Observa-se também que a afinidade pelo NO da MbB depende do pH; quanto menor o pH, mais difícil fica se completar a reação do Fe^{3+} com o NO, mesmo se a razão NO/Mb é maior que 2. Os espectros de RPE da MbANO e da MbBNO são diferentes, porque o campo cristalino em torno do ferro apresenta pequenas variações, alterando a distância $\text{N}_\epsilon\text{-Fe-NO}$. No caso da MbA isto dá origem a um espectro similar ao encontrado para o ferro pentacoordenado (tipo A); no caso da MbB, o espectro é do tipo encontrado para ferro hexacoordenado (tipo B).

O estudo da dependência do espectro de RPE com a temperatura, no caso da EcNO AGp, mostra que existe um equilíbrio térmico entre duas espécies hexacoordenadas : a espécie I, que predomina à baixa temperatura e cujo espectro de RPE exibe desdobramento superhiperfino com 9 linhas; a espécie II, que predomina a altas temperaturas e cujo espectro de RPE é uma linha larga. No intervalo de temperaturas estudado, pode ser observado que em temperaturas intermediárias, os espectros são uma mistura das duas espécies. Pode-se, através de diferença espectral, estudar o comportamento de cada espécie separadamente e o equilíbrio da mistura. Verificou-se que as duas espécies estão separadas por cerca de 2 kcal/mol. Com os resultados obtidos e comparando-os com os obtidos na literatura, é possível sugerir a existência de uma glutamina distal para a Ec AGp.

Para a MbNO Apb, encontra-se um espectro de RPE que

apresenta desdobramento superhiperfino com 9 linhas. Os espectros a baixa e alta temperatura são similares; apenas à alta temperatura a resolução é menor.

Observa-se ainda, a influência do sítio distal (his E7 nas mioglobinas de Cavalo e de Cachalote) sobre a ligação Fe-N-O. Nas Mb de Cavalo e de Cachalote, em que o sítio distal é ocupado por uma histidina, o espectro de RPE da MbNO é uma linha larga que não varia significativamente com a temperatura. Na Ec AGp, em que o sítio distal está provavelmente ocupado por uma glutamina, o espectro de RPE apresenta uma dependência com a temperatura: a 309.3K, o espectro é uma linha larga, a 103.0K, o espectro apresenta desdobramento superhiperfino. Na Mb Apb, em que não há resíduo básico ocupando a posição distal, o espectro apresenta desdobramento superhiperfino em todo o intervalo de temperatura estudado (113,7K a 283,3K).

ABSTRACT

Using the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique, the properties of several nitrosyl hemoproteins were investigated as a function of temperature, pH and nitric oxide (NO) concentration.

In hemoproteins, the heme moiety is esconced in a pocket: in one side there is an open cavity where the bonding of different molecules, such as O_2 , NO, CO, etc., may occur. Close to that open cavity is the distal site which may be occupied or not by an aminoacid residue thus influencying in different ways the ligand bonding. The following nitrosyl hemoproteins were studied: horse and spermwhale myoglobins which have an histidine residue occupying the distal site, the myoglobin of the mollusk *Aplysia brasiliana* (Mb Apb) which has no aminoacid residue in the distal site and the erythrocruorin from the earthworm *Annelidae Glossoscolex paulistus* (Ec AGp) whose structure is no yet known.

The results that were obtained with horse and spermwhale myoglobins solutions prepared using liofilized protein from Sigma, show that almost 13% of the myoglobins is in the oxi form (MbA) and the remaining 87% is in the meta form (MbB). The NO binding to MbA is done by simple substitution of the O_2 molecule, remaining the iron atom in its ferrous state. With MbB we have a quite different situation and in this case, two steps are needed to obtain the nitric oxide derivative: first the Fe^{3+} is reduced to Fe^{2+} and then the NO molecule bind to it, the extention to which this last step occurs, depends on the nitric oxide concentration. If the NO/Mb ratio is equal to or greater than 2/1, the EPR signal is a broad line (B type), as

it has been already identified. If the NO/Mb ratio is around 0,2/1, the EPR spectrum (A type) is characterized by a hyperfine splitting similar to that of human deoxyhemoglobin in the T conformation. Finally, if the NO/Mb ratio has a value between 0,2/1 and 2/1, the EPR signal observed is due to contributions from both species (AB). Variations in the EPR spectra with temperature is only observed for the A and AB types. Furthermore, it has also been observed that MbB affinity for NO is pH dependent, the lower the pH, more difficult is the completion of the Fe^{3+} reaction with NO, even if the NO/Mb ratio is greater than 2/1. The difference between the EPR spectra of MbA and MbB is due to the small but significant differences in the crystal field around the iron atom, thus modifying the $\text{N}_\epsilon\text{-Fe-NO}$ distance. In the MbA case, this gives rise to a spectrum similar to that found for pentacoordinated iron (A type), for MbB the spectrum shows a pattern similar to that found for an hexacoordinated iron atom (B type).

The analysis of the EPR spectra of EcNO AGp at various temperatures showed that there is a thermal equilibrium between two hexacoordinated species: species I, which is predominant at low temperatures and is characterized by a nine-line superhyperfine splitting, and species II, which is predominant at high temperatures, characterized by a broad line EPR spectrum. It was found that in the range of temperatures studied, the EPR signals are due to contributions from two species. The spectral difference made possible to learn about each species independently and the equilibrium. The two species differ in enthalpy by no more than about 2 kcal/mol. At the light of these findings, and comparing with the data found in the literature, it may be postulated the existence of

a glutamine at the distal site in Ec AGp.

For MbNO Apb, it was found an EPR spectrum exhibiting a nine-line superhyperfine splitting. The EPR spectra at low and high temperatures are similar, but the former are well resolved while in the latter, the superhyperfine splitting is something blurred.

Futhermore, it has been possible to learn about the influence of the distal site on the Fe-N-O bond. For horse and sperm whale myoglobins, where an histidine occupies the distal site, the EPR spectrum is a broad line which does not change significantly with temperature. For Ec AGp, where a glutamine probably occupies the distal site, the EPR spectra are temperature dependent: at 309.3K it is a broad line and at 103.0K it presents superhyperfine splitting. Finally, for Mb Apb where there is no basic residue occupying the distal site, the EPR spectra are characterized by a nine-line superhyperfine splitting all over the temperature range studied (113.7 to 283,3K).

LISTA DE FIGURAS

1. Caminho pelo qual o O_2 é levado à mitocôndria.	10
2. Protoporfirina	11
3. Grupo Heme: a) vista dos ligantes no plano; b) vista dos ligantes fora do plano	12
4. A Histidina.	13
5. Estrutura esquemática de: a) citocromo-c; b) citocromo-a	14
6. O grupo heme colocado na fenda da globina.	15
7. Modelo da mioglobina a alta resolução.	17
8. Modelo esquemático mostrando o grupo heme na Mioglobina	17
9. Modelo do grupo heme mostrando as histinas proximal e distal	18
10. Diagrama esquemático mostrando a 6ª posição de coordenação: lugar de enlace do oxigênio	18
11. Curva de equilíbrio de oxigênio da eritrocruorina de <i>Glossoscolex paulistus</i>	22
12. Diagrama de níveis de energia de um eletrôn na presença de campo magnético	28
13. Parte angular das funções de onda de um eletrôn 3d	31
14. O efeito do campo cristalino nos níveis de energia dos orbitais d: a) íon livre; b) vizinhança octaédrica e c) distorção tetragonal.	33
15. Espectro de RPE de ferrihemoproteínas: a) 1ª derivada da absorção; b) absorção	36
16. Orbitais $3d^5$	37
17. 1ª derivada do espectro de RPE de metamioglobina	41
18. Diagrama de Campo Cristalino para Fe^{3+} Spin Alto	42
19. Diagrama de Orbitais Moleculares proposto para o modelo $\pi^*(NO)$	52
20. Modelo usado para calcular a função de onda eletrônica do sistema nitrosilhemoproteína.	54

21. Estrutura eletrônica mais satisfatória em termos dos parâmetros de RPE	54
22. O óxido nítrico como redutor de ferro na metahemoglobina.	58
23. Arranjo experimental para a produção de NO.	66
24. Espectros de RPE de MbNO de Cachalote em diferentes temperaturas, pH=7,0, $C_{Mb} = 3\text{mM}$, 90% saturação de NO .	78
25. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH=7,0, $C_{Mb} = 3\text{mM}$, 90% saturação de NO .	79
26. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 110,0 K, pH = 7,0 $C_{Mb} = 1\text{mM}$, diferentes saturações de NO: a) 100%; b) 85% c) 56%; d) 15%; e) 10% f) Espectro do sinal do Fe^{3+} .	80
27. Espectros de RPE de MbNO de Cachalote, em diferentes temperaturas, pH = 4,7, $C_{Mb} = 1\text{mM}$, 25% saturação NO .	82
28. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 4,6, $C_{Mb} = 1\text{mM}$, 25% saturação NO .	83
29. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 9,6, $C_{Mb} = 1\text{mM}$	84
30. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 113 K, pH = 7,0, $C_{Mb} = 1\text{ mM}$. A solução não foi agitada após a adição do NO. Tempo de reação: a) 1 min ;b) 2 min; c) 4 min e d) 5 min.	85
31. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, 100% saturação NO : a) $C_{Mb} = 1\text{ mM}$; b) $C_{Mb} = 0,1\text{ mM}$	86
32. Espectros de RPE de MbNO de Cachalote, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, 95% saturação NO a) $C_{Mb} = 0,1\text{ mM}$; b) $C_{Mb} = 1\text{ mM}$; c) $C_{Mb} = 3\text{ mM}$	87
33. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, 60% saturação de NO a) $C_{Mb} = 0,1\text{ mM}$; b) $C_{Mb} = 1\text{ mM}$; c) $C_{Mb} = 3\text{ mM}$	88
34. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 7,0, 100% de saturação de NO.	89

35. Espectros de RPE de MbNO Cavalo, 113,0K, pH 7,0 C _{Mb} = 1 mM. a) sinal do Fe antes de adicionar NO à solução, b) 5 min, c) 15 min, d) 3h40min e) 5h . .	90
36. Espectros obtidos no computador, misturando os es- pectros correspondentes às espécies I e II em pro- porções que variam de 1 a 100%	91
37. Espectros de RPE de EcNO AGp, em diferentes tempe- raturas, pH 7,2.	94
38. Espectros de RPE de EcNO AGp: a) 103,0K; b) 309,3K .	95
39. Espectros de RPE de MbNO Apn, em diferentes tempe- raturas, pH 7,32	98
40. Espectros de RPE de MbNO Apb, 113,7K, pH 7,3 . . .	99
41. Espectros de RPE de MbNO Apb, 115,8K, pH 4,6 . . .	100
42. MbNO. Áreas relativas dos sinais de RPE devidos ao NO e Fe ³⁺ em g ~ 6 e g ~ 4,4 vs. tempo de reação. Dados obtidos do experimento cujos resultados são mostrados na figura 35.	106
43. MbNO. Área relativa do sinal de RPE devido ao NO vs. Área relativa do sinal devido ao Fe ³⁺ (g ~ 6).	108
44. MbNO. Porcentagem de Saturação de NO vs. Área rela- tiva do sinal de RPE devido ao NO. Ao lado dos pon- tos experimentais, observa-se a forma de linha do espectro de RPE.	109
45. EcNO AGp. Variação dos valores g _x relativos, obtidos do espectro experimental vs. Inverso da temperatura	122
46. EcNO AGp. Variação dos valores de largura de linha obtidas dos espectros experimentais vs. inverso da temperatura.	123
47. EcNO AGp. Intensidades relativas obtidas dos espec- tros experimentais vs. temperatura, I ₀ = I(103,0K).	124
48. EcNO AGp. Valores g _x relativos, obtidos dos espec- tros diferença x temperatura	125
49. EcNO AGp. Valores de largura de linha obtidas do espectro diferença vs. inverso da temperatura . .	125

50. EcNO AGp. Intensidades relativas obtidas dos espectros diferença vs.temperatura. Curva ajustada.	126
51. MbNO Apb. Valores relativos g_x vs. inverso da tempera <u>tu</u> ra.	129
52. MbNO Apb. Valores de largura de linha vs. inverso da temperatura	130
53. MbNO Apb. Intensidade relativa vs.temperatura	131

LISTA DE TABELAS

I. Valores de spin possíveis para o Fe^{2+} e Fe^{3+}	34
II. Os três sistemas propostos para estudar as diferentes formas estruturais das nitrosilhemoproteínas	55
III. Parâmetros de RPE para MbNO de Cavalo e Cachalote. .	74
IV. Parâmetros de RPE para nitrosil eritrocruorina de <i>Annelidae Glossoscolex paulistus</i>	93
V. Parâmetros de RPE de nitrosilmioglobina de <i>Aplysia brasiliiana</i>	97
VI. Formas dos espectros das diferentes espécies de proteínas nitrosiladas	133

I N T R O D U Ç Ã O

Todo ser vivo transporta consigo um registro porme-
norizado de seus antecedentes, desde o princípio da vida na
Terra. Este registro é conservado em código nas moléculas gi-
gantes de ácido desoxirribonucleico (DNA) que constituem o
estoque total de informação genética. O registro genético é
também expresso nas moléculas de proteína que dotam o orga-
nismo de sua forma e função.

Essas duas espécies de molécula, DNA e proteína,
são documentos vivos da história da evolução. Embora quimica-
mente muito diferentes, elas tem em comum uma característica
fundamental: ambas se constituem de uma sucessão unidimensio-
nal de subunidades ligeiramente diferentes como elos de dife-
rentes cores de correntes. Cada elo colorido ocupa um lugar
que lhe é especificamente destinado, a não ser que as mudan-
ças hereditárias, denominadas mutações, mudem a cor de um elo,
desloquem, eliminem ou acrescentem um elo (ou muitos) de ca-
da vez. Além disso, as proteínas são dobradas de um modo tal
que lhes permita executar suas funções específicas, de modo
que existe um binômio forma-função bem definido.

No decorrer da evolução, e para poder continuar de-
sempenhando sua função de transporte e armazenamento de oxi-
gênio, molécula vital para a sobrevivência das espécies, as
mioglobinas e hemoglobinas também sofreram mutações. Algumas
foram positivas e possibilitaram a perpetuação da espécie, -
outras porém demonstraram serem negativas e são a causa de
doenças tal como a anemia falciforme.

Surge então o interesse de se poder entender, a
nível molecular, o que ocorre quando o oxigênio se liga à

proteína e se as mutações ocorridas afetam de alguma forma a ligação da molécula de oxigênio. Assim, houve interesse em estudar as mioglobinas tidas como padrão (Cachalote e Cavalo) que apresentam sítio ativo bem característico, com um grupo heme, que possui um átomo de ferro coordenado por quatro nitrogênios pirrólicos e uma histidina proximal, e próximo ao local de ligação da molécula de oxigênio, uma histidina distal.

Além das mioglobinas chamadas "padrão" foram estudadas a mioglobina de *Aplysia brasiliana* que não possui a histidina distal e uma hemoglobina de invertebrado, a eritrocruorina de *Annelidae Glossoscolex paulistus*, da qual ainda não se possuem muitos dados, especificamente não se conhece o aminoácido distal nem sua interação com o ligante.

Colocado o problema, é necessário estabelecer uma forma de se poder inspecionar o sítio ativo no momento em que ele está desempenhando sua função. A sonda utilizada para as investigações foi o óxido nítrico que possui um peso molecular aproximadamente igual ao da molécula de oxigênio e além disso, é paramagnética. Deste modo é possível estudar a molécula numa forma (nitrosilada) similar à sua forma nativa (a forma oxigenada) utilizando a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

As hemoproteínas, com sua função e estrutura básica e alguns aspectos característicos sobre as mioglobinas de Cachalote, Cavalo e *Aplysia brasiliana* e sobre a eritrocruorina de *Annelidae Glossoscolex paulistus* são discutidas no Capítulo I. Os aspectos teóricos da Ressonância Paramagnética Eletrônica e sua relação com as hemoproteínas são apresen

tadas no Capítulo II. As nitrosilhemoproteínas são discutidas no Capítulo III, onde também se trata do mecanismo de reação do óxido nítrico com as hemoproteínas. O Capítulo IV trata dos Materiais e Métodos utilizados neste trabalho. No Capítulo V são descritos os resultados experimentais e, finalmente no Capítulo VI os resultados são discutidos e as conclusões apresentadas.

C A P Í T U L O I

"H E M O P R O T E Í N A S"

1.1. INTRODUÇÃO

A transição da vida anaeróbica à vida aeróbica foi - uma etapa importante na evolução porque há grandes vantagens e energéticas para um organismo se ele pode oxidar seus combustíveis moleculares usando o oxigênio molecular (O_2). Na glicólise anaeróbica há uma produção de 2 moléculas de ATP (Adenosina Trifosfato, uma verdadeira unidade de energia, sua hidrólise libera 7,3 kcal/mol) por molécula de glicose. Se a glicólise continua no Ciclo de Krebs e, finalmente num sistema cujo oxidante - final é a molécula de O_2 (citocromo-oxidase por exemplo), obtém-se mais 12 moléculas de ATP por molécula de glicose. De modo que podemos concluir que o metabolismo aeróbico produz 7 vezes mais energia que o anaeróbico.

A necessidade de transportadores de O_2 foi atendida, no reino animal de várias maneiras. Nos animais mais primitivos que são pequenos e de baixo metabolismo, o transportador está - contido em células suspensas no fluido celômico. Com o desenvolvimento da circulação, surgiram transportadores de O_2 dissolvidos no plasma e, posteriormente, soluções concentradas deles foram incluídas em células circulantes especiais, os eritrócitos. Esta última forma constitui um grande progresso, pois permite a presença na circulação de grandes quantidades de transportador, sem aumentar correspondentemente a viscosidade e a pressão osmótica do meio circulante. Numerosos transportadores e armazenadores de O_2 de diferentes propriedades estão distribuídos pelo reino animal. Quase todos os vertebrados possuem, como transportador de O_2 , uma hemoglobina (peso molecular ~65.000), e como armazenador, uma mioglobina (peso molecular ~17.000).

Entre os invertebrados ocorre grande diversidade. Nas

espécies em que o transportador está simplesmente dissolvido no plasma, ele tem invariavelmente grande peso molecular (entre - 400.000 e 6.700.000). Grandes hemoproteínas denominadas eritro-cruorinas são encontradas no sangue de numerosos anelídeos poli e oligoquetos.

Todas estas hemoproteínas apresentam ferroprotoporfirina (vide seção seguinte) como núcleo prostético.

Entretanto, a nível celular, a extração de energia - via Ciclo de Krebs, é realizada por uma organela chamada mitocôndria. Esta entidade possui uma estrutura de dupla membrana na qual a membrana externa serve para definir sua forma, enquanto que sua membrana interna forma muitas dobras e é o suporte dos componentes responsáveis pelo transporte de eletrons e das enzimas necessárias ao Ciclo de Krebs que estão localizadas no interior da mitocôndria, que é o lugar de produção de ATP.

O caminho pelo qual o oxigênio é levado à mitocôndria é esquematicamente mostrado na figura 1.

Fig. 1. Caminho pelo qual o O₂ é levado à mitocôndria.

Neste capítulo trataremos das hemoproteínas cuja função é o transporte de O_2 das interfaces respiratórias (brânquias e pulmões) para os tecidos bem como sua armazenagem nesses últimos.

1.2. DESCRIÇÃO DE MOLÉCULAS CONSTITUINTES DE HEMOPROTEÍNAS

Pirrol - Um heterociclo de 5 membros:

Porfirina - Quatro anéis pirrólicos ligados por pontes $-CH=$

Protoporfirina - Uma porfirina substituída com as seguintes cadeias laterais: ácido propiônico ($-CH_2-CH_2COOH$) nas posições a e h, metil ($-CH_3$) nas posições b, c, e e g, vinil ($-CH=CH_2$) nas posições d e f (vide figura 2).

Fig. 2. A Protoporfirina

Heme - Quando dois hidrogênios do centro da protoporfirina são substituídos por um átomo de ferro, o composto resultante é o heme (figura 3). O ferro é coordenado por 4 nitrogênios pirrólicos, numa estrutura aproximadamente planar. As outras duas posições de coordenação (5 e 6), estão dispostas em direções perpendiculares ao plano do grupo heme.

(a)

(b)

Fig. 3. Grupo Heme. (a) vista dos ligantes no plano: (b) vista dos ligantes - fora do plano.

Aminoácidos - São compostos químicos que contêm tanto um grupo carboxílico (-COOH) como um grupo amino (-NH₂). São as unidades estruturais das proteínas e tem a seguinte estrutura geral:

No desenho acima, R representa qualquer dos 20 diferentes grupos moleculares que distinguem um aminoácido fundamental de outro. Um aminoácido de particular interesse para a discussão que - seguirá, a histidina, é mostrado na figura 4.

Fig. 4. A histidina. O anel de 5 membros é o imidazol.

1.3. MIÓGLOBINA (Mb) E HEMOGLOBINA (Hb)

Conforme foi visto na introdução, a mioglobina e a hemoglobina são as proteínas responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio molecular nos vertebrados e ocasionalmente em alguns invertebrados.

Mas, as hemoproteínas não somente tem a função de trans

portar e armazenar oxigênio, senão que também funcionam como moléculas redox, chamadas citocromos (Dickerson, 1972). Já tem sido identificados um certo número de citocromos e todos eles apresentam um grupo heme no qual o íon ferro encontra-se octaedricamente coordenado; durante o transporte de eletrons o ferro muda de +2 para +3. A figura 5 mostra a estrutura esquemática de dois citocromos representativos.

Fig. 5. Estrutura esquemática de (a) citocromo-c e (b) citocromo-a.

O grupo ativo que dá a estas hemoproteínas a capacidade de ligar reversivelmente o oxigênio molecular (ou transportar eletrons no caso dos citocromos) é o grupo heme (figura 3) que se encontra numa bolsa da globina (figura 6) que é a parte essencial para esta reversibilidade, evitando a oxidação do ferro durante a associação e dissociação do O_2 , já que as porfirinas são rápida e irreversivelmente oxidadas pelo oxigênio. Portanto, a relativa estabilidade da oxihemoproteína é a base da função biológica destas proteínas, e a perda desta propriedade está ligada à integridade da conformação proteica.

O ferro do grupo heme pode ter valência +2 ou +3. A ligação de O_2 ocorre quando o ferro está na sua forma ferrosa (ou seja, Fe^{2+}). Assim tem-se as formas oxi e deoxi para a proteína,

conforme mostra a figura 6. Se o 6º ligante for a água, ter-se-á a forma meta e o ferro estará como férrico (Fe^{3+}).

Fig. 6. O Grupo Heme colocado na fenda da globina.

A mioglobina é uma metaloproteína monomérica com uma cadeia polipeptídica constituída de 153 aminoácidos (peso molecular 17.800) e tem uma forma compacta com dimensões de $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$ (Stryer, 1979). Na figura 7 pode ser observado um modelo da mioglobina a alta resolução.

O interior da mioglobina é formado quase que exclusivamente de resíduos não polares, enquanto que o exterior contém resíduos polares e apolares. Cerca de 75% da cadeia polipeptídica consiste de hélices α . O único grupo heme está localizado numa bolsa apolar (figura 8).

Fig. 7. Modelo da Mioglobina a alta resolução. Somente são mostrados os átomos de carbono (Stryer, 1979).

Fig. 8. Modelo esquemático mostrando o grupo Heme na Mioglobina.

O átomo de ferro do grupo heme está ligado a um átomo de nitrogênio (que ocupa a 5ª posição de coordenação) pertencente a uma histidina (figura 4) chamada histidina proximal ou histidina F8 (figuras 9 e 10).

Fig. 9. Modelo do grupo heme mostrando as Histidinas Proximal e Distal

Fig. 10. Diagrama esquemático mostrando a 6ª posição de coordenação : lugar do enlace do oxigênio.

A 6ª posição de coordenação é o lugar de enlace da molécula de oxigênio. Deve ser mencionada a presença de uma histina (denominada distal ou histidina E7) próxima a esta 6ª posição (figuras 9 e 10).

Por sua vez, a hemoglobina é uma molécula tetramérica, quase esférica, com um diâmetro aproximado de 55 Å (Perutz, 1964). As quatro cadeias (duas α e duas β) que constituem o tetrâmero, estão empacotadas numa disposição tetraédrica, cada uma com um grupo heme. A distância entre os dois sítios de ligação mais próximos é de 25 Å.

Nos tetrâmeros, cada cadeia α está em contato com duas cadeias β , ao passo que há poucas interações entre as duas cadeias α e as duas cadeias β entre si. Em contraste com a molécula de mioglobina que somente pode ligar uma molécula de oxigênio, uma só molécula de hemoglobina possui a capacidade de ligar um máximo de 4 moléculas de oxigênio. A oxigenação da hemoglobina se dá por etapas, cada uma delas caracterizada por uma constante de equilíbrio diferente, encontrando-se que a afinidade dos quatro sítios de ligação (os hemes contendo Fe^{2+}) cresce à medida que os sítios são oxigenados. Diz-se então que a interação Hb/O_2 é cooperativa. Mais ainda, quando a constante de ligação de um sítio de uma molécula é afetada pelo estado de ocupação de outro sítio, diz-se que a interação é do tipo alostérico.

As diferenças estruturais entre a mioglobina e a hemoglobina são significativas, pois a natureza tetramérica da hemoglobina lhe permite dar uma resposta rápida às diferenças nas pressões de oxigênio de modo a assegurar o suprimento de oxigênio às células.

As propriedades e características descritas anteriormente são comuns às mioglobinas de Cavalo e Cachalote (van den

Oord et al., 1969).

Entretanto, mioglobinas e hemoglobinas de espécies diferentes podem diferir entre si, pela presença ou não de algum aminoácido da cadeia globínica, mas desempenham, apesar das diferenças, a mesma função biológica.

A seguir são descritas algumas características da mioglobina de *Aplysia brasiliana* e da eritrocruorina (hemoglobina de invertebrado) de *Annelidae Glossoscolex Paulistus*.

1.4. MIOGLOBINA DE "APLYSIA BRASILIANA"

A *Aplysia brasiliana* é um molusco gasterópode que habita principalmente o litoral norte do estado de São Paulo. Atualmente, devido ao aumento considerável da poluição, a população deste molusco tem decrescido consideravelmente.

A seção ventral do animal, ao longo da linha axial, revela duas grandes massas musculares vermelho escuras que são respectivamente a massa bucal e o chamado estômago muscular, mas essas que podem ser facilmente isoladas e removidas para serem usadas na obtenção da mioglobina.

Os estudos bioquímicos realizados (Say, 1980), mostram que a mioglobina de *Aplysia brasiliana* é monomérica, contém 0,33% em ferro e 1,21% em hidratos de carbono neutros. O peso molecular computado é de 16154 daltons. Ainda não se conhece nem sua estrutura primária nem sua estrutura terciária. A composição em aminoácidos da apomioglobina é similar, mas não idêntica, à da mioglobina de *Aplysia limacina* (gasterópode encontrado no Mediterrâneo) cuja estrutura primária já foi elucidada (Ungaretti et al., 1978). A maior diferença entre as duas é a presença de uma tirosina na mioglobina de *Aplysia brasiliana* e

sua ausência na *Aplysia limacina*. Além disso a mioglobina de *Aplysia brasiliana* apresenta o N-terminal (o N que pertence ao aminoácido que ocupa a extremidade da cadeia) bloqueado, o que impede a participação deste resíduo na formação de complexos - e/ou interação com ligantes externos.

Outro fato a destacar é que a análise de aminoácidos indica a existência de uma só histidina, e deve tratar-se da - histidina proximal (His F8), pois da mesma forma que no caso da *Aplysia limacina* (que não apresenta histidina distal), a banda de absorção óptica na região de Soret ($\lambda \sim 410$ nm) é bastante alargada e com um coeficiente de extinção molar mais baixo que o encontrado nas hemoproteínas que possuem a histidina distal (His E7) (Ascenzi et al., 1981; Desideri et al., 1985).

A mioglobina de *Aplysia brasiliana* sofre uma desnaturação reversível no intervalo de pH entre 6,0 e 9,0.

O pK da transição ácido-alcalina é de 7,2 tanto para a mioglobina de *Aplysia brasiliana* como *limacina* enquanto que para a mioglobina de Cachalote é de 9,2 e isto é devido a uma mudança da hidrofobicidade na região do grupo heme.

Outros estudos tem sido desenvolvidos para uma melhor caracterização da molécula. Tabak et al. (1982) observaram mudanças conformacionais no intervalo de temperatura entre 30 e 50 °C, dependente do pH. Baffa (1984) realizou estudos sobre a transição ácido-alcalina, bem como a interação com metais de - transição e as mudanças conformacionais induzidas pela temperatura.

1.5. ERITROCRUORINA DE "ANNELIDAE GLOSSOSCOLEX PAULISTUS"

As hemoproteínas dissolvidas no sangue dos invertebrados são chamadas genericamente eritrocruorinas, mas poderiam ser mais propriamente denominadas de hemoglobinas de invertebrados.

Nos oligoquetos, classe de anelídeos geralmente de vida subterrânea, sem ventanas e com pequeno número de cerdas em cada anel (e cujo sinônimo vulgar é minhoca), a respiração se dá através da superfície do corpo. Tem sido sugerido que nas minhocas terrestres os pigmentos respiratórios tem alta afinidade pelo oxigênio de forma a compensar a falta de órgãos respiratórios especializados (Weber, 1978). Nos seres pequenos, em geral como são a maioria dos vermes, a relação área/volume é grande bastante para que o oxigênio atinja todas as células por difusão. Mas, nas espécies maiores, como as minhocas gigantes, nas quais a relação área/volume é menor, deveria existir um mecanismo eficiente para transportar o oxigênio da superfície para os tecidos. Curiosamente, as maiores minhocas aparecem em regiões tropicais, onde as altas médias de temperatura do solo promovem uma alta taxa metabólica, e onde a pressão de oxigênio é frequentemente diminuída tanto pela respiração dos solos orgânicos como pela umidade ambiental.

A eritrocruorina de minhoca é um pigmento respiratório de alto peso molecular ($\sim 3 \times 10^6$) que possui ferroprotoporfirina (figura 2) como grupo prostético. Em contraste com as hemoglobinas e mioglobinas, não existe uma correspondência um a um entre o peso molecular das cadeias polipeptídicas (~ 17.000) e o peso molecular mínimo de uma base (~ 23.000) (Antonini & Chiancone, 1977). Esta observação incentivou uma série de investigações estruturais que tem levado à proposição que somente duas das

três cadeias polipeptídicas constitutivas das eritrocruorinas possuem heme (Chiancone et al., 1980). Os estudos de dicróismo circular mostram que a vizinhança do grupo heme está constituída por resíduos aromáticos (Desideri et al., 1982). Estas características tem despertado o interesse no estudo das propriedades de ligação do O_2 das eritrocruorinas. Com este objetivo, Abe & Meirelles (1985) estudaram a afinidade pelo O_2 da eritrocruorina da minhoca gigante *Glossoscolex paulistus*, que é originária do Estado de São Paulo. Eles determinaram o coeficiente de cooperatividade utilizando o gráfico de Hill (figura 11).

Fig. 11. Curva de equilíbrio de oxigenação da eritrocruorina da minhoca gigante *Glossoscolex paulistus*.

Finalmente, é conhecido o fato que a eficiência do transporte de O_2 fica aumentada por interações heteroalostéricas. Uma das mais importantes é a que corresponde ao Efeito Bohr, na qual íons H^+ se ligam a certos resíduos de aminoácidos, não nos hemes, e alteram as constantes que se referem às ligações $Fe-O_2$.

A eritrocruorina de *Glossoscolex paulistus* apresenta um Efeito Bohr pronunciado, favorecendo o transporte de O_2 a nível dos tecidos ainda no caso de pequenas diferenças de pH (Abe & Meireles, 1985).

C A P Í T U L O I I

*"RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA EM
HEMOPROTEÍNAS"*

2.1. INTRODUÇÃO

Para que num sistema seja observado o fenômeno de Resonância Paramagnética Eletrônica (RPE), é necessário que ele - seja composto por átomos que possuam eletrons desemparelhados, ou seja, que tenham momento magnético e momento angular. O caso mais simples é o de um eletron livre, cujo momento angular é igual a 1/2 e seu momento magnético $\vec{\mu}$ é dado por:

$$\vec{\mu} = -g \beta \vec{S} \quad (2.1)$$

onde β é o magneton de Bohr e g é o fator de Landé para o eletron.

Se o eletron é colocado num campo magnético $\vec{H}$, então existe uma energia de interação entre o eletron e o campo magnético, dada por $-\vec{\mu} \cdot \vec{H}$. O hamiltoniano Zeeman para o sistema é então:

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2.2)$$

Se o campo magnético H_0 está na direção z , tem-se:

$$H = g \beta H_0 S_z \quad (2.3)$$

onde S_z é a componente do spin eletrônico na direção z . A solução do hamiltoniano fornece as energias possíveis para o sistema:

$$E = g \beta H_0 m_s \quad (2.4)$$

onde m_s são os autovalores de S . Para um eletron, $m_s = \pm 1/2$ e o diagrama de níveis de energia é mostrado na figura 12. A transição entre os dois níveis de energia se dará quando a energia

$$\Delta E = g \beta H_0 \quad (2.5)$$

for fornecida ao sistema. A energia ΔE normalmente é fornecida por um campo de microondas de frequência fixa, perpendicular ao campo magnético H_0 , que é adiabaticamente variado até que ocorra a transição. Quando esta ocorre, o sistema absorve energia do campo de microondas e a absorção (ou a sua derivada) pode ser detectada por um sistema eletrônico apropriado que faz parte do espectrômetro de RPE.

Fig. 12. Diagrama de níveis de energia de um elétron na presença de um campo magnético.

Normalmente, as situações encontradas não se restringem apenas a um spin resultante igual a $1/2$. Além das interações do spin eletrônico aparecem outras devidas aos ligantes do átomo central, à simetria do sistema, que envolvem interações entre spins (eletrônico e nuclear) entre si, com o campo magnético, etc.

O hamiltoniano de spin, introduzido por Abragam & Price em 1951, é uma poderosa ferramenta que permite a descrição concisa dos dados de RPE. Neste formalismo, os elementos de

matriz entre os vários estados determinados pelo hamiltoniano completo, que descreve o sistema, estão representados por aqueles do spin efetivo (Abragam & Bleaney, 1969). As diferentes interações aparecem como funções do vetor campo magnético e dos operadores de spin eletrônico e nuclear. O uso deste formalismo permite descrever os níveis de energia mais baixos do íon, entre os quais são observadas as transições de microonda, como funções do spin eletrônico efetivo S , spin nuclear I e do campo magnético H . Os efeitos da parte orbital do estado fundamental e dos estados excitados são incorporados neste hamiltoniano como constantes associadas aos operadores independentes formados pelas componentes de S , I e H . Desta forma, o hamiltoniano é dado por:

$$H_{spin} = \mathbf{S} \cdot \vec{g} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S} \cdot \vec{A} \cdot \mathbf{I} + \mathbf{S} \cdot \vec{D} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \vec{Q} \cdot \mathbf{I} \quad (2.6)$$

onde $\vec{g}$ é o tensor da interação Zeeman, $\vec{A}$ é o tensor da interação hiperfina, $\vec{Q}$ é o tensor de energia quadrupolar e $\vec{D}$ é o tensor que é função dos elementos de matriz orbital, com estados excitados do campo cristalino e do parâmetro spin-órbita (Poole & Farach, 1976).

Nos casos em que a simetria é ortorrômbica e nos casos que envolvem operadores do tipo HS , SI , e S^2 , o hamiltoniano pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} H = & \beta (g_x H_x S_x + g_y H_y S_y + g_z H_z S_z) + \\ & + A_x S_x I_x + A_y S_y I_y + A_z S_z I_z + \\ & + D [S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1)] + E (S_x^2 - S_y^2) \end{aligned} \quad (2.7)$$

Se a simetria é tetragonal e o eixo tetragonal é o eixo z , o hamiltoniano adquire a forma apresentada na equação - (2.8):

$$\begin{aligned}
H = & g_{//} \beta H_z S_z + g_{\perp} (H_x S_x + H_y S_y) + \\
& + A S_z I_z + B (S_x I_x + S_y I_y) + \\
& + D [S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1)] \quad (2.8)
\end{aligned}$$

onde B representa o valor do parâmetro de interação hiperfina, perpendicular ao eixo z (Pake, 1973).

O hamiltoniano de spin pode, dependendo da simetria, ser simplificado. É o caso do íon Fe^{3+} com coordenação de pirâmide de base quadrada ou octaédrica, situado num campo com simetria axial. Como o isótopo mais abundante do Fe^{3+} não possui momento magnético nuclear, o hamiltoniano pode ser escrito como:

$$\begin{aligned}
H = & \beta (g_{//} S_z H_z) + \beta g_{\perp} (S_x H_x + S_y H_y) \\
& + D [S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1)] + \\
& + E [S_x^2 - S_y^2] \quad (2.9)
\end{aligned}$$

2.2. TEORIA DE CAMPO CRISTALINO

Na aproximação da teoria de campo cristalino, assume-se que o íon paramagnético reside num campo elétrico cuja origem são cargas pontuais no sítio dos ligantes. Esta aproximação eletrostática pode ser melhorada se se considera os orbitais moleculares dos ligantes. A teoria que trata tanto com campo cristalino como com orbitais moleculares é a teoria de campo ligante. Para as discussões qualitativas, a teoria de campo cristalino será suficiente.

Se esta teoria é aplicada ao íon ferro, pode-se pensar em íons com a camada 3d não totalmente preenchida. Para uma discussão das propriedades do íon Fe é fundamental conhecer as

distribuições de densidades eletrônicas, ou seja, as suas funções de onda. A dependência angular das cinco funções de onda 3d ortogonais é esquematizada na figura 13.

Fig. 13. Parte angular das funções de onda de um eletrón 3d.

Os orbitais d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} são denominados t_{2g} e os d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$ são chamados orbitais e_g . A energia de todos os cinco orbitais é a mesma, ou seja, o estado fundamental é penta degenerado. Na aproximação de campo cristalino o efeito da circunvizinhança (isto é, os ligantes) não é o mesmo sobre todos os orbitais d e, sendo assim, a degenerescência é levantada, de modo que o desdobramento dos níveis de energia degenerados deverá ser sensível à simetria da vizinhança.

Numa primeira aproximação ao estudo do problema do grupo heme das hemoproteínas no qual o íon ferro está octaédricamente coordenado, supõe-se o íon coordenado por 6 ligantes - carregados negativamente. Se agora o íon metálico com seus orbi

tais d é colocado no centro do octaedro, ter-se-á um desdobramento. Os três orbitais t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) tendem a se afastar dos vértices negativos do octaedro, enquanto que os orbitais e_g (d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$) apontam exatamente para as cargas negativas. Neste caso, a energia de repulsão coulombiana é grande e estes orbitais estarão com uma energia maior. A diferença de energia entre os orbitais t_{2g} e e_g é chamada de parâmetro de campo cristalino Δ . Este valor depende do composto; em grupos heme, é da ordem de 10^4 cm^{-1} .

Se ao octaedro regular adiciona-se uma distorção tetragonal, as degenerescências dos orbitais t_{2g} e e_g são desdobradas. Isto se deve ao fato de que a distorção faz com que as cargas se movam do íon central para a direção z , reduzindo desse modo a energia de repulsão entre as cargas e os orbitais que apontam na direção z (figura 14). Poder-se-ia então esperar um abaixamento de energia do orbital d_{z^2} , e uma separação do orbital d_{xy} . Na realidade, este resultado não se obtém simplesmente da teoria de campo cristalino. Para explicar o fato de que o orbital d_{xy} tem energia menor que os orbitais d_{xz} e d_{yz} , seria necessário aplicar a este problema a teoria de campo ligante (Feher, 1969). Os orbitais d_{xz} e d_{yz} permanecem degenerados, a não ser que se introduza uma distorção rômica.

Tendo estabelecido qual a ordem dos níveis de energia, há que se decidir como distribuir os elétrons entre estes níveis. Isto será discutido a seguir, no caso específico de hemoproteínas.

Fig. 14. O efeito do campo cristalino nos níveis de energia dos orbitais d:

- a) íon livre (simetria esférica)
- b) vizinhança octaédrica
- c) octaedro com distorção tetragonal

Observe que o orbital d_{z^2} aponta para as cargas negativas, enquanto que o orbital d_{xy} as evita. A diferença de energia resultante é representada por Δ .

2.3. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE HEMOPROTEÍNAS

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica tem sido de grande valia na caracterização da estrutura e função de hemoproteínas. A técnica tem sido aplicada quase que exclusivamente a proteínas na forma férrica, já que a forma nativa da deoxihemoglobina é diamagnética e só pode ser estudada por este método no caso de existir um ligante paramagnético (por exemplo NO ou O_2^-). Também a oxihemoglobina não exibe sinal de RPE. Entretanto a forma oxidada [Fe^{3+} , d^5] tem sido amplamente estudada. A porfirina pode ser encarada como um ligante tetradentado axialmente simétrico para o ferro. Na metamioglobina os cinco eletrons estão desemparelhados e estão num estado fundamental 6S , com $-\frac{5}{2} \leq S_z \leq \frac{5}{2}$ onde S_z é a componente do momento de spin na direção z do campo magnético. Existe para o ferro a possibilidade de um estado de spin intermediário (tabela I), - mas que tem sido observado somente em compostos modelo (Dickinson & Symons, 1983).

	Spin Alto (Campo Baixo)	Spin Intermediário	Spin Baixo (Campo Alto)
5 Eletrons d Fe^{3+}	$S = 5/2$	$S = 3/2$	$S = 1/2$
6 Eletrons d Fe^{2+}	$S = 2$	$S = 1$	$S = 0$

Tabela I. Valores de Spin possíveis para o Fe^{2+} e Fe^{3+} .

2.4. ESTADOS ELETRÔNICOS DO FERRO

2.4.1. ION LIVRE

Um átomo de ferro neutro tem 26 eletrons, dos quais 18 estão em camadas fechadas e 8 estão na configuração orbital $(3d)^6 (4s)^2$. Nas hemoproteínas, o ferro pode aparecer no estado trivalente (Fe^{3+} , férrico) ou divalente (Fe^{2+} , ferroso). No primeiro caso a configuração orbital é $3d^5$ e no último $3d^6$. Estas configurações tomadas junto com a vizinhança produzida pelos ligantes, formam a base para a teoria das propriedades ópticas e magnéticas das hemoproteínas.

A camada 3d consiste de 5 orbitais que podem acomodar no máximo 10 eletrons levando-se em conta seus spins paralelos e antiparalelos, como é requerido pelo princípio de exclusão de Pauli. Quando há menos de 10 eletrons, vários arranjos são possíveis, como mostrado na tabela I. A regra de Hund favorece o estado de spin mais alto como o de mais baixa energia, de forma que os estados fundamentais para $3d^5$ e $3d^6$ são respectivamente 6S e 5D .

2.4.2. FERRIHEMOPROTEÍNAS DE SPIN BAIXO

O espectro de RPE típico de ferrihemoproteínas de spin baixo é mostrado na figura 15. Os três pontos importantes são os correspondentes aos campos magnéticos associados ao início e fim do espectro e o "ponto de cruzamento" situado aproximadamente no meio, como se observa na figura 15. Estes pontos definem os três valores de g : g_x , g_y e g_z .

A existência de três valores de g amplamente distintos para o sistema $S = 1/2$, leva a duas conclusões imediatas:

- 1. A microvizinhança em torno do ferro tem simetria rômbrica, isto é, a simetria D_{4h} devida ao anel da profirina foi reduzida pelo menos para uma simetria mais baixa como D_{2h} em virtude de algum mecanismo.
- 2. A partir dos grandes desvios dos fatores- g do valor 2.00 (o valor esperado para um elétron desemparelhado num orbital isolado), conclui-se que há grandes contribuições do momento angular orbital para o momento magnético.

Fig. 15. Espectro de RPE de Ferrihemoproteínas

(a) 1ª derivada do espectro de absorção

(b) espectro de absorção

Uma boa aproximação para explicar o espectro é dada por Weissbluth (1967). O modelo assume que os três orbitais t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) estão isolados dos orbitais e_g (d_{z^2} , $d_{x^2-y^2}$) e que os cinco elétrons de valência estão localizados nestes orbitais t_{2g} , de forma que a configuração eletrônica a um elétron é $(d_{xy})^2 (d_{xz})^2 (d_{yz})$, que pode ser representada alternativamente como (d_{yz}) , ou seja, um buraco em d_{yz} . Além disso,

é postulado que estes orbitais estão sujeitos a campos ligantes assimétricos; na simetria D_{2h} a parte não esférica dos campos - ligantes pode ser decomposta numa componente axial Δ (proporcional ao campo ligante forte ao longo do eixo z) e uma componente rômica, menor, V (proporcional à diferença no campo ligante - forte, ao longo de x e y). O efeito de Δ , usualmente interpretado como um alongamento ou uma compressão no eixo z (figura 16) (perpendicular ao plano do grupo heme), é separar d_{xy} de d_{xz} e d_{yz} ; com Δ positivo, d_{xy} é estabilizado em relação aos outros orbitais (figura 16).

Fig. 16. Orbitais 3d⁵.

A componente V é uma distorção no plano, resultante da inequivalência de d_{xz} e d_{yz} , nunca é maior que $\frac{2}{3} \Delta$ porque, quando a separação entre os orbitais é igual, um tem rômica máxima. Além disso, qualquer aumento em V , leva a uma mudança qualitativa no padrão gráfico, e os eixos xy podem ser redefinidos para manter o eixo z como aquele que está associado com a maior distorção; com

$$\frac{V}{\Delta} = \frac{2}{3}$$

o sistema é dito 100% rômico.

Se o eletrão estiver confinado unicamente a d_{yz} , po-

deria não haver contribuição orbital ao momento magnético e so mente um valor-g seria observado. Entretanto, há três valores de g distintos, o que estabelece que o orbital que contém o spin desemparelhado não está exclusivamente em d_{yz} , como está implícito na figura 16, mas numa combinação linear de d_{yz} com d_{xz} e d_{xy} . Esta mistura dos três orbitais é quebrada pela interação spin-órbita, pois os três orbitais estão relacionados uns com os outros por rotações das coordenadas x , y e z .

O uso extensivo dos valores-g em análise estrutural, tem fornecido um esboço proveitoso dos princípios envolvidos, relacionando os valores-g com os parâmetros de campo ligante V e Δ .

O próximo passo é expressar as funções de onda como uma combinação linear dos três estados disponíveis:

$$\begin{aligned} |\psi^+\rangle &= a |\xi^+\rangle + ib |\eta^-\rangle + c |\zeta^+\rangle \\ |\psi^-\rangle &= a |\xi^-\rangle + ib |\eta^+\rangle + c |\zeta^-\rangle \end{aligned} \quad (2.10)$$

em que d_{yz} , d_{xy} e d_{xz} são representados por ξ , η e ζ ; a , b e c são reais, os sinais $+$ e $-$ representam o spin eletrônico. A formulação da combinação exata do orbital na equação (2.10) não é óbvia; é ditada pelo fato de que os estados são misturados por interações spin-órbita e é obtida a partir de considerações de simetria do grupo duplo destes estados, como descrito por Weissbluth (1967). Adicionalmente, as relações entre os coeficientes nas duas equações (2.10) são governadas pela regra de Kramer: $|\psi^-\rangle = i |\psi^+\rangle$.

Em 1977, Taylor propôs uma representação alternativa para o estado fundamental, o que levou a uma conveniente simplificação nas fórmulas subsequentes:

$$\begin{aligned}
 |\psi^+\rangle &= a |\xi^+\rangle - ib |\eta^-\rangle - c |\zeta^+\rangle \\
 |\psi^-\rangle &= -a |\xi^-\rangle - ib |\eta^+\rangle - c |\zeta^-\rangle
 \end{aligned}
 \tag{2.11}$$

A aplicação do operador Zeeman a $|\psi^+\rangle$ e $|\psi^-\rangle$ resulta na energia de cada um dos estados em termos de a , b e c ; então:

$$g_i = \frac{\Delta E_i}{\beta H}, \text{ com } i = x, y, z. \tag{2.12}$$

e,

$$\begin{aligned}
 g_z &= 2 [(a + b)^2 - c^2] \\
 g_y &= 2 [(a + c)^2 - b^2] \\
 g_x &= 2 [a^2 - (b + c)^2]
 \end{aligned}
 \tag{2.13}$$

Estas equações são uma consequência dos sinais de a , b e c usados na equação (2.11) e, mais particularmente da escolha que o produto $g_x g_y g_z$ seja positivo quando $a = 1$.

As relações (2.13) levam a resultados importantes: são obtidas expressões para as quantidades a, b, c, V e Δ :

$$\begin{aligned}
 a &= \frac{(g_z + g_y)}{[8(g_z + g_y - g_x)]^{1/2}} \\
 b &= \frac{(g_z - g_x)}{[8(g_z + g_y - g_x)]^{1/2}} \\
 c &= \frac{(g_y - g_x)}{[8(g_z + g_y - g_x)]^{1/2}}
 \end{aligned}
 \tag{2.14}$$

e

$$\frac{V}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_y}{g_z - g_x} \quad (2.15)$$

$$\frac{\Delta}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_z}{g_y - g_x} - \frac{1}{2} \frac{V}{\lambda}$$

V e Δ são dados em unidades da constante de acoplamento spin-órbita λ . Assim, tem-se que:

$$g_z + g_y - g_x = 2 (a + b + c)^2 \quad (2.16)$$

Utilizando a condição de normalização $a^2 + b^2 + c^2 = 1$, tem-se que:

$$\begin{aligned} g_x^2 + g_y^2 + g_z^2 - g_x g_z - g_y g_x + \\ + g_z g_y - 4 g_x - 4 g_y + 4 g_z = 0 \end{aligned} \quad (2.17)$$

Esta expressão permite calcular qualquer valor de g conhecendo-se os outros dois, o que é de particular interesse - para os grupos heme porque o valor de g em campo alto é frequentemente alargado e somente detectável em soluções muito concentradas (figura 5).

2.4.3. FERRIHEMOPROTEÍNAS DE SPIN ALTO

Quase sem exceção, a ressonância paramagnética eletrônica de ferrihemoproteínas de spin alto ($S = 5/2$) é tal como caracterizada na figura 17, com $g_{\perp} = 6$ e $g_{\parallel} = 2$.

Fig. 17. Primeira derivada do Espectro de RPE de Metamioglobina, com concentração 2,1 mM (Palmer, 1979).

Esta ressonância se origina dos estados de spin com $M_S = \pm 1/2$ que está estabilizado com relação aos outros componentes do sexteto $S = 5/2$, via mistura do estado excitado 4A_2 .

Na simetria cúbica, o estado excitado é:

$${}^4T_1 [(d_{xy} \ d_{xz} \ d_{yz})^4 \ d_{z^2}^1].$$

Este estado pode estar misturado com o estado fundamental pelas interações spin-órbita, mas o resultado é um deslocamento comum aos seis subestados de 6A . Quando a simetria do campo li-

Fig. 18. Diagramas de Campo Cristalino para Fe^{3+} Spin alto.

- a) $\frac{\Delta}{\lambda}$ grande e negativo; b) $\frac{\Delta}{\lambda}$ grande e positivo; c) $\frac{\Delta}{\lambda} \lesssim 1$.

gante é reduzida à tetragonal, 4T_1 desdobra-se em:

$${}^4A_2 (d_{xu}^2 d_{xz}^1 d_{uz}^1 d_{z^2}^1) \quad e$$

$${}^4E [(d_{xz} d_{uz})^3 d_{xu}^1 d_{z^2}^1]$$

e, em hemoproteínas, 4A_2 é o estado mais baixo, conforme pode ser observado na figura 18 (a, b, c).

A interação spin-órbita de 4A e 4E com o estado fundamental é diferente para as várias componentes de 6A tal que os estados $M_S = \pm 1/2$ ficam mais estáveis por uma quantidade - 6 D, os estados $M_S = \pm 3/2$ por 4 D e os estados $M_S = \pm 5/2$ não são deslocados, e D é dado pela seguinte expressão:

$$D = \frac{\lambda}{5} \left(\frac{1}{\Delta_1} - \frac{1}{\Delta_2} \right) \quad (2.18)$$

onde Δ_1 e Δ_2 são as energias de excitação de 6A a 4A_2 e 4E , respectivamente (figura 18), para $\Delta_2 > \Delta_1$, D é positivo; D é usualmente denominado parâmetro de desdobramento de campo zero.

A ressonância paramagnética eletrônica é observada para os subestados mais baixos, $M_S = \pm 1/2$. Com H_0 paralelo ao plano normal ao grupo heme, $g_{//} = 2$, com H_0 perpendicular à normal ao grupo heme, $g_{\perp} = 6$ (em geral, quando $D > g_e \beta H_0$, então $g_{\perp} = 2S + 1$).

Feher (1969) fornece uma maneira qualitativa para entender o valor de g na orientação perpendicular. No campo eletrostático axial forte decorrente do desdobramento de campo zero, o spin eletrônico é quantizado ao longo do eixo z do campo zero, independente da direção do campo aplicado. Quando o campo está também ao longo do eixo z, a projeção dos estados M_S sobre o campo resulta nos valores $\pm 1/2$ e $g = 2$. Entretanto, quando

o campo aplicado é perpendicular a z , a projeção do spin sobre H é muito maior, a interação do spin com H também é maior, e este aumento na energia de interação leva a um valor mais alto de g , especificamente $g = 6$.

Se a simetria local é reduzida de tetragonal à rômbica, a distorção resultante no plano do grupo heme pode resultar energias diferentes de d_{xz} e d_{yz} , e o nível 4E se desdobra nas componentes E_x e E_y . Isto resulta em correções posteriores às energias dos subestados 6A quando o campo magnético está ao longo dos eixos x e y do grupo heme. A interação total é usualmente escrita como:

$$D S_z^2 + E (S_x^2 - S_y^2)$$

A fórmula para D permanece a mesma que antes se Δ_2 é tomado como a média das energias de E_x e E_y (vide figura 18); a fórmula para E é:

$$E = \frac{\lambda^2}{10} \left(\frac{1}{\Delta x} - \frac{1}{\Delta y} \right) \quad (2.19)$$

onde Δx e Δy são as energias de excitação de 6A_1 a E_x e E_y respectivamente.

As expressões resultantes para os valores de g na presença de uma distorção rômbica são (Palmer, 1979):

$$g_{x, y} = 6,01 \pm 24 \frac{E}{D} - 18,7 \frac{E^2}{D^2} \quad (2.20)$$

$$g_z = 2,00 - 33,8 \frac{E^2}{D^2}$$

de forma que:

$$\frac{E}{D} = \frac{g_x - g_y}{48} \quad (2.21)$$

escolhendo os eixos de forma que $\frac{E}{D} \leq 0,33$, pode-se definir:

$$\% \text{ Rombicidade} = \frac{g_x - g_y}{16} \times 100 \quad (2.22)$$

Peisach et al. (1971) determinaram desta forma o grau de rombicidade de uma variedade de ferrihemoproteínas de spin-alto. Os valores observados na maioria das proteínas estão num intervalo de rombicidade menor que 20% ($g_x - g_y \leq 3$). Os mecanismos específicos, mecânicos ou elétricos, responsáveis por estas variações na rombicidade não são claros ainda, mas o fenômeno propriamente dito tem sido usado na detecção da interação "heme-heme" em estados misturados da oxihemoglobina.

C A P Í T U L O I I I

*"ÓXIDO NÍTRICO: UMA Sonda PARA O ESTUDO DE
HEMOPROTEÍNAS"*

3.1. INTRODUÇÃO

Desde que a ressonância paramagnética eletrônica foi introduzida para o estudo de moléculas de interesse biológico, a hemoglobina e a mioglobina tem sido as metaloproteínas mais extensivamente estudadas. Em adição à determinação da orientação do grupo heme com relação aos eixos cristalográficos, tem sido obtidas informações detalhadas tais como a ordem dos níveis de energia na camada d do ferro, a simetria do campo elétrico que o circunda, e a mudança na sua configuração eletrônica como um resultado da desnaturação da proteína (Kon, 1968). Estas investigações, entretanto, tem sido feitas quase que exclusivamente em metaloproteínas e seus derivados, nos quais o ferro está oxidado (Fe^{3+}) e não poderia ligar moléculas de oxigênio. Pouco conhecimento tem sido obtido no que concerne ao estado eletrônico da hemoglobina ou a natureza da ligação ferro-oxigênio.

As formas ferrosas das hemoproteínas são de grande interesse porque se assemelham muito à forma oxigenada tanto da hemoglobina como da mioglobina, mais do que as formas férricas.

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica tem sido aplicada ao estudo do produto da reação de hemoproteínas com óxido nítrico (NO), que é paramagnético. Os espectros de RPE de derivados de NO de hemoproteínas Fe^{2+} apresentam variações de acordo com a espécie da proteína (Kon, 1968, 1969; Yonetani et al., 1972) e mostram as perturbações na estrutura nativa da proteína. Assim, a vizinhança eletrônica do ferro em várias hemoproteínas e em complexos com o grupo heme tem sido investigados, utilizando o óxido nítrico como uma sonda paramagnética (Kon & Kataoka, 1969; Yoshimura et al., 1979; Yonetani et

al., 1972; John & Waterman, 1979; Chien, 1969; Kon, 1968, 69, 75; Dickinson & Chien, 1971; Nagai et al., 1978; Maxwell & Caughey, 1976).

O óxido nítrico, como a molécula de oxigênio, liga-se ao ferro ocupando a 6ª posição de coordenação, ficando o ferro octaedricamente coordenado, e da mesma forma que o O_2 o NO se liga formando uma dobra ($\angle Fe - N - O \approx 110^\circ$; Chien, 1969). Além disso, os compostos heme ferrosos com NO são paramagnéticos, ao contrário do caso em que os ligantes são O_2 ou CO, é possível realizar estudos através de RPE. A maioria destes estudos em nitrosilhemoproteínas tem sido feitos em soluções congeladas e dois tipos de espectros tem sido observados.

Morse & Chan (1980) estudaram a dependência com a temperatura do espectro de RPE da solução congelada de nitrosilmioglobina (MbNO). No espectro assim obtido é possível detectar a presença de duas espécies, uma com tensor-g rômico, conhecida como tipo I, (2,080, 1,998, 1,979) e outra com tensor - g axial, conhecida como tipo II (2,041, 1,983).

Hori et al. (1981) fizeram os mesmos estudos em cristal, e obtiveram o tensor-g rômico a baixa temperatura (2,076, 2,002, 1,979) bem como o tensor hiperfino completo (15, 17, 19 G) para o tipo I. O tipo II não pode ser totalmente descrito.

O espectro à temperatura ambiente fornece um tensor-g diferente (2.050, 2.022, 1,993) e um tensor hiperfino A (^{14}N) - não coincidente (10,8, 14,6, 18,6 G). O desdobramento hiperfino do ^{14}N se faz ao longo da direção de g_{min} , direção da ligação Fe - N (NO), em todos os casos. Isto tem implicações importantes para o estudo na vizinhança do grupo heme quando a amostra é congelada. Entretanto, com base na estrutura eletrônica do complexo, que será discutida na seção seguinte, e nas varia-

ções dos valores de g com o ângulo, a conclusão de que a direção de g_{min} é a da ligação Fe - N (NO) não parece ser correta. Mais ainda, como g_{max} ($= g_x$) está ao longo do eixo único b do cristal, ele é o mesmo nos dois sistemas de coordenadas do grupo heme, mas dependendo de como seja feita a denominação dos tensores de RPE, as direções de g_y e g_z podem ser invertidas. Estes argumentos, citados em vários trabalhos (Hori et al., 1981; Dickinson & Chien, 1971, 1973; Yonetani et al., 1972; Yoshimura et al., 1979) são discutidos a seguir.

3.2. ESTRUTURA ELETRÔNICA

Os estudos de RPE estabelecem que os eletrons desemparelhados estão fortemente ligados ao átomo metálico, com uma delocalização relativamente menor em relação à porfirina e à histidina. Entretanto, para os derivados NO e O₂ há várias estruturas alternativas, algumas das quais consideram uma ampla delocalização em direção aos ligantes.

A seguir serão expostos quatro modelos eletrônicos, com enfoque no orbital do eletron desemparelhado.

1. Modelo $\pi^*(NO)$ (Trittelvitz et al., 1975)

Neste modelo a contribuição orbital $\pi^*(NO)$ é considerada maior que a do orbital d_{yz} (Fe). O diagrama de orbitais moleculares proposto pelos autores é apresentado na figura 19.

Fig. 19. Diagrama de Orbitais Moleculares proposto para o modelo π^* (NO).

2. *Modelo* $\pi^* (d_{yz})$ (Dickinson & Symons, 1983)

Este modelo é o mesmo que o anterior, mas a contribuição do orbital $d_{yz}(\text{Fe})$ é maior que a do $\pi^*(\text{NO})$.

3. *Modelo de Doetschman* (Doetschman et al., 1980)

Este modelo envolve uma mistura de quase todos os níveis possíveis, ou seja $\pi_y^* (0,18)$, $\pi_z^* (0,35)$, $d_{xz} (0,23)$, $d_{xz} (0,24)$. Para poder explicar a grande constante de acoplamento hiperfino do $^{14}\text{N}(\text{NO})$ admite também uma mistura do nível $\sigma(\text{NO})$ aos outros já mencionados.

4. *Modelo* σ^* (Mun et al., 1979)

Os autores estudam as distribuições eletrônicas em oito diferentes formas estruturais com o intuito de explicar as mudanças na interação hiperfina do ^{14}N , observadas com a transição da estrutura R à T da nitrosilhemoglobina. Esta transição é provocada pelo inositolhexafosfato (IHP) ou pela variação de pH.

Quatro das oito formas estudadas (tabela II) consideram o N_{prox} , do imidazol proximal, protonado e deprotonado, com as estruturas do grupo $\text{Fe} - \text{N} - \text{O}$, linear e em dobra (figura 20).

Duas outras formas possuem a estrutura $\text{Fe} - \text{N} - \text{O}$ linear e a distância $\text{Fe} - \text{Imidazol}$ aumentada em 0,5 e 1,0 Å.

Os outros dois sistemas estudados são pentacoordenados, com a ligação $\text{Fe} - \text{N} - \text{O}$ em dobra e linear.

Fig. 20. Modelo usado para calcular a função de onda eletrônica do sistema nitrosilhemoproteína.

Os estudos mostram que os arranjos dos níveis de energia não diferem significativamente de uma estrutura para outra e que o eletron desemparelhado sempre ocupa um orbital antiligante d_{z^2} , com pequena delocalização para o orbital $N(\sigma)$ do N_E e uma grande delocalização para o orbital $NO (\sigma, \pi)$ (figura 21).

Fig. 21. Estrutura Eletrônica mais satisfatória em termos dos parâmetros de RPE

Fe - N - O	Diferenças	
linear	N_{prox} : protonado	1º Sistema
dobra	deprotonado	
linear	deprotonado	
dobra	protonado	
linear	Fe - Im + 0,5 Å	2º Sistema
linear	Fe - Im + 1,0 Å	
linear	Pentacoordenado	3º Sistema
dobra	Pentacoordenado	

Tabela II. Os três sistemas propostos para estudar as diferentes formas estruturais de nitrosilhemoproteínas.

O primeiro sistema (tabela II) poderia explicar a existência de um padrão hiperfino com 9 linhas decorrentes da interação hiperfina do ^{14}N do grupo NO e o átomo N_ϵ do imidazol proximal.

Já para o segundo sistema, um aumento do comprimento da ligação Fe - Im produz uma sensível diminuição na interação hiperfina do $^{14}\text{N}_\epsilon$, indicando que um aumento maior que 1,0 Å, poderia gerar um padrão hiperfino com 3 linhas, semelhante ao encontrado para o sistema pentacoordenado, ou seja, o 3º sistema (tabela II).

O modelo mais adequado

A razão para esta proliferação de modelos é o fato que os resultados de RPE são complexos, especialmente quando as direções dos vários componentes tensoriais são levados em conta. Entretanto, há certos aspectos dos resultados que fortalecem a proposição de que o modelo σ^* é o mais correto:

- a) Os deslocamentos de g (g -shifts) são pequenos. Quase todos os complexos com estruturas tipo d_{xz}^1 exibem g -shift grande.
- b) O valor grande de A_{iso} (^{14}N) é típico de uma estrutura σ^* .
- c) A pequena constante de acoplamento hiperfino anisotrópica para N_e também favorece mais a hipótese de uma interação σ que uma π . A pequena intensidade de A_{iso} (cerca de 7 G) mostra que a delocalização em direção a este ligante é pequena, o que indica que provavelmente a ligação seja fraca. Isto, por sua vez pode explicar porque esta ligação é relativamente fácil de ser quebrada na mudança $R \rightleftharpoons T$.
- d) O g -shift negativo. A existência de um pequeno g -shift negativo tem sido tomada como uma evidência clara contra a estrutura σ^* . Entretanto, no trabalho de Mun et al. (1979) sugere-se que os níveis π^* e σ^* estão relativamente próximos um do outro e, nesse caso, um g -shift negativo decorre naturalmente de um acoplamento entre eles.

Alguns argumentos contra os modelos (1) e (2)

O argumento principal contra o modelo ($\pi^*: d_{yz}$) é a pequena magnitude de Δg , já que para este tipo de estrutura seria esperado g-shift grande. A única maneira de explicar os pequenos g-shifts observados seria postular uma densidade de spin muito baixa sobre o ferro e isto leva à estrutura 1, modelo ($\pi^*: NO$). Se o eletrão desemparelhado está num nível π^* puro sobre o NO, o acoplamento hiperfino do ^{14}N deveria tender na direção do próprio NO, sendo requeridas constantes de acoplamento hiperfino isotrópicas pequenas e anisotrópicas relativamente grande, contrariamente ao observado.

Conclue-se então que a estrutura do modelo σ^* , ainda que simples, explica satisfatoriamente os resultados obtidos - com os derivados nitrosilados.

3.3. MECANISMO DE REAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO COM HEMOPROTEÍNAS

Keilin & Hartree (1937), realizando experimentos ópticos com oxi e meta hemoglobina, mostraram que o óxido nítrico combina-se com ambas as formas da hemoglobina. Com a oxihemoglobina, o composto formado é estável, sendo difícil reobter a hemoglobina livre de NO. Com a metahemoglobina, entretanto, o composto formado não é estável, sendo que o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} e o composto resultante é igual ao obtido com a oxihemoglobina, como está representado na figura 22.

Fig. 22. O óxido nítrico como redutor do ferro na metahemoglobina.

As evidências de que o composto formado pela adição de NO à oxi-Hb e meta-Hb é o mesmo são resumidas a seguir:

- ambos compostos apresentam o mesmo espectro eletrônico;
- os espectros de RPE, à temperatura ambiente, das soluções das Nitrosilhemoglobinas em tampão fosfato são superponíveis;
- os espectros de RPE das amostras policristalinas, à $T = -195^{\circ}\text{C}$, concordam em todos os detalhes;
- os sinais de RPE dos monocristais dos dois compostos apresentam os mesmos valores de g e A ;
- os dois compostos cristalizam no sistema monoclinico, com igual cela unitária.

Sem dúvida que todos estes resultados (Chien, 1969a) são um forte suporte para a suposição de que o mesmo composto NO Hb é formado na reação do NO com oxi ou metahemoglobina.

Mais ainda, a reação de Methb com NO deveria dar uma molécula diamagnética com spin emparelhado, derivado de um Fe^{3+} spin baixo, ou uma molécula com $S = 2$ derivado de um Fe^{3+} spin alto. Dado que o teorema de Kramer não se aplica ao sistema $S = 2$ (spin par), o campo ligante poderia remover todas as de-

generescências na ausência do campo magnético. A aplicação do campo magnético simplesmente deslocaria as energias relativas de todos os níveis não degenerados, de modo que seria muito difícil observar sinal de RPE a menos que dois níveis estivessem suficientemente próximos como para que ocorresse a absorção de um foton de microonda. A deoxi Hb, uma molécula com $S = 2$, - não apresenta sinal de RPE, o que é mais um subsídio para a afirmação de que a nitrosilhemoglobina (ou nitrosilmioglobina) paramagnética obtida à partir da met-Hb (ou met-Mb) não pode ser met-Hb NO (ou met-Mb NO).

A reação da proteína diamagnética com NO deveria dar um estado fundamental com $S = 1/2$ (campo forte) ou $S = 3/2$ (campo fraco), ambos paramagnéticos. O estado de spin alto deveria ter um tempo de relaxação spin-rede curto, sendo difícil a observação de sinal de RPE, exceto a muito baixas temperaturas. A observação de espectros de RPE à temperatura ambiente, com uma intensidade correspondente a um spin desemparelhado, mostra que ambos produtos de reação são nitrosil-ferroso-Hemoglobina de spin baixo.

O mecanismo proposto para a reação da Met-Hb (ou Met-Mb) com NO é o seguinte (Ehrenberg & Szczepkowsky, 1960; Chien, 1969a):

Observa-se que, no mecanismo proposto, para cada (heme Fe^{3+}) são necessárias 2 moléculas de NO para que a reação ocorra totalmente, isto é, para que ocorra a redução do ferro e a formação da nitrosil-ferroso-heme.

C A P Í T U L O I V

"MATERIAIS E MÉTODOS"

4.1. PREPARAÇÃO DA MIOGLOBINA DE APLYSIA BRASILIANA

O molusco *Aplysia Brasiliana* é encontrado nas praias da região norte do Estado de São Paulo. A mioglobina foi extraída da massa bucal, após a decapitação dos animais. O músculo radular é então mantido em recipientes com gelo.

A mioglobina é preparada através do procedimento originariamente descrito por Rossi-Fanelli & Antonini (1957) com as alterações sugeridas por Wittemberg et al. (1965).

O músculo é triturado em tampão fosfato (pH = 8,0) e a mistura homogeneizada. A suspensão permanece em repouso em banho de gelo durante 6 horas, com intermitentes agitações. A mioglobina em solução é separada por centrifugação. A solução de mioglobina é fracionada sucessivamente com sulfato de amônio sólido, pulverizado a 50, 60 e 65% de saturação respectivamente. O pH é estabilizado em 7,0 pela adição de hidróxido de amônia; a temperatura é mantida a 0 °C durante todo o processo. Após cada adição, a solução permanece em repouso por 30 minutos. Finalmente a Mb é obtida por fracionamento com sulfato de amônio 95% de saturação e o precipitado mais uma vez é separado por centrifugação durante 30 minutos a 5000 rpm e à 0 °C. Este material é diluído num volume mínimo de água e dializado exaustivamente para a eliminação de sal.

A mioglobina, parcialmente purificada pelo método acima descrito, é cromatografada em coluna de Dietilamina etil (DEAE) celulose. Por eletroforese em gel de poliacrilamida e focagem isoelétrica, é determinada que a fração IV, maior componente cromatográfico hemoproteico, é homogênea. O padrão eletroforético é o de proteína pura. O ponto isoelétrico está inserido no intervalo 4,50 e 4,75 de pH. A mioglobina assim obtida, e que está na

forma aquo-meta, foi a utilizada neste trabalho.

Uma descrição mais detalhada do procedimento de extração e purificação da mioglobina de *Aplysia brasiliana* pode ser encontrada no trabalho de Say (1980).

4.2. PREPARAÇÃO DA ERITROCRUORINA DE "ANNELIDAE GLOSSOSCOLEX PAULISTUS"

Espécimes da minhoca *Glossoscolex paulistus*, pesando $15,2 \pm 2,7$ g, foram coletadas em Rio Claro, Estado de São Paulo, e mantidas a 24 ± 2 °C no solo do sítio em que foram coletadas. Todas as minhocas foram usadas num intervalo de 10 dias após a coleta.

O sangue é extraído da artéria dorsal. A solução de eritrocruorina é obtida pela diluição do sangue em 2 volumes de tampão fosfato 0,1 M contendo EDTA 1 mM, pH = 7,2. O precipitado é separado após centrifugação à 16000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante é dializado contra o mesmo tampão. A eritrocruorina é precipitada por centrifugação 250.000 g (Beckman). O agregado é dissolvido em tampão fosfato e centrifugado duas vezes nas mesmas condições. A eritrocruorina assim obtida é então estocada a 4 °C.

4.3. MIOGLOBINA DE CAVALO

Foi utilizada mioglobina de coração de cavalo, tipo III, liofilizada, com o ferro no estado férrico, da Sigma Chemical Co.

As soluções foram preparadas utilizando água destilada e deionizada e filtradas através de filtro poroso.

4.4. MIOGLOBINA DE CACHALOTE

Foi utilizada mioglobina de músculo do esqueleto de Cachalote, tipo II, liofilizada, com ferro no estado férrico, - da Sigma Chemical Co.

As soluções foram preparadas usando água destilada e deionizada e filtrada através de filtro com placa porosa.

4.5. PREPARAÇÃO DO GÁS NO

O gás NO foi obtido à partir da reação de ácido nítrico com cobre metálico. segundo a reação:

O arranjo experimental para a produção de NO é mostrado na figura 23. O sistema é deaerado e deixa-se gotejar ácido nítrico (30%) sobre o cobre. O gás proveniente da reação passa por uma armadilha de água deoxigenada para lavagem e, finalmente o gás NO é armazenado num balão de vidro.

4.6. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NITROSILHEMOPROTEÍNAS

A solução de hemoproteína é colocada num tonômetro, ao qual está preso um tubo de quartzo (ambos previamente deaerados) no qual são efetuadas as medidas de RPE. É feito vácuo (10^{-2} Torr) no sistema e em seguida injetado o gás NO. em quantidades diferentes dependendo do experimento. O tonômetro com a solução é então agitado por 10 minutos ou não, dependendo do estudo a ser feito. Em seguida, a amostra é passada para o tubo de quartzo.

Fig. 23. Arranjo experimental para a produção de gás NO.

Para diminuir a possibilidade de qualquer interferência, a amostra é previamente deaerada e lavada com gás N_2 e novamente deaerada. O gás N_2 , obtido de cilindros da White Martins, é previamente deoxigenado.

4.7. MEDIDAS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de RPE foram realizadas num espectrômetro Varian série "E-Line Century", modelo E-109, banda X (9 GHz), - 100 kHz de frequência de modulação, equipado com cavidade retangular Varian "Multi-Purpose (E-231)".

As condições de medida foram: 20 mW de potência de microondas, 2 G_{pp} de amplitude de modulação.

Para as medidas em que a temperatura foi variada, utilizou-se um controlador de temperatura Varian E-257/WL.

As amostras foram colocadas, conforme a necessidade em celas planas de quartzo ou em tubos de quartzo.

A temperatura foi medida com um termopar cobre-constantan colocado junto à amostra e conectado a um termometro digital Fluke-2100-A.

4.8. MEDIDAS DE pH

Para as medidas de pH, utilizou-se um pH-metro Ambriex, equipado com eletrodo semi-micro que permite medidas em no mínimo 0,1 ml de solução.

4.9. TAMPÕES

Foram utilizados os seguintes tampões:

- pH entre 2,2 e 8,0 : misturas de HNO_3 0,5M e Na_2HPO_4 0,5 M
- pH entre 7,8 e 10,0: misturas de ácido bórico 0,5 M e H_3PO_3 0,5 M
- pH entre 11,0 e 12,0 : Na_2HPO_4 0,5 M.

4.10. FERRICIANETO DE POTÁSSIO

Devido ao fato de já ter sido observado que as mioglobinas de Cavalo e de Cachalote apresentam uma mistura de proteína na forma oxí e na forma meta (Lamy e cols., 1976); nesses casos, adicionou-se Ferricianeto de Potássio $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, à solução de mioglobina (meta) a fim de que todo o ferro existente na solução estivesse na forma fêrrica. Após a adição do ferricianeto de potássio, a solução foi passada em coluna de Sephadex G-25 e centrifugada por 20 min., de forma a retirar o excesso de ferricianeto. Esta oxidação foi acompanhada por medidas espectrofotométricas e por RPE.

4.11. MEDIDAS DE ABSORÇÃO ÓPTICA

As medidas foram realizadas num espectrofotômetro marca Shimadzu, Double Beam, UV-180.

C A P Í T U L O V

"R E S U L T A D O S"

5.1. MIOGLOBINAS DE CAVALO E CACHALOTE

Nos experimentos realizados com as metamioglobinas, foram variados um ou mais dos seguintes parâmetros:

- a. temperatura
- b. pH
- c. Tempo de reação com o NO
- d. concentração de NO (C_{NO})
- e. concentração da solução de mioglobina (C_{Mb}).

Como era razoável esperar, devido à igualdade da esfera de coordenação do ferro, os espectros para as mioglobinas de cavalo e cachalote são, em idênticas condições, iguais. Isto pode ser claramente observado nas figuras 24 e 25 e 27 e 28 que mostram a dependência dos espectros com a temperatura.

Os resultados obtidos em diversos experimentos são expostos a seguir.

5.1.1. *O espectro de MbNO*

5.1.1.a. Se a concentração de NO é suficiente para saturar a solução, o que significa que todas as moléculas estão sob a forma de MbNO, o espectro é uma linha larga, com simetria aproximadamente rômica, como pode ser observado nas figuras 24, 25 e 34 (páginas 78, 79 e 89).

5.1.1.b. Se a concentração de NO é tal que há grupos heme que não possuem NO ligado, o espectro apresenta características diferentes das apresentadas no item 5.1.1.a. Na figura 26 são observados os espectros de RPE obtidos das soluções congeladas de mioglobina com concen-

trações decrescentes de NO, partindo da condição de saturação (fig. 26a) até uma concentração tal que o espectro obtido se assemelha ao da deoxi HbNO (Louro et al., 1979, 1981).

Em todos os casos observa-se o sinal de Fe^{3+} em valores de g iguais a 6,106 e 4,421 (figura 26f), embora a intensidade relativa entre os dois sinais seja diferente.

5.1.2. *Espectros com igual forma*

Como foi ressaltado no início, obtêm-se espectros de igual forma em idênticas condições, mas é possível obter espectros de igual forma em diferentes condições como, por exemplo, diferentes concentrações de NO e diferentes valores de pH. A forma dos espectros das figuras 27 e 26c (aproximadamente 110K) são iguais, sendo que foram obtidos de soluções onde as relações molares NO:Mb eram aproximadamente 1:2 e 1:1 e os pH=4,7 e 7,0 respectivamente.

5.1.3. *Diferentes valores de pH*

Em condições idênticas e diferentes valores de pH, a intensidade do sinal e a relação sinal/ruído são diferentes e isto pode ser observado comparando-se os espectros obtidos a pH 4,6 (fig. 28) e pH=9,6 (fig. 29). Sendo que a relação sinal/ruído é 10/1 (pH=4,6) e 32/1 (pH=9,6) e as intensidades do sinal são 5 e 16 respectivamente.

5.1.4. *A reação do NO*

Se o NO é adicionado sem que se agite a solução, ver₁

fica-se que o espectro vai mudando com o tempo até que todo o NO disponível tenha reagido com a MB. Na fig. 30 podem ser observados os espectros de MbNO 1,2,4 e 5 minutos após a adição do NO, sendo que foi colocado uma quantidade de NO tal que NO: Mb = 4:1. Uma comparação qualitativa destes espectros com os da figura 26 mostra que a percentagem de saturação muda com o tempo e posteriormente foi feita uma análise quantitativa dos resultados.

5.1.5. *Diferentes concentrações de Mb*

Para diferentes concentrações da solução de mioglobina, mantidos os outros parâmetros constantes, inclusive a relação NO/Mb, foram obtidos espectros com formas iguais, porém com intensidades de linha diferentes (figuras 31, 32 e 33).

5.1.6. *Diferenças entre os espectros das soluções de Mb saturadas e não saturadas com NO*

Se a concentração de NO é suficiente para saturar a solução, a forma da linha não muda significativamente com a temperatura (fig. 34) ao passo que se a quantidade de NO é menor que a necessária para a saturação, a forma do espectro varia com a temperatura (figs. 27, 28 e 29). Sendo que a mudança é reversível.

5.1.7. *O sinal de Fe^{3+}*

A monitoração do sinal de Fe^{3+} (g-6) numa solução com NO:MB = 2:1 e agitada, permite verificar que à medida que este sinal diminui, o sinal de RPE em g-2 aumenta (figs. 35 e 42).

5.1.8. *Digitalização de espectros*

Digitalizando os espectros de RPE obtidos nos extremos das concentrações de NO, figuras 26a e 26e, e combinando-os entre si em diferentes proporções é possível reproduzir os outros espectros da figura 26 (figura 36), bem como calcular a fração de cada tipo (a ou e) necessária para obter outro espectro.

Na tabela III são apresentados os parâmetros de RPE obtidos à 110K das mioglobinas de Cavalo e Cachalote, que como foi mencionado na seção 5.1 são idênticos.

Tabela III. Parâmetros de RPE para MbNO de Cavalo e Cachalote, em função da % de NO.

Os resultados são mostrados a seguir nas figuras de 24 a 36.

5.1.9. *Adição de Ferricianeto de Potássio à Solução de Mb*

5.1.9.a. *Espectro óptico*

Foram preparadas soluções de Mb de Cavalo e de Cachalote, ambas em concentrações 0,05 mM. A Absorção óptica foi medida em 638 nm, que representa uma das bandas características da metMb. Os valores obtidos antes e após a adição de ferricianeto são tabelados abaixo:

$K_3 [Fe(CN)_6]$	Absorbância	
	Mb Cavalo	Mb Cachalote
sem (antes)	0,179	0,141
com (depois)	0,205	0,161

Observa-se que há um aumento de cerca de 14% no valor da absorbância após a adição de ferricianeto de potássio. Isto significa que existia 12,5% de Mb na forma oxi tanto na Mb de Cavalo como de Cachalote.

5.1.9.b. *Espectros de RPE*

i. solução de ferricianeto de potássio

As soluções branco de ferricianeto de potássio, com e sem NO não apresenta, sinal de RPE na região de interesse.

ii. solução de Mb + $K_3[Fe(CN)_6]$

Observa-se que o sinal de Fe^{3+} em $g = 5,72$ cresce cerca de 13% após a adição de ferricianeto de potássio, conforme pode ser visto abaixo:

iii. solução de Mb + $K_3 Fe(CN)_6$ + NO

O NO foi adicionado gradativamente à solução de Mb + $K_3 Fe(CN)_6$. Após a primeira adição (0,2 NO/Mb), observa-se que ocorre uma redução do sinal do Fe^{3+} e um pequeno aumento do sinal em $g \sim 2$, com a forma de uma linha larga. Quando a relação NO/Mb passa para 1,35 NO/Mb, o sinal de Fe^{3+} fica reduzido cerca de 50% e o sinal em $g \sim 2$ cresce significativamente, sempre conservando a forma de linha larga (não aparecem sinais do triplete).

.77.

Mb + Ferricianeto + NO

Fig. 24. Espectros de RPE de MbNO de Cachalote em diferentes temperaturas, pH = 7,0, $C_{Mb} = 3\text{mM}$, 20 mW de potência de micro-ondas, 2 G de amplitude de modulação, 1,8 NO/Mb

Fig. 25. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 7,0, $C_{Mb} = 3\text{mM}$, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação, 1,8 NO/Mb

Fig. 26. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, com diferentes concentrações de NO, 110,0 K, pH = 7,0, $C_{Mb} = 1$ mM, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação.

f) Espectro de RPE do Fe^{3+}

Fig. 27 Espectros de RPE de MbNO de Cachalote, em diferentes temperaturas, pH = 4,7, $C_{Mb} = 1$ mM. 20 mW de potência de microondas, 2G de amplitude de modulação, 0,5NO/Mb

Fig. 28. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 4,6, C_{Mb} = 1mM, 20 mW de potência de microondas, 2G de amplitude de modulação, NO:Mb = 0,5:1

Fig. 29. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo em diferentes temperaturas, pH = 9,6, $C_{Mb} = 1\text{mM}$, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação, NO Mb = 0,5/1

Fig. 30. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 113 K, pH = 7,0, $C_{Mb} = 1$ mM, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação. A solução não foi agitada após a adição de NO. Tempo de reação: a) 1 minuto; b) 2 min c) 4 min e d) 5 min.

Fig. 31. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, pH = 7,0, 20 mW de potência de microondas, 2G de amplitude de modulação, 2 NO/Mb

a) $C_{\text{Mb}} = 1\text{mM}$

b) $C_{\text{Mb}} = 0,1 \text{ mM}$

Fig. 32. Espectros de RPE de MbNO de Cachalote, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, pH = 7,0, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação, 1,9 NO/Mb

a) $C_{\text{Mb}} = 0,1 \text{ mM}$

b) $C_{\text{Mb}} = 1 \text{ mM}$

c) $C_{\text{Mb}} = 3 \text{ mM}$

Fig. 33. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 110 K, com diferentes concentrações de proteína, pH = 7,0, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação, 60% de saturação de NO.

a) $C_{\text{Mb}} = 0,1 \text{ mM}$

b) $C_{\text{Mb}} = 1 \text{ mM}$

c) $C_{\text{Mb}} = 3 \text{ mM}$

Fig. 34. Espectro de RPE de MbNO de Cavalo, em diferentes temperaturas, pH = 7,0, 2 NO/Mb, 20 mW de potência de microondas, 2G de amplitude de modulação.

Fig. 35. Espectros de RPE de MbNO de Cavalo, 113,0 K, pH = 7,0
20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação

- a) $t = 0$, sinal do ferro antes de adicionar NO à solução, $G = 6,3 \times 10^3$; b) 5min; c) 15min; d) 3h40min
e) 5h.

Fig. 36. Espectros obtidos misturando os espectros correspondentes às espécies A e B em diferentes proporções. O espectro VIII, corresponde ao espectro experimental *e* (figura 26), obtido com 20 μ l de NO (0,2 NO/Mb).. O espectro I, corresponde ao espectro experimental *a* (figura 26), obtido com 200 μ l de NO (2 NO/Mb).

5.2. ERITROCRUORINA DE "ANNELIDAE GLOSSOSCOLEX PAULISTUS"

Na figura 37 são apresentados os espectros de RPE da solução de nitrosileritrocruorina de *Annelidae Glossoscolex paulistus* (EcNO AGp), preparada da maneira descrita na seção 4, obtidos em diferentes temperaturas e pH = 7,0.

Uma análise da figura 37 revela que os espectros variam com a temperatura e que no intervalo estudado, de 103,0 a 309,3 K, correspondem a uma mistura de duas espécies em equilíbrio, sendo que os espectros obtidos nos extremos do intervalo correspondem à espécie I (103,0 K) e II (309,3 K).

5.2.1. A espécie I (103,0 K)

O espectro de RPE (figura 38a) apresenta desdobramento superhiperfino com 9 linhas e simetria aproximadamente rôm-bica ($g_{xx} \neq g_{yy} \approx g_{zz}$). Para o sinal em campo baixo, o valor de g_{xx} é determinado no máximo da ressonância e é igual a 2,078. Tanto para o sinal centrado em g_{xx} como em g_{yy} não se observa desdobramento hiperfino. Para o sinal centrado em $g_{zz} = 2,006$ verifica-se a existência de um desdobramento superhiperfino com 9 linhas (um triplete de tripletes). A constante de desdobramento para o triplete maior é igual a 24,5 G e 6,5 G para o triplete menor. A largura de linha (pico a pico) é igual a 146,3 G.

Um resumo dos valores dos diferentes parâmetros encontra-se na tabela IV.

5.2.2. A espécie II (309,3 K)

O espectro de RPE da espécie II (figura 38b) apresenta uma linha larga na qual foram determinados os valores g_A e g_B no máximo e mínimo da ressonância, respectivamente. A largura de linha (pico a pico) é igual a 73 G.

Na tabela IV encontra-se um resumo dos valores dos diferentes parâmetros de RPE.

ESPECIE I (103,0 K)	ESPECIE II (309,3 K)
$g_{xx} = 2,078$	$g_A = 2,041$
$g_{yy} = 1,982$	
$g_{zz} = 2,006$	$g_B = 2,004$
$a_{NO} = 24,0 \text{ G}$ $a_{N_e} = 6,5 \text{ G}$ $\Delta H_{NO}(\text{intrínseco}) = 18,5 \text{ G}$ $\Delta H_{N_e}(\text{intrínseco}) = 5,5 \text{ G}$ $\Delta H = 146,3 \text{ G}$	$\Delta H = 73,0 \text{ G}$

Tabela IV . Parâmetros de RPE para EcNO AGP.

Fig. 37. Espectros de RPE de EcNO AGP, em diferentes temperaturas, pH = 7,2, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação.

Fig. 38. Espectro de EcNO AGP à 103,0 e 309,3 K.

5.3. MIOGLOBINA DE "APLYSIA BRASILIANA"

Os espectros de RPE das soluções de nitrosilmioglobina de *Aplysia brasiliana* (MbNO Apb), preparadas da forma descrita na seção 4, obtidos em diferentes temperaturas e dois valores de pH, são apresentados nas figuras 39 e 40 (pH = 7,32) e na figura 41 (pH = 4,6).

Analisando a figura 39 verifica-se que a variação de temperatura não produz modificações significativas na forma da linha. Apenas a relação de intensidades e a largura de linha diminuem com o aumento da temperatura, fazendo com que o desdobramento superhiperfino que é bem evidente a 113,7 K, quase não possa ser observado a 283,3 K

Uma análise mais detalhada do espectro obtido a 113,7 K (figura 40) mostra que este apresenta simetria próxima da rômica, com $g_{xx} = 2,087$, $g_{yy} = 1,983$ e $g_{zz} = 2,007$, e que nem o sinal em campo baixo, nem o centrado em g_{yy} apresentam estrutura hiperfina. Para o sinal centrado em $g_{zz} = 2,007$, o espectro apresenta um desdobramento superhiperfino com 9 linhas, com constantes de desdobramento iguais a 22,0 G (para o triplete maior) e 6,8 G (para o triplete menor). A largura de linha (pico a pico) é igual a 158,8 G. A 283,3K, obteve-se os valores $g_{xx} = 2,070$ e $g_{zz} = 2,018$, e a largura de linha igual a 112,5 gauss.

Em pH = 4,6. o comportamento com relação à temperatura é similar ao da solução em pH = 7,2. Uma análise do espectro a 115,5 K (figura 41) revela que é similar ao obtido em pH = 7,32 a não ser pela relação sinal/ruído, que é maior em pH mais baixo. Os parâmetros de RPE para este espectro são $g_{xx} = 2,085$, $g_{yy} = 1,980$, $g_{zz} = 2,007$, $a_{NO} = 21,0$ G e $a_{N_\epsilon} = 6,5$ G.

Um resumo dos resultados obtidos para MbNO Apb pode ser encontrado na tabela V.

pH	7,32		4,60
T	113,7 K	283,3K	115,5 K
g_{xx}	2,087	2,070	2,085
g_{yy}	1,983	1,982	1,980
g_{zz}	2,008	2,018	2,007
a_{NO}	22,4 G	22,4 G	21,0 G
$a_{N_{\epsilon}}$	6,8 G		6,5 G
ΔH_{pp}	158,8 G	155,0 G	112,5 G
$\Delta H_{NO}(\text{intrínseco})$	18,4 G		
$\Delta H_{N_{\epsilon}}(\text{intrínseco})$	5,2 G		

Tabela V. Parâmetros de RPE para MbNO ApB

Fig. 39. Espectros de RPE de MbNO Apb, em diferentes temperaturas, pH = 7,32, 20 mW de potência de microondas, 2 G de amplitude de modulação.

Fig. 40. Espectro de RPE de MbNO Apb a 113,7 K,
pH = 7,32, 20 mW de potência de microondas
2 G de amplitude de modulação.

Fig. 41. Espectros de MbNO Apb, 115,5 K, pH = 4,6
20 mW de potência de microondas , 2 G de
amplitude de modulação.

C A P Í T U L O V I

"DISCUSSÃO E CONCLUSÕES"

6.1. MIOGLOBINA DE CAVALO E DE CACHALOTE

Analisando os espectros da figura 26, observa-se dois tipos de espectros bem diferentes: enquanto que os espectros *e* e *d* são relatados na literatura como pentacoordenados (Kon , 1975; Mun e cols., 1979) e que daqui por diante será nomeado tipo A, o espectro *a* é analisado como sendo devido a uma forma hexacoordenada (Morse & Chan, 1980) e daqui por diante será chamada de tipo B. Os espectros *b* e *c* aparentam ser uma mistura dos tipos A e B. Isto pode ser melhor avaliado através da composição espectral realizada no computador, mostrada na figura 36. Para realizar esta composição, foram somados os espectros *a* e *e* em diferentes proporções, obtendo-se formas espectrais semelhantes às experimentais. Comparando os espectros somados com os experimentais, verifica-se que o espectro VII, figura 36 é muito semelhante ao espectro *d*, figura 26, permitindo supor que entre 10 e 15% das moléculas de MbA NO originam o espectro pentacoordenado.

É interessante notar que a mioglobina apresenta, no caso em que há pouco NO, um espectro semelhante ao das deoxi~~h~~emoglobinas na conformação T (Louro e cols, 1979, 1981), e isto não parece ter uma explicação simples em se tratando de mioglo~~b~~bina monomérica.

A primeira idéia que surgiu é que esse efeito, que no caso das hemoglobinas é explicado pelo efeito cooperativo dos quatro sítios de ligação, poderia ser devido a uma alta concentração de proteína, o que provocaria uma certa interação entre hemes de diferentes moléculas. Pelos cálculos feitos verificou-se que numa solução 1 mM, a distância média entre hemes seria da ordem de $100 \text{ \AA}$, sendo que essa distância é muito maior que a dos hemes das hemoglobinas. Nas hemoglobinas, a distância média entre os átomos de ferro mais próximos é de $25 \text{ \AA}$ e o diâmetro da molécula é de $55 \text{ \AA}$ (Stryer, 1979). Ainda assim, foram feitas medidas variando-se a concentração de proteína, mas mantendo constante a relação NO/Mb, para estudar o efeito da concentração nos resultados obtidos (por exemplo, os resultados mostrados na figura 26). Os espectros obtidos para diferentes concentrações e mesma relação NO/Mb, são mostrados nas figuras 31, 32 e 33.

Na figura 31, o espectro obtido é uma linha larga, com simetria aproximadamente rômbrica, independente da concentração de proteína. A relação NO/Mb é de 2/1. Já no espectro da figura 32, onde a concentração de NO/Mb é menor que no caso anterior (1,8/1), verifica-se a emergência de alguns picos, que estão bem nítidos na figura 33 (1,2 NO/Mb). Em cada uma das figuras acima, os espectros apresentam mesma forma, tanto para baixa concentração (0,1 mM) como para concentração mais alta (3 mM), com a distância média entre hemes variando entre $1000 \text{ \AA}$ e $30 \text{ \AA}$ respectivamente.

Portanto, fica descartada a hipótese de que este efeito seja devido à interação entre hemes de diferentes moléculas pela alta concentração de proteína, ou por uma possível formação de dímeros.

Ascenzi e cols. (1985) sugerem que o pH seja o agente que quebra a ligação ferro-histidina proximal. Os resultados aqui presentes mostram claramente que o pH não desempenha este papel. Observando-se por exemplo, as figuras 28 e 29, é possível verificar que para diferentes valores de pH (4,6 e 9,6 respectivamente) e à temperatura da ordem de 115 K, o espectro apresenta um desdobramento hiperfino e que à temperatura da ordem de 280 K, o espectro é uma linha larga. Ainda mais, na figura 30, observa-se a mesma solução de proteína que não foi agitada após adição de NO, e para um mesmo valor de pH, o espectro apresenta diferentes formas dependendo do tempo de reação. Portanto, é possível descartar também a possibilidade de que o efeito (espectro semelhante ao da forma T para HbNO) seja induzido pelo pH.

Como a origem desse efeito poderia estar no fato de que a mioglobina utilizada se apresenta inicialmente no estado férrico, os três experimentos a seguir discutidos, foram analisados de forma a diremir possíveis dúvidas:

Experimento A: Neste experimento cujos resultados são apresentados na figura 35, foi adicionado NO em excesso (havia mais que 2 NO/Mb), e após a adição de NO a solução foi agitada para acelerar a reação heme-NO. A forma do espectro em $g \sim 2$ não varia, embora a intensidade do sinal devido ao Fe^{3+} em $g \sim 6$ tenha decaído cerca de 16 vezes em 5 horas. Este monitoramento dos sinais foi analisado e graficado conforme pode ser observado na figura 42. Observa-se que à medida que cresce o sinal devido ao NO, decai o sinal devido ao Fe^{3+} , o que é bastante lógico, uma vez que todo o Fe^{3+} ao final da reação, deve ter passado ao estado de Fe^{2+} . Além disso, cresce o sinal em $g = 4,421$ (cerca

Fig. 42. Áreas relativas dos sinais de RPE devidos ao NO e Fe³⁺ em g ~ 6 e g ~ 4,4 vs. tempo de reação. Dados obtidos do experimento cujos resultados são apresentados na figura 35.

Observação: As áreas para os três sinais estão normalizadas a 1, mas a intensidade do sinal em g ~ 4,4 é cerca de 20 vezes menor que a do sinal devido ao NO.

de 3%), mas da mesma forma que o sinal em $g \sim 2$, possivelmente por efeito de desnaturação da proteína, em face do tempo esperado para a realização das medidas de RPE, visto haver excesso de NO.

Experimento B: Neste experimento, da mesma forma que no anterior, foi colocado excesso de NO, mas não se agitou a solução. Os espectros obtidos (figura 30), medidos em diferentes instantes, variam desde a forma que apresenta desdobramento hiperfino até a linha larga, devido à existência de NO suficiente para continuar a reação, ou seja, até reduzir todo o Fe^{3+} a Fe^{2+} e, concomitantemente, ligar-se a todos grupos heme disponíveis.

Experimento C: No experimento cujos resultados são mostrados na figura 26, foram colocadas diferentes quantidades de NO e as soluções não foram agitadas. Esperou-se o mesmo intervalo de tempo para medir cada uma das soluções nitrosiladas. Todos os espectros foram obtidos à 110K. Em cada caso, a reação heme-NO começou mas se deteve numa situação diferente, devido às diferentes quantidades de NO agregadas. O sinal de RPE foi monitorado em $g \sim 2$ e $g \sim 6$. Na figura 43, verifica-se que à medida que aumenta o sinal devido ao NO, diminui o sinal devido ao Fe^{3+} , uma vez que quanto mais moléculas de Mb tem o NO ligado, mais íons Fe^{3+} foram reduzidos a Fe^{2+} . Na figura 44, observa-se uma dependência linear para a relação entre a quantidade de NO vs. área do sinal devido ao NO. Ao lado dos pontos experimentais, observa-se a forma da linha dos espectros de RPE. Analisando estas duas figuras, parece que a relação NO/Fe é 1/1, - porém, nos experimentos, foi agregada a proporção de 2NO/Fe, portanto, confirma-se a afirmação de Chien(1969a).

Dos três experimentos realizados, embora com procedimentos diferentes, o resultado final é sempre o mesmo: quando

Fig. 43. MbNO. Áreas relativas do sinal de RPE devido ao NO vs. Área relativa do sinal devido ao Fe^{3+} ($g \sim 6$).

Fig. 44. Porcentagem de Saturação de NO *vs.* Área Relativa do sinal de RPE devido ao NO. Ao lado dos pontos experimentais, observa-se a forma da linha do espectro de RPE. Considerou-se que quando há 2NO/Mb, a saturação é 100%.

há pelo menos 2 NO/Mb, o Fe^{3+} fica reduzido a Fe^{2+} , e o espectro é uma linha larga (tipo B); quando há menos do que 2 NO/Mb, num dado instante de tempo, nem todo Fe^{3+} pode estar reduzido, e o espectro pode apresentar diferentes formas.

Em função dos resultados até agora apresentados, e resumidos a seguir, pode-se sugerir a presença de duas espécies de mioglobina:

- quando há cerca de 0,2 NO/Mb e espectro, que apresenta um tripleto, corresponde à espécie que se denomina MbA.

- quando há 2 (ou mais) NO/Mb, o espectro, que apresenta a forma de uma linha larga, corresponde à espécie que se denomina MbB.

Ainda, dado que o espectro de RPE apresenta uma triplete quando a relação NO/Mb é da ordem de 0,2, isto significa que a espécie MbA tem maior afinidade pelo NO. Por outro lado, como o espectro final, quando a relação NO/Mb é de 2 ou mais, é sempre uma linha larga, correspondente à espécie MbB, a quantidade de MbB deve ser muito maior que a de MbA.

Mais ainda, o fato dos espectros de MbA e MbB serem diferentes, indica que a coordenação ao redor do Fe^{2+} apresenta ligeiras modificações.

A hipótese da existência de duas espécies já havia sido levantada por outros autores:

- Morse & Chan (1980), trabalhando com MbNO (a partir de MetMb, Sigma), sugerem que os diferentes sinais de RPE observados, em diferentes temperaturas, são contribuições de duas espécies hexacoordenadas que diferem na posição do Fe em relação ao plano da porfirina:

onde as espécies (I) e (II), predominam a alta e baixa temperatura, respectivamente.

- Yoshimura e cols. (1980), trabalhando com nitrosilhemoproteínas, sugerem, a partir das mudanças observadas nos espectros de RPE, a existência de duas espécies moleculares que diferem na estrutura da unidade Fe-N-O.

- Hori e cols. (1981), estudando cristais de MbNO (obtidos a partir de Mb da Sigma), acima do ponto de congelamento, observaram a presença de duas espécies com espectros de RPE diferentes. Entretanto, segundo os autores, a dependência com a temperatura dos espectros de RPE, não pode ser explicada somente por combinações apropriadas do tipo de alta e baixa temperatura, como sugerido por Morse & Chan (1980), senão que também as propriedades do ligante devem ser levadas em consideração pois elas são drasticamente alteradas acima do ponto de congelamento.

- Ascenzi e cols. (1985), estudando soluções de MbNO (obtidas a partir de Mb da Sigma) também observaram duas formas espectrais e explicam o fato como uma dependência de pH.

Em todos estes trabalhos, não houve cuidado com a quantidade de NO utilizada em cada reação, ou pelo menos este fato não é mencionado. Neste trabalho, constatou-se que este ponto é de fundamental importância pois, os resultados obtidos nas experiências descritas pelos diversos autores mencionados, também dependem da quantidade de NO utilizada; sem esse cuidado, os resultados ficam mascarados pois um só fator (temperatura, pH, ou outro) é levado em consideração.

Mais ainda, na maioria dos trabalhos, a Mb utilizada era liofilizada e estava na forma meta. Isto implica, de acordo com Lamy e cols. (1976), que alguma fração de MbO₂ deveria

estar presente. Realizaram-se então dois experimentos de forma a se ter certeza que todo o ferro presente estava na forma férrica:

Experimento A:

Mediram-se os espectros de absorção óptica (conforme descrito na seção 5.1.9.a) de Mb de Cavalo e de Cachalote, observando-se que após a adição de ferricianeto de potássio, a absorbância cresceu cerca de 14%, o que significa que ainda havia na proteína 12,5% de MbO_2 , que o ferricianeto conseguiu oxidar e passar a Fe^{3+} .

Experimento B:

Com os espectros de RPE (conforme seção 5.1.9.b), obteve-se resultados comparáveis com os de absorção óptica, com o sinal de Fe^{3+} crescendo cerca de 13% após a adição de ferricianeto de potássio. O mais surpreendente é que o sinal em $g \sim 2$, não cresceu de forma significativa após a adição de NO, ao passo que o sinal de Fe^{3+} decresce bastante até cerca de 2 NO/Mb, conforme pode ser observado na figura da página 113.

Este resultado está de acordo com o mecanismo de reação proposto para a reação de MetMb + NO que conforme está descrita na seção 3.3, deve ocorrer em duas etapas: na primeira etapa uma molécula de NO é utilizada para reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} e na segunda etapa, uma outra molécula de NO liga-se ao Fe^{2+} proveniente da etapa anterior, formando-se então MbNO. Os espectros correspondentes a este experimento (seção 5.1.9.b), mostram essas duas etapas: primeiro observa-se somente o decrescimento do sinal de Fe^{3+} ; quando o sinal de Fe^{3+} para decair, começa a crescer o sinal em $g \sim 2$.

Quando se trabalha com amostra sem ferricianeto, ou seja, sem que todo o Ferro existente na proteína seja Fe^{3+} , o

Controle da intensidade do ferro à solução
nitrosilada de mioglobina + ferricianeto de potássio. Observa-
se que para que a intensidade do ferro caia pela metade é neces-
sário adicionar à solução 1,35 NO/Mb.

sinal de RPE em $g \sim 2$ começa a crescer ao mesmo tempo que dimi
nue o sinal de Fe^{3+} . Isso porque na amostra coexistem 2 espê-
cies: cerca de 13% de MbO_2 e o restante de MetMb. Assim, quan-
do se adiciona NO ele se liga ao Fe^{2+} originando o triplete e
ao mesmo tempo começa a reduzir o ferro da MetMb. Como a por-
centagem de MbO_2 é pequena, aparece inicialmente um triplete
que deve crescer até consumir todo MbO_2 . Se ainda existe NO su-
ficiente, ele se liga ao Fe^{2+} originário da redução do Fe^{3+} da
MetMb, dando origem a uma linha larga.

Isto permite concluir que o espectro final depende
da forma inicial da mioglobina (MetMb ou mistura).

Se a mioglobina utilizada está toda na forma meta, ou
seja, que todo o Ferro é Fe^{3+} , tem-se:

(TIPO B)

espectro de RPE : linha larga

Observa-se que o sinal de Fe^{3+} decai com a adição
de NO (seção 5.1.9.), sendo necessárias 2 (ou mais) moléculas
de NO para obter os dois passos da reação (seção 3.3), e o si-
nal de RPE em $g \sim 2$ é sempre uma linha larga.

Se a mioglobina utilizada possui cerca de 13% de fer-
ro na forma de Fe^{2+} (MbO_2), tem-se:

Observa-se que ao mesmo tempo que o sinal de Fe^{3+} de cresce aparece o sinal do complexo pentacoordenado (figura 26 e) MbA. Mas quando se coloca entre 0,2 e 2 NO/Mb, a reação pode parar em qualquer estágio intermediário, de modo que o espectro poderá ser o correspondente a MbA ou a uma mistura de MbA e MbB, dependendo da quantidade de NO (vide figura 36 onde são mostrados os espectros realizados no computador e figura 26, espectros experimentais).

Em todos os casos, quando se estuda a dependência dos espectros de RPE com a temperatura ou pH, a interpretação dos resultados depende do controle da quantidade de NO adicionada, ou melhor, da relação NO/Mb. Assim, quando se estuda a mudança do espectro de RPE com a temperatura, os resultados podem indicar a presença de duas espécies que mantêm dependência com a temperatura se a relação NO/Mb < 2. Entretanto, quando se estuda a dependência com o pH, tal como no trabalho de Ascenzi e cols., (1985), é necessário ter cuidado com o mecanismo de reação do NO com a proteína, que em pH baixo fica dificultada, como está descrito na seção 3.3. A equação c (seção 3.3):

depende do meio em que é feita. E em pH baixo (3,9 no artigo referido anteriormente) há dificuldade em continuar a reação, já que está diminuída a concentração de íons OH^- , fazendo com que não seja possível alcançar a reação d (seção 3.3):

Mais ainda, como os autores utilizaram Mb da Sigma (a mesma utilizada neste trabalho), certamente a amostra deve conter cerca de 13% de $\text{Fe}^{2+}(\text{MbO}_2)$ responsável pela aparição do triplete. A conclusão dos autores é que o triplete é devido ao valor do pH (3,9), mas o que de fato acontece é que há dificuldade em continuar a reação e o espectro resultante é o do tipo A.

Fica claro então que qualquer estudo com a proteína, tal como dependência com a temperatura ou pH, depende de seu estado inicial.

Dependência com a temperatura: Conforme mostram os resultados do presente trabalho (ver figuras 24 a 36), existe uma relação entre a forma do espectro e a temperatura se a relação NO/Mb é menor que 2/1; se a relação é maior ou igual a 2/1, a forma do espectro não varia significativamente com a temperatura. Em baixas temperaturas é possível obter-se todas as formas espectrais (figura 26 e 30) tipo A, tipo B ou a mistura deles, dependendo da relação NO/Mb.

Dependência com o pH: Em soluções de pH baixo a reação com o NO é dificultada, como foi discutido anteriormente, de modo que os espectros representam uma mistura das espécies que compreendem a ligação do NO com parte dos Fe^{3+} e do NO com os átomos de ferro da MbO_2 (ligação predominante) presentes na Mb liofilizada.

Uma pergunta que surge do exposto é: porque os espectros são diferentes se a espécie que os provoca, em ambos os casos, é Fe^{2+}NO ? O que acontece é que o Fe^{2+} já presente na amostra liofilizada, dá origem a um espectro que corresponde a um ferro pentacoordenado, enquanto que o Fe^{2+} proveniente do Fe^{3+} dá lugar a um espectro que corresponde a um ferro hexacoordenado. Para explicar estas diferenças na coordenação, Yoshimura e cols. (1979), sugerem que necessariamente deve existir alguma diferença na estrutura da unidade Fe-N-O. Por sua parte, Hori e cols. (1980), trabalhando com Mb da Sigma, veem duas espécies, uma a alta e outra a baixa temperatura (que, como foi discutido aqui, são espécies dependentes da razão NO/Mb). Através de RPE em amostras cristalinas mostram que a diferença entre as duas espécies está na orientação do ligante em relação ao grupo prostético

De fato, a diferença entre as espécies A e B deve ocorrer por pequenas variações em torno das vizinhanças do Fe.

Mun e cols. (1979), realizando investigações teóricas sobre estruturas eletrônicas de diferentes formas estruturais de proteínas nitrosiladas, sugerem (ver detalhes seção 3.2-4), que

um aumento do comprimento (ou o enfraquecimento) da ligação Fe-N_ε pode originar uma situação completamente análoga à situação em que o sistema heme-NO é pentacoordenado. Então, no caso presente, o NO ligado ao Fe, deve puxar o ferro para fora do plano do grupo heme, aumentando ou quebrando a ligação Fe-N_ε, originando um espectro tipo A.

No trabalho de Ascenzi e cols. (1985), o padrão hiperfino de três linhas também é explicado com base na ligação Fe-N_ε como anteriormente exposto; apenas a causa da quebra desta ligação é a protonação de um dos nitrogênios do anel imidazol da histidina proximal, pelo pH baixo. Por outro lado, Mun e cols. (1979), concluem em seu trabalho que a protonação ou desprotonação do N_{prox} (figura 20) do imidazol proximal não pode explicar o padrão hiperfino de três linhas. Isto está de acordo com o presente trabalho, uma vez que pode-se obter o espectro tipo A independente de pH (baixo ou alto). Como foi discutido anteriormente, o pH só dificulta o mecanismo da reação MetMb + NO, além de diminuir a relação sinal/ruído do espectro de RPE, mas sem alterar muito a ligação do NO com oxMb.

CONCLUSÕES

- . Observa-se mesmo comportamento para MbNO de Cavalo e de Cachalote.
- . Existe cerca de 13% de Fe^{2+} na proteína liofilizada (Sigma), tanto de Cavalo como de Cachalote.
- . A reação da MetMb com o NO ocorre em duas etapas:
 - a) $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$
 - b) $\text{Fe}^{2+} + \text{NO} \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{NO}$
- . A relação entre o número de moléculas de NO colocadas e o número de moléculas de mioglobina (liofilizada) presentes na solução (NO/Mb), define o tipo de espectro de RPE:
 - a) se $\text{NO}/\text{Mb} \approx 0,2$ espectro tipo A (Fe pentacoordenado)
 - b) se $\text{NO}/\text{Mb} > 2$ espectro tipo B (Fe hexacoordenado)
 - c) se $0,2 < \text{NO}/\text{Mb} < 2$ espectro mistura AB
- . Em soluções onde $\text{pH} < 7$, a reação do ferro com o NO é dificultada. Diminui a relação sinal/ruído do espectro de RPE.
- . O espectro do tipo A é devido ao NO ligado ao Fe^{2+} (MbO_2) presente na proteína liofilizada.
- . O espectro tipo B é devido ao NO ligado ao Fe^{2+} proveniente da redução do Fe^{3+} .
- . Pode-se obter espectros com formas semelhantes, independentemente da concentração de proteína (entre 0,1 e 3 mM neste trabalho), temperatura e pH, desde que se mantenha a relação NO/Mb.
- . A diferença entre o Fe^{2+} -N-O tipo A e tipo B está na variação da distância NO-Fe-N_e hisF(8).

6.2. ERITROCRUORINA DE "ANNELIDAE GLOSSOSCOLEX PAULISTUS"

Os resultados de RPE de nitrosil eritrocruorina de *Annelidade Glossoscolex paulistus* (EcNO AGp) mostram que há duas conformações em equilíbrio. A dependência com a temperatura dos espectros de RPE se origina de um equilíbrio térmico entre duas espécies hexacoordenadas, separadas por uma barreira energética de 2 a 3 kcal/mol.

O espectro a 103,0 K (figura 38 a) apresenta um desdobramento superhiperfino com 9 linhas, resultante do spin nuclear do nitrogênio ($I = 1$). O desdobramento maior pode ser atribuído ao NO e as linhas hiperfinas, à interação com o N_ϵ do 5º ligante (imidazol proximal). A estrutura hiperfina em g_{zz} reflete a interação do elétron do N ao longo da direção normal ao plano do grupo heme.

À medida que diminua a temperatura, o Fe se afasta do aminoácido (ou buraco) distal e o espectro de RPE é uma linha larga (figura 38b). Espectros semelhantes e mesmo comportamento com relação à temperatura, foram obtidos para MbNO de Elefante (Bartnicki et al., 1982), que possui uma glutamina distal ao invés da histidina como as mioglobinas de Cachalote e de Cavalo.

No caso desta eritrocruorina ainda não foi determinada a sequência primária, mas outras eritrocruorinas conhecidas, apresentam uma glutamina distal (Huber et al., 1970). Em função disto e comparando-se os resultados com os de MbNO de elefante, é possível supor que esta eritrocruorina possui uma glutamina distal ou pelo menos um aminoácido que tenha, da mesma forma que a glutamina, uma interação com o NO mais fraca que o que possui uma histidina distal. Os dados da literatura (Yoshimura et al., 1979) mostram que outras nitrosilhemoproteínas que pos-

suem histidina distal não exibem desdobramento superhiperfino - até temperaturas próximas à de hélio líquido.

A análise dos resultados mostra que de fato existem duas espécies. A partir dos espectros de RPE foram feitas medidas do valor relativo de g_x (figura 45), da largura de linha - (figura 46) e da intensidade relativa da linha centrada em g_x (figura 47) em função da temperatura. Na figura 45 pode-se observar que g_x varia bastante com a temperatura ($g_{max} = 2,078$ e $g_{min} = 2,061$; $\Delta g_{exp} = 0,017$), o mesmo ocorrendo com a largura de linha (figura 46).

O problema com estes gráficos é que no intervalo de temperatura estudado, coexistem as duas espécies hexacoordenadas. Como pode ser observado através dos espectros de RPE (Figura 37) a largura e a forma da linha variam muito, e além disso, a dependência com a temperatura é diferente para as duas espécies, suas populações relativas não obedecem à distribuição de Boltzmann. Para contornar este problema, dos espectros experimentais, foram subtraídos o espectro em 309,3K (espécie II), até obter o espectro correspondente à espécie I (103,0K), da forma seguinte:

$$\begin{pmatrix} \text{Espectro} \\ \text{experimental} \end{pmatrix} - Y_o \begin{pmatrix} \text{Espectro} \\ \text{espécie II} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \text{Espectro} \\ \text{espécie I} \end{pmatrix}$$

A partir dos espectros diferença e dos parâmetros Y_o , que refletem a porcentagem relativa entre as duas espécies, foram novamente construídos os gráficos dos parâmetros de RPE em função da temperatura.

Pode-se observar, agora, na figura 48, que g_x se mantém constante em todo intervalo de temperatura, o mesmo sucedendo com a largura de linha (figura 49).

Fig. 45. EcNO AGp. Valores g_x relativos, obtidos do espectro experimental vs. inverso da temperatura.

$$\Delta g_x = g - g_0, \text{ onde } g_0 = g(103,0\text{K}).$$

Fig. 46. EcNO. Variação dos valores de largura de linha, obtidas dos espectros experimentais *vs.* inverso da temperatura.

Fig. 47 EcNO AGp. Intensidades Relativas obtidas dos espectros experimentais *vs.* temperatura, $I_0 = I(103,0K)$.

Fig. 48. EcNO AGp. Valores g_x relativos obtidos dos espectros diferença *vs.* inverso da temperatura, para espécie I.

Fig. 49. EcNO AGp. Valores de largura de linha obtidos dos espectros diferença *vs.* inverso da temperatura, para espécie I

Fig. 50 EcNO AGp. Intensidades Relativas obtidas dos espectros diferença *vs.* temperatura. Ajuste da curva usando a equação

$$y = 1 / (1 + e^{-\Delta G/kT})$$
 onde ΔG é a energia livre de Gibbs.

Com as intensidades já não ocorre o mesmo. O gráfico das intensidades relativas vs. temperatura é uma curva (figura 50), que foi ajustada por mínimos quadrados, segundo a distribuição:

$$y = \frac{1}{1 + \exp(-\Delta G/kT)}$$

onde $y = I_1 / (I_1 + I_2)$ onde I_1 e I_2 representam a população das espécies nos estados I e II, respectivamente e,

$$I_i = \exp(-\Delta G_i/kT), \quad i = 1, 2.$$

onde:

ΔG → energia livre de Gibbs (kcal/mol)

ΔH → entalpia (kcal/mol)

ΔS → entropia (u.e.)

k → constante de Boltzmann

T → temperatura absoluta

Os parâmetros obtidos através do ajuste de curva são:

$$\Delta H = 2,17 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta S = 11,27 \text{ ue}$$

Este valor obtido para ΔH está dentro dos valores esperados e descritos na literatura (Morse & Chan, 1980), para a barreira energética que separa as duas espécies hexacoordenadas.

Pode-se observar que à temperatura de aproximadamente 200K a relação y vale 0,5.

6.3. MIOGLOBINA DE "APLYSIA BRASILIANA"

Os resultados de RPE de nitrosilmioglobina de *Aplysia brasiliana* (MbNO Apb), mostram que há apenas um estado conformacional. A dependência com a temperatura dos espectros de RPE se origina de uma só espécie hexacoordenada. O fato da Mb Apb não possuir histidina distal influe na forma de linha dos espectros. O espectro é semelhante a baixa e alta temperatura, apenas a resolução do desdobramento superhiperfino é menor em alta temperatura (figura 39).

Os espectros a baixa temperatura de EcAGp e MbApb são semelhantes, mas o de MbApb tem melhor resolvida a estrutura hiperfina. Este fato pode ser devido aos valores de ΔH intrínsecos: enquanto que para Ec AGp é igual a 5,5 G e $a_{N_E} = 6,5$ G (tab.IV), para MbApb, é igual a 5,2 G e $a_{N_E} = 6,8$ G (tabela V).

A análise dos parâmetros de RPE mostra de fato, uma espécie. Nas figuras 51 e 52, observa-se a variação dos valores de g e de largura de linha que permanecem constantes no intervalo de temperaturas estudado.

O gráfico para as intensidades relativas mostra ser linear com a temperatura (figura 53). Aparentemente este comportamento é diferente daquele encontrado para EcNO AGp; possivelmente para que ocorresse uma transição do tipo da Ec AGP, seria necessário um intervalo de temperaturas muito maior.

Fig. 51 MbNO Apb. Valores g_x relativos vs. inverso da temperatura.
 $\Delta g_x = g - g_0$, onde $g_0 = g(113,7\text{K})$.

Fig. 52 MbNO Apb. Valores de largura de linha
vs. inverso da temperatura.

Fig. 53 . MbNO Apb. Intensidade Relativa (medida em g_x) vs. temperatura (ajuste por mínimos quadrados), $I_0 = I(113,7K)$

<i>Nitrosil hemoproteínas</i>	<i>Espécie I (baixa T)</i>	<i>Espécie II (alta T)</i>	<i>Aminoácido Distal</i>
<i>Cavalo Cachalote (100%)</i>			<i>histidina</i>
<i>Ec AGp</i>			<i>glutamina (?)</i>
<i>Elefante (Bartnicki et al.1982)</i>			<i>glutamina</i>
<i>Mb App</i>			<i>(?)</i>

Tabela VI. Formas dos espectros das diferentes espécies de proteínas nitrosiladas.

A análise do comportamento com relação à temperatura para as duas espécies de proteínas (Ec AGp e Mb App), mostram que há uma dependência com a temperatura das intensidades das linhas de RPE. Se são consideradas as variações das intensidades das linhas de RPE de MbNO App e EcNO AGp (experimental e diferença), pode-se observar que a dependência com a temperatura das intensidades das linhas está essencialmente linear, portanto em boa con-

Intensidades das linhas de RPE normalizadas para Mb Apb e Ec AGp (experimental e espectros diferença)

cordância com a distribuição de Boltzmann. O desvio para temperaturas mais altas (cerca de -40°C) é devido ao descongelamento da água de hidratação. Já para a EcNO AGp, o desvio é devido à existência de duas espécies e a variação das intensidades das linhas não obedece a distribuição de Boltzmann.

6.5. CONCLUSÕES

Comprovou-se que a molécula de NO funciona de fato como uma sonda. As diferentes hemoproteínas estudadas possuem diferenças estruturais que a molécula de NO "enxerga", através de sua ligação com o ferro do grupo heme.

Constatou-se que as proteínas de Cavalo e de Cachalote não possuíam ferro apenas na forma férrica, mas cerca de 13% na forma ferrosa. Este fato, dá origem a dois tipos de espectros de RPE quando a molécula de NO liga-se à proteína. O Fe^{2+} presente na proteína liofilizada dá origem a um espectro tipo pentacoordenado (tipo A). O Fe^{3+} após ser reduzido pelo NO, forma um complexo Fe^{2+}NO , que dá origem a um espectro hexacoordenado (tipo B). Pode-se observar o espectro de RPE tipo A, tipo B ou a mistura deles, em diferentes valores de pH e temperatura, sempre dependendo da concentração de NO. Os espectros de RPE da MbANO e MbBNO são diferentes, porque há uma variação da distância da ligação $\text{Fe}-\text{N}_\text{e}$, no caso da distância aumentar, tem-se o espectro tipo A.

A Mb Apb que não possui resíduo básico ocupando a posição distal. O espectro de RPE apresenta um desdobramento superhiperfino com 9 linhas e a forma do espectro praticamente não varia com a temperatura, observando-se apenas um decréscimo da resolução do desdobramento superhiperfino. A variação relativa das linhas de RPE contra o inverso da temperatura obedece a distribuição de Boltzmann até cerca de -40°C , onde começa a aparecer um efeito de descongelamento da proteína.

Os espectros de RPE de EcNO AGp mostram que há duas conformações em equilíbrio, uma a baixa temperatura (espectro com

desdobramento superhiperfino com 9 linhas) e outra a alta temperatura (cujo espectro é uma linha larga). Estas duas espécies estão separadas por uma barreira energética de cerca 2 kcal/mol, valor este obtido a partir de ajuste de curvas, por mínimos quadrados, que relaciona a variação das intensidades relativas com a temperatura. Estes resultados são interpretados como sendo originários de duas conformações hexacoordenadas, diferindo na posição do ferro em relação aos ligantes e ao plano da porfirina.

Com os resultados obtidos e comparando-os com os de Mioglobina de Elefante, que possui uma glutamina ocupando a posição distal, pode-se sugerir que:

- . Ec AGp deve possuir um aminoácido ocupando a posição distal, caso contrário comportaria-se como Mb Apb.
- . Este aminoácido não deve ser a histidina, pois, caso fosse, - comportaria-se como Mb de Cavalo e de Cachalote.
- . Pode-se sugerir que o aminoácido seja a glutamina (ou outro) que da mesma forma tenha uma interação com o NO mais fraca que a histidina.

Estes resultados permitem tecer suposições acerca da posição distal em casos, como o da Ec AGp, em que não há determinação de sua estrutura, Isto é de grande importância, pois tanto o sítio distal como proximal, determinam o comportamento químico da molécula (Mins e cols., 1983), permitindo assim estudar e entender as funções biológicas das proteínas.

6.6. SUGESTÕES

O estudo de hemoproteínas marcadas com NO, tem um grande campo, ainda em aberto, e que pode levar a explicar muitas das funções biológicas das proteínas.

Um aspecto importante, que deve ser delicadamente levado em conta, é o valor de pH. Ele pode dificultar processos de ligação da molécula com o ligante, impedindo mesmo que a molécula possa desempenhar suas funções. É necessário verificar se uma alteração de pH após a molécula ter sido marcada com NO modifica as vizinhanças do ferro do grupo heme e suas ligações.

Outro ponto importante é o da quantificação de moléculas de NO por mioglobina. É necessário poder entender e estudar o mecanismo de reação das hemoproteínas com o NO.

Pode-se também tentar caracterizar outras hemoproteínas cuja estrutura não está determinada, através de estudos comparativos com outras hemoproteínas e baseando-se nos resultados deste trabalho.

Muitas outras sugestões poderiam ser dadas, já que o próprio grupo de Biofísica tem dirigido sua atenção para este tipo de estudo, como por exemplo o das proteínas desidratadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A.S. & MEIRELLES, N.C. (1985). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80A, 53-55.
- ABRAGAM, A. & BLEANEY, B. (1969). *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, Oxford University Press, London.
- ABRAGAM, A. & PRYCE, M.H.L. (1951). *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser A205, 135-153.
- ANTONINI, E. & CHIANCONE, E. (1977). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6, 239-271.
- ASCENZI, P., GIACOMETTI, G.M., ANTONINI, E., ROTILIO, G. & BRUNORI, M. (1981). *J. Biol. Chem.*, 256, 5383-5386.
- ASCENZI, P., COLETTA, M., DESIDERI, A. & BRUNORI, M. (1985). *Biochem. Biophys. Acta*, 807, 299-302.
- BAFFA FILHO, O. (1984). *Tese de Doutorado*, IFQSC-USP.
- BARTNICKI, D.E., MIZUKAMI, H. & ROMERO-HERRERA, A.E. (1983). *J. Biol. Chem.*, 258, 1599-1602.
- BROWN III, W.E., SUTCLIFFE, J.W. & PULSINELLI, P.D. (1983). *Biochemistry*, 22, 2914-2923.
- CASE, D.A. & KARPLUS, M. (1979). *J. Mol. Biol.*, 132, 343-368.
- CHIANCONE, E., BRENOWITZ, M., ASCOLI, F., BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. (1980). *Biochem. Biophys. Acta*, 623, 146-162.
- CHIEN, J.C.W. (1969). *J. Chem. Phys.*, 51, 4220-4227.
- CHIEN, J.C.W. (1969a). *J. Am. Chem. Soc.*, 91:8, 2166-2168.
- DESIDERI, A., VERZILI, D., ASCOLI, F., CHIANCONE, E. & ANTONINI, E. (1982). *Biochem. Biophys. Acta*, 708, 1-5.
- DESIDERI, A., CHIANCONE, E. & ASCOLI, F. (1985). *J. Inorg. Biochem.*, 25, 225-228.
- DICKERSON, R.E. (1972). *Sci. Amer.* 226, 58-64.
- DICKINSON, L.C. & CHIEN, J.C.W. (1971). *J. Am. Chem. Soc.*, 93:20, 5036-5040.
- DICKINSON, L.C. & CHIEN, J.C.W. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 587-593.

- DICKINSON, L.C. & SYMONS, M.C.R. (1983). *Chem. Soc. Rev.*, 12, 387-414.
- DOETSCHMAN, D.C., SCHWARTZ, S.A. & UTTERBACK, S.G. (1980). *Chem. Phys.*, 49, 1-8.
- EHRENBERG, A. & SZCZEPKOWSKI, T.W. (1960). *Acta Chem. Scand.*, 14, 1684-1692.
- FEHER, G. (1969). *Electron Paramagnetic Resonance with Application to Selected Problems in Biology*, Gordon & Breach, New York.
- HORI, H. IKEDA-SATO, M. & YONETANI, T. (1981). *J. Biol. Chem.*, 256, 7849-7855.
- HUBER, R., EPP, O., STEIGMAN, W. & FORMANEK, H. (1971). *Eur. J. Biochem.*, 19, 42-50.
- JOHN, M.E. & WATERMAN, M.R. (1979). *FEBS Letters*, 106, 219-222.
- KEILIN, D. & HARTREE, E.F. (1937). *Nature*, 139, 548.
- KON, H. (1968). *J. Biol. Chem.*, 243, 4350-4357.
- KON, H. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 423-427.
- KON, H. (1975). *Biochem. Biophys. Acta*, 379, 103-113.
- KON, H. & KATAOKA, N. (1969). *Biochemistry*, 8, 4757-4762.
- LAMY, M.T., COSTA RIBEIRO, P. & NASCIMENTO, O.R. (1976). *FEBS Letters*, 71, 29-32.
- LOURO, S.R.W., COSTA RIBEIRO, P. & BEMSKI, G. (1979). *Nota Científica, PUC/RJ*, 06/79.
- LOURO, S.R.W., COSTA RIBEIRO, P. & BEMSKI, G. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 56-63.
- MAXWELL, J.C. & CAUGHEY, W.S. (1976). *Biochemistry*, 15, 388 - 396.
- MORSE, R.H. & CHAN, S.I. (1980). *J. Biol. Chem.*, 255, 7876-7882.
- MINS, M.P., PORRAS, A.G., OLSON, J.S., NOBLE, R.W. & PETERSON, J.A. (1983). *J. Biol. Chem.*, 258, 14219-14232.
- MUN, S.K., CHANG, J.C., DAS, T.P. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4842-4846.

- NAGAI, K. HORI, H., YOSHIDA, S., SAKAMOTO, H. & MORIMOTO, H.
(1978). *Biochim. Biophys. Acta*, 532, 17-28.
- PAKE, G.E. (1973). *The Physical Principles of Electron Paramagnetic Resonance*, W.A. Benjamin Inc., New York.
- PALMER, G. (1979). *The Porphirins*, vol IV in David Dolphin ed., *Physical Chemistry, Part B*, Academic Press, 313-354.
- PEISACH, J., BLUMBERG, W.E., OGAWA, S., RACHMILEWITZ, E.A. & OLTILIK, R. (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 3342-3355.
- PERUTZ, M.F. (1964). *Sci. Amer.*, 211, 64-76.
- PERUTZ, M.F., HASNAIN, S.S., DUKE, P.J., SESSLER, J.L. & HAHN, J.E., (1982). *Nature*, 295, 535-538.
- POOLE, C.P. & FARACH, H.A. (1976). *Teoría de la Resonancia Magnética*, Editorial Reverté, Spain.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. (1957). *Biochimia*, 22, 335-344.
- SANDS, R.H. (1955). *Phys. Rev.*, 99, 1222-1226.
- SAY, J.C. (1980). *Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP*.
- STRYER, L. (1979). *Bioquímica*, Editorial Reverté, Spain.
- TABAK, M., NASCIMENTO, O.R. & SAY, J.C. (1982). *FEBS Letters*, 140, 241-244.
- TAYLOR, C.P.S., (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, 491, 137-149.
- TRITTELVITZ, E. GERSONDE, K. & WINTERHALTER, K.H. (1975). *Eur. J. Biochem.*, 51 33-42.
- UNGARETTI, L., BOLOGNESI, M., CANILLO, E. OBERTI, R. & ROSSI, G. (1978). *Acta Cryst.*, B34, 3658-3662.
- van den OORD, A.H.A., WESDORP, J.J., van DAM, A.F. & VERHEIJ, J.A. (1969). *Eur. J. Biochem.*, 10, 140-145.
- WEBER, R.E. (1978). *Respiratory Pigments in Physiology of Annelids* Mill, P.J. ed. Academic Press, London.
- WEISSBLUTH, M. (1967). *Structure and Bonding*, 2, 1-125, Springer-Verlag New York Inc
- WITTEMBERG, B.A., BRIEL, R.W. & WITTEMBERG, J.B. (1965). *Biochem. J.*, 96 363-373.

YONETANI, T., YAMAMOTO, H., ERMAN, J.E., LEIGH Jr., J.S. & REED,
G.H. (1972). *J.Biol.Chem.*, 247, 2447-2455.

YOSHIMURA, T., OZAKI, T., SHINTANI, Y. & WATANANE, H. (1979).
Arch. Biochem. Biophys., 193, 301-313.