

JONATHAN BRITO SOUZA DE OLIVEIRA

**Caracterização estrutural da hemoglobina extracelular de
Amyntas gracilis (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Soares Santiago
Co-orientadora: Prof^a Dra Patrícia Gleydes Morgante

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

O48c Oliveira, Jonathan Brito Souza de
Caracterização estrutural da hemoglobina extracelular de
Amyntas gracilis (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas /
Jonathan Brito Souza de Oliveira. – Registro : [s.n.], 2018
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Patrícia Soares Santiago

Coorientador: Patrícia Gleydes Morgante

1. Hemoproteínas. 2. Biomoléculas. 3. Biofísica.
4. Espectroscopia visível. 5. Espectrometria de massa.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Caracterização estrutural da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas"

AUTOR: JONATHAN BRITO SOUZA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:




Prof.ª. Dr.ª. PATRICIA SOARES SANTIAGO

Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro

Araraquara, 29 de junho de 2018

DADOS CURCCIULARES

Nome: Jonathan Brito Souza de Oliveira

Nome em citações bibliográficas: OLIVEIRA, J. B. S.

Nascimento: 25/03/1992

E-mail: jonath_brito@hotmail.com

Resumos das qualificações:

Formado em Engenharia agrônômica pela Universidade Estadual Paulista - UNESP. Mestre em biotecnologia pelo programa de pós-graduação do Instituto de Química de Araraquara - IQ/UNESP. Ênfase em caracterização biofísica de biomoléculas, em especial hemoglobinas extracelulares gigantes, também conhecidas como eritruorinas.

Formação acadêmica/titulação

- 2016 - 2018** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
com período sanduíche em Instituto de Medicina Molecular (Orientador : Nuno Correia Santos)
Título: Caracterização estrutural da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas.,
Ano de obtenção: 2018
Orientador: Patrícia Soares Santiago
Co-orientador: Patrícia Gleydes Morgante
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2011 - 2016** Graduação em Agronomia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Caracterização hemoglobina extracelular *Amyntas gracilis* (HbAg) com potencial aplicação como biossensor de contaminação do solo.. Início: 2014. Trabalho de Conclusão de Curso
Orientador: Patrícia Soares Santiago
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2017 - 2018** Estágio de Pesquisa.
Instituto de Medicina Molecular, IMM, Portugal
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2016 - 2016** Estágio em Genética. . (Carga horária: 480h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

- 2015 - 2016** Centro Acadêmico. .
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2014 - 2015** iniciação científica. .
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Sao Paulo, Brasil
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico
- 2013 - 2014** Iniciação científica-IC. .
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Sao Paulo, Brasil
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico
- 2013 - 2013** Estágio de aperfeiçoamento de técnicas. . (Carga horária: 88h).
Instituto de Química de São Carlos, IQSC, Brasil
- 2012 - 2013** Programa de Educação Tutorial - PET. .
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2012 - 2013** Iniciação científica -IC. .
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Sao Paulo, Brasil
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico

Atuação profissional

1. Instituto de Medicina Molecular - IMM

Vínculo institucional

- 2017 - 2018** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional:
Intercâmbio/Bolsista Mestrado acadêmico , Carga
horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações: Período de estágio
desenvolvido com apoio e auxílio da FAPESP (BEPE:
2017/19332-4) como parte integrante do curso de
mestrado acadêmico desenvolvido no país, também
sob auxílio da FAPESP (2016/10884-1), sendo o
tema da pesquisa avaliado correlato ao proposto a
ser desenvolvido no país (caracterização biofísica da
hemoglobina extracelular extraída do anelídeo
Amyntas gracilis - HbAg).

2. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

- 2016 - 2018** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: aluno de mestrado, Carga horária: 40. Regime: Dedicção exclusiva
- 2012 - 2015** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: aluno de iniciação científica, Carga horária: 12. Regime: Parcial
Outras informações: Ênfase do período de bolsa no estudo e caracterização físico-químico e estrutural de proteínas, mais especificamente sistemas hemoproteicos. Projeto inserido na grande área de biológicas, com concentração na biofísica molecular.

Atividades

- 08/2016 - 06/2018** Pesquisa e Desenvolvimento, Campus Experimental de Registro
Linhas de pesquisa:
biotecnologia , biofísica molecular , eritrocruorinas
- 04/2015 - 04/2016** Conselhos, Comissões e Consultoria, Campus Experimental de Registro
Especificação:
Membro titular discente - Conselho Diretor CERe
- 03/2015 - 03/2016** Direção e Administração, Campus Experimental de Registro
Cargos ocupados:
Vice-coordenador sócio cultural - Centro Acadêmico
- 04/2014 - 04/2015** Conselhos, Comissões e Consultoria, Campus Experimental de Registro
Especificação:
Membro titular discente - Comissão Permanente de Pesquisa - CPP
- 08/2012 - 12/2015** Pesquisa e Desenvolvimento, Campus Experimental de Registro
Linhas de pesquisa:
Biofísica-molecular, proteínas, biotecnologia, biomateriais.

Linhas de pesquisa

1. Biofísica-molecular, proteínas, biotecnologia, biomateriais.

Objetivos: estudos de caracterização estrutural e da estabilidade de duas hemoglobinas extracelulares gigantes, uma extraída do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (HbGp) e a outra do *Amyntas gracilis* (HbAg) e avaliar o potencial uso destas hemoglobina como biossensor de contaminação ambiental. Para estes estudos biofísicos propõe-se o uso de diversas técnicas espectroscópicas, como absorção ótica, fluorescência, dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico (DLS), espalhamento de raio X de baixo ângulo (SAXS), ultracentrifugação analítica (AUC) e espectrometria de massa. Assim avaliaremos a estabilidade térmica, dissociação e/ou desnaturação da HbAg e HbGp em diferentes valores de pH, na presença de agentes caotrópicos, metais e pesticidas. Imobilização da HbAg e HbGp em biopolímeros como filme nanoestruturados, por técnica LBL, o que permite que a região de biorreconhecimento fique livre para a interação com pesticidas ou metais (fertilizantes) de interesse agrônômico.

Projetos

Projetos de pesquisa:

2016 – 2018: Caracterização estrutural da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas.

Descrição: O presente plano de pesquisa de mestrado tem como objetivo realizar estudos de caracterização estrutural e da estabilidade da hemoglobina extracelular gigante extraída do anelídeo *A. gracilis* (HbAg). Serão estudadas as propriedades biofísicas da HbAg e suas subunidades, tais como, a dissociação e/ou desnaturação, em diferentes valores de pH e efeito de concentração de proteína. Várias técnicas espectroscópicas, tais como, absorção ótica, fluorescência estática, dicroísmo circular, espalhamento dinâmico de luz (DLS), e estruturais, espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), ultracentrifugação analítica, do inglês, Analytical ultracentrifugation - AUC e espectrometria de massas, do inglês, matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF-MS serão utilizadas.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo: 2016/10884-1)

2014 – 2015: Oligoquetas edáficos como bioindicadores da qualidade do solo em ecossistemas agrícolas

Descrição: Será dada continuidade aos estudos desenvolvidos, com o objetivo avançar nos estudos de caracterização estrutural e da estabilidade da hemoglobina extracelular gigante, extraída do anelídeo *Amyntas gracilis*

(HbAg). Devido às propriedades físico-químicas de hemoglobinas extracelulares: resistência à oxidação, alta cooperatividade e estabilidade oligomérica, significativo poder de reassociação, e uma maior estabilidade quando comparada com a hemoglobina humana despertou-se o interesse de sua aplicação tanto na área médica, como sangue artificial, quanto ambiental por sua afinidade a metais. As hemoglobinas de *Lumbricus terrestris* (HbLt) e *Glossoscolex paulistus* (HbGp) vem sendo estudada em projetos anteriores e poderá ser usada como um modelo para as investigações com a HbAg, ainda não explorada. Desta forma, para avaliarmos as propriedades físico-química da HbAg, propões-se o uso de diferentes técnicas biofísicas e espectroscópicas, como absorção ótica, fluorescência, dicroísmo circular, espalhamento de luz dinâmico (DLS), espalhamento de raio X de baixo ângulo (SAXS), ultracentrifugação analítica (AUC) e espectrometria de massa (MALDI TOF). Desta forma avaliaremos a estabilidade térmica, dissociação e/ou desnaturação da HbAg em diferentes valores de pH e na presença de agentes caotrópicos. Uma vez caracterizada, a hemoglobina HbAg será imobilizada em superfícies sólidas através de filmes automontados e seu potencial como biossensores para a detecção de metais que contaminam o solo, será explorado.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2011 - 2013 Oligoquetas edáficos como bioindicadores da qualidade do solo em ecossistemas agrícolas na Região do Vale do Ribeira

Descrição: Entre os diversos seres vivos que habitam o solo, as minhocas têm sido propostas e utilizadas como bioindicadores da qualidade do solo. Estas apresentam efeitos positivos sobre a estrutura física do solo, a disponibilidade de nutrientes para as raízes, crescimento das plantas e produtividade agrícola. Portanto, é necessário gerar mais informações sobre as suas populações e relação com diversos parâmetros ambientais e físico-químicos do solo em diferentes ecossistemas do país, e sobre seu potencial uso como bioindicadores ambientais. Assim, esse projeto avaliará as populações de minhocas em ecossistemas agrícolas do Vale do Ribeira, principalmente nas culturas de Banana, e sua correlação com as propriedades ambientais. O trabalho visa avaliar de forma mais ampla, o potencial das oligochaetas como bioindicadores da fertilidade do solo, e propor em nível molecular como os defensivos agrícolas afetam o organismo destes animais. Existem diversos protocolos da Organização internacional para padronização (ISO) referentes a ensaios ecotoxicológicos com minhocas. Entretanto, esses ensaios usam minhocas epigéias e exóticas que não são representativas dos solos brasileiros e desta forma faz-se necessário avaliar o impacto de contaminantes sobre as minhocas mais comumente encontradas em ecossistemas agrícolas e florestais do nosso país. Na segunda etapa deste projeto de pesquisa serão avaliadas as propriedades físico-químicas e estruturais da hemoproteína, extraída dos anelídeos, presentes nas culturas de banana. Para estes estudos físico-químicos propõe-se o uso de diversas técnicas espectroscópicas, como absorção ótica, fluorescência estática, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e dicroísmo circular (CD), assim como algumas técnicas estruturais, espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS),

ultracentrifugação analítica (AUC), espectrometria de massa e cromatografia. Todas estas análises deverão contribuir para um salto qualitativo importante no conhecimento e caracterização de
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Outros tipos de projetos

2017 – 2018: Determinação de parâmetros termodinâmicos e atividade intrínseca da hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg)

Descrição: O projeto tem como objetivo o estudo da cinética de agregação/dissociação da hemoglobina do anelídeo *Amyntas gracilis* (HbAg). Pelo uso do espalhamento de luz dinâmico (DLS), pretende-se avaliar as propriedades termodinâmicas da HbAg e de suas subunidades em diferentes condições de pH, concentração, temperatura e, na presença de agentes caotrópicos. Estes resultados permitirão o avanço na compreensão dos fenômenos de agregação/dissociação e desnaturação envolvidos nesta hemoglobina extracelular. Adicionalmente, serão realizadas medidas de Microscopia de Força Atômica (AFM) da proteína em diferentes condições de pH para avaliação da topografia da estrutura oligomérica e, ensaios para a observação de possível atividade peroxidase pela HbAg.

Situação: Em andamento Natureza: Outros tipos de projetos

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (3);

Integrantes: Jonathan Brito Souza de Oliveira; Patrícia Soares Santiago (Responsável); Nuno C Santos; Marco André Manso Domingues.

Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processo: 2017/19332-4)

Áreas de atuação

1. agronomia
2. Proteínas
3. Biofísica
4. Biofísica Molecular
5. Físico-Química
6. Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

Prêmios e títulos

2016 Honra ao mérito - 1º da turma, Conselho Regional de Engenharia e Agronomia do Estado de São Paulo - CREA-SP

2016 Prêmio Câmpus Experimental de Registro da UNESP, UNESP - CÂMPUS EXPERIMENTAL DE REGISTRO

2014 Melhores trabalhos da área de biológicas da unidade, Unesp - congresso de iniciação científica

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, F. A. O.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; LINHARES, A. P. D.; MORGANTE, P. G.; Carvalho, J. W. P.; Tabak, M. Characterization of Amynthas Gracilis Hemoglobin (HbAg) and its Subunits by AUC and MALDI-TOF-MS In: 59 Annual Meeting Biophysical Society, 2015, Baltimore. **Biophysical Journal.** , 2015. v.108. p.375a -

2. **OLIVEIRA, J. B. S.**; Santiago, P. S.; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G. **STUDIES OF GIANT EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) AS A PROTOTYPE BIOSENSOR FOR ENVIRONMENTAL CONTAMINATION.** In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu.-. , 2015.

3. **OLIVEIRA, J. B. S.**; SANTIAGO, P. S.; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G. ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 2 fase, 2014, Águas de Lindóia. **ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL..** , 2014.

4. **OLIVEIRA, J. B. S.**; SANTIAGO, P. S.; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G. ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1 fase, 2014, Registro. **ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL..** , 2014.

5. **OLIVEIRA, J. B. S.**; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G.; SANTIAGO, P. S. Caracterização da hemoglobina extracelular Amynthas gracilis (HbAg) com potencial aplicação como bioindicador de contaminação do solo. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1 fase, 2013, Registro. **Caracterização da hemoglobina extracelular Amynthas gracilis (HbAg) com potencial aplicação como bioindicador de contaminação do solo..** , 2013.

6. LINHARES, A. P. D.; SANTIAGO, P. S.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; BERTINI, G. Estudos ecotoxicológicos e biofísicos utilizando anelídeos e hemoproteínas como bioindicadores de contaminação do solo In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1 fase, 2013, Registro. **Estudos ecotoxicológicos e biofísicos utilizando anelídeos e hemoproteínas como bioindicadores de**

contaminação do solo. , 2013.

7. LINHARES, A. P. D.; SANTIAGO, P. S.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; BERTINI, G. Estudos ecotoxicológicos e biofísicos utilizando anelídeos e hemoproteínas como bioindicadores de contaminação do solo In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 2 fase, 2013, Barra Bonita. **Estudos ecotoxicológicos e biofísicos utilizando anelídeos e hemoproteínas como bioindicadores de contaminação do solo.** , 2013.

8. SANTIAGO, P. S.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; LINHARES, A. P. D.; Carvalho, J. W. P.; CARVALHO, F. A. O.; Tabak, M. Extration, separation and characterization of the extracellular hemoglobin *Amyntas gracilis* (HbAg) with potential application as bioindicator of soil contamination. In: XII Encontro da SBPMat, 2013, Campos do Jordão. **Extration, separation and characterization of the extracellular hemoglobin *Amyntas gracilis* (HbAg) with potential application as bioindicator of soil contamination..** , 2013. v.1. p.108

9. Pinto, D.; Porciuncula, G.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; Rosseto, V.; SKREBSKY, E. C. COLETA, PREPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS PARA O HERBÁRIO DA UNIPAMPA - CAMPUS DOM PEDRITO In: II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Uruguaiana. **II SIEPE.** , 2010.

10. Porciuncula, G.; **OLIVEIRA, J. B. S.**; Pinto, D.; Rosseto, V.; SKREBSKY, E. C. Elaboração de diferentes composições de compostagem para uso na adubação de plantas In: II SIEPE Diversidade de Ideias para Ações Inovadoras, 2010, Uruguaiana. **Elaboração de diferentes composições de compostagem para uso na adubação de planta.** , 2010.

11. **OLIVEIRA, J. B. S.**; Porciuncula, G.; Pinto, D.; Rosseto, V.; Perleberg, C. S.; SKREBSKY, E. C. Influência de diferentes substratos agrícolas na germinação de sementes de espécies forrageiras In: II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010, Uruguaiana. **II SIEPE.** , 2010.

12. **OLIVEIRA, J. B. S.**; Bittencourt; R.; Farias; J. L.; Daltro; D. S.; Felice; A.; Hubert; A. R. N.; PINHO, A. S. Perfil do consumidor de leite em uma rede de hipermercado na cidade de São Paulo In: II SIEPE Diversidade de Ideias para Ações Inovadoras, 2010, Uruguaiana. **Perfil do consumidor de leite em uma rede de hipermercado na cidade de São Paulo.** , 2010.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **OLIVEIRA, J. B. S.**; Santiago, P. S.; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G. **Estudos da interação da hemoglobina extracelular gigante *Amyntas gracilis* (HbAg) com o metal pesado Cobre.**, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

2. **OLIVEIRA, J. B. S.**; LINHARES, A. P. D.; SANTIAGO, P. S. **STUDIES OF GIANT EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN *Amyntas gracilis***

(HbAg) AS A PROTOTYPE BIOSENSOR FOR ENVIRONMENTAL CONTAMINATION., 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. **OLIVEIRA, J. B. S.; SANTIAGO, P. S.; LINHARES, A. P. D.; BERTINI, G. ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.**, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. **OLIVEIRA, J. B. S.; LINHARES, A. P. D.; SANTIAGO, P. S.; BERTINI, G. Caracterização da hemoglobina extracelular Amynthes gracilis (HbAg) com potencial aplicação como bioindicador de contaminação do solo.**, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. **OLIVEIRA, J. B. S.; Porciuncula, G.; Pinto, D.; Rosseto, V.; Perleberg, C. S.; SKREBSKY, E. C. influência de diferentes substratos agrícolas na germinação de sementes forrageiras**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. **OLIVEIRA, J. B. S.; Bittencourt; R.; Farias; J. L.; Daltro; D. S.; Felice; A.; Hubert; A. R. N.; PINHO, A. S. Perfil do consumidor de leite em uma rede de hipermercados na cidade de São Paulo-SP**, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Demais produções bibliográficas

1. **OLIVEIRA, J. B. S. Periódico Técnico Científico - 'Na Brasa'. Jornal.** , 2013. (Outra produção bibliográfica)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no **XLVII Encontro anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular**, 2018. (Encontro)
IMMOBILIZATION OF HEMOGLOBIN FROM AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) USING THE LAYER-BY-LAYER TECHNIQUE (LBL).

2. Apresentação de Poster / Painel no **46º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2017. (Congresso)
Isoelectric point of Giant Hemoglobin of Amynthes gracilis (HbAg) and Thermal Stability Studies upon pH Effect.

3. **23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015. (Congresso)

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015. (Congresso)

STUDIES OF GIANT EXTRACELLULAR HEMOGLOBIN AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) AS A PROTOTYPE BIOSENSOR FOR ENVIRONMENTAL CONTAMINATION.

5. Apresentação Oral no **XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1 fase**, 2014. (Congresso)

ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.

6. **XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 2 fase**, 2014. (Congresso)

ESTUDOS DA HEMOGLOBINA GIGANTE EXTRACELLULAR AMYNTHAS GRACILIS (HBAG) COMO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.

7. **I Encontro de Extensão Universitária da UNESP de Registro**, 2013. (Encontro)

8. Apresentação Oral no **XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp - 1 fase**, 2013. (Congresso)

Caracterização da hemoglobina extracelular Amynthes gracilis (HbAg) com potencial aplicação como bioindicador de contaminação do solo..

9. **II Workshop sobre Arborização Urbana no Vale do Ribeira**, 2011. (Outra)

10. **I seminário de mercado de trabalho para zootecnia**, 2010. (Seminário)

11. Apresentação Oral no **II salão internacional de ensino, pesquisa e extensão (II SIEPE)**, 2010. (Congresso)

Perfil do consumidor de leite em uma rede de hipermercados na cidade de São Paulo-SP.

Organização de evento

1. **OLIVEIRA, J. B. S.**

I Visita ao Polo Regional Vale do Ribeira - APTA Regional de Pariquera-Açu, 2013. (Outro, Organização de evento)

2. **OLIVEIRA, J. B. S.**; Zanon, J. A.; Sakata, P. A.; Fukunaga, F. E.

I Ação Integralizadora - Dia da Árvore, 2012. (Outro, Organização de evento)

Outras informações relevantes

1 Ênfase na área de proteômica. Atualmente é membro do grupo de pesquisa em Biomoléculas da UNESP - Câmpus Experimental de Registro e, membro participante do projeto Jovem Pesquisador (JP) coordenado pela Profa Dra Patrícia Soares Santiago, cujo objetivo é caracterização de uma nova Hemoproteína extracelular gigante, extraída do anelídeo Amynthes gracilis e, o

estudo e proposição do seu uso em sensor de contaminação ambiental.

07/2016; 09/2016 - Pesquisador colaborador projeto LEC - 17229/CNPEM
"Determinação da massa molar da HbAg e a caracterização das espécies presentes em equilíbrio por ultracentrifugação analítica (AUC)."

09/2017 - Pesquisador colaborador projeto LEC - 22124/CNPEM
"Caracterização estrutural de hemoglobinas extracelulares por ultracentrifugação analítica e dicroísmo circular."

Aos meus pais, Jose A. de Oliveira e Adaustria B. S. de Oliveira, que sempre acreditaram e apoiaram meus sonhos. À minha amada avó, Elza G. de Azevedo, por toda paciência e doçura e aos amigos que a vida me trouxe.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda a vez que força que ele me trouxe nos momentos mais difíceis e, por tudo que tenho conquistado até hoje.

Aos meus pais e avó que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof^a. Patrícia Soares Santiago e co-orientadora Prof^a. Patrícia G. Morgante por toda a orientação, sabedoria e paciência durante essa jornada, obrigado.

A minha amiga Carolina Rissi (Birita), pela convivência, companheirismo e parceria diária. Enfrentar os problemas do dia a dia foi mais fácil com sua ajuda, sua sensibilidade e apoio foram essências durante este período.

Ao prof. Dr. Marcel Tabak e ao grupo de Biofísica Molecular (IQSC-USP) por todo o apoio dado durante a execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Nuno C. Santos e a equipe do grupo de Biomembranas e Nanomedicina (IMM/Lisboa) pelo acolhimento e prestatividade que recebi durante a minha estadia em Lisboa/Portugal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa - Jovem Pesquisador (JP), processo n^o 2015/11447-1.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado, processo n^o 2016/10884-1.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), processo n^o 2017/19332-4.

Aos meus parceiros de laboratório (Biomoléculas) Claudemir, Lierge e Isis por sempre estarem prontamente dispostos a me ajudar com tudo. Fico muito feliz e agradecido de ter dividido o espaço de trabalho com pessoas como vocês.

Aos demais integrantes do laboratório Biomoléculas Luana, Camila, Raíssa e Raphael pelas risadas, conversas e conselhos compartilhados durante esses anos.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças”

Stephen Hawking

RESUMO

As hemoglobinas extracelulares apresentam alta estabilidade oligomérica, resistência à oxidação, cooperatividade e afinidade para ligar oxigênio, além do potencial uso em aplicações biotecnológicas como substituto sanguíneo e biossensores de contaminação ambiental. Devido a estas propriedades, os objetivos desta dissertação foram caracterizar a estrutura e a estabilidade da hemoglobina extracelular gigante do anelídeo *Amyntas gracilis* (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas, tais como, absorção ótica, intensidade de espalhamento de luz (LSI), espalhamento de luz dinâmico (DLS), eletroforese SDS-PAGE, ultracentrifugação analítica (AUC), espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF-MS) e microscopia de força atômica (AFM). Em pH 7,0, a HbAg apresentou espectro de absorção ótica com máximo em 415 nm (banda de Soret) e em 540 e 575 nm (bandas Q). A alcalinização do meio deslocou os máximos de absorção para 405 nm e uma única banda Q alargada em 540 nm, devido à oxidação do grupo heme. O perfil proteico apresentado pela HbAg por eletroforese SDS-PAGE foi semelhante, mas não igual a hemoglobina extracelular de *Glossoscolex paulistus* (HbGp). A HbAg apresentou três bandas com massa molar (MM) entre 25-37 KDa associadas as cadeias **L**, enquanto a HbGp apresenta apenas duas bandas nesta faixa de massa. As análises dos dados de MALDI-TOF-MS mostraram que a HbAg apresenta quatro isoformas para o monômero **d** (**d₁** - **d₄**) com MM entre 16,2-16,8 kDa, três linkers (**L₁**, **L₂** e **L₃**), 25,8-26,8 kDa, duas isoformas para o trîmero **abc** e uma única isoforma para o tetrâmero **abcd** (67,7 kDa). Por AUC foi determinada a MM da HbAg na sua forma íntegra de 3,9 MDa, sendo este valor superior a HbGp (3,6 MDa). O maior valor de MM observado é associado a auto-agregação da HbAg em função do tempo de estocagem. O valor de ponto isoelétrico (pI) estimado por Potencial Zeta foi de $6,0 \pm 0,3$. A HbAg nativa apresenta um diâmetro hidrodinâmico (Dh) de 28 nm determinado por DLS. Porém, em pH menor que 6,5 a proteína mostrou tendência em formar agregados, já em pH acima de 8,0 a hemoglobina sofreu dissociação concomitante com agregação. A microscopia de força atômica (AFM) de filmes de HbAg em pH 7,0 revelou altura entre 15-20 nm que foi associado a dois discos hexagonais sobrepostos. Estudos iniciais de atividade peroxidase (POD) indicaram maior estabilidade da HbAg frente altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em relação a HbGp. Por fim os resultados apresentados nesta dissertação mostram um grande avanço na caracterização da HbAg, uma hemoglobina extracelular gigante até então não relatada na literatura. Adicionalmente possibilitou a criação de novas vertentes de estudos que no futuro poderão resultar na criação de produtos de grande aplicação biotecnológica, tais como biossensores destinados às áreas médica e ambiental, além de produtos de suprimento de oxigênio para tecidos sob condição de hipóxia.

Palavras chave: Hemoproteínas, propriedades físico-químicas de biomoléculas, caracterização biofísica, espectroscopia, espectrometria.

ABSTRACT

The extracellular hemoglobin molecules present high oligomeric stability, resistance to oxidation, cooperativity and affinity to bind oxygen, besides the potential use in biotechnological applications as blood substitute and biosensors of environmental contamination. Considering that, this dissertation aimed to characterize the structure and stability of the giant extracellular hemoglobin of the annelid *Amyntas gracilis* (HbAg) by different biophysical techniques, such as optical absorption, light scattering intensity (LSI), dynamic light scattering (DLS), SDS-PAGE electrophoresis, analytical ultracentrifugation (AUC), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and atomic force microscopy. The HbAg had an optical absorption spectrum with a maximum of 415 nm (Soret band), and 540 and 575 nm (Q bands) at pH 7.0. The alkalization of the medium shifted the absorption maxima to 405 nm and a single broad Q band at 540 nm due to the oxidation of the heme group. The protein profile presented by HbAg by SDS-PAGE electrophoresis was similar but not identical to the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp). HbAg presented three bands with molecular mass (MM) ranging 25-37 kDa associated with the **L** chains, whereas HbGp presented only two bands in this MM range. MALDI-TOF-MS data showed that HbAg presents four isoforms for the monomer **d** (**d₁-d₄**) with MM ranging 16.2-16.8 kDa, three linkers (**L₁**, **L₂** and **L₃**), 25.8-26.8 kDa, two isoforms for the abc trimer and a single isoform for the abcd tetramer (67.7 kDa). By AUC, the MM of whole HbAg was determined in 3.9 MDa, a higher value than that observed for HbGp (3.6 MDa). The highest MM value observed was associated with self-aggregation of HbAg as a function of storage time. The isoelectric point value (pI) estimated by Zeta Potential was 6.0 ± 0.3 . Native HbAg had a hydrodynamic diameter (D_h) of 28 nm determined by DLS. However, at pH less than 6.5 the protein showed tendency to form aggregates; at pH above 8.0 the hemoglobin undergoes dissociation concomitant with aggregation. Atomic Force Microscopy (AFM) of HbAg films at pH 7.0 revealed a height between 15-20 nm that was associated with two overlapping hexagonal layers. Initial studies of peroxidase activity (POD) indicated higher stability of HbAg against high concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) relative to HbGp. Finally, the results presented in this dissertation show a great advance in the characterization of HbAg, a giant extracellular hemoglobin not previously reported in the literature. In addition, it has enabled the creation of new study strands that in the future may result in the creation of products of great biotechnological application, such as biosensors destined to the medical and environmental areas, as well as products of oxygen supply to tissues under the condition of hypoxia.

Keywords: Hemoproteins, physicochemical properties of biomolecules, biophysical characterization, spectroscopy, spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da hierarquia estrutural apresentada pela HbGp íntegra, a partir de estudos cristalográficos.....	30
Figura 2: Cromatograma da HbAg íntegra 30 mg · mL ⁻¹ obtido por SEC utilizando uma coluna Superdex G-200 16/600, equilibrada em tampão Tris-HCl 100 mmol · L ⁻¹ pH 7,0 a 25° C, acoplado a um cromatógrafo AKTA Pure M (GE)	48
Figura 3: Espectros de absorção ótica da HbAg em função do pH.	50
Figura 4: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da HbGp e HbAg.....	52
Figura 5: Espectro de massa da HbAg na ausência de β-mercaptoetanol obtido por MALDI-TOF.....	56
Figura 6: Dados de AUC da HbAg íntegra em pH 7,0.....	59
Figura 7: Distribuição da MM da HbAg.....	60
Figura 8: Variação da média do Diâmetro hidrodinâmico (D _h), Z-average, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para [HbAg] = 0,5 mg · mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato, 30 mmol · L ⁻¹ , pH 7,0 a 25°C.....	64
Figura 9: Distribuição de tamanho obtido de dados de DLS da [HbAg] = 0,5 mg · mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato borato, 30 mmol · L ⁻¹ , pH 7,0, 25°C.....	65
Figura 10: Diâmetro médio hidrodinâmico (D _h), Z-average, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para [HbAg] = 0,5 mg · mL ⁻¹ em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato, 30 mmol · L ⁻¹ , a 25°C.	66
Figura 11: Gráficos de distribuição de tamanho (nm) obtidos de dados de DLS da HbAg, 0,5 mg · mL ⁻¹ , em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol · L ⁻¹ em diferentes valores de pH	68
Figura 12: Variação da média do Diâmetro hidrodinâmico (D _h), Z-average, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para [HbAg] = 3,0 mg · mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato, 30 mmol · L ⁻¹ , pH 7,0 a 25° C.	72
Figura 13: Distribuição de tamanho obtido de dados de DLS da [HbAg] = 3,0 mg · mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato borato, 30 mmol · L ⁻¹ , pH 7,0	73
Figura 14: Efeitos da temperatura sobre as propriedades hidrodinâmicas da HbAg íntegra 0,5 mg · mL ⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato, 30 mmol · L ⁻¹ pH 7,0. (A)	74

Figura 15: Dados para estimação de pl da HbAg íntegra	76
Figura 16: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato- borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, sobre a superfície de mica obtidas por AFM.	78
Figura 17: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato- borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,5, sobre a superfície de mica obtidas por AFM.	79
Figura 18: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 10,0, sobre a superfície de mica obtidas por AFM.	81
Figura 19: Representação do mecanismo do ciclo da peroxidase (POD) proposto para HbGp, proteína ortóloga a HbAg, na presença e ausência de guaiacol.	86
Figura 20: Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na atividade residual peroxidase (POD) da HbAg.	89

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Massa molar (Da) das subunidades da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg), na forma nativa, na ausência e presença de β -mercaptoethanol, obtidos do MALDI-TOF-MS. 57
- Tabela 2:** Propriedades Hidrodinâmicas da HbAg e outras Ec. 60
- Tabela 3:** Diâmetro médio hidrodinâmico, *Z-average*, (D_h), em nanômetros (nm) \pm desvio padrão (SD) e índice de polidispersão (PDI), considerando-se três medidas independentes, observados para HbAg 0,5 mg \cdot mL⁻¹ em função do valor de pH, a 25° C. 67
- Tabela 4:** Tamanho (nm) e representatividade de espalhamento no sistema (%) de populações obtidas por DLS para a [HbAg] = 0,5 e 3,0 mg \cdot mL⁻¹ em função de diferentes valores de pH, a 25° C obtidos por DLS.. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(abcd)₃L₃ - Protômero

Å – Angstrom

a – Cadeia globínica a

abc – Subunidade trimérica

Abs – Absorção

AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês “Atomic Force Microscopy)

AUC – Ultracentrifugação analítica (do inglês “Analytical ultracentrifugation”)

b– Cadeia globínica b

BSA – Albumina de soro bovino

c– Cadeia globínica c

cap – Subunidade dodecamérica (abcd)₃

CD – Dicroísmo circular (do inglês “Circular Dichroism”)

Cryo-EM - Microscopia eletrônica de criogênese (do inglês “Cryogenic Electron Microscopy)

CTAC – Cloreto de cetiltrimetilamônio (do inglês “cetyl trimethyl ammonium chloride”)

D - Coeficiente de difusão

d– Cadeia globínica d

D_h – Diâmetro hidrodinâmico

DLS – Espalhamento de luz dinâmico (do inglês “Dynamic Light Scattering”)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Ec - Eritrucruorina

EM - Microscopia eletrônica (do inglês “electron microscopy”)

ERO - Espécies reativas de oxigênio

f/f₀ - Razão friccional

g – Constante gravitacional universal

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

Hb- Hemoglobina

HbAg – Hemoglobina de *Amyntas gracilis*

HbAm – Hemoglobina de *Arenicola marina*

HbEa - Hemoglobina de *Eisenia Andrei*

HbGp – Hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*

HbLt – Hemoglobina de *Lumbricus terrestris*

HbPe - Hemoglobina de *Perionyx excavatus*

HbRa – Hemoglobina de *Rhinodrilus alatus*

HEPES – Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico

HSA – Soro albumina humana

k – constante de mola

kDa – Kilo Dalton

L – Cadeia linker

MALDI-TOF-MS - Espectrometria de massa por tempo de voo (do inglês “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly-Mass Spectrometry”)

MALS - Espalhamento de luz em múltiplos ângulos (do inglês “Multi Angle Light Scattering”)

MDa - Mega Dalton

MM – Massa molar

MV – Microvesícula

PDI - Índice de polidispersão (do inglês “polydispersity index”)

pI – Ponto isoelétrico

POD – Atividade Peroxidase

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotação por minuto

R_s- Raio de Stokes

s/D - Razão coeficiente de sedimentação/ coeficiente de difusão

$S_{20,w}^0$ - Coeficiente de sedimentação em água a 20° C extrapolado para diluição infinita de proteína, 0 mg mL⁻¹.

$S_{20,w}$ - Coeficiente de sedimentação em água a 20° C

SAXS – Espalhamento de luz de Raio-X de baixo ângulo (do inglês “Small-angle X-ray scattering”)

SDS – Dodecilsulfato de sódio (do inglês “sodium dodecyl sulfate”)

SDS-Page - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, “Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”)

SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho (do inglês “Size Exclusion Chromatography”)

SOD – Atividade superóxido dismutase

STEM - Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (do inglês “scanning transmission electron microscopy”)

SV - Velocidade de sedimentação (do inglês “sedimentation velocity”)

T_m – Temperatura crítica de desnaturação

Tris - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

U – unidade atividade enzimática

u.a. – Unidade arbitraria

α – Letra grega alfa

β – Letra grega beta

λ – Letra grega lambda – usada para indicar comprimento de onda

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	28
1.1 Hemoglobinas Extracelulares gigantes	28
1.2 Conservação estrutural: Estudos com Ec de várias espécies.....	30
2. Objetivos	35
2.1 Objetivo geral:	35
2.2 Objetivos específicos:	35
3. Material e métodos	36
3.1 Extração da hemolinfa de <i>A. gracilis</i>	36
3.2 Purificação da hemolinfa e obtenção da hemoglobina extracelular (Ec) de <i>A. gracilis</i> (HbAg) pura.	36
3.2.1 Centrifugação	36
3.2.2 Diálise	36
3.2.3 Ultracentrifugação.....	37
3.2.4 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, <i>Size Exclusion Chromatography</i>).....	37
3.3 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE	38
3.4 Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo (MALDI-TOF-MS, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly-Mass Spectrometry</i>)	40
3.5 Ultracentrifugação Analítica (AUC, <i>Analytical Ultracentrifugation</i>)	41
3.6 Espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta visível (Uv-Vis).....	41
3.7 Intensidade de Espalhamento de Luz (LSI, <i>Light Scattering Intensity</i>) ...	42
3.8 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, <i>Dynamic Light Scattering</i>).....	42
3.9 Estimação de ponto isoelétrico (pI) da HbAg por Potencial Zeta e LSI...	44
3.10 Microscopia de força atômica (AFM, <i>Atomic Force Microscopy</i>).....	45
3.11 Estudos iniciais de determinação de atividade peroxidase (POD) da HbAg	47

4. Resultados e Discussão	48
4.1 Purificação da Hemolinfa e obtenção da hemoglobina Extracelular de <i>A. gracilis</i> (HbAg).....	48
4.1 Espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta visível (Uv-Vis).....	49
4.2 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE	51
4.3 MALDI-TOF-MS	54
4.4 AUC	58
4.5 DLS	63
4.5.1 Efeito do pH na estabilidade oligomérica da HbAg	63
4.5.2 Efeito da concentração e temperatura na estabilidade oligomérica da HbAg no pH 7,0.	72
4.6 Estimativa do pI da HbAg por potencial-zeta e LSI	75
4.7 AFM	77
4.8 Estudos iniciais de determinação de atividade POD da HbAg	85
5. Conclusão	91
6. Perspectivas Futuras.....	94
7. Referências	96

1. Revisão de Literatura

1.1 Hemoglobinas Extracelulares gigantes

O anelídeo *Amyntas gracilis* é uma das minhocas mais frequentemente encontradas no solo brasileiro, porém trata-se de uma espécie invasora originária do continente asiático, tendo sua ocorrência comum em solos com grande interferência humana (STEFFEN, 2012). *A. gracilis* pertencente à classe Oligochaeta, família Megascolecidae e gênero *Amyntas* (KINBERG, 1866). As características físicas de cada espécime se limitam a um comprimento que varia de 80 a 120 mm, diâmetro de 4 a 7 mm e massa de 4 a 6 g.

O filo Annelida possui uma vasta diversidade de exemplares espalhados desde o ambiente terrestre até o marinho (LAMY et al., 1996; WEBER; VINOGRADOV, 2001). A hemoproteína extraída da hemolinfa de *A. gracilis* (HbAg) é uma hemoglobina (Hb) extracelular gigante, assim como a extraída de *Lumbricus terrestris* (HbLt) e *Glossoscolex paulistus* (HbGp), atualmente duas das Hb extracelulares gigantes mais intensamente estudadas na literatura (CARVALHO, F et al., 2011ab; LAMY et al., 1996; MARTIN et al., 1996; SANTIAGO et al., 2010ab; TABAK et al., 2012; WEBER; VINOGRADOV, 2001; ZAL et al., 2000).

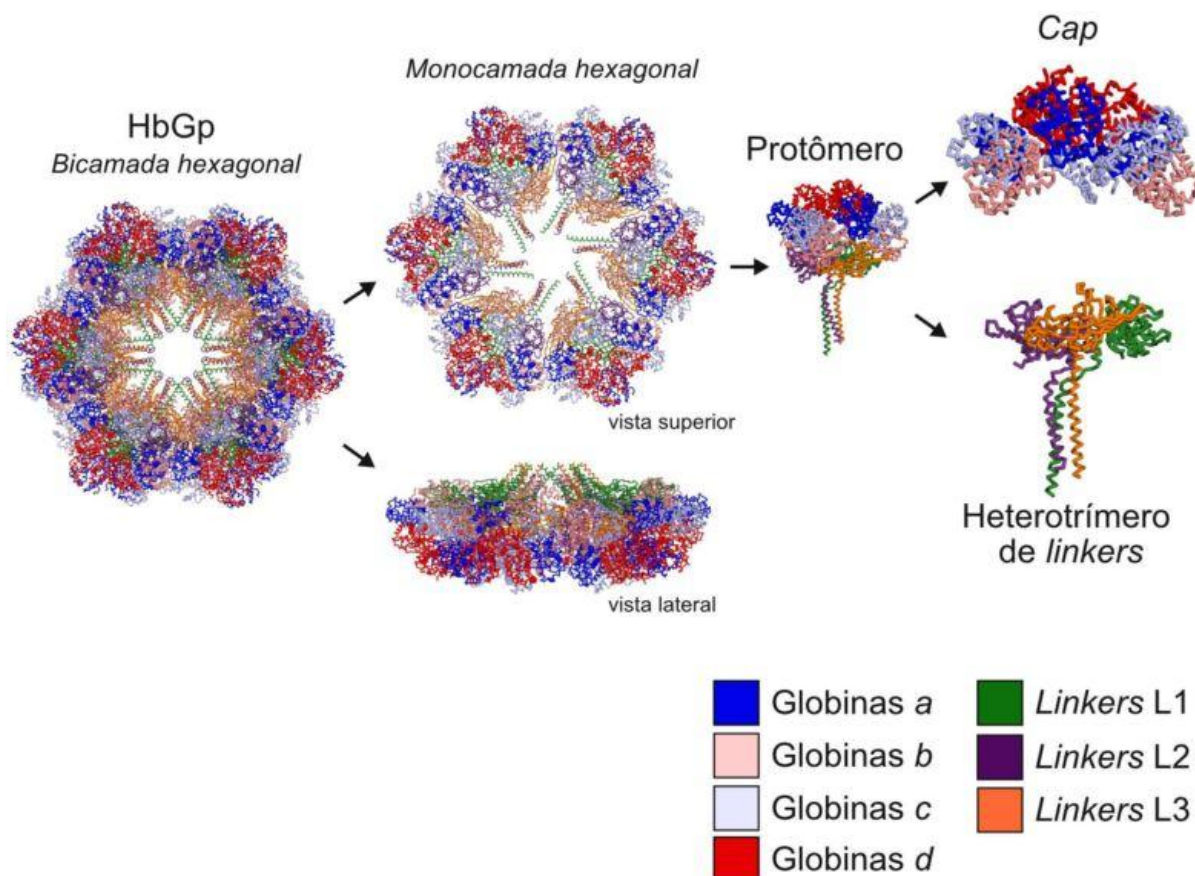
As Hb têm papel vital no organismo, pois são responsáveis pelo transporte de oxigênio molecular aos tecidos. Hb extracelulares gigantes, também conhecidas como eritruorinas (Ec) (SVEDBERG; ERIKSSON, 1933), têm sido estudadas como modelos de alta complexidade em relação à ligação do oxigênio molecular (O₂) ao grupo heme, mas também de composição estrutural. Essa classe de hemoproteína é caracterizada por apresentar uma grande massa molar (MM) que chega a vários megadalton - (MDa), uma alta afinidade e cooperatividade de ligação ao O₂ e boa estabilidade redox, garantida pela sua estrutura oligomérica compactada que protege os grupos hemes da oxidação dentro do bolsão hidrofóbico (VINOGRADOV, 2004; WEBER; VINOGRADOV, 2001).

As Ec são formadas por várias subunidades, os monômeros **a**, **b**, **c** e **d** possuem um grupo heme cada, já as cadeias denominadas de Linkers (**L**) não possuem o grupo prostético em sua composição (CARVALHO, F et al., 2009;

MARTIN et al. 1996; WEBER; VINOGRADOV, 2001). Essas subunidades estão organizadas em uma dinâmica explicada pelo modelo nomeado de “bracelete” (KREBS, ZIPPER; VINOGRADOV, 1986, MARTIN et al., 1996; VINOGRADOV et al., 1986).

Neste modelo é proposto que a hierarquia oligomérica dessa classe de proteínas é composta por 12 protômeros, cada um destes correspondendo à fórmula geral $(abcd)_3L_3$, divididos igualmente entre dois discos hexagonais, a bicamada hexagonal. Uma monocamada hexagonal é formada por 6 $(abcd)_3L_3$, a subunidade dodecamérica, também denominada de “cap”, corresponde ao $(abcd)_3$, o tetrâmero é composto por quatro tipos de globinas (**a**, **b**, **c** e **d**). O trímero (**abc**) é decorrente da união das cadeias **a**, **b** e **c** por ligações dissulfeto, ficando o monômero **d** ligado ao tetrâmero (**abcd**) por interações eletrostáticas. Os **L** se organizam em heterotrímeros que têm a função de estabilizar e possibilitar o arranjo das demais subunidades (BACHEGA, 2013; CARVALHO, F et al., 2011a; MARTIN et al. 1996; TABAK et al., 2012). O principal exemplo dessa organização estrutural é a HbLt (KREBS, ZIPPER; VINOGRADOV, 1986; MARTIN et al., 1996). Entretanto, estudos por diferentes técnicas biofísicas, e mais recentemente o estudo cristalográfico da HbGp, indicam que as proteínas HbGp e HbLT compartilham uma organização oligomérica similar entre si (Figura 1).

Figura 1: Representação da hierarquia estrutural apresentada pela HbGp íntegra, a partir de estudos cristalográficos. A fórmula geral $12(abc d)_3L_3$ rende à biomolécula 144 cadeias globínicas e 36 linkers (*L*). Código de acesso: 4u8u



Fonte: BACHEGA (2013); BACHEGA et al., 2015

1.2 Conservação estrutural: Estudos com Ec de várias espécies.

Dados de ultracentrifugação analítica do inglês, *Analytical ultracentrifugation* (AUC), em condições de alta alcalinidade ou presença de agentes caotrópicos (ureia e guanidina), confirmam a similaridade de comportamento da dissociação na HbGp com a HbLt. Subunidades de menor MM e valor de coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}$) se formam a partir de estruturas oligoméricas maiores, através de subseqüentes dissociações da Hb íntegra (CARVALHO, F et al., 2009, 2011a, 2015).

A similaridade de composição estrutural entre a HbGp e HbLt foi evidenciada por estudos por eletroforese monodimensional SDS-PAGE e espectrometria de massa por tempo de voo, do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption ionization Time-of-Flight-Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS) nos quais foram observadas, respectivamente, quantidades próximas de bandas coradas no gel e presença de isoformas com MM entre 17,3-17,6; 16,3-16,8 kDa para as cadeias globínicas **a** e **d**, uma única contribuição de MM para monômero **b** (16,4 kDa) e **c** (18,2 kDa) e valores de MM em 68,4 kDa (dodecâmero), 51,2 kDa (trímero) e na faixa de 25,8-32,9 kDa para as cadeias **L** (CARVALHO, F et al., 2011a; TABAK et al., 2012). Adicionalmente, estudos recentes envolvendo dados originados da montagem e análise do transcriptoma da HbGp confirmaram grande similaridade de sequência de aminoácidos desta Ec com a HbLt; para as subunidades **a**, **b** e **c** essa paridade chega a ser maior que 70% (BACHEGA, 2013).

Estes estudos propõem uma grande conservação estrutural e de MM entre as subunidades que compõem essas Ec. O que pode ser utilizado como parâmetro para o estudo de diversidade de espécies e da avaliação evolutiva, neste caso, para entender se as diferenças estruturais existentes entre diferentes Ec ocorrem devido a uma real evolução entre espécies, ou então, surgem em função de uma plasticidade intrínseca da biomolécula (ZAL et al., 2000).

O interesse sobre essas proteínas fica maior quando são observadas as suas propriedades físico-químicas: alta estabilidade estrutural, grande número de cadeias com o grupo heme, resistência à dissociação oligomérica e auto-oxidação, estabilidade térmica, alto potencial redox e uma baixa resposta imunogênica. Por estes motivos, essas biomoléculas têm sido propostas para usos biotecnológicos no desenvolvimento de sangue artificial, tendo como exemplo a Ec de *Arenicola marina* (HbAm) que nas últimas décadas tem sido objeto principal de estudo do grupo de pesquisa/companhia biotecnológica de origem francesa Hemarina, a qual em seu portfólio detém produtos de fins terapêuticos voltados para área médica, cujo objetivo é o suprimento de O₂ para sistemas que necessitam de oxigenação. Estes produtos desenvolvidos agem como carreadores de O₂ universal, promovendo a melhoria da oxigenação de órgãos pré-transplante, neste caso, rins, enxertos e até mesmo

em tratamento de ferimentos crônicos ou hipoxicos. Estes produtos se mostram promissores por serem fáceis de usar pela equipe médica e diminuir os riscos de rejeição dos enxertos/órgãos pós-transplante (FUSHITANI; HEMARINA, 2018; RIGGS, 1991; ROSSELOUT et al., 2006; ZAL et al., 2000; ZHU et al., 1996;).

Todavia, além das propriedades descritas acima, as Ec ainda apresentam atividades intrínsecas. Uma delas é associada ao controle de espécies reativas de oxigênio (ERO). A atividade de peroxidase (POD) foi descrita em literatura para HbGp por Caruso et al. (2016) e a superóxido dismutase (SOD) para a HbLt e HbAm por Liochev et al. (1996) e Rousselot et al. (2006), respectivamente.

A atividade POD relatada ao grupo das hemeoproteínas se deve ao grupo heme, presente em sua estrutura proteica, ter um ciclo catalítico muito semelhante ao das enzimas peroxidases. Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ferro do grupo prostético é oxidado formando derivados de proteína, componentes I e II que possuem grupo ferryl, capazes de oxidar vários tipos de substratos orgânicos tais como fenóis e aminas aromáticas em um processo de oxi-redução com dois elétrons. Este processo termina com ferro utilizando um de seus elétrons para oxidar o substrato orgânico no processo de redução do íon Fe (IV), estado intermediário de oxidação do ferro na presença de H_2O_2 e substrato redutor, para o estado Fe (III), estado nativo da enzima (LI et al., 2006; NAGABABU; RIFIKIND, 2004). Porém, apesar da comprovada existência de muitos grupos heme nas Ec, cerca de 144 (TABAK et al., 2012) e das enzimas heme-peroxidases estarem dentro do grupo das metaloproteínas com comprovada aplicação na indústria no tratamento de águas residuais (AZEVEDO et al., 2003; RAI et al., 2001), pouco conteúdo científico é encontrado na literatura a respeito da atividade peroxidase nas Ec, evidenciando uma lacuna sobre o tema.

Entretanto, estudos sobre a estabilidade térmica e oligomérica de Ec, tais como, hemoglobina extracelular de *Rhinodrilus alatus* (HbRa) e HbGp demonstram o empenho em avançar na compreensão da estrutura-atividade destas macromoléculas. O uso da técnica de espalhamento de luz dinâmico, do inglês, *Dynamic Light Scattering* (DLS) possibilitou a determinação do diâmetro hidrodinâmico aparente (D_h) da HbGp e da HbRa em solução. Em pH 7,0, a

25°C, essas Ec possuem D_h igual a 27 ± 1 nm (CARVALHO, J et al., 2016; SANTIAGO et al., 2008). Já em pH alcalino (acima de 9,0), a 25°C, há uma maior tendência à dissociação oligomérica e, menores valores de D_h são observados, chegando a um valor mínimo de 10 ± 1 nm no pH 10,7 (SANTIAGO et al., 2008). O monitoramento da estabilidade térmica também foi realizado por DLS, sendo concluído que a temperatura crítica de desnaturação, do inglês, *melting point*, (T_m), observada para HbGp em pH 7,0 está em torno de 52°C, enquanto a HbRa em mesmas condições desnaturou apenas em 56°C (CARVALHO, J et al., 2016; SANTIAGO et al., 2008).

Adicionalmente, o uso da técnica permitiu estimar a cinética de dissociação da HbGp, esse dado reunido com avaliação da auto-oxidação do grupo heme por outras técnicas espectroscópicas, possibilitou a proposição de um modelo de dissociação para a HbGp (SANTIAGO et al., 2008, 2010ab). Vale mencionar que o valor do ponto isoelétrico (pI) da HbGp foi determinado por potencial Zeta (pI ~ 6,0), o qual está próximo ao valor exato de $5,8 \pm 0,5$ mV, determinado por focalização isoelétrica (SANTIAGO et al., 2010b).

Estudos de interação da HbGp com o surfactante catiônico Cloreto de Cetil trimetil Amônio (do inglês, *cetyltrimethylammonium chloride* - CTAC) e o aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate* - SDS) foram realizados utilizando diferentes técnicas espectroscópicas, calorimetria, DLS e espalhamento de raios X a baixo ângulo, do inglês, *small angle X-ray scattering* (SAXS) (CARVALHO, J et al., 2014, 2013b; SANTIAGO et al., 2007, 2008, 2010a). A interação da HbGp com SDS e CTAC depende fortemente do pI da proteína, evidenciando que a interação eletrostática do surfactante com a proteína é bastante significativa (CARVALHO, J et al., 2013b, 2014; SANTIAGO et al., 2007, 2008, 2010a). Os estudos da interação proteína-surfactante iônico em valores de pH ácido (5,0) e neutro (7,0) evidenciaram comportamento oposto exibido pela biomolécula em relação a presença do agente caotrópico no sistema. Em ambos os casos (pH 5,0 e 7,0) com a adição do surfactante ocorreu a diminuição da estabilidade da proteína. Todavia, em meio ácido essa instabilidade foi mais pronunciada na presença de SDS do que de CTAC, já em pH neutro foi observado exatamente o contrário.

As informações sobre esse grupo de proteínas são ainda mais enriquecidas pelos estudos sobre conformação oligomérica, adquiridos por

microscopia eletrônica de transmissão de varredura (do inglês, *scanning transmission electron microscopy* - STEM) e microscopia eletrônica (do inglês, *electron microscopy* - EM), realizados com a HbLt e HbAm (BOEKEMA; VAN HELL, 1989; KAPP et al., 1982). Nesses experimentos foi possível confirmar por imagens geradas por microscopia eletrônica um formato aproximadamente pentagonal para a subunidade $(abcd)_3L_3$ da HbLt, além da sobreposição das duas camadas, $[(abcd)_3L_3]_{12}$, que compõem a proteína íntegra, e que possuem formato hexagonal. Além de ser apresentado as dimensões do oligômero da HbLt em $20,0 \pm 0,8$, $28,2 \pm 0,8$ e $11,0 \pm 0,7$ e da HbAm em $19,0 \pm 1,2$, $27,5 \pm 0,8$ e $10,5 \pm 0,6$ nm para altura, diâmetro total e diâmetro do protômero, respectivamente (KAPP et al., 1982). Os resultados obtidos nestes estudos possibilitaram observar similaridades de tamanho entre componentes de diferentes Ec, além de confirmar os dados anteriormente obtidos por SAXS, eletroforese SDS-PAGE e MALDI-TOF-MS que traziam evidências de uma conservação estrutural dessa classe proteica e possibilitaram a proposição do modelo bracelete que explica a estrutura quaternária dessa biomolécula (KAPP et al., 1982, ROYER et al., 1981; VINOGRADOV, KAPP; OHTSUKI, 1982).

Entretanto, apesar das inúmeras informações coletadas sobre estrutura, dinâmica e comportamento dessas Ec oriundas de anelídeos de grande comprimento (Minhocão), pouco se sabe sobre os mesmos temas em relação às Ec oriundas de espécies de anelídeos relativamente menores (comprimento ≤ 15 cm), como é o caso de *Amyntas gracilis*. Logo, o estudo de caracterização biofísica da HbAg pode complementar o conhecimento a cerca destas proteínas, provendo dados que possam confirmar uma provável conservação das características estruturais e hidrodinâmicas. Além disso, pode contribuir para o entendimento da relação estrutura-atividade-função desta classe proteica. Dessa forma, este trabalho tem relevância intrínseca ao permitir a caracterização de uma Ec até então não relatada em literatura e, servirá, futuramente, de base para novos estudos e experimentos aplicados que venham a utilizar esta macromolécula.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Caracterização da hemoglobina extracelular extraída do anelídeo *Amyntas gracilis* (HbAg) por diferentes técnicas biofísicas

2.2 Objetivos específicos:

1. Extrair e Purificar a HbAg em seu estado nativo por cromatografia líquida e eletroforese monodimensional;
2. Analisar por espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF-MS) e ultracentrifugação analítica (AUC) a HbAg na sua forma nativa, em pH 7,0;
3. Realizar medidas espectroscópicas (absorção ótica, espalhamento de luz – LSI) para avaliar os efeitos de pH e concentração de proteína nos processos de dissociação, oxidação e desnaturação;
4. Analisar por espalhamento de luz Dinâmico, do inglês *Dynamic Light Scattering* (DLS) os efeitos do pH e da concentração de proteína na estabilidade oligomérica da proteína.

3. Material e métodos

3.1 Extração da hemolinfa de *A. gracilis*.

A extração da hemolinfa foi realizada, segundo o protocolo reportado para *G. paulistus* (IMASATO et al., 1995; SANTIAGO, 2008) e adaptado para *A. gracilis* (OLIVEIRA, 2015). No processo, foram utilizados cerca de 120 espécimes, adquiridos da empresa Minhobox, locada em Juiz de Fora/MG. Inicialmente, os animais foram anestesiados por imersão, durante 3-4 minutos, em água gelada, e logo em seguida, feito um corte e a dissecação, com auxílio de bisturi e alfinetes, da região próxima à faringe; com uso de pipetas pasterur a hemolinfa presente no local foi coletada e armazenada em tubos previamente preenchidos com algumas gotas de citrato de sódio $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ para evitar a coagulação do material.

3.2 Purificação da hemolinfa e obtenção da hemoglobina extracelular (Ec) de *A. gracilis* (HbAg) pura.

3.2.1 Centrifugação

A centrifugação da hemolinfa diluída em anticoagulante foi realizada a 5000 rpm ($3.164 \times g$) por 15 min a 4°C em centrífuga Eppendorf 5810 R. O processo teve o intuito restos de tecidos e fluídos excretados pela minhoca durante o processo de extração (IMASATO et al., 1995; SANTIAGO et al., 2007). O controle da temperatura se faz necessário nesta etapa, devido ao aquecimento que a amostra sofre com a alta rotação do equipamento e que, poderia levar enzimas e proteínas presentes na hemolinfa a se desnaturarem.

3.2.2 Diálise

Nesta etapa, o objetivo foi conseguir eliminar ainda mais impurezas do material de interesse, através da difusão seletiva. Desta forma, a amostra foi colocada dentro de uma membrana seletivamente permeável com corte de peso molecular de 10 kDa, que em seguida foi fechada e mergulhada em tampão Tris HCl $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,0, por 12 horas a uma temperatura entre $4-8^{\circ} \text{C}$. Durante esse período, devido ao efeito do equilíbrio químico, o citrato

de sódio e outras moléculas de menor tamanho permearam pela membrana e difundiram para fora do saco contendo a hemolinfa, ao mesmo tempo, o tampão circundante (Tris-HCl) entrou. Ao final, o resultado obtido foi uma hemolinfa mais pura e diluída em tampão Tris-HCl (AGUSTINHO et al., 1996; IMASATO et al., 1995).

3.2.3 Ultracentrifugação

A amostra foi ultracentrifugada a 60.000 rpm (250 000 x g) por 5 horas a 4 °C em ultracentrifuga Himac CP 80 β (Hitachi–Japão) no Instituto de Química, Araraquara UNESP. A hemoglobina extracelular (Ec) foi obtida na forma pellet, aderido à parede do fundo do tubo, sendo em seguida resuspendido em um volume mínimo de tampão Tris-HCl 100 mmol \cdot L⁻¹ pH 7,0 e acondicionado em geladeira entre 4-8° C.

3.2.4 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, *Size Exclusion Chromatography*)

A cromatografia por exclusão de tamanho é um dos principais modos de separação para polímeros. É baseada na separação dos componentes individuais da amostra pelos poros do material empacotado dentro da coluna cromatográfica. Moléculas grandes não podem, ou, podem parcialmente penetrar nesses poros, já moléculas menores podem atravessar a maioria dos diminutos poros (NELSON; COX, 2002). A partir destas informações, moléculas grandes são coletadas primeiro, seguido das intermediárias e por fim, as menores moléculas que atravessaram por entre os poros saem da coluna. O referido processo seguiu o descrito para a HbGp (AGUSTINHO et al., 1996; SANTIAGO et al., 2010b). Foi utilizado nesta etapa, como polímero filtrante, o SEPHADEX G-200 hidratado em tampão Tris-HCl 100 mmol \cdot L⁻¹ pH 7,0 empacotado em coluna de cromatografia de vidro com mesmas dimensões descritas para o processo de purificação da HbGp, 100 cm de comprimento por 1,0 cm de diâmetro (CARVALHO, F, 2013; SANTIAGO, 2008). A passagem da proteína pela coluna se fez utilizando a força da gravidade exercida pelo tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 100 mmol \cdot L⁻¹ pH 7,0). A coleta das frações separadas no processo ocorreu a cada 1 mL. O SEC é a última etapa de purificação da HbAg. Para a verificação do sucesso na purificação da HbAg

íntegra, uma alíquota da amostra, cerca 500 μL , foi novamente purificada pela técnica de SEC pelo uso de uma coluna de cromatografia de fase móvel líquida, modelo 16/600, acoplada a um cromatografo AKTA Pure M (GE) e equilibrada com tampão Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0, sendo o processo feito a uma velocidade de eluição de 0,9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As frações de Ec pura foram analisadas espectrofotometricamente em equipamento UV-2000 (Shimadzu, Japão) entre 700-250 nm a 25 °C para verificação da existência de espectro de absorção típico desta classe proteica na sua forma oxy, ou seja, com oxigênio molecular ligado a sexta coordenação do ferro do grupo heme. Em seguida, adotando-se o valor do coeficiente de absorvidade molar da oxy-HbGp, $\epsilon_{415\text{nm}} = 5,5 \pm 0,8 (\text{mg}\cdot\text{mL})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (CARVALHO, F et al. 2009, 2011a, 2013a, 2015; SANTIAGO et al., 2008, 2010b), a concentração do estoque foi determinada em 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ por meio do uso da lei de Beer-Lambert (Equação 1).

$$\text{Abs} = -\log T = -\log (I / I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L, \quad (\text{Equação 1})$$

Em que **Abs** é a absorbância medida, **I_0** , é a intensidade da luz incidente a um dado comprimento de onda, **I** é a intensidade transmitida pela amostra, **L** é o caminho óptico pela amostra (distância que a luz percorreu pela amostra), **ϵ** é coeficiente de absorvidade molar (a qual varia de substância para substância), e **c** é a concentração da substância, cromóforo. Todos os processos desta etapa foram realizados no Laboratório Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP.

3.3 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE

A caracterização inicial da HbAg obtida por SEC foi realizada por géis de eletroforese com 15% de acrilamida, seguindo o protocolo adaptado da HbGp para HbAg (OLIVEIRA, 2015).

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) - gel SDS-PAGE, é um método muito utilizado para separar e analisar massas moleculares (MM) de biomoléculas, tais como proteínas, DNA e RNA. A técnica

basicamente consiste da separação e migração das componentes da amostra em função da sua MM em um gel o qual está sob a aplicação de uma diferença de potencial (MAIZEL, 2000).

O gel confeccionado para o teste é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode agir como uma peneira molecular. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada, o que se torna muito útil, uma vez que algumas biomoléculas diferem de 5 KDa uma da outra (LAEMMLI, 1970; MAIZEL, 2000).

A separação das componentes da amostra pela MM é garantida pela eliminação de variáveis como a forma e a carga da proteína nativa através da adição do SDS durante a confecção do gel. A função deste reagente é desnaturar a amostra aplicada no gel, de modo, a converter esta em uma estrutura linear que facilitará sua migração pelo pela malha do gel durante a aplicação do potencial elétrico. O SDS tem adicionalmente a função de possibilitar uma eletroforese uniforme entre as diferentes subunidades da amostra. Isso ocorre, pois, o surfactante tem alta carga negativa e uma cauda hidrofóbica que interage com as cadeias polipeptídicas da proteína, tornando-as negativamente carregadas. Na ausência do SDS, as proteínas com massas iguais poderiam migrar diferentemente na malha do gel devido a diferenças de potencial de carga de suas estruturas tridimensionais que poderiam alterar sua migração pelo gel conforme fosse aplicado o potencial elétrico (LAEMMLI, 1970; MAIZEL, 2000).

Adicionalmente ao SDS, o uso do agente redutor β – mercaptoetanol nas amostras a serem aplicadas no gel, possibilita quebra das pontes dissulfeto existentes na estrutura do material de interesse, ajudando assim, a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos, e a separação de subunidades que se encontravam unidas por esta ligação (LAEMMLI, 1970; MAIZEL, 2000).

Para o estudo do perfil proteico da HbAg a eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-glicina pH 8,3 (Tris-HCl 25 mmol \cdot L⁻¹, glicina 192 mmol \cdot L⁻¹) com a aplicação de voltagem constante em 140 V durante 90 minutos, utilizando amostras de HbAg e HbGp com concentração final de 0,3 mg \cdot mL⁻¹ diluídas em tampão amostra Laemmli (Bio-Rad™) na presença e ausência de

β -mercaptoetanol, aplicados no gel de empilhamento (pH 6,8) nos seguintes volumes: 5, 10 e 15 μ L. Padrões proteicos (Precision Plus Protein[®] Standards da Bio-Rad[™]) entre 250 a 10 kDa foram usados no gel para ajudar na estimacão da MM aparente das subunidades presentes. Após a eletroforese os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250[®] da Bio-Rad[™] e descorado com mistura de ácido acético, etanol e água nas proporções 3:2:35 (v/v).

3.4 Espectrometria de Massa por Tempo de Vo (MALDI-TOF-MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly-Mass Spectrometry)

As medidas ocorreram conforme o protocolo feito para HbGp e adaptado para a HbAg (OLIVEIRA, 2015). Amostras de HbAg íntegra foram dialisadas para reduzir o conteúdo de sal proveniente do tampão a uma concentrao de 5,0 mmol \cdot L⁻¹. A faixa de concentrao de proteína utilizada no experimento foi de 1,0 – 3,0 mg \cdot mL⁻¹ na presença e ausência de β -mercaptoetanol (50 mmol \cdot L⁻¹). A matriz de dessoro empregada foi o cido 3,5-Dimetoxi-4-hidroxicinâmico (cido sinapnico), dissolvido em uma mistura de acetonitrila:água (50:50 volume) contendo 0,5 % de ácido trifluoracético. As amostras de HbAg íntegra foram misturadas com soluço saturada de ácido sinapnico nas razões 1:5, 1:10 e 1:20 (v/v), proteína:matriz.

A medida foi realizada utilizando espectrmetro de massas, modelo Etthan MALDI-TOF (Amersham Bioscience), localizado na Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo - SP, com uso de voltagem de acelerao de 20 kV. O instrumento foi calibrado utilizando os padrões: citocromo c de corao bovino e albumina de soro bovino, do inglês, *Bovine Serum Albumin* (BSA), obtidos da Sigma. As amostras foram analisadas em duplicata, e os espectros acumulados por cerca de 200 disparos de laser, sendo posteriormente plotados pelo software *Origin 8.0*. As massas moleculares das espécies presentes foram obtidas a partir da média dos valores observados em experimentos independentes.

3.5 Ultracentrifugação Analítica (AUC, *Analytical Ultracentrifugation*)

A sequência metodológica de preparo das amostras para AUC segue o proposto para a HbGp (CARVALHO, F, 2013; CARVALHO, F et al., 2009, 2011b). Os experimentos de velocidade de sedimentação, do inglês, *sedimentation velocity* (SV) foram realizados a 20 °C, usando um rotor do tipo An60Ti e velocidade de rotação de 15.000 a 40.000 rpm em uma ultracentrífuga analítica da Beckman Optima XL-A. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 100 mmol · L⁻¹ + 50 mmol · L⁻¹ NaCl, pH 7,0 em uma faixa de concentração de 100-300 µg · mL⁻¹. Em seguida, as amostras foram dialisadas contra o mesmo tampão de preparo por 48 horas, sendo a cada 12 horas o volume substituído e, reservado o último volume para ser utilizado como referência no experimento de AUC.

O software SEDFIT (Versão 15.01b) foi usado para análise dos dados brutos, de modo a ajustar os dados da absorção observada *versus* raio da cela. O coeficiente de sedimentação em água a 20° C ($S_{20,w}$) foi determinado como o máximo dos picos de sedimentação (c) e o coeficiente de sedimentação extrapolado para a diluição infinita ($S_{20,w}^0$) foi estimado por regressão linear dos valores de $S_{20,w}$ medido em cada concentração (SCHUCK, 2000, 2003).

3.6 Espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta visível (Uv-Vis).

Medidas de absorção óptica foram realizadas para estudo da variação do pH sobre o comportamento da HbAg. Os espectros de absorção foram coletados em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão) na faixa de 250 a 700 nm, com concentração de HbAg de 0,1 mg · mL⁻¹ em tampão acetato-borato-fosfato 30 mmol · L⁻¹ e caminho ótico de 0,5 cm.

3.7 Intensidade de Espalhamento de Luz (LSI, *Light Scattering Intensity*)

O LSI foi realizado com amostras de HbAg de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, diluída em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ na faixa de 2,6 – 8,0, usando excitação e emissão em 350 nm e caminho ótico de 1 cm.

3.8 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

Na técnica de DLS é feita a incidência de um feixe de luz monocromático sobre uma amostra em meio aquoso para o monitoramento do movimento browniano das moléculas suspensas em solução. A flutuação do espalhamento de luz observado no sistema oriundo da interação luz \times matéria é registrada ao longo do tempo. A partir dessas oscilações da luz espalhada em função do tempo são gerados os correlogramas que relacionam as flutuações de uma mesma medida entre si. O acúmulo de correlogramas possibilita a determinação de uma função de auto-correlação, que irá informar sobre o decaimento exponencial de relação entre dados de espalhamento observados, e fornecerá o valor do coeficiente de difusão (D) da molécula em sua fórmula. A partir do valor de D e utilizando a equação de Stokes-Einstein (Equação 2) é possível determinar o diâmetro hidrodinâmico (D_h) em nano- metros (nm) de uma esfera:

$$D_h = k \cdot T / 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D \quad (\text{Equação 2})$$

onde K é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta em Kelvin, D é o coeficiente de difusão e η é a viscosidade do solvente (PECORA, 1985).

Assim, a sensibilidade de DLS (0,3 nm a 10 μm) é suficiente para distinguir diferentes estados proteicos oligoméricos e quaternários, e é idealmente adequada para monitorar a estabilidade da estrutura da proteína em condições de desnaturação/dissociação.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas obtidos a partir da função autocorrelação podem ser obtidos utilizando o método *Cumulants*.

Este método é baseado em um ajuste monoexponencial da função autocorrelação e pode fornecer o tamanho médio da partícula (Z-average) e o índice de polidispersão, do inglês, *polydispersity index* (PDI). Entretanto, uma alternativa para sistemas polidispersos (presença de várias espécies) é uma análise multiexponencial da função autocorrelação, que pode fornecer uma distribuição do tamanho da partícula em função da intensidade, número e volume de partículas espalhadoras (NNLS ou Contin).

Assim, o uso destes tipos de análises permite conhecer as populações (tamanho/diâmetro das espécies presentes em equilíbrio) responsáveis pelo espalhamento detectado. Adicionalmente, a largura da base dos picos gerados nessa distribuição permite concluir sobre homogeneidade do sistema (mono ou polidisperso), sendo esta informação refletida no PDI. Essas distribuições permitem conhecer a real importância das demais populações presentes no sistema no espalhamento de luz observado (BERNE; PECORA, 2000).

Os experimentos de DLS foram realizados em equipamento da Malvern, modelo Nano ZS, com ângulo de espalhamento fixo de 173° , e laser de He-Ne de comprimento de onda de 633 nm. Cinéticas a 25°C em valores de pH 5,0 a 10,0 foram realizadas de acordo com o descrito para proteínas ortológicas (CARVALHO, J et al., 2014, 2016; SANTIAGO et al., 2008, 2010ab) utilizando cubetas descartáveis de plástico, de caminho ótico de 1 cm, para a determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do o comportamento exibido pela HbAg $0,5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em função do tempo.

O estudo da temperatura crítica de desnaturação, do inglês, *melting point* (T_m) foi feito para HbAg $0,5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ testando a faixa de temperatura ($25\text{-}65^\circ\text{C}$) em pH 7,0, utilizando cubeta de vidro e caminho ótico de 1 cm. O aumento da temperatura sobre a amostra ocorreu a um ritmo de $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ como o indicado nos protocolos descritos para HbGp e para a HbRa (CARVALHO, J et al. 2016; SANTIAGO et al. 2008, 2010a). O estudo do efeito da concentração sobre o comportamento e o D_h (nm) exibido pela HbAg $3,0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi realizado em pH 7,0 a 25°C .

Em ambos os experimentos, cinética e *melting*, as amostras foram diluídas em tampão acetato-fosfato-borato $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em todos os

experimentos as amostras foram previamente filtradas em filtro milipore 0,45 µm (Whatman, Florham Park, NJ) antes do início da medida.

Os resultados foram posteriormente analisados por D_h (nm) e distribuição de tamanho (intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz), com auxílio dos softwares Origin 8.0 e Zetasizer 7.12.

3.9 Estimação de ponto isoelétrico (pI) da HbAg por Potencial Zeta e LSI

O potencial-Zeta é uma análise da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade de biomoléculas. O valor de potencial-Zeta pode ser medido simultaneamente com o tamanho e a concentração das partículas. Durante as medidas de potencial-Zeta é aplicado um campo elétrico sobre as cargas suspensas da biomolécula em meio aquoso, o que induz as moléculas a se deslocarem para um determinado pólo. Desta forma, a partir do movimento das partículas em direção aos polos de carga oposta, a mobilidade eletroforética (μ_e) é medida e expressa em unidade de força de campo elétrico e então, é aplicada a equação de Henry (Equação 3) que resulta no valor do potencial-Zeta. A partir desta informação é possível estimar o pI (ponto isoelétrico) de uma molécula, considerando que próximo ao pI o valor de potencial-Zeta é próximo a zero (SANTIAGO et al., 2010b).

$$\mu_e = 2 \cdot \epsilon \cdot \zeta \cdot F(ka) / 3 \cdot \eta \quad (\text{Equação 3})$$

Em que, ζ é o potencial-Zeta, μ_e é a mobilidade eletroforética, ϵ corresponde a constante dielétrica da água, $F(ka)$ representa a função de Henry, cujo valor é de 1,5 para partículas suspensas em meio aquoso e η é o valor de viscosidade da solução.

Os experimentos de potencial-Zeta foram realizados em equipamento da Malvern, modelo Nano ZS, com ângulo de espalhamento fixo de 173°, e laser de He-Ne de comprimento de onda de 633 nm. As medidas foram feitas usando a técnica de velocidade de laser Doppler, do inglês, *laser Doppler velocity* (LDV). A estimação do pI da HbAg utilizou amostras com concentração

de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ diluídas em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ na faixa de pH 4,0 a 7,0. Em todas as medidas as amostras foram previamente filtradas em filtro milipore $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (Whatman, Florham Park, NJ) antes do início da medida. Os resultados do potencial de carga superficial x pH do tampão foram posteriormente plotados com o auxílio do software Origin 8.0.

3.10 Microscopia de força atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*)

A técnica possibilita a caracterização de superfícies através da geração de imagens com alta resolução que variam centenas de nm até poucos μm (EDSTROM et al., 1990). A AFM consiste na varredura da superfície da amostra por uma sonda (ponta) acoplada em uma estrutura denominada de cantilever, de forma, a se obter informações sobre sua topografia.

O equipamento de AFM opera medindo a força existente, em nano Newton (nN), entre sonda e a amostra. Esta força é o resultado do balanço entre a atração ocasionada pelas forças intermoleculares e a repulsão entre os orbitais eletrônicos dos átomos de ambas as partes, durante o escaneamento.

O registro de variação do posicionamento do feixe de laser, refletido pelo conjunto sonda - cantilever, em direção ao centro do quadrante do detector, permite que seja mensurada a deflexão da sonda durante a varredura, sendo obtida, desta forma, uma imagem topográfica da amostra. Os dados são coletados em varreduras de linhas consecutivas e apresentados em imagens quadradas de 512×512 até 8×8 pixels (BINNING, QUATE; GERBER, 1986; BHUSHAN; MARTI, 2004; HERRMANN et al., 1997; RUGAR; HANMA, 1990).

As medidas de AFM foram realizadas em aparelho da JPK Nanowizard IV (Berlin, Alemanha), montado sobre um microscópio ótico Zeiss Axiovert 200 (Göttingen, Alemanha). Os escaneamentos foram realizados pelo método de qi, do inglês, *quantitative imaging*, no qual a sonda ao atingir um limite de força, entre $0,1 - 0,5 \text{ nN}$, estabelecido durante o início da medida, retraí automaticamente, evitando que a amostra seja danificada pelo excesso de compressão, e empregando sondas do tipo qp- BioAC da Nanosensors (Neuchâtel, Suíça). As sondas qp-BioAC são constituídas por 3 cantilever de diferentes tamanhos e conseqüentemente de diferentes constantes de mola.

Para os estudos realizados, foi utilizado o cantilever mais longo, CB3, com uma constante de mola (k) 0,03-0,09 Nm^{-1} .

Antes de cada medida a sonda foi calibrada pelo método do ruído térmico, do inglês, *thermal noise* para determinação exata da constante de mola do cantilever ao qual estava associada. Neste método o equipamento estimula a vibração do conjunto sonda - cantilever através da aplicação de uma corrente elétrica para a determinação de k . O procedimento é realizado com o conjunto sonda - cantilever livre do contato com a superfície da amostra e repetido duas vezes. Na primeira, a determinação de k ocorre em temperatura ambiente e na segunda dentro das condições de realização da medida.

As medidas de AFM da HbAg foram realizadas nos valores de pH 7,0, 7,5 e 10,0 para verificar a dimensão máxima, em altura (nm), apresentado pelas partículas da amostra. Os escaneamentos foram feitos em filmes da HbAg utilizando a concentração de $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína e tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Após o preparo dos estoques de HbAg, o volume de $75 \mu\text{L}$ foi aplicado em suporte plano e de formato esferoide feito de mica, material inerte, previamente limpo, clivado e aderido a uma lâmina de vidro. O volume de amostra foi deixado por 30 minutos sobre a mica para poder adsorver sobre a sua superfície, em seguida foram feitas 10 lavagens da região, com $100 \mu\text{L}$ cada, usando o mesmo tampão utilizado no preparo dos estoques, previamente filtrado; posteriormente foi aplicado $100 \mu\text{L}$ do mesmo tampão sobre a mica para realização da varredura.

Os resultados apresentados foram originalmente adquiridos de escaneamentos em quadrantes de $0,5 \mu\text{m}^2$, $1 \mu\text{m}^2$, $2 \mu\text{m}^2$ e $5 \mu\text{m}^2$, com resolução de 512×512 pixels. A força utilizada para a realização da medida foi ajustada durante o escaneamento, ficando na faixa de $0,1 - 0,5 \text{ nN}$. Ao término da leitura de cada linha de varredura, a sonda foi retraída 50 nm de forma a garantir que a interação sonda-amostra deixasse de existir, antes do início de um novo escaneamento.

A construção das imagens foi feita utilizando o ajuste de polinomiais em cada uma das linhas acumuladas nas varreduras, em software disponibilizado pelo fabricante do equipamento. Através de algoritmos matemáticos, o ajuste linearizou as linhas que, originalmente não tinham tal orientação, em virtude do cristal no qual a sonda é fixada, não ter um movimento tipicamente linear. O

tratamento dos dados resultou na geração de representações planas da topografia do filme de HbAg.

3.11 Estudos iniciais de determinação de atividade peroxidase (POD) da HbAg

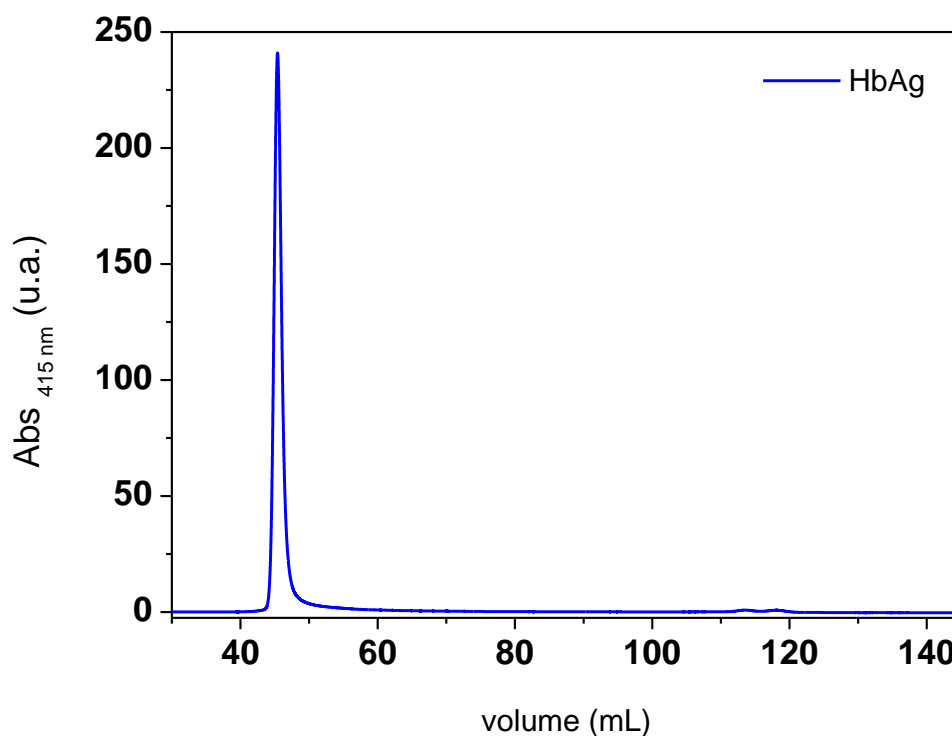
A metodologia utilizada para os ensaios de atividade peroxidase (POD) seguiu o protocolo descrito para a HbGp (CARUSO et al., 2016). O efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na atividade POD da HbAg foi determinado espectrofotometricamente utilizando-se o H_2O_2 como substrato I e guaiacol como substrato redutor subsequente (substrato II). Os ensaios foram realizados em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e a temperatura ambiente ($25^\circ C$). A mistura reacional inicial continha tampão Fosfato de Potássio $100 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, pH 7,0, diferentes concentrações de H_2O_2 dentro da faixa de 0-80 $\text{mmol} \cdot L^{-1}$, 16 μM de guaiacol e $0,1 \text{ mg} \cdot mL^{-1}$ de HbAg em um volume final de 3 mL. Os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata em cada condição testada. A concentração do estoque de HbAg utilizada foi medida espectrofotometricamente a 415 nm, previamente a cada etapa reacional. A atividade POD da proteína foi medida em termos residuais específicos ($U \cdot mg^{-1}$) em presença de H_2O_2 . Uma unidade de atividade (U) é definida como a capacidade da proteína (enzima) em converter 1 μmol de substrato (Guaiacol) em produto (tetraguaiacol) por minuto sob condições padrões, neste caso, pH 7,0 a $25^\circ C$.

4. Resultados e Discussão

4.1 Purificação da Hemolinfa e obtenção da hemoglobina Extracelular de *A. gracilis* (HbAg)

Ao fim do processo de extração e purificação da hemolinfa de *A. gracilis* foi obtido cerca de 4 mL de hemoglobina purificada (HbAg) com concentração média de $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para a verificação de sucesso nas etapas empregadas na purificação da proteína íntegra foi feita uma nova cromatografia por exclusão de tamanho em cromatografo equipado com módulo de absorção óptica. A observação do cromatograma mostra um único pico com eluição em torno dos 45 mL o qual foi associado à HbAg íntegra (Figura 2).

Figura 2: Cromatograma da HbAg íntegra $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtido por SEC utilizando uma coluna Superdex G-200 16/600, equilibrada em tampão Tris-HCl $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,0 a 25°C , acoplado a um cromatógrafo AKTA Pure M (GE).



Tal resultado indica que o sistema possui alta homogeneidade e o processo feito para obtenção da HbAg não interferiu na estabilidade da proteína estando a hemoglobina na forma íntegra. O comportamento visto é semelhante ao da HbGp (CARVALHO, F et al., 2011a, 2013).

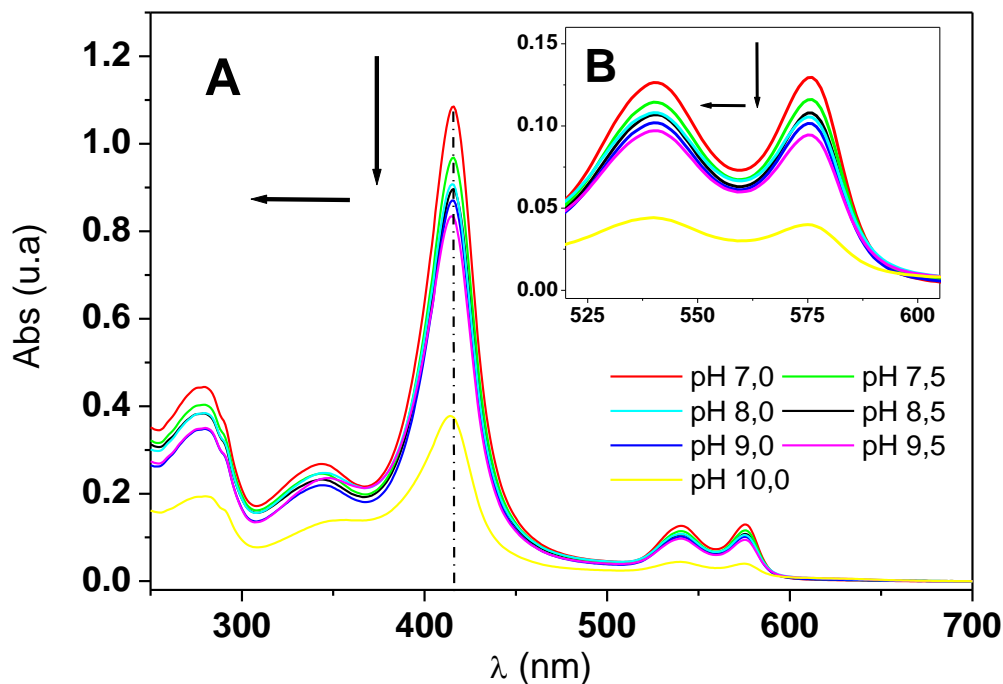
4.1 Espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta visível (Uv-Vis).

Com intuito de observar o comportamento de oxidação da HbAg em função do pH foi realizada a absorção óptica da HbAg na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). Os espectros de absorção da HbAg íntegra, na faixa de pH entre 7,0 – 10, são apresentados nas Figuras 3A e 3B. Em pH 7,0 a HbAg apresenta comportamento típico esperado para as hemoglobinas extracelulares. No comprimento de onda (λ) 415 nm, uma grande intensidade de absorção é registrada e associada à banda de Soret, outras duas bandas são observadas em 540 e 575 nm e são relacionadas às bandas α e β , respectivamente, também conhecidas como bandas Q (Figura 3A).

O aumento do valor do pH (acima de 8,0) provoca modificações no espectro da HbAg. Em pH 10,0 esse processo é confirmado pela redução e deslocamento para λ menores dos máximos de absorção (Figura 3A). A região entre 520 a 605 nm mostra com melhor resolução o espectro das bandas Q na faixa de pH de 7,0 a 10,0, o meio alcalino tendência a formação de uma única banda Q deslocada para o λ de 540 nm (Figura 3B). As modificações citadas acima, todavia são verificadas em menor intensidade no espectro da HbAg (Figura 3A e 3B) possivelmente devido a um baixo tempo de exposição da proteína aos valores de pH alcalino testados.

As variações no espectro, descritas acima, são utilizadas para monitorar o estado de oxidação do grupo heme e indiretamente o nível de enovelamento da proteína. Experimentos de absorção óptica e DLS com a HbGp mostram que mudanças no valor de pH (7,0-10,0) e a presença de agentes caotrópicos tais como, surfactantes iônicos ($0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS em pH 5,0 e $0,02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAC em pH 7,0), ureia ($4,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em pH 7,0) e guanidina ($0,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ em pH 7,0 a 45°C) primeiramente causam a oxidação do grupo heme e posteriormente, em maior concentração, provocam a dissociação oligomérica (CARVALHO, F et al., 2015; CARVALHO, J et al., 2013; POLI, MOREIRA; IMASATO et al., 2011; SANTIAGO et al., 2008).

Figura 3: Espectros de absorção ótica da HbAg em função do pH. (A) Espectro de absorção ótica entre 700-250 nm, da HbAg $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ na faixa de pH entre 7,0 - 10,0. (B) Inseto da Figura 2A na faixa de 520-605 nm, mostra com melhor resolução o espectro das bandas Q. As setas indicam o sentido em que ocorrem as mudanças no espectro da banda de Soret (415 nm) e das banda Q (540 - 575 nm) com o aumento do valor do pH. A linha pontilhada indica o λ máximo de absorção para a banda Soret em 415 nm.



Fonte: Autor

Estudos sobre o efeito do pH na estabilidade oligomérica da HbGp e HbRa mostram a maior suscetibilidade da molécula a dissociação em meio alcalino ($\text{pH} \geq 9,0$) (CARVALHO, J et al., 2013ab, 2016) e relatam a ocorrência da oxidação do grupo heme antes do início do processo de dissociação (SANTIAGO et al., 2008). Adicionalmente, propõem que a redução de intensidade da banda de Soret, observada em pH 10,0, seria um indicativo do crescimento do processo de oxidação no sistema. Uma vez que este comportamento poderia ser observado pelo aumento da concentração de espécies oxidadas em solução com um coeficiente de absorvidade molar (ϵ) menor em relação ao apresentado pela Hb nativa (RIFKIND et al., 1994).

As mudanças observadas no espectro de absorção da HbAg em função da alteração de valor do pH são consistentes aos descritos para outras Ec, em

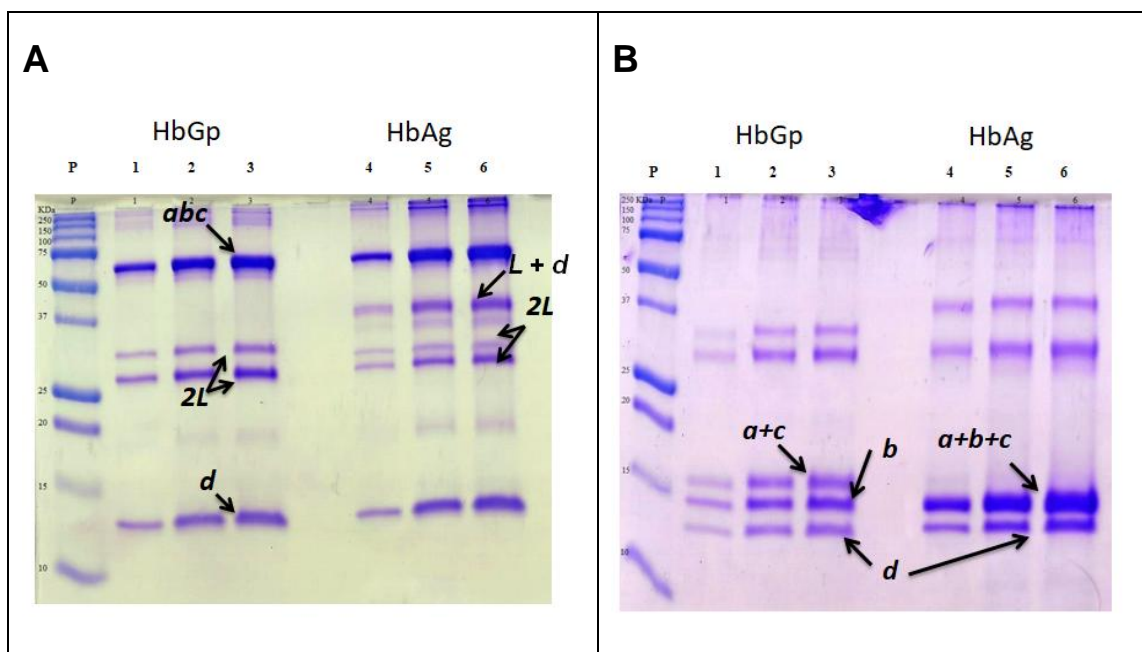
especial a HbGp (CARVALHO, J. 2013; AGUSTINHO et al., 1996; SANTIAGO, 2008) que será utilizada como padrão comparativo no presente estudo de caracterização.

4.2 Eletroforese monodimensional SDS-PAGE

A verificação de composição e estimativa de MM das subunidades da HbAg foi realizada por meio de géis de eletroforese monodimensional na presença e ausência de agente redutor, β -mercaptoetanol. Nas figuras 3A e 3B são apresentados, respectivamente, os géis de SDS-PAGE da HbGp e da HbAg íntegra na ausência e presença do agente redutor. O poço (P) corresponde ao padrão de massa molar usado para a calibração das massas aparentes das bandas presentes no gel; os poços 1, 2, e 3 correspondem à HbGp; já os poços 4, 5 e 6 à HbAg (Figura 4A e 4B).

Na ausência do agente redutor as Ec apresentam resultados semelhantes, com presença de banda em torno de 52 e 12 kDa, os quais estão associados, em ordem, às subunidades **abc** e **d** que são apresentados na Figura 4A e indicados a posição das suas respectivas bandas, assim como de todas as outras que aparecem nos géis, por setas em função da MM descrita em estudo de espectrometria de massa da Ec que, será discutido na seção a seguir. Para a região dos **L**, entre 25-37 kDa, aparentemente, a HbGp possui duas bandas relacionadas a esta subunidade, sendo o mesmo observado para a HbAg que detém uma das bandas com valor MM próximo aos 27 kDa (Figura 4A) Os resultados obtidos e mostram similaridade de padrão proteico da HbAg com o relatado a HbGp em estudos anteriores pela mesma técnica (CARVALHO, F et al., 2011a; IMASATO et al., 1995).

Figura 4: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% da HbGp e HbAg. O poço (P) corresponde ao padrão massa que vai de 250 até 10 kDa. A MM do padrão de proteína usado é exibido no lado esquerdo do gel. (A) Gel de eletroforese, na ausência do β -mercaptoetanol e, (B) na presença do agente redutor. Os poços 1 a 3 correspondem, em ordem, a HbGp nos seguintes volumes 5, 10 e 15 μ L; os poços 4 a 6 são referentes a HbAg em mesmas condições.



Fonte: Autor

A diferença entre as duas Ec testadas está em relação à banda com MM entre 40-43 kDa, logo acima da região das bandas das cadeias *L* (Figura 4A). A maior massa obtida por essa subunidade indica que esta é provavelmente relacionada com um dímero de *L*, ou então, uma associação entre uma cadeia *L* e alguma outra cadeia globínica (*a*, *b*, *c* ou *d*). A proposição é feita em razão da banda em questão estar entre as bandas das cadeias *L* e das cadeias globínicas citadas anteriormente. A hipótese ganha embasamento quando são revisados estudos da dissociação, separação e purificação das subunidades por SEC da HbGp. Estes experimentos mostraram que posteriormente a saída do monômero *d* ocorre à saída do *L* (CARVALHO, F et al., 2011a). Assim com esta informação é possível pensar em uma associação entre estas duas subunidades. Adicionalmente, o monômero *d* em estudos de SV mostrou tendência em autoassociar em dímero, trímero e até em unidades formadas por quatro monômeros *d* (CARVALHO, F et al., 2013). O que leva a crer ser possível uma ligação entre *L* e *d*.

Na figura 4B, a ausência da banda correspondente ao **abc**, em torno dos 52 kDa (Figura 4A) é observada devido a redução das ligações dissulfeto existentes na subunidade trimerica, pela ação do β -mercaptoetanol e, posterior divisão nas seguintes subunidades monoméricas **a**, **b** e **c**. Para a HbGp, como esperado, as subunidades **a,b,c** e **d** se organizaram em 3 bandas diferentes, na faixa de MM entre 10-20 kDa. Todavia, para a HbAg apenas duas destas bandas foram localizadas no gel, sendo a próxima aos 12 kDa associada ao monômero **d**. A adição do agente redutor não alterou, para nenhuma das Ec testadas, a posição das bandas relativas as cadeias **L**, entre 25-37 kDa o que corrobora com estudo anteriores da HbGp (CARVALHO, F et al., 2011a; TABAK et al., 2012). Mesmo comportamento foi observado para a banda em 40-43 kDa, desta forma, a recuperação da proteína contida nesta banda em específico e sua utilização em novos estudos de massa (SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS) em condições que venham desfazer possíveis ligações existentes nesta subunidade serão grande interesse para o entendimento da constituição desta subunidade até então não relatado em resultados de SDS-PAGE de Ec.

A indicação da última banda corada no gel ao monomero **d** é feita com base nos resultados publicados para outras Ec, tais como a hemoglobina extracelular de *Eisenia andrei* (HbEa), *Perionyx excavatus* (HbPe), HbGp, HbRa e HbLt que têm determinado a MM dessa cadeia monomérica entre 16-17 kDa. A diferença de 4 kDa observada nos resultados SDS-PAGE ocorrem devido a uma limitação de resolução pela técnica que normalmente tem a migração das subunidades que compõem a amostra alterada pela presença de determinados reagentes como o SDS e o β -mercaptoetanol (CARVALHO, F et al., 2011b; 2014; TABAK et al., 2012). Por esta razão, uma melhor caracterização das subunidades da HbAg por espectrometria de massa foi realizada e, será discutida no item a seguir.

4.3 MALDI-TOF-MS

A Figura 5 mostra os espectros de MALDI-TOF-MS da HbAg íntegra na ausência de β -mercaptoetanol em pH 7,0. Na Figura 5A, são apresentados os picos obtidos para o monômero **d**, **abc** e as cadeias **L**, sendo que a visualização destes picos de ionização e os seus valores de MM estão de acordo com o descrito na literatura para a HbGp e HbRa (CARVALHO, F et al., 2011a; 2014, OLIVEIRA, MOREIRA; TABAK, 2007, TABAK et al., 2012). O monômero **d** por ser mais facilmente ionizado gera o pico mais intenso do espectro em torno dos 16,5 KDa. A região expandida entre 25,6 a 28,5 kDa (Figura 5B) corresponde aos sinais de ionização das cadeias **L** com apenas uma protonação (L^+). A figura mostra claramente a existência de três cadeias linkers L_1^+ , L_2^+ e L_3^+ , com MM de 25,880, 26,080 e 26,853 kDa, respectivamente, para a HbAg. Próximo a 8,1 kDa foi encontrado pico de ionização associado ao monomero **d** duplamente protonado (d^{+2}) (dados não apresentados).

Entre 15,9 a 18,0 kDa (Figura 5C) foram encontrados os sinais de ionização correspondentes às isoformas do monômero monoprotinado (d^+), contribuições intensas em 16,244 kDa e 16,459 kDa foram indicadas, respectivamente, para as isoformas, d_1^+ e d_2^+ , outras duas contribuições, menos intensas, em 16,667 kDa foi sugerida ao d_3^+ e em 16,855 kDa para d_4^+ .

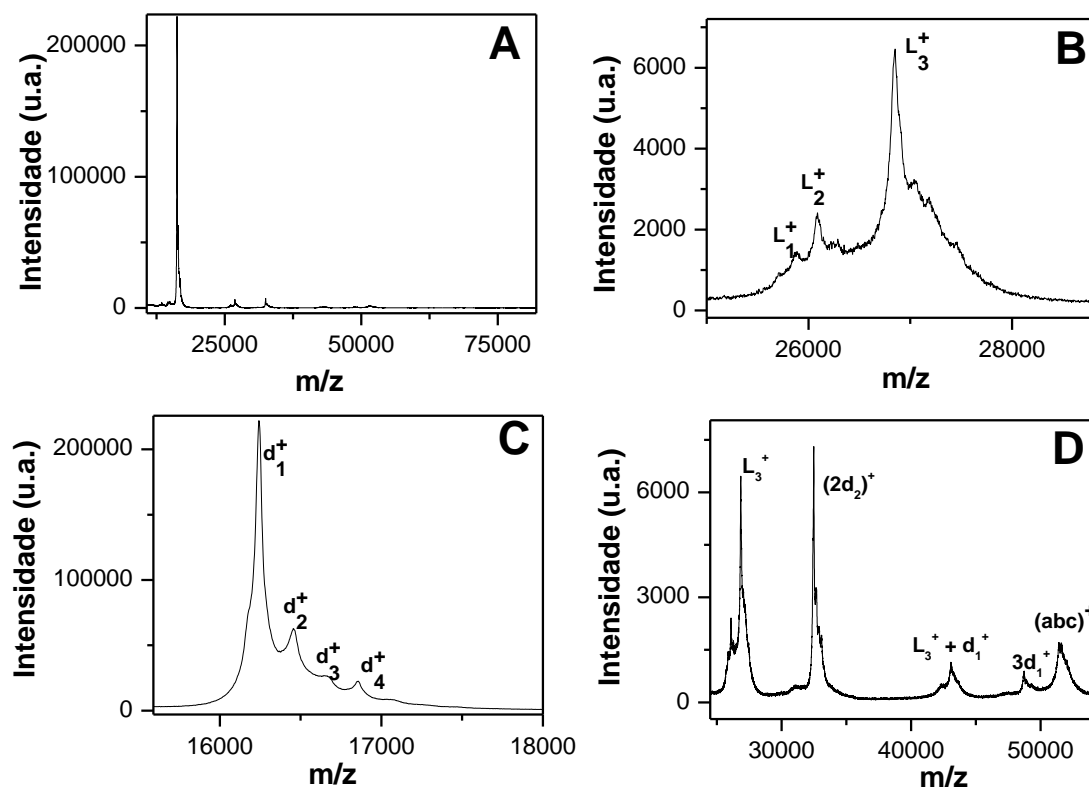
Entre 26,0 e 55,0 kDa, dois picos intensos foram vistos, um referente ao L_3^+ em 26,853 kDa e o outro próximo aos 32,680 kDa ($2d_2^+$) (Figura 5D). Dados de MALDI-TOF-MS para HbGp e HbRa indicam a presença de pico em 32 KDa (CARVALHO, F et al., 2009; 2011a, 2013, 2014; TABAK et al., 2012), o relacionando a um possível L_3^+ , ou então, a um dímero do isômero d_2^+ ($2d_2^+$), devido a uma sobreposição de sinais no espectro entre essas duas cadeias polipeptídicas. Essa hipótese se basearia no comportamento exibido pela dissociação oligomérica desta classe proteica; as cadeias **L** e **d** apresentam uma pequena diferença de volume (cerca de 5mL) na separação/purificação de subunidades da HbGp por SEC, ainda com a mesma E_c resultados SV mostraram a tendência de **d** em se oligomerizar e formar dímeros e tetrâmeros (CARVALHO, F et al., 2009, 2011ab, 2013, 2014; TABAK et al., 2012).

Entretanto, o espectro da HbAg se diferenciou ao apresentar a existência de um pico específico de ionização para cada uma dessas subunidades.

Na Figura 5D foi visualizado pico próximo aos 43 kDa o qual é normalmente encontrado em resultados de espectrometria de massa de outras Ec, tais como HbGp, HbRa (CARVALHO, F et al., 2011a; TABAK et al., 2012). Todavia, nas publicações disponíveis a cerca do tema não há uma descrição da provável identidade deste pico de ionização. Desta forma, é proposto que tal resultado seja ligado a banda em torno dos 40-43 kDa observada pelos géis SDS-PAGE da HbAg (Figuras 4A e 4B). A partir da análise dos picos de ionização presentes na Figura 5D, nota-se que o pico em 43 kDa esta entre as ionizações da cadeia **L** dos agregados de **d**. A partir dos valores de MM das subunidades da HbAg na presença e ausência de β -mercaptoetanol apresentados na Tabela 1, se chega que somando os valores de massa disponíveis para cada isoforma destas cadeias, chegasse mais perto do referido valor de MM para a associação de $L_3^+ + d_1^+$ que resulta em 43,097 kDa (Figura 5D). Como comentado na seção dos resultados de SDS-PAGE da HbAg, artigos sobre a purificação de subunidades da HbGp relatam que logo após saída da cadeia **d** ocorre a saída da fração referente aos **L** (CARVALHO, F et al., 2011a, 2013) juntamente com esta informação se tem que na Figura 5D, o pico de 43 kDa esta entre as ionizações destas duas cadeias o que sugere uma associação entre **L** e **d**. A observação deste pico de ionização continuou quando houve a adição do agente do redutor (Tabela 1), assim como também notado no gel SDS-PAGE da proteína em presença do β -mercaptoetanol (Figura 4B). O estudo das interações existentes entre as cadeias **L** e as cadeias globínicas (**a**, **b**, **c** e **d**), por meio de simulações computacionais, que usariam dados gerados pelos estudos cristalográficos de subunidades que compõem outras Ec, tais como a HbGp (BACHEGA et al., 2015) poderão ajudar na compreensão de como poderia ocorrer essa possível associação entre cadeias, e o motivo pelo qual por que esta não é desfeita em presença do agente redutor.

Em torno dos 49 kDa (Figura 5D) foi encontrado pico referente ao trímero de monômero d_1^+ , $3(d_1)^+$, isoforma da cadeia **d**, também reportado para a HbGp, HbRa e HbEa (CARVALHO, F et al., 2011a; TABAK et al., 2012).

Figura 5: Espectro de massa da HbAg na ausência de β -mercaptoetanol obtido por MALDI-TOF (A) Espectro de MALDI-TOF-MS da HbAg, em pH 7,0. (B) Região expandida de 25,0 a 29,0 kDa para L^+ , (C) Região expandida entre 15,6 até 18,0 kDa para d^+ ; (D) Região expandida para $(L_3)^+$, $(2d_2)^+$, $(3d_1)^+$ e $(abc)^+$, de 24,5 até 54,5 kDa.



Fonte: Autor

A seguir, pode-se visualizar na Tabela 1, todas as MM observadas por MALDI-TOF-MS para as subunidades da HbAg na presença e ausência de agente redutor. Os valores de massa dos isômeros representam a média dos valores obtidos dos picos mono e duplamente protonados.

Tabela 1: Massa molar (Da) das subunidades da hemoglobina de *Amyntas gracilis* (HbAg), na forma nativa, na ausência e presença de β -mercaptoethanol, obtidos do MALDI-TOF-MS.

Subunidades	HbAg ^a	HbAg ^b	HbGp ^{a*}	HbGp ^{b*}	HbRa ^{a**}	HbRa ^{b**}	HbLt ^a	HbLt ^b
d₁	16,244 ± 3	16,280 ± 8	16,370±10	16,360	16,166±20	16,166±20	15,991±4 ^{d,e,f}	15,991±4 ^{d,e,i}
d₂	16,459 ± 5	16,415 ± 16	16,415±10	16,445±20	16,377±16	16,385±16	15,988±4 ^{d,f}	15,998±4 ^{d,f}
d₃	16,667 ± 5	-	16,650±40	16,620	16,583±18	16,697±20	15,958±4 ^{d,f}	15,958±4 ^{d,f}
d₄	16,855 ± 3	-	16,850±40	16,820	-	-	-	-
d1+heme	17,068	-	-	-	16,779±17	16,912±17	-	-
b	-	16,216 ± 12	-	16,480	-	17,290±16	-	16,248±5 ^{d,e,i}
a₁	-	17,015 ± 7	-	17,330±15	-	17,133±20	-	19,386±15 ^{d,e}
a₂	-	17,061 ± 5	-	17,410	-	-	-	19,221±10 ^{e,i}
a₃	-	17,138 ± 7	-	17,546	-	-	-	19,065±4 ^g
a₄	-	17,259±8	-	17,620	-	-	-	18,901±15 ^{e,i}
c₁	-	17,446±5	-	18,245±20	-	17,506±13	-	17,290±5 ^{d,e,i}
L₁	25,880 ± 20	25,944 ± 100	25,780±30	25,870±50	26,136	25,970	27,728±15 ^{d,e}	27,728±15 ^{d,t}
L₂	26,080 ± 2	26,150 ± 50	26,750±80	26,720±80	26,367	26,440	32,251±20 ^{d,e}	32,251±20 ^{d,t}
L₃	26,853 ± 4	26,914 ± 80	32,870	32,900	32,515	-	24,919±10 ^{d,e}	24,919±10 ^{d,t}
L₄	-	-	-	-	26,570	26,710	24,710 ^d	24,710 ^d
2d₁	32,480 ± 5	-	-	-	-	-	-	-
2d₂	32,680 ± 20	-	32,870	32,900	32,515	-	-	-
2d₃	32,895± 25	-	-	-	-	-	-	-
2d₄	33,084± 25	-	-	33,870	-	-	-	-
L₃+ d₁	43,097 ± 4	43,194 ± 44	-	-	-	-	-	-
3d₁	48,752± 3	-	-	-	-	-	-	-
2c₂	-	-	-	34,700	-	-	-	-
(abc)₁	51,415 ± 20	-	51,200	-	51,470	-	52,868±50 ^{d,e,t}	-
(abc)₂	51,610± 14	51,645± 15	51,985	51,630	-	-	53,300±100 ^f	-
abcd	67,793	68,207	68,400	69,280	67,690 ^c	-	68,678 ^e	-

^aHemoglobina 3,0 mg mL⁻¹ dados de massa, em ausência de β -mercaptoethanol.

^bHemoglobina 3,0 mg mL⁻¹ dados de massa, em presença de β -mercaptoethanol.

^cTABAK et al., 2012

^dOLIVEIRA, MOREIRA; TABAK, 2007

^eOWNBY et al., 1993

^fMARTIN et al., 1996

^gLAMY et al., 1996

*MM_{HbGp} referência: CARVALHO, F et al., 2013, 2011ab, 2009

** MM_{HbRa} referência: CARVALHO, F et al., 2014

A verificação dos valores de MM das subunidades da HbAg (Tabela 1) confirmam a presença de duas isoformas para o **abc** em acordo com descrito para HbGp (CARVALHO, F et al., 2011a; OLIVEIRA, MOREIRA; TABAK, 2007;

TABAK et al., 2012) e HbLt (MARTIN et al., 1996; OWNBY et al., 1993) e, diferente do observado para a HbRa que possui apenas um único **abc**, em razão da não existência de isoformas para as cadeias globínicas **a**, **b** e **c** (CARVALHO, F et al., 2014). Em geral, as MM encontradas para as subunidades da HbAg são similares, mas não idênticas as publicadas para a HbGp e outras Ec, tais como HbLt, HbAm e HbRa (CARVALHO, F et al., 2011ab, OLIVEIRA, MOREIRA; TABAK, 2007; ROUSSELOT et al., 2006; VINOGRADOV, 2004;).

Na literatura, análises feitas com a HbLt, HbAm, HbRa e HbGp sugeriram pequenas diferenças de MM entre as subunidades das diferentes espécies testadas (BACHEGA, 2013; CARVALHO, F et al., 2014; MARTIN et al., 1996; OWNBY et al., 1993; ZAL et al., 1997). Recente estudo cristalográfico mostrou identidade de sequência mínima de 70% entre as cadeias **a**, **b** e **c** da HbGp com as da HbLt, já para **d** e **L** essa percentagem foi um pouco menor, de 59 e 64%, respectivamente (BACHEGA, 2013). Desta forma, esses estudos sinalizam uma conservação de MM e estrutura das Ec durante o processo evolucionário dessas espécies de anelídeos. A fim de se indicar a MM apresentada pela HbAg na sua forma íntegra e em pH 7,0 estudos por AUC foram realizados e são apresentados na próxima seção.

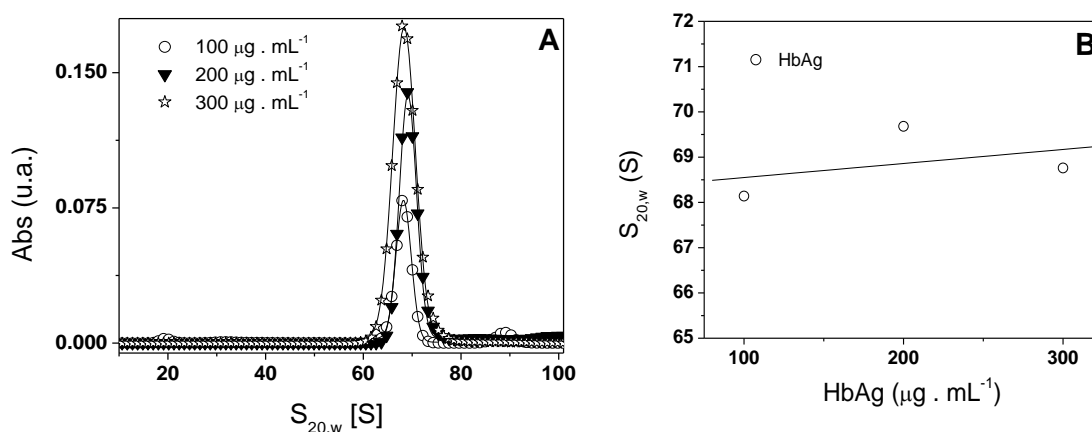
4.4 AUC

A distribuição dos coeficientes de sedimentação em Svedberg (S) a 20° C, $S_{20,w}$, para três concentrações de HbAg em pH 7,0, oriundas de estoque purificado 15 dias antes dos estudos de SV, e, os valores $S_{20,w}$ corrigidos para diluição infinita, $s_{20,w}^0$, são apresentados nas Figuras 6A e 6B, respectivamente. Para a concentração de $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de HbAg, foi observado na distribuição de $c(S)$ um pico que representa 99,45% do sistema (Figura 6A), indicando uma alta homogeneidade da HbAg em meio neutro, mesmo comportamento foi observado nas demais concentrações testadas (100 e $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Os valores de $S_{20,w}$ (Figura 6A) foram corrigidos para diluição infinita pela regressão linear dos pontos. O valor de $s_{20,w}^0$, corresponde ao $s_{20,w}$ a $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de proteína, sendo estimado em $68,2 \pm 2$ (Figura 6B) para a proteína íntegra. O valor de $s_{20,w}^0$ é relativamente maior ao reportado a HbGp com $s_{20,w}^0$

de $58,1 \pm 0,4$ S, HbAm (50 S), HbRa ($59,1 \pm 0,1$ S), HbPe, ($58,9 \pm 0,2$ S) (TABAK et al. 2012) e, HbLt, (60 S) (DANIEL et al., 2004; VINOGRADOV et al., 1986). Entretanto, este valor é próximo ao reportado para a HbEa, ($64,6 \pm 0,4$ S) (TABAK et al., 2012).

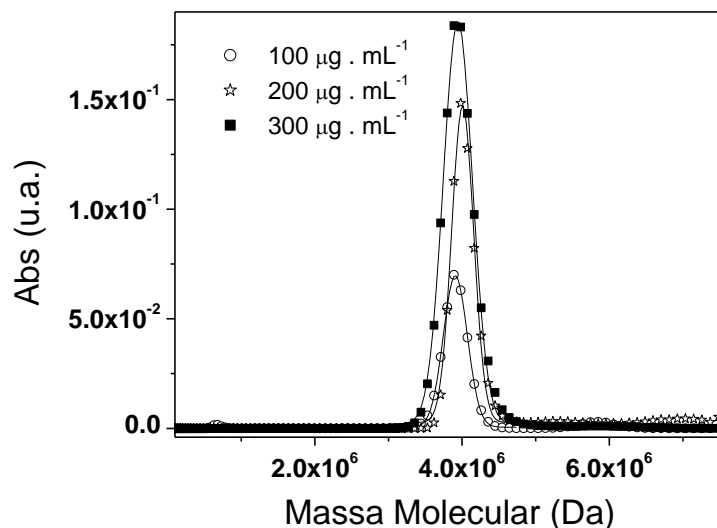
Figura 6: Dados de AUC da HbAg íntegra em pH 7,0. (A) Distribuição de sedimentação $S_{20,w}$ com os respectivos ajustes para a HbAg nas concentrações de 100, 200 e 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ preparados em 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,0) contendo 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl. O valor aparente de $S_{20,w}$ para cada concentração foi determinado no máximo dos picos de distribuição de sedimentação. (B) $S_{20,w}^0$, obtido reta regressão linear dos valores de $S_{20,w} \times$ concentração de HbAg, ajustados a diluição infinita pela linha cheia até 68,2 S.



Fonte: Autor

A Figura 7 mostra a distribuição da MM para a HbAg em três concentrações diferentes. Através do $S_{20,w}$ obtido das amostras de proteína (Figura 6A), foi observado maior MM para HbAg íntegra (Figura 7) em comparação ao relatado para HbGp (CARVALHO, F et al., 2009, 2011b). Os parâmetros hidrodinâmicos obtidos no experimento estão reunidos na Tabela 2. A razão friccional (f/f_0), a média do diâmetro hidrodinâmico (Z-average (D_h)), Raio de Stoke (R_s) dos dados descritos para HbAg são similares aos reportados para a HbGp e HbRa (CARVALHO, F et al. 2011ab, 2014). Entretanto, a MM obtida pela razão coeficiente de sedimentação/coeficiente de difusão (s/D) e o $s_{20,w}^0$ são diferentes. A razão s/D forneceu uma MM de aproximadamente 3,9 MDa para a HbAg, valor próximo ao registrado para HbEa (3,8 MDa) (Tabela 2).

Figura 7: Distribuição da MM da HbAg. A figura mostra MM ajustada para a HbAg nas concentrações de 100, 200 e 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7,0, contendo 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl. A MM para cada concentração foi determinada como o máximo dos picos de distribuição de massa.



Fonte: Autor

Tabela 2: Propriedades Hidrodinâmicas da HbAg e outras Ec.

	MM (MDa)	$S_{20,w}^0$ (S)	D_h (nm)	R_s (nm)	f/f_0	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	PDI
HbAg	3,9 ^a	$68,2 \pm 2^a$	28 ± 1^g	$12,9 \pm 1^g$	$1,28 \pm 0,02^a$	52 ^g	0,02 ^g
HbGp	3,6 ^b	$58,1 \pm 0,4^b$	27 ± 1^c	13 ± 1^c	$1,36 \pm 0,04^b$	52 ^c	0,01 ^c
HbEa	3,8 ^d	$64,6 \pm 0,4^d$	-	-	-	-	-
HbRa	3,6 ^d	$58 \pm 0,1^e$	27 ± 1^e	-	-	60 ^e	0,02 ^e
HbLt	3,6 ^f	60 ^f	-	-	-	-	-

^aValores experimentais obtidos do software SEDFIT pelo ajuste dos dados pela distribuição de c (S) ou c (M) para formas íntegras, em função da concentração de proteína; ^bCARVALHO, F et al., 2009; ^cSANTIAGO et al., 2008; ^dTABAK et al., 2012; ^eCARVALHO, J et al., 2016; ^fWEBER; VINOGRADOV, 2001; ^gDados experimentais obtidos de análises por DLS.

Na literatura, divergências sobre o valor de MM da HbLt também foram observadas. Os valores informados ficavam entre 3,4 - 4,4 MDa (DANIEL et al., 2003, 2004; DAVID; DANIEL, 1974; MARTIN et al., 1996; OWNBY et al., 1993; TSAFADIA; DANIEL, 1999; ZHU et al., 1996;), porém um consenso foi alcançado para o valor de 3,6 MDa, em função das informações trazidas com a determinação da estequiometria da Ec pelo modelo bracele $[(abcd)_3L_3]_{12}$ (MARTIN et al., 1996) e pelos resultados obtidos com Difração de Raios-X do cristal da HbLt (ROYER et al., 2000, 2006). Todavia, a obtenção valor de MM

maior a 3,6 MDa para a HbLt em estudos por espalhamento de luz em múltiplos ângulos (do inglês, *multi angle light scattering* - MALS) e AUC, anos antes do consenso sobre este MM da proteína íntegra (DANIEL et al., 2003; OWNBY et al., 1993; TSAFADIA; DANIEL, 1999; ZHU et al., 1996), trouxe o questionamento sobre obtenção dos altos valores de MM obtidos para a HbLt a tona no meio científico.

A ocorrência de auto agregação da HbLt íntegra foi primeiramente vista em estudos por microscopia eletrônica (ROCHE et al., 1960). Em experimentos por AUC durante a transição do pH para valores ácidos para o acompanhamento do perfil de dissociação da Ec, foi obtido em solução, juntamente com a proteína íntegra (60 S), uma espécie com $S_{20,w}$ em 88 S, a qual foi relacionada a uma união lado a lado de duas moléculas de HbLt (DAVID; DANIEL, 1974; ROCHE et al., 1960). A verificação da ocorrência do fenômeno em outras espécies de anelídeos ocorreu pelos estudos com Ec de *Eumenia crassa* e *Limnodrilus gotoi*. Nestes trabalhos, imagens geradas por microscopia eletrônica constataram que, grande parte das moléculas da amostra estavam em associação umas com as outras (LEVIN, 1963; YAMAGISHI et al., 1966). A Ec de *Euzonus mucronata* em estudos por cromatografia e AUC revelou que entre 10-15% das biomoléculas do sistema eram dímeros com MM entre 6-7 MDa (TERWILLIGER et al., 1977).

Em recente estudo para a determinação de agregação na HbLt, Riggs; Riggs (2014) pelo uso conjunto das técnicas de SEC e MALS, comprovaram que, de fato, a HbLt apresenta naturalmente a tendência a ser agregar (oligomerizar). A partir da análise da estrutura do cristal de HbLt foram encontradas claras evidências da possibilidade de ocorrência de interações lado a lado entre uma molécula de HbLt com outra (Ec-Ec), sendo ligações de hidrogênio e eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos da cadeia **c** e **d** das moléculas envolvidas os responsáveis pela associação. Desta forma, soluções da Ec foram preparadas tanto a partir do cristal da HbLt como também de estoque de sangue na forma líquida com diferentes tempos de armazenamento e momentos de coleta das minhocas para avaliar a presença de agregados e a MM que seria obtida das amostras em cada situação.

No cromatograma da solução originada do cristal foram encontradas moléculas com MM de 3,6 MDa, referente a uma HbLt (monômero), mas

também de moléculas com 4,29 e 7,2 MDa, sendo este último relacionado a um dímero de HbLt (3,6 MDa) (RIGGS; RIGGS, 2014). O teste com amostras feitas com o uso de estoque de HbLt líquida mostrou diferenciação do resultado para o uso de sangue de minhocas coletadas em diferentes épocas do ano.

O cromatograma gerado a partir da HbLt extraída de minhocas capturadas durante o verão não evidenciou a presença de dímeros ou qualquer outro tipo de molécula com MM maior a 3,6 MDa. Todavia, minhocas coletadas no inverno renderam amostra composta por uma mistura de monômeros e produtos da agregação da HbLt com MM média de 4,0 MDa. Uma possível explicação pensada pelos autores para a distinção observada estaria sobre a síntese de hemoglobinas nas minhocas, que ocorreria apenas no verão, ficando em seguida, as Ec formadas em circulação no corpo do animal durante os meses de inverno o que, ocasionaria a formação das moléculas de alta MM vistas nos resultados (RIGGS; RIGGS, 2014).

Esta última parte foi proposta com base na dependência com a concentração e tempo de armazenamento do estoque de Ec utilizado nas análises (RIGGS; RIGGS, 2014). Amostras com $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de HbLt com estocagem igual ou maior a 48 dias formaram partículas com MM superior 4,4 MDa, enquanto o uso de proteína na mesma condição, porém com estocagem igual ou menor a 1 hora formaram moléculas com no máximo 3,7 MDa. O efeito do armazenamento do estoque ficou mais evidente com uso de HbLt estocada por mais de 5 anos, nesse caso além, da presença do monômero de 3,6 MDa, também faziam parte da solução agregados com MM média entre 7,2-11 MDa, sendo que o aumento na concentração das amostras apenas fortaleceu o processo associativo (RIGGS; RIGGS, 2014).

A partir dos dados expostos, acredita-se que a oligomerização também possa ocorrer na HbAg, uma vez que dados de MALDI-TOF-MS, AUC e SAXS (BACHEGA, 2013; CARVALHO, F et al., 2011ab, 2015; CARVALHO, J et al., 2013ab; TABAK et al., 2012) mostram uma tendência de conservação não só da MM entre subunidades, mas também da conformação da estrutura oligomérica entre as diferentes proteínas da classe, outra possibilidade é o tempo de estocagem da proteína.

Assim, o alto valor de MM obtida para a HbAg quando comparada com a HbGp poderia estar associado a dois motivos: a) uma diferenciação na

estequiometria das subunidades que compõe a estrutura oligomérica da HbAg; b) Formação de agregados de HbAg em razão do tempo de estocagem das amostras utilizadas neste estudo. Assim, o valor de 68,2 S cuja MM estimada pela razão s/D é de 3,95 MDa, possivelmente, seja de um agregado formado por mistura de monômeros, dímeros e outros produtos da agregação e não a uma única molécula de HbAg.

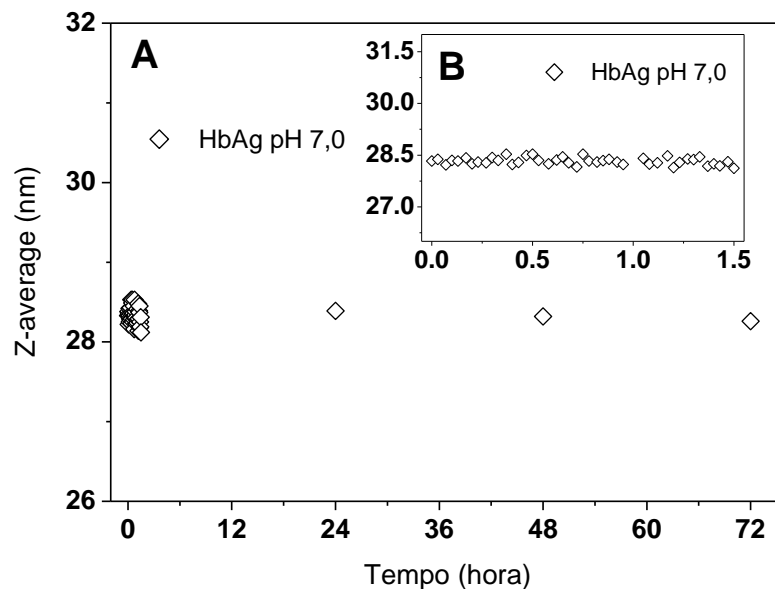
Desta forma, estudos posteriores de montagem e análise de transcriptoma e de cristalografia da HbAg podem contribuir para compreensão da estequiometria das subunidades presentes na HbAg. Adicionalmente, novas medidas de SV utilizando amostras com diferentes tempos de estocagem poderão ajudar na compreensão deste fenômeno. Nos dados de DLS que serão apresentados a seguir fica evidente que a HbAg apresenta tendência a auto agregação quando comparada com a HbGp.

4.5 DLS

4.5.1 Efeito do pH na estabilidade oligomérica da HbAg

Nas Figuras 8A e 8B é apresentado o valor do diâmetro médio hidrodinâmico, *Z-average*, (D_h), da HbAg 0,5 mg · mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol · L⁻¹ em pH 7,0, a 25°C, ao longo do tempo. Em pH 7,0, quando a proteína está na sua forma nativa, foi observado o valor de D_h de 28,2 ± 0,2 nm. O valor de D_h não se alterou ao longo de 72 horas, evidenciando a estabilidade oligomérica da HbAg nestas condições. O índice de polidispersão (PDI) encontrado está na faixa 0,02 - 0,03. Resultados similares foram descritos para HbGp e HbRa, que em mesmas condições, possuem D_h em torno de 27 ± 1 nm (CARVALHO, J et al., 2013ab, 2014, 2016; SANTIAGO et al., 2008, 2010ab).

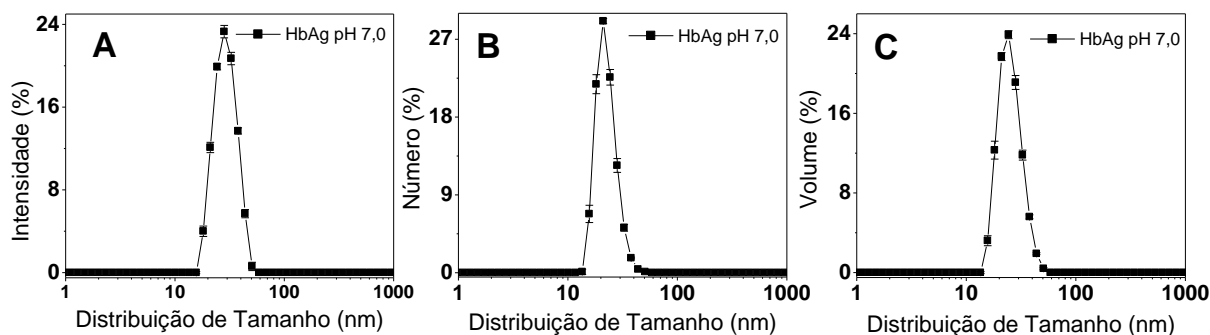
Figura 8: Variação da média do Diâmetro hidrodinâmico (D_h), *Z-average*, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para $[HbAg] = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0 a 25°C . (A) Medidas de DLS feitas em um intervalo de até 72 horas. (B) Início da cinética para o intervalo de 1,5 horas. Durante todo o período considerado a partícula manteve D_h de $28 \pm 0,2 \text{ nm}$.



Fonte: Autor

As distribuições de tamanho da partícula em função da intensidade de espalhamento, número e volume de partículas espalhadoras da HbAg pH 7,0, 25°C , são apresentadas na Figura 9. A análise da distribuição de tamanho em função da intensidade de espalhamento (Figura 9A) apresenta um único pico, fino e estreito, centrado em 28,2 nm. Nas Figuras 9B e 9C, a distribuição de tamanho da partícula em função do número e volume de partículas espalhadoras confirmam a existência de uma única população responsável pelo espalhamento de luz. Estes resultados corroboram com os apresentados para *Ec* ortológicas a HbAg (CARVALHO, J et al., 2013ab, 2016; SANTIAGO et al., 2008).

Figura 9: Distribuição de tamanho obtido de dados de DLS da $[HbAg] = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, 25°C ; (A) Distribuição do tamanho da partícula por intensidade de espalhamento; (B) Distribuição em função do número de partículas espalhadoras; (C) Distribuição em função do volume das partículas espalhadoras. O valor do diâmetro hidrodinâmico (D_h) foi caracterizado no máximo da gaussiana. Os valores apresentados correspondem a uma média de 3 medidas independentes \pm desvio padrão (SD).

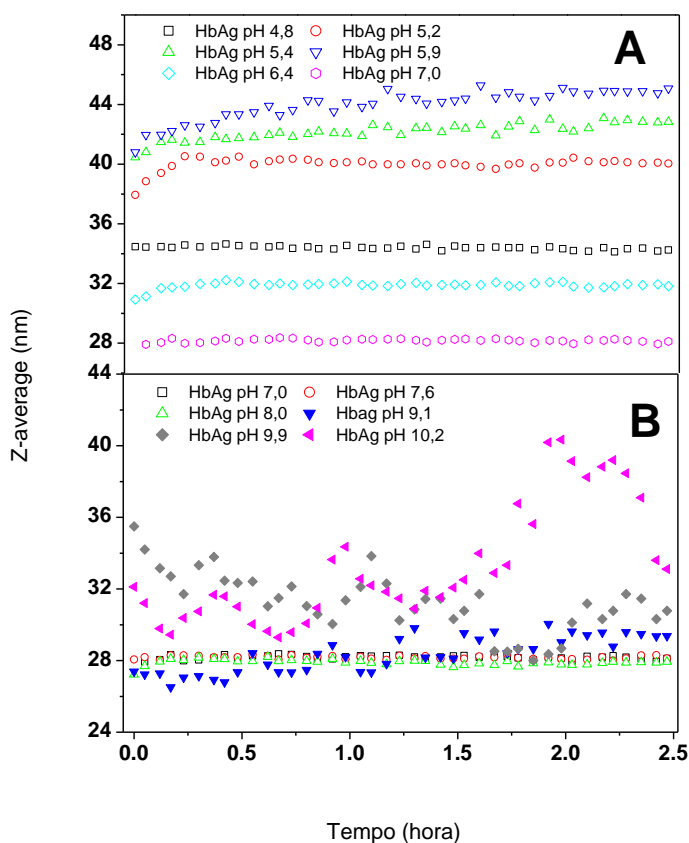


Fonte: Autor

O diâmetro hidrodinâmico (D_h), a 25°C , da HbAg $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, foi monitorado na faixa de pH 4,8 a 10,2 (Figura 10). Na Figura 10A, em meio ácido (pH 4,8 – 6,4) os valores de D_h observados para HbAg são relativamente maiores ao registrado em pH 7,0 (28 nm). No pH 4,8 foi registrado D_h de 34,3 nm, enquanto que em pH 5,9 o valor de D_h observado foi de 45,2 nm. Na faixa de pH 7,0 e 8,2 o valor de D_h observado ficou em torno de 28,2 nm. Estes resultados sugerem que na faixa de pH ácido a proteína se encontra agregada, já na faixa de pH 7,0 e 8,2 a proteína se encontra na sua forma monomérica. Tal comportamento poderia ser relacionado com o pI ácido desta classe de proteica (VINOGRADOV et al., 1986; WEBER; VINOGRADOV, 2001). As proteínas quando estão em valores de pH próximo ao pI apresentam carga superficial nula, o que favorece a agregação (NELSON; COX, 2002). Porém vale dizer que, a HbGp, uma proteína ortóloga a HbAg, apresenta D_h em torno de 27 nm em valores de pH próximo ao seu pI a 25°C , (SANTIAGO et al., 2010b). Estes resultados podem sugerir que a HbAg apresenta uma menor estabilidade quando comparada com a HbGp.

A alcalinização do meio (pH $\geq 8,5$) revelou alterações no tamanho da HbAg e a partir do pH 9,1 foi observada agregação, expressa pelo aumento no valor de D_h . No pH 10,2, a biomolécula apresentou tamanho médio de 32 nm (Figura 10B). Os valores de D_h e PDI exibidos pela HbAg em função do pH estão reunidos na Tabela 3.

Figura 10: Diâmetro médio hidrodinâmico (D_h), Z-average, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para $[HbAg] = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em diferentes valores de pH, em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, a 25°C . (A) Análises em meio ácido ao neutro, mostrando a cinética na faixa de pH 4,8 ao 7,0 (B) Análises em meio neutro ao alcalino, mostrando a cinética na faixa de pH 7,0 a 10,2.



Fonte: Autor

Estudos com a HbGp e a HbRa mostram que o D_h ($27 \pm 1 \text{ nm}$), a 25°C , na faixa de pH 5,0 a 8,5, não se altera por um período de até 24 horas (CARVALHO, J et al., 2016; SANTIAGO et al., 2010b). Acima do pH 9,0 para a HbGp ocorre a redução do D_h de 27 para $10 \pm 1 \text{ nm}$, em virtude da dissociação oligomérica da proteína íntegra em espécies de menores tamanho em solução (CARVALHO, F et al., 2013, 2014, 2015; CARVALHO, J et al., 2013ab, 2014, 2016; SANTIAGO et al., 2008, 2010ab). A formação de agregados, concomitante, ao processo de dissociação da HbGp e HbRa foi verificada em estudos da estabilidade térmica das proteínas em meio alcalino (CARVALHO, J et al., 2012, 2016). Acima do pH 8,0, o tamanho dos agregados formados a 70°C para HbRa eram consideravelmente menores em relação aos observados em pH 7,0 e 25°C (CARVALHO, J et al., 2016). O motivo deste comportamento pode está associado a uma alta taxa de dissociação sobre a

estrutura da Hb que agiu inibindo a geração de agregados de maior tamanho em solução.

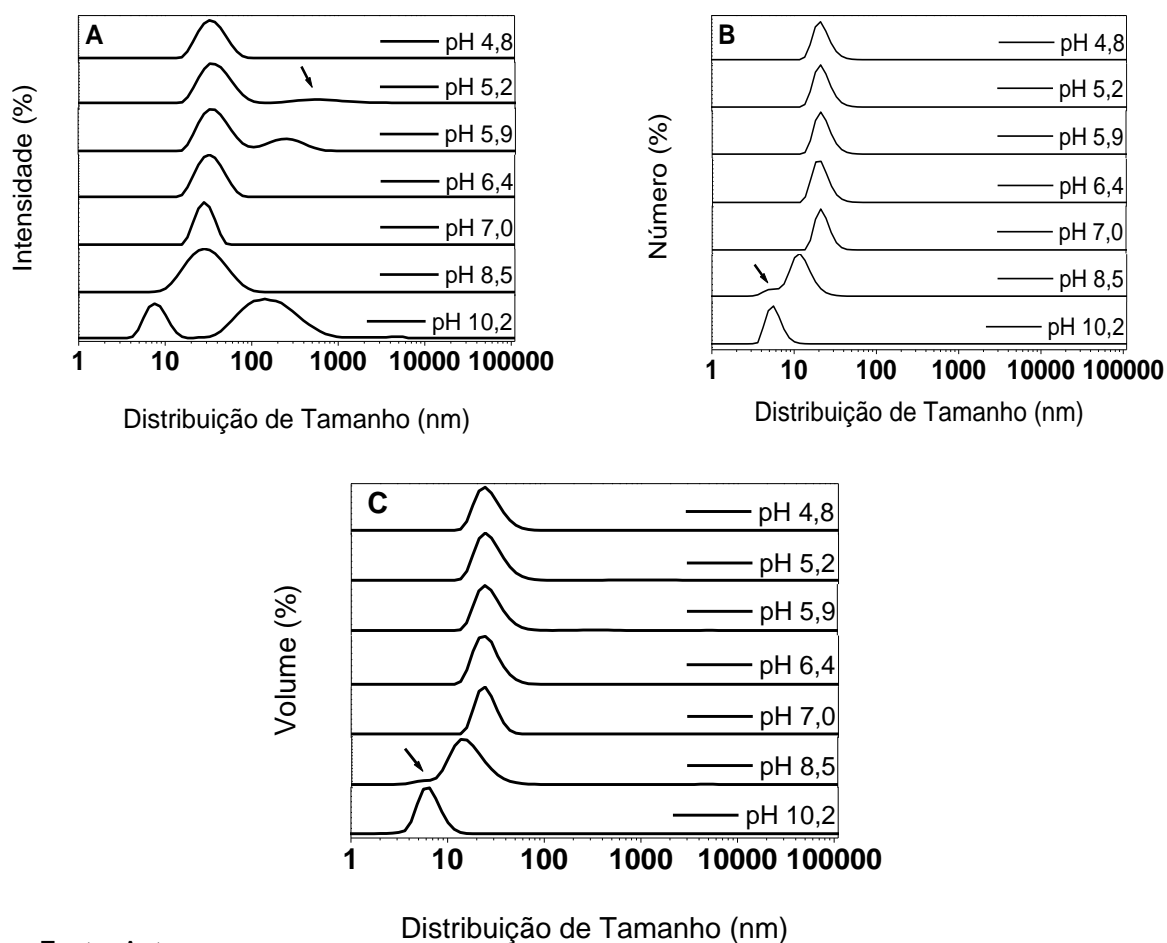
Tabela 3: Diâmetro médio hidrodinâmico, *Z-average*, (D_h), em nanômetros (nm) \pm desvio padrão (SD) e índice de polidispersão (PDI), considerando-se três medidas independentes, observados para HbAg 0,5 mg \cdot mL⁻¹ em função do valor de pH, a 25° C.

pH	D_h^*	PDI
4,8	34,3 \pm 0,2	0,175 \pm 0,008
5,2	40,0 \pm 0,4	0,246 \pm 0,006
5,4	42,1 \pm 0,6	0,281 \pm 0,019
5,7	44,3 \pm 0,8	0,326 \pm 0,024
5,9	45,2 \pm 1,0	0,338 \pm 0,031
6,4	31,8 \pm 0,2	0,125 \pm 0,010
7,0	28,1 \pm 0,2	0,021 \pm 0,009
7,6	28,1 \pm 0,1	0,028 \pm 0,009
8,2	27,0 \pm 0,2	0,043 \pm 0,010
8,5	27,0 \pm 0,2	0,211 \pm 0,024
9,1	30,0 \pm 1,7	0,972 \pm 0,049
9,5	29,8 \pm 1,2	0,968 \pm 0,043
9,9	30,8 \pm 1,9	1,000
10,2	32,0 \pm 2,0	1,000

*O valor indicado em nanômetros (nm) foi caracterizado no máximo da gaussiana.

As distribuições de tamanho por intensidade de espalhamento, número e volume de partículas espalhadoras da HbAg 0,5 mg \cdot mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato em pH ácido e alcalino são apresentados na Figura 10. Ao longo da faixa de pH estudado, a análise por intensidade de espalhamento mostrou diferentes perfis de distribuição de tamanho. Em pH 7,0, a HbAg é composta por uma única população com D_h de 28,2 nm, porém a acidificação do meio provoca um alargamento da distribuição de tamanho e surgimento de outras populações (Figura 11A). No pH 4,8 ocorreu o descolamento e alargamento da distribuição, e a intensidade de espalhamento de luz observada no sistema passou a ser ocasionada exclusivamente pela população de D_h centrada em 32,6 nm. Já no pH 5,2 aparece uma segunda população que inicialmente começou a se formar em 531,2 nm, contribuindo com 6,2 % das espécies em equilíbrio (Figura 11A e Tabela 4).

Figura 11: Gráficos de distribuição de tamanho (nm) obtidos de dados de DLS da HbAg, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. (A) Distribuição de tamanho obtida a partir da intensidade de espalhamento de luz das partículas em solução. A seta em 531,2 nm indica o início do aparecimento do agregado em solução. (B) Distribuição de tamanho obtida a partir do número de partículas espalhadoras de luz. A seta em 5,6 nm indica o início da formação de população de menor tamanho. (C) Distribuição de tamanho obtida a partir do volume das partículas espalhadoras de luz. A seta em 6,5 nm indica o início da formação de população de menor tamanho. Os valores de diâmetro hidrodinâmico (D_h) foram caracterizados no máximo dos respectivos picos de espalhamento de luz.



Fonte: Autor

A medida, em que houve o aumento do pH do meio foi observado um deslocamento do D_h da segunda população acompanhado do aumento da sua representatividade no sistema. No pH 5,9 os valores de tamanho e de contribuição da espécie no equilíbrio foram, respectivamente, 32,6 nm com 77,6% e 255 nm com 22,4% (Figura 11A). No pH 6,4, a distribuição volta a ser formada por uma única população de 32,6 nm, já em pH 7,0 o valor de D_h

observado para a única população presente na solução foi de 28,2 nm, tal resultado foi mantido até o pH 8,2 (Figura 11A e Tabela 4). O D_h e a contribuição da espécie no equilíbrio obtidos nos diferentes valores de pH foram listados na Tabela 4.

Tabela 4: Tamanho (nm) e representatividade de espalhamento no sistema (%) de populações obtidas por DLS para a $[HbAg] = 0,5$ e $3,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em função de diferentes valores de pH, a 25° C obtidos por DLS. Os valores indicados \pm desvio padrão (SD) foram divididos por tipo de análise: intensidade de espalhamento, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando-se três medidas independentes.

pH	Análise					
	Intensidade		Número		Volume	
	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)
4,8	32,6 \pm 2,5	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100
5,2	32,6 \pm 2,5	91,1	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	98,5 [*]
	531,2 \pm 41,9	6,2 [*]				1,5 [*]
5,4	32,6 \pm 2,5	89,6	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	98,7 [*]
	342 \pm 23,3	11,4				2,3 [*]
5,7	32,4 \pm 2,5	77,6	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	99 [*]
	255 \pm 20,0	22,4				1,0 [*]
5,9	32,6 \pm 2,5	93,1	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	95,2 [*]
	255 \pm 20,0	3,8 [*]				4,8 [*]
		3,1 [*]				
6,4	32,6 \pm 2,5	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100
7,0	28,2 \pm 0,6	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100
7,6	28,2 \pm 2,2	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100
8,2	28,2 \pm 2,2	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100
8,5	28,2 \pm 2,2	100	11,7 \pm 0,8	100	13,5 \pm 1,0	100
9,1	7,5 \pm 0,60	42,4	5,6 \pm 0,4	100	6,5 \pm 0,4	99,6 [*]
	141,8 \pm 11,2	55,5				0,4 [*]
9,5	7,5 \pm 0,60	26	5,6 \pm 0,4	100	6,5 \pm 0,4	99,6 [*]
	141,8 \pm 11,2	74				0,4 [*]
9,9	7,5 \pm 0,60	27,2	5,6 \pm 0,4	100	6,5 \pm 0,4	99,4 [*]
	141,8 \pm 11,2	72,8				0,6 [*]
10,2	7,5 \pm 0,60	23,3	5,6 \pm 0,4	100	6,5 \pm 0,4	99,5 [*]
	141,8 \pm 11,2	76,7				0,6 [*]
7,0 ^{**}	28,2 \pm 0,6	100	21,0 \pm 1,4	100	24,3 \pm 1,6	100

% Porcentagem das espécies presentes em equilíbrio

*Porcentagem referente à contribuição de agregados com tamanho médio superior a 300 nm e/ou partículas maiores que 4000 nm nomeadas *dust*.

**Valores referentes à HbAg $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$

No pH 8,5, o maior alargamento da base do pico da distribuição indicou a presença de moléculas de menor tamanho no sistema. Estudos realizados com a HbGp por DLS descrevem que uma maior base dos picos da distribuição ocorre em razão da formação de espécies de menor tamanho, oriundas da dissociação oligomérica da proteína (CARVALHO, J et al., 2014, 2016; CARVALHO, F et al., 2013, 2014; SANTIAGO et al., 2008). A partir do pH 9,1 (dados não mostrados), duas populações com D_h em 7,5 e 141,8 nm passam a compor o sistema. Em pH 10,2 mais de 70% das espécies em equilíbrio correspondem a população de 141,8 nm (Figura 11 A e Tabela 4).

Os dados da distribuição por número e volume das partículas espalhadoras são apresentados nas Figuras 11B e 11C. A análise destes gráficos indicou diferentemente da distribuição por intensidade de espalhamento, que o sistema é formado por uma única partícula em solução. Apesar de indicada a presença de uma segunda população pela distribuição por intensidade de espalhamento, a quantidade e o volume desta segunda população provavelmente deveriam ser pequenos. De modo que, na análise multiexponencial pela distribuição de tamanho em função do número e volume da partícula apareceu a contribuição de uma única espécie.

Entre o pH 4,8 - 8,2, as distribuições por número e volume da partícula foram compostas, respectivamente, por uma única população de valores de D_h entre 21 e 24,3 nm. Entretanto, no pH 8,5 foi notado um comportamento diferente, a espécie com D_h que se mantinha estável entre 21 e 24,3 nm aparece com D_h entre 11,7 e 13,5 nm (indicados por setas nas Figuras 10B e 10C). Acima do pH 8,5 o D_h reduz ainda mais, se estabilizando em 5,6 e 6,5 nm para análise por número e volume, respectivamente (Figuras 11B, 11C e Tabela 4).

Assim, esta análise permitiu observar que a HbAg desnatura-se e/ou agrega-se em valores de pH alcalino ($\text{pH} \geq 8,5$), porém o processo de dissociação ocorre simultaneamente. A redução da estabilidade acompanhada da indução à dissociação oligomérica em função da alcalinidade do meio é também descrita para a HbGp e HbRa (CARVALHO, J et al., 2012, 2016; CARVALHO, F et al., 2013, 2014; SANTIAGO et al., 2008). Nestes estudos foi observado que em valores de pH acima de pH 9,1, a HbGp

reduz a sua estabilidade térmica e ocorre a formação de espécies de D_h em 10 ± 1 nm a 25° C (CARVALHO, J et al., 2012, 2013ab; SANTIAGO et al., 2008, 2010a).

Em relação à presença de agregados na faixa de pH ácido (4,8 – 6,4), evidenciado nas distribuições por intensidade de espalhamento da HbAg (Figura 11A), resultados similares foram observados para proteínas ortológicas. O acompanhamento da estabilidade térmica da HbGp por absorção ótica na faixa de pH ácido (5,0-6,0) confirmou que acima dos 58° C ocorre a formação de agregados no sistema (CARVALHO, J et al., 2013a). Resultado parecido foi obtido por DLS para meta-HbGp, forma oxidada da Hb, em pH 5,0, dados de *melting point* mostraram, logo no início do ciclo de aquecimento ($T < 30^\circ$ C), o surgimento de agregação, seguido da precipitação de grandes partículas a partir dos 60° C (CARVALHO, J et al., 2012). Comportamento similar também foi descrito para HbRa, em pH 5,0 e 6,0, acima de 60 e 62° C, respectivamente, onde partículas de altos valores de D_h foram registradas (CARVALHO, F et al., 2014; CARVALHO, J et al., 2016).

A formação de agregados em solução para a HbGp e HbRa também foi constatada em estudos do efeito da interação Ec \times surfactantes iônicos (SDS e CTAC) sobre a estabilidade térmica da proteína. Nestes trabalhos, a origem destas grandes partículas foi justificada como sendo um efeito intrínseco da desnaturação térmica sofrida por estas Ec em temperaturas superiores aos seus respectivas temperaturas de desnaturação, do inglês *melting point* (T_m). Esta explicação é pautada no comportamento das Ec na ausência destes agentes caotrópicos nesta situação a biomolécula apresentou agregação concomitantemente a desnaturação (CARVALHO, J et al., 2013b, 2014).

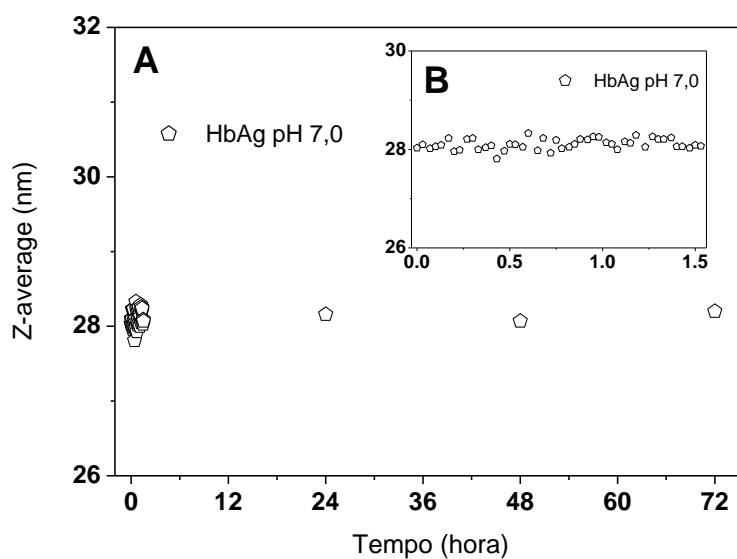
Quanto ao surgimento de agregados na faixa de pH ácido para a HbAg, uma possível explicação seria o efeito do pI desta proteína, uma vez que as Ec são descritas como um grupo de macromoléculas que apresentam pI ácido (LAMY et al., 1996). Moléculas na região de influência do pI tendem a ser menos estáveis e suscetíveis à agregação, em virtude da perturbação do equilíbrio do potencial elétrico responsável pela manutenção da estrutura oligomérica. Neste tipo de situação, as dinâmicas de atração e repulsão da proteína se invertem e, áreas que antes eram distantes umas das outras se tornam mais próximas, sendo o inverso válido também (VOET; VOET, 2006).

Assim, é sugerido que a instabilidade da HbAg em meio ácido seja ocasionada pela proximidade ao pI, provavelmente localizado entre os pH 5,0-6,0. A partir dos dados apresentados a 25° C, estudos variando a temperatura do meio e concentração de HbAg foram realizados para melhor compreender o comportamento da proteína em pH 7,0 e, estes resultados são discutidos no item a seguir.

4.5.2 Efeito da concentração e temperatura na estabilidade oligomérica da HbAg no pH 7,0.

O efeito da concentração sobre as propriedades hidrodinâmicas para a HbAg 3,0 mg · mL⁻¹ em pH 7,0, a 25° C é apresentado nas Figuras 12 e 13. As Figuras 11A e 11B indicam que o D_h se manteve essencialmente similar ao observado para a concentração de 0,5 mg · mL⁻¹, em 25° C, com D_h de, 28,2 ± 0,2 nm e PDI de 0,03.

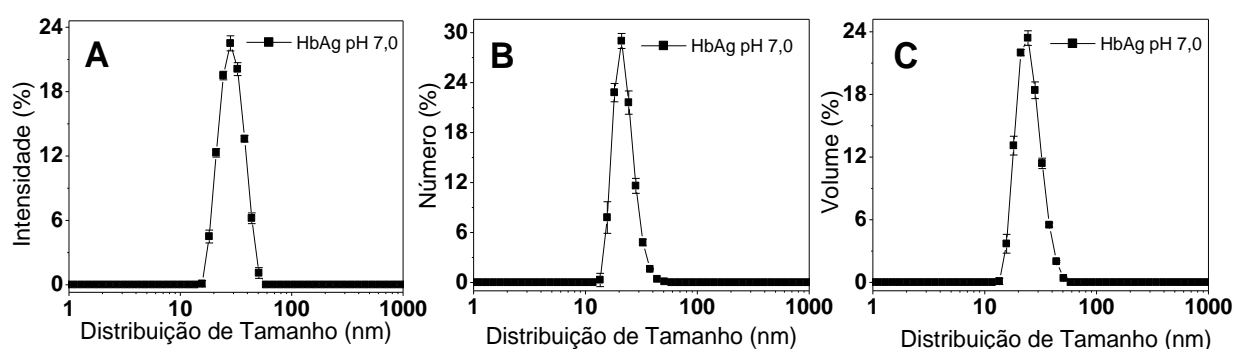
Figura 12: Variação da média do Diâmetro hidrodinâmico (D_h), Z-average, em nanômetros (nm), obtidas por DLS em função do tempo para [HbAg] = 3,0 mg · mL⁻¹ em tampão acetato-fosfato-borato, 30 mmol · L⁻¹, pH 7,0 a 25° C. (A) Medidas de DLS feitas em um intervalo de até 72 horas. (B) Início da cinética para o intervalo de 0 - 1,5 horas. Durante todo o período considerado a partícula manteve D_h de 28 ± 0,2 nm.



Fonte: Autor

A análise dos gráficos de distribuição de tamanho em função da intensidade, número e volume de partícula espalhadora confirmam a presença de uma única população em solução, similar ao observado para menor concentração de HbAg ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Assim, a monodispersão do sistema é comprovada pela presença de um único pico fino e estreito nos gráficos de distribuição (Figura 13). O valor D_h da HbAg $3,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi descrito na Tabela 4. Os resultados expostos estão de acordo com o relatado para HbGp que em pH 7,0, mantém os mesmo valor de D_h , PDI e composição do sistema entre $0,5 - 3,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (CARVALHO, F et al., 2012, 2013b, 2014).

Figura 13: Distribuição de tamanho obtido de dados de DLS da $[\text{HbAg}] = 3,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0. (A) Distribuição de tamanho obtida a partir da intensidade de espalhamento das partículas em solução. (B) Distribuição de tamanho obtida a partir do número de partículas espalhadoras de luz. (C) Distribuição de tamanho obtida a partir do volume das partículas espalhadoras de luz. O valor do diâmetro hidrodinâmico (D_h) foi caracterizado no máximo da gaussiana. Os valores apresentados correspondem a uma média de 3 medidas independentes \pm desvio padrão (SD).



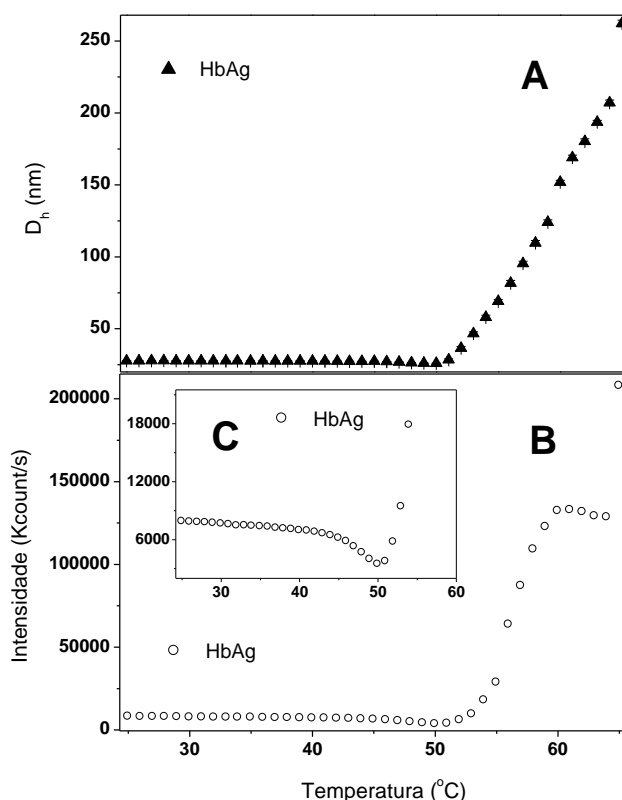
Fonte: Autor

O estudo da estabilidade térmica da HbAg, no pH 7,0, foi realizado utilizando a técnica de DLS. Na figura 14, são apresentados os resultados de T_m e contagem da luz espalhada da HbAg na faixa de temperatura entre $25-65^\circ \text{C}$. O gráfico de $D_h \times$ temperatura (Figura 14A) mostra que a HbAg permaneceu estável até 51°C , apresentando um valor de D_h em $28 \pm 1 \text{ nm}$. Porém, em 52°C um significativo aumento no D_h foi registrado, devido a desnaturação acompanhada de agregação proteica. Estudos com proteínas ortológicas a HbAg, mostram que após atingido o T_m , ocorre o aumento da taxa de

agregação comprovada pelo crescimento do D_h da partícula em solução (SANTIAGO et al., 2010b).

Acima dos 52°C , partículas com maior D_h foram observadas em suspensão e, o PDI a 65°C , foi de 0,3, valor este 10 vezes maior comparado ao registrado a 25°C . A explicação para esse aumento decorre do elevado número de partículas com diferentes tamanhos dispersando a luz incidente na solução. O que dificulta a determinação de um valor exato de D_h existente na amostra (BERNE; PECORA, 2000).

Figura 14: Efeitos da temperatura sobre as propriedades hidrodinâmicas da HbAg íntegra $0,5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato, $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7,0. (A) Diâmetro Hidrodinâmico (D_h) da HbAg na faixa de temperatura ($25\text{-}65^\circ\text{C}$). (B) Contagem da luz espalhada pela HbAg (Kcounts/s) para faixa de temperatura entre $25\text{-}65^\circ\text{C}$. (C) Área expandida da contagem (Kcounts/s) exibida pela HbAg entre a faixa de $25\text{-}60^\circ\text{C}$.



Fonte: Autor

Os dados de contagem da luz espalhada em pH 7,0 (Figura 14B) confirmam a estabilidade oligomérica da HbAg indicada nos dados de D_h (Figura 14A). Entretanto, a diminuição da intensidade de espalhamento (Kcount/s) a partir de 35°C revela a ocorrência de uma leve dissociação da

estrutura oligomérica da HbAg antes da sua desnaturação em 52° C (Figura 14C). Em $T = 50^{\circ} \text{C}$ foi registrado valor mínimo (151,4 Kcount/s) para a intensidade de espalhamento, por outro lado, acima desta temperatura, houve o aumento da contagem, em razão do início do processo da desnaturação proteica, concomitante ao de agregação.

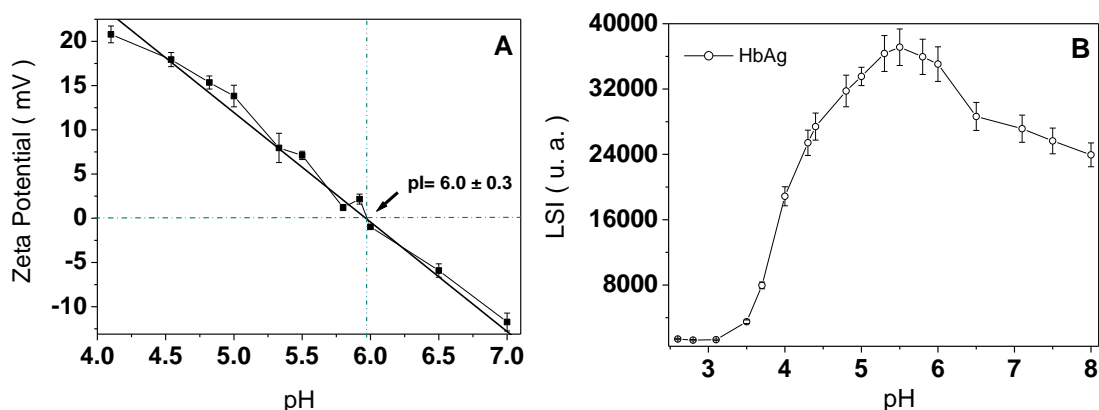
Os resultados sugerem que a HbAg dissocia parcialmente antes de desnaturar, comportamento similar é descrito para outras proteínas da classe. Estudos da interação HbGp-CTAC em pH 7,0 verificaram que na ausência do surfactante catiônico uma leve dissociação foi visualizada, entre 30-48° C, pela redução dos valores de contagem. Com a adição de 0,05 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ CTAC o fenômeno continuou a ser visto entre 30-44° C, porém com uma diminuição mais pronunciada dos valores de Kcount/s devido a menor estabilidade exibida pela HbGp em presença do CTAC (CARVALHO, J et al., 2014). O T_m da HbAg em meio neutro é similar ao observado para a HbGp (52° C) e, é menor ao descrito para HbRa (56° C) (CARVALHO, F et al., 2014; CARVALHO, J et al., 2016; SANTIAGO et al., 2008).

4.6 Estimativa do pI da HbAg por potencial-zeta e LSI

Em virtude da influência do pI sobre o comportamento apresentado pela HbAg nos dados de DLS e, dos efeitos observados na interação de outras Ec com surfactantes iônicos, foi realizada a estimativa do pI da HbAg por potencial-zeta e LSI. Na Figura 15A é apresentado um gráfico de potencial (mV) \times pH onde é possível visualizar a redução de carga superficial da HbAg de 20 mV em pH 4,1 para -12 mV no pH 7,0. Assim, é possível observar que em meio ácido há a predominância de carga residual positiva na superfície da proteína, o que corrobora com resultados obtidos para outras Ec, tais como HbLt, HbGp e HbRa (CARVALHO, F et al. 2014; CARVALHO, J et al., 2013b, 2014, 2016; LAMY et al., 1996; SANTIAGO et al., 2007). Por volta do pH 6,0, o potencial-Zeta está próximo a zero. A regressão linear dos pontos do potencial-Zeta \times pH, estimou o pI da HbAg em $6,0 \pm 0,3$ (Figura 15A).

A intensidade de espalhamento de luz, do inglês *Light Scattering Intensity* (LSI) exibido pela HbAg em diferentes valores de pH (Figura 15B) indicou que no pH 5,5 se tem o máximo valor de LSI para HbAg. O máximo LSI foi observado próximo ao valor de pI (~ 6,0) indicado por potencial-Zeta. Mesmo comportamento foi relatado para HbGp, proteína ortóloga a HbAg, que também apresentou um largo pico de LSI com máximo no pH 5,8 e obteve pI em $5,5 \pm 0,6$ por potencial-Zeta (SANTIAGO et al., 2010b).

Figura 15: Dados para estimação de pI da HbAg íntegra. (A) Potencial-zeta da HbAg íntegra, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ em função do pH. Os símbolos correspondem aos dados experimentais. Os pontos correspondem a média de 15 medidas para cada pH. A linha contínua representa o ajuste linear. (B) Intensidade de Espalhamento de luz (LSI) da HbAg íntegra medido em fluorímetro em diferentes valores de pH. $[\text{HbAg}] = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 2,6-8,0. Todas as medidas foram feitas a 25°C . O ponto máximo de espalhamento foi considerado para estimar o pI por LSI. Os pontos correspondem à média dos valores \pm o desvio padrão (SD).



Fonte: Autor

A estimativa de um pI ácido para a HbAg está em concordância ao descrito ao grupo das Ec (LAMY et al., 1996). Vale mencionar que o alto valor de LSI observado na região próxima ao pI da proteína está relacionada com o fato da carga da superfície da proteína ser nula, o que favorece o processo de agregação da proteína (VOET; VOET, 2006).

Estudos do efeito de surfactantes iônicos sobre a estabilidade oligomérica de Ec indicam a influência do potencial de carga superficial da proteína na interação Ec-surfactante. Em pH 5,0 a HbGp exibiu uma forte interação com o SDS, a adição de $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS levou a redução em 2°C o T_m da HbGp, e o aumento da concentração do agente caotrópico para 0,1

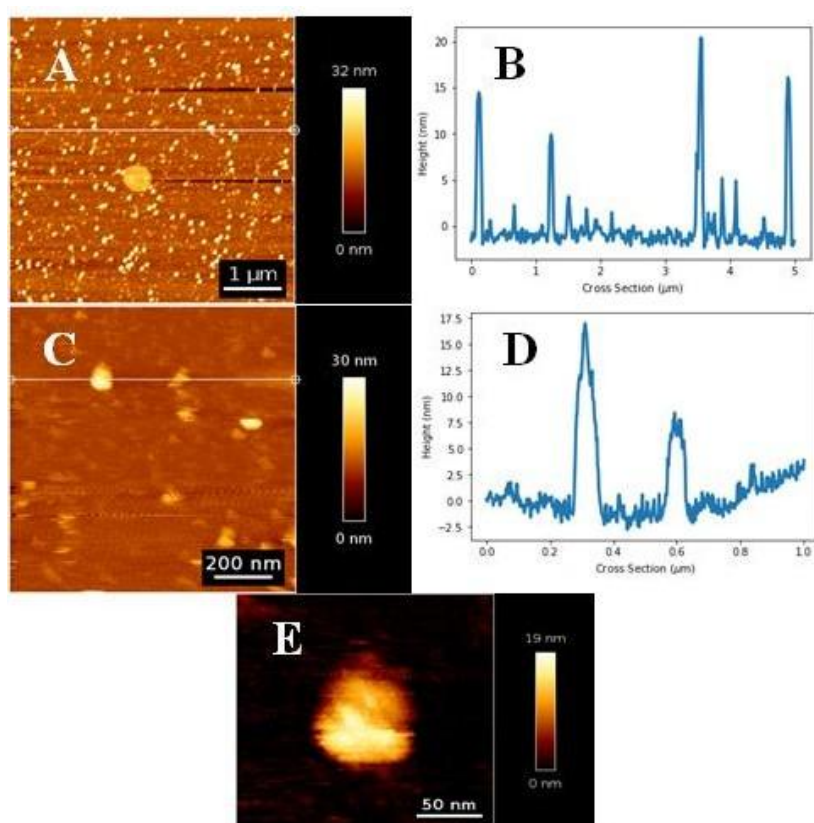
$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ culminou na formação de grandes agregados a 25°C e na queda do T_m de 55 para 47°C . Entretanto, em $\text{pH } 7,0$ essa interação foi mais fraca, sendo necessário $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS para reduzir o T_m da HbGp de 52 para 50°C (CARVALHO, J et al., 2013b; SANTIAGO et al., 2007). A exposição ao CTAC, por outro lado, teve um comportamento oposto e mais intenso que o visto com o SDS. Em pH neutro, o uso de baixa concentração de CTAC ($0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) rebaixou em 11°C o início da desnaturação da HbGp, além de promover a formação de grandes agregados em temperatura ambiente. A ação do CTAC, porém foi menos vigorosa em pH ácido, o registro da diminuição em 11°C no T_m da HbGp apenas foi constatado a $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAC (CARVALHO, J et al., 2014; SANTIAGO et al., 2007). A ocorrência de tais comportamentos foi vinculada a existência de cargas residuais sobre a superfície da biomolécula de acordo com pH do meio, fato este que seria o principal direcionador das reações vistas nas interações Ec x surfactantes iônicos, em meio aquoso.

4.7 AFM

No intuito de avançar na caracterização estrutural da HbAg, estudos de AFM foram realizados sob o filme da proteína em $\text{pH } 7,0$, $7,5$ e $10,0$. Estes valores de pH foram escolhidos para avaliar a proteína em seu estado nativo ($\text{pH } 7,0$ e $7,5$) e na forma dissociada/agregada ($\text{pH } 10,0$). A Figura 16 apresenta os resultados de AFM da espessura do filme (nm), da HbAg $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH } 7,0$. A análise dos gráficos de altura, do inglês, *height* x seção transversal, do inglês *cross section*, de varredura de área com $5 \times 5 \mu\text{m}$, permite visualizar a presença de moléculas com tamanho entre $15 - 20 \text{ nm}$ (Figura 16A e 16B). De forma geral a imagem sugere a formação de uma monocamada proteica sobre a superfície de mica, pois por meio das imagens obtidas às partículas estão razoavelmente espaçadas e não aglomeradas, permitindo uma análise das partículas. Ampliando a imagem apresentada na Figura 16A, obtém-se a imagem ilustrada na Figura 16C. A Figura 16E representa uma ampliação da Figura 16C. A Figura 16D permite visualizar o tamanho médio das partículas presentes no

referido filme. Assim, uma análise qualitativa destas imagens permite informar que a HbAg pode apresentar um tamanho de 15 a 20 nm, em pH 7,0. O segundo pico com altura média entre 7,5 - 8,0 nm possivelmente está relacionado ao tamanho de um hexâmero da estrutura da HbAg que se rompeu durante o processo de deposição da HbAg na mica, seguido de lavagem da superfície da mica com o tampão, como o descrito em material e métodos.

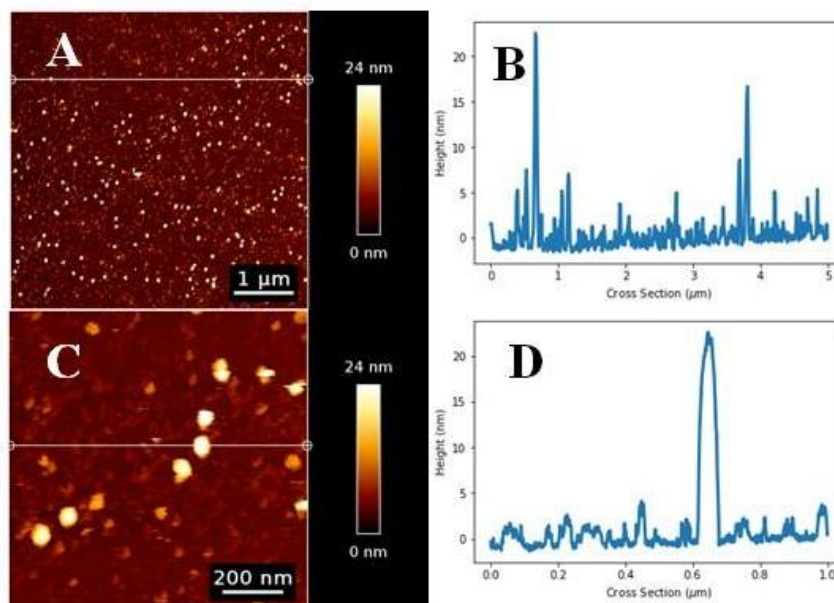
Figura 16: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato- borato $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, sobre a superfície de mica obtidas por AFM. (A) Imagem topográfica referente ao escanamento de quadrante de $5 \times 5\ \mu\text{m}$. A escala de cor no eixo Z (nm) representa uma estimativa do tamanho da HbAg; (B) Gráfico da altura \times corte transversal (height \times cross section (μm)) representando o perfil topográfico da seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em A); (C) Imagem topográfica de quadrante de $1 \times 1\ \mu\text{m}$ gerado pela ampliação da área analisada em A; (D) Gráfico da altura \times cross section representativo do perfil topográfico da seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em C); (E) Ampliação da imagem apresentada em C.



Fonte: Autor

A Figura 17 mostra a imagem topográfica obtida por AFM do filme da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 7,5. As imagens quadrangulares de 5×5 e 1×1 μm , Figuras 17A e 17C, respectivamente, mostram um padrão visual similar ao alcançado pela topografia da HbAg em pH 7,0 (Figura 16A e 16C). O gráfico de *height* \times *cross section*, indicou tamanho da HbAg entre 15 - 20 nm, com o aparecimento de partículas menores com dimensões que variaram de 8 a 5 nm (Figura 17B e 17D).

Figura 17: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato- borato $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,5, sobre a superfície de mica obtidas por AFM. (A) Imagem topográfica referente ao escaneamento de quadrante de 5×5 μm . A escala de cor no eixo Z (nm) representa uma estimativa do tamanho da HbAg; (B) Gráfico da altura \times corte transversal (*height* \times *cross section* (μm)) representando a seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em A); (C) Imagem topográfica do quadrante de 1×1 μm gerado pela ampliação de área analisada em A; (D) Gráfico da altura \times *cross section* representativo do perfil topográfico da seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em C).



Fonte: Autor

O valor de tamanho observado por AFM da HbAg em pH 7,5 é essencialmente o mesmo indicado para as medidas de AFM em pH 7,0, no qual o escaneamento do filme formado pela proteína apresentou alturas entre 15-20 nm. De fato, por DLS, foi observado que o estado oligomérico da HbAg

em pH 7,0 e 7,5 é bastante similar. A técnica de DLS mostra uma única população de espécie com tamanho de $28,2 \pm 0,2$ nm na HbAg, na faixa de pH entre 7,0 - 8,2 (Figura 11A e Tabela 4).

Uma possível explicação para o menor valor de tamanho observado para HbAg por AFM está relacionado a adsorção da HbAg sobre a superfícies de mica, o que levaria a proteína apresentar uma forma mais compacta. Esta ideia é baseada em estudos de AFM e DLS descritos para outros sistemas biológicos.

Os dados de microscopia da HbAg em pH 10,0 são apresentados na Figura 18; a exposição da HbAg a alta alcalinidade provocou mudanças na imagem coletadas por AFM (Figura 18A). A comparação da topografia das imagens referentes às varreduras feitas em pH 7,0 (Figura 16A) e 7,5 (Figura 17A), com a obtida em pH 10,0 permite observar a presença de espécies maiores com tamanho entre 50 e 70 nm, além das espécies com 20 e 8 nm.

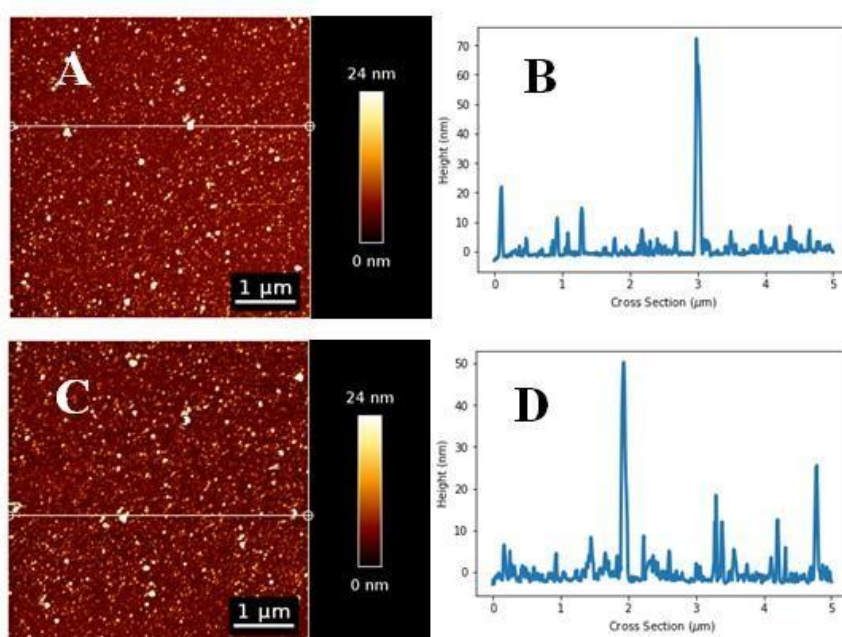
As partículas com 50 nm ou mais, possivelmente são agregados formados por uma mistura de HbAg íntegra e subunidades formadas pela dissociação oligomérica da proteína em meio alcalino. A proposta é feita com base no comportamento exibido pela proteína em pH alcalino em estudo por DLS. No pH 10,2 os dados de DLS da HbAg indicaram um sistema composto em 76,7% por agregados e 23,3% por partículas com D_h próximo aos 8,0 nm (Figura 11A e Tabela 4). Todavia, nas distribuições de tamanho por número e volume das partículas espalhadoras (Figura 11B e 11C e Tabela 4) a presença destes agregados em solução não foi observada, em grande parte devido a uma baixa quantidade e/ou volume destas grandes partículas em solução.

Uma hipótese para a visualização destes agregados por microscopia seja pela magnificação da agregação, em razão da adsorção da proteína ao substrato (mica). Para a formação do filme analisado foi necessário à deposição e descanso da proteína por 30 minutos sobre a mica para que ocorresse a adsorção do material sobre a superfície e em seguida a lavagem da área com tampão.

A visualização de partículas com tamanho de 20 nm, relacionada à proteína íntegra, provavelmente ocorreu pelo pouco tempo de exposição da Ec ao pH alcalino, cerca de 30 minutos antes da realização da medida. Desta forma, o tempo empregado de equilíbrio da amostra em pH 10, pode não ter

sido o suficiente para que ocorresse a total dissociação da proteína íntegra. Os resultados expostos pelo AFM são similares, mas não iguais aos obtidos por DLS, entretanto medidas adicionais precisam ser realizadas para uma melhor compreensão dos comportamentos notados.

Figura 18: Imagem topográfica e de dimensão (altura do filme) da HbAg $1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão acetato-fosfato-borato $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 10,0, sobre a superfície de mica obtidas por AFM. (A) Imagem topográfica referente ao escaneamento de quadrante de $5 \times 5\ \mu\text{m}$. A escala de cor no eixo Z (nm) representa uma estimativa do tamanho da HbAg; (B) Gráfico da altura \times corte transversal (height \times cross section (μm)) representando a seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em A); (C) Imagem topográfica do quadrante de $5 \times 5\ \mu\text{m}$ coletada em diferente área da superfície da mica; (D) Gráfico da altura \times cross section representativo do perfil topográfico da seção considerada na superfície da mica (linha contínua representada em C).



Fonte: Autor

Estudos de microvesículas (MV) isoladas do plasma sanguíneo humano, por DLS e AFM, indicaram valores de tamanho médio de partículas de 181 ± 71 e 176 ± 30 nm, respectivamente (GYÖRGY et al., 2011). O motivo da diferença de tamanho foi associado a limitação da técnica do AFM ao se analisar as MV em filme aderido à superfície sólida e exposto ao ar e não em suspensão como ocorre por DLS.

Efeito similar foi observado em MV de origem bacteriana, em que a caracterização de MV de composição lipoproteica oriundas de bactérias *Lactobacillus casei BL 23* por técnicas estruturais como DLS e AFM descreveram, respectivamente, valores médios de tamanho de 47 ± 3 nm e 33 ± 3 nm. Além disso, foi relatado que as vesículas se apresentavam com uma forma esférica (análises por DLS) e esférica – côncava (análises por AFM) para as MV de *L. casei BL 23* (RUBIO et al., 2017). O contraste entre os resultados encontrados foi sugerido que estivesse relacionado ao tipo de preparo das amostras, as quais estas foram submetidas antes das análises de AFM e DLS.

Na AFM, para a formação do filme analisado, antes houve a secagem do filme de material biológico, em cabine de fluxo de ar, o que pode ter interferido na medição do real tamanho das MV. Por outro lado, as amostras analisadas por DLS estavam suspensas em solução. Outra possibilidade levantada pelos autores está associada à composição da membrana das MV. A sua constituição lipoproteica pode ter contribuído para que esta ficasse mais aderida (achatada) sobre a superfície sólida de imobilização, mudando a assim seu formato original e conseqüentemente o tamanho observado na análise por AFM (RUBIO et al., 2017).

A diferença entre resultados para tamanho de partículas entre DLS e AFM também foi visualizada em experimentos de imobilização de lipossomas utilizados na funcionalização de nanopartículas de hidrogel destinadas para o carregamento de medicamentos no organismo humano. Por meio da AFM foi notado tamanho médio de 70 nm para os lipossomas, já por DLS esse valor foi maior, cerca de 100 nm (KAZAKOV et al., 2003). A divergência entre os resultados também foi associada à deformação que a molécula sofreu ao aderir à superfície sólida (mica). Além disso, foi observado que após a imobilização ocorreria o rompimento da bicamada lipídica. O que justificaria a presença de estruturas com formato diferente do esférico, e composto apenas por uma camada plana de lipídios (KAZAKOV et al., 2003).

A observação da agregação por AFM é descrita em experimentos relacionados com a fribrilogênese em proteínas. O uso de $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ corante alimentício tartrazina em amostras de serum albumino humano, do inglês, *human serum albumin* (HSA) e serum albumino bovino, do inglês, *bovine serum albumin* (BSA) $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 3,5 provocou a formação de grande

agregados com tamanho de 66,7 (HSA) e 69,3 nm (BSA), observados por DLS e, tendo estes agregados formato do tipo amilóide confirmado em medidas de AFM, sendo associados a fibrilas de origem proteica devido ao formato longo e tubular característico (AL-SHABIB et al., 2018).

Mesma capacidade de detecção foi vista em estudo da agregação e caracterização de fibrilas formadas na albumina do ovo em pH 2,0 em função do aquecimento a 90° C no tempo. Filmes preparados a partir de amostras aquecidas e analisadas por AFM confirmaram que nas primeiras 24 horas após o aquecimento ocorreu agregação proteica visualizada pela existência de três tipos diferentes de fibrilas: I, II e III nas imagens de microscopia (LARA et al., 2012). Os agregados foram diferenciados de acordo com o seu tamanho: o tipo I obteve dimensão de 7 ± 2 nm; o tipo II com 4 ± 1 nm; e o III, menor de todos, com $2,5 \pm 1$ nm. Adicionalmente a presença dos agregados também foi observada por medidas de DLS pela observação de um sistema bimodal formado por duas populações de D_h em 28 e 200 nm indicados a ser referente as fibrilas do tipo I e III, respectivamente (LARA et al., 2012).

Por outro lado, estudo por microscopia eletrônica, do inglês, *electron microscopy* (EM), de proteínas ortológicas a HbAg, tais como HbLt e HbAm mostraram resultados que se assemelham ao valor obtido pelo AFM do filme de HbAg. A EM da HbLt e da HbAm confirmou que o formato destas duas Ec é compatível ao proposto pelo modelo bracelete em que duas camadas hexagonais estão justapostas uma a outra. Adicionalmente, o experimento indicou, respectivamente, diâmetro de $28,2 \pm 0,8$, $27,5 \pm 0,8$ nm e altura de $20 \pm 0,9$, $19,0 \pm 1,2$ nm para a HbLt e HbAm (KAPP et al., 1982).

A microscopia eletrônica de transmissão por varredura, do inglês, *Scanning Transmission Electron Microscopy* (STEM), da HbLt observou que a proteína em filme montado sobre substrato sólido assume duas posições principais (KAPP et al., 1984): a) horizontal em que fica evidente que a molécula possui um formato hexagonal; b) lateral, na qual foi revelado a existência de duas camadas hexagonais uma sobre a outra, confirmando os dados anteriormente descritos por EM (KAPP et al., 1984). A análise das micrografias coletadas e analisadas em diferentes formas de contagem da intensidade por pixel acumulado resultou em dimensão para a HbLt em $30-32 \times 19,8-21,7$ nm (KAPP et al., 1984).

Dados similares foram observados em experimentos de cristalografia da HbLt. A densidade eletrônica obtida do cristal indicou que a proteína íntegra apresenta dimensão de 285 Å (cerca de 28,5 nm) × 180 Å (18,0 nm) (ROYER et al., 2000). Vale dizer que, a dimensão proposta para a HbLt íntegra foi recentemente confirmada por microscopia eletrônica de criogênese, do inglês *cryogenic electron microscopy* (cryo-EM), pela obtenção de uma reconstrução da Ec comparável ao mapa cristalográfico gerado pelos dados de SAXS do cristal da HbLt (AFANASYEV et al., 2017).

Em recente estudo cristalográfico da HbGp foi observado que a proteína íntegra possui diâmetro igual a 290 Å (29 nm) e altura de 190 Å (19 nm) (BACHEGA et al., 2015). A proximidade de tamanho entre a HbGp e HbLt foi atribuída a grande similaridade de dados estruturais entre as duas Ec (identidade de sequência maior a 70% para as cadeias globinicas **a**, **b** e **c** entre as duas Ec) (BACHEGA et al., 2015; BACHEGA, 2013). Adicionalmente, dados de AUC, MALDI-TOF-MS e SDS-PAGE comprovam proximidade de composição estrutural entre as hemoglobinas (CARVALHO et al., 2009; 2011ab).

Diante de todo o exposto e considerando a similar condição de preparo da amostra de HbAg para as análises por AFM com as amostras medidas de Ec por EM e STEM (filmes montados sobre substrato sólido), pode-se propor que o valor observado de tamanho da partícula entre 15-20 nm por AFM da HbAg em pH 7,0 e 7,5 seja na realidade referente a altura das duas camadas hexagonais sobrepostas. Este dado juntamente com o valor de D_h obtido por DLS, em mesmo valor de pH indicaria inicialmente que, a HbAg possui dimensão (28 × 20 nm, diâmetro × altura) próxima ao descrito para outras proteínas da classe. Todavia, medidas adicionais são necessárias para aquisição de dados para a confirmação desta hipótese.

A realização de outros tipos de microscopia da HbAg, como por exemplo EM, STEM e crio-ME são de grande interesse para obtenção destes dados mais refinados, que ajudarão na identificação da presença de similaridades entre as hemoglobinas gigantes e na confirmação da proposta de conservação estrutural entre as diferentes Ec ao longo do processo evolutivo.

4.8 Estudos iniciais de determinação de atividade POD da HbAg

Em virtude do potencial uso biotecnológico desta classe de proteína para o desenvolvimento de sangue artificial e biossensores de contaminação ambiental, um estudo a cerca da atividade residual POD intrínseca da HbAg foi realizado de forma a enriquecer o conhecimento acumulado sobre esta biomolécula, trazendo informações que possibilitem novas aplicações de uso para estas proteínas.

A determinação de atividade enzimática envolve o estudo dos mecanismos da reação catalisada pela proteína, mas, além disso, também faz necessário o acompanhamento da geração e concentração do produto pelo fenômeno (CARUSO et al., 2016). O monitoramento do estado (estrutural e funcional) da enzima em diferentes condições de temperatura, concentração de sais (força iônica), pH, presença de metais pesados e uso de substratos por técnicas espectroscópicas, tais como, absorção ótica e fluorescência, são essenciais para o fornecimento de informações sobre o desempenho da enzima na catálise da reação (CARUSO et al., 2016; DAÍ et al., 2018; LI et al., 2018; SHETTY et al., 2017;). Adicionalmente, técnicas como DLS, dicroísmo circular, do inglês *circular dichroism* (CD) e AFM contribuem revelando possíveis mudanças estruturais que ocorrem na proteína devido ao seu papel enzimático (BRISSENET et al., 2013; KIKANI; SINGH, 2015; KRICKL et al., 2018; NIEDZWIECKA et al., 2011).

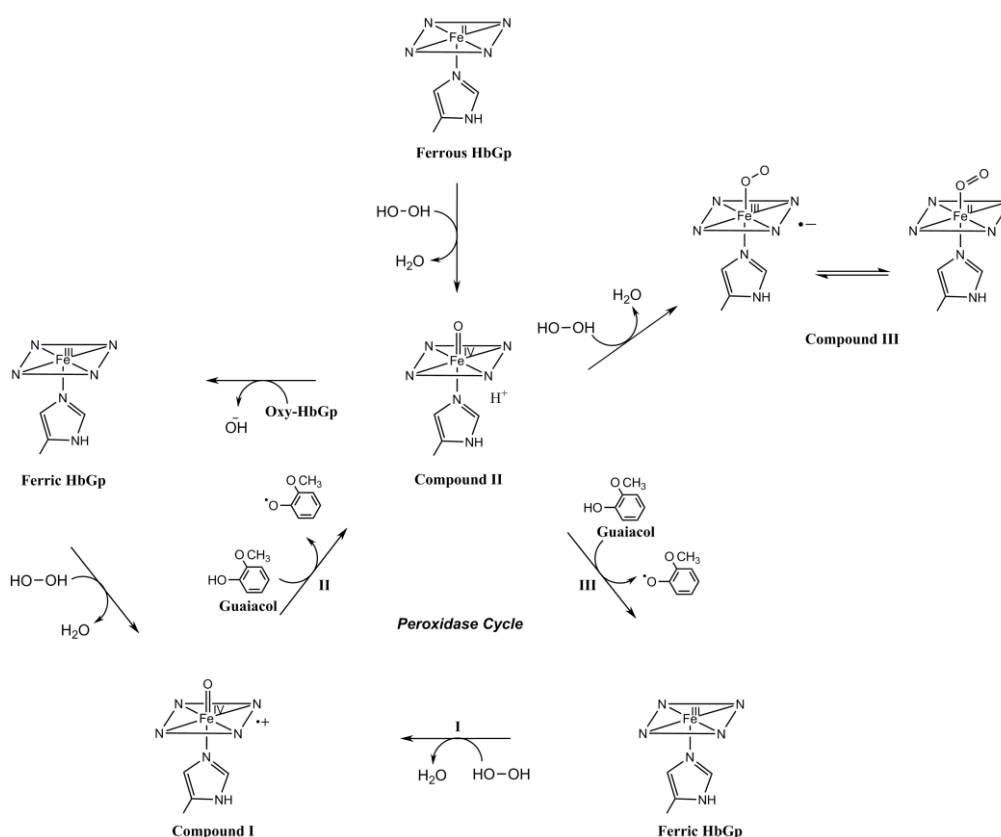
Assim, estudos enzimáticos exigem a execução de diversas formas de análise por diferentes técnicas para a correta determinação da atividade enzimática. Diante do exposto, os resultados apresentados a seguir são referentes a um estudo inicial acerca da atividade residual POD da HbAg.

As informações iniciais sobre a atividade POD da HbAg foram coletados seguindo o protocolo descrito para a realização de ensaio de catálise e conversão de H_2O_2 em meio tamponante na presença de guaiacol como substrato doador de elétrons da HbGp (CARUSO et al., 2016). No qual a reação de conversão citada anteriormente consiste de um processo cíclico de três etapas, em que a enzima (Hb) é primeiramente oxidada pelo H_2O_2 e, então, reduzida de volta para sua forma nativa em dois passos sequenciais que

envolvem a formação de dois intermediários enzimáticos, denominados compostos oxoferril I e II.

A ausência de guaiacol, leva ao uso de diferentes vias pela Hb para voltar a sua forma férrica. Primeiramente, o H_2O_2 reage com a Hb na forma ferrosa (Fe^{+2}), a fim de gerar a forma oxi-ferril (composto II), este sequencialmente reage com outra molécula de Hb ferrosa para produzir Hb na forma férrica (Fe^{+3}), sendo este mecanismo o de oxidação da Hb ferrosa. Estas etapas da atividade peroxidase da Hb na presença e ausência do guaiacol podem ser visualizadas no esquema da Figura 19, que ilustra o mecanismo do fenômeno para HbGp, proteína ortóloga a HbAg.

Figura 19: Representação do mecanismo do ciclo da peroxidase (POD) proposto para HbGp, proteína ortóloga a HbAg, na presença e ausência de guaiacol.



Fonte: CARUSO et al., 2016

Na presença de guaiacol, a reação segue um mecanismo cíclico de 3 etapas envolvendo a formação de dois intermediários proteicos. O H_2O_2 reage com a Hb férrica (Fe^{+3}) para gerar o composto I (radical π cation oxoferril-

porfirina), incorporando átomos de oxigênio do H_2O_2 dentro dos centros heme oxi-ferril, gerando radicais π cátion oxoferril-porfirínicos. Nesta reação, a oxidação dos centros heme férricos e dos anéis porfirínicos libera 2 elétrons que são utilizados para reduzir o H_2O_2 a água. O composto I reage com moléculas de guaiacol, doadoras de um único elétron, reduzindo-se novamente a Hb na forma Fe^{+3} , via composto II (oxoferril-porfirina protonada). A formação de radicais porfirínicos π deve envolver a produção dos seguintes subprodutos: espécies oxo-ferril protonadas, radicais guaiacol (tetraguaiacol) e água.

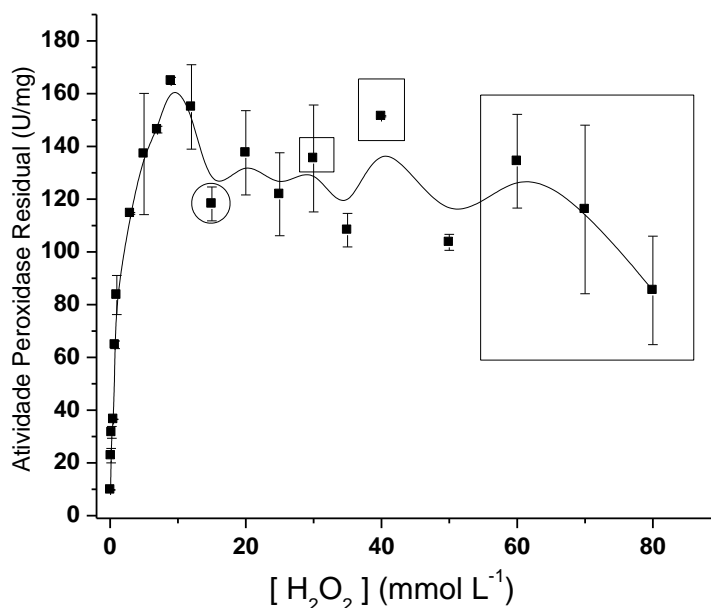
No entanto, em condições de quantidades insuficientes de guaiacol, o H_2O_2 pode passar a atuar como um doador de elétrons (co-substrato), levando a formação (a partir do composto II) de formas oxi-ferrosas ou complexos superóxido-férricos (composto III). A competição do H_2O_2 com guaiacol pela oxidação da Hb produz um sistema irreversível que inibe ou diminui a atividade POD de hemoglobinas, devido a degradação do grupo heme da hemoproteína (ALAYASH et al., 1999; AZEVEDO et al., 2003; BUEHLER et al., 2009; DAVIES et al., 2008; JAKOPITSCH et al., 2005; LI et al., 2006; NAGABABU, RIFIKIND, 2004; VILLEGAS, MAUK, VAZQUEZ-DUHALT, 2000; VLASITS et al., 2010; WINTERBOURN, 1985).

Dado o mecanismo descrito acima e a possível inativação pelo H_2O_2 , a atividade peroxidase da HbAg, seguiu o descrito para proteína ortóloga (HbGp) e foi determinada e expressa em termos de atividade relativa residual. O experimento realizado teve a finalidade de indicar qual concentração de H_2O_2 proporcionaria atividade residual POD máxima, para esse estudo empregou-se o tampão fosfato de potássio, pH 7,0 a 25 °C (Figura 20).

A curva de atividade POD residual da HbAg x concentração de H_2O_2 , obtida pela reação em tampão fosfato de potássio 0,1 mol \cdot L⁻¹, indicou que o máximo de atividade foi alcançado na concentração de 9 mmol \cdot L⁻¹ de H_2O_2 , sendo este valor próximo ao indicado para HbGp, 10 mmol \cdot L⁻¹ H_2O_2 (CARUSO et al., 2016). Após esse máximo, foi observado o decaimento da atividade conforme houve o aumento da concentração de H_2O_2 , o que sugeriu que o excesso de H_2O_2 possivelmente levou a uma degradação do grupo prostético da hemoproteína. Tal proposição se baseia no resultado descrito para a HbGp, que em mesmas condições experimentais exibiu comportamento similar, sendo

este atribuído a degradação do grupo em heme em função das mudanças ocasionadas no seu espectro UV-Vis entre 700-250 nm (CARUSO et al., 2016).

Figura 20: Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na atividade residual peroxidase (POD) da HbAg. As medidas de atividade POD foram calculadas para o uso de diferentes concentrações de H_2O_2 (0 - 80 $mmol \cdot L^{-1}$), empregando-se guaiacol ($16 \mu mol \cdot L^{-1}$) como substrato. A oxidação do guaiacol foi determinada em tampão fosfato de potássio $0,1 mol \cdot L^{-1}$, pH 7,0, $25 \text{ }^\circ C$ e concentração de HbAg de $0,1 mg \cdot mL^{-1}$.



Fonte: Autor

Na ausência de H_2O_2 , a Hb apresentava espectro típico da classe com banda de maior absorção em 414 nm (banda de Soret) e outras duas em 540 e 575 nm, bandas α e β , respectivamente.

Todavia, em meio reacional com excesso de H_2O_2 ($80 mmol \cdot L^{-1}$) foi registrada a redução dos máximos de absorção e seus deslocamentos para maiores comprimentos de onda (λ) em razão da formação das espécies ferryl ($Fe^{IV} = O$), concomitante com a degradação do grupo prostético (CARUSO et al., 2016). Apesar da proximidade de resultado para atividade POD residual máxima em função da concentração de H_2O_2 entre as duas Ec, o valor da atividade residual da HbAg foi calculado em $160 U \cdot mg^{-1}$ cerca de 10 vezes maior que indicado para da HbGp ($15 U \cdot mg^{-1}$), em mesmas condições experimentais (CARUSO et al., 2016).

Duas hipóteses podem ser feitas para a observação desta diferença de atividade entre estas Ec. A primeira seria um efeito da natureza do tampão (fosfato de potássio) utilizado para compor o meio reacional em questão. Em experimentos bioquímicos convencionais, como o de determinação de atividade enzimática por meio de ensaio catalítico, a escolha do pH ótimo para o desenvolvimento do é a primeira etapa experimental a ser pensada (SALIS; MONDUZZI, 2016; STOLL; BLANCHARD, 2009). Em seguida, protocolos da enzimologia indicam o uso de diferentes tipos de sais para garantir a estabilidade do pH desejado no meio reacional. Feito a escolha do sal para a confecção do tampão do ensaio, é necessário ser feito um estudo adicional de possíveis efeitos dos seus íons sobre o desempenho da proteína, de forma, a se encontrar especificidades que sejam oriundas da interação tampão x enzima (SALIS; MONDUZZI, 2016; STOLL; BLANCHARD, 2009). Alguns exemplos desta situação são: tampão fosfato inibindo enzimas como carboxipeptidases, uréases, quinases e hidrogenases, o sal borato reagindo e formando complexos com mono e oligossacarídeos; casos que o tampão Tris reage com grupamento aldeído e cetonas da molécula em solução (STOLL; BLANCHARD, 2009).

A segunda hipótese seria, maior estabilidade da HbAg frente a altas concentrações de H_2O_2 ; na Figura 20 os valores ressaltados pelos retângulos indicam que em altas concentrações de H_2O_2 não foram observados consecutivos decaimentos da atividade residual POD, como o visto para a HbGp e associado a degradação do grupo heme devido ao excesso de H_2O_2 no meio reacional (CARUSO et al., 2016). Por outro lado, a atividade ressaltada com um círculo, demonstra um decaimento não esperado para o comportamento notado para a HbAg em altas concentrações de H_2O_2 . Assim, estes dados sugerem a necessidade de novas replicatas e experimentos, a fim de se confirmar e complementar os resultados observados para HbAg em relação a atividade POD.

5. Conclusão

A extração da hemolinfa de *A. gracilis* e sua purificação por SEC para obtenção da hemoglobina extracelular (HbAg) foi bem sucedida. Ao fim do processo foi coletada fração composta unicamente por uma espécie, associada à proteína íntegra em pH 7,0 a 25° C.

Os resultados de SDS-PAGE mostraram uma grande similaridade, mas não igualdade de migração eletroforética das bandas referentes às subunidades da HbAg com as da HbGp. Os resultados de MALDI-TOF-MS mostraram a presença de quatro cadeias globínicas e de um trímero, com duas isoformas, além de quatro isômeros para o monômero **d** e **a**, assim como descrito para a HbGp. Os valores de massa das cadeias monoméricas observados por MALDI-TOF-MS da HbAg são bastante similares aos encontrados para a HbGp e HbRa. Entretanto, dados de AUC mostraram uma maior MM para a HbAg ($\pm 3,9$ MDa), em relação a HbGp e HbRa ($\pm 3,6$ MDa), mas que se assemelha com a MM da HbEa ($\pm 3,8$ MDa). Assim, os dados de SDS-PAGE e MALDI-TOF-MS não estão totalmente em consonância com os dados de AUC. As posições das bandas no gel de SDS-PAGE, bem como os valores de massa para as subunidades dadas por MALDI-TOF-MS para a HbAg são muito próximas a da HbGp o que torna a diferença de massas reportadas por AUC entre as hemoglobinas pouco provável.

Por isso, neste trabalho são propostas duas possibilidades para o maior valor de MM da HbAg frente a HbGp e a HbRa: a) Uma diferença na formação oligomérica da proteína nativa HbAg, quando comparada com a HbGp, através da presença de subunidades HbAg que lhe rendessem uma estequiometria diferente de $[(abcd)_3L_3]_{12}$, descrita em outros estudos de Ec; b) O alto valor de MM da HbAg observado por AUC em pH 7,0, ser relacionado a um agregado formado pela mistura de monômeros, dímeros e outras espécies de agregação, e não a HbAg nativa (monômero), sendo este comportamento resultado de uma menor estabilidade oligomérica da HbAg quando comparada com a HbGp e HbRa.

Assim, novas análises sobre a estrutura da HbAg são necessárias, visto as divergências encontradas em valores de massa e de coeficientes de

sedimentação entre a HbAg com hemoglobinas da mesma classe. Além disso, um estudo de AUC da HbAg purificada em datas diferentes pode ser interessante. Este estudo permitiria avaliar se a proteína se agrega cada vez mais de acordo com o seu tempo de armazenamento.

Os dados de DLS sugerem que em pH neutro a HbAg é composta por uma única espécie de D_h em torno de 28 nm. Em valores de pH ácido (4,8 a 5,9) é observado que a HbAg se encontra agregada com valor de D_h de 44 nm a 25° C, diferentemente do observado para a HbGp e HbRa. Em meio alcalino a HbAg também se mostra mais instável, em comparação a outras hemoglobinas extracelulares gigantes, por apresentar em pH inferior a 9,0 indícios de dissociação e agregação parcial da sua estrutura oligomérica. Quanto a resistência ao aquecimento, os valores de T_m indicam similaridade de estabilidade térmica entre a HbAg e a HbGp, em pH 7,0, porém ambas apresentam menor resistência ao aumento da temperatura em comparação a HbRa. Dados de LSI e potencial-zeta propõe que o valor do pI da HbAg está em torno de $6,0 \pm 0,3$, sendo este valor próximo ao descrito a outras hemoglobinas extracelulares gigantes.

Os resultados obtidos por AFM da HbAg em pH 7,0 e 7,5 indicaram essencialmente tamanho da molécula entre 15-20 nm. Este valor pode estar relacionado a altura de dois discos hexagonais sobrepostos um ao outro. Em pH 10,0, foram detectadas moléculas de tamanho de 50-70 nm que podem estar associadas a presença de agregados devido a dissociação alcalina.

No estudo inicial da atividade POD da HbAg foi verificada maior atividade residual da HbAg ($160 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) em relação a HbGp ($15 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), bem como uma maior estabilidade da Hb de *A. gracilis* em altas concentrações de H_2O_2 . Todavia, estudos complementares e novas medidas se fazem necessários para uma melhor compreensão e comprovação dos resultados observados.

Concluindo, os dados apresentados nesta dissertação, em grande parte, estão de acordo com reportado para proteínas homólogas, porém uma menor estabilidade oligomérica e um valor de MM diferente são relatados. Por isso, novas análises de AUC, MALDI-TOF-MS, eletroforese SDS-PAGE, DLS e de técnicas estruturais como AFM e Microscopia eletrônica da HbAg em função do tempo estocagem, concentração, variação de pH e condições desnaturantes

(presença de ureia, guanidina, surfactantes iônicos) podem trazer informações relevantes acerca da dinâmica estrutural da HbAg. Ensaio da HbAg em concentrações crescentes de H_2O_2 , na ausência de guaiacol, em função do tempo, devem contribuir para averiguação da estabilidade da observada para HbAg frente a altas concentrações do agente oxidante. Além disso, o emprego de diferentes tampões, tais como HEPES e Tris-HCl, na mistura do meio reacional poderão fornecer dados adicionais sobre o efeito do tampão sobre a o desempenho da atividade enzimática apresentada pela hemoglobina.

Estes estudos futuros podem confirmar se há uma real diferença entre os valores de MM, e parâmetro hidrodinâmicos e propriedades intrínsecas da HbAg com outras hemoproteínas da classe ou se estes, por outro lado, são próximos, reafirmando assim, a hipótese da existência de conservação estrutural da hemoglobina entre as espécies, ao longo do processo evolutivo. Além de trazer informações que vão possibilitar novas ideias de aplicação destas biomoléculas na área científica.

6. Perspectivas Futuras

O objetivo do presente trabalho foi alcançado, uma vez que a hemoglobina extracelular de *Amyntas gracilis* (HbAg) foi inicialmente caracterizada e trouxe informações inéditas sobre uma hemoglobina extraída de uma minhoca de menor comprimento (≤ 20 cm) em relação aos relatos da literatura (anelídeos maiores a 30 cm de comprimento). Todavia, novos experimentos ainda são necessários para a melhor compreensão deste complexo multiunidades.

Esta dissertação abriu novas vertentes para caracterizar a HbAg, por isso o grupo Biomoléculas terá como objetivos futuros realizar diferentes tipos de estudos:

- a) Estudos por dicroísmo circular (CD) para avaliar a presença e estabilidade da estrutura secundária da HbAg em função da concentração, pH, temperatura e tempo de estocagem;
- b) Reavaliar a MM das subunidades da HbAg e investigar a banda em 37 kDa (SDS-PAGE) não detectada por MALDI-TOF-MS. Estudos de SEC utilizando como detector um medidor de tamanho e MM da partícula (SEC/MALS);
- c) Estudos de SV e equilíbrio de sedimentação, do inglês *sedimentation equilibrium* (SE) por AUC da HbAg na sua forma nativa e em condições que favoreçam a sua dissociação e agregação;
- d) Após os resultados obtidos por AFM ficou evidente que estudos por EM, ou, então Crio-EM poderão trazer informações relevantes a respeito da forma, tamanho e das interações entre subunidades da HbAg;
- e) Novos estudos de POD deverão ser realizados para confirmar que HbAg apresenta uma maior estabilidade frente a altas concentrações de H_2O_2 em relação a HbGp.

Por fim, o presente trabalho avançou consideravelmente na caracterização da HbAg, porém muitos outros estudos se fazem necessários

para melhor compreender este sistema, que, no futuro, pode vir a se tornar um grande produto biotecnológico.

7. Referências

AFANASYEV, P.; SEER-LINNERMAYR, C.; RAVELLI, R. B. C.; MATADEEN, R.; DE CARLOS, S.; ALEWEIJNSE, B.; PORTUGAL, R. V.; PANNU, N. S.; SCHATZ, M.; VAN HELL, M. Single-particle cryo-EM using alignment by classification (ABC): the structure of *Lumbricus terrestris* haemoglobin. **IUCrj**, v. 7, p. 678-694, 2017.

AGUSTINHO, S. C. M; TINTO, M.H; IMASATO, H; TOMINAGA, T.T; PERUSSI, J.R; TABAK, M. Spectroscopic studies of the met form of the extracellular hemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1298, p.148-158, 1996.

ALAYASH, A. I.; RYAN, B. A. B.; EICH, R. F.; OLSON, J. S.; CASHON, R. E. Reactions of sperm whale myoglobin with hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2029-2037, 1999.

AL-SHABIB, N. A.; KHAN, J. M.; ALSENAIDY, M. A.; ALSENAIDY, A. M.; KHAN, M. S.; HUSAIN, F. M.; KHAN, M. R.; NASSEM, M.; SEN, P.; ALAM, P.; KHAN, R. H. Unveiling the stimulatory effects of tartrazine on human and bovine serum albumin fibrillogenesis: Spectroscopic and microscopic study. **Spectrochimica Acta A**, v. 191, p. 116-124, 2018.

AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C.; PRAZERES, D. M. F.; VOJINOVIC, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Horseadish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. **Biotechnology Annual Review**, v. 9, p. 199-247, 2003.

BACHEGA, J. F. R. **Estrutura cristalográfica da hemoglobina de *Glossoscolex paulistus*, um complexo de 3,6 mega Dalton (Crystallographic Structure of *Glossoscolex paulistus* Hemoglobin, a complex of 3.6 MDa)**. Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos (IFSC) p. 165 Ph.D. dissertation (in Portuguese), 2013.

BACHEGA, J. F. R.; MALUF, F. V.; ANDI, B.; PEREIRA, H D'Muniz.; CARAZZOLLEA, M. F.; ORVILLE, A. M.; TABAK, M.; BRANDÃO-NETO, J.; GARRATT, R. C.; REBOREDO, E. H. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 1257–1271, 2015.

BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics**; John Wiley & Sons, Inc., New York 2000. BHUSHAN, B.; MARTI, O. AFM Instrumentation and analyses. In: _____. **Springer Handbook of Nanotechnology**. 1^a ed. Springer Berlin Heidelberg, 2004, p.595-612.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, Ch. Atomic Force Microscopy. **Physical review letters**, v. 56; p. 930-934, 1986.

BOEKEMA, E. J.; VAN HELL, M. Molecular shape of *Lumbricus terrestris* erythrocyte studied by electron microscopy and image analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 957, p. 370-379, 1989.

BRISSENET, Y.; MELLET, C. O.; MORANTDAT, S.; MORENO, M. I. G.; DENIAUD, D.; MATHEWS, S. E.; VIDAL, S.; DESTÁK, S.; EL KIRAT, K.; GOUIN, S. G. Topological effects and binding modes operating with multivalent imunosugar-based glycoclusters and mannosidases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 18427-18435, 2013.

BUEHLER, P. W.; ABRAHAM, B.; VALLELIAN, F.; LINNEMAYR, C.; PEREIRA, C. P.; CIPOLLO, J. F.; JIA, Y.; MIKOLAJCZYK, M.; BORETTI, F. S.; SCHOEDON, G.; ALAYASH, A. I.; SCHAER, D. J. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**, v. 113, p. 2578-2586, 2009.

CARUSO, C. S.; BIAZIN, E.; CARVALHO, F. A. O.; TABAK, M.; BACHEGA, J. F. R. Metals content of *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: Its peroxidase activity and the importance of these ions in the protein stability. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 161, p. 63- 72, 2016.

CARVALHO, F. A. O. **Estudo da estabilidade oligomérica da hemoglobina extracelular gigante de *Glossoscolex paulistus* (HbGp) na presença de agentes caotrópicos e caracterização das subunidades.** São Carlos. 131 f. Tese de doutorado (Dourado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

CARVALHO, F. A. O.; ALVES, F. R.; CARVALHO, J. W. P.; TABAK, M. Guanidin hydrochloride and urea effects upon the thermal stability of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp). **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 74, p. 18-28. 2015.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P. BIAZIN, E.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Characterization of *Rhinodrilus alatus* hemoglobin (HbRa) and its subunits: Evidence for strong interaction with cationic surfactants DTAB and CTAC. **Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology**, v. 167, p. 23-29, 2014.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; ALVES, F. R. TABAK, M. pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 333-341, 2013.

CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S; TABAK, M. Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. **Process Biochemistry**, v. 46, p.2144–2151, 2011a.

CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. Molecular masses and sedimentation coefficients of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Alkaline oligomeric dissociation. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.1, v.48, p.183-193, 2011b.

CARVALHO, F.A.O.; SANTIAGO, P. S.; BORGES, J. C.; TABAK, M. On the molecular mass of the extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Analytical ultracentrifugation reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 257-263, 2009.

CARVALHO, J. W. P.; ALVES, F. R.; BATISTA, T.; CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Sodium dodecyl sulfate (SDS) on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and surface B**, v. 111, p. 561-570, 2013b.

CARVALHO, J. W. P.; CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Rhinodrilus alatus* (HbRa): DLS and SAXS studies. **Europe Biophysics Journal**, v. 45, p. 549-563, 2016.

CARVALHO, J. W. P.; CARVALHO, F. A. O.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Thermal denaturation and aggregation of hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in acid and neutral media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 109-118, 2013a.

CARVALHO, J. W. P.; CARVALHO, F. O. A.; BATISTA, T.; SANTIAGO, P. S.; TABAK, M. Cetylmethylammonium chloride (CTAC) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dinamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. **Colloids and Surfaces B**, v. 118, p; 14-24, 2014.

CARVALHO, J. W. P.; SANTIAGO, P. S.; BATISTA, T.; SALMON, C. E. G.; BARBOSA, L. R. S.; ITRI, R.; TABAK, M. On the temperature stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*, at different oxidation states: SAXS and DLS studies. **Biophysical chemistry**, v. 163-164, p. 44-55, 2012.

DAI, X. Y.; KHONG, L. M.; WANG, X. L.; ZHU, Q.; CHEN, K.; ZHOU, T. Preparation, characterization and behavior of pectinase covalently immobilized onto sodium alginate/grapheme oxide composite beads. **Food chemistry**, v. 253, p. 185-193, 2018.

DANIEL, E.; LUSTIG, A.; DAVID, M. M.; TSFADIA, Y. Towards a resolution of the long-standing controversy regarding the molecular mass of the extracellular erythrocrurin of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1649, p. 1–15, 2003.

DANIEL, E.; RUSTIG, A.; DAVID, M. M. TSFADIA, Y. On the molecular mass of *Lumbricus erythrocrurin*. **Micron**, v. 35, p. 131-132, 2004.

DAVID, M. M.; DANIEL, E. Subunit structure of earthworm erythrocrurin. **Journal of Molecular Biology**, v. 87, p. 89-101, 1974.

DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; REES, M. D. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 1200-1234, 2008.

EDSTROM, R. D.; MEINKE, M. H.; YANG, X.; YANG, R.; EVANS, D. F. Scanning tunneling microscopy of the enzymes of muscle glycogenolysis. **Ultramicroscopy**, v. 33, p. 99-106, 1990.

FUSHITANI, K.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris* oxygenation properties of isolated chains, trimer, and a reassociated product. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 10275-10281, 1991.

GYÖRGY, B.; MÓDOS, K.; PÁLLINGER, E.; PÁLÓCZI, K.; PÁSZTÓI, M.; MISJÁK, P.; DELI, M. A.; SIPOS, A.; SZALAI, A.; VOSZKA, I.; POLGÁR, A.; TÓTH, K.; CSETE, M.; NAGY, G.; GAY, S.; FALUS, A.; KITTEL, A.; BUZÁS, E. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. **Blood Journal**, v. 117, p. 39-48, 2011.

HEMARINA. **Brest University Hospital and HEMARINA present positive new advances from the initial clinical trial of HEMO₂life[®] at the American Transplant Congress in Seattle.** Disponível em: http://www.hemarina.com/index.php?rex=19&ctn=pub_aff_breve.348#pub_aff_breve.348 Acesso em: 10 jun. 2018

HERRMANN, P. S. P.; DA SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R. F.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros**, v.7, p. 51-61, 1997.

IMASATO, H.; TINTO, M. H.; PERUSSI, J. R.; TABAK, M. Fluorescence of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* obtained by gel filtration. **Comparative biochemistry and physiology Part B**, v. 112, p. 217-226, 1995.

JAKOPITSCH, C.; WANASINGHE, A.; JANTSCHKO, W.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Kinetic of interconversion of ferrous enzymes, compound II and compound III, of wild-type *Synechocystis* catalase-peroxidase and Y249F: proposal for the catalic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 9037-9042, 2005.

KAPP, O. H., VINOGRADOV, S. N., OHTSUKI, M.; CREWE, A. V. Scanning transmission electron microscopy of extracellular invertebrate annelid hemoglobins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.704, p.546–548,1982.

KAPP, O. H.; POLIDORI, G.; MAINWARING, M. G.; CREWE, A. V.; VINOGRADOV, S. N. The reassociation of *Lumbricus terrestris* hemoglobin dissociated at alkaline pH. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 628-639, 1984.

KAZAKOV, S.; KAHOLEK, M.; KUDASHEVA, D.; TERAOKA, I.; COWMAN, M. K.; LEVON, K. Poly(N- isopropylacrylamide-co-1-vinylimidazole) Hydrogel Nanoparticles Prepared and Hydrophobically Modified in Liposome Reactors: Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering Study. **Langmuir**, v. 19, p. 8086-8093, 2003.

KIKANI, B. A.; SIGH, S. P. Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylases as probed by CD spectroscopy. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 450-460, 2015.

KINBERG, J.G.H. Öfversigt af Kongelige Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar. **Annulata nova**, v. 23, p.97–103, 1866.

KREBS, A.; ZIPPER, P.; VINOGRADOV, S. N. Lack of size and shape alteration of oxygenated and deoxygenated *Lumbricus terrestris* hemoglobin? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1297, p. 115-118, 1986.

KRICKL, S.; TOURAUD, D.; BAUDIN, P.; ZINN, T.; KUNZ, W.; Enzyme activity of peroxidase in surfactant-free microemulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 516, p. 466-475, 2018.

LAMY, J. N.; GREEN, B. N.; TOULMOND, A.; WALL, J. S.; WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. Giant Hexagonal Bilayer Hemoglobins. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 3113-3124, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Journal of Molecular Biology**, v. 2276, p. 680-685, 1970.

LARA, C.; GOURDIN-BERTIN, S.; ADAMCIK, J.; BOLISSETTY, S.; MEZZENGA, R. Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 4213- 4221, 2012.

LEVIN, Ö. Electron microscope observations on some 60 S erythrocytins and their split products, **Journal of Molecular Biology**. v.6, p. 95–101. 1963.

LI, D.; ZHANG, X.; LONG, Y.; SUN, X. Inactivation of hemoglobin by hydrogen peroxide and protection by a reductant substrate, **Life Science Journal**., v. 3, p. 52-58, 2006

LI, Z.; SCOTT, K.; HEMAR, Y.; ZHANG, H. M. OTTER, D. Purification and characterization of protease (tamarilin) from tamarillo fruit. **Food chemistry**, v. 256, p. 228-234, 2018.

LIOCHEV, S. I.; KUCHUMOV, A. R.; VINOGRADOV, S. N.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase activity in the giant hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 330, p. 281-284, 1996.

MAIZEL, J. V., Jr. REVIEW: SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 590-592, 2000.

MARTIN, P.D; KUCHUMOV, A; GREEN, B.R; OLIVER, R.W.A; BRASWELL, E.H; WALL, J.S. Vinogradov, S.N. Mass spectrometric composition and molecular mass of *Lumbricus terrestris* hemoglobin: A refined model of its

quaternary structure. **Journal of Molecular Biology**. n.1, v.255, p.154–169, 1996.

NAGABABU, E.; RIFIKIND, J. M. Heme degradation by reactive oxygen species. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, p. 967-978, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NIEDZWIECKA, A.; LEKKA, M.; NILSSON, P.; VIRTANEN, A. Global architecture of human poly (A)-specific ribonuclease by atomic force microscopy in liquid and dynamic light scattering. **Biophysical chemistry**, v. 158, p. 141-149, 2011.

OLIVEIRA, J. B. S. **Caracterização da hemoglobina extracelular *Amyntas gracilis* (HbAg) com potencial aplicação como biossensor de contaminação do solo**. 2015. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Agronomia – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Registro, 2015.

OLIVEIRA, M. S., MOREIRA, L. M.; TABAK, M. Partial characterization of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: A MALDI-TOF-MS study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 429-436, 2007.

OWNBY, D. W.; ZHU, H.; SCHENEIDER, K.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T.; RIGGS, A. F. The extracellular hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*: Determination of subunit stoichiometry. **The journal of biological chemistry**, n. 18, v. 268, p. 13539-13547, 1993.

PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy**. Ed. Plenum Press: New York and London, 1985.

POLI, A. L.; MOREIRA, L. M.; IMASATO, H. Autoxidation of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Molecular mechanism and oligomeric implications. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 82, n. 1, p. 306-315, 2011.

RAI, G. P.; SAKAI, S.; FLÓREZ, A. M.; MOGOLLON, L.; HAGER, L. P. Directed evolution of chloro-peroxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.343, p.1-8, 2001.

RIFKIND, J. M.; ABUGO, A.; LEVY, A.; HEIM, J. Detection, formation and relevance of hemichromes and hemochromes. **Methods in Enzymology**, v. 231, p. 449-480, 1994.

RIGGS, A. F.; RIGGS, C. K. The self-association of the giant hemoglobin from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1844, p. 1071-1075, 2014.

ROCHE, J.; BESSIS, M.; THIERY, J. P. Etude de l'hémoglobine plasmatique de quelque Annelides au microscope électronique. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 41, p. 182–184, 1960.

ROUSSELOT, M; DELPY, E; LA ROCHELLE, C.D; LAGENTE, V; PIROW, R; REES, J; HAGEGE, A; LE GUEN, D; HOURDEZ, S; ZAL, F. *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. **Biotechnology Journal**. n.3, v.1, p.333-345, 2006.

ROYER, W. E.; BRADEN, B. C.; JACOBS, H. C.; LOVE, W. E. In: Lamy, J; Lamy, J **Invertebrate Oxygen-Binding Proteins**, 2^o ed, New York. Marcel Dekker, 1981, p. 337-341.

ROYER, W. E.; STRAND, K.; VAN HELL, M.; HENDRICKSON, W. A. Structural hierarchy in erythrocrurin, the giant respiratory assemblage of annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 7107-7111, 2000.

ROYER, W. E.; SHARMA, H.; STRAND, K.; KNAPP, J.E.; BHYRAVBHATLA, B. Lumbricus Erythrocrurin at 3.5 Å Resolution: Architecture of a Megadalton Respiratory Complex. **Structure**, n.7, v.14, p.1167–1177, 2006.

RUBIO, A. P. D.; MARTÍNEZ, J. H.; CASILLAS, D. C.; LESKOW, F. C.; PIURI, M.; PÉREZ, O. E. Lactobacillus casei BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

RUGAR, D.; HANMA, P. Atomic force microscopy. **Physics today**, v. 43, p. 23-30, 1990.

SALIS, A.; MONDUZZI, M. Not only pH specific buffer effects in biological systems. **Current opinion in colloids & interface science**, v. 23, p. 1-9, 2016.

SANTIAGO, P. S. **Interação de porfirinas hidrofílicas e de hemoglobina extracelular com modelos biomiméticos de membrana biológica**. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SANTIAGO, P. S., CARVALHO, F. A. O., DOMINGUES, M. M., CARVALHO, J. W. P., SANTOS, N. C., TABAK, M. Isoelectric point determination for *Glossoscolex paulistus* extracellular hemoglobin: oligomeric stability in acidic pH and relevance to protein-surfactant interactions. **Langmuir**, v. 26, p.9794–9801, 2010b.

SANTIAGO, P. S.; CARVALHO, J. W. P.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Thermal stability of extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Determination of activation parameters by optical spectroscopic and differential scanning calorimetric studies. **Biophysical Chemistry**, v. 152, p. 128-138, 2010a.

SANTIAGO, P. S.; MOREIRA, L. M.; DE ALMEIDA, E. V.; TABAK, M. Giant extracellular *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp) upon interaction with cethylmethylammonium chloride (CTAC) and sodium dodecyl sulphate (SDS) – surfactants: Dissociation of oligomeric structure and autoxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 506-517, 2007.

SANTIAGO, P. S.; MOURA, F.; MOREIRA, L. M.; DOMINGUES, M. M.; SANTOS, N. C.; TABAK, M. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobina of *Glossocolex paulistus*. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2228-2240, 2008.

SCHUCK, P. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. **Analytical Biochemistry**. v.320, p.104–124, 2003.

SCHUCK, P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 3, p. 1606-1619, 2000.

SHETTY, R.; VESTEGAARD, M.; JESSEN, F.; HÄGGLUND, P.; KNORR, V.; KOEHLER, P.; PRAKASH, H. S.; HOBLEY, T. J. Discovery, cloning and characterization of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. **Enzyme and microbial technology**, v. 107, p. 57-63, 2017.

STEFFEN, G. P. K. **Diversidade de minhocas e sua relação com ecossistemas naturais e alterados no estado do Rio Grande do Sul**. 208 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. Buffers: principles and practice. **Methods enzymology**, v. 463, p. 43-56, 2009.

SVEDBERG, T.; ERIKSSON, I. B. The molecular weight of erythrocrucorin, **Journal of the American Chemical Society**, v.55, p. 2834–2841, 1933.

TABAK, M.; CARVALHO, F. A. O.; CARVALHO, J. W. P.; BACHEGA, J. F. R.; SANTIAGO, P. S. Recent new characterizations on the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* and some other giant hemoglobins from different worms. In: Alessio Innocenti. (Org.). **Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine**, InTech - Open Access Publisher, v. 1, p. 337-356, 2012.

TERWILLIGER, R. C.; TERWILLIGER, N. B.; SCHABTACH, E.; DANGOTT, L. Erythrocrucorins of *Euzonus mucronata* Treadwell: evidence for dimeric annelid extracellular hemoglobin, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 57A, p. 143–149, 1977.

TSFADIA, Y.; DANIEL, E. A re-evaluation of the molecular mass of earthworm extracellular hemoglobin from meniscus depletion sedimentation equilibrium. Nature of the 10 S dissociation species, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1433, p. 217–228, 1999.

VILLEGAS, J. A.; MAUK, A. G. E VASQUEZ-DUHALT, R. A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 237-244, 2006.

VINOGRADOV, S. N. The stoichiometry of the four linker subunits of *Lumbricus terrestris* hemoglobin suggests an asymmetric distribution. **Micron**, n.1-2, v. 35, p.127-129, 2004.

VINOGRADOV, S. N.; KAPP, O. H.; OHTSUKI, M. **The extracellular haemoglobins and chorocruorins of annelids**. In Electron Microscopy of Proteins, v. 3. J. R. Harris, editor. Academic Press, London, UK. 135–164, 1982.

VINOGRADOV, S. S.; LUGO, S. D.; MAINWARING, M. G.; KAPP, O. H.; CREWE, A. V. Bracelet protein: A quaternary structure proposed for the giant extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. **Biochemistry**, v. 83, p. 8034-8038, 1986.

VLASITS, J.; JAKOPITSCH, C.; BERNROITNER, M.; ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Mechanism of catalase activity of heme peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v, 500, p. 74-81, 2010.

VOET, D.; VOET J. G. **Fundamentos De Bioquímica: A Vida Em Nível Molecular**. Porto Alegre: Artmed,3 ed. p.1616, 2006.

WEBER, R. E.; VINOGRADOV, S. N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. **Physiological Reviews**, n.2, v.81, p.569 – 628, 2001.

WINTERBOURN, C. C. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin, **Environmental Health Perspectives**, v. 4, p. 321-330, 1985.

YAMAGISHI, M.; KAJITA, A.; SHUKUYA, K.; KAZIRO, K. Quaternary structure of *Limnodrilus* haemoglobin, **Journal of Molecular Biology**, v. 21, p. 467–472, 1966.

ZAL, F.; GREEN, B. N.; LALLIER, F. H.; VINOGRADIV, S. N. TOULMOND, A. Quaternary structure of the extracellular haemoglobin of the lugorm *Arenicola marina*: a multi-angle-laser-light-scattering and electrospray-ionisation-mass-spectrometry analysis. **European Journal Biochemistry**, v. 243, p. 85-92, 1997.

ZAL, F.; GREEN, B. N.; MARTINEAU, P.; LALLIER, F. H.; TOULMOND, A.; VINOGRADOV, S. N.; CHILDRESS, J. J. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 5227-5236, 2000.

ZHU, H.; OWNBY, D. W.; RIGGS, C. K.; NOLASCO, N. J.; STOOPS, J. K.; RIGGS, A. F. Assembly of the gigantic hemoglobin of the earthworm *Lumbricus terrestris* - Roles of subunit equilibria, non-globin linker chains, and valence of the heme iron. **Jornal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 30007-30021, 1996.