



**DINÂMICA DE PROTEÍNAS: EFEITOS DA
HIDRATAÇÃO EM ESTRATO CÓRNEO E DE
DETERGENTES EM ALBUMINA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Instituto de Física

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Junaine Vasques da Silva

Título do trabalho: Dinâmica de proteínas: efeitos da hidratação em estrato córneo e de detergentes em albumina.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 05 / 07 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
LABORATÓRIO DE BIOFÍSICA

**DINÂMICA DE PROTEÍNAS: EFEITOS DA
HIDRATAÇÃO EM ESTRATO CÓRNEO E DE
DETERGENTES EM ALBUMINA**

JUNAINE VASQUES DA SILVA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Física da Universidade Federal de Goiás
como requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Física.**

Orientador: ANTONIO ALONSO

GOIÂNIA
2002

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Vasques da Silva, Jussaine

Dinâmica de Proteínas: Efeitos da Hidratação em Estrato Cômico e de
Detergentes em Albumina [manuscrito] / Jussaine Vasques da Silva. -
2002.

Cl. 101 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alonso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Goiás, Instituto
de Física (IF). Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2002.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Ressonância Paramagnética Eletrônica. 2. Marcadores de Spin.
3. Mobilidade de Proteínas. I. Alonso, Antônio, orient. II. Título.

CDU 53

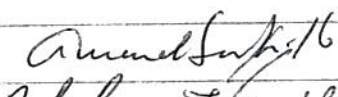
Dr. Jesiel Freitas Carvalho: Fil. F. Quel.

Goiânia, 04 de outubro de 2002, 45^o aluno titulado

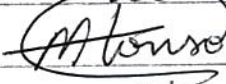
(46) Ata da apresentação e defesa de Dissertação de Mestrado de Junaine Vasques da Silva para obtenção do título de Mestre em Física

No dia 19 de dezembro de 2002, às 9:30 hs, reuniu-se na sala de seminários do Instituto de Física a Banca Examinadora composta pelos Professores Dr. Antonio Slonzo, como orientador e presidente da banca, Dr. Arcando Saito Ito da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo como examinador externo e o Dr. José Nicodemos Teixeira Rabelo como examinador local, perante a qual a candidata Junaine Vasques da Silva apresentou e defendeu a Dissertação de Mestrado intitulada "Dinâmica de Proteínas: Efeitos da Hidratação em Estrato Córneo e de Detergentes em Albumina". A sessão foi aberta pelo coordenador do programa de Pós-Graduação em Física, Dr. José Nicodemos Teixeira Rabelo, e a direção dos trabalhos foi conduzida pelo presidente da banca. A candidata apresentou então os principais aspectos e resultados da pesquisa desenvolvida por ela como tema para a sua dissertação. Encerrada a apresentação, que durou 40 minutos, os membros da banca examinadora questionaram

a candidata sobre o trabalho por ela realizado, reconhecendo a qualidade da dissertação, apresentando recomendações para melhorar sua redação. Depois de encerrada a discussão do trabalho e o questionamento da candidata, os membros da banca reuniram-se em sessão reservada e atribuíram à candidata as seguintes notas: Dr. Amando Sauti Ito, nota 10,0; Dr. José Nicodemos Teixeira Rabelo, nota 10,0; Dr. Antônio Alonso, nota 10,0. A banca atribuiu portanto à candidata a média 10,0, equivalente ao conceito A, satisfazendo portanto plenamente as exigências para a obtenção do título de Mestre em Física. É por ver verdade, eu José Nicodemos Teixeira Rabelo lavrei esta ata, que é assinada pelos membros da banca examinadora

Dr. Amando Sauti Ito: 

Dr. José Nicodemos Teixeira Rabelo: 

Dr. Antônio Alonso: 

7
Goiânia, 19 de dezembro de 2002. 46º aluno
titulado

(47) Ata da apresentação e defesa de Dissertação de Mestrado de Leomar Alves de Souza para obtenção do título de Mestre em Física

No dia 13 de fevereiro de 2003, às 10:00 h.

JUNAINÉ VASQUES DA SILVA

**DINÂMICA DE PROTEÍNAS: EFEITOS DA HIDRATAÇÃO EM ESTRATO
CÓRNEO E DE DETERGENTES EM ALBUMINA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física

Aprovação por:



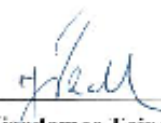
Prof. Dr. Antonio Alonso

Instituto de Física – UFG – Orientador



Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

FFCLRP-USP, Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. José Nicodemos Teixeira Rabelo

Instituto de Física – UFG

Goiânia, 19 de dezembro de 2002

*A Ciência é constituída de
fatos assim como uma casa é
construída com tijolos, mas
um conjunto de fatos não é
uma ciência, da mesma
forma que um amontoado de
tijolos não é uma casa.*

Henri Poincaré

***Dedico ao meu filho
João Vitor V. Breitenbach***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antonio Alonso, mais que um orientador, um verdadeiro amigo, uma pessoa que resume em si qualidades que fazem dele alguém muito especial.

Ao professor Fernando Pelegrini, pelo uso do Laboratório de RPE.

Aos meus pais João e Sebastiana e às minhas irmãs Hérিকা e Sheyla, verdadeiros companheiros.

Aos colegas Alessandro Carneiro, Sérgio J. Leonor e Wilmar P. dos Santos, pela solidariedade.

À Laura Breitenbach e ao Celmar Freitas, por compartilhar comigo momentos fraternos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Desenho esquemático da divisão da epiderme em camadas.....	23
Figura 1.2- Desenho esquemático do processo de diferenciação celular da camada epidermal da pele.....	26
Figura 1.3- Modelo esquemático do envelope do corneócito.....	29
Figura 2.1- Níveis de Zeeman em função do campo magnético de um único elétron.....	32
Figura 2.2- Diagrama de vetores ilustrando o movimento de precessão do momento magnético do elétron em torno do campo magnético externo H_0 , e também o campo magnético H_1 , oriundo da microonda.....	35
Figura 2.3- Fórmula química geral do radical nitróxido.....	41
Figura 2.4-Desdobramentos hiperfinos das linhas do nitróxido, ilustrando a formação do espectro.....	43
Figura 2.5 – Espectros de RPE representando as anisotropias dos tensores G e A	46
Figura 2.6 – Esboço do radical nitróxido, ilustrando os eixos principais dos tensores magnéticos.....	47
Figura 3.1 – Marcadores de spin derivados do maleimido.....	57
Figura 4.1- Espectros de RPE, experimental e simulado, a 34°C, do marcador Mal-6, covalentemente ligado aos grupos sulfidrila do estrato córneo..	60
Figura 4.2- modelo esquemático do marcador Mal-6 ligado covalentemente ao grupo sulfidril da proteína.....	61
Figura 4.3 – Espectros de RPE experimental e de melhor ajuste do marcador de spincovalentemente ligado aos grupos-SH do estrato córneo (pH5.1)....	63
Figura 4.4- A razão entre as populações das componentes fortemente e fracamente imobilizadas, N_S/N_W	64
Figura 4.5- Parâmetros de difusão rotacional para as componentes	

Fortemente ($R_{\text{bar}}S$) e fracamente ($R_{\text{bar}}W$) imobilizadas.....	68
Figura 4.6- Parâmetro de RPE $2T_{//}$, o desdobramento hiperfino máximo do Mal-6, como uma função da temperatura, e como uma função do conteúdo de água do EC.....	71
Figura 4.7 -Espectro de RPE medidos a 30 ⁰ C dos diferentes sítios SH livres do SC.....	73
Figura 4.8- Tempo de meia vida do radical nitróxido, na presença de ácido ascórbico a 0,5 mM.....	74
Figura 4.9 - Parâmetro de RPE, $2T_{//}$, do marcador Metil covalentemente ligado aos grupos sulfidrila do estrato córneo (pH 5,1) como uma função do tempo de reação com o NEM, para duas temperaturas distintas.....	75
Figura 4.10- Espectros de RPE, experimental e simulado, a 25 ⁰ C do marcador de spin Mal-5, covalentemente ligado ao grupo sulfidrila da albumina do soro bovino (0,2 mM) em tampão fosfato pH 7,4.....	77
Figura 4.11- Espectros de RPE experimental e melhor ajuste do Mal-5 em albumina do soro bovino (pH 7,4) a 25 ⁰ sem e com tratamento de SDS a 10 mM.....	78
Figura 4.12- A razão entre as populações das componentes fracamente e fortemente imobilizadas, N_W/N_S , no espectro de RPE da BSA marcada com 5-M como uma função da temperatura. Efeito do tratamento com 10 mM SDS.....	79
Figura 4.13-Gráfico de Arrhenius para os parâmetros de difusão rotacional $R_{\text{bar}}S$ para a componente fortemente imobilizada e $R_{\text{bar}}W$ para a componente fracamente imobilizada, obtidos do ajuste dos espectros de RPE do Mal-5 em BSA.....	81
Figura 4.14- Dependência dos parâmetros de difusão rotacional (R_{bar}) em relação à concentração do surfactante.....	82
Figura 4.15- A razão entre as populações das componentes fracamente e fortemente imobilizadas N_W/N_S e o parâmetro de RPE $2T_{//}$, no espectro de RPE da BSA marcada com Mal-5, como uma função da concentração do surfactante.....	83

Figura 5.1- Modelo 1 – energia padrão de Gibbs relacionada ao comprimento da cadeia lateral do nítróximo.....	87
Figura 5.2 – Modelo 2 – Entalpia relacionada ao comprimento da cadeia lateral do nítróximo e ao tratamento com uréia.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 46 °C), entalpia e entropia padrões associadas às interações da cadeia lateral do nitróxido com as proteínas do estrato córneo, para algumas faixas de conteúdo de água.....	66
Tabela 4.2- Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 46°C), entalpia e entropia padrões associadas a cadeia lateral do nitróxido ligada à Albumina do Soro Bovino.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

EC- Estrato Córneo;

S-S- Ligação dissulfeto;

SH- Grupo tiol ou sulfidril;

RPE- Ressonância Paramagnética Eletrônica;

T₁ – Tempo de relaxação spin-rede;

T₂ – Tempo de relaxação spin-spin;

A - Constante de desdobramento hiperfino externo;

Mal-5- 3-maleimido-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

Mal-6- 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1 oxil;

Metil- 3-maleimidometil 2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

Etil- 3-(2-maleimidoetil)-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

Etoxi- 3-[2-(2-maleimidoetoxi)etilcabomoil]-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

NEM- N-etil-maleimido;

BSA- Bovine Serum Albumine;

SDS- dodecil sulfato de sódio;

HPS- N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonate;

S- Componente fortemente imobilizada no espectro de RPE do maleimido;

W- Componente fracamente imobilizada no espectro de RPE do maleimido;

NLLS- Nonlinear Least-square;

$2T'_{//}$ - Parâmetro de desdobramento hiperfino externo;

a_0 – constante de desdobramento hiperfino isotrópico;

N_S - População de spins da componente fortemente imobilizada;

N_W . População de spins da componente fracamente imobilizada;

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

1.1 A ESTRUTURA DA PELE.....	21
1.2 O ESTRATO CÓRNEO.....	22
1.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O PROCESSO DE QUERATINIZAÇÃO.....	24
1.3 FORMAÇÃO DO ENVELOPE CELULAR CORNIFICADO E AS PROTEÍNAS CONSTITUINTES DO ENVELOPE.....	26

CAPÍTULO 2- PRINCÍPIOS BÁSICOS DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

2.1- INTRODUÇÃO.....	30
2.2- CONDIÇÃO DE RESSONÂNCIA.....	30
2.3- FREQUÊNCIA DE RECESSÃO.....	33
2.4- A ABSORÇÃO COMO UMA FUNÇÃO DAS POPULAÇÕES DE SPINS.....	36
2.5- INTERAÇÕES MAGNÉTICAS.....	37
2.6- OS MECANISMOS DE RELAXAÇÃO.....	39
2.7- A TÉCNICA DOS MARCADORES DE SPIN.....	41
2.8- ANISOTROPIAS DOS FATORES A E g	43
2.9- TEMPO DE CORRELAÇÃO ROTACIONAL.....	46
2.10- ESTUDO DAS PROTEÍNAS E O MÉTODO DE MARCAÇÃO SÍTIO DIRIGIDO.....	47
2.11- A SIMULAÇÃO DOS ESPECTROS.....	48

CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1- CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO.....	52
3.2- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESTRATO CÓRNEO.....	52
3.3- CONTROLE DA HIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESTRATO CÓRNEO.....	53
3.4- CINÉTICA DE REAÇÃO.....	54
3.5- PROCESSO DE SEPARAÇÃO DO ENVELOPE DO CORNEÓCITO...55	
3.6- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BSA.....	55
3.7- MARCADORES DE SPIN UTILIZADOS.....	56
3.8- PARÂMETROS DA SIMULAÇÃO ESPECTRAL.....	56

CAPÍTULO 4- RESULTADOS

4.1- EFEITO DA HIDRATAÇÃO SOBRE A DINÂMICA DAS PROTEÍNAS DO ESTRATO CÓRNEO.....	58
4.1.1- INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE PROTEÍNAS MARCADAS COM MAL-6.....	58
4.1.2- A MOBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO EC DECRESCER COM A REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁGUA.....	62
4.2- REDUÇÃO DO MARCADOR “IN SITU” COM ÁCIDO ASCÓRBICO.....	72
4.3- EFEITOS DE DETERGENTES NA DINÂMICA DA ALBUMINA.....	76
4.3.1- BSA MARCADA COM O MARCADOR MAL-5.....	76

CAPÍTULO 5- DISCUSSÕES

5.1- HIDRATAÇÃO DO EC RELACIONADA AOS	
---------------------------------------	--

PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA CADEIA LATERAL DO NITRÓXIDO.....	84
5.2- MODELOS PARA EXPLICAR AS VARIAÇÕES NA ENERGIA LIVRE DE GIBBS, ENTALPIA E ENTROPIA.....	85
5.3- A HIDRATAÇÃO DO EC AUMENTA A MOBILIDADE DE SUAS PROTEÍNAS.....	89
5.4- A HIDRATAÇÃO DO EC E SUAS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS..	90
5.5- A MARCAÇÃO DE SPIN EM MUTAÇÕES SÍTIOS DIRIGIDOS.....	80
5.6- BSA-SURFACTANTE.....	81
5.7- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
 CAPÍTULO 6- CONCLUSÕES.....	 96
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 98

RESUMO

A camada mais superficial da epiderme, o Estrato Córneo (EC), tem como função principal a formação de uma barreira física que controla a perda de água do corpo bem como a permeação de outras substâncias em ambas as direções da pele. O EC é formado por células anabolicamente mortas, os corneócitos, os quais sofreram diferenciação celular terminal, e sua função é realizada formando uma estrutura de proteínas altamente insolúveis na superfície do corneócito, chamada de envelope celular, e também uma matriz lipídica, essencialmente ceramídios, colesterol e ácidos graxos, que dificultam a difusão da água.

Neste trabalho, o EC foi marcado com marcadores de spin específicos para reagir com os grupos sulfidrilas das proteínas, para investigar os efeitos do conteúdo de água na dinâmica de proteínas diretamente no tecido intacto. Um modelo de dois estados para a cadeia lateral do nitróxido descreveu a coexistência de duas componentes espectrais de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). A componente denominada fortemente imobilizada (S), surge de uma fração de marcadores com o átomo de oxigênio do nitróxido ligado à proteína (estrutura rígida) enquanto a componente fracamente imobilizada é gerada pelos marcadores com mobilidade mais alta (~10 vezes maior) e expostos ao ambiente aquoso. As populações relativas entre estes dois estados de mobilidade, S e W, estão em equilíbrio termodinâmico. Os parâmetros da termodinâmica: energia livre padrão de Gibbs, entalpia e entropia, envolvidos na transferência da cadeia lateral do nitróxido do estado W, contatando ao solvente, para o estado S, contatando a proteína, indicaram que a redução do conteúdo de água para abaixo de ~0.69g de H₂O por g de EC seco, estabiliza o estado S (cadeia lateral do nitróxido dobrada sobre a cadeia principal da proteína). Ao diminuir o nível de hidratação para abaixo de ~ h 0.69 (g H₂O/g

EC seco) o movimento local da cadeia polipeptídica e o movimento rotacional da cadeia lateral do marcador de spin foram ambos reduzidos.

Para testar nossa metodologia em uma proteína pura e bem conhecida, estudamos os efeitos de dois tipos de detergentes sobre a albumina do soro bovino (BSA). Ambos os detergentes, o aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e o ziteriônico N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS) aumentaram a mobilidade da cadeia principal da proteína e da cadeia lateral do nitróxido. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que estes detergentes desestabilizam a proteína favorecendo conformações menos compactas.

Os resultados do presente trabalho também podem contribuir para aprimorar a análise dos espectros em marcação sítio dirigido, especialmente para uma descrição mais quantitativa em termos de parâmetros termodinâmicos.

ABSTRACT

The main function of the most superficial layer of the epidermis, the Stratum Corneum (SC), is to provide a physical barrier that controls the transepidermal water loss as well as the permeation of another substances in both directions across the skin. The SC is formed by anabolically dead cells, the terminally differentiated corneocyte, and its function is essentially accomplished by forming a highly insoluble protein structure on the surface of the corneocytes, termed the cornified cell envelope, and by impeding water diffusion across the SC by mortaring the corneocytes together by layers of skin-specific lipids, essentially ceramide, cholesterol and fatty acid.

In this work the cell envelope of the SC was spin labeled with a sulfhydryl-specific nitroxide reagent to investigate the water content effects upon the protein dynamics directly in the intact tissue. A two-state model for the nitroxide side chain describe the coexistence of two spectral components in the electron paramagnetic resonance (EPR) spectra. The so-called strongly immobilized component, S, is associated with the EPR signal of a motionally restricted nitroxide fraction having its N-O group hydrogen bonded to protein (rigid structure) while the weakly immobilized component, W, corresponds to the signal provided by the spin labels with higher mobility (~ 10 times greater) exposed to the aqueous environment. The relative populations between these two mobility states, S and W, are in thermodynamic equilibrium. The standard Gibbs free energy, enthalpy and entropy changes for transferring the nitroxide side chain from the state contacting the solvent, W, to the one contacting protein, S, indicated that the reduction of the SC water content to below ~ 0.69 g H₂O per g dry SC, stabilizes the protein interacting state, S. Upon decreasing the SC hydration level below ~ 0.69 the segmental motion of the polypeptide chains and the rotational motion of the spin-labeled side chain were also constrained.

To test our methodology in a pure and very well known protein, we also studied the effects of two types of detergents on the bovine serum albumin (BSA). Both detergents, the anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) and the zwitterionic N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonium-1-propanesulfonate (HPS) increase the mobility of the protein backbone and of the nitroxide side chain. The thermodynamic parameters indicated that these detergents destabilize the protein favoring less compact conformations.

This work can also be useful to improve the spectral analysis of site-directed spin labeling, especially for a more quantitative description in terms of thermodynamic parameters.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.4 A ESTRUTURA DA PELE

Há mais de 100 anos, o prestigiado patologista Rudolph Virchow retratou a pele como um revestimento protetor de vísceras internas mais delicadas e funcionalmente sofisticadas. Naquela época, considerava-se a pele como, essencialmente, uma barreira passiva à perda de líquido e lesão mecânica. Através da microscopia óptica de rotina, os primeiros pesquisadores só podiam visualizar a camada epidérmica resistente composta por células epiteliais escamosas estratificadas, a derme subjacente coriácea e o coxim de gordura subcutânea situado logo abaixo. Este nível de compreensão pouco mudou ao longo do século seguinte. Durante as três últimas décadas, no entanto, a pesquisa científica seguiu caminhos altamente produtivos que demonstraram que a pele é um órgão complexo no qual interações celulares e moleculares reguladas com precisão governam muitas respostas cruciais ao meio ambiente [1].

A pele recobre a superfície do corpo e consiste de duas camadas principais, sendo elas: o epitélio de superfície ou epiderme e a camada de tecido subjacente, a derme. Abaixo da derme existe uma camada de tecido adiposo denominada hipoderme, que une a derme aos órgãos internos. A pele é um órgão que perfaz cerca de 16% da massa corporal. Suas funções são diversas. Ela protege o organismo contra lesões de dessecação, recebe estímulos do meio ambiente além de excretar várias substâncias [2].

A epiderme é um epitélio estratificado composto de células de duas linhagens distintas. As que compreendem a maior parte do epitélio sofrem queratinização e formam as camadas superficiais da pele. Existem também

células nas camadas mais profundas da epiderme que não se queratinizam mas são capazes de produzir um pigmento denominado melanina (Figura 1.1).

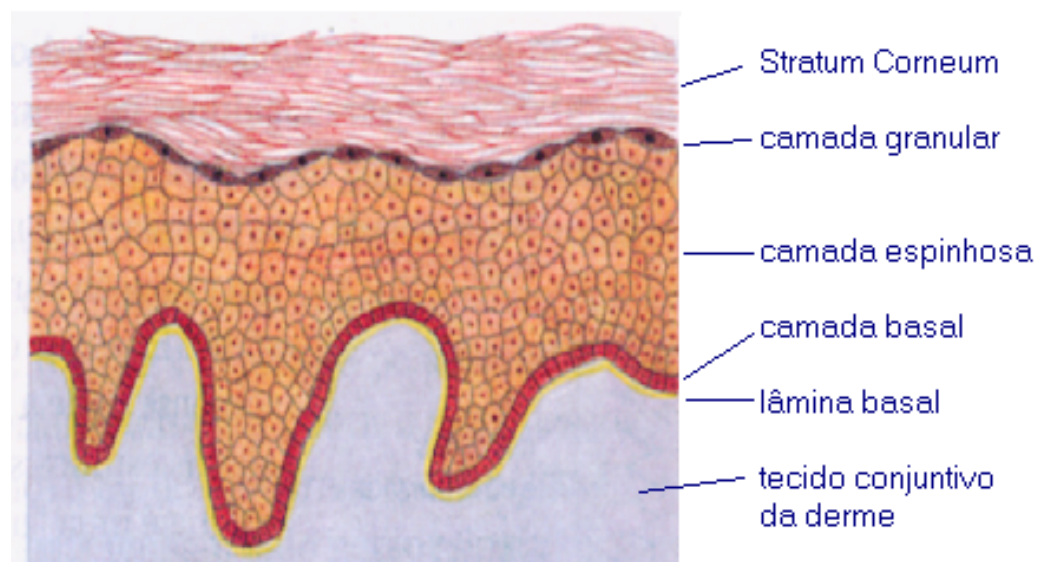


Figura 1.1- Desenho esquemático da divisão da epiderme em camadas [11].

Em cortes perpendiculares à superfície podemos notar quatro camadas distintas: o estrato germinativo ou estrato basal, uma camada de células cúbicas localizadas sobre a membrana basal; o estrato espinhoso, constituído de várias camadas de células espinhosas que apresentam pontes intercelulares. A camada seguinte é o estrato granuloso, que é formado por células achatadas, nas quais são observados grânulos de querato-hialina que contribuem para estrutura do material de interfilamentos da camada córnea. Segue-se então o estrato córneo ou camada cornificada [3].

1.2 O ESTRATO CÓRNEO

O estrato córneo, a camada mais superficial da epiderme, é formado por células que não possuem núcleo, achatadas e destituídas de organelas citoplasmáticas, com membranas celulares espessas, cujo citoplasma se

apresenta cheio de substância córnea, uma escleroproteína filamentosa chamada queratina. Essa proteína é constituída por cadeias protéicas ricas em ligações dissulfeto (S-S). O estrato córneo é responsável pela relativa impermeabilidade da pele, dificultando a evaporação de água pela sua superfície. Os mecanismos de controle de permeabilidade estão baseados no fato de que o coeficiente de difusão da água aumenta com o acréscimo da quantidade de água no tecido [4,5]. Portanto, quando há um excesso de água na pele, o EC permite maior difusão de água e para baixa umidade relativa do ambiente, e a baixa difusão de água no EC previne a alta perda de água. Essa característica é de importância fundamental para a vida humana e dos mamíferos em geral.

O estrato córneo apresenta espessura bastante variada e compõe-se de células claras anabólicamente mortas, semelhantes a escamas, que se tornam cada vez mais achatadas à medida que se aproximam da superfície e se descamam continuamente. As células apresentam membranas espaçadas que se interdigitam estreitamente, através dos desmossomos [6].

Durante o processo de queratinização o que se observa é a síntese da queratina, que na camada córnea tem sua estrutura reforçada pela transformação das suas ligações sulfídrilas (-SH-) em dissulfeto (S-S). Em um determinado instante durante a queratinização enzimas são liberadas pelos lisossomas com digestão de várias organelas citoplasmáticas: complexo de Golgi, mitocôndrias e núcleo. Isto explica o aspecto hialino e a perda da estrutura celular do estrato córneo [7,8].

É interessante observar que o estrato córneo surge a partir da diferenciação celular dos queratinócitos que acontece logo acima da camada basal (descrita em maiores detalhes na próxima seção). O EC humano é uma membrana homogênea de 10-20 μm de espessura e pode chegar a 500 μm na região da palma da mão. Na literatura, é dito que o EC é formado de células queratinizadas, os corneócitos, embebidas em uma matriz lipídica [7,8,9]. Tal matriz é constituída basicamente de ceramídeos, ácidos graxos livres, colesterol

e sulfato de colesterol, sendo ela a responsável por conferir o potencial de barreira física ao EC e provavelmente está envolvida na coesão entre os corneócitos [10,11,12].

Sendo a última camada da epiderme, a membrana de interface entre o organismo e o meio ambiente, a principal função do EC é controlar a perda de água transepidermal. Outras funções são: controlar a permeação de outras substâncias em ambas direções através da pele, filtrar a radiação solar que penetra na pele, fornecer alta impedância elétrica, contribuir para as propriedades viscoelásticas da pele e impedir a entrada de microorganismos.

1.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O PROCESSO DE QUERATINIZAÇÃO

A epiderme é um epitélio com múltiplas camadas, compostas essencialmente por queratinócitos cuja atividade diferenciada é sintetizar proteínas do filamento intermediário, denominadas de queratinas. Estas células mudam sua aparência de uma camada para a próxima (Figura 1.2). A primeira camada é a basal sendo que somente células basais sofrem mitose e representam também uma classe de célula tronco, pois são capazes de seguir uma programação genética para se transformarem em variados tipos de células que compõe a epiderme. Acima da camada basal os queratinócitos não se subdividem, apenas migram para as camadas superiores e enquanto migram sofrem o processo de diferenciação celular terminal (termina com a morte da célula). Logo acima das células basais está a camada de células espinhosas e sobre estas há uma fina camada de célula granular. Isso marca o limite entre a camada interna metabolicamente ativa e a camada mais externa, consistindo de células diferenciadas cujas organelas intracelulares desapareceram. Essas

células mais externas são reduzidas a camadas achatadas, cheias de queratina densamente empacotadas, os corneócitos [13].

Descrevendo a diferenciação celular de maneira dinâmica, vemos que, enquanto algumas células basais estão se dividindo, aumentando a população na camada basal, outras células estão se deslocando para a camada de célula espinhosa, submetendo-se à primeira etapa da sua jornada em direção ao exterior. Quando elas alcançam a camada granular, as células começam a perder seus núcleos e organelas citoplasmáticas, sendo transformadas, dessa forma, em escamas queratinizadas. Durante esse processo, outras proteínas características, tais como a involucrina, também começam a ser sintetizadas como parte de um programa coordenado de diferenciação celular terminal. O período entre o nascimento da célula na camada basal da pele humana e a queda da superfície varia de duas a quatro semanas, dependendo da região do corpo [13].

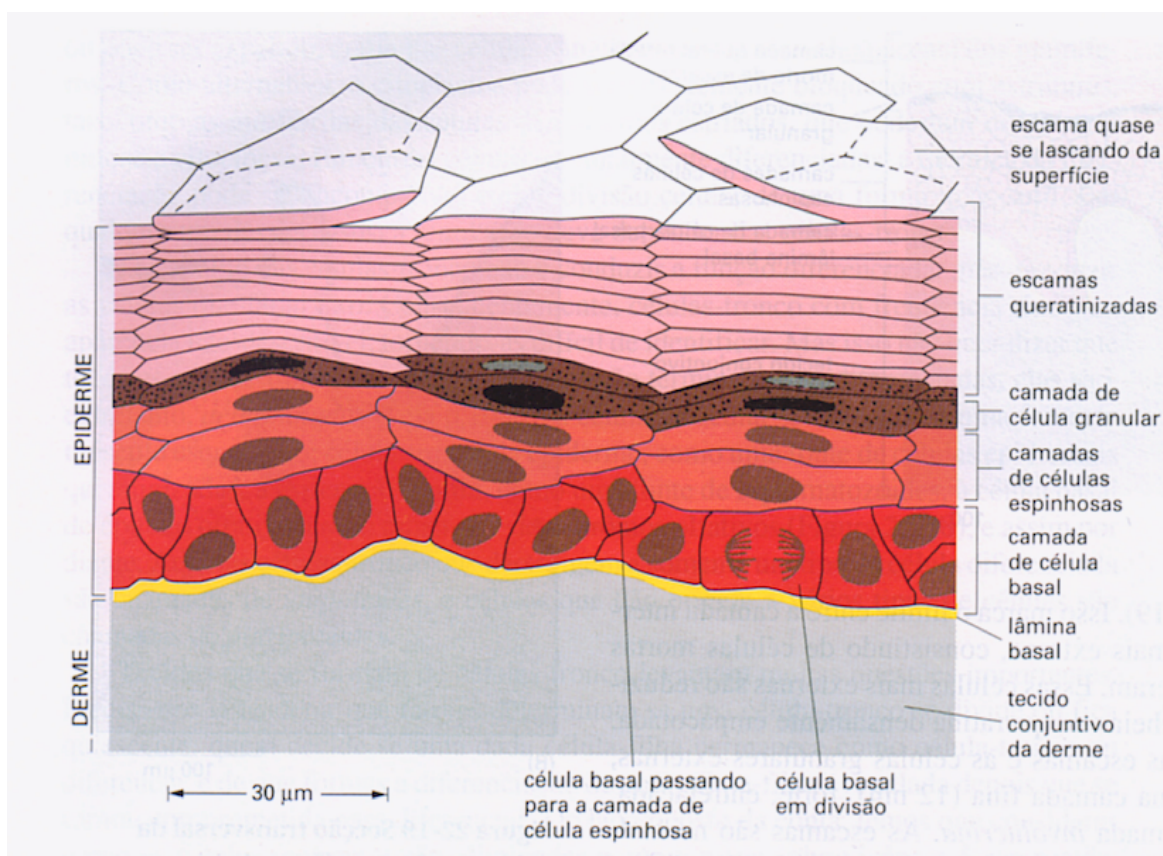


Figura 1.2- Desenho esquemático do processo de diferenciação celular da camada epidermal da pele [13].

1.4 FORMAÇÃO DO ENVELOPE CELULAR CORNIFICADO E AS PROTEÍNAS CONSTITUINTES DO ENVELOPE

Durante o processo de diferenciação terminal em epitélio estratificado tal como a epiderme, uma camada fina, de 15 nm de espessura, de proteínas insolúveis é depositada na superfície intracelular da periferia da célula. Este envelope celular cornificado desempenha um papel crítico na função de barreira para o organismo [14]. É importante salientar que em epitélios ortoqueratinizados, tais como a epiderme, o envelope celular é também denominado envelope celular cornificado.

As proteínas constituintes do envelope tornam-se insolúveis pelas ligações cruzadas de dissulfeto intermolecular e ligações de peptídeos N^ε-(γ-glutamil)lisina formadas pela ação da transglutaminase presente na membrana dos queratinócitos [15,16,17].

De uma perspectiva experimental, o envelope celular é definido como a parte insolúvel que sobra após exaustiva extração com agentes desnaturantes e agentes redutores [18]. No caso do envelope cornificado, muitas proteínas têm sido identificadas e caracterizadas como componentes potenciais do envelope, incluindo: a involucrina, cistatina α , pequenas proteínas ricas em prolina (SPR1, SPR2, na epiderme, bem como SPR3 em queratinócitos), loricrina, filagrina, filamentos intermediários de queratina e proteínas ricas em cisteínas [14,18].

Todavia, experimentos para mostrar que estas são, de fato, as proteínas estruturais do envelope celular são inviáveis, particularmente devido às ligações peptídicas cruzadas que impedem o isolamento e análise destas proteínas (reagentes que hidrolisam as ligações peptídicas cruzadas também hidrolisam as outras ligações destruindo as proteínas) [19]. Contudo, muitas aproximações têm sido exploradas e modelos matemáticos indiretos têm fornecido importantes indícios sobre a abundância dos agregados de proteínas no envelope cornificado da epiderme [20]. Este modelo é baseado em métodos de ajustes de mínimos quadrados, comparando as composições de aminoácidos conhecidas da maioria das proteínas identificadas (precursoras), listadas acima, com a composição total do envelope do corneócito. Deste modo, foi estimado que a loricrina é a componente em maior quantidade (66%), juntamente com quantidades menores de proteínas ricas em cisteína (14%), filagrina (10%), SPRs (5%), involucrina e cistatina α (2-5% cada) [20].

Várias evidências sugerem que a involucrina seja usada com antecedência na formação das estruturas do envelope celular. Muitos estudos revelaram que a involucrina é depositada na periferia da célula antes de outras

proteínas, tais como a loricrina [21]. A estrutura da involucrina é importante na determinação do seu papel na formação do envelope cornificado, mostrando uma distribuição periférica uniforme de resíduos de glutamina (gln) em intervalos iguais ao longo do seu eixo α -helicoidal e sugerindo uma capacidade de fazer ligações cruzadas de proteínas [22].

Um número expressivo de estudos tem informado as características marcantes de algumas proteínas precursoras da estrutura do envelope celular, mas tem sido difícil estabelecer quais proteínas iniciam a formação do envelope e quais eventos cada uma promove.

Em pesquisas mais recentes, Steinert e Marekov têm usado a técnica de marcação com ouro coloidal e imagens de microscopia eletrônica além de seqüenciamento de peptídeos para explorar estágios mais anteriores da montagem do envelope celular e com isso têm seguido a progressão e o destino das proteínas com ligações cruzadas e como ocorre a diferenciação celular terminal [23]. Em seu trabalho, além das proteínas já citadas anteriormente, eles ainda identificaram várias proteínas juncionais de células, incluindo desmoplaquina, envoplaquina e periplaquina (Figura 1.3)

Neste modelo está mostrada a inserção de filamentos de queratina citoplasmática no complexo protéico do envelope. Próximo da involucrina e envoplaquina estão os ceramídios ligados covalentemente às proteínas. Também estão mostradas em verde as enzimas denominadas transglutaminase, as quais estão ancoradas na membrana do queratinócito antes de sua diferenciação e promovem as ligações dipeptídicas já mencionadas bem como as ligações dos ceramídeos ao envelope protéico.

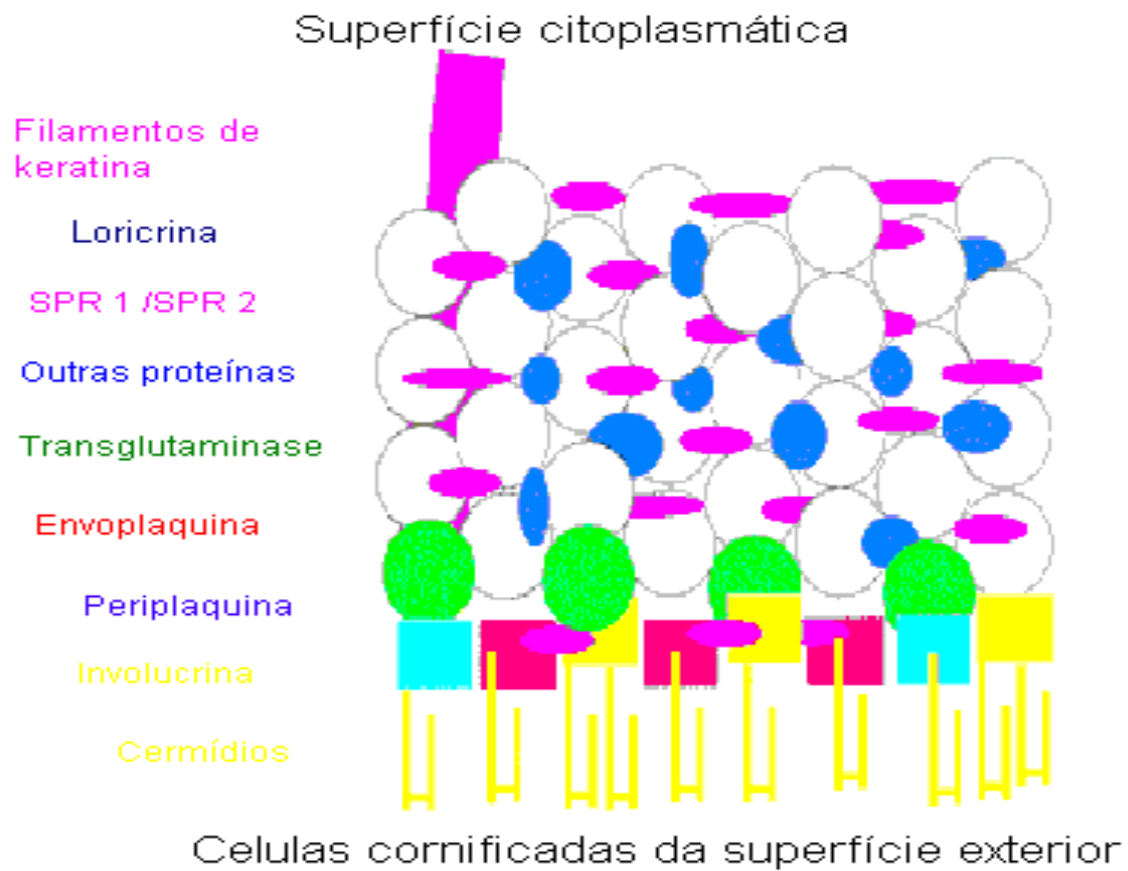


Figura 1.3- Modelo esquemático do envelope do corneócito [Steinert, P. M. (2000). J. B. Cell 151, f5-f7].

CAPÍTULO 2

PRINCÍPIOS BÁSICOS DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

2.1 INTRODUÇÃO

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que permite investigar amostras com elétrons desemparelhados, sendo bastante utilizada em pesquisas biológicas, visto que a análise dos espectros proporciona informações a nível molecular. Radicais livres e compostos biológicos contendo elementos de transição têm revelado serem os tipos de moléculas com elétrons desemparelhados que mais são investigados por RPE em pesquisas biológicas [24].

2.2 CONDIÇÃO DE RESSONÂNCIA

O elétron é uma partícula carregada que gira em torno do núcleo. Como resultado desse giro, aparecem dois momentos magnéticos possíveis: o momento magnético orbital ($\vec{L}$), que surge do movimento do elétron em torno do núcleo e momento magnético de spin ($\vec{\mu}$), que se origina do movimento do elétron em torno do seu próprio eixo [25]. Todos os elétrons têm um spin intrínseco que é caracterizado pelo momento angular de spin $\vec{L}$, sendo que $\vec{\mu}$ e $\vec{L}$ são sempre proporcionais, isto é:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad , \quad (2.1)$$

$$\gamma = -\frac{e}{2mc} \quad (2.2)$$

onde γ é chamado de raio giromagnético, e é a carga do elétron, m é a massa do elétron e c é a velocidade da luz. De acordo com a mecânica quântica, a componente do momento angular de spin ao longo de uma dada direção pode assumir os seguintes valores

$$L_z = \hbar M_s \quad (2.3)$$

onde M_s é chamado de número quântico de spin. Combinando as Eq. (2.1) e (2.3), temos:

$$\mu_z = -\frac{eh}{4\pi mc} M_s, \quad (2.4)$$

a equação acima surge de um modelo clássico, ou seja, se aplica ao movimento de um elétron em torno do núcleo. Sendo o momento angular de spin um efeito quantum-mecânico então, corrigindo a Eq. (2.4), podemos rescrevê-la como

$$\mu_z = -g \frac{eh}{4\pi mc} M_s = -g\beta M_s \quad (2.5)$$

onde β é magneton de Bohr e g não tem um nome específico, sendo chamado de fator-g, e é específico de cada amostra. Na visão clássica, o fator-g seria um fator de correção empregado, pois o momento angular obtido experimentalmente é sempre diferente do valor esperado, determinado pela teoria [26].

Aplicando-se um campo magnético sobre uma amostra paramagnética, ocorre a formação de duas populações de spins, uma que se orienta na mesma direção do campo e outra contrária à direção do campo. As energias de interação dos spins com o campo são diferentes, com isso temos dois níveis de energia, conforme figura 2.1, chamados de níveis de Zeeman, dados por [26]:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 \quad (2.6)$$

onde $\vec{\mu}$ é o momento associado ao elétron.

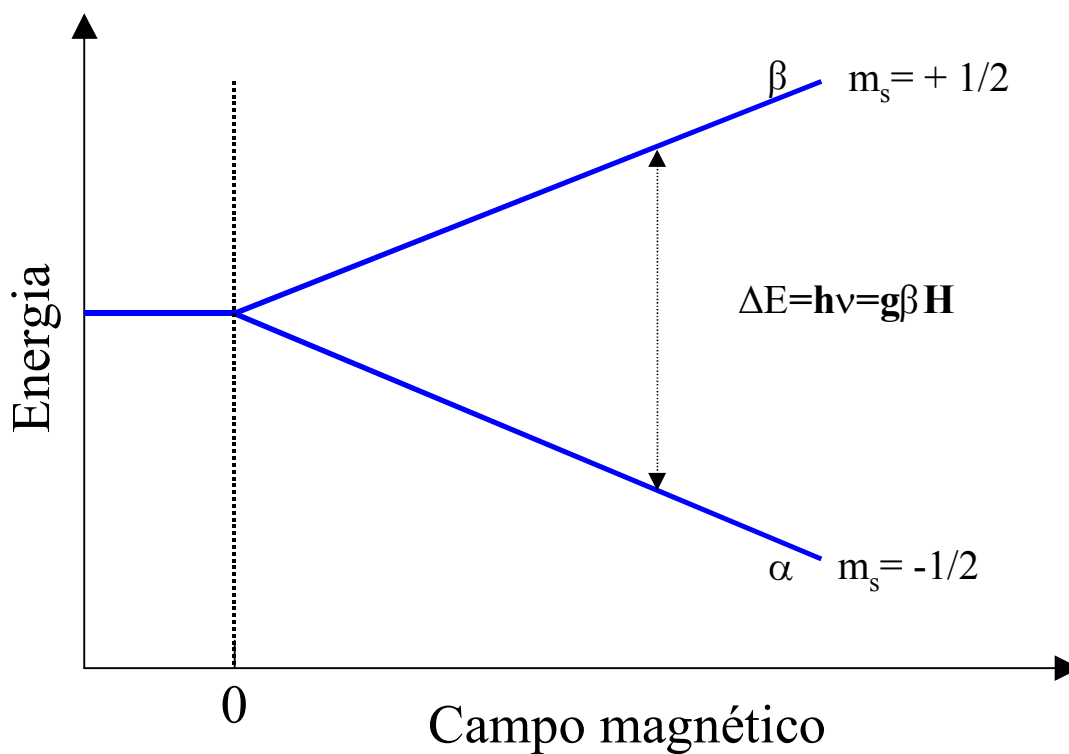


Figura 2.1- Níveis de Zeeman em função do campo magnético para um único elétron.

Para sistemas com spin, S , igual a $1/2$, temos que a componente z do momento magnético assume os seguintes valores:

$$\mu_z = \mp \frac{1}{2} g\beta \quad ; \quad m_s = \pm \frac{1}{2} \quad (2.7)$$

onde os valores de m determinam as possíveis projeções do spin eletrônico ao longo do eixo z , ou o eixo ao longo do qual se aplica o campo magnético externo H_0 . Sendo assim, temos os seguintes estados de energia:

$$E = \pm \frac{1}{2} g \beta H_0 \quad (2.8)$$

Uma vez estabelecidos os dois estados de energia, pela aplicação do campo magnético externo, transições entre os níveis podem ocorrer se a amostra for exposta a um campo eletromagnético de frequência característica para igualar a diferença de energia. Em experimentos de RPE, o campo é aplicado em um plano perpendicular à direção do campo magnético estático. As transições são induzidas somente entre níveis adjacentes (obedecendo a exigência $\Delta M_s = \pm 1$), então a condição de ressonância que conduz à absorção de energia pela amostra é alcançada quando:

$$h\nu = \Delta E = g\beta H \quad (2.9)$$

onde ν é a frequência do campo de radiação, que neste caso é uma frequência na faixa de micro-onda [27]. As transições, de α para β e de β para α , são igualmente prováveis, e somente é possível detectar absorção de energia se houver mais spins em α do que em β .

2.3 FREQUÊNCIA DE PRECESSÃO

Na ausência de um campo magnético externo, a orientação dos momentos magnéticos na amostra é aleatória. Com a aplicação de um campo magnético externo, o momento magnético $\vec{\mu}$ do elétron adquire um movimento de precessão em torno da direção do campo magnético aplicado, como mostra a Figura 2.2. Este movimento de precessão é o resultado de um torque devido à interação do momento magnético do elétron com o campo aplicado [24,25]. Tal movimento pode ser descrito pela variação do momento angular, de acordo com a seguinte equação:

$$\vec{\tau} = \frac{d\vec{L}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (2.10)$$

sendo $\vec{\mu} = -\gamma \vec{L}$, a expressão acima pode ser rescrita da maneira que se segue:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{H}_0 \times \vec{\mu} \quad (2.11)$$

onde o momento magnético do elétron pode ser representado por:

$$\vec{\mu} = \mu_x \hat{i} + \mu_y \hat{j} + \mu_z \hat{k}, \quad (2.12)$$

e o campo magnético externo, aplicado na direção do eixo z, dado por:

$$\vec{H}_0 = H_0 \hat{k}. \quad (2.13)$$

Sendo assim, resolvendo o produto vetorial, da Eq. (2.11) temos:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = -\gamma H_0 \mu_y \hat{i} + \gamma H_0 \mu_x \hat{j} + 0. \quad (2.14)$$

De onde podemos identificar as três componentes da derivada do momento magnético

$$\frac{d\mu_x}{dt} = -\gamma H_0 \mu_y; \quad \frac{d\mu_y}{dt} = \gamma H_0 \mu_x; \quad \frac{d\mu_z}{dt} = 0; \quad (2.15)$$

cujas respectivas soluções são:

$$\mu_x = \cos \omega_0 t; \quad \mu_y = \sin \omega_0 t; \quad \mu_z = cte; \quad (2.16)$$

onde $\omega_0 = \gamma H_0$, é denominado de frequência de precessão de Larmor, sendo que essa frequência não altera a magnitude do momento magnético do elétron [28].

O campo efetivo é dado por $\vec{H}_{ef} = \vec{H}_0 + \vec{H}_1(t)$, onde $\vec{H}_1(t)$ é o campo de microonda. A ressonância então acontece quando a frequência de precessão de Larmor for igual à frequência do campo de microonda, ou seja $\omega_0 = \omega_1$, como mostra a figura 2.2.

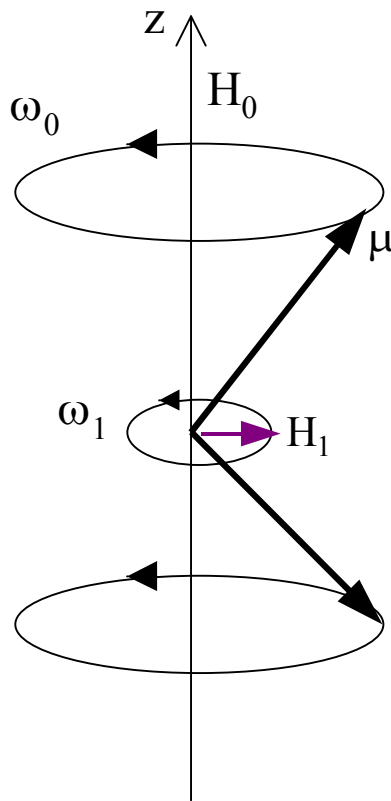


Figura 2.2- Diagrama de vetores ilustrando o movimento de precessão do momento magnético do elétron em torno do campo magnético externo H_0 e também o campo magnético H_1 oriundo da microonda.

2.4 A ABSORÇÃO COMO FUNÇÃO DAS POPULAÇÕES DE SPINS

Para que haja um sinal de absorção observável em RPE é necessário que o sistema paramagnético interaja com um campo magnético efetivo (total), dado por:

$$\vec{H}_{ef} = \vec{H}_0 + \vec{H}_1(t) \quad . \quad (2.17)$$

Quando o sistema está em ressonância, ou seja, quando a frequência de precessão de um determinado spin é exatamente igual à frequência do campo de microondas, energia é trocada entre o campo magnético e o sistema de spins, de maneira que transições são induzidas entre os dois níveis de energia. Portanto, a absorção líquida de energia requer uma diferença de população para os dois níveis em que as transições estão sendo induzidas. Se em uma amostra existe N^α elétrons em um nível com energia E^α ($M_S = -1/2$) e N^β elétrons em um nível com energia E^β ($M_S = +1/2$), os elétrons estão distribuídos entre os dois níveis de energia de acordo com a distribuição de Boltzmann [24], então podemos escrever:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp \left[- \left(\frac{E_\alpha - E_\beta}{kT} \right) \right], \quad (2.18)$$

onde k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Sabemos que como $\Delta E \ll kT$ as populações dos dois níveis são praticamente iguais. O que vai determinar a intensidade do sinal de RPE será a diferença populacional n ($n = N^\alpha - N^\beta$) dos dois estados de spins. A absorção líquida de energia do campo de radiação ocorre quando a maior taxa de transição acontece de um nível mais populado para o outro menos populado. Se não ocorrer processos dissipativos, N^β cresce até se igualar a N^α e a taxa de absorção de energia tende a zero.

Como resultado desse processo não será mais observada a ressonância e o sistema estará saturado [29].

Para temperaturas em torno de 300 K e um campo magnético de 3400 G, temos que a razão entre as populações de spins dada pela Eq. (2.18) é de 1,0015, ou seja, uma diferença de 15 spins em 10^4 . Como o número total de spins N é muito elevado, $N \sim 10^{15}$ spin, é possível concluir que a diferença de população é da ordem de $1,5 \times 10^{12}$ spins, uma diferença considerável para espectroscopia de RPE.

2.5 INTERAÇÕES MAGNÉTICAS

A separação de energia em dois níveis, resultante dos diferentes estados de spin sob a ação do campo magnético externo, é conhecida como efeito Zeeman, sendo este representado por uma energia expressa pela seguinte hamiltoniana:

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} = -\mu_z H \quad (2.19)$$

Além da interação Zeeman já discutida vamos discutir também a interação entre o spin eletrônico e o spin nuclear conhecida como interação hiperfina. Essa interação é de grande importância na análise do espectro e na identificação de espécies paramagnéticas. Concentraremos nossa discussão principalmente em moléculas com um elétron desemparelhado (radicais livres), porque essa classe molecular é normalmente usada em técnicas de marcadores de spin.

O desdobramento da linha do espectro de RPE surge do fato de que o momento magnético de spin eletrônico, interagindo com o momento magnético nuclear (I), “sente” um campo magnético total diferente, conforme as $2I+1$ orientações possíveis que são assumidas pelo spin nuclear no campo magnético

estático. As interações entre os spins nucleares e os spins eletrônicos são representadas pela seguinte hamiltoniana [30,31]:

$$H_{hip} = -g_e \beta_e g_n \beta_n \left[\frac{(\vec{I} \cdot \vec{S})}{r^3} - \frac{3(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\vec{I} \cdot \vec{S}) \delta(r) \right], \quad (2.20)$$

onde r é a distância entre o núcleo e o elétron, I e S são os vetores de spin nuclear e eletrônico respectivamente. Os dois primeiros termos da Eq. (2.20) descrevem a interação dipolar elétron-núcleo, podendo ser escritos na forma do tensor de acoplamento hiperfino entre os dois vetores de momento angular:

$$H_{dipolar} = \vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{S}, \quad (2.21)$$

onde A é um tensor de segunda ordem representando o acoplamento hiperfino dipolar, dado por uma matriz de elementos A_{ij} :

$$A_{ij} = -g_e \beta_e g_n \beta_n \left\langle \frac{(r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j)}{r^5} \right\rangle. \quad (2.22)$$

O segundo termo da equação 2.20 surge do acoplamento de contato de Fermi, também chamada de interação hiperfina isotrópica, devido ao fato do elétron ter uma probabilidade finita de ser encontrado no núcleo, cuja derivação está baseada na equação relativística de Dirac [30]. A hamiltoniana que descreve esta interação é dada por:

$$H_{isotrópica} = a \cdot \vec{S} \cdot \vec{I}, \quad (2.23)$$

onde a é a constante de acoplamento isotrópico escalar, é dada por:

$$a = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_n \beta_n |\Psi(0)|^2, \quad (2.24)$$

onde $|\Psi(0)|^2$ representa a probabilidade de encontrar o elétron no núcleo.

Sendo assim podemos escrever a Hamiltoniana de acoplamento hiperfino da seguinte maneira:

$$H_{\text{hiperfina}} = H_{\text{dipolar}} + H_{\text{isotrópica}}. \quad (2.25)$$

2.6 OS MECANISMOS DE RELAXAÇÃO

Quando uma amostra paramagnética se encontra na presença de um campo magnético, ela sofre um processo de magnetização M , definido como a soma dos momentos magnéticos por unidade de volume, ou seja,

$$M = \frac{1}{V} \sum_i \mu_i. \quad (2.26)$$

O valor de M possui uma orientação de mínima energia quando M é paralelo ao campo magnético H_0 .

Para que a magnetização retorne ao equilíbrio, é necessário que haja troca de energia entre o sistema de spin e a rede. Portanto, esta volta da magnetização ao equilíbrio não é instantânea, pois é necessário que os modos de vibração de rede recebam a energia suplementar do sistema de spins. Esta absorção de energia pela rede permite a relaxação do sistema, que acontece num determinado tempo T_1 , conhecido como tempo de relaxação spin-rede, ou longitudinal. Este tempo de relaxação T_1 está relacionado com a característica da amostra e com a temperatura [30].

Além do tempo de relaxação descrito acima, existe também um outro, T_2 , chamado de tempo de relaxação spin-spin, ou transversal. Este tipo de relaxação é proveniente do aparecimento da componente transversal da magnetização no plano xy, que é induzida a se movimentar em torno do campo total $H(t)$, na presença do campo de microondas. Quando não há nenhum campo de microondas incidindo na amostra, a componente de magnetização M_{xy} encontra-se em um determinado valor de equilíbrio, o qual depende da intensidade dos campos locais onde os spins se encontram localizados. Quando o campo de microondas passa a incidir na amostra, a componente transversal da magnetização M_{xy} sairá de sua condição de equilíbrio, retornando à condição inicial após um determinado período de tempo. Este tempo necessário para que este processo aconteça é o chamado tempo de relaxação spin-spin, T_2 [31].

Da mesma forma que a relaxação spin-rede determina o grau de saturação do sistema, a relaxação spin-spin está associada à largura de linha do sinal de RPE, quando o sistema não está saturado. Os fatores que determinam a rapidez da relaxação spin-spin são: a intensidade e a distribuição dos campos locais em torno dos centros paramagnéticos, sendo que a largura de linha vai depender de como cada spin irá precessionar em torno do campo magnético que atua sobre ele, não esquecendo que a frequência de precessão se altera conforme a intensidade do campo local. Assim, quanto maior for a intensidade dos campos locais em que cada spin se encontra, maior será a largura de linha de ressonância e conseqüentemente menor o T_2 [28,29], já que este é inversamente proporcional à largura de linha. Podemos também pensar através do princípio da incerteza que quanto menor for o tempo de vida de um estado, maior será a imprecisão na determinação de sua energia; o estado de energia fica mais alargado e a distribuição de frequências de ressonância será maior.

2.7 O MÉTODO DOS MARCADORES DE SPIN

Os sistemas biológicos não são paramagnéticos, sendo assim não são capazes de gerar sinal de ressonância paramagnética eletrônica. Uma alternativa para estudar sistemas dessa natureza é usando a técnica de marcadores de spin.

Marcação de spin se refere ao uso de radicais livres estáveis como grupos “informantes” ou marcadores. O termo “marcador de spin” foi primeiro criado por McConnell e co-autores. Marcadores de spin (radicais livres estáveis) são usualmente moléculas contendo o terminal nitróxido que contém um elétron desemparelhado nos átomos de nitrogênio e oxigênio [32].

O radical nitróxido foi descoberto por volta de 1960 por pesquisadores russos e americanos independentemente. Estes radicais receberam considerável atenção desde que foi observada a possibilidade de reações químicas sem o envolvimento do elétron desemparelhado e a partir daí ocorreu um grande desenvolvimento na síntese dos nitróxidos [33].

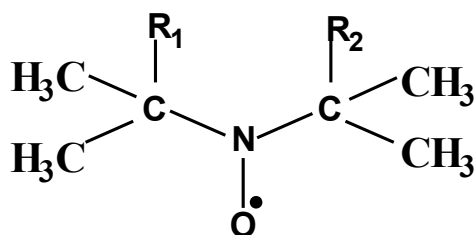


Figura 2.3 - Fórmula química geral do radical nitróxido. R₁ e R₂ representam grupos químicos que variam de acordo com o tipo de marcador de spin.

Uma vez inseridos em um sistema biológico, este marcador fornece informações sobre o meio em que se encontra. O sinal de RPE do nitróxido é muito adequado para gerar informações tais como: a polaridade, a viscosidade,

a acidez do meio bem como as dinâmicas locais das estruturas das macromoléculas e possíveis restrições de movimento do marcador de spin.

O spin desemparelhado responsável pelo espectro de RPE está próximo ao grupo N-O. A interação magnética significativa está entre o elétron desemparelhado e o núcleo ^{14}N . Esta interação núcleo-elétron é representada pela hamiltoniana de interação hiperfina. Sendo $I=1$ para o nitrogênio, o que resulta é $2I+1$ linhas de igual intensidade, separadas pela constante de acoplamento ou constante de desdobramento hiperfino, representada por A , na Fig. 2.4, que pode ser definida, no espectro, como a distância medida em gauss (G), entre duas linhas adjacentes, e g é o fator que define a posição da linha central.

No caso do nitróxido, há um desdobramento dos níveis de energia em três, devido aos três valores permitidos do número quântico de spin nuclear M_I , que pode assumir os valores $M_I = -1, 0, 1$. Assim a ressonância ocorre para três valores de campo, sempre satisfazendo à regra de seleção $\Delta M_I = 0$.

A importância fundamental da técnica de marcadores de spin vem do interesse em se conhecer a estrutura, ou mesmo determinados sítios específicos de moléculas biológicas. O espectro de RPE do marcador é sensível ao seu movimento e isso permite avaliar o grau de mobilidade do marcador no meio. Mudanças conformacionais podem modificar o movimento do marcador e, em vista disso, são detectadas.

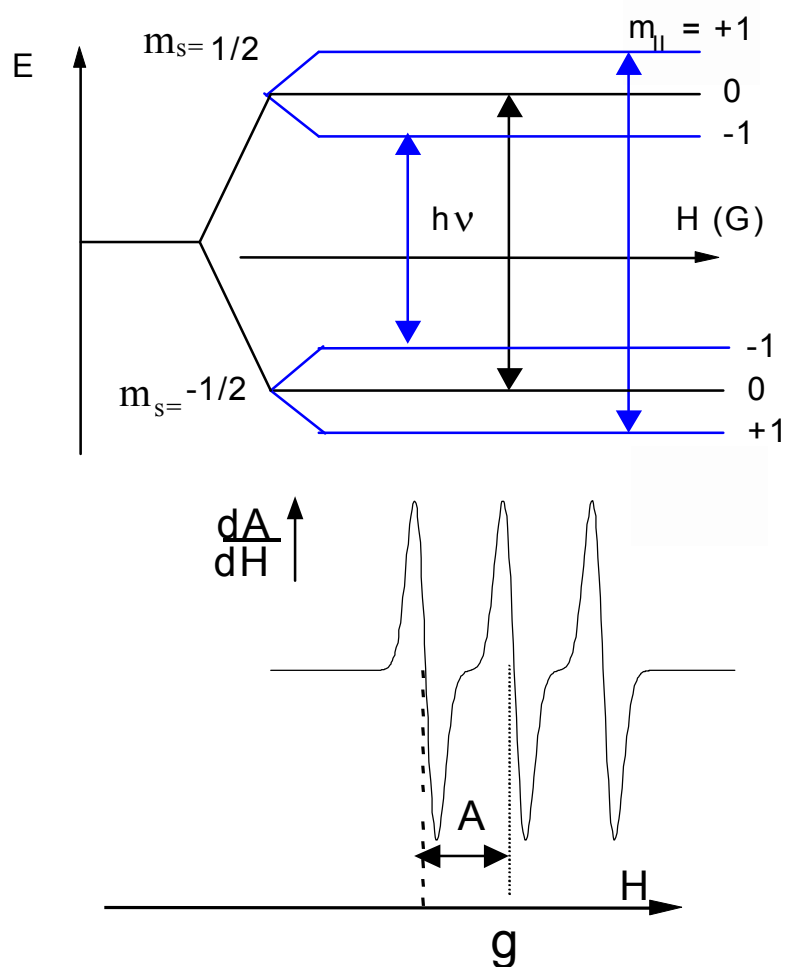


Figura 2.4- Desdobramentos hiperfinos das linhas do nitróxido, ilustrando a formação do espectro (primeira derivada da curva de absorção); A é a constante de desdobramento hiperfino e g define a posição da linha central.

2.8 ANISOTROPIA DOS FATORES A e g

Os espectros de RPE do nitróxido são anisotrópicos. Ambos os valores do fator g e da constante de acoplamento têm dependência angular, isto é, os valores podem variar de acordo com a aplicação do campo magnético. Contudo alguns fatos essenciais são observados, tais como: o maior espaçamento entre as linhas é observado quando o campo magnético está ao longo da direção do eixo z , onde está localizada aproximadamente 80% da densidade eletrônica, neste caso o desdobramento hiperfino $A_{zz} \cong 32$ G, como mostra a Fig. 2.5.

Desdobramentos menores ocorrem nas direções x e y: onde, $A_{xx} \cong A_{yy} \cong 6 \text{ G}$. Com a mudança da direção de aplicação do campo, há um deslocamento dos espectros para a esquerda devido ao aumento do fator-g. Quando em solução, devido ao movimento rápido, estas anisotropias desaparecem e o espectro resultante é a média das três componentes [27], ou seja

$$A_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) , \quad g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) . \quad (2.27)$$

A média é observada porque de uma linha de ressonância à outra do espectro do nitróxido, temos uma frequência de 10^8 Hz . Se o nitróxido girar com uma frequência superior a essa ela consegue contribuir para as três linhas ao mesmo tempo, ou seja, o espectro é modulado pelo processo temporal.

Podemos entender como isto ocorre analisando a Hamiltoniana para o radical nitróxido, Eq. 2.20, que contém basicamente três termos: a interação de Zeeman, o desdobramento hiperfino isotrópico (contato de Fermi) e o desdobramento hiperfino da interação dipolar. Sob movimento rápido de rotação do nitróxido os valores de fator-g e desdobramentos hiperfinos observados nos espectros são os traços dos tensores de segunda ordem. Assim o traço do tensor g dá g_0 e o do desdobramento isotrópico dá A_0 (equação 2.27). Mas no caso do desdobramento hiperfino dipolar o traço deste tensor é zero. De maneira alternativa à descrita na equação 2.21 sua fórmula também pode ser escrita como:

$$H_{dip} = \mathbf{I} \cdot \mathbf{A}^o \cdot \mathbf{S} \quad (2.28)$$

$$H = g_e \beta_e g_n \beta_n \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{r^3} \quad (2.29)$$

Como podemos observar esta expressão tem valor zero para $\theta = 54^\circ$ e dá valores negativos para $\theta > 54^\circ$. Experimentalmente as linhas de ressonância resultantes de uma interação dipolar se cruzam neste ângulo (entre a direção do campo magnético e da reta que une os dois spins). A integral para todos os ângulos dá zero. Para o radical nitróxido a energia da interação dipolar elétron-núcleo corresponde nos espectros a uma variação de frequência da ordem de 10^8 Hz. Assim se o movimento de rotação do nitróxido for mais rápido em relação a essa frequência a interação dipolar não é observada e o espectro de RPE é caracterizado pelos parâmetros g_0 e A_0 (veja figura 2.5). Quando o movimento do marcador aumenta a partir do limite rígido na escala de RPE para o radical nitróxido (10^{-5} s) até o limite de movimento rápido (10^{-10} s) o espectro muda de maneira gradual e esta mudança é causada em grande parte pelo desaparecimento da interação dipolar com o aumento de movimento. Como o movimento de rotação do conjunto de marcadores da amostra é uma distribuição, para um tempo de correlação rotacional de 10^{-8} s haverá parte dos marcadores com menos movimento, mostrando um pouco de interação dipolar, e parte não apresentando esta interação devido ao movimento mais rápido.

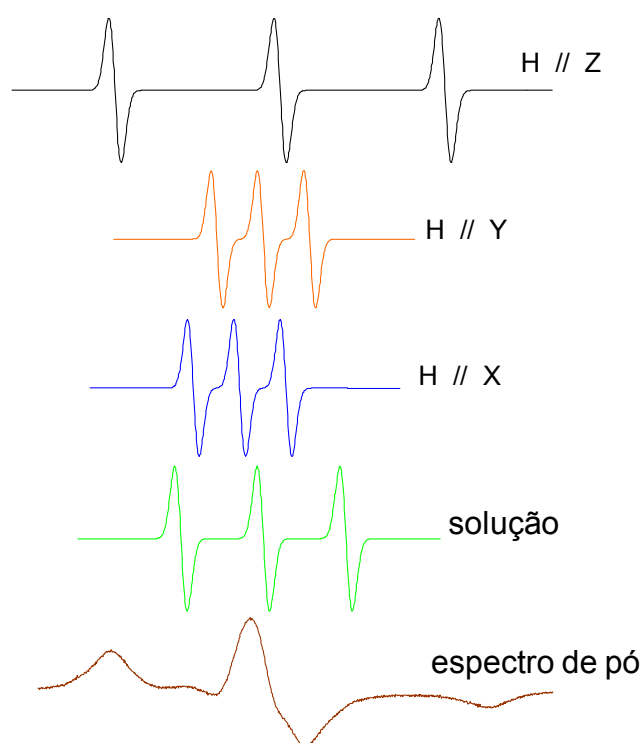


Figura 2.5 – Espectros de RPE representando as anisotropias dos tensores g e A . Em preto, quando o campo magnético é aplicado na direção do eixo z , em laranja, quando o campo é aplicado na direção y , e em azul, campo magnético na direção x . Em verde, tem-se o espectro do marcador em solução, e em marrom, o espectro obtido com temperatura de -70°C (espectro de pó)

2.9 TEMPO DE CORRELAÇÃO ROTACIONAL

Um parâmetro importante calculado através das anisotropias do fator- g e do desdobramento hiperfino, é o tempo de correlação rotacional, que reflete o movimento da molécula em um meio biológico.

O tempo de correlação rotacional τ_c é definido como um intervalo de tempo associado com a mudança de orientação do nitróxido, refletindo assim o movimento do marcador em um meio biológico. O cálculo desse parâmetro é possível devido às anisotropias do fator- g e do desdobramento hiperfino que o nitróxido apresenta. Estas anisotropias são representadas por tensores de segunda ordem cujos autovetores principais estão orientados da seguinte forma:

o eixo z é paralelo ao orbital $2p_z$ do nitrogênio, como mostra a Fig.2.6, o eixo x é paralelo à direção da ligação N-O e o eixo y é ortogonal aos outros dois.

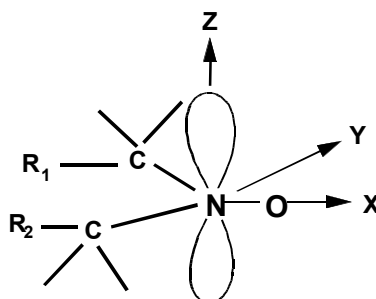


Figura 2.6 – Esboço do radical nitroxídeo, ilustrando os eixos principais dos tensores magnéticos

2.10 ESTUDO DE PROTEÍNAS E O MÉTODO DE MARCAÇÃO SÍTIO DIRIGIDO

As proteínas são estudadas através de marcadores de spin que reagem com determinados sítios como os grupos sulfidrila, os terminais amino e a cadeia lateral da lisina, formando ligações covalentes. Neste trabalho, como será visto adiante, nós aproveitamos sítios naturais do estrato córneo ou da albumina para ligar o marcador no aminoácido cisteína. A marcação de spin em mutação sítio dirigido é um método emergente para a determinação da estrutura e dinâmica conformacional de proteínas solúveis em água e proteínas de membranas. O artifício essencial do método é ligar o nitroxídeo na cisteína que foi introduzida por mutagênese, em posições predeterminadas, na sequência de aminoácidos da proteína. O marcador é utilizado por reagir com os grupos SH, onde passa a ser uma pequena molécula que permite uma análise do local mais próximo ao esqueleto proteico, refletindo melhor o movimento das cadeias polipeptídicas [34]. Os espectros de RPE de proteínas marcadas por spins são

geralmente compostos por basicamente duas componentes espectrais chamadas de componentes fortemente imobilizada (S) e fracamente imobilizada (W) na escala de tempo de RPE. Apesar das significativas contribuições fornecidas pela espectroscopia de RPE ao estudo das proteínas, a origem destas duas componentes espectrais não foi completamente entendida. Barnes e colaboradores (1994) [35] sugeriram que a origem destas componentes continua sendo um problema para especulação. Contudo, em trabalho prévio [36] foi mostrado que estas duas componentes resultam de um equilíbrio termodinâmico entre as duas populações de nitróxido com estados de mobilidade muito diferentes. A componente menos móvel surge quando a cadeia lateral do nitróxido adota uma conformação dobrada sobre a cadeia principal da proteína, com o grupo N-O se conectando a sítios locais da proteína através de ligação de hidrogênio, uma informação assegurada pelos parâmetros espectrais de RPE. Enquanto a componente mais móvel é fornecida por aqueles marcadores de spin em contato com o solvente, refletindo polaridades típicas para sistemas aquosos. Em artigo subsequente, diversos testes experimentais foram feitos para corroborar esta interpretação [37].

2.11 A SIMULAÇÃO DOS ESPECTROS DE RPE

Hoje existem programas modernos de simulação de espectros de RPE que podem retratar quantitativamente a maior parte das complexas interações entre os marcadores de spin e os sistemas biológicos. A teoria básica envolvida nestes programas é complexa e foge do escopo deste trabalho. Nós utilizamos o programa “Non Liner Least Square” (NLLS) que será mais bem descrito na seção de materiais e métodos. Este programa foi utilizado como uma ferramenta de análise sem nos preocuparmos em entender todos os aspectos teóricos de seu funcionamento. O programa NLLS vem sendo

desenvolvimento desde a década de 70 pelo grupo do Professor Jack H. Freed (Cornell University) [38] e atualmente está disponível na Internet.

O leitor interessado no assunto poderá obter uma boa introdução da teoria através dos trabalhos de Nordio [27] e de Jack H. Freed [38]. Em nível mais avançado citamos o trabalho de 1989 [39]. Uma pesquisa bibliográfica pelo autor Freed JH na Internet poderá fornecer uma numerosa lista de artigos sobre a teoria envolvida na simulação.

Para não deixar o leitor sem uma idéia geral, finalizaremos este capítulo mencionando alguns aspectos envolvidos. A base do método de simulação é a equação estocástica de Liouville, a qual é equivalente à equação de Shrödinger dependente do tempo:

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(\Omega, t) = -i [H(\Omega, t), \rho(\Omega, t)] - \Gamma(\Omega) [\rho(\Omega, t) - \rho_0(\Omega, t)], \quad (2.30)$$

onde $H(\Omega, t)$ é o operador Hamiltoniano de spin, o qual, como vimos acima depende da orientação do marcador representada pelos ângulos de Euler $\Omega(\phi, \theta, \psi)$. A dependência temporal está contida tanto no Hamiltoniano como nos elementos da matriz densidade ρ . O comutador da equação dá a dinâmica de spin para cada orientação molecular, prevista pela mecânica quântica. $\Gamma(\Omega)$ é o operador de Markov para a difusão rotacional independente do tempo, cuja equação, no modelo de difusão Browniana, pode ser escrita como:

$$\frac{\partial}{\partial t} P(\Omega, t) = -\Gamma(\Omega) P(\Omega, t), \quad (2.31)$$

onde $P(\Omega, t)$ corresponde à probabilidade do marcador estar em um estado Ω em um dado tempo t . O processo estacionário de Markov é tal que a probabilidade de encontrar o marcador no estado Ω_2 no tempo t_2 , se no estado Ω_1 no tempo $t_1 = t_2 - \Delta t$, é independente do valor de Ω_1 no tempo anterior t_1 e

depende somente de Δt e não de t_1 . No caso da difusão rotacional isotrópica, $\Gamma(\Omega)$ é o operador $R\nabla^2$, e $R^{-1} = 6\tau_C$, o tempo de correlação rotacional.

Quando a molécula gira, o Hamiltoniano de spin varia em torno de um valor médio H_0 devido às anisotropias de fator-g e de desdobramento hiperfino, sendo esta flutuação considerada como uma perturbação $H_1(t)$. Este giro é representado pelas matrizes de Wigner que relaciona a orientação do marcador em relação ao sistema do laboratório. Nos elementos da matriz densidade estão embutidos os efeitos das transições e relaxações de spin. Os efeitos da relaxação são descritos pelo método de Redfield [30]. A simulação do espectro de RPE consiste em resolver numericamente um sistema de equações lineares através de um algoritmo sofisticado, no caso do programa NLLS este algoritmo é o de Lankoz.

O Hamiltoniano de spin total, quando expresso em unidades de frequência, pode ser separado em três componentes,

$$H(\Omega) = H_0 + H_1(\Omega) + \varepsilon(t) . \quad (2.32)$$

Onde o Hamiltoniano independente da orientação,

$$\hbar H_0 = \gamma_e B_0 S_Z - \hbar \sum_i \gamma_i B_0 I_{Zi} + \hbar \gamma_e \sum_i a_i S_Z I_{Zi} , \quad (2.33)$$

dá os níveis de energia de ordem zero e as frequências de transição. A parte dependente de orientação, $H_1(\Omega)$, pode ser expressa como um produto escalar de dois tensores:

$$H_1(\Omega) = \sum_{\mu,i} \sum_{L,M,K} (-1)^K F_{\mu,i}^{(L-K)} D_{KM}^L(\Omega) A_{\mu,i}^{L,M} , \quad (2.34)$$

onde os tensores “ F ” e “ A ” acima são componentes irreduzíveis de tensores de ordem L ($L = 2$ nos caso dos tensores g e A do nítróxido). Esta representação de tensor, mais complicada que a matricial, é utilizada para facilitar os cálculos. O tensor “ F ” representa as funções espaciais em coordenadas fixadas na molécula (os eixos principais dos tensores “ g ” e “ A ” são fixados na molécula, veja Figura 2.6) enquanto o tensor “ A ” é o operador de spin definido no sistema de eixos do laboratório (o eixo z de quantização segue a orientação do campo magnético externo). Os subscritos μ e i se referem aos dois tipos de perturbação (fator- g e interação hiperfina). Os harmônicos esféricos em sua forma mais geral “ D ” fazem a transformação do sistema de eixos fixado na molécula (x' , y' , z') para o sistema de eixos do laboratório (x , y , z). Estes elementos da matriz de rotação de Wigner, os quais são tabelados, formam uma base ortogonal completa. É importante lembrar que as funções de Wigner são as soluções da equação de Schrödinger para o rotor simétrico.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.1 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO

As medidas foram realizadas com um espectrômetro de RPE da BRUKER, modelo ESP 300, com cavidade ressonante ER4102 ST e operando o equipamento em banda-X. Os parâmetros espectrais foram os seguintes: potência de microondas, 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,024 G; campo central, 3365 G; varredura de campo magnético, 100 G. O controle de temperatura foi feito com precisão de aproximadamente 0,3 K, utilizando o controlador da Eurothermam/Bruker que faz uso do sistema de fluxo de nitrogênio.

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ESTRATO CÓRNEO

As membranas de EC foram extraídas de ratos da raça Wistar recém nascidos (com menos de 24 h de vida), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e preparadas no laboratório de Biofísica do Instituto de Física (IF) da UFG.

Após o sacrifício dos ratos por decapitação, as peles foram retiradas com o uso de bisturi e colocadas em água destilada por 1 h, depois estendidas sobre papel de filtro (Whatmam nº 2) com a parte interna em contato com o ar, e colocadas então em um suporte. O suporte foi introduzido em um dissecador contendo 0,5 litro de hidróxido de amônio (NH_3 , PA, Merck). Este dissecador foi conectado, através de uma mangueira, a outro dissecador sob vácuo. Depois da conexão feita, as válvulas de retenção dos dois dissecadores são abertas ao mesmo tempo, deste modo, eliminado o ar do dissecador contendo as peles, deixando-as expostas ao gás de hidróxido de amônio por 5 minutos.

As peles foram retiradas do papel de filtro e colocadas em água destilada, com a parte interna voltada para baixo, durante 2 h aproximadamente. Após o repouso em água destilada, as peles foram lavadas e as membranas de EC foram extraídas apenas friccionando o lado interno da pele. As membranas de EC foram mergulhadas em água destilada e então estendidas sobre tela de teflon. As telas de teflon foram colocadas em suporte e levadas ao dissecador, contendo sílica gel, onde permaneceram sob vácuo por 48 h, aproximadamente. Após a desidratação, as membranas de EC foram colocadas entre folhas de papel de filtro e mantidas sob vácuo em dissecador contendo sílica gel, até serem utilizadas.

3.3 CONTROLE DA HIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EC

As membranas de EC desidratadas foram cortadas em partes iguais de 5 mg, aproximadamente, e colocadas em água destilada por 15 minutos. Posteriormente foram incubadas em 60 μ l de solução de marcador de spin Mal-6 (4-maleimido-1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidina), comprado da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI), a 2 mM (tampão acetato 10 mM, pH 5,3, 0,15 M NaCl e 0,1 mM EDTA) por 15 minutos.

Após o processo de marcação, as amostras foram lavadas por sete vezes, sendo primeiramente lavadas por duas vezes em água destilada, depois três vezes em etanol e por fim, mais uma vez em água destilada e outra no tampão. Esse procedimento de repetidas lavagens é necessário para retirar o excesso de marcador de spin que não se ligou quimicamente ao EC, evitando dessa forma, o aparecimento do sinal de RPE típico do marcador livre em solução.

Depois da lavagem, a amostra foi introduzida em capilar somente para adquirir o formato interno do capilar; depois de moldada nessa forma foi exposta ao meio ambiente, por determinado intervalo de tempo com o objetivo de perder uma certa quantidade de água. Feito isso, a amostra foi novamente

colocada em capilar o qual foi selado para manter o conteúdo de água após o equilíbrio. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura de 2 a 86°C, variando de quatro em quatro graus Celsius.

Após as medições, as amostras foram retiradas dos capilares, pesadas e depois de permanecerem em dessecador contendo sílica gel, por 48 h, foram pesadas novamente. A partir dos pesos nas condições secas e hidratadas o conteúdo de água de cada amostra foi estimado como a percentagem de água na amostra hidratada ($\text{g H}_2\text{O/g EC úmido} \times 100\%$). De uma mesma membrana de EC foram preparadas diversas amostras com diferentes conteúdos de água e isto foi repetido três vezes em experimentos independentes.

3.4 CINÉTICA DE REAÇÃO

As membranas de estrato córneo, previamente incubadas por 30 minutos em água destilada, foram colocadas em 60 μl de solução contendo o bloqueador de grupos sulfidrilas NEM (N-etil-maleimido) a 2 mM no tampão acetato por tempos variados, desde 15 minutos até 12 h. Depois de incubadas com o NEM, as amostras foram lavadas 2 vezes em água destilada, 2 vezes em álcool e mais 2 vezes em água destilada. Na sequência, as membranas foram incubadas em 60 μl de solução contendo o marcador de spin Metil a 4 mM, por tempos variados, desde 30 minutos até 15 h, conforme o tempo de incubação com o NEM. Depois de marcadas, as amostras foram lavadas de acordo com o procedimento descrito acima. Finalmente as membranas foram incubadas em tampão (pH 5,1) por 15 minutos e introduzidas em capilares para medidas de RPE. Os espectros foram registrados a 2°C e a 30°C.

As membranas marcadas com metil, depois de retiradas do espectrômetro, foram incubadas em 0,5 ml de solução com 0,5 mM de ácido ascórbico por 5 minutos. Posteriormente, a membrana era retirada do ependorfe, colocada no capilar para registro do espectro, e depois colocada de

volta no ependorfe. Esse Procedimento foi repetido por 6 vezes, até completar 30 minutos de reação com o ácido ascórbico.

3.5 PROCESSO DE SEPARAÇÃO DO ENVELOPE DO CORNEÓCITO

Uma membrana de EC (~ 10 mg) foi incubada a 50°C, por 24 h, em 10 ml de uma solução contendo: SDS (decilsulfato de sódio) a 2 mM, N-óxido-dimetildodecilamina a 8 mM e uréia a 8 M. A seguir foi feita a diálise da mistura, utilizando uma tela de teflon como membrana. Na tela de teflon fica retido o envelope do corneócito e no becker, onde foi realizada a diálise, fica o restante das proteínas, sendo possível concentrá-las por centrifugação. O envelope foi marcado incubando-o, por 18 h, com marcador a 2 mM. Posteriormente foi lavado como feito com as amostras de EC. Para o restante das proteínas, foi realizada uma incubação de 1 h, à temperatura ambiente, e o processo de lavagem foi feito por diálise contra o tampão em geladeira.

3.6 PREPARAÇÃO DE BSA (“BOVINE SERUM ALBUMINE”) MARCADA

A BSA, obtida da Sigma Chem. Co. (Milwaukee, WI, USA), na concentração de 0,3 mM em tampão fosfato salino (fosfato a 10 mM, NaCl a 150 mM e EDTA a 0,2 mM, pH 7,4) foi incubada por 24 h a aproximadamente 4°C com marcador de spin 5-MSL (Milwaukee, WI, USA) a 1 mM. Os marcadores livres foram removidos por diálise contra o tampão em geladeira. Para introduzir o detergente na concentração correspondente a solução de BSA foi diluída a 0,2 mM em tampão incluindo a amostra de controle (sem detergente). As amostras foram introduzidas em tubos capilares para medidas de RPE.

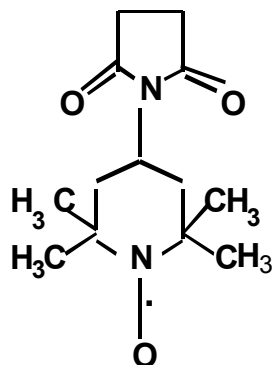
3.7 MARCADORES DE SPIN UTILIZADOS

Existem vários tipos de marcadores de spin disponíveis no mercado e que podem ser utilizados nos estudos de proteínas. Na figura 3.1 estão apresentadas as fórmulas moleculares dos marcadores de spin derivados do maleimido mencionados em nosso trabalho. Estes marcadores reagem especificamente com os grupos sulfidrila das proteínas.

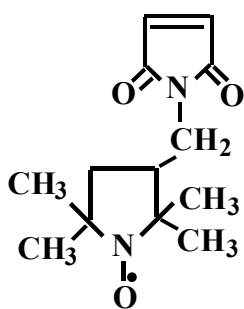
3.8 PARÂMETROS DA SIMULAÇÃO ESPECTRAL

Os espectros de RPE foram simulados através do programa NLLS (“Nonlinear Least-square”) [39]. Este programa permite o ajuste de um espectro com duas componentes com diferentes estados de mobilidade e parâmetros dos tensores magnéticos. Os tensores magnéticos g e A , são definidos em um sistema de eixos fixos na molécula, onde por convenção, o eixo x está na direção da ligação N-O, o eixo z é paralelo ao eixo $2p_z$ do átomo de nitrogênio, e o eixo y é perpendicular aos eixos x e z [38]. Os tensores g e A (G) usados nos cálculos para as componentes 1 e 2, chamadas neste trabalho de componentes S e W, respectivamente, foram: $g_{xx}(S) = 2,0098$, $g_{yy}(S) = 2,006$, $g_{zz}(S) = 2,002$, $g_{xx}(W) = 2,0079$, $g_{yy}(W) = 2,0054$, $g_{zz}(W) = 2,003$, $a_{xx}(S) = 6,9$, $a_{yy}(S) = 7,9$, $a_{zz}(S) = 36,2$, $a_{xx}(W) = a_{yy}(W) = 7,5$, $a_{zz}(W) = 36,2$.

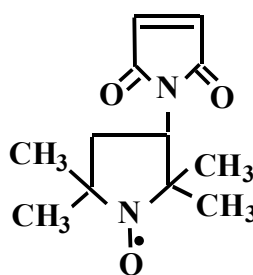
a)



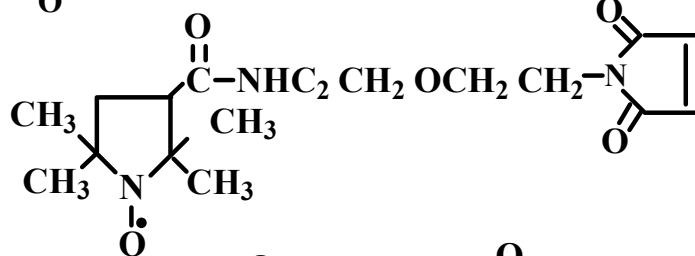
b)



c)



d)



e)

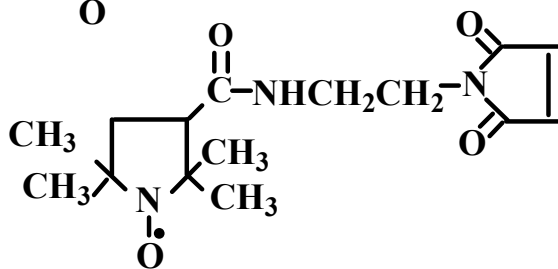


Figura 3.1-a) 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1 oxil (**mal-6**)

b) 3-maleimidometil 2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

c) 3-maleimido-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil (**mal-5**);

d) 3-[2-(2-maleimidoetoxi)etilcabomoil]-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil;

e) 3-(2-maleimidoetil)-2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidinil oxil

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 EFEITO DA HIDRATAÇÃO SOBRE A DINÂMICA DAS PROTEÍNAS DO ESTRATO CÓRNEO

4.1.1 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE PROTEÍNAS MARCADAS COM MAL-6

Na Figura. 4.1a são mostrados os espectros de RPE experimental e de melhor ajuste do marcador de spin derivado do maleimido, 6-MSL, covalentemente ligado aos grupos SH do tecido do estrato córneo. Como geralmente ocorrem para outras proteínas, tais espectros são compostos de basicamente duas componentes espectrais, indicando a coexistência de duas populações de spin com estados de mobilidade muito diferentes. Pela simulação dos espectros, é possível separar as duas componentes espectrais que se sobrepõem no espectro experimental. Estas componentes, tecnicamente denominadas de fortemente e fracamente imobilizadas, são normalmente denotadas por componentes S e W, respectivamente. A componente mais móvel W (Figura 4.1b), sob a escala de tempo dos experimentos de RPE para radicais nitróxidos em banda X (9,4 GHz), apresenta três linhas de ressonância bem definidas, tendo uma constante de desdobramento hiperfino isotrópico $2 a_o$, que é muito sensível à polaridade do solvente onde o nitróxido está dissolvido. O parâmetro, $2a_o$, da componente fracamente imobilizada W é o mesmo daquele observado para o marcador de spin em tampão ($17,1 \pm 0,5$ G, espectro não mostrado), indicando que os radicais nitróxidos da componente W estão expostos ao solvente. Assim seus movimentos refletem um tempo de correlação efetivo devido às isomerizações em torno das ligações que unem o grupo nitróxido à proteína. Este tempo de correlação efetivo cai na escala dos

nanossegundos, sendo quase uma ordem de magnitude mais lento daquele do marcador de spin em solução. A componente fortemente imobilizada ou componente de menor movimento S (Figura. 4.1c) representa a maior fração do espectro e permite medir o desdobramento das linhas de ressonância extremas do espectro, ou seja, o parâmetro $2T_{//}$, que reflete a mobilidade do marcador. O tempo de correlação rotacional da componente S é cerca de uma ordem de magnitude maior daquele da componente W, o que indica forte interação do nitróxido com a cadeia polipeptídica.

O valor de $2T_{//}$ de ~ 68 G a 18°C , como será visto adiante, assegura que os nitróxidos que geram a componente S estão formando ligação de hidrogênio com a proteína. O parâmetro $2T_{//}$ é sensível à mobilidade do nitróxido, mas também é afetado pela ligação de hidrogênio com o grupo N-O e interações de van der Waals (Griffith e Jost, 1996), ambas interações tendo o efeito de aumentar a densidade de spin eletrônico desemparelhado no núcleo do nitrogênio.

Em meio hidrofóbico, onde o nitróxido não forma ligação de hidrogênio, o valor máximo de $2T_{//}$ não seria maior que 65 G. Então o estado de mobilidade baixa do marcador da componente S é explicado por uma forte ligação à proteína. De um lado está covalentemente ligado ao átomo de enxofre da cisteína e no outro lado o grupo N-O está ligado ao hidrogênio do grupo amida ou a algum grupo das cadeias laterais.

Com o aumento da temperatura ocorre um decréscimo da razão entre as componentes fortemente e fracamente imobilizadas, N_S/N_W , e como este processo é completamente reversível, fica claro que estas duas componentes espectrais estão em equilíbrio termodinâmico. Portanto, estas duas componentes surgem de dois estados permutáveis do nitróxido: ligado ao hidrogênio (S) e não-ligado ao hidrogênio (W) da proteína.

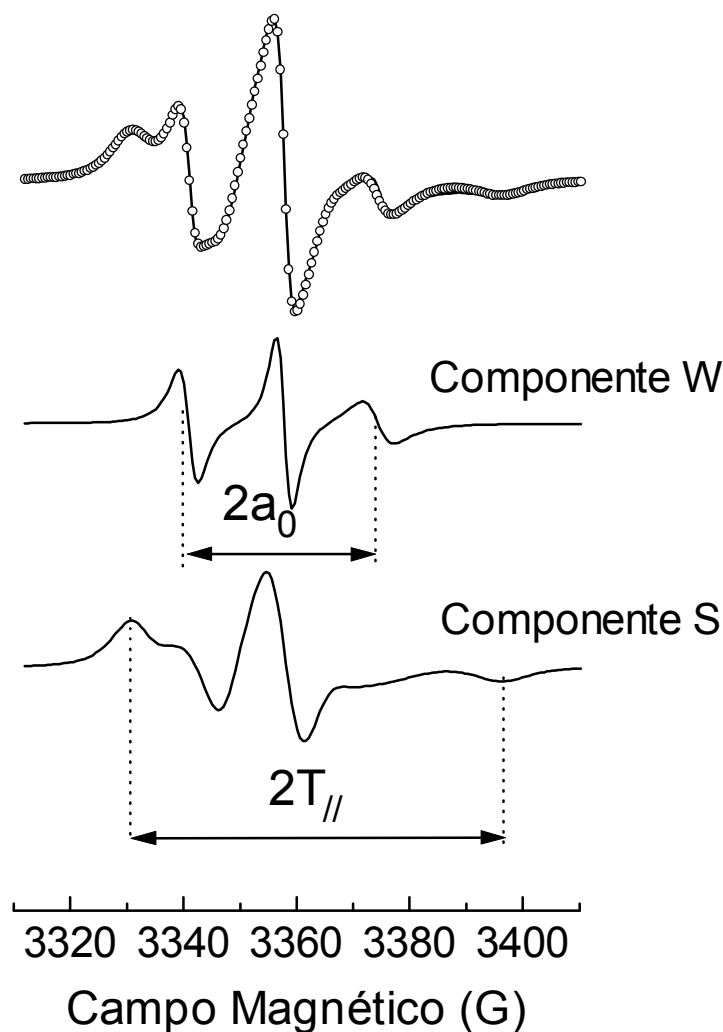


Figura 4.1- (a) Espectros de RPE, experimental (linha) e simulado (círculos), a 34°C, do marcador de spin derivado do maleimido, 6-MSL, covalentemente ligado aos grupos sulfidrilas do estrato córneo em acetato salino tamponado pH 5.1. O melhor ajuste do espectro deste trabalho foi obtido pelo NLLS, considerando duas componentes para todos os ajustes. (b) As componentes fracamente (W) e fortemente (S) imobilizadas, respectivamente. Os parâmetros de RPE $2a_0$, o espalhamento hiperfino isotrópico e $2T_{//}$, o espalhamento hiperfino externo estão indicados.

Na Figura 4.2, um modelo molecular ilustra a acomodação do Mal-6 ligado ao grupo sulfidrilas. Ao lado da possível ligação do nitróxido também estão indicadas as ligações de hidrogênio dos átomos de oxigênio do grupo

maleimido com a cadeia polipeptídica. Estas ligações, que provavelmente favorecem a alta reatividade do maleimido com o grupo sulfidríla, poderiam prender o grupo maleimido à dobra da proteína, explicando a mobilidade muito baixa deste marcador de spin. Neste caso, a ligação que une o maleimido ao nitróxido seria a fonte mais importante dos movimentos rotacionais.

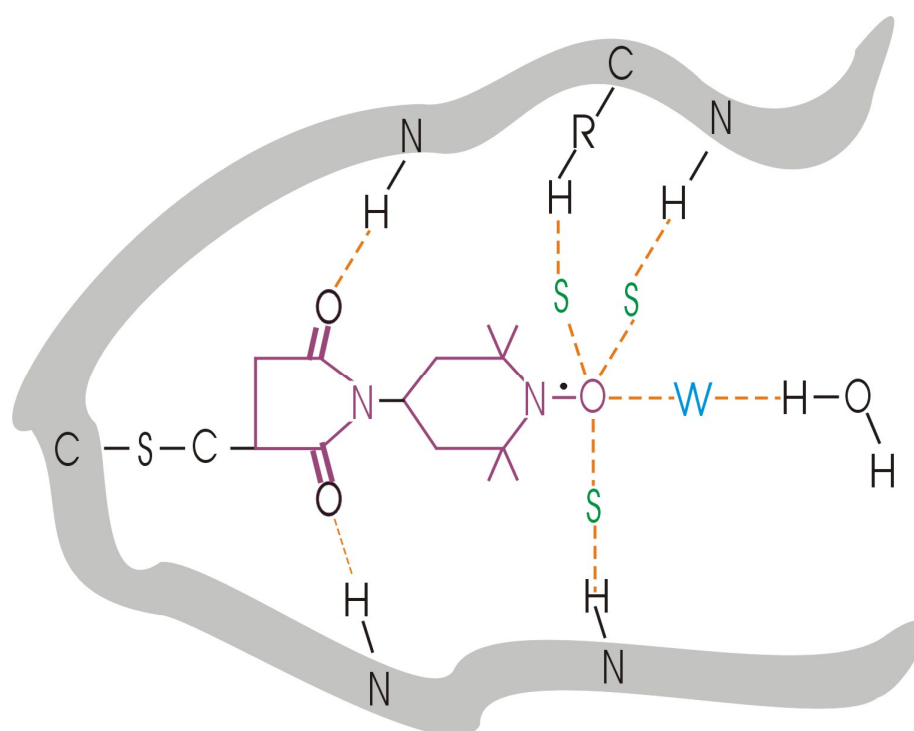


Figura 4.2- modelo esquemático do marcador Mal-6 ligado covalentemente ao grupo sulfidríla da proteína. Neste modelo o átomo de oxigênio do nitróxido pode formar ligações de hidrogênio ou com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água do solvente, formando a componente fracamente imobilizada (W). Os dois átomos de oxigênio do anel do maleimido também formam ligações de hidrogênio com a proteína prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica.

4.1.2 A MOBILIDADE DAS PROTEÍNAS DO EC DECRESCER COM A REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁGUA

Na Figura 4.3, os espectros de RPE experimental e simulado do Mal-6, ligado ao EC, são mostrados a 30 e 50°C para vários conteúdos de água das amostras. Para cada simulação espectral, as populações relativas das duas frações de radicais, bem como os parâmetros de correlação rotacional $R_{\text{bar}}S$ (componente S) e $R_{\text{bar}}W$ (componente W) podem ser obtidos [38]. O programa de ajuste NLLS permite o cálculo do tensor de difusão rotacional, isto é, permite determinar o movimento rotacional em cada componente de um sistema de referência fixo na molécula, R_x , R_y e R_z [39], mas para simplificar os aspectos operacionais do programa, lidando com duas componentes espectrais ao mesmo tempo, usamos somente os parâmetros $R_{\text{bar}}S$ e $R_{\text{bar}}W$, que representam os valores médios ou o traço do tensor de difusão rotacional. De um modo geral, as convergências dos ajustes foram boas conforme mostrado na Figura 4.3.

A Figura 4.4 mostra a razão da população de marcadores de spins nos dois estados de movimento em função da temperatura e para vários conteúdos de água. Os gráficos mostraram um comportamento linear para todos os conteúdos de água das amostras, em todas as faixas de temperaturas apresentadas. Para temperaturas abaixo desses intervalos e para conteúdos de água abaixo de 17% (relativo ao peso total), a população da componente W é muito baixa no espectro de RPE e sua superposição com a componente S impede a exata determinação das populações relativas.

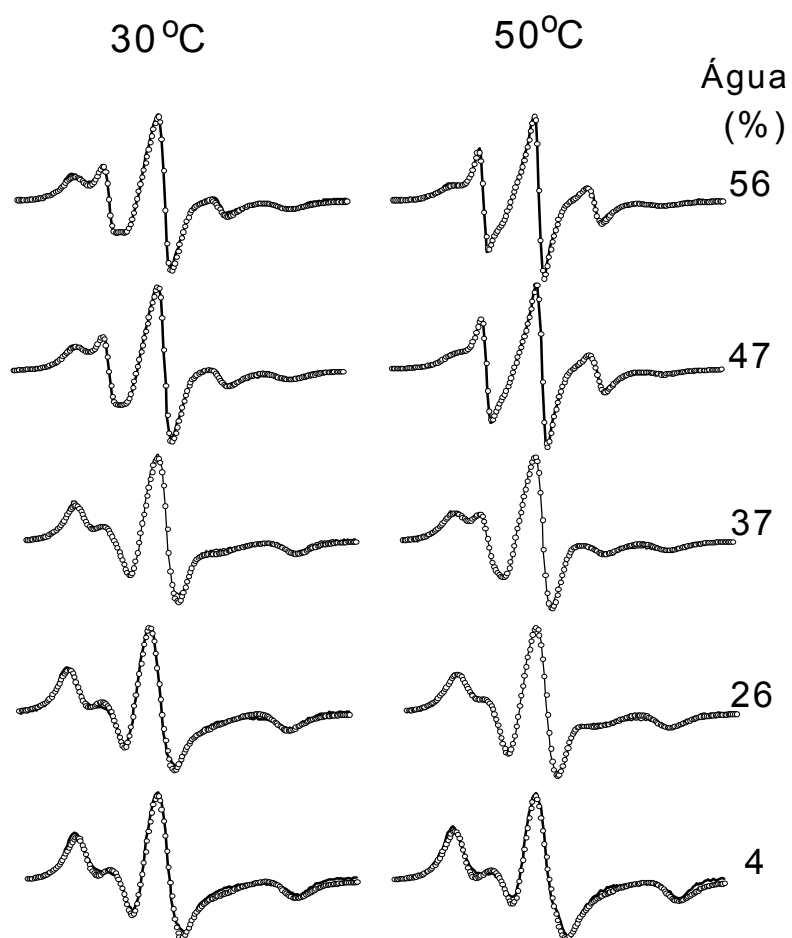


Figura 4.3 – Espectros de RPE experimental (preto) e de melhor ajuste (vermelho) do marcador de spin derivado do maleimido 6-MSL covalentemente ligado aos grupos-SH do estrato córneo (pH 5.1) a 30 e 50°C, para alguns conteúdos de água. Faixa de varredura do campo magnético: 100 G.

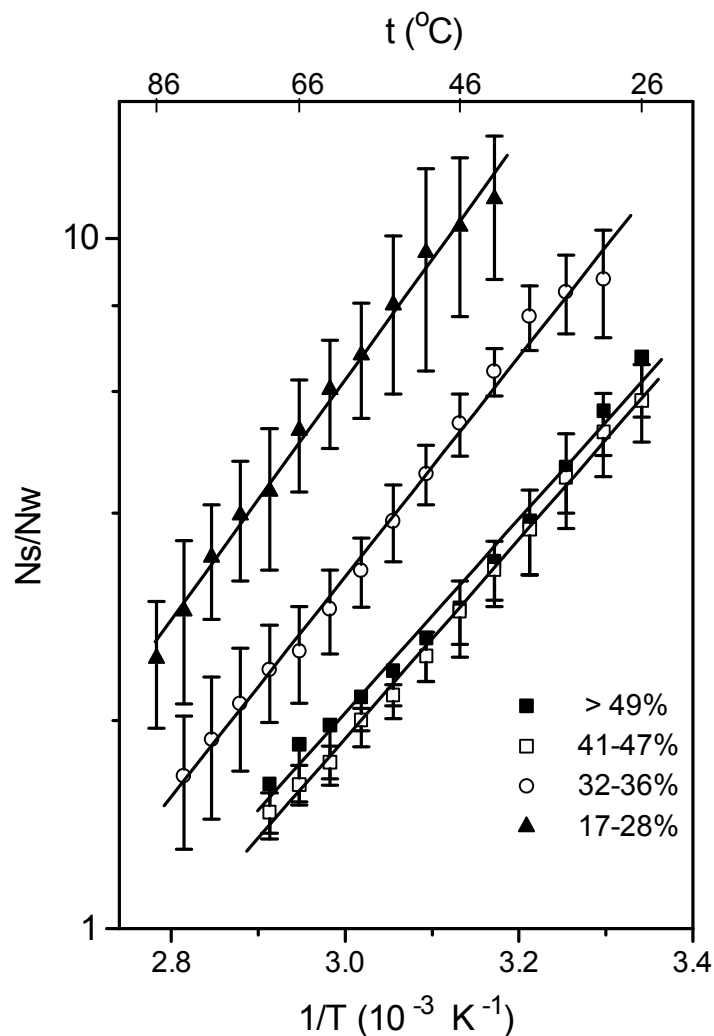


Figura 4.4- A razão entre as populações das componentes fortemente e fracamente imobilizadas, N_s/N_w , no espectro de RPE do estrato córneo marcado com 6-MSL (pH 5.1), como uma função da temperatura absoluta recíproca. Os símbolos referem-se ao estrato córneo com diferentes conteúdos de água em relação ao peso total (% w/w).

Conteúdos de água na faixa de 47-57% não diferem do estado completamente hidratado (excesso de água). Diferenças significativas foram observadas decrescendo o conteúdo de água para as faixas de 35-40% e 18-30%. É notável que todos os espectros de RPE foram completamente reversíveis; após as medidas até altas temperaturas, cada amostra foi novamente medida a 38°C para verificar a reversibilidade e a estabilidade do conteúdo de água das amostras.

Considerando que a relação das populações dos marcadores de spin das duas componentes é dada pela distribuição de Boltzmann com somente dois níveis de energia e cada nível contendo n estados de degenerescência, ou n maneiras de se obter este nível de energia, podemos escrever a seguinte expressão para a razão entre as populações [40]:

$$N_W = \frac{n_W}{n_S} N_S \exp \left[- \frac{(E_W - E_S)}{RT} \right], \quad 4.1$$

ou ainda

$$\ln \frac{N_W}{N_S} = \ln \frac{n_W}{n_S} - \frac{(E_W - E_S)}{RT}, \quad 4.2$$

onde n_W/n_S é um fator pré exponencial que reflete a razão entre o número de configurações para formar as componentes W e S, E_W e E_S são as energias do marcador em contato com a água e com a proteína, respectivamente.

Como N_W/N_S é a razão entre os marcadores de spin das respectivas componentes no equilíbrio, $\Delta G=0$ e,

$$\ln \frac{N_W}{N_S} = \ln K = - \frac{\Delta G^0}{RT} = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}, \quad 4.3$$

ou ainda,

$$\log \frac{N_S}{N_W} = - \frac{\Delta S^0}{2,303 R} + \frac{\Delta H^0}{2,303 RT}, \quad 4.4$$

onde K é a constante de equilíbrio, ΔS^0 é a entropia padrão e ΔH^0 é a entalpia padrão. A Eq. 4.4 mostra que, na prática, os valores numéricos de ΔS^0 e ΔH^0 podem ser determinados através de um gráfico, chamado de gráfico de van't Hoff, como aquele apresentado na Figura 4.4. O coeficiente angular seria $\Delta H^0/2,303R$ e a interseção daria $-\Delta S^0/2,303R$. A tabela 4.1 apresenta os valores calculados para ΔH^0 , ΔS^0 e n_W e n_S . Aumentando a temperatura, o sistema absorve calor e se torna

menos organizado, isto é, a troca de S para W é um processo endotérmico com o aumento de entropia. A diferença de entalpia é também a energia aparente necessária para dissociar o nitróxido da proteína com um correspondente aumento de entropia devido principalmente ao aumento de movimento (a componente W representa um estado de maior mobilidade).

TABELA 4.1

Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 46 °C), entalpia e entropia padrões associadas às interações da cadeia lateral do nitróxido com as proteínas do estrato córneo, para algumas faixas de conteúdo de água. O estrato córneo foi marcado com o marcador de spin derivado do maleimido 6-MSL, nos grupos sulfidrilas. A razão entre os números de configurações para as duas componentes (n_w/n_s , eq. 2) está também apresentada. Comparação é feita com o marcador 5-MSL (controle) e tratamento com uréia 8M.

Conteúdo de água		$\Delta G^\circ_{W \rightarrow S}$	$\Delta H^\circ_{W \rightarrow S}$	$\Delta S^\circ_{W \rightarrow S}$
(g H ₂ O/g EC seco)	(% do peso total)	kcal mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹	cal mol ⁻¹ K ⁻¹
h > 0.96	> 49	-0.67	-6.4 ± 0.7	-17.9
h 0.69-0.89	41-47	-0.64	-6.6 ± 1.0	-18.7
h 0.47-0.56	32-36	-1.13	-7.4 ± 0.8	-19.6
h 0.21-0.39	17-28	-1.51	-8.0 ± 2.2	-20.3

* Os valores numéricos foram calculados usando a equação 4.4 e os dados do gráfico apresentado na Fig. 4.4. Veja texto para maiores detalhes.

Na Figura 4.5, os parâmetros de movimento rotacional ($R_{\text{bar}}S$) e ($R_{\text{bar}}W$) obtidos pelos ajustes da simulação são apresentados como uma função temperatura recíproca. $R_{\text{bar}}S$ reflete o movimento local do esqueleto da proteína, desde que os

marcadores de spin da componente S estão “cristalizados” na proteína, e $R_{\text{bar}}W$ reflete o movimento rotacional da cadeia lateral do nitróxido na fase aquosa, podendo ser afetado pela micro viscosidade nas vizinhanças dos grupos sulfidrila. É visto que ambos os parâmetros são sensíveis à temperatura e que reduzindo o conteúdo de água do EC mudanças significativas são observadas. Não foram detectadas diferenças estatísticas para amostras com conteúdos de água na faixa de 47% até o estado completamente hidratado. Ambos, $R_{\text{bar}}W$ e $R_{\text{bar}}S$, decresceram com a redução do conteúdo de água para a faixa de 35-40% e ainda mais para o intervalo de 18-30%. Abaixo desta última faixa de conteúdo de água, a componente W tende a desaparecer e somente $R_{\text{bar}}S$ pode ser determinado com precisão. Para níveis de hidratação na faixa de 0-4%, $R_{\text{bar}}S$ indicou que as cadeias polipeptídicas ficaram presas até 58°C e acima desta temperatura elas apresentaram um discreto acréscimo de movimento.

A energias de ativação indicadas na Fig. 4.5 foram estimadas com base em uma expressão tipo de Arrhenius,

$$D = D_0 \exp[-E_a/RT], \quad (4.5)$$

em que D é o coeficiente de difusão do marcador e E_a é a energia da difusão, ou seja a energia para dissociar a molécula do solvente. Das equações de Einstein-Stokes temos que:

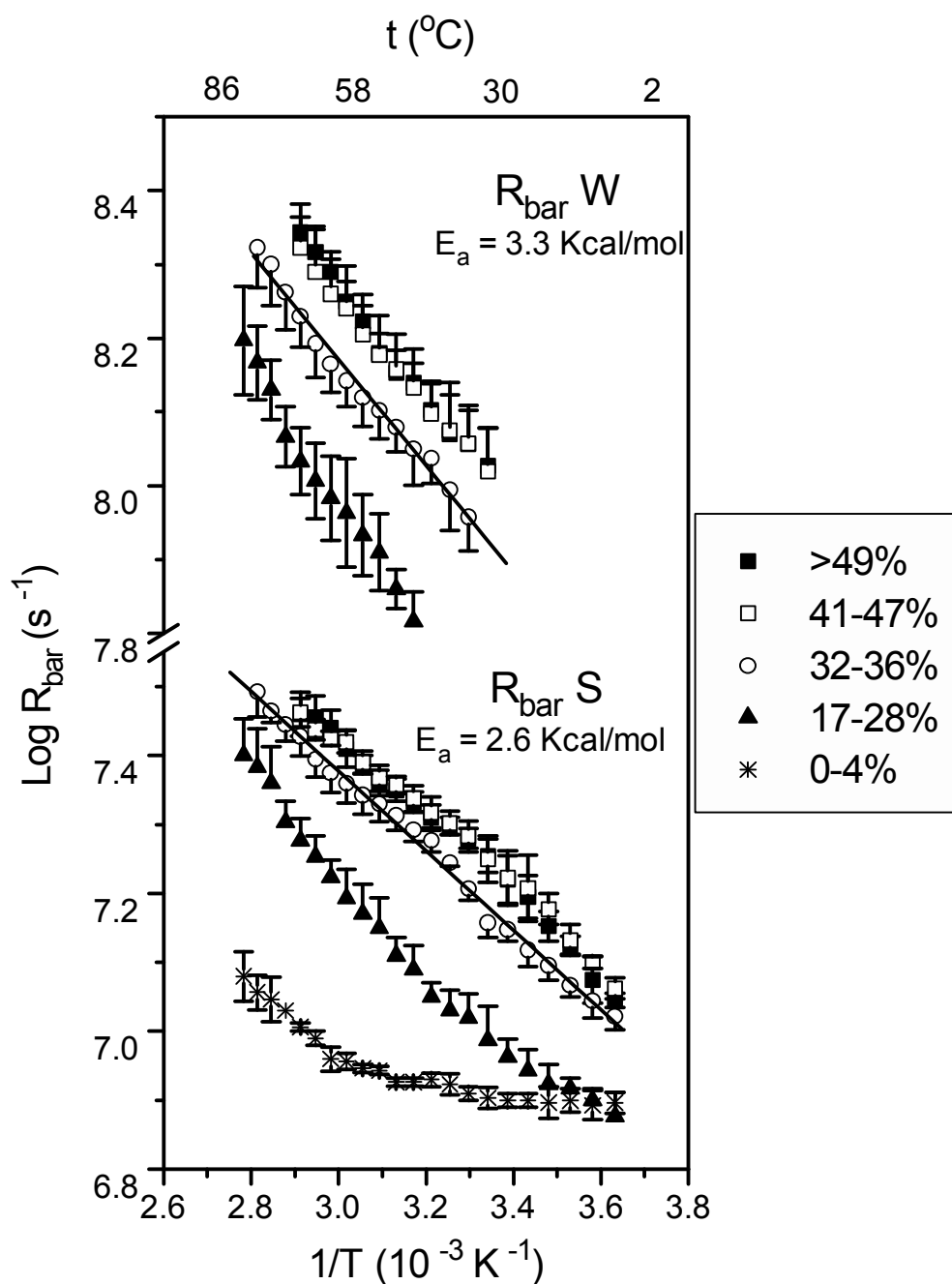


Figura 4.5- Parâmetros de difusão rotacional para as componentes fortemente ($R_{\text{bar}}S$) e fracamente ($R_{\text{bar}}W$) imobilizadas, acima e abaixo da “quebra”, respectivamente, como uma função da temperatura absoluta recíproca. Os parâmetros foram obtidos dos ajustes dos espectros de RPE do MSL-6 em estrato córneo (pH 5.1). Os símbolos se referem ao estrato córneo com diferentes conteúdos de água relativos ao peso total (%w/w). As energias de ativação indicadas representam as barreiras de energia que os marcadores estão sujeitos em suas reorientações.

$$D = KT/6\pi\eta a, \quad (4.6)$$

onde η é o coeficiente de viscosidade do meio e a é o raio de giro da molécula, e

$$\tau_C = \eta V/KT, \quad (4.7)$$

onde V é o volume da molécula marcadora.

Assim podemos escrever:

$$\tau_C = (V/6\pi a D_0) \exp(E_a/RT). \quad (4.8)$$

E como $\tau_C = (R_{\text{bar}})^{-1}$ temos, finalmente, que

$$\log R_{\text{bar}} = \log C - E_a/2,303RT, \quad (4.9)$$

onde a constante C é igual a $6\pi a D_0/V$. Desse modo no gráfico da Fig. 4.5 a inclinação da reta deve dar o valor de $-E_a/2,303R$.

Neste gráfico de Arrhenius (Fig. 4.5) a energia de ativação aparente E_a para a componente W a 32-46% de hidratação foi de 3,3 Kcal/mol. Para conteúdos de água menores é observada uma tendência de aumento no valor de E_a consistente com a idéia de que a cadeia lateral do nitróxido sofre interações mais intensas para o caso das amostras menos hidratadas. Para a componente S o valor da E_a estimado foi de ~2,6 Kcal/mol indicando que a energia transferida para a cadeia lateral do nitróxido, promovendo estados de mobilidade mais alta, é menor do que quando a cadeia lateral está em contato com a fase aquosa. As amostras com conteúdo de água de 0-4% e 17-28% não apresentaram um comportamento linear. No mais baixo nível de hidratação (0-4%) a E_a foi muito baixa no intervalo de temperatura de 2 a ~60°C e aumentou para ~2 Kcal/mol no intervalo de temperaturas entre ~60 a 86°C. Estes resultados sugerem que a energia térmica fornecida à cadeia lateral do nitróxido, com a elevação da temperatura até ~60°C,

foi insuficiente para a cadeia superar a barreira de energia e adquirir estados mais altos de movimento. Acima de $\sim 60^\circ\text{C}$ uma fração de marcadores parece ter obtido a energia necessária para vencer o potencial restaurador, refletindo assim a energia de ativação aparente. Um efeito semelhante também aparece nas amostras de conteúdos de água mais altos (17-28%) onde as rotações ou oscilações de torção da cadeia marcada foram restritas até $\sim 30^\circ\text{C}$; acima desta temperatura uma parte dos marcadores vencem o potencial de restauração de aproximadamente 2 Kcal/mol.

O movimento local do esqueleto da proteína também pode ser acessado pelo parâmetro $2T_{//}$ (Figura 4.1), o desdobramento hiperfino máximo, desde que as linhas de ressonância envolvidas nesta determinação estão bem isoladas no espectro de RPE do Mal-6 ligado às proteínas do EC. Este parâmetro prático, que pode ser medido diretamente no espectro, está relacionado à mobilidade do marcador de spin mesmo que em princípio seja um parâmetro estático associado com a distribuição de orientação dos marcadores. Na Figura 4.6a está mostrada a dependência do $2T_{//}$ com a temperatura. Este parâmetro refletiu as mudanças de mobilidade na cadeia principal da proteína de modo similar ao $R_{\text{bar}}S$.

O parâmetro $2T_{//}$ também pode ser usado para avaliar a polaridade do meio no qual está o nitróxido [34]. No estado congelado, devido à imobilização do nitróxido, na escala de tempo de seu sinal de RPE, é observada uma aproximação entre os valores de $2T_{//}$ e $2A_{zz}$, a componente principal z do tensor hiperfino, a qual é modulada pela distância média entre a densidade de elétrons desemparelhados e o núcleo do nitrogênio. Esta distância é reduzida, e o $2A_{zz}$ é aumentado, quando cargas positivas nas vizinhanças do grupo N-O polarizam esta ligação tornando o átomo de nitrogênio mais eletropositivo.

Na Figura 4.6b é mostrado o gráfico de $2T_{//}$ do Mal-6 ligado ao EC a -70°C em função do conteúdo de água. Os valores de $2T_{//}$ começam em $\sim 70,2$ G para amostras secas e alcançam um patamar em $\sim 73,2$ G, em cerca de 30% do conteúdo de água. Na ausência de ligações de hidrogênio ou em meio hidrofóbico os valores esperados para o $2T_{//}$ são de 65 G. Os valores de ~ 70 G para amostras

secas indicam uma formação de ligação de hidrogênio do grupo N-O com a proteína e a mudança adicional de ~ 3 G no desdobramento hiperfino é devido à contribuição de campo elétrico pela presença das moléculas de água próximas ao fragmento N-O [34].

Estes resultados também sugerem que o conteúdo de água de 20-30% é o nível de hidratação mínimo necessário para cobrir todos os sítios de ligação da água nas proximidades do nitróxido e que cerca de 30% é a quantidade de água ligada à proteína, desde que a polaridade desta região seja a mesma do estado totalmente hidratado ($>49\%$ do conteúdo de água).

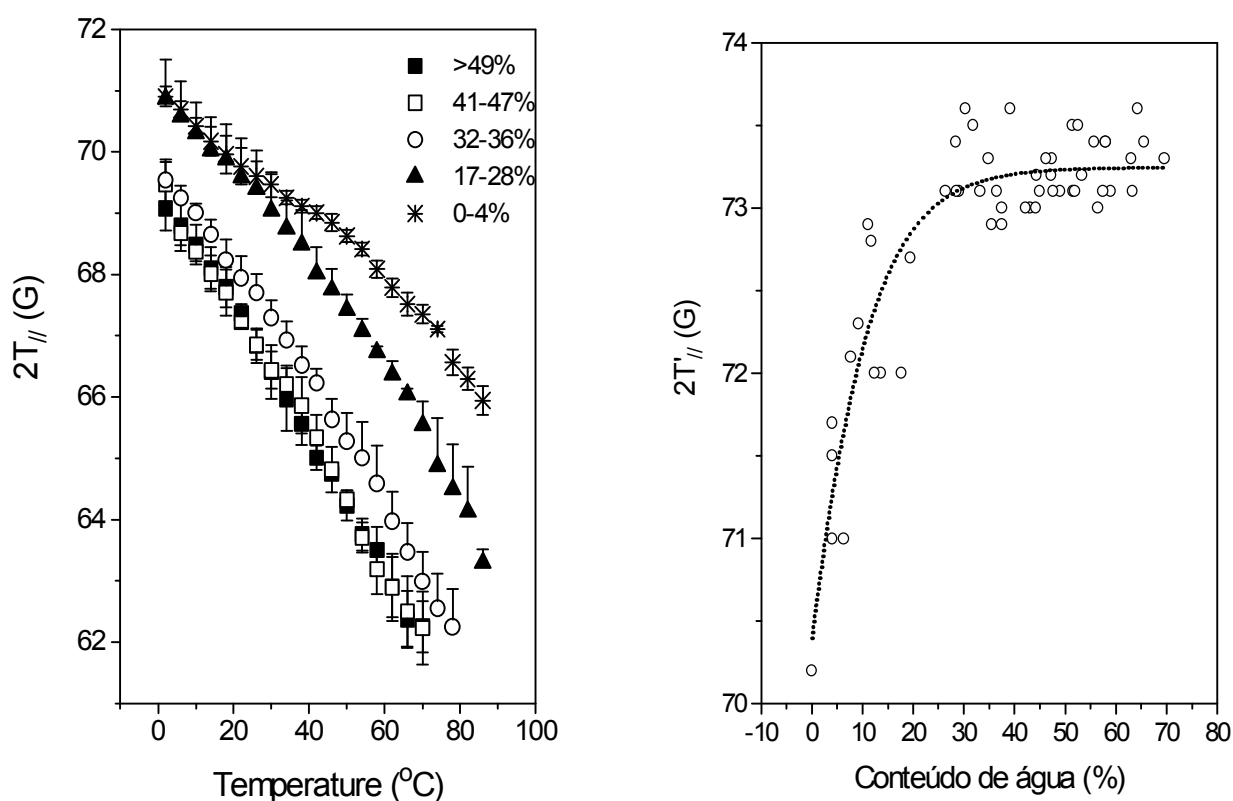


Figura 4.6- Parâmetro de RPE $2T_{\parallel}$, o desdobramento hiperfino máximo (veja Fig. 4.1) do 6-MSL covalentemente ligado aos grupos sulfidrila do estrato córneo (pH 5.1) a) como uma função da temperatura, b) como uma função do conteúdo de água do EC a -70°C . Os símbolos se referem ao estrato córneo com diferentes conteúdos de água relativos ao peso total (% w/w).

4.2 REDUÇÃO DO MARCADOR “IN SITU” COM ÁCIDO ASCÓRBICO

Esta seção tem como objetivo a obtenção de mais informações sobre os sítios sulfidrilas do EC que foram marcados.

Experimentos de cinética de reação dos marcadores específicos dos sítios SHs com EC indicaram que no EC há dois tipos de sítios; um deles é marcado em sua maioria com tempos de reação no intervalo de 15 a 30 minutos, enquanto o outro é marcado com períodos longos de incubação, de 6 a 24 h. É possível perceber isso porque os perfis dos espectros de RPE dos dois sítios são bem diferentes (espectros a e b da Fig. 4.7); a proporção de componente W no sítio 2, ou sítio que marca posteriormente é muito maior. Como há a possibilidade de isolar o envelope do corneócito do EC, foi possível observar que as proteínas do envelope são as que marcam primeiro, dando um espectro muito similar aos descritos neste trabalho (tempo de incubação de 15 minutos, veja a seção de Materiais e Métodos). As proteínas que sobraram no processo de separação do envelope, predominantemente queratinas de vários tipos que ficam no interior do corneócito, também foram marcadas sendo obtido um espectro similar ao do sítio 2 que marca posteriormente (espectros b e c da Fig. 4.7). Isto deixa claro que neste trabalho marcamos as proteínas do envelope e resta saber se o envelope marca mais rápido do que o sítio 2 porque está mais acessível ou se é mais reativo. Para responder isto experimentalmente foram realizados experimentos de bloqueios dos grupos sulfidrilas com N-etilmaleimido (NEM), posterior marcação e acesso do local com ácido ascórbico, solúvel em água como o marcador de spin. Em outras palavras, o NEM tem um grupo maleimido e reage com os grupos sulfidrilas de modo similar ao marcador, (geralmente o NEM é um pouco mais reativo), mas não contém o nitróxido; assim é possível bloquear os sítios que reagem primeiro. Desta forma, foram realizados bloqueios dos grupos SH com diferentes tempos de incubação e depois o EC foi marcado. O marcador sofre redução, perdendo seu sinal de EPR, quando reage com o ácido ascórbico, assim a velocidade de redução

dos marcadores depende fundamentalmente da velocidade do ácido acessar os sítios. A Figura 4.9 apresenta os tempos de meia vida dos marcadores na presença do ácido ascórbico.

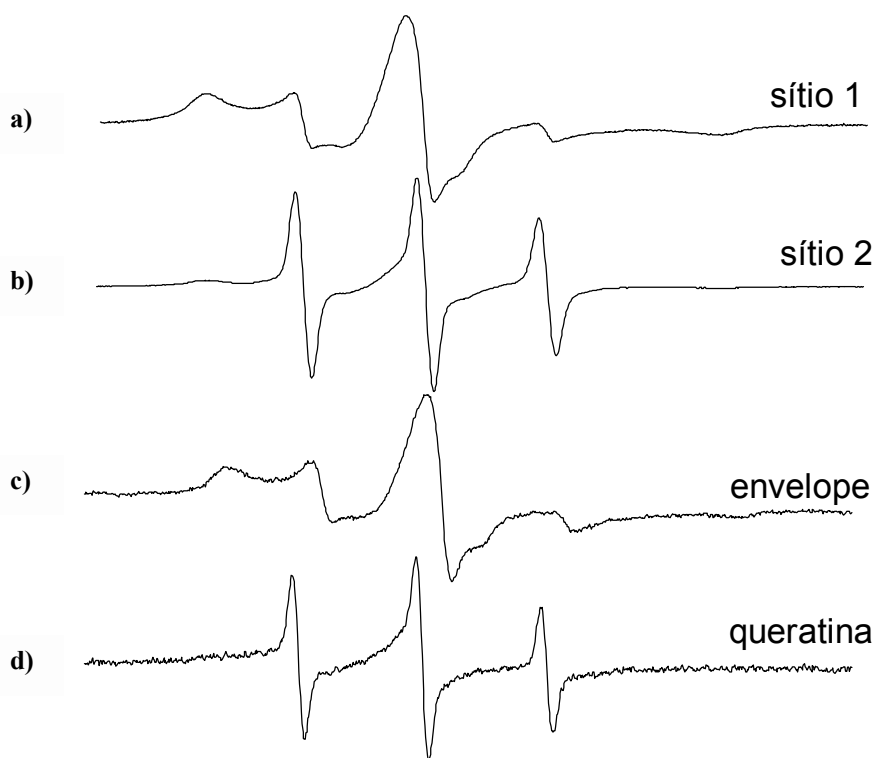


Figura 4.7 -Espectro de RPE medidos a 30°C dos diferentes sítios SH livres do SC: a) (sítio mais acessível), marcado com mal-5 durante 15 minutos; b) (sítio menos acessível), bloqueado com NEM por 2 horas e marcado com mal -5 por 18 horas; c) espectro do envelope do corneócito isolado; d) espectro da queratina e outras proteínas do EC que sobraram no processo de extração do envelope do corneócito.

Como se pode observar na Figura 4.8 o sítio 2 é acessado mais rapidamente pelo ácido ascórbico, sugerindo que eles estão também mais acessíveis ao marcador de spin. Dessa forma o sítio 2 depende de uma marcação mais demorada por ser menos reativo do que o sítio 1.

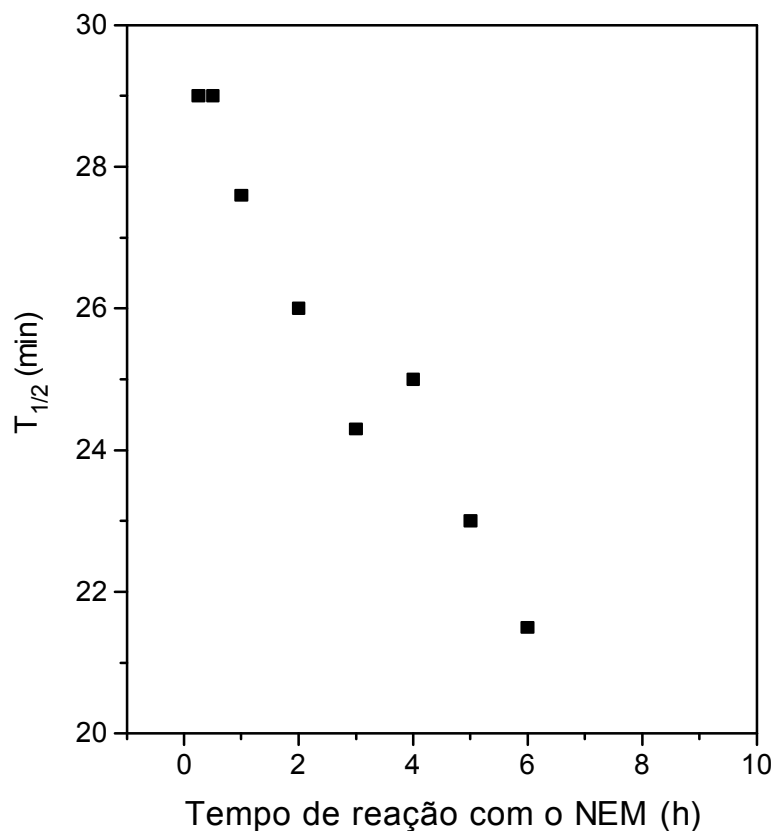


Figura 4.8- (a) Tempo de meia vida do radical nitróxido em função do tempo de reação com o NEM, a uma temperatura de 26°C, na presença de 0,5 mM de ácido ascórbico.

Com os espectros de RPE que geraram os dados do gráfico da Figura 4.8 também foi possível avaliar a mobilidade da proteína em função do tempo de bloqueio com o NEM, ou seja, selecionando progressivamente os sítios do interior do corneócito. A Figura 4.9 mostra o gráfico do parâmetro $2T_{//}$, do marcador de spin Metil, em função do tempo de reação com o N-etil maleimido, para duas temperaturas distintas. Os valores de $2T_{//}$ começam em ~68,5 G e ~66,5 G para as temperaturas de 2°C e de 30°C, respectivamente, e parecem alcançar um patamar em ~67,3 G e ~64,6°C, para as respectivas temperaturas, quando o tempo de reação com o NEM está em torno de 7 h. O comportamento do parâmetro em questão sugere que a mobilidade da proteína aumenta à medida que o marcador de

spin se liga aos grupos sulfidrillas que estão localizados em regiões mais internas do corneócito, sendo que a mobilidade é maior quando o estrato córneo é submetido à temperaturas mais altas.

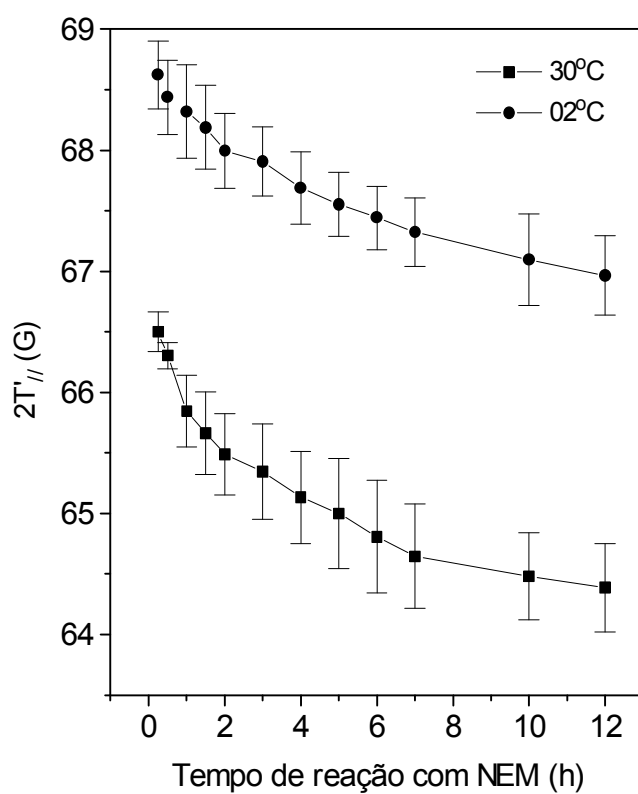


Figura 4.9 - Parâmetro de RPE $2T'_{//}$, desdobramento hiperfino máximo, do marcador Metil covalentemente ligado aos grupos sulfidrillas do estrato córneo (pH 5,1) como uma função do tempo de reação com o NEM, para duas temperaturas distintas.

4.3 EFEITOS DE DETERGENTES NA DINÂMICA DA ALBUMINA

A albumina do soro bovino (BSA) é uma das proteínas que tem sido objeto de amplos estudos de biofísica e bioquímica funcionando como uma proteína modelo. As albuminas são receptoras de uma grande variedade de ligantes de baixo peso molecular pertencentes a várias classes de componentes químicos. Com esta parte de nosso trabalho, o objetivo é conseguir mais informações sobre a interação de detergentes com proteínas, usando a BSA como um sistema modelo. Além de ser uma proteína muito estudada seria um sistema menos complexo que o do EC onde há um complexo protéico. Utilizamos dois tipos de detergentes, sendo o aniônico: dodecil sulfato de sódio (SDS) e o ziteriônico: N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonate (HPS).

Este estudo permite também uma comparação com os resultados para EC, mesmo que usamos um outro marcador de spin neste caso, o 5-MSL, o qual difere do 6-MSL por conter um anel pirrolidina ao invés do piperidina.

4.3.1 BSA MARCADA COM O MARCADOR MAL-5

Na Figura 4.10, está mostrado o espectro de RPE a 38°C do marcador de spin derivado do maleimido 5-MSL, covalentemente ligado ao grupo-SH da BSA.

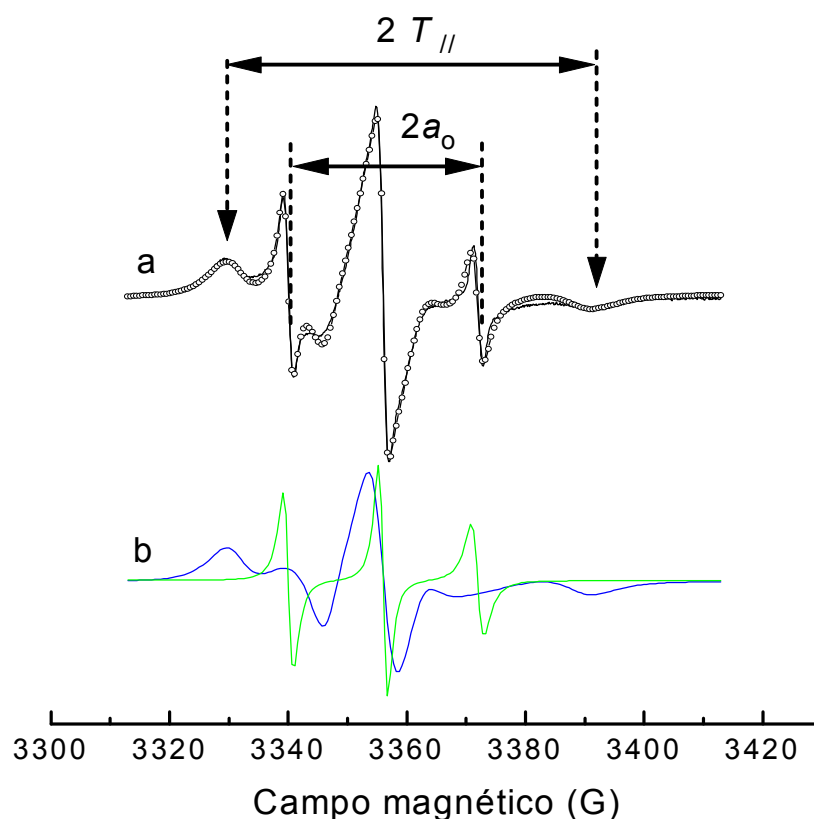


Figura 4.10- Espectros de RPE (a) experimental (linha) e simulado (círculos), a 25°C do marcador de spin derivado do maleimido 5-MSL, covalentemente ligado ao grupo sulfidrila da albumina do soro bovino (0,2 mM) em tampão fosfato pH 7,4. O espectro de melhor ajuste foi obtido pelo programa NLLS, considerando duas componentes espectrais para todos os ajustes. (b) as componentes fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. Os parâmetros de RPE $2T_{//}$, o desdobramento hiperfino externo, e $2a_0$, o desdobramento hiperfino isotrópico estão indicados. Varredura de campo magnético total: 100 G.

O espectro de RPE da BSA é também composto por duas componentes espectrais com estados de mobilidade muito diferentes. Na Figura 4.16b estão mostradas as componentes simuladas S e W.

Na Figura 4.11 estão mostrados os espectros, experimental e simulado, a 25°C, do 5-MSL ligado a BSA, sem o tratamento (espectro a) e tratado com SDS a 10 mM (espectro b).

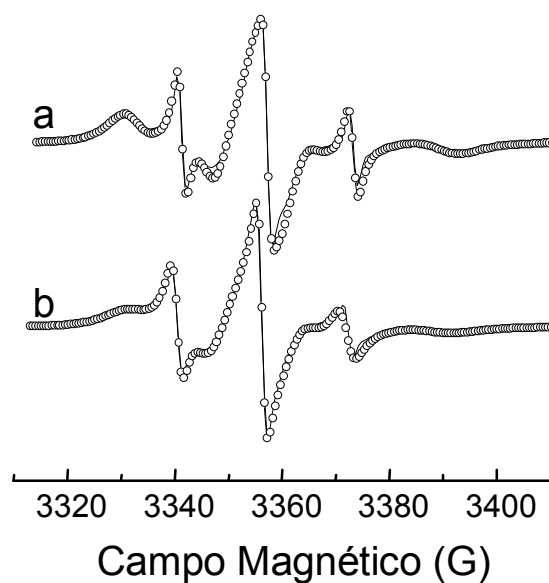


Figura 4.11- Espectros de RPE experimental (linha) e melhor ajuste (círculos), do 5-MSL em albumina do soro bovino (pH 7,4) a 25°C sem (a) e na presença de SDS a 10 mM. Faixa de varredura de campo magnético: 100 G.

A razão entre as populações das componentes fortemente e fracamente imobilizadas, N_S/N_W , como função da temperatura absoluta recíproca é apresentada na Figura 4.12. Assim como no caso do EC, um comportamento linear é observado em toda a faixa de temperatura. O tratamento com SDS a 10 mM conduz a um grande acréscimo na razão N_W/N_S .

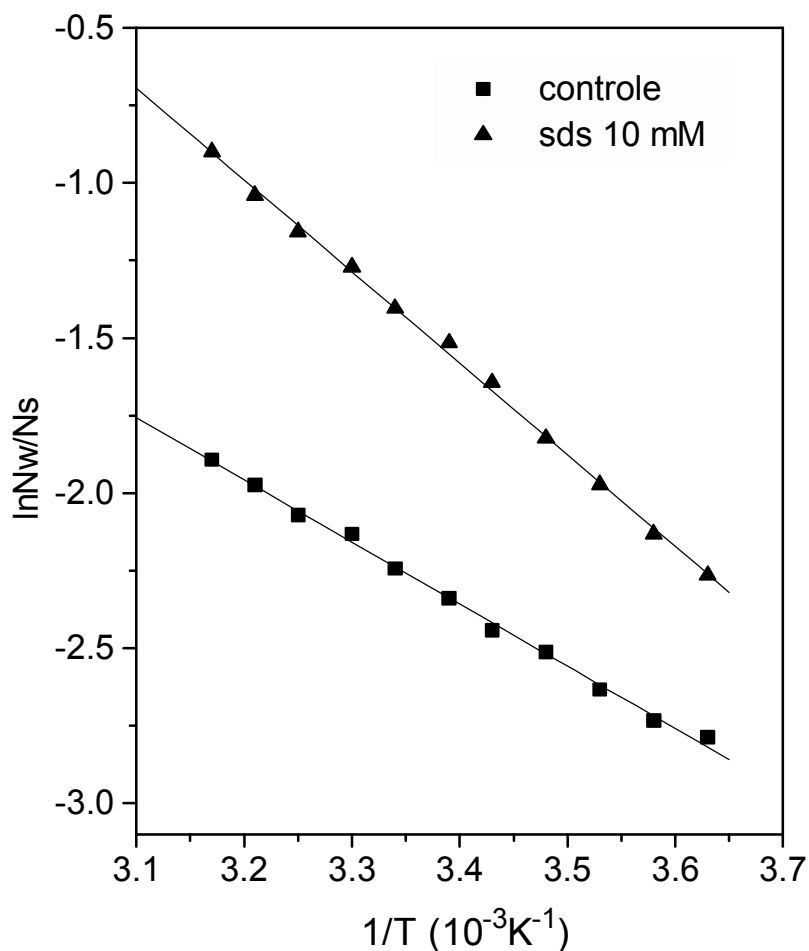


Figura 4.12- A razão entre as populações das componentes fracamente e fortemente imobilizadas, N_w/N_s , no espectro de RPE da albumina do soro bovino marcada com 5-MSL (pH 7,4), como uma função da temperatura absoluta recíproca. Efeito do tratamento com 10 mM SDS.

Como no caso do EC calculamos os valores das energias padrão de Gibbs (ΔG^0) bem como as variações de entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0) (Tabela 4.2).

TABELA 4.2

Mudanças na energia livre padrão de Gibbs (a 46°C), entalpia e entropia padrões associadas a cadeia lateral do nitróxido ligada à Albumina do Soro Bovino, onde é feita uma comparação com o caso em que a Albumina foi tratada com SDS a 10 mM. A Albumina foi marcada nos grupos sulfidrilas com o marcador de spin 5-MSL.

Amostras	$\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow S}$	$\Delta H^{\circ}_{W \rightarrow S}$	$\Delta S^{\circ}_{W \rightarrow S}$
	kcal mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹	cal mol ⁻¹
K ¹			
BSA (controle)	-1.2	-4,0	-8,9
BSA (SDS)	-0.5	-5,9	-17,0
Comparação			
EC totalmente hidratado	-0.67	-6.4 $\pm$ 0.7	-17.9

* Os valores numéricos foram calculados usando a equação 4.4 e os dados do gráfico apresentado na Fig. 4.12. Veja texto para maiores detalhes.

Os parâmetros obtidos através das simulações, para as componentes fortemente imobilizada (componente S) e fracamente imobilizada (componente W), estão mostrados na Figura 4.13 em função da temperatura absoluta. Os parâmetros $R_{\text{bar}}S$ e $R_{\text{bar}}W$ indicaram que o SDS aumentou a mobilidade da cadeia principal da proteína ($R_{\text{bar}}S$) e reduziu a mobilidade na cadeia lateral do nitróxido ($R_{\text{bar}}W$).

Na Figura 4.14, a dependência dos parâmetros $R_{\text{bar}}S$ e $R_{\text{bar}}W$ em relação à concentração do surfactante, mostra que ambos, SDS e HPS, causam um acréscimo na mobilidade do esqueleto da proteína e um decréscimo na micro viscosidade na região do grupo-SH, com mudanças mais rápidas em concentrações menores.

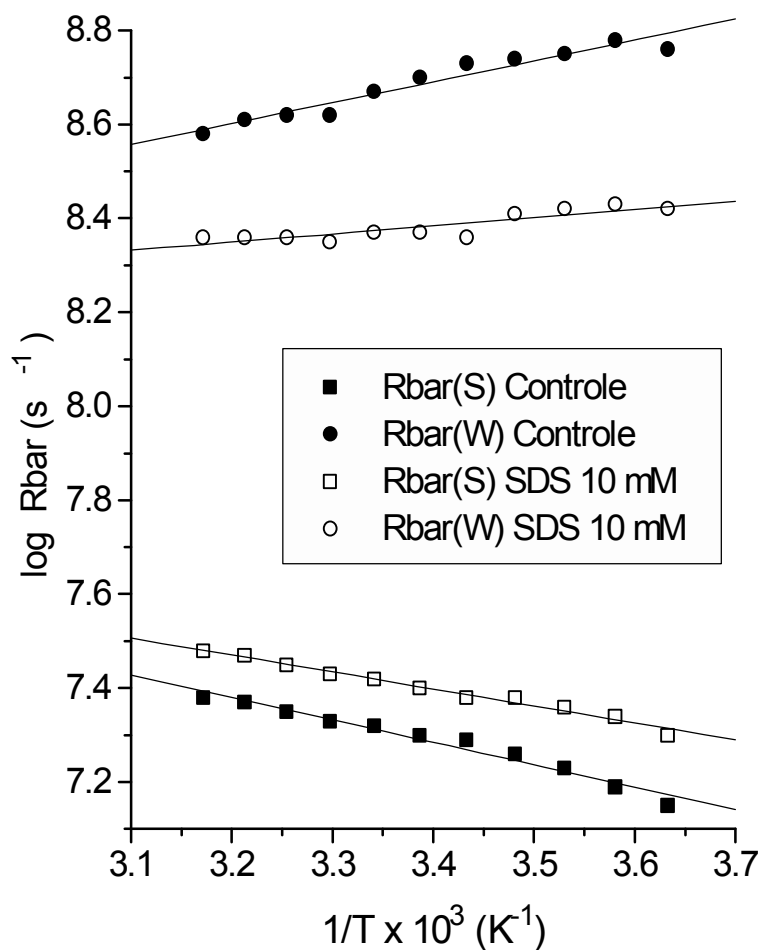


Figura 4.13-Gráfico de Arrhenius para os parâmetros de difusão rotacional $R_{\text{bar}}\text{S}$ para a componente fortemente imobilizada (quadrados) e $R_{\text{bar}}\text{W}$ para a componente fracamente imobilizada (círculos), obtidos do ajuste dos espectros de RPE do 5-MSL albumina do soro bovino (pH 7.4). Os símbolos fechados referem-se às amostras de controle e os símbolos abertos referem-se à BSA com adição de SDS a 10 mM.

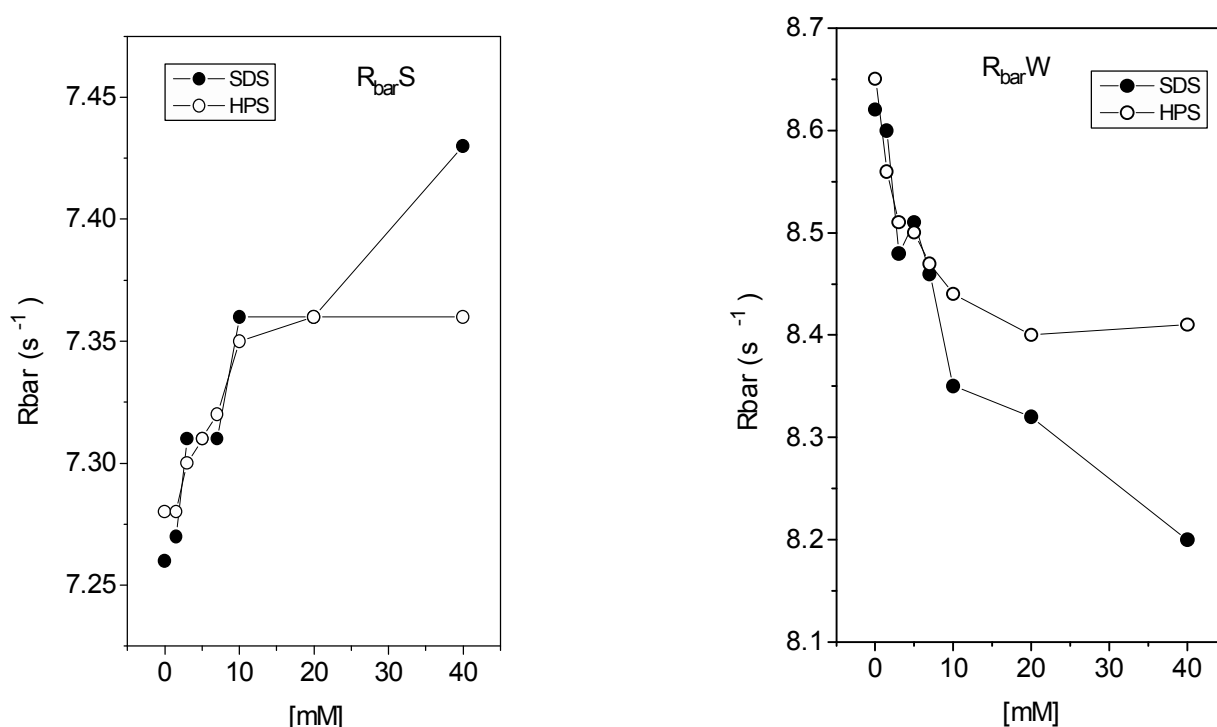


Figura 4.14- Dependência dos parâmetros de difusão rotacional (R_{bar}) em relação à concentração do surfactante. $R_{\text{bar}}(\text{S})$, para a componente fortemente imobilizada e $R_{\text{bar}}(\text{W})$ para a componente fracamente imobilizada. Parâmetros obtidos do ajuste do espectro de RPE do Mal-5 em BSA (albumina do soro bovino, pH 7.4). Os símbolos referem-se ao SDS (fechados) e HPS (abertos).

O sistema parece encontrar alguma saturação acima de 10 mM para ambos os surfactantes. Efeitos similares são vistos também para a dependência da razão $N_{\text{W}}/N_{\text{S}}$ (fig.4.15a) e do parâmetro $2T_{\parallel}$ (fig. 4.15b), em relação à concentração do surfactante.

Ambos, SDS e HPS, levaram a um aumento significativo na mobilidade da proteína, especialmente entre 5 e 10 mM. O efeito do SDS foi mais acentuado a 10 mM e concentrações acima deste valor, se comparado com as mudanças induzidas pelo HPS.

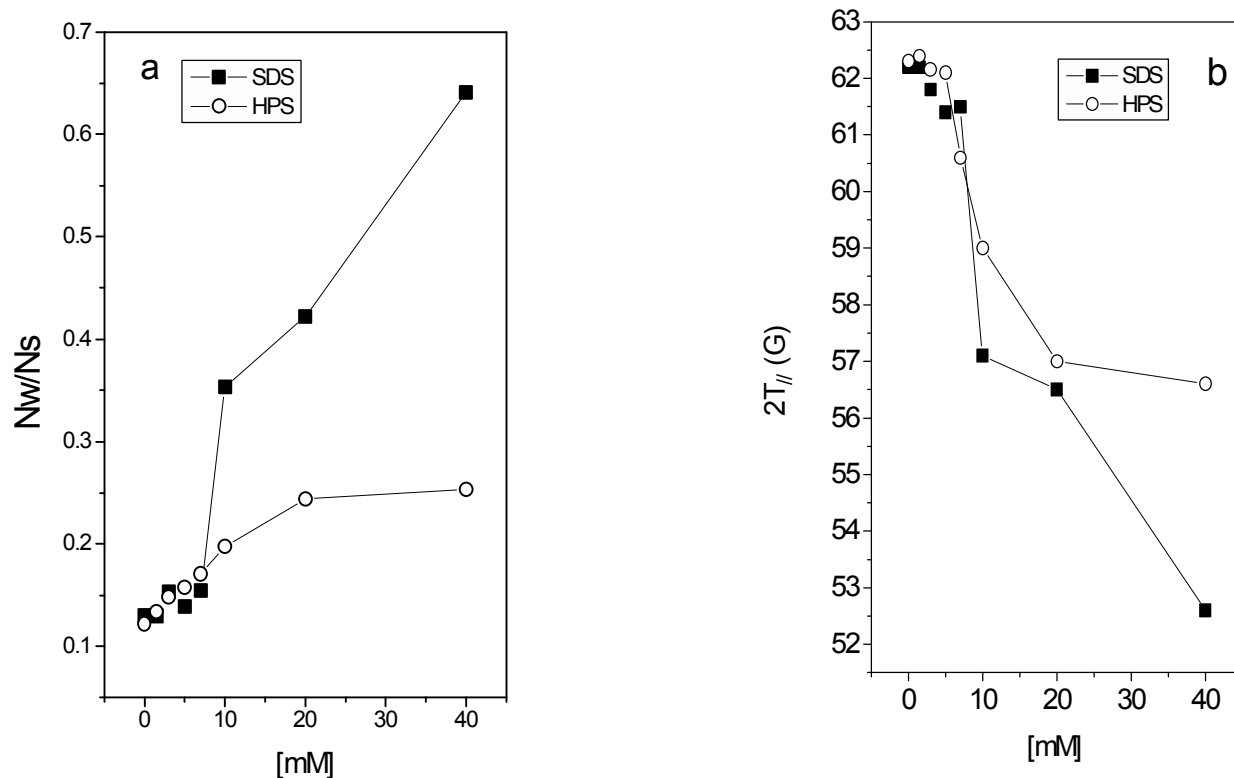


Figura 4.15- (a) A razão entre as populações das componentes fracamente e fortemente imobilizadas N_w/N_s , no espectro de RPE da albumina do soro bovino marcada com 5-MSL (pH 7,4), como uma função da concentração do surfactante. Os símbolos, quadrados e círculos, se referem ao SDS e ao HPS, respectivamente. (b) O parâmetro de RPE $2T_{//}$, O desdobramento hiperfino externo do 5-MSL covalentemente ligado aos grupos sulfidrila da BSA (pH 7.4), como uma função da concentração do surfactante em tampão.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÕES

Nossos dados experimentais requerem discussões sobre dois pontos de vista básicos: os aspectos metodológicos e os estudos dos efeitos da hidratação nas proteínas do EC e dos detergentes em BSA. Como analisado no capítulo anterior, o tempo de reação dos marcadores de spin com o EC foi escolhido para marcar predominantemente o envelope do corneócito. O sinal de RPE deste sítio é similar ao de muitas proteínas estudadas [35,41] e é muito mais reativo do que um segundo sítio existente no interior do corneócito o qual tem também uma conformação bem diferente do primeiro.

5.1 HIDRATAÇÃO DO EC RELACIONADA AOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA CADEIA LATERAL DO NITRÓXIDO

Os resultados apresentados mostram o quanto a técnica de espectroscopia de RPE associada com o método de marcadores de spin é promissora no estudo de proteínas e suas funções biológicas, especialmente quando o método de marcação em sítio dirigida e a simulação espectral são adequadamente explorados. Com relação aos efeitos da hidratação sobre as proteínas do EC, os espectros compostos de RPE nos permitiram avaliações simultâneas de diversas alterações. A desidratação diminui a energia livre total $\Delta G_{w \rightarrow s}^0$ (Tabela 1), estabilizando a interação da cadeia lateral do nitróxido com as cadeias polipeptídicas. Por exemplo, a mudança do estado completamente hidratado para o nível de hidratação entre 18 e 30%, corresponde a uma variação de $-0,84$ Kcal/mol na energia livre padrão de Gibbs ($\Delta G_{w \rightarrow s}^0$) a 46°C . Para dissociar o radical nitróxido da proteína, o sistema absorve calor e esta mudança na entalpia é transformada em variação de entropia, que também significa variação

de movimento. Desta maneira, temperaturas baixas ou baixos conteúdos de água direcionam o equilíbrio $S \rightarrow W$ para a formação da componente S, liberando calor e gerando ordem.

Um dos principais experimentos que corroboram a idéia de que o nitróxido em um mesmo sítio pode gerar os espectros de duas componentes predominantes é aquele que envolve a redução do nitróxido com o ácido ascórbico. Desde que o agente redutor alcança o fragmento do nitróxido via fase aquosa, seria esperada uma redução mais rápida da componente W em relação à S, porque seus marcadores de spin têm mais liberdade rotacional e são mais acessíveis à reação com o ascorbato. As medidas das velocidades de redução do 5-MSL ligado ao grupo sulfidrila da BSA [29,42], mostraram que sob baixa velocidade de redução, o perfil do espectro se mantém e para as reduções mais rápidas, com um tempo de meia vida igual ou abaixo de 7,9 minutos, a componente W sofre um decréscimo maior que o da S, sugerindo que o tempo de conversão S-W é mais lento que 7,9 minutos para este sistema. Em adição a tal argumento, Esmann e co-autores (1992) [43] medindo a taxa de redução, pelo ascorbato, de vários marcadores de spin ligados aos grupos-SH da Na,K-ATPase encontraram taxas de redução sistematicamente mais rápidas para a componente mais móvel (W) em cerca de 70% para os marcadores 5- e 6-MSL.

5.2 MODELOS PARA EXPLICAR AS VARIAÇÕES NA ENERGIA LIVRE DE GIBBS, ENTALPIA E ENTROPIA

É importante comentar também os resultados de nosso laboratório [29,44] com o marcador de spin 5-MSL e seus análogos com cadeias de espaçamento entre os anéis do maleimido e da pirrolidina. Enquanto o $\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow S}$ aumentou de -1.0 para 0.1 Kcal/mol, do menor (5-MSL) para o mais longo,

$\Delta H_{W \rightarrow S}^0$ variou de -5.7 para -4.2 Kcal/mol, respectivamente. Aumentando o comprimento do marcador aumenta a área superficial que o nitróxido varre com seus desbocamentos moleculares e, conseqüentemente, também aumenta o contato com a fase aquosa, o número de configurações n_W (Eq. 4.4), a população da componente W que tem mais energia e, finalmente o $\Delta G_{W \rightarrow S}^0$ (veja Modelo 1, Fig. 5.1).

Os valores de entalpia e entropia padrões são difíceis de serem racionalizados, particularmente devido ao número de fatores que podem influenciá-los. Se forem considerados dois estados com potenciais químicos, de tal modo que $\mu_S < \mu_W$, estes serão afetados pela mobilidade do marcador e da proteína e também pela capacidade do solvente solubilizar o marcador.

No caso do tratamento do EC com 8 M uréia, por exemplo, ocorre redução de ambos $\Delta G_{W \rightarrow S}^0$ e $\Delta H_{W \rightarrow S}^0$ (Tabela 1). A uréia forma ligações de hidrogênio com a proteína promovendo configurações mais expandidas e mais expostas ao solvente. No EC, os efeitos da uréia têm sido atribuídos à sua capacidade de se ligar às proteínas, causando uma expansão do tecido e reduzindo as suas propriedades de barreira física [45,46]. Como as configurações mais compactas são mais estáveis e possuem menos energia, maiores graus de exposições ao solvente leva a um aumento do $\Delta G_{W \rightarrow S}^0$. Em condições similares quando o comprimento da cadeia lateral do nitróxido é aumentada há uma maior exposição do nitróxido ao solvente e um aumento de $\Delta G_{W \rightarrow S}^0$ (veja Modelo 1, na Fig. 5.1). Com maiores exposições há um aumento do número de configurações possíveis, n_W (Eq. 4.3), e uma maior probabilidade de formar o estado de maior energia E_W . As mudanças de entalpia podem ser explicadas com base nas variações dos potenciais químicos das duas componentes básicas dos espectros (μ_S e μ_W), outra forma de considerar as energias dos estados (E_S e E_W). Assumindo que o potencial químico μ_S não varie muito com as mudanças conformacionais das proteínas, pois o potencial

químico μ_W deve ser muito mais afetado com estas mudanças, maiores exposições ao solvente tendem a reduzir μ_W , diminuindo a diferença em relação ao μ_S , desde que o solvente tem maior atividade (maior capacidade de dissolver o nitróxido). A uréia tende a abaixar a entalpia porque expõe o marcador ao solvente e este efeito é mais importante quando o marcador é de cadeia curta. Por outro lado, a solução de uréia a 8 M não é um bom solvente para o marcador, elevando o potencial químico μ_W e com isso aumentando a entalpia. Assim a uréia a 8 M apresenta dois efeitos que se compensam: por um lado causa maior exposição dos sítios, reduzindo $\Delta H_{W \rightarrow S}^0$ e por outro reduz a atividade do solvente, tendendo a aumentar $\Delta H_{W \rightarrow S}^0$ (Ver modelo 2). Desidratando as amostras, são reduzidos ambos i) a atividade do solvente, aumentando $\Delta H_{W \rightarrow S}^0$, e ii) o número de configurações n_W , com maior energia, diminuindo $\Delta G_{W \rightarrow S}^0$.

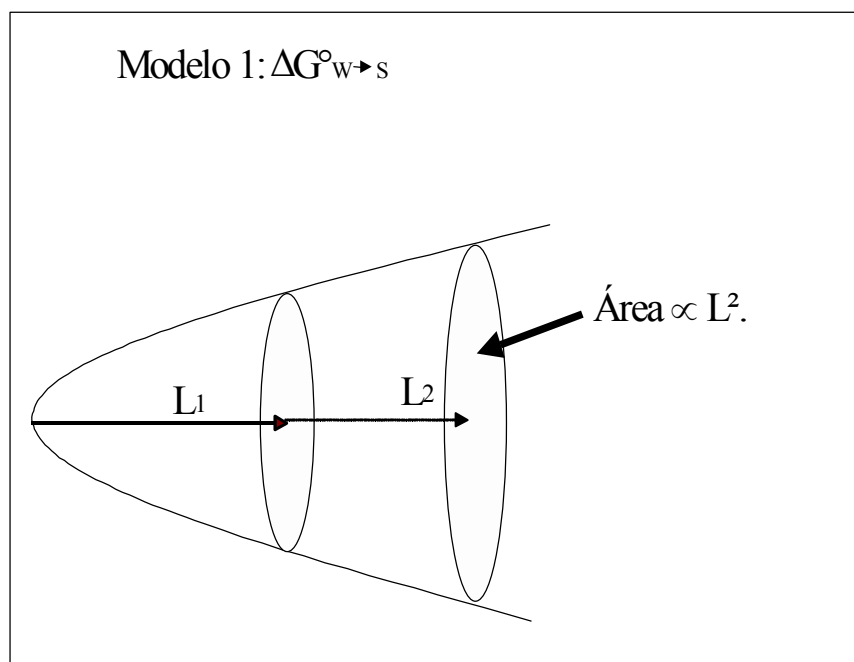


Figura 5.1 - Modelo 1 – energia padrão de Gibbs relacionada ao comprimento da cadeia lateral do nitróxido. A área é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia espaçadora entre o maleimido e o radical nitróxido. O marcador mais longo tem uma maior probabilidade de contactar o solvente e formar a componente W (maior energia).

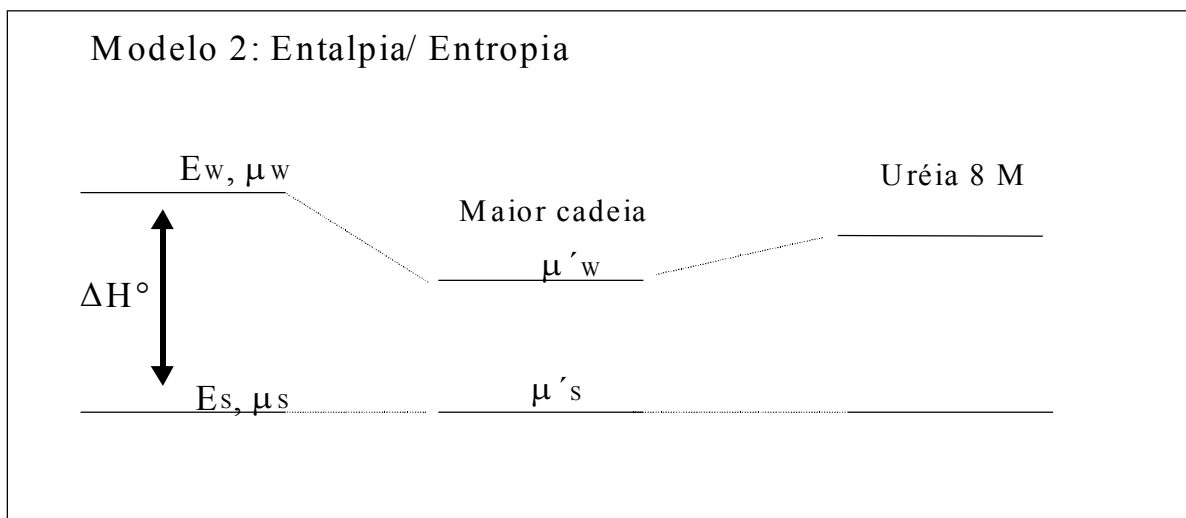


Figura 5.2 - O interior da proteína sendo menos hidratado tem uma menor atividade da água e, portanto, menor capacidade de dissolver o marcador de spin. Com maiores cadeias o nitróxido adquire um potencial químico, μ_w , menor. A uréia expõe o marcador ao solvente tendendo a reduzir o potencial químico, mas por outro lado, a sua presença a 8 M no solvente tende a aumentar o potencial químico pelo fato de reduzir a atividade do solvente.

Em trabalhos prévios [37,47], foi mostrado que com a deslipidização do EC usando solventes orgânicos, o equilíbrio S-W sofre uma pequena mudança para o estado W, com uma correspondente $\Delta\Delta G^0_{W \rightarrow S}$ de +0,3 KCal/mol, que foi explicado como um aumento na abertura da cavidade sulfidrilica que poderia favorecer o acesso do solvente aos grupos thiol. Uma outra hipótese provável seria um aumento na atividade do solvente causado pelo tratamento de extração dos lipídios. É ilustrativos a comparação de todos esses resultados com aqueles de um recente artigo onde os efeitos causados pela uréia a 8 M sobre o EC foram investigados usando o marcador de spin 5-MSL [42]. A energia livre a 46°C para amostras completamente hidratadas foi $\Delta G^0_{W \rightarrow S} = -1,02$ Kcal/mol e

muda para +0,23 Kcal/mol com o tratamento com uréia. Contrário aos efeitos da desidratação, a uréia causou uma maior exposição da proteína ao solvente. Como discutido por Baskokov e co-autores (1998) [45], a uréia em soluções aquosas, sendo um melhor solvente que a água, no sentido de poder formar ligação de hidrogênio com a proteína, aumenta a hidratação da proteína, promovendo configurações mais expandidas e expostas. Coletivamente, estes resultados dão suporte à hipótese de que o processo de deslipidização resulta em um aumento da hidratação do EC.

5.3 A HIDRATAÇÃO DO EC AUMENTA A MOBILIDADE DE SUAS PROTEÍNAS

O fato mais interessante dos espectros de RPE de proteínas marcadas é que eles geralmente permitem o cálculo simultâneo do tempo de correlação rotacional para as duas componentes: o movimento da cadeia lateral do nitróxido em contato com o solvente, $R_{\text{bar}}W$, e o movimento local da cadeia polipeptídica, $R_{\text{bar}}S$. Com o acréscimo do nível de hidratação de EC, ambos os parâmetros indicaram um aumento gradual da dinâmica do movimento até conteúdos de água de 41-49%. Acima deste nível de hidratação, não foram observadas alterações adicionais no espectro de RPE, sugerindo a existência de um ponto de hidratação máxima, dentro desta faixa de conteúdo de água, acima da qual a não-idealidade desaparece.

Tsai e co-autores (2001) [48] usando experimentos de espalhamento de nêutrons com pó de Rnase A, observaram uma temperatura de transição T_g a 250 K quando a amostra estava 24% hidratada, em relação ao peso total, e nenhuma transição até 300 K para proteínas secas. Esses autores atribuíram esta transição a movimentos vibracionais anarmônicos e sugeriram que a água facilita a obtenção de conformações de maiores energias. Os resultados

reportados aqui para o parâmetro $R_{\text{bar}}S$ (Fig. 4.5) sugerem transições similares para as proteínas do EC marcados nos grupos thiol. Para EC seco a transição parece ocorrer a $\sim 60^\circ\text{C}$ e para EC com 17-28% de hidratação, a mudança no coeficiente de inclinação da curva ocorre a $\sim 10^\circ\text{C}$. Para níveis de hidratação mais elevados esta transição é vista em torno de -15°C , onde também começa a aparição da componente W (dados não mostrados). É interessante que a componente W ocorre bem abaixo de 0°C , denotando uma baixa atividade do solvente onde está localizada a cadeia lateral do nitróxido.

5.4 A HIDRATAÇÃO DO EC E SUAS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS

Medindo a perda de água transepidermal *in vivo* em ratos recém nascidos com um aparelho disponível comercialmente, o evaporímetro da Sevo-Med, encontramos $2,8 \pm 0,3 \text{ g/m}^2/\text{h}$ [49], um resultado bastante parecido com o obtido por Scott e co-autores (1982) para ratos adultos [50]. Por comparação, em pele humana, o valor médio obtido para a região interna do antebraço foi $3,2 \pm 0,3 \text{ g/m}^2/\text{h}$ contra uma umidade relativa de aproximadamente 50%. Medidas *in vitro* do fluxo de água em EC de ratos recém-nascidos como uma função do seu conteúdo de água indicou que o fluxo de $2,8 \text{ g/m}^2/\text{h}$ corresponde a $\sim 30\%$ do conteúdo de água, relativo ao peso total [49]. Como para a condição *in vivo*, a taxa limite da perda de água deve ser dada pelas camadas de células externas do EC (menores conteúdos de água e constante de permeabilidade) [51], presumimos que o conteúdo de água dessas camadas é de $\sim 30\%$ (ou h 0,39), contudo o conteúdo de água das camadas mais interiores tem sido reportado como 88% (h 1,65), equivalente àqueles do tecido do interior do corpo. É interessante que o conteúdo de água de $\sim 30\%$ (h 0,39) para as camadas da superfície *in vivo* é aproximadamente a mesma quantidade de água ligada à proteína deduzida do parâmetro $2T'_{//}$ (Fig. 7). Abaixo deste nível de hidratação,

o EC gradualmente perde sua capacidade de alongamento, atingindo um mínimo abaixo de ~18% (h 0,21), uma propriedade macroscópica que também concorda com a rigidez molecular observada para $h < 0,21$ (Fig. 5 e 6).

Yang e colaboradores (1993) [52] avaliaram o efeito da hidratação sobre a dinâmica da trimetoprim ligada ao dihidrofolato reductase usando a técnica de RMN e descobriram que uma hidratação mínima de 30% é necessária para restabelecer a dinâmica do trimetoprim deuterada no complexo da proteína e que um maior acréscimo no nível de hidratação restaura somente parcialmente a dinâmica das proteínas do EC. Esta quantidade de 30% seria justamente a porcentagem de água ligada à proteína, como indicado pelo experimento apresentado na Fig. 6. É notável que ambos, a fluidez lipídica e o fluxo de água no EC mostraram um acréscimo gradual com o aumento do conteúdo de água até ~52%, de maneira similar à observada no presente trabalho para proteínas do EC. Elevações mais altas dos níveis de hidratação levam a maiores atividades do solvente ou pressão osmótica sobre a proteína induzindo mudanças conformacionais para configurações menos compactas e menos estáveis. Portanto, no tecido do EC, o grande aumento da dinâmica molecular causada por uma hidratação excessiva faz da água uma importante promotora da permeação de drogas administradas na pele [53,54].

5.5 A MARCAÇÃO DE SPIN EM MUTAÇÕES SÍTIOS DIRIGIDOS

No método de marcação de spin em sítio dirigido (comentado na introdução) é usual calcular um “parâmetro de acessibilidade” do nitróxido por agentes paramagnéticos polares (NiAA e NiEDAA) e apolares (O_2) [55,56]. Este parâmetro é calculado com base no comportamento da potência de saturação do sinal do nitróxido por parte destes agentes. Os efeitos de relaxação rápida sobre o sinal de RPE do nitróxido alargam suas linhas de ressonância

podendo fazê-las desaparecer dependendo da frequência de colisão do nitróxido com a espécie paramagnética [29,42]. Cloreto de Níquel a 250 mM faz desaparecer a componente W do espectro do 5-MSL em EC [29,42]. Desde que o Ni (II) alcança o nitróxido pela fase aquosa, seu efeito é bem mais pronunciado sobre esta componente que é gerada por marcadores cujos nitróxidos estão em contato com o solvente, sendo estes resultados um reforço importante para nossa interpretação. De acordo com a presente interpretação, a componente S estaria muito menos acessível pois estaria formando ligação de hidrogênio com a cadeia principal da proteína. Esta interpretação afeta sensivelmente a forma de análise, por exemplo, não seriam necessários experimentos de rastreamento de moléculas polares ou apolares para descobrir se o marcador está localizado em sítios hidrofóbicos ou hidrofílicos; com nossa interpretação a polaridade do solvente poderia ser medida diretamente no espectro de RPE, pelo parâmetro $2a_o$ (Fig. 1a), explorando a alta sensibilidade do nitróxido à polaridade do solvente. É notável que todos os grupos sulfidrila acessados pelos marcadores de spin estão localizados em regiões hidrofílicas da proteína., desde que o $2a_o$ observado para a componente W é a mesma daquela do marcador de spin em tampão ($2a_o = 34,2$ G, para meios hidrofóbicos esse valor pode decrescer para ~ 29 G). Isso também ocorre para grupos sulfidrila nativos de outras proteínas, tais como a membrana Na^+/K^+ -ATPase da *Squalus accanthias* [43], a membrana translocadora de fosfato/ H^+ da mitocôndria de ratos vivos [57], a creatine kinase [58] e a proteína de membrana rodopsina [59].

Tem surgido na literatura um número grande de trabalhos envolvendo o estudo da dinâmica de estruturas de proteínas pelo método de marcação em sítio dirigido. Se por um lado a engenharia genética de proteínas e a análise de suas funções relacionadas às suas estruturas e dinâmicas representam um estudo muito interessante, as formas de análise dos espectros que tem sido adotadas deixam muito a desejar ao nosso ver. Os espectros de múltiplas componentes

não foram satisfatoriamente interpretados e a simulação dos espectros só foi utilizada mais recentemente em alguns casos [35,42]. Além disso, o comportamento termodinâmico da cadeia lateral do nitróxido não tem sido analisado (os espectros são obtidos em apenas uma temperatura). Isto mostra que este trabalho pode dar uma importante contribuição para a forma de analisar os espectros de EPR dos marcadores ligados às proteínas.

5.6 BSA-SURFACTANTE

Os espectros de RPE do 5-MSL em BSA indicaram maior mobilidade do marcador do que no caso deste marcador ligado ao EC [29,42]. Os espectros obtidos a 25°C para BSA foram similares aos obtidos a 38°C para o EC. Como a simulação é mais fácil para espectros refletindo maior mobilidade do marcador houve melhores convergências dos espectros para BSA.

A energia padrão de Gibbs ($\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow S}$) para a BSA foi de -1,2 Kcal/mol, enquanto para o EC (e 5-MSL) foi de -1,0 Kcal/mol; a diferença é bem pequena, mas sugere que a BSA estabiliza a forma ligada (S) do marcador. A presença de 10mM SDS em BSA desestabiliza esta forma ligada aumentando a energia livre para -0,6 Kcal/mol. É conhecido que o SDS desestabiliza as proteínas se inserindo nas regiões hidrofóbicas e se ligando em torno das cadeias polipeptídicas e dependendo da concentração pode tanto desnaturar as proteínas quando isolar suas cadeias.

A entalpia ($\Delta H^{\circ}_{W \rightarrow S}$) foi de -5,7 e -4,0 Kcal/mol para o EC e BSA, respectivamente. É importante observar que no caso da Albumina a atividade do solvente deve ser maior porque a proteína está dissolvida em solução a 0,2 mM, ou seja, há abundância de solvente enquanto no EC que é um tecido há bem menos água disponível. Maior atividade do solvente abaixa o potencial químico dos marcadores da componente W e assim torna menor a diferença de

energia entre os dois estados (ver Modelo 2, Fig. 5.2). A presença do SDS, formando dispersão (micelas/agregados) no solvente, deve causar redução de atividade do solvente e isto poderia explicar o aumento de entalpia para 5,7 Kcal/mol.

Os detergentes em geral aumentam a mobilidade do esqueleto das proteínas e o fato de nossos resultados indicarem exatamente isto não só confirma este efeito, detectando por RPE, mas também corrobora nossa metodologia. Em adição foi observado que o SDS reduziu a mobilidade dos marcadores em contato com a fase aquosa, sugerindo que as micelas de SDS ou agregados interagem com o radical nitróxido causando restrições em seus movimentos.

A BSA é uma proteína muito estudada especialmente pela sua capacidade de ligar ácido graxos em seus cinco sítios hidrofóbicos [60, 61,6]. Marcadores de spin lipídicos tem sido ligados a estes sítios para estudar as afinidades de cada um e verificar como elas mudam na presença de diferentes moléculas; no caso dos detergentes em especial tem sido utilizadas várias classes, como os catiônicos, aniônicos e ziteriônicos, para através dos efeitos poder elaborar modelos das ligações destes ácidos graxos nos sítios da BSA. As informações aqui obtidas serão importantes para comparar com experimentos que estão sendo realizados em nosso laboratório usando marcadores lipídicos ligados a estes sítios da Albumina.

5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notável como a espectroscopia de RPE de marcador de spin de proteína pode fornecer informações complementares sobre a mobilidade de proteínas e atividade do solvente na vizinhança das cadeias polipeptídicas. Como o EC é um sistema complexo e muitas de suas proteínas não podem ser isoladas, essas medidas feitas diretamente no tecido intacto são muito importantes

especialmente para comparação com suas propriedades macroscópicas, análises das interações drogas-EC ou diferentes casos de lesões e doenças de pele.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- 1) A interpretação sobre a coexistência de duas componentes básicas nos espectros de RPE dos marcadores de proteínas foi corroborada com a análise de novos experimentos neste trabalho. Como os dois estados do nitróxido que geram estas componentes estão em equilíbrio termodinâmico, medidas em função da temperatura permitiram calcular pela primeira vez os parâmetros termodinâmicos: entalpia, entropia e energia livre de Gibbs. Esta interpretação foi valiosa neste trabalho explicando de modo bastante completo os efeitos da hidratação sobre as proteínas do EC e de dois detergentes sobre a BSA.
- 2) Os parâmetros termodinâmicos indicaram que a desidratação do EC estabiliza as configurações mais compactas das proteínas do envelope do corneócito (menor energia de Gibbs). A razão entre o número de cadeias laterais do nitróxido que ficam dobradas sobre a cadeia polipeptídica e o número daquelas que ficam em contato com o solvente fica maior e a energia ou entalpia para dissociá-las também se torna maior. Com esta dissociação a entropia gerada também é maior no caso das amostras mais desidratadas. Estes dados são compatíveis com um tecido mais rígido e de menor capacidade de alongamento.
- 3) Os parâmetros de movimento R_{barS} e R_{barW} indicaram que a desidratação reduz a capacidade de movimento das proteínas do EC. Foi discutida a faixa ótima de hidratação para um bom funcionamento do EC, sugerindo uma faixa ampla de ~18 a ~50% de água em relação ao peso total. Abaixo desta faixa a dinâmica das proteínas decresce rapidamente assim como decrescem a permeabilidade e a elasticidade. Acima desta faixa a dinâmica molecular

bem como as propriedades macroscópicas citadas praticamente não sofrem alterações e a hidratação excessiva pode ser prejudicial devido ao fato de “lavar” as substâncias higroscópicas do fator de umectância natural da pele.

- 4) Medidas a -70°C permitiram o acessar o autovalor $2A_{zz}$ do tensor magnético de desdobramento hiperfino que foi sensível ao campo elétrico gerado pela presença de água ligada nas vizinhanças do nitróxido. Foi observado um platô na curva acima de 30% de hidratação sugerindo que esta é a quantidade aproximada de água ligada nas proteínas do EC e o restante estaria livre. Esta observação está em concordância com dados da literatura para outras proteínas e detectados por outros métodos.
- 5) Os detergentes SDS e HPS aumentam a mobilidade das cadeias das proteínas e decrescem o movimento da cadeia lateral do nitróxido em contato com o solvente. Os detergentes se inserem nas interfaces das proteínas expandindo-as e aumentando o contato com o solvente. Esta expansão foi detectada e quantificada em termos de aumentos na energia livre de Gibbs e o maior contato com o solvente foi confirmado, podendo ser quantificado em termos das variações de entalpia ou entropia como função da concentração do detergente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] **MURPHY, G. F.; MIHM, M.C.** (1994): A Pele, in: Patologia estrutural e funcional. 5^a edição, Ed. Guanabara-Koogan.
- [2] **BLOOM, W.; FAWCETT, D. W.;** (1977): Tratado de Histologia. 10^a edição, Ed. Interamericana.
- [3] **JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.** (1993): Histologia Básica, 4^a edição, p.58-78, Ed. Guanabara Koogan.
- [4] **BLANK, I. H.; MOLONEY, J.; EMSLIE, ^a G.; SIMON, I.; APT, C.** (1984); The diffusion of water across the stratum corneum as a function, of its water content. *J. Invest. Dermatol.* 82: 188-194.
- [5] **ALONSO, A; MEIRELLES, N. C.; TABAK, M.** (1995): Effect of hidration upon fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: na EPR study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1237:6-15.
- [6] **BAILEY, F. R.; COPENHARVER, W. M.;** (1973): O Tegumento, in: Histologia, 16^a edição, Ed. Edgard Blüchen Ltda.
- [7] **ELIAS, P. M.; FRIEND, D .S.** (1975) : The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell. Biol.*65:180-191.
- [8] **ELIAS, P. M.** (1983): Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.*80: 44s-49s.
- [9] **ODLAND, G. F.** (1992): in Structure of the skin. vol.1. (Goldsmith, L.A.,ed), p.3-15, Oxford University Press, New York.
- [10] **SWARTZENDRUBER, D. C.; WERTZ, P. W.; MADISON, K. C.;** **DOWNING, D. T.** (1987): *j. Invest. Dermatol.*87: 709-713.
- [11] **GRAY, G. M.; WHITE, R. J.; YARDLEY, H. J.** (1982): *Br. J. Dermatol.* 106: 59-63.
- [12] **HOLBROOK, A. K.** (1982): in Structure and Function of the developing Human skin. Vol. 1 (Goldsmith, L.A., ed), p.65-97, Oxford University Press, new York.

- [13] **ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, D. J.** (1997) : *Biologia Molecular da Célula*, 3^a edição, p.1139-1184, Ed. Artes Médicas Sul Ltda.
- [14] **STEINERT, P. M.; MAREKOV, L. N.** (1995): The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 e 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelop. *J. Biol. Chem.* 270:17702-17711.
- [15] **MATOLTSY, A. G.; MATOLTSY, M. N.** (1970): The chemical nature of the keratohyalin granules of the epidermis. *J. Cell.Biol.* 47:593-603.
- [16] **ABERNETHY, J. L.; HILL, R. L.; GOLDSMITH, L. A.** (1977): Epsilon-(gamma-glutamyl)lysine cross-links in human stratum corneum. *J. Biol. Chem.* 252:1837-1839.
- [17] **RICE, R. H.; GRENN, H.** (1997). The cornified envelope of terminally diferenciaded human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell.* 11:417-422.
- [18] **HOHL, D.** (1990): Cornified cell envelope. *Dermatológica.* 180:201-221.
- [19] **STEVEN, A. C.; STEINERT, P. M.** (1994): Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell. Sci.* 107:693-700.
- [20] **STEINERT, P. M.; MAREKOV, L. N.** (1999): Iniciation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol. Biol. Cell.* 10:4247-4261.
- [21] **YAFFE, M. B.; BEEGEN, H.; ECKERT, R. L.** (1992): Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as na intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *J. Biol. Cchem.* 267:12233-12238.
- [22] **SIMON, M.; GREEN, H.** (1985): Enzymatic crosslinking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. *Cell.* 40:677-683.
- [23] **STEINERT, P. M.** (2000). *J. B. Cell* 151: 5-7.

- [24] **SWARTZ; BOLTON, J. R.; BORG.** (1972): Biological Applications of Electron Spin Resonance, p.1-20,38-47,192-221, Ed. Wiley, New York.
- [25] **YKEIA, M.** (1993): News Applications of Electron Spin Resonance. Ed Word Scientific, Singapore.
- [26] **ATHERTON, N. M.** (1973): Electron Spin Resonance. Theory and Applications, p.12-25,254-265.
- [27] **NORDIO, P. L.** (1976): General Magnetic Resonance Theory. In: Spin labeling, Theory and Applications. L. J. Berliner, editor. Academic Press, New york, p.5-51.
- [28] **PAKE, G. E.** (1973): The Principles of Electron Paramagnetic Resonance, 2. Ed., W.A. Benjamin,Inc., London.
- [29] **SANTOS, W. P.** (2001): Estudo das proteínas do envelope do corneócito por RPE de marcadores de spin. Tese de Mestrado. Instituto de Física, UFG.
- [30] **SLICHTER, C.P.** (1989): Principles of Magnetic Resonance, 3. Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.p.199-218 e 503-516.
- [31] **RODRIGUES, P. P.** (1999): Saturação progressiva e determinação de tempos de relaxação em melanina sintética usando RPE. Dissertação de Mestrado, Instituto de Física, USP.
- [32] **BERLINER, L. J.** (1978): Methods in enzymology. 49: 466-470.
- [33] **ALONSO, A.** (1986): Estudos por RPE de um radical nítróido em monocristal: Interação com prótons e relaxação eletrônica.Tese de doutorado, Instituto de Física e Química de São Carlos, USP.
- [34] **GRIFFITH, O. H.; JOST, P. C.** (1976): Lipid spin labels in biological membranes. *In* Spin Labeling. Theory and Applications. Berliner, L. J., ed. Academic Press. New York. 453-523.
- [35] **BARNES, J. P.; LIANG, Z.; MCHAOURAB, H. S.; FREED, J. H.; HUBBELL, W. L.** (1999): A multifrequency electron spin resonance study of T4 lysozyme dynamics. *Biophys. J.* 76:3298-3306.

- [36] **ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C.; TABAK, M.** (2000a): Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem. and Phys. Lipids* 104:101-111.
- [37] **ALONSO, A.; SANTOS, J.G.; TABAK, M.** (2000b): Stratum corneum protein mobility as evaluated by a spin label maleimide derivative. *Biochim. Biophys. Acta.* 1478:89-101.
- [38] **BUDIL, D. E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J. H.** (1996): Nonlinear-Least-Squares Analysis of slow-Motion EPR Spectra in one and two Dimension Using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. *Journal of Magnetic Resonance.* 120:155-189.
- [39] **SCHNEIDER, D.J.; FREED, J. H.** (1989): Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide in: Berliner, L. J., Reuben, J., (Eds), *Biological Magnetic resonance, Vol.8*
- [40] **VAN HOLDE, K. E.** (1998): Principles of physical biochemistry. Prentice Hall. 10ª edição. P. 68-87.
- [41] **ESMANN, M.; HANKOVSKY, H. O.; HIDEG, K.; MARSH, D.** (1989): A novel spin-label for study of membrane protein rotational diffusion using saturation transfer electron spin resonance. Application to selectively labelled class I and class II -SH groups of the shark rectal gland Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 978:209-215.
- [42] **ALONSO, A.; SANTOS, W. P.; LEONOR, S. J.; SANTOS, J. G.; TABAK, M.** (2001): Stratum Corneum Protein Dynamics as Evaluated by a Spin-label Maleimide Derivative: Effect of Urea. *Bioophysical Journal.* Vol 81.p.3566-3576.
- [43] **ESMANN, M.; HIDEG, K.; MARSH, D.** (1992): Analysis of thiol-topography in Na^+/K^+ -ATPase using labelling with different maleimide nitroxide derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1112:215-225.
- [44] **LEONOR, S. J.** (2001): Estudo de proteínas do interior do corneócito avaliadas por RPE de marcadores de spin. Tese de mestrado, Instituto de Física, UFG.
- [45] **BASKAKOV, I.; WANG, A.; BOLEN, D. W.** (1998): Trimethylamine-N-oxide counteracts urea effects on rabbit muscle lactate

dehydrogenase function: a test of the counteraction hypothesis. *Biophys. J.* 74:2666-2673.

- [46] **HAN, S. K.; JUN, Y. H.; RHO, Y. J.; HONG, S. C.; KIM, Y. M.** 1991 Percutaneous absorption-enhancing activity of urea derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 14:112-118.
- [47] **SANTOS, J. G.** (2000): Mobilidade de proteínas avaliadas por marcadores de spin derivados do maleimido. Dissertação de Mestrado, Instituto de Física, UFG.
- [48] **TSAL, A. M.; T. J. UDOVIC, T. J.; NEUMANN,D.D.A.** (2001): The inverse relationship between protein dynamics and thermal stability. *Biophys. J.* 81: 2339-2343.
- [49] **ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M.** (1996): Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical properties. *J. Invest. Dermatol.* 106:1058-1063
- [50] **SCOTT, R. C.; OLIVER, G. J. A.; DUGARD, P. H.; SINGH, H. J.** (1982): A comparison of techniques for the measurement of transepidermal water loss. *Arch. Dermatol.* 274:57-64.
- [51] **BLANK, I. H., J. MOLONEY, A. G. EMSLIE, I. SIMON, AND C. APT.** 1984. The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content. *J. Invest. Dermatol.* 82:188-194.
- [52] **YANG, Q.; HUANG, F.; HUANG, T.; GELBAUM, L.** (1993): The effect of hydration on the dynamics of trimethoprim bound to dihydrofolate reductase. A deuterium NMR study. *Biophys. J.* 81:1361-1365.
- [53] **BARRY, B. W.** (1987) : Skin 1.*Pharmacol.* 121-137.
- [54] **POTTS, R. O. ; FRANCOUER, M. L.** (1991). *J. Invest. Dermatol.*96: 495-499.
- [55] **ZHAN, H.; KYOUNG, O. J.; SHIN, Y. K.; HUBBELL, W. L.; COLLIER, R. J.** (1995): Interaction of the isolated transmembrane domain of diphtheria toxin with membranes. *Biochemistry* 34:4856-4863.

- [56] **RUSSELL, C. J.; THORGEIRSSON, T. E.; SHIN, Y. K.** (1999): The membrane affinities of the aliphatic amino acid side chains in an α -helical context are independent of membrane immersion depth. *Biochemistry* 38:337-346.
- [57] **HOUSTEK, J.; BERTOLI, E.; STIPANI, I.; PAVELKA, S.; MEGLI, F. M.; PALMIERI, F.** (1993): Characterization of sulphydryl groups of the mitochondrial phosphate translocator by a maleimide spin label. *FEBS Lett.* 154:185-190.
- [58] **LIU, Z. J.; ZHOU, J. M.** (1995). Spin-labeling probe on conformational change at the active sites of creatine kinase during denaturation by guanidine hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta* 1253 (1995) 63-68.
- [59] **DELMELLE, M. N.; VIRMAUX, N.** (1977): Location of two sulphydryl groups in the rhodopsin molecule by use of the spin label technique. *Biochim. Biophys. Acta* 464:370-377.
- [60] **TURRO, N. J.; LEI, X. G.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; ARONSON, M.** (1995): Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System. *Langmuir.* 11: 2525-2533.
- [61] **GELAMO, E. L.; SILVA, C. H. T. P.; IMASATO, H.; TABAK, M.** (2001): Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1594: 84-99.
- [62] **CAVALU, S.; DAMIAN, G.; DÂNSOREANUF, M.** (2002): EPR syudy of non-covlente spin labeled serum albumin and hemoglobin, *Biophys. Chem.* 99: 182-188.