

ROSA CRISTINA CAPITÃO

Determinação da Entalpia e da Entropia de Solvatação da Superfície Protéica a Partir da Energética de Oxigenação de Hemoglobinas

Orientador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2007

ROSA CRISTINA CAPITÃO

Determinação da Entalpia e da Entropia de Solvatação da Superfície Protéica a Partir da Energética de Oxigenação de Hemoglobinas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2007

Capitão, Rosa Cristina.

Determinação da entalpia e da entropia de solvatação da superfície protéica a partir da energética de oxigenação de hemoglobinas / Rosa Cristina Capitão. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2007,

138 f. : 37 il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio Francisco Colombo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobina. 2. Hemoglobina - Hidratação. 3. Hemoglobina - Termodinâmica. 4. Entalpia. 5. Entropia. 6. Energia livre de oxigenação. 7. Capacidade calorífica. 8. Compensação entalpia-entropia. I. Colombo, Marcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 547.963.4

ROSA CRISTINA CAPITÃO

DETERMINAÇÃO DA ENTALPIA E DA ENTROPIA DE
SOLVATAÇÃO DA SUPERFÍCIE PROTÉICA A PARTIR DA
ENERGÉTICA DE OXIGENAÇÃO DE HEMOGLOBINAS

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente, Orientador e 1º. Examinador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

2º. Examinador: Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas

3º. Examinador: Prof. Dr. Richard John Ward

4º. Examinador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodríguez

5º. Examinador: Prof. Dr. Marinônio Cornélio Lopes

São José do Rio Preto, 01 / junho / 2007.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, com auxílio financeiro da FAPESP, processo 02/08396-6.

Aos meus pais José e Renilda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo* pela orientação, confiança e dedicação, realizando a análise deste trabalho com alto caráter científico.

Aos professores *Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodríguez* e *Dr. Marcelo Andrés Fossey*, pelas sugestões dadas a este trabalho, no exame de qualificação.

Ao *Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodríguez* pelo uso do seu laboratório e equipamentos, além da amizade, incentivo e atenção na realização dos experimentos.

Ao *Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey* pela amizade e incentivo constante no decorrer de minha permanência neste departamento.

Aos demais professores do departamento de Física: *Dr. José Ramon Beltran Abrego*, *Dr. Jorge Chahine*, *Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni*, *Dr. Marinônio Lopes Cornélio*, *Dr. Elso Drigo Filho*, *Dr. José Roberto Ruggiero*, *Dr. Augusto Agostinho Neto*, *Dr. Valmir Fadel*, *Dr. Vitor Barbanti Pereira Leite* pelo convívio, e em especial para o *Prof. Dr. João Ruggiero Neto* pela confiança e amizade.

À *Priscilla* não somente pela amizade e lealdade, mas também pelo companheirismo dos dias difíceis e dos dias calmos e alegres: "... sempre rir, sempre rir, pra viver é melhor sempre rir...".

Aos meus colegas de laboratório e departamento: *André*, *Renato Caetano*, *Renato Gaspar*, *Vanessa*, *Henrique*, *Bruno* e *Nayara*, companheiros em quaisquer situações.

À *Ilva* secretária do departamento de física, pela prestação contínua.

Aos técnicos do departamento de Física, *Paulinho* e *Barbosa*, que nunca deixaram de prestar seus auxílios ao laboratório.

À *Fapesp* pelo incentivo financeiro.

*No matter where you are in life,
No matter who you are,
No matter what you have accomplished..
Face your fears and Live your dreams.
If you want, you can do it!*

Rosa Cristina Capitão

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A molécula de hemoglobina	02
1.1.1. Estrutura	02
1.1.2. Função	04
1.2. Regulação alostérica	06
1.2.1. Ligação de O ₂	06
1.2.2. Efeito de água	09
1.2.3. Efeito do Cl ⁻	11
1.2.4. Efeito da temperatura	15
1.3. Hemoglobinas estudadas	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Purificação da Hb	23
3.2. Determinação da concentração protéica e frações oxiHb e metaHb	25
3.3. Medidas de osmolalidades	27
3.4. Determinação das curvas de oxigenação	27
3.5. Método tonométrico-espectrofotométrico	30
3.6. Determinação dos parâmetros termodinâmicos através das <i>Equações de van't Hoff</i>	35

4. RESULTADOS	39
4.1. Efeito de a_w sobre a afinidade da Hb de diferentes espécies por O_2	40
4.2. Determinação da entalpia de oxigenação de diferentes espécies de Hb	47
4.3. Relação entre Δn_w e ΔH de oxigenação	52
4.4. Relação entre Δn_w e ΔS de oxigenação	59
4.5. Compensação entalpia-entropia de oxigenação	62
4.6. Relação entre ΔC_p , pH e NaCl	69
5. DISCUSSÃO	72
5.1. Efeito de a_w sobre a afinidade da Hb por O_2	73
5.2. Correlação entre Δn_w , ΔH e ΔS de oxigenação	74
5.3. Relação entre os valores de ΔH e ΔS determinados neste trabalho com os dados existentes na literatura	76
5.4. Relação entre ΔC_p e os parâmetros obtidos neste trabalho	79
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS	86
7.1. Bibliografia	87
7.2. Participações em Congressos	95

ANEXOS	97
Anexo A - Seqüência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas das espécies de Hb estudadas neste trabalho e alinhamento com as cadeias da HbA ₀ (HbBov _{ad} e HbEq) e HbF (HbBov _{fet})	98
Anexo B - <i>Equações de van't Hoff</i>	111
Anexo C - Comportamento da afinidade das espécies de Hb por O ₂	114
Anexo D - Comparação entre os parâmetros de oxigenação obtidos através do <i>Gráfico de Hill</i> e com a <i>Equação de Adair</i>	122
Anexo E - Comparação entre os parâmetros termodinâmicos determinados com a <i>Equação de van't Hoff</i> e com a <i>Equação de van't Hoff Integrada</i>	128
Anexo F - Tabelas com os valores de entalpia e entropia de solvatação obtidos da literatura	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de Hb de um vertebrado.	02
Figura 2. Estrutura da protoporfirina IX e do heme.	03
Figura 3. Bolsão do heme.	04
Figura 4. Esquema do modelo de simetria (modelo MWC).	07
Figura 5. Esquema do modelo seqüencial (modelo KNF).	08
Figura 6. Corte transversal da cavidade central da espécie HbA ₀ .	12
Figura 7. Espectros de absorção da desoxiHb e da oxiHb na região do visível para a espécie HbEq (60µM/heme) em 10mM Hepes pH 7,2.	28
Figura 8. Representação esquemática do tonômetro utilizado nos experimentos.	30
Figura 9. Gráfico de Hill para uma solução contendo a espécie HbBov _{fet} (60µM/heme) em 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2 à 298K.	33
Figura 10. Comportamento da afinidade da espécie HbBov _{fet} (60µM/heme) por O ₂ em soluções contendo Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	41
Figura 11. Gráfico da dependência de P ₅₀ com a _w na ausência de NaCl à 298K, com seus respectivos n ₅₀ das espécies HbBov _{ad} (60µM/heme) Hepes 7,2, HbBov _{ad} (60µM/heme) Ches 9,0, HbBov _{fet} (60µM/heme) Hepes 7,2, HbBov _{fet} (60µM/heme) Ches9,0, HbEq (60µM/heme) Hepes7,2, HbEq (60µM/heme) Ches 9,0.	43
Figura 12. Gráfico da dependência de P ₅₀ com a _w na presença de 100mM NaCl à 298K, com seus respectivos n ₅₀ das espécies HbBov _{ad} (60µM/heme) Hepes 7,2, HbBov _{ad} (60µM/heme) Ches 9,0, HbBov _{fet} (60µM/heme) Hepes 7,2, HbBov _{fet} (60µM/heme) Ches 9,0, HbEq (60µM/heme) Hepes 7,2, HbEq (60µM/heme) Ches 9,0.	44
Figura 13. Gráficos de ln(P ₅₀) em função da temperatura (T), com os seus respectivos n ₅₀ para a espécie HbBov _{ad} (60µM/heme) Hepes 7,2 e Ches 9,0 na ausência e, Hepes 7,2 e Ches 9,0 na presença de NaCl.	48
Figura 14. Gráficos de ln(P ₅₀) em função da temperatura (T), com os seus respectivos n ₅₀ para a espécie HbBov _{fet} (60µM/heme) Hepes 7,2 e Ches 9,0 na ausência e, Hepes 7,2 e Ches 9,0 na presença de NaCl.	49
Figura 15. Gráficos de ln(P ₅₀) em função da temperatura (T), com os seus respectivos n ₅₀ para a espécie HbEq (60µM/heme) Hepes 7,2 e Ches 9,0 na ausência e, Hepes 7,2 e Ches 9,0 na presença de NaCl.	50
Figura 16. Gráfico de ΔH de oxigenação em função de Δn _w , para variadas espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais.	53
Figura 17. Variação de log(P ₅₀) para as espécies: HbBov _{ad} , HbBov _{fet} e HbEq, ambas na ausência de NaCl e concentração 60µM/heme, nos pHs indicados na figura.	56
Figura 18. Variação do número de prótons entre os estados T e R de variadas espécies de Hb na ausência e na presença de 100mM NaCl em função da variação de hidratação de cada espécie.	58

Figura 19. Gráfico de $T\Delta S_{\text{calculado}}$ de oxigenação em função de Δn_w para variadas espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais.	60
Figura 20. Gráfico de compensação, $\Delta H_{\text{observado}}$ versus $\Delta S_{\text{calculado}}$, para a oxigenação de variadas espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais.	63
Figura 21. Comparação entre o fenômeno de compensação de oxigenação das espécies em suas respectivas condições experimentais com a compensação de hidratação de resíduos hidrofóbicos.	66
Figura 22. Comparação entre o fenômeno de compensação de oxigenação das espécies em suas respectivas condições experimentais com a compensação associada à hidratação de resíduos hidrofílicos.	67
Figura 23. Comparação entre os parâmetros ΔC_p , pH e ausência/presença de 100mM NaCl, para as espécies de Hb analisadas em variadas condições experimentais.	70
Figura 24. Estrutura dos aminoácidos apolares e polares.	99
Figura 25. Seqüência dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas α (a) e β (b) da HbBov _{ad} , além do alinhamento com as respectivas cadeias da HbA ₀ .	101
Figura 26. Seqüência dos resíduos de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica γ da HbBov _{fet} , além do alinhamento com a cadeia γ da HbF (a) e com a cadeia β da HbBov _{ad} (b).	104
Figura 27. Seqüência dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas α (a) e β (b) da HbEq, além do alinhamento com as respectivas cadeias da HbA ₀ .	106
Figura 28. Seqüência dos resíduos de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica α da HbI.	108
Figura 29. Alinhamento das seqüências dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das espécies HbA ₀ , HbF, HbBov _{ad} , HbBov _{fet} e HbEq.	110
Figura 30. Comportamento da afinidade da espécie HbBov _{fet} (60 μ M/heme) por O ₂ em soluções contendo Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	115
Figura 31. Comportamento da afinidade da espécie HbBov _{ad} (60 μ M/heme) por O ₂ em soluções contendo Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	116
Figura 32. Comportamento da afinidade da espécie HbBov _{ad} (60 μ M/heme) por O ₂ em soluções contendo Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	117
Figura 33. Comportamento da afinidade da espécie HbEq (60 μ M/heme) por O ₂ em soluções contendo Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	118
Figura 34. Comportamento da afinidade da espécie HbEq (60 μ M/heme) por O ₂ em soluções contendo Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	119
Figura 35. Tela do aplicativo MATLAB com a rotina utilizada para o cálculo das componentes principais.	121

Figura 36. Gráfico de $\Delta H_{\text{integrada}}$ e $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ de oxigenação, ambos em função de Δn_w , para variadas espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais. 129

Figura 37. Gráfico de $\Delta S_{\text{integrada}}$ e $\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ de oxigenação, ambos em função de Δn_w , para variadas espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Comparação entre os valores de Δn_w na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb.	46
Tabela II - Valores de ΔH e ΔS na ausência e na presença de 100mM NaCl para as espécies de Hb, em várias condições experimentais, calculados a partir do ajuste linear do gráfico de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura (T), além dos valores de ΔG_0 e ΔC_p .	51
Tabela III - Valores de Δn_{H^+} para várias espécies de Hb, na ausência e na presença de 100mM NaCl.	57
Tabela IV - Valores de ΔH e ΔS para a espécie HbA ₀ em 10mM Hepes pH 7,3, em várias concentrações de NaCl. Estes valores foram determinados em nosso grupo de pesquisa.	64
Tabela V - Abreviações dos aminoácidos e propriedades da cadeia lateral.	98
Tabela VI - Comparação entre os valores de P_{50} obtidos pelo <i>Gráfico de Hill</i> e com a <i>Equação de Adair</i> , além dos valores de K_1 obtido da <i>Equação de Adair</i> , na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb.	124
Tabela VII - Comparação entre os valores de Δn_w com P_{50} obtida do <i>Gráfico de Hill</i> , em K_1 e com P_{50} calculada a partir de K_4 , na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb.	125
Tabela VIII - Comparação entre o ΔH de oxigenação obtido pela inclinação do gráfico de $\ln(P_{50}) \times 1/T$ ($\Delta H_{van't Hoff}$) e o calculado pela <i>Equação de van't Hoff Integrada</i> ($\Delta H_{integrada}$), além dos valores de ΔG_0 , ΔC_p e ΔS .	127
Tabela IX - ΔH , ΔG e ΔS de hidratação de diferentes grupos, estimados a partir da área de superfície acessível ao solvente.	133
Tabela X - Parâmetros de solvatação de resíduos de aminoácidos apresentados por Oobatake e colaboradores.	134
Tabela XI - Energética de dissolução de alcanos (substâncias não-polares) da fase gasosa para a água em 298K.	135
Tabela XII - Parâmetros termodinâmicos de transferência de substâncias não-polares (hidrocarbonos) líquidas para a água em 298K.	135
Tabela XIII - ΔG e ΔH de hidratação obtidos a partir da transferência da fase gasosa para a água e de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína.	136
Tabela XIV - Parâmetros termodinâmicos de hidratação determinados, tendo como base, interações interatômicas que ocorrem com o desnovelamento protéico.	137
Tabela XV - ΔG e ΔH de hidratação de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína obtidos por Ooi e colaboradores.	138

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,3-BPG	2,3-Bifosfoglicerato
\bar{Y}	Saturação fracional da hemoglobina com oxigênio (saturação parcial de O ₂)
$\delta H_{\text{solvatação}}$	Entalpia de solvatação (Kcal/mol.H ₂ O)
$\delta S_{\text{solvatação}}$	Entropia de solvatação (cal/mol.K.H ₂ O)
Δn_w	Diferença de hidratação obtida na transição T→R da hemoglobina (H ₂ O/Hb)
Δn^{H^+}	Número de prótons de Bohr obtido na transição T→R da hemoglobina (H ⁺ /Hb)
ΔG	Variação de energia livre (Kcal/mol.heme)
ΔH	Variação de entalpia (Kcal/mol.heme)
$\Delta H_{\text{configuração}}$	Variação de entalpia devido às mudanças estruturais na proteína
ΔH_{O_2}	Variação de entalpia de ligação de oxigênio ao grupo heme
$\Delta H_{\text{observado}}$	Variação de entalpia de reação (Kcal/mol)
ΔS	Variação de entropia (cal/mol.K)
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ASA	<i>Accessible surface area</i> (área acessível ao solvente)
Asn	Asparagina
Asp	Asparagina
ATP	Adenosinatrifosfato
a_w	Atividade de água
Ches	Ácido 2-(N-ciclohexilamino)etano sulfônico
CO₂	Dióxido de carbono
Cys	Cisteína
Cl⁻	Íon cloreto
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatograph</i> (cromatografia líquida de rápida performance)
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
Hb	Hemoglobina
HbA₀	Componente majoritário da hemoglobina humana adulta (98%)
HbA₂	Componente minoritário da hemoglobina humana adulta (2%)
HbBov_{ad}	Hemoglobina bovina adulta
HbBov_{fet}	Hemoglobina bovina fetal
HbEq	Hemoglobina equina adulta
HbI	Hemoglobina do molusco <i>Scapharca inaequalvis</i>
Hepes	Ácido (2hidroxietil) piperazina-N-(2 etano sulfônico)

His	Histidina
His-E7	Histidina distal
His-F8	Histidina proximal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IHP	Inositol hexafosfato
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
metaHb	Meta-Hemoglobina
mmHg	Milímetro de mercúrio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O₂	Oxigênio molecular
Osm	Osmolaridade
P₅₀	Pressão de oxigênio que satura 50% dos grupos heme da hemoglobina (mmHg)
Phe	Fenilalanina
pO₂	Pressão parcial de oxigênio (mmHg)
Pro	Prolina
Ser	Serina
R	Constante universal dos gases (1,987cal/mol.K)
R	Estrutura relaxada da hemoglobina (oxigenada)
T	Estrutura tensa da hemoglobina (desoxigenada)
T₀	Estrutura desoxigenada (tensa) da hemoglobina isenta de ânions
T₀	Temperatura de referência (298K)
T_x	Estrutura desoxigenada (tensa) da hemoglobina ligada a ânions
Thr	Treonina
Tris	(2-hidroxietil)-imino-(hidroximetil)metano
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

CAPITÃO, R. C. *DETERMINAÇÃO DA ENTALPIA E DA ENTROPIA DE SOLVATAÇÃO DA SUPERFÍCIE PROTÉICA A PARTIR DA ENERGÉTICA DE OXIGENAÇÃO DE HEMOGLOBINAS*. SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, 2007, 138P. TESE DE DOUTORADO EM BIOFÍSICA MOLECULAR. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS, CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”.

RESUMO

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica cuja principal função é o transporte de oxigênio. As moléculas de O₂ se ligam cooperativamente à proteína, com afinidade crescente com a saturação. O favorecimento à energia de ligação se deve à mudança da estrutura quaternária da proteína, ou seja, da conformação T de baixa afinidade para a conformação R de alta afinidade, induzida pela ligação do ligante. Decorrente desta mudança conformacional há um aumento da área de superfície protéica acessível ao solvente (ASA), na transição do estado totalmente desoxigenado (T) para o estado totalmente oxigenado (R). Esta variação de ASA pode ser medida, em solução, utilizando-se o método de estresse osmótico (COLOMBO et al., 1992). Neste trabalho, determinamos o número de moléculas de água (Δn_w) que se liga a diferentes espécies de Hb na transição desoxiHb→oxiHb. Este valor varia de espécie para espécie, e dentro de cada espécie é maior na presença de NaCl do que na ausência deste sal. A ligação preferencial do ânion cloreto à conformação T da Hb altera sua estrutura terciária, o que reflete em mudanças no valor de Δn_w de oxigenação medidos na ausência e na presença deste ânion. Como referenciado, os valores de Δn_w de oxigenação foram determinados em solução pelo método de estresse osmótico, isto é, a partir da determinação da dependência de P₅₀ com a atividade de água (a_w). Mostramos que diferentes espécies de Hb, em diferentes condições de solução, além de terem valores de Δn_w de oxigenação distintos, apresentam valores diferentes de ΔH de oxigenação ($\Delta H_{\text{observado}}$). Os valores de Δn_w e de $\Delta H_{\text{observado}}$, determinados para as espécies de Hb Equina adulta (HbEq), Bovina adulta (HbBov_{ad}) e fetal (HbBov_{fet}) em diferentes condições experimentais, em conjunto com valores de Δn_w e $\Delta H_{\text{observado}}$ para as hemoglobinas das espécies Humana (HbA₀) e do molusco *Scapharca inaequalvis* (HbI) foram correlacionados e analisados com o objetivo de determinar o valor da variação de entalpia e da entropia de solvatação, $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$, respectivamente. Determinou-se que $\delta H_{\text{solvatação}}$ é aproximadamente -0,57Kcal/mol.H₂O. Este parâmetro representa o custo entálpico de hidratação protéica em meio aquoso. Por sua vez, o custo entrópico, $\delta S_{\text{solvatação}}$, determinado foi de aproximadamente -2,89cal/mol.K.H₂O, e a energia livre de hidratação, $\delta G_{\text{solvatação}}$, aproximadamente 290cal/mol.H₂O. Com a finalidade de determinar a natureza da

energética de hidratação que está associada com a oxigenação das espécies de Hb, confrontamos através de gráficos de compensação, os valores de $\Delta H_{\text{observado}}$ e de $\Delta S_{\text{observado}}$, com os valores dos parâmetros de solvatação calculados a partir da transferência de pequenos compostos químicos de líquidos hidrofóbicos (ou da fase gasosa) para a água. O resultado encontrado mostra que o $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{observado}}$ que acompanham as mudanças conformacionais das espécies de Hb segue a mesma linha de compensação associada com a transferência de grupos hidrofóbicos de líquidos apolares para a água. Isto sugere que a energética de hidratação associada com a oxigenação das espécies de Hb possui característica hidrofóbica. Porém, o ΔC_p obtido experimentalmente para as espécies de Hb de animais adultos (Bovina adulta e Equina) indica que há o predomínio da solvatação de grupos polares. Ainda não é conhecida uma causa específica para tal divergência.

Palavras chave: hemoglobina, hidratação, entalpia, entropia, capacidade calorífica.

ABSTRACT

Hemoglobin (Hb) is a tetrameric protein whose main function is oxygen transport. Four O₂ molecules bind cooperatively to the protein. The cooperative stepwise increasing in O₂-affinity with protein saturation is bound to the change in the protein's quaternary structure from the low O₂-affinity conformation (T-state) to the high O₂-affinity conformation (R-state) induced by ligand binding. Upon the T→R transition, the water accessible surface area (ASA) of the protein increase, with a consequent binding of extra water molecules to the protein. The change in hydration associated with the Δ ASA can be determined in solution using the osmotic stress method (COLOMBO et al., 1992). In this work, we determined the number of water molecules (Δn_w) that bind to different Hb specie in the T→R transition. This value changes from specie to specie, and is larger in presence of NaCl than in absence for all specie. In this work we had also determined the enthalpy change of Hb oxygenation (ΔH_{obs}) for the different specie and at varied conditions where the value of Δn_w of oxygenation were observed to vary. Δn_w and ΔH_{obs} values determined for the Equine adult (HbEq), Bovine adult (HbBov_{ad}) and fetal (HbBov_{fet}) Hb in different experimental conditions, and Δn_w and ΔH_{obs} values previously determined for Human (HbA₀) and for the mollusk *Scapharca inaequivalvis* (HbI) hemoglobins, we correlated and analyzed in order to determine the enthalpy and entropy changes associated with the binding of extra water molecules to the newly exposed protein surface upon oxygenation. We have found that δH_{sol} , the heat change of protein hydration, is approximately -0,57Kcal/mol.H₂O. This parameter represents the enthalpic cost of protein hydration in aqueous solution. The entropic cost, δS_{sol} , was estimated as approximately -2,89cal/mol.K.H₂O. At 298K, the free energy change of protein surface hydration, δG_{sol} , is approximately 290cal/mol.H₂O. Plots of enthalpy-entropy compensation were used to analyze the character, hydrophobic or hydrophilic, of the energetics of protein hydration determined in this work. We found, by comparing ΔH and ΔS values of Hb oxygenation with tabulated ΔH and ΔS values of transfer of small hydrophobic and hydrophilic groups into water that the energetics of protein hydration associated with Hb oxygenation have hydrophobic characteristics. However, ΔC_p experimentally obtained for Bovine adult and Equine adult Hb indicate that there is a prevalence of polar groups' solvation. A specific cause is still not known for such divergence.

Key words: hemoglobin, hydration, enthalpy, entropy, heat capacity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A molécula de hemoglobina

1.1.1. Estrutura

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica, encontrada principalmente nos glóbulos vermelhos do sangue de animais vertebrados. Nos humanos adultos, há duas frações de hemoglobinas: a HbA₀ e a HbA₂, correspondendo a aproximadamente 98% e 2% do total da proteína, respectivamente (STRYER, 1996). A HbA₀ possui uma massa molecular de aproximadamente 65KDa (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007; IMAI, 1982) e uma estrutura quaternária composta por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$) (figura 1) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada, respectivamente, onde tanto a subunidade α quanto a β são formadas de oito hélices nomeadas de A à H (STRYER, 1996; BALDWIN, 1975).

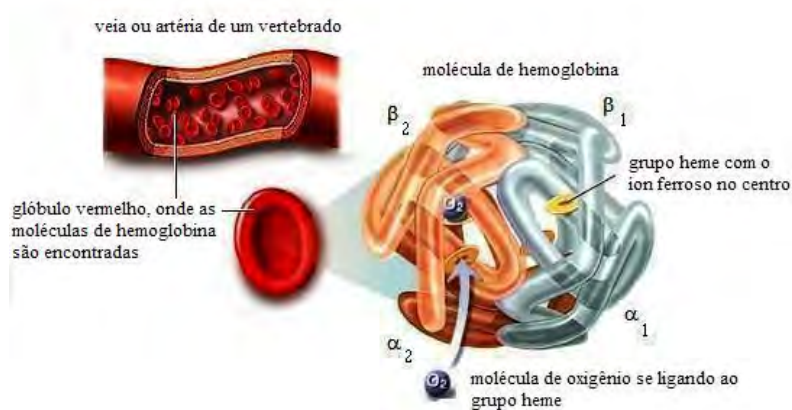


Figura 3. Molécula de Hb de um animal vertebrado. Esta proteína é encontrada principalmente dentro dos glóbulos vermelhos dos vertebrados (MEDLINEPLUS, 2005).

Cada uma de suas quatro cadeias polipeptídicas possui um grupo prostético heme, encaixado em uma cavidade hidrofóbica entre as hélices E e F, que é um complexo de protoporfirina IX, cujo centro contém um Fe^{+2} , onde o oxigênio é reversivelmente ligado (figura 2) (STRYER, 1996). O sistema de anel heterocíclico do heme é um derivado porfirínico, contendo quatro grupos pirrólicos (marcados de A à D) (VOET et al., 2002; MATHEWS e VAN HOLDE, 2000).

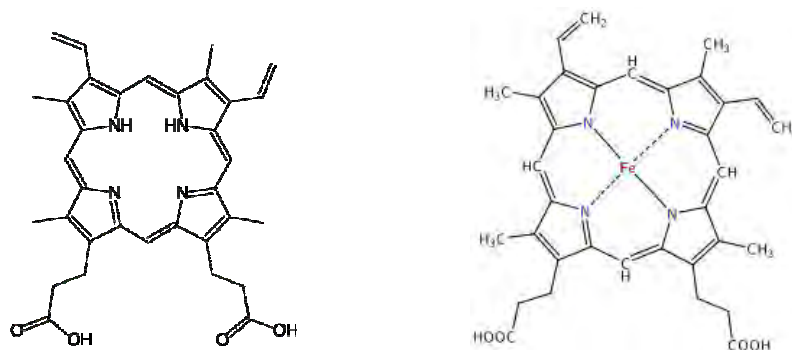


Figura 2. Estrutura da protoporfirina IX (a) e do heme (b) (VOET et al., 2002).

A reversibilidade da ligação do oxigênio é possibilitada pelas hélices das cadeias polipeptídicas que circundam o grupo prostético heme, mantendo-o em um *bolsão* hidrofóbico, que impede a oxidação do Fe^{+2} (BALDWIN, 1975). O Fe^{+2} é coordenado por quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos que formam a protoporfirina e a um átomo de nitrogênio da cadeia lateral da His-F8, denominada histidina proximal. Uma molécula de O_2 atua como um sexto ligante ao átomo de ferro, fazendo uma ponte de hidrogênio com a His-E7 (histidina distal), auxiliando na estabilização deste ligante ao ferro.

Na forma oxidada da Hb, metaHb, o estado de oxidação do ferro é +3, e não há ligação com o oxigênio. Nos glóbulos vermelhos dos vertebrados há um sistema enzimático denominado *meta-hemoglobina redutase*, que converte pequenas quantidades de metaHb formadas espontaneamente ao estado ferroso (VOET et al., 2002).

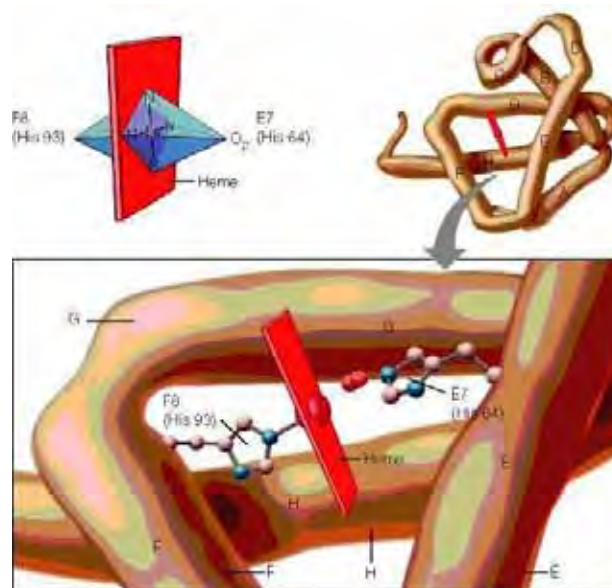


Figura 3. Bolsão do heme. A coordenação octaédrica do átomo de ferro, com os quatro nitrogênios da porfirina com o Fe^{2+} no plano do heme e, a His-F8 e o O_2 na posição axial (MATHEWS e VAN HOLDE, 2000).

1.2.1. Função

A função principal da Hb é o transporte de oxigênio dos órgãos captadores para os tecidos e de parte do dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos para os órgãos captadores (BALDWIN, 1975).

A ligação do oxigênio a Hb ocorre de modo cooperativo, ou seja, a ligação de uma molécula de O₂ ao primeiro sítio de ligação, aumenta a afinidade de ligação das demais moléculas de O₂ aos sítios livres remanescentes. Este efeito de alteração da afinidade de ligação de um sítio devido à ligação do ligante em outro sítio distante é conhecido como fenômeno alostérico. A origem molecular da cooperatividade da ligação de O₂ à Hb está relacionada com as mudanças nas conformações terciária e quaternária da estrutura da Hb induzidas pela ligação de O₂.

As estruturas cristalográficas dos estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado, assim como de estados parcialmente oxigenados de hemoglobinas de várias espécies são conhecidos. Além de pequenas diferenças na estrutura terciária, é notável nestas estruturas a diferença no arranjo quaternário do tetrâmero da desoxiHb em relação à oxihb. Para a HbA₀, por exemplo, a diferença de orientação relativa entre seus dímeros é de cerca de 15° nestas estruturas. Além disto, pontes salinas existentes na estrutura da desoxiHb encontram-se rompidas na estrutura da oxihb (PERUTZ, 1989; BALDWIN, 1975). Estudos termodinâmicos, por outro lado, sugerem que a mudança conformacional na estrutura quaternária da proteína é responsável pela cooperatividade entre os sítios de ligação de O₂ à Hb (ACKERS et al., 1992; IMAI, 1982).

As mudanças na estrutura da Hb, induzidas pela ligação de O₂, geram ainda mudanças no número de prótons, íons monovalentes e divalentes, e moléculas de água associadas à Hb, de forma que a atividade destas moléculas em solução atuam na regulação da afinidade global da proteína pelo oxigênio.

1.2. Regulação alostérica

1.2.1. Ligação de O₂

Quando a ligação de um ligante X a um sítio protéico interfere na ligação de uma outra molécula de X a outro sítio protéico, então a interação alostérica será *homotrópica*, ou seja, uma interação entre ligantes do mesmo tipo. A ligação de O₂ (*efetor homotrópico*) à Hb é um exemplo deste tipo de interação, pois sua ligação a um sítio da proteína facilita a ligação aos demais sítios livres. Quando a ligação de um ligante Y altera a afinidade da ligação de um outro ligante Z à mesma proteína, então a interação alostérica será *heterotrópica*, ou seja, uma interação entre ligantes distintos. Para a Hb, o cloreto (Cl⁻), os fosfatos orgânicos (IHP, ATP, 2,3-BPG), o CO₂, os prótons (H⁺) e a água (H₂O) são *efetores heterotrópicos*, pois influenciam na afinidade da Hb pelo O₂, variando de acordo com a concentração destes íons, com o pH e com a atividade de água (a_w) em solução (COLOMBO et al., 1992; ROLLEMA et al., 1975; ANTONINI e BRUNORI, 1971; MONOD et al., 1965; WYMAN, 1964).

O efeito das interações alostéricas nas propriedades funcionais das proteínas cooperativas é explicado pelos modelos de simetria (modelo MWC) (MONOD et al., 1965) e pelo modelo sequencial (modelo KNF) (KOSHLAND et al., 1966).

No modelo de simetria proposto por Monod e colaboradores (figura 4), as proteínas cooperativas são formadas por mais de uma subunidade, cada uma com um sítio de ligação para cada ligante. Além disso, apresentam dois arranjos quaternários diferentes, cujo equilíbrio é regulado pela saturação do ligante. Em uma dessas estruturas, denominada T, as subunidades estão amarradas por ligações que dificultam as mudanças terciárias necessárias à ligação do substrato. Na outra estrutura, denominada R, as

subunidades estão relaxadas, facilitando a ligação do ligante (MONOD et al., 1965). No caso da Hb, estes dois arranjos quaternários seriam as conformações T (desoxiHb) e R (oxiHb), de baixa e alta afinidade por O₂, respectivamente (VOET et al., 2002; STRYER, 1996). O equilíbrio entre estas conformações protéicas quaternárias é dado por,



onde, à medida que a Hb é oxigenada, a afinidade da proteína pelo O₂ aumenta devido ao deslocamento do equilíbrio, T↔R, na direção da estrutura R.

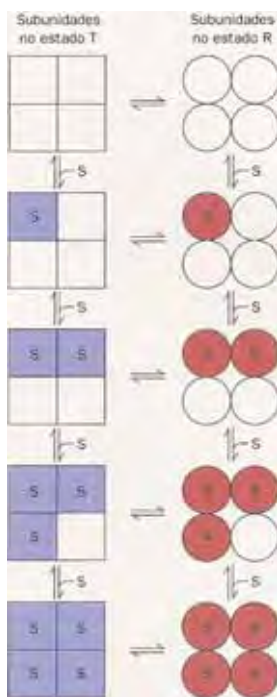


Figura 4. Esquema do modelo de simetria (modelo MWC). Os quadrados representam as subunidades de uma proteína tetramérica no estado T e os círculos, no estado R. Os estados T e R estão em equilíbrio, independentemente do número de ligantes S que tenham ligado à proteína. Se o ligante S ligar mais fortemente à estrutura R do que a T, induzirá a transição T→R, aumentando a afinidade das subunidades livres. Neste modelo, a simetria da proteína é conservada (VOET et al., 2002).

No modelo sequencial proposto por Koshland e colaboradores (KOSHLAND et al., 1966), a ligação do ligante provoca uma alteração conformacional na subunidade a qual se liga, e devido à essas mudanças conformacionais sobre as subunidades vizinhas surgem interações cooperativas. As mudanças conformacionais ocorrem sequencialmente à medida que mais sítios de ligação estão sendo ocupados, como mostra a figura 5.



Figura 5. Esquema do modelo sequencial (modelo KNF). A ligação progressiva do ligante provoca mudanças conformacionais nas subunidades, sendo as maiores mudanças nas subunidades que recebem o ligante. Neste modelo, a simetria da proteína não é preservada (VOET et al., 2002).

A ligação de O_2 à Hb exibe características de ambos os modelos, pois a mudança conformacional quaternária $T \rightarrow R$ é combinada, de acordo com o modelo de simetria, enquanto que a ligação do ligante à conformação T causa mudanças estruturais terciárias, segundo o modelo sequencial.

Assim, a interação dos ligantes heterotrópicos regula a afinidade da proteína por O_2 através de mudanças no equilíbrio alostérico (STRYER, 1996). Consequentemente, é possível determinar o número de moléculas dos ligantes heterotrópicos liberados ou associados à estrutura protéica com a ligação do oxigênio, através da dependência da afinidade da proteína com a atividade do ligante heterotrópico. Esta propriedade da oxigenação da Hb é explorada neste trabalho para determinar as diferenças de hidratação entre os estados oxigenado e desoxigenado da proteína.

1.2.2. Efeito de água

A ligação de O₂ a Hb provoca uma mudança na estrutura da proteína (T→R) e vem acompanhada pela liberação de prótons e ânions (ligados a sítios heterotrópicos), em pH fisiológico, e pelo aumento da superfície protéica exposta ao solvente*.

Esta variação de superfície protéica exposta ao solvente é necessariamente acompanhada pela ligação de um número extra de moléculas de água à proteína, uma vez que a estrutura R é mais hidratada que a estrutura T (COLOMBO et al., 1992; LESK et al., 1985). Este efeito se reflete na dependência da afinidade da Hb por O₂ com a_w.

A fim de estudar o efeito de água na afinidade da proteína por O₂, Colombo e colaboradores, propuseram um método de estresse osmótico para estimar estas variações de hidratação que freqüentemente acompanham reações de macromoléculas biológicas em solução, e demonstraram sua aplicabilidade ao determinarem a diferença de hidratação entre os estados totalmente oxigenado e desoxigenado da HbA₀ (COLOMBO et al., 1992). O princípio do *Método de Estresse Osmótico* consiste em perturbar o equilíbrio das reações bioquímicas modulando as interações água-macromolécula, através de mudanças na atividade do solvente. Como o equilíbrio químico é determinado pelas atividades dos reagentes e produtos, uma reação envolvendo a ligação ou liberação de moléculas de água terá sua posição de equilíbrio também determinada pela atividade de água na solução. O método de estresse osmótico utiliza solutos neutros, como açúcares e polióis (TIMASHEFF e ARAKAWA, 1982), para variar a_w e determinar seu efeito na constante de equilíbrio K de reação (PARSEGIAN et al., 1995; COLOMBO et al., 1992).

* Quando a Hb é oxigenada em pH em torno de 5,5, ocorre o *Efeito Bohr* reverso, ou seja, a oxigenação é acompanhada pela absorção de um próton por mol (BENESCH e BENESCH, 1961).

A análise do efeito de solvatação utiliza a relação de *linkage* químico (equação 2) derivada tanto a partir do *Potencial de Ligação de Wyman* (WYMAN e GILL, 1990; WYMAN, 1964) ou através de *Equações de Gibbs-Duhem* (COLOMBO e BONILLA-RODRIGUEZ, 1996; COLOMBO et. al., 1994, 1992),

$$\left. \frac{d \ln K}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = - (n_w^{final} - n_w^{inicial}) = \Delta n_w \quad (2)$$

Para uma dada reação, a equação 2 prevê que a taxa de variação do logaritmo da constante de equilíbrio (K) com a variação do logaritmo de a_w seja uma constante igual a variação de hidratação (Δn_w). Esta equação, aplicada à oxigenação de hemoglobinas, K assume o valor de P_{50} ,

$$-\left. \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \frac{(n_w^{oxi} - n_w^{desoxi})}{4} = \frac{\Delta n_w}{4} \quad (3)$$

onde, a_i é a atividade de um ligante i que não a água, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas R e T, respectivamente, e 4 é o número de sítios de ligação de O_2 existentes na proteína (SALVAY, 2001; COLOMBO et al., 1992).

A partir da análise da dependência de P_{50} da HbA₀ com a_w , e da análise destes dados com a equação 3, Colombo e colaboradores mostraram que cerca de 70 moléculas de água estão envolvidas na oxigenação da Hb na presença de NaCl (COLOMBO et al., 1992) e, independente da natureza de qualquer outro soluto neutro, o Δn_w permanece sempre próximo de 70 moléculas de água (COLOMBO e BONILLA-RODRIGUEZ, 1996) durante todo o processo de oxigenação. Na análise do efeito dos

solutos neutros sobre as características de ligação de oxigênio à Hb é levado em consideração a possibilidade de ligação direta do soluto com a proteína e o efeito indireto do soluto sobre a_w .

Salvay e colaboradores estimaram o Δn_w da HbA₀, pesando um filme de Hb em uma microbalança de quartzo, na sua oxigenação (SALVAY et al., 2003). Em uma atmosfera de 98% de umidade relativa no ambiente interno da microbalança, monitorando espectrofotometricamente, os autores desoxigenaram e oxigenaram a proteína, e a hidratação, por medidas de frequência de ressonância do cristal de quartzo. A massa seca, eles determinaram, equilibrando, após a oxigenação, o filme de Hb em uma atmosfera de 0% de umidade relativa. Assim, os autores determinaram simultaneamente o Δn_w e as cinéticas de oxigenação da HbA₀, mostrando que a variação de hidratação obtida pela microbalança de quartzo concorda com aquela determinada com o método de estresse osmótico (COLOMBO et al., 1992). Além disso, as medidas diretas do aumento de hidratação da Hb com a oxigenação, espectrofotometricamente, permitiram a determinação concomitante das cinéticas de oxigenação e de hidratação da proteína. Esta combinação de métodos abriu a possibilidade de determinar que o passo limitante da reação cooperativa de oxigênio a Hb é a transição conformacional entre os estados alostéricos T e R.

1.2.3. Efeito do Cl⁻

O Cl⁻, além de ser um efetor alostérico fisiologicamente importante, contribui para a regulação da afinidade da Hb por O₂ de forma a diminuí-la, estabilizando a estrutura T (PERUTZ et al., 1994).

Muitos estudos foram realizados para identificar o sítio de ligação do cloreto à Hb. Durante anos sugeriu-se que essa ligação se daria em sítios específicos da Hb, localizados no resíduo N-terminal Val 1 β_2 e no grupo guanidino da Arg 141 α_1 do resíduo C-terminal (KILMARTIN et al., 1980, 1978; CHIANCONE et al., 1975, 1972). Entretanto, Perutz e colaboradores sugeriram que os efeitos do Cl^- na afinidade da Hb ocorre devido a uma *condensação iônica* (PERUTZ et al., 1994, 1993), ou seja, não existiria um sítio específico para a ligação do Cl^- . Além disso, o excesso de cargas positivas na cavidade central da desoxiHbA₀ se deve à presença de oito resíduos de aminoácidos catiônicos* e três resíduos de aminoácidos aniônicos† (PERUTZ et al., 1993). Neste caso, o excesso de cargas positivas promove o aparecimento de uma repulsão eletrostática, deslocando o equilíbrio de T para R.

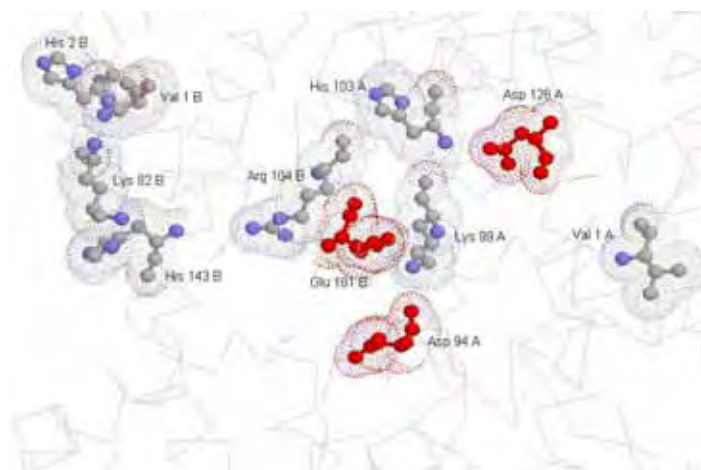


Figura 6. Corte transversal da cavidade central da espécie HbA₀. Os resíduos ● e ● representam os aminoácidos catiônicos, e os resíduos ●, representam os aminoácidos aniônicos‡ (SILVA et al., 1992).

* Cadeia α - Val 1, Lys 99, His 103; Cadeia β - Val 1, His 2, Lys 82, Arg 104, His 143

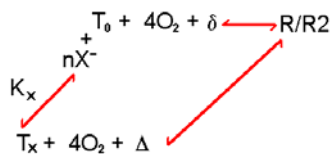
† Cadeia α - Asp 94, Asp 126; Cadeia β - Glu 101

‡ Os resíduos apresentados correspondem somente às cadeias α_1 e β_1 . Estes mesmos resíduos também são encontrados nas cadeias α_2 e β_2 , que juntos somam dezesseis cargas positivas e seis cargas negativas.

Em soluções com concentrações maiores que 10mM de NaCl, o Cl^- interage com a Hb, fazendo a_w variar de forma significativa, podendo alterar o equilíbrio entre as estruturas T e R devido à diferença de hidratação entre elas. Colombo e colaboradores mostraram que a transição $\text{T} \rightarrow \text{R}$ na HbA_0 é acompanhada pela ligação de aproximadamente 70 moléculas de água, para concentrações de NaCl acima de 50mM (COLOMBO et al., 1994).

Em um trabalho posterior Colombo e Seixas (1999), verificaram como Δn_w de oxigenação das espécies HbA_0 e HbBov_{ad} varia com a concentração de NaCl, mostrando que a variação de hidratação associada à oxigenação da Hb é modulada pela ligação preferencial de ânions à estrutura T. Também, que a mudança conformacional $\text{T} \rightarrow \text{R}$ em soluções na ausência de NaCl ou em concentrações menores que 1mM, é acompanhada por uma variação de hidratação de aproximadamente 25 moléculas de água para a HbA_0 . Neste mesmo trabalho, Colombo e Seixas propuseram que a estrutura desoxiHb coexiste em duas conformações alostéricas distintas, ou seja, uma estrutura T, estabilizada quando os íons cloreto estão ligados à ela e uma outra estrutura T, sem ânions ligados (COLOMBO e SEIXAS, 1999).

Durante a transição $\text{T} \rightarrow \text{R}$, na presença de ânions, há um estado intermediário T_0 , no qual estes ânions são liberados da estrutura conforme ocorre a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado T_0 é estabilizado e a transição passa a ser $\text{T}_0 \rightarrow \text{R}$, com uma pequena variação de hidratação. Estes resultados levaram a proposição do modelo de oxigenação da Hb a seguir,



onde X^- é o ligante aniônico, por exemplo, Cl^- , 2,3-BPG ou IHP; δ e Δ representam a diferença de hidratação entre os estados $T_0 \rightarrow R$ e $T_x \rightarrow R$, respectivamente; K_x é a constante de equilíbrio aparente para a ligação de X^- ao estado T da Hb e nX^- é o número aparente de X^- ligados.

A estrutura R também é afetada pela presença da concentração salina da solução, definida pela força iônica da mesma. Silva e colaboradores cristalizaram a carbomoxi-hemoglobina (estrutura semelhante à oxihb) em um ambiente de baixa força iônica e encontraram uma estrutura diferente da R. Este estado, denominado R2, possui uma diferença de rotação entre o dímero $\alpha_2\beta_2$ em relação à forma R. Enquanto na transição $T \rightarrow R$, a rotação do dímero é de 15° , esta rotação é cerca de $22,7^\circ$ na transição $T \rightarrow R2$ (SILVA et al., 1992). Apesar desta diferença, os dois estados possuem afinidades intrínsecas ao O_2 muito parecidas e são praticamente indistinguíveis em solução. Desta forma, existe ainda uma discussão para se definir qual seria o estado oxigenado final da Hb.

Imaizumi e colaboradores estudaram a influência da presença de ânions em solução nas constantes K_R (oxihb) e K_T (desoxihb) (IMAIZUMI et al., 1979). Segundo os autores, a presença de ânions em solução parece não alterar a constante de ligação K_R , diferente do que acontece com a K_T , sustentando que a presença de um estado intermediário estabilizado na ausência de ânions seria um estado desoxigenado alternativo.

A presença de um novo estado estrutural alostérico para a desoxihb foi posteriormente confirmada por outros grupos, em experimentos de oxigenação da HbA_0 encapsulada em sílica-gel, o que impede mudanças quaternárias na proteína, sustentando que este processo ocorre com mudanças terciárias (BRUNO et al., 2001; SHIBAYAMA e SAIGO, 1995).

1.2.4. Efeito da temperatura

Durante a transição estrutural T→R da Hb, várias pontes salinas são quebradas e os contatos presentes nas estruturas terciária e quaternária são refeitos, tal que vários grupos são expostos ao solvente. Em consequência, ligantes heterotrópicos que interagem preferencialmente com o estado T são liberados e uma quantidade extra de água liga-se à nova superfície exposta ao solvente pelo estado R. Em função desta reorganização estrutural da proteína e do solvente, variações de calor, entropia e energia livre de oxigenação da Hb são medidas. Para quantificar as variações das grandezas termodinâmicas citadas acima se faz necessário verificar a dependência mútua entre as curvas de oxigenação obtidas em diferentes temperaturas e na presença de efetores alostéricos.

A determinação do efeito da temperatura no equilíbrio e na cinética de ligação de O₂ à Hb permite determinar, respectivamente, a variação de entalpia de reação e de entalpia de ativação destas reações. Estes valores de $\Delta H_{\text{observado}}$ contêm contribuições devido à ligação de O₂ (ΔH_{O_2}), a mudanças estruturais na Hb ($\Delta H_{\text{configuração}}$), à ligação de um número Δn_w extra de moléculas de água à superfície protéica ($\Delta n_w \times \Delta H_w$) e à liberação de Δn_i prótons e ânions que ocorrem na transição T→R ($\sum \Delta n_i \times \Delta H_i$, onde $i = H^+, Cl^-$), isto é (ATKINS e DE PAULA, 2002),

$$\Delta H_{\text{observado}} = \Delta H_{O_2} + \Delta H_{\text{configuração}} + \Delta n_w \times \Delta H_w + \sum \Delta n_i \times \Delta H_i \quad (4)$$

Nesta equação, o termo de entalpia de solvatação corresponde à soma,

$$\Delta H_{\text{solvatação}} = \Delta H_{\text{configuração}} + \Delta n_w \times \Delta H_w \quad (5)$$

que é proporcional à variação de hidratação associada à oxigenação (CAÔN FILHO, 2003).

Existem evidências sugerindo que o termo de entalpia, associado à liberação de íons da estrutura da Hb, seja praticamente nulo, uma vez que estas interações são de origem eletrostática (BUCCI e FRONTICELLI, 1985). Então, desprezando este termo tem-se,

$$\Delta H_{\text{observado}} = \Delta H_{O_2} + \Delta H_{\text{configuração}} + \Delta n_w \times \Delta H_w \quad (6)$$

Trabalhos anteriores mostraram que o número de moléculas de água, determinado por estresse osmótico, é diretamente proporcional à variação de superfície acessível ao solvente (ASA) na transição T→R (COLOMBO et al., 1992). Como esta variação de área também reflete as mudanças conformacionais que contribuem para a entalpia conformacional, é possível supor que a variação de entalpia de solvatação é proporcional a Δn_w , e a equação 6 se simplifica,

$$\Delta H_{\text{observado}} = \Delta H_{O_2} + \Delta n_w \times (\Delta H_{\text{configuração}} + \Delta H_w) \quad (7)$$

onde $\Delta H_{\text{configuração}} + \Delta H_w$ representam a soma da variação de entalpia conformacional e da entalpia de hidratação por molécula de água, respectivamente, tal que a variação de entalpia de solvatação por molécula de água será dada por,

$$\delta H_{\text{solvatação}} = (\Delta H_{\text{configuração}} + \Delta H_w) \quad (8)$$

Substituindo a equação 8 em 7,

$$\Delta H_{\text{observado}} = \Delta H_{O_2} + \Delta n_w \times \delta H_{\text{solvatação}} \quad (9)$$

Esta expressão prevê que a energia de solvatação da superfície exposta pela Hb devido à transição entre as estruturas T e R pode ser obtida a partir da correlação existente entre a variação de entalpia de hidratação de diversas espécies de hemoglobinas.

Caôn Filho (2003) determinou valores de Δn_w e de entalpia de oxigenação da HbA₀ em função da concentração de Cl⁻, e demonstrou que $\Delta H_{\text{observado}}$ está linearmente correlacionado com Δn_w . A partir destas medidas foi possível fazer a determinação inicial de $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$ (CAÔN FILHO e COLOMBO, manuscrito). Estes resultados apontam que é possível relacionar $\Delta H_{\text{observado}}$ e Δn_w de oxigenação através da equação 09.

1.3. Hemoglobinas estudadas

A variação de hidratação, bem como as variações de entalpia e entropia associadas à reação da proteína com o O₂, variam entre as diferentes espécies de Hb e, dentro de cada espécie, com a concentração de ânions. Assim, as espécies de hemoglobinas estudadas foram: Bovina adulta (HbBov_{ad}) e fetal (HbBov_{fet}), Equina (HbEq) e do molusco *Scapharca inaequalvis* (HbI), cujos dados experimentais foram obtidos na literatura, permitindo comparar e estender os estudos anteriormente realizados com a espécie Humana adulta (HbA₀) (CAÔN FILHO, 2003).

A seqüência de resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas destas espécies de Hb, uma descrição de cada uma delas e o alinhamento com as cadeias da HbA₀ (HbBov_{ad} e HbEq) e da HbF* (HbBov_{fet}) estão no Anexo A.

* Hemoglobina humana fetal

2. OBJETIVOS

O estudo experimental da contribuição energética da solvatação para a estabilidade de macromoléculas biológicas e para o controle de reações bioquímicas tem sido bastante explorado, devido à sua importância para o entendimento dos mecanismos de ação destas moléculas, através do método do estresse osmótico proposto por Colombo e colaboradores (COLOMBO et al., 1992). Esta metodologia permite determinar a variação de hidratação de uma proteína associada aos rearranjos moleculares que acompanham a associação de um ligante. Isto é possível porque a variação de hidratação da superfície macromolecular está associada a uma variação de energia livre de Gibbs, que é modulada pela atividade da água do tampão, e é proporcional ao número estequiométrico de moléculas de água que participam da reação.

A oxigenação das espécies HbA₀ e HbBov_{ad} promove mudanças conformacionais na proteína com o conseqüente aumento de suas superfícies expostas ao solvente. Os números de moléculas de água associados a estas reações tem sido determinados em diversas condições experimentais e na ausência ou na presença dos efetores alostéricos Cl⁻, 2,3-BPG e IHP. Estes resultados mostraram que a variação de hidratação das espécies de Hb com a oxigenação, depende da espécie considerada e da interação destas espécies com àqueles efetores alostéricos (TOSQUI, 2004; CAÔN FILHO, 2003; COLOMBO e SEIXAS, 1999; COLOMBO e BONILLA-RODRIGUEZ, 1996; COLOMBO et al., 1994, 1992).

Conforme proposto por Colombo e Seixas (1999), a dependência de Δn_w com a concentração de efetores aniônicos se deve às mudanças terciárias na estrutura quaternária T, induzidas pela ligação preferencial do Cl⁻ a esta conformação (TOSQUI, 2004; SALVAY et al., 2003; CAÔN FILHO, 2003; CASTRO, 1999; COLOMBO e SEIXAS, 1999; SEIXAS et al., 1999; COLOMBO et al., 1994). Além disso, há evidências na literatura que o Δn_w de oxigenação varia também para hemoglobinas de outras espécies,

por exemplo, do bagre *Hoplosternum litoralle* (PERES et al., 2004), da truta *Oncorhynchus mykiss* (HUNDAHL et al., 2003), da enguia *Anguilla anguilla* (HUNDAHL et al., 2003), do molusco *Scapharca inaequivalvis* (CHIANCONE e BOFFI, 2000), da cascavel *C. durissus terrificus* (LOMBARDI et al., 2006) e em hemocianinas, como por exemplo da tarântula* *Eurypelma californicum* (HELLMANN et al., 2003).

Além dos valores de Δn_w de oxigenação variarem de espécie para espécie de Hb e devido a interações específicas com efetores alostéricos, os valores de entalpia de reação também variam. Em estudo prévio, Caôn Filho (2003) determinou os valores de hidratação e de entalpia de oxigenação da espécie HbA₀ em função da atividade de íons cloreto. Estes resultados demonstraram que a variação de entalpia de oxigenação desta espécie está linearmente correlacionada com o Δn_w da reação. A análise destes dados considerou as diversas contribuições para o calor de reação, levando à preposição de que o efeito do Cl⁻ sobre o valor de ΔH de oxigenação é indireto, e está associado à variação do número de moléculas de água que se liga à Hb na transição T→R. A partir destes resultados, Caôn Filho avaliou $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$.

Com base nestas informações, exploraremos os valores de Δn_w e ΔH de oxigenação das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fét} e HbEq, além da HbI, em diferentes condições de solução, o que nos permitirá estender os estudos anteriormente realizados com a espécie HbA₀ (CAÔN FILHO, 2003), verificando se a correlação entre estes parâmetros pode se aplicada para as demais espécies de Hb. Como objetivo geral, buscaremos determinar a entalpia e a entropia associada à solvatação de superfícies protéicas em meio aquoso.

* Nesta espécie, a hemocianina é o transportador de oxigênio e está presente dentro da hemolinfa de muitos artrópodes e moluscos. A principal diferença da hemoglobina dos vertebrados para a hemocianina é o fato de em vez do ferro, possui cobre onde o O₂ é reversivelmente ligado. A oxigenação causa uma mudança de cor da solução, ou seja, sua forma desoxigenada é incolor (Cu⁺) enquanto que sua forma oxigenada é azul (Cu²⁺) (HELLMANN et al., 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Purificação da Hb

O procedimento experimental utilizado na purificação das hemoglobinas é baseado na metodologia proposta por Williams e Tsay (1973). As amostras de sangue de cavalo, boi e bezerro recém-nascido para a preparação da HbEq, HbBov_{ad} e HbBov_{fet}, respectivamente, foram cedidas pelo Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP - São José do Rio Preto). O sangue dos animais foi coletado por punção intravenosa com seringas heparinizadas. Após a coleta do sangue, o plasma foi retirado por centrifugação a 489xg em 4°C. As hemácias foram lavadas cinco vezes em uma solução salina tamponada (0,9% NaCl + 50mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH 8,5), onde o volume de tampão adicionado é três vezes maior do que o volume de glóbulos vermelhos decantados.

A hemólise ocorre com a adição de uma solução hipotônica (50mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH 8,5). A retirada dos *debris** ocorreu com a adição de clorofórmio (MERCK), no mesmo volume que a solução da amostra, sob agitação constante. Neste ponto, o sistema forma duas fases, sendo uma polar (com as proteínas) e outra apolar (com os debris). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 414xg por 2 horas em 4°C. Novamente, o sobrenadante foi coletado e a amostra foi dialisada em 2 litros de tampão de diálise (50mM Tris-HCl + 1mM EDTA pH 8,5) por 12 horas em 10°C para a remoção de fosfatos.

Na cromatografia de troca iônica os tampões utilizados foram: um tampão inicial (15mM Tris-HCl pH 8,4) e outro tampão final (15mM BisTris-HCl pH 7,0).

* Fragmentos da membrana que envolve o glóbulo vermelho

Cerca de 4,5g da resina DEAE-SEPHADEX A-50 PHARMACIA foi adicionada em aproximadamente 350ml do tampão inicial por 12 horas em 25°C, sendo este o tempo indicado pelo fabricante para a hidratação da resina. Após a hidratação da resina, a coluna XK-50 PHARMACIA é montada em 25°C e equilibrada em uma câmara fria à temperatura próxima de 10°C com o tampão inicial. Com a coluna equilibrada, a amostra de Hb foi aplicada à coluna e lavada com tampão inicial (\cong 700ml) por 12 horas. Em pH 8,4 a proteína possui carga efetiva negativa, o que resulta na retenção da Hb pelos cátions da resina. O passo seguinte foi acoplar a coluna à um sistema de FPLC modelo LKB da PHARMACIA e a um banho térmico de circulação NESLAB RTE 111 com a temperatura mantida constante em 4°C.

O FPLC forma um gradiente de pH devido à mistura dos tampões inicial e final, permitindo a eluição da amostra pela coluna. O gradiente foi iniciado em 50% (V/V) de tampão inicial e final, sendo que a concentração do tampão final foi gradativamente elevada até atingir 100%, onde ocorre o desprendimento da fração de interesse de cada Hb. O fluxo de saída de tampão pela coluna foi de 4ml/min.

A HbBov_{ad} (FRONTICELLI e BUCCI, 1994; NAGEL e CHANG, 1981) e a HbBov_{fet} possuem apenas uma fração protéica. Já a HbEq possui 2 frações, sendo uma com ponto isoelétrico em 6,5 (fração de interesse) e outra entre 6,7-6,8, correspondendo a 80% e 20%, respectivamente, do total de Hb (GIARDINA et al., 1990).

Após a eluição da fração de interesse de cada espécie de Hb, as amostras foram concentradas por ultrafiltração em 4°C, utilizando concentradores CENTRIPREP[®] MILLIPORE até um volume de aproximadamente 30ml. Posteriormente, uma coluna de troca iônica mista AMBERLITE MB-1 SIGMA foi equilibrada com água destilada, deionizada, e filtrada em filtro MILLI-Q PLUS MILLIPORE gelada (\cong 5°C) e então, as

amostras foram passadas por, no mínimo, cinco vezes para que quaisquer íons contidos nas mesmas ficassem ligados à resina.

Em seguida, as amostras foram novamente concentradas por ultrafiltração a 4°C em concentradores CENTRIPREP® MILLIPORE até atingirem uma concentração de aproximadamente 3mM/heme e então, foram armazenadas em alíquotas de 250µl em N₂ líquido. Ao final destes procedimentos, a pureza das amostras foi checada através de uma eletroforese não desnaturante PAGE, corada por impregnação de nitrato de prata (LAEMMLI, 1970).

3.2. Determinação da concentração protéica e frações oxiHb e metaHb

A determinação da concentração protéica foi realizada com base no método quantitativo espectrofotométrico (RIGGS, 1981). O espectrofotômetro de varredura utilizado nos experimentos foi um VARIAN CARY 3E UV-VISIBLE.

A equação 10 possibilita o cálculo da concentração da proteína, [Hb], a partir das absorvâncias (Abs) medidas em um dos picos característicos da oxiHb ($\lambda = 540$ ou 576nm) e do valor correspondente à linha de base (700 nm),

$$[Hb] = \frac{(Abs_{576} - Abs_{700}) \cdot (V_{diluição} + V_{Hb})}{(\epsilon_{576} \cdot V_{Hb})} \quad (10)$$

onde a concentração da Hb é expressa em mM/heme, o termo ($V_{diluição} + V_{Hb}$) representa o volume total de amostra na cubeta (tampão + Hb) e ϵ_{576} é o coeficiente de extinção molar para a oxiHb em $\lambda = 576$ nm (BENESCH et al., 1973).

O átomo de ferro presente nos grupos heme da Hb, pode sofrer auto-oxidação, passando de $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$. Quando isso ocorre forma-se a metaHb, que não liga O_2 (VOET, et al., 2002). *In vivo*, os níveis de metaHb são mantidos baixos pelo sistema enzimático *meta-hemoglobina redutase*. *In vitro*, como este sistema enzimático não está presente, então alíquotas de catalase* e superóxido dismutase† foram adicionadas às soluções para evitar a formação de radicais livres, e assim, impedir a auto-oxidação do Fe^{+2} (BENESCH et al., 1973). Como a presença de metaHb acima de 5% pode adulterar os resultados, é importante checar ao final da purificação, assim como ao final de cada experimento, a concentração de metaHb presente.

Para isso, utilizamos as equações descritas abaixo,

$$A_{576} = [oxiHb] \varepsilon_{576}^{oxi} l + [metaHb] \varepsilon_{576}^{meta} l \quad (11)$$

$$A_{630} = [oxiHb] \varepsilon_{630}^{oxi} l + [metaHb] \varepsilon_{630}^{meta} l \quad (12)$$

onde [metaHb] e [oxiHb] são as concentrações molares da proteína oxidada e não oxidada, respectivamente, e l é o caminho ótico da cubeta (RIGGS, 1981). Os valores dos coeficientes de extinção molar determinados em pH 7,2 e nos comprimentos de ondas em 630nm e em 576nm, tanto para a oxiHb quanto para a metaHb, utilizados nos cálculos são aqueles determinados por Benesch e colaboradores (BENESCH et al., 1973),

$$\varepsilon_{630}^{oxi} = 0,14 \text{ mM.heme}^{-1}.\text{cm}^{-1} \quad \text{e} \quad \varepsilon_{576}^{oxi} = 15,8 \text{ mM.heme}^{-1}.\text{cm}^{-1} \quad \text{para a oxiHb}$$

$$\varepsilon_{630}^{meta} = 3,76 \text{ mM.heme}^{-1}.\text{cm}^{-1} \quad \text{e} \quad \varepsilon_{576}^{meta} = 4,14 \text{ mM.heme}^{-1}.\text{cm}^{-1} \quad \text{para a metaHb}$$

* Extraída do fígado bovino C-9322 SIGMA

† Extraída do eritrócito bovino S-2515 75KU SIGMA

3.3. Medidas de osmolalidades

As osmolalidades das soluções contendo Hb foram determinadas por medidas de depressão do ponto de congelamento da solução, utilizando um osmômetro OSMETTE A 5002 PRECISION SYSTEM INC.. Após a obtenção das curvas de oxigenação da Hb, em cada condição experimental, utilizando a sacarose como soluto neutro para variar a osmolalidade, ou seja, para variar a_w das soluções, as osmolalidades são medidas. O logaritmo de a_w foi então calculado através da relação (COLOMBO e BONILLA-RODRIGUEZ, 1996),

$$\ln a_w = \frac{\Delta_{dpc}}{K_{cc} M_w} = -\frac{osm}{55,5} \quad (13)$$

onde Δ_{dpc} é o decréscimo do ponto de congelamento, K_{cc} é a constante crioscópica dada por 1860Kg/mol, M_w é a molaridade da água pura (55,5) (ATKINS e DE PAULA, 2002).

3.4. Determinação das curvas de oxigenação

Para estudar a saturação de O_2 da Hb em função da pO_2 , é acompanhada a variação espectral que a Hb apresenta em seus estados oxigenado e desoxigenado (figura 7). O espectro de absorção de luz visível característico da Hb em seu estado totalmente oxigenado apresenta picos em 540nm e 576nm e o espectro absorção da Hb totalmente desoxigenada apresenta um pico em 550nm. Como pode ser observado na figura 7, conforme a Hb passa de seu estado oxigenado para o desoxigenado, é observada uma

variação de absorção espectral característica do grupo heme na região do espectro visível (450 a 700nm).

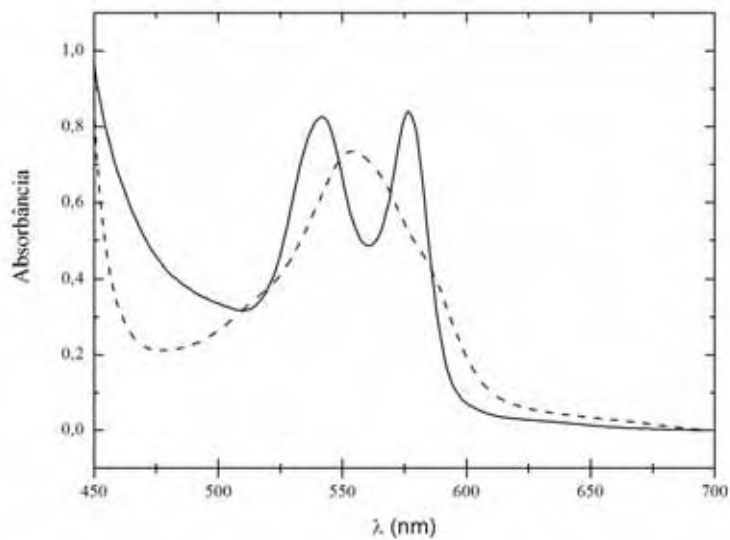


Figura 7. Espectros de absorção da desoxiHb (linha tracejada) e da oxiHb (linha contínua) na região do visível para a espécie HbEq (60 μ M/heme) em 10mM HEPES pH 7,2, obtidos com um espectrofotômetro de varredura VARIAN CARY 3E UV-VISIBLE. As regiões intermediárias entre os espectros são referentes às diferentes saturações que a Hb apresenta durante o processo de desoxigenação e/ou de oxigenação.

A absorbância de uma espécie cromófora é dada pela *Lei de Beer-Lambert*, ou seja,

$$Abs = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C \quad (14)$$

onde I_0 e I são as intensidades da luz incidente e emergente da amostra, respectivamente, C é a concentração molar da amostra, ℓ é o caminho óptico percorrido pela luz na amostra,

dado em cm, ε_{λ} é o coeficiente de extinção molar do cromóforo, no comprimento de onda λ dado em $M^{-1}.cm^{-1}$ e Abs é a absorvância anteriormente definida (TINOCO JR. e SAUER, 1995).

A absorvância de uma amostra no comprimento de onda λ , contendo duas espécies cromóforas de coeficientes de extinção molar ε_{λ_1} e ε_{λ_2} , e concentrações C_1 e C_2 , respectivamente, é dada por,

$$Abs_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda_1} \cdot C_1 \cdot \ell + \varepsilon_{\lambda_2} \cdot C_2 \cdot \ell \quad (15)$$

Para uma reação na qual ocorre a interconversão da espécie 1 em 2 ou vice e versa, a absorvância medida varia, dependendo de quanto ε_{λ_1} difere de ε_{λ_2} , portanto, pode ser acompanhada espectrofotometricamente.

Neste estudo acompanhamos a oxigenação das espécies de Hb pela variação da absorção em $\lambda = 576nm$, que corresponde a um dos picos da absorção da oxiHb. Neste comprimento de onda, o coeficiente de extinção molar da oxiHb é 15,8heme/mM.cm e da desoxiHb é 0,98heme/mM.cm (BENESCH et al., 1973). As curvas de oxigenação foram determinadas pelo método tonométrico-espectrofotométrico (ROSSI-FANELLI e ANTONINI, 1958; RIGGS e WOLBACH, 1956).

3.5. Método tonométrico-espectrofotométrico

O tonômetro é formado por um corpo principal de vidro, uma válvula que controla a entrada e a saída dos gases, uma saída conectora vedada com uma tampa de borracha por onde são feitas as adições de oxigênio, e uma cubeta acoplada, onde fica a

amostra com volume de 2500 μ l. A figura 8 mostra a representação esquemática de um tonômetro.

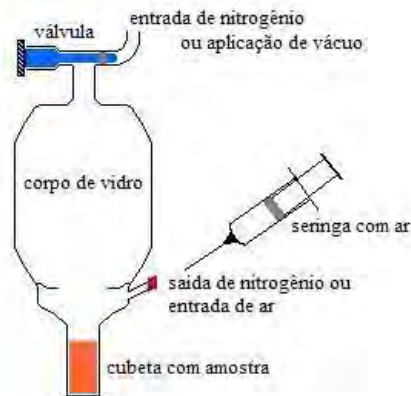


Figura 8. Representação esquemática do tonômetro utilizado nos experimentos. Com uma seringa, injeta-se um volume conhecido de ar dentro do tonômetro (TOSQUI, 2004).

Após preparar a amostra nas condições desejadas para o experimento, esta é aplicada no tonômetro e é medido um espectro de absorção da solução contendo a Hb oxigenada. Em seguida, é feito vácuo dentro do tonômetro e esta solução é desoxigenada através da passagem de nitrogênio gasoso, por cerca de 3 minutos. Em seguida, novamente é feito vácuo dentro do tonômetro. Então, o tonômetro é colocado em um banho termostatizado por 6 minutos para a estabilização da amostra na temperatura desejada para o experimento e, então, outro espectro de absorção é medido, agora com a Hb totalmente desoxigenada. Logo, os valores de absorção da Hb nas duas condições extremas são obtidos e, dessa maneira, é possível calcular a fração de saturação com qualquer outro espectro intermediário. Assim, iniciam-se as adições de O₂ por meio de uma seringa e, após cada adição, o tonômetro foi agitado por 6 minutos dentro do banho termostatizado,

para que a solução fique equilibrada e na temperatura de trabalho. Em seguida, um novo espectro é medido. Este processo se repete até que a solução fique totalmente oxigenada.

A pO_2 no tonômetro foi calculada a partir do volume de ar injetado V_i , da pO_2 na atmosfera (P_0^*) e do volume da fase gasosa no tonômetro V_t ,

$$pO_2 = \frac{(P_0 \cdot V_i)}{V_t} \quad (16)$$

O grau de saturação \bar{Y} foi calculado em cada valor de pO_2 a partir das leituras de absorvância da oxiHb e da desoxiHb no comprimento de onda de 576nm.

Os parâmetros funcionais P_{50} e n_{50} foram calculados a partir do gráfico de Hill, definido a partir do equilíbrio hipotético (HILL, 1913),



onde n é o número de moléculas de oxigênio que se ligam à proteína e K é a constante de dissociação de O_2 dada por,

$$K = \frac{[Hb][O_2]^n}{[Hb(O_2)_n]} \quad (18)$$

onde $[Hb(O_2)_n]$ é a concentração de Hb totalmente oxigenada, $[Hb]$ é a concentração da Hb totalmente desoxigenada, $[O_2]^n$ é a atividade do oxigênio livre em solução (BALDWIN, 1976).

* O valor da pressão ambiente utilizado nos experimentos foi 147,25mmHg e não foi corrigido com a pressão de vapor ambiente.

Sua saturação fracional de O₂ (\bar{Y}),

$$\bar{Y} = \frac{n [Hb(O_2)_n]}{n ([Hb] + [Hb(O_2)_n])} \quad (19)$$

onde expressando-se [O₂] em termos de pO₂, combinando as equações 18 e 19, fazendo alguns rearranjos e expressando a equação na sua forma logarítmica, chega-se à *Equação de Hill* (FERMI et al., 1984; PERUTZ, 1979; BALDWIN, 1976),

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = n \log(pO_2) - \log(K) \quad (20)$$

Com os valores de \bar{Y} e de pO₂, o *Gráfico de Hill* é construído, como mostra a figura 6. O gráfico $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)$ versus $\log(pO_2)$, chamado Gráfico de Hill, descreve a ligação de O₂ à Hb. O grau de cooperatividade é representado pelo Coeficiente de Hill, n₅₀, obtido pela inclinação do Gráfico de Hill no ponto médio $\bar{Y} = 0,5$, conforme a expressão,

$$n_{50} = \left. \frac{d \log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)}{d \log(pO_2)} \right|_{\bar{Y}=0,5} \quad (21)$$

A determinação de n₅₀ ocorre no intervalo de saturação de O₂ de 20 a 80%. (IMAI, 1982). Para n₅₀ > 1, a equação 19 descreve uma sigmóide, indicando a presença de sítios idênticos com diferentes afinidades pelo ligante. Quando n₅₀ = 1, a equação 19 descreve uma hipérbole, representando uma reação de ligação de O₂ não-cooperativa ou

ausência de cooperatividade (VOET et al., 2002). Para a Hb de mamíferos em condições fisiológicas normais, o valor de n_{50} está entre 2,8 e 3,0, indicando que a ligação do O_2 à Hb é altamente cooperativa (VOET et al., 2002; STRYER, 1996).

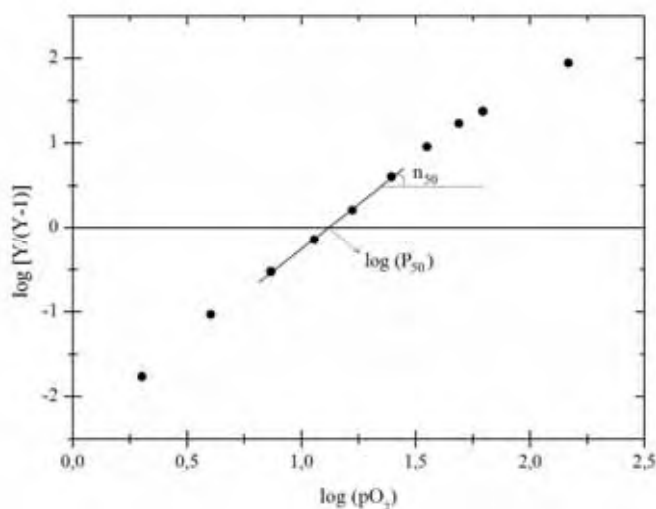


Figura 9. Gráfico de Hill para uma solução contendo a espécie HbBov_{fet} (60μM/heme) em 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2 à 298K. A afinidade (P_{50}) é obtida da interseção deste gráfico com o eixo $\log(pO_2)$ e a cooperatividade (n_{50}) é calculada a partir da inclinação do mesmo.

A afinidade da Hb por O_2 , P_{50} , é a pressão correspondente a 50% de saturação dos sítios de ligação de O_2 . O valor de P_{50} é obtido da interseção do gráfico de $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)$ com o eixo de $\log(pO_2)$, quando $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)=0$ (IMAI, 1982; BALDWIN, 1976).

Considerando que o ambiente interno do tonômetro apresenta uma pequena diferença de temperatura em relação ao ambiente externo, então para as diversas condições experimentais uma correção do cálculo da P_{50} foi necessária.

Da primeira lei da termodinâmica, a *equação de estado* de um gás perfeito é definida por,

$$PV = nRT \quad (22)$$

Quando uma quantidade de gás (n) está sujeita a temperaturas (T) e pressões (P) diferentes, ocupando um mesmo volume (V) e sabendo que R é a constante universal dos gases, então, reescrevendo e rearranjando a equação 22 para as condições inicial (1) e final (2) deste gás,

$$P_2 = P_1 \cdot \frac{T_2}{T_1} \quad (23)$$

Reescrevendo a equação 23 em termos de P_{50} ,

$$P_{50_{\text{corrigida}}} = P_{50} \cdot \frac{T_{\text{exp}}}{T_0} \quad (24)$$

onde T_{exp} é temperatura em que o experimento está sendo realizado e T_0 é a temperatura do ar injetado no tonômetro (298K).

3.6. Determinação dos parâmetros termodinâmicos através das Equações de van't Hoff

A análise do efeito da temperatura na afinidade das espécies de Hb pelo oxigênio foi realizada considerando que a variação de energia livre de oxigenação da Hb (δG_{O_2}), calculando o trabalho para transferir δn_{O_2} moléculas de oxigênio do estado de referência, onde o potencial químico do ligante ($\mu_{O_2}^0$) para a proteína em meio no qual o potencial químico do ligante é μ_{O_2} , através da expressão (WYMAN, 1964),

$$\delta G_{O_2} = (\mu_{O_2} - \mu_{O_2}^0) \delta n_{O_2} = (RT \ln pO_2) \delta n_{O_2} \quad (25)$$

Considerando um mol de Hb, o trabalho total de oxigenação ou a variação de energia livre total de oxigenação da proteína entre o seu estado totalmente desoxigenado e seu estado totalmente oxigenado, é dado pela integral,

$$\Delta G_{O_2} = G_{oxi} - G_{desoxi} = \int_0^4 RT \ln pO_2 \delta n_{O_2} = RT \ln P_m \quad (26)$$

onde R é a constante universal dos gases dada por 1,987cal/mol.K, T é a temperatura em Kelvin e P_m é a atividade média do ligante.

Para curvas de oxigenação simétricas em torno do valor de pO_2 onde a Hb encontra-se 50% oxigenada, P_m é numericamente igual a P_{50} . P_{50} , por sua vez, esta relacionado com a constante de equilíbrio de associação de quatro moléculas de O_2 , definida no *modelo de ligação seqüencial de Adair* (WYMAN e GILL, 1990; IMAI, 1982), $K = k_1 k_2 k_3 k_4$, onde k_i é a constante de ligação do i-ésimo ligante, pela relação abaixo,

$$P_{50}^0 = \frac{1}{(k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4)^4} \Rightarrow P_{50}^0 = K^{-\frac{1}{4}} \quad (27)$$

Combinando as equações 26 e 27, tem-se que a variação de Energia Livre de Gibbs (ΔG) de oxigenação da Hb e dada por,

$$\Delta G = RT \ln(P_{50}) \quad (28)$$

A equação 28 fornece o valor de energia livre de Gibbs de oxigenação por mol de O_2 ligado por heme da Hb. Para se obter o valor de ΔG para ligar as quatro moléculas de O_2 à Hb deve-se multiplicar este valor por quatro.

Da segunda lei da termodinâmica, a variação da Energia Livre de Gibbs é definida por,

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (29)$$

Combinando as equações 28 e 29, a expressão é obtida,

$$RT \ln(P_{50}) = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (30)$$

Que reescrita,

$$R \ln(P_{50}) = \frac{\Delta H}{T} - \Delta S \quad (31)$$

Derivando a equação 31 em função da temperatura,

$$R \frac{d \ln P_{50}}{dT} = \frac{d\Delta H}{dT} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta H}{T^2} \quad (32)$$

Quando a variação de capacidade calorífica (ΔC_p) é nula, ou seja, quando ΔH é independente da temperatura, integrando a equação 32 em função do inverso da temperatura, e derivando a equação resultante também em função do inverso da temperatura, tem-se a *Equação de van't Hoff*,

$$\left. \frac{d \ln P_{50}}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \right|_{a_i} = \frac{\Delta H}{R} \quad (33)$$

A inclinação do gráfico de $\ln(P_{50})$ em função de $\frac{1}{T}$ fornece o valor do calor de oxigenação por grupo heme (ΔH).

Quando ΔH é dependente da temperatura, sabendo-se que na temperatura de referência T_0 , os valores da entalpia de van't Hoff em P_{50} são dados por ΔH_0 , e integrando a equação 32 em função da temperatura, chega-se à *Equação de van't Hoff Integrada*,

$$\ln \left(\frac{P_{50}}{P_{50}^0} \right) \Big|_{a_i} = \frac{\Delta H_0 - T_0 \Delta C_p \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) - \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_0} \right)}{R} \quad (34)$$

Além da variação de entalpia de oxigenação (ΔH), é possível estimar a variação de capacidade calorífica associada a esta reação (ΔC_p) (DOYLE e HENSLEY, 1998; WEBER, 1995; LIU e STURTEVANT, 1995; NAGHIBI et al., 1995), a partir do ajuste não linear da equação 34 aos dados experimentais apresentados nos gráficos de $\ln(P_{50})$ em função de T.

O subscrito a_i , nas equações 33 e 34, determina que a afinidade de oxigênio seja mantida constante às atividades de quaisquer outros ligantes alostéricos presentes na solução, por exemplo, pH, concentração iônica, entre outros (TINOCO JR. e SAUER, 1995; IMAI, 1982).

A variação de entropia de oxigenação (ΔS) foi estimada através da equação 29, utilizando-se os valores de ΔG_0 (equação 28) e ΔH_0 , obtidos na temperatura de referência T_0 .

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de a_w sobre a afinidade da Hb de diferentes espécies por O_2

O efeito da adição de solutos neutros sobre a afinidade das espécies HbBov_{ad} (Bovina adulta), HbBov_{fet} (Bovina fetal) e HbEq (Equina) foi medido em tampão 10mM Hepes pH 7,2 (Hepes 7,2) e 10mM Ches pH 9,0 (Ches 9,0) a 298K, na ausência e presença de 100mM NaCl em várias concentrações de sacarose. Todos os dados foram obtidos pelo método tonométrico-espectrofotométrico.

A figura 10 mostra as curvas de saturação parcial de O_2 da espécie HbBov_{fet} em função do $\log(pO_2)$ determinadas em diferentes concentrações de sacarose. Estes experimentos foram realizados com o objetivo de determinar Δn_w da proteína durante a sua oxigenação, na ausência e na presença de 100mM NaCl. A figura 10(a) mostra as curvas de oxigenação da espécie HbBov_{fet} na ausência de NaCl. Os dados indicam que mudanças na atividade de água (a_w) não alteram a afinidade da proteína pelo O_2 . Diferentemente disto, a figura 10(b) mostra as curvas de oxigenação desta mesma espécie na presença de 100mM NaCl. Observa-se um aumento em P_{50} com a diminuição de a_w . Este efeito ocorre, pois ao adicionar solutos neutros e, conseqüentemente, diminuir a_w da solução, o equilíbrio alostérico $T \leftrightarrow R$ desloca-se na direção da estrutura menos hidratada e de menor afinidade pelo O_2 , ou seja, desloca-se para a estrutura T.

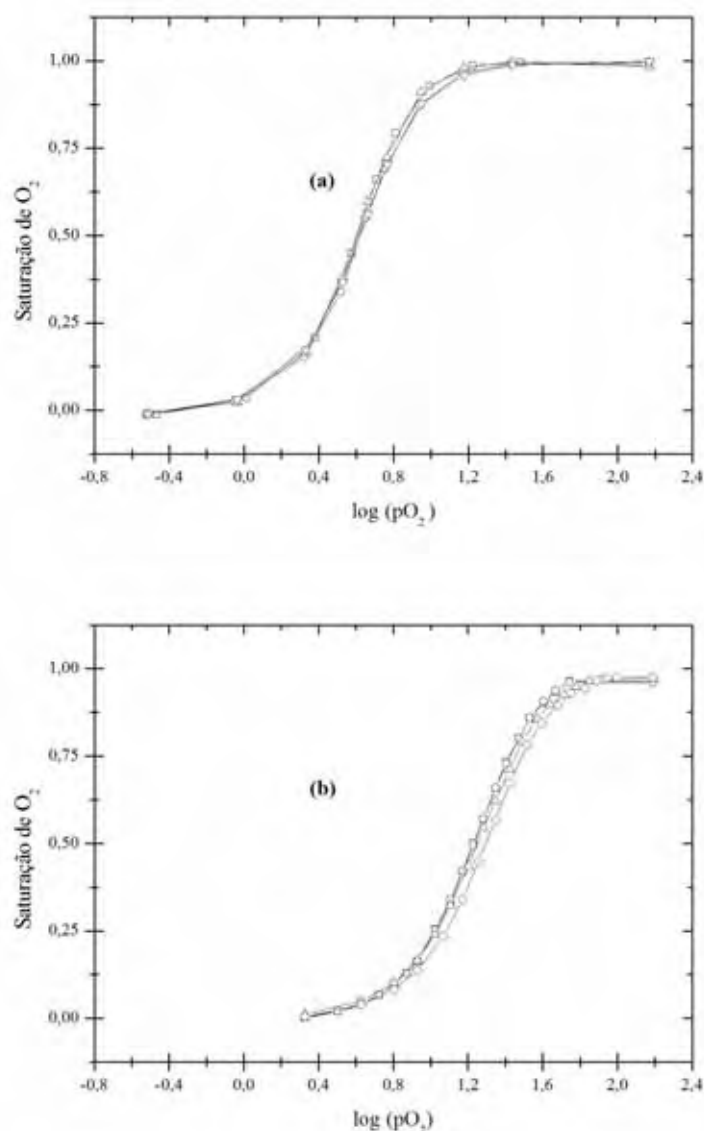


Figura 10. Comportamento da afinidade da espécie HbBov_{fet} (60μM/heme) por O₂ em soluções contendo (a) Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (▽), com osmolaridades 0,020, 0,356, 0,808 e 1,441osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P₅₀, ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Hepes 7,2 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (◇), com osmolaridades 0,211, 0,542, 1,007 e 1,607osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P₅₀, com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

Nos experimentos realizados com as espécies HbBov_{ad} e HbEq, na ausência de NaCl, as mudanças em a_w não alteram a afinidade da proteína pelo O₂. Na espécie HbA₀, a afinidade da proteína por O₂ é alterada pela concentração de sacarose, pois na oxigenação desta espécie há a ligação de moléculas de água, em um número menor (δn_w) na ausência deste sal (TOSQUI, 2004; CAÔN FILHO, 2003; SALVAY et al., 2003; COLOMBO e SEIXAS, 1999; COLOMBO et al., 1992). Na presença de 100mM NaCl, observa-se um aumento em P₅₀ com a diminuição de a_w para todas as espécies estudadas. Os resultados referentes às espécies HbBov_{ad} e HbEq em Hepes 7,2 e Ches 9,0 a 298K, na ausência e presença de 100mM NaCl em várias concentrações de sacarose, além da espécie HbBov_{fet} em Ches 9,0 a 298K, também em várias concentrações de sacarose, estão no Anexo C.

O efeito de a_w na afinidade da Hb, analisado com a equação de *linkage* de Wyman (WYMAN, 1964) conforme proposto por Colombo e colaboradores (COLOMBO et al., 1992) (equação 3), fornece Δn_w entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb ($n_w^{oxi} - n_w^{desoxi}$). Os valores de P₅₀ e n_{50} foram obtidos a partir do Gráfico de Hill, isto é, dos gráficos de $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right)$ em função de $\log(pO_2)$. O índice de cooperatividade das espécies de Hb analisadas, n_{50} , também foi obtido a partir da inclinação do mesmo gráfico e todas as espécies apresentaram valores entre 1,97 e 3,0 (figuras 11 e 12).

As figuras 11 e 12 mostram os gráficos dos valores de $\ln(P_{50})$, como também, os respectivos valores de n_{50} , ambos em função de $\ln(a_w)$, determinados para as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, ambas em Hepes 7,2 e Ches 9,0 a 298K. A figura 11 mostra os dados obtidos na ausência de NaCl e a figura 12, os dados obtidos na presença de 100mM NaCl. Em ambas as figuras, nota-se que os valores de $\ln(P_{50})$ para cada uma

destas espécies de Hb estão linearmente correlacionados com o $\ln(a_w)$. As retas que passam através de cada conjunto de pontos experimentais representam o melhor ajuste linear a estes pontos.

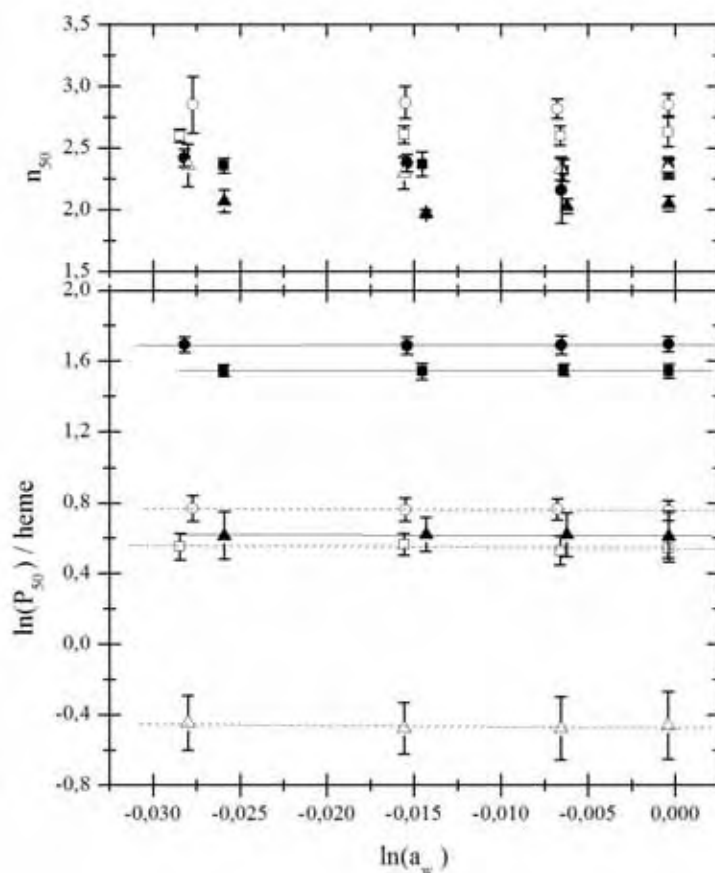


Figura 11. Gráfico da dependência de P_{50} com a_w a 298K, com seus respectivos n_{50} das espécies HbBov_{ad} (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (●), HbBov_{ad} (60 μ M/heme) Ches 9,0 (○), HbBov_{fet} (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (■), HbBov_{fet} (60 μ M/heme) Ches 9,0 (□), HbEq (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (▲), HbEq (60 μ M/heme) Ches 9,0 (△). O ajuste linear por mínimos quadrados destes gráficos leva a um coeficiente angular igual a $0,1 \pm 2,1$ (●), $-0,4 \pm 3,2$ (○), $0,1 \pm 1,8$ (■), $-0,7 \pm 3,1$ (□), $-0,1 \pm 7,1$ (▲) e $-0,8 \pm 8,2$ (△), indicando em todos os casos uma variação de hidratação nula ou indeterminada dentro do erro experimental. Além disso, através dos valores de n_{50} , observa-se um aumento da cooperatividade, independente da espécie de Hb com o aumento do pH (7,2→9,0). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de pelo menos 8 experimentos.

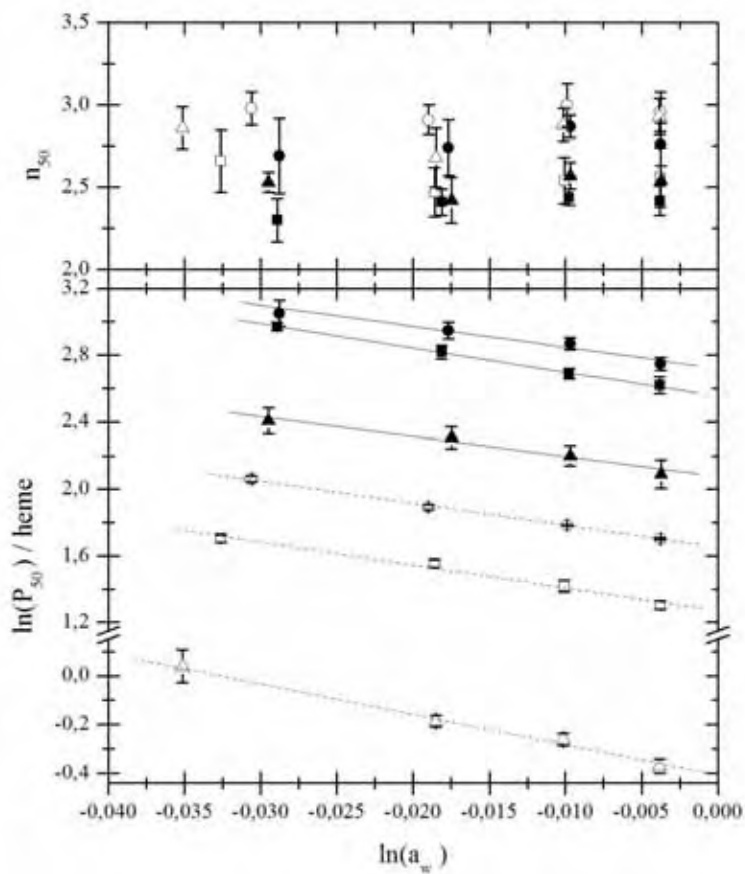


Figura 12. Gráfico da dependência de P_{50} com a_w na presença de 100mM NaCl a 298K, com seus respectivos n_{50} das espécies HbBov_{ad} (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (●), HbBov_{ad} (60 μ M/heme) Ches 9,0 (○), HbBov_{fet} (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (■), HbBov_{fet} (60 μ M/heme) Ches 9,0 (□), HbEq (60 μ M/heme) Hepes 7,2 (▲), HbEq (60 μ M/heme) Ches 9,0 (△). O ajuste linear por mínimos quadrados destes gráficos leva a um coeficiente angular igual a $12,6 \pm 0,6$ (●), $13,2 \pm 0,6$ (○), $14,5 \pm 0,8$ (■), $13,7 \pm 1,5$ (□), $11,8 \pm 1,2$ (▲) e $12,4 \pm 1,9$ (△), indicando que cerca de 51 ± 2 , 53 ± 3 , 58 ± 3 , 55 ± 6 , 47 ± 5 e 50 ± 4 , respectivamente, moléculas de água se ligam por Hb. Além disso, observa-se um aumento nos valores de n_{50} , independente da espécie de Hb, com o aumento do pH (7,2 \rightarrow 9,0). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de pelo menos 8 experimentos.

Nas condições experimentais apresentadas na figura 11, observamos que P_{50} não varia com a_w , concordando com os resultados anteriormente obtidos para a HbBov_{ad}

(TOSQUI, 2004). Consequentemente, o Δn_w das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq na ausência de NaCl é nulo, pois o coeficiente angular do ajuste de $\ln(P_{50})$ versus $\ln(a_w)$ é indeterminado dentro do erro experimental. Estes resultados mostram que a hidratação intrínseca dos estados oxigenado e desoxigenado destas espécies de Hb é equivalente na ausência de ânions ligados. Além disso, observamos que os resultados independem do pH utilizado nos experimentos.

Na figura 12, que mostra as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq na presença de 100mM NaCl, observamos que P_{50} varia com a_w e assim, ocorre a ligação de um número extra de moléculas de água. O aumento de Δn_w de oxigenação destas espécies de Hb pode ser atribuído à ligação preferencial de íons cloreto à conformação T da Hb, como ocorre com a espécie HbA₀ (TOSQUI, 2004; CAÔN FILHO, 2003; SALVAY et al., 2003; COLOMBO e SEIXAS, 1999). Observamos também que a afinidade da espécie de Hb aumenta com o aumento do pH (7,2→9,0), implicando que o equilíbrio conformacional desloca-se no sentido da conformação de mais alta afinidade por O₂, a conformação R. Portanto, a transição T→R é seguida pela liberação de prótons. Porém, o número de moléculas de água que liga a estas espécies de Hb independe do pH utilizado. Nestas condições, nas espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq ocorre a ligação de 51 ± 2 , 58 ± 3 e 47 ± 5 moléculas de água por Hb, respectivamente em pH 7,2 e, 53 ± 3 , 55 ± 6 e 50 ± 4 moléculas de água por Hb, respectivamente em pH 9,0.

Nota-se também na figura 12, que o valor de $\ln(P_{50})$ varia linearmente com o $\ln(a_w)$ na presença de NaCl, concordando com os resultados anteriormente publicados para a espécie HbA₀ (CAÔN FILHO, 2003; SALVAY et al., 2003; COLOMBO et al., 1996, 1994, 1992; PARSEGIAN et al., 1995).

A tabela I mostra os valores de Δn_w obtidos para todas as espécies de Hb analisadas além dos dados existentes na literatura, a partir do ajuste do Gráfico de Hill, nas variadas condições experimentais.

Tabela I - Comparação entre os valores de Δn_w na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb. Os valores obtidos e os da literatura concordam dentro do erro experimental.

Espécie	Δn_w (H ₂ O/Hb) 0mM NaCl	Δn_w (H ₂ O/Hb) 100mM NaCl	Autor
HbA ₀ pH 7,3	25±1	72±3	COLOMBO e SEIXAS, 1999; COLOMBO e BONILLA- RODRIGUEZ, 1996; COLOMBO et al., 1992
HbA _{0-K1*} pH 7,3	26±2	52±2	CAÔN FILHO, 2003
HbA ₀ pH 9,0	25±1	71±1	CAÔN FILHO, 2003
HbA _{0-K1} pH 9,0	26±1	51±1	CAÔN FILHO, 2003
HbI pH 7,2	-	-7±1	CHIANCONI e BOFFI, 2000
HbBov _{ad} pH 7,2	0	51±2	TOSQUI, 2004; Resultado do Autor
HbBov _{ad} pH 9,0	0	53±3	Resultado do Autor
HbBov _{fet} pH 7,2	0	58±3	Resultado do Autor
HbBov _{fet} pH 9,0	0	55±6	Resultado do Autor
HbEq pH 7,2	0	47±5	Resultado do Autor
HbEq pH 9,0	0	50±4	Resultado do Autor

* Dependência de Δn_w na constante de ligação da primeira molécula de O₂ à Hb.

4.2. Determinação da entalpia de oxigenação de diferentes espécies de Hb

A entalpia de oxigenação das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq foi determinada através dos gráficos de *van't Hoff*, isto é, pelo ajuste do gráfico de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura através da equação 34, que fornece o valor do calor de oxigenação por grupo heme (ΔH) e a variação de capacidade térmica associada à reação de oxigenação (ΔC_p). Estas espécies de Hb foram estudadas nas condições Hepes 7,2 e Ches 9,0, na ausência e na presença de 100mM NaCl. Além disso, os valores das respectivas entropias de oxigenação (ΔS) foram calculados com a equação 29 na temperatura de referência de 298K.

As figuras 13, 14 e 15 mostram os gráficos de $\ln(P_{50})$ em função de T, com seus respectivos n_{50} para as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, respectivamente. Os dados obtidos pelos ajustes dos gráficos apresentados nestas figuras, em conjunto com os valores de entalpia e entropia existentes na literatura para as várias espécies de Hb em suas diferentes condições experimentais, estão na tabela II.

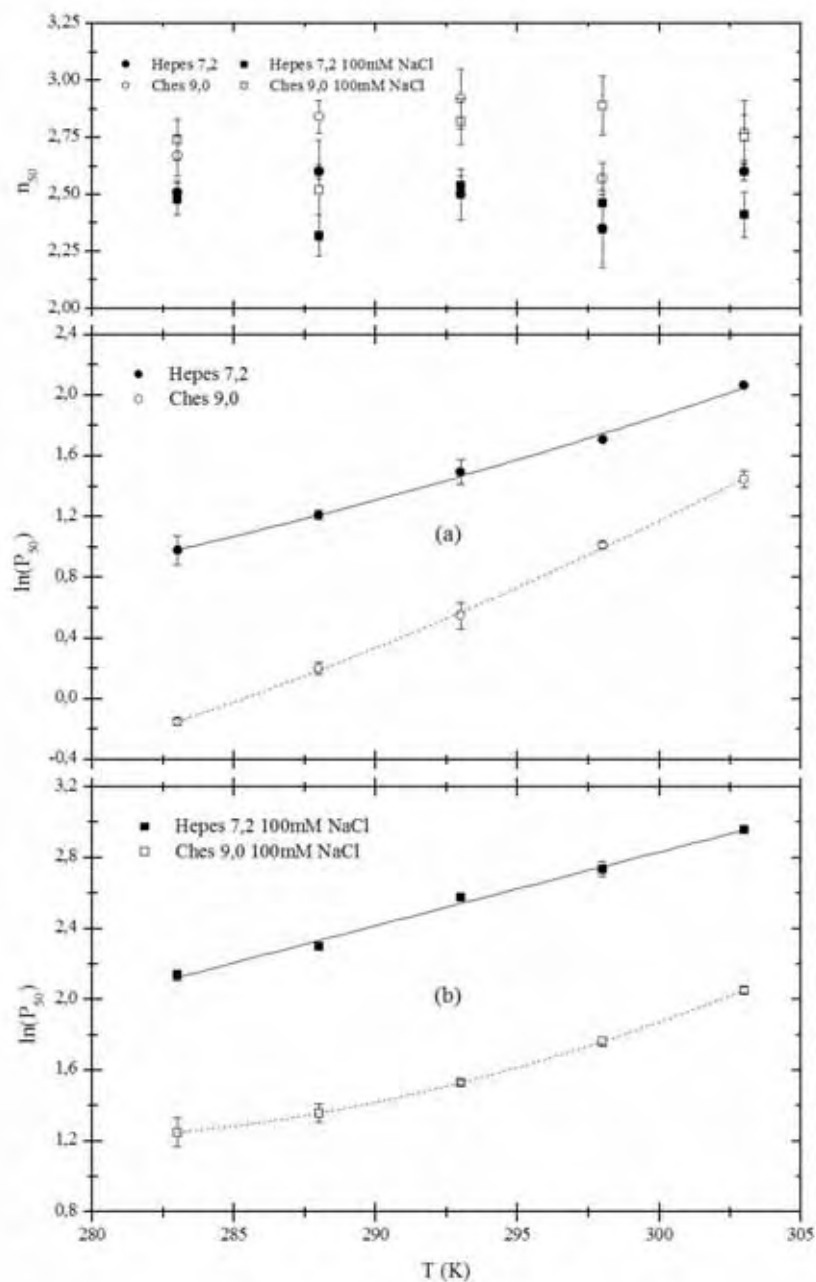


Figura 13. Gráficos de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura (T), com os seus respectivos n_{50} para a espécie HbBov_{ad} (60 μ M/heme) (a) Hepes 7,2 (●) e Ches 9,0 (○); (b) Hepes 7,2 (■) e Ches 9,0 (□), ambos em 100mM NaCl. As curvas representam o melhor ajuste da *Equação de van't Hoff integrada* (equação 34) aos dados experimentais, fornecendo o valor do calor de oxigenação por grupo heme (ΔH) e a variação da capacidade térmica associada à reação de oxigenação (ΔC_p). Além disso, observa-se um aumento da cooperatividade (n_{50}), independente da espécie de Hb, com o aumento do pH (7,2→9,0). Os valores dos ajustes estão na Tabela II. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de pelo menos 6 experimentos.

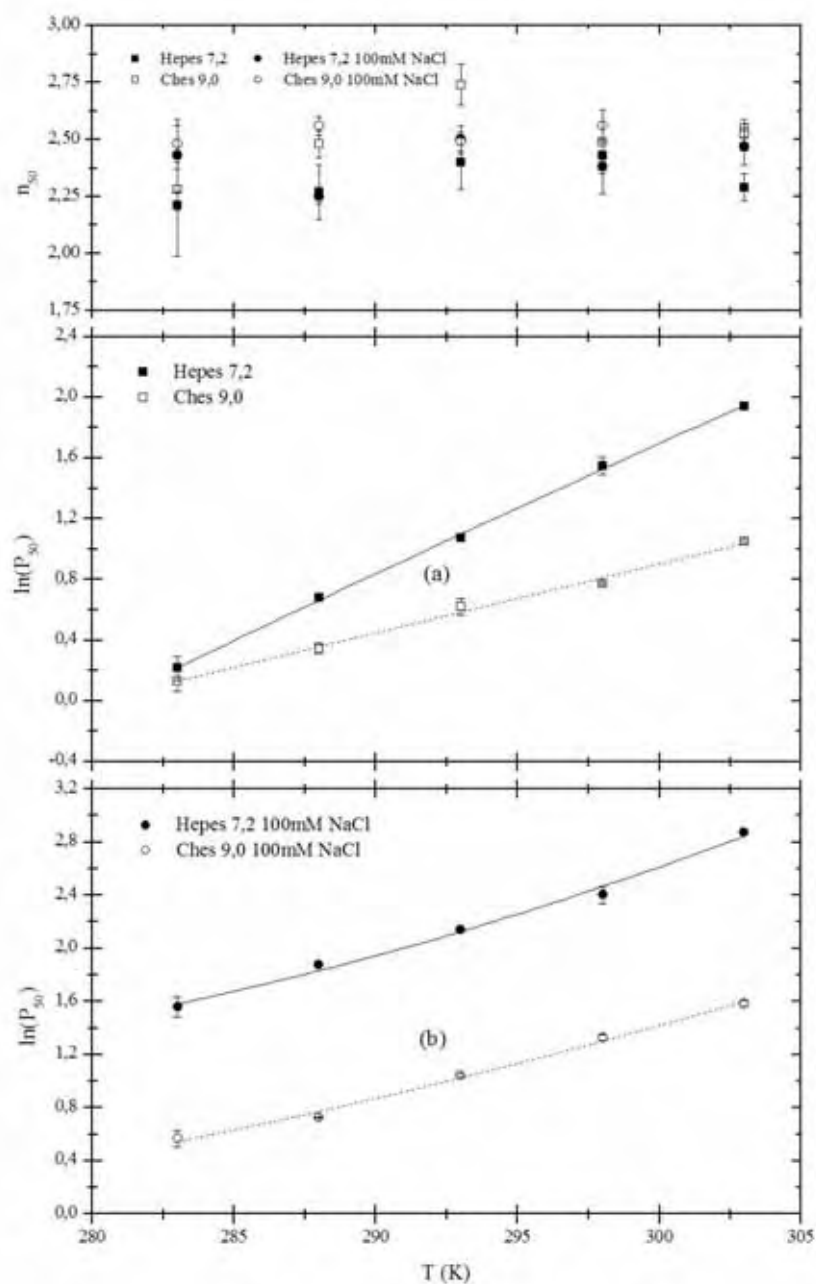


Figura 14. Gráficos de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura (T), com os seus respectivos n_{50} para a espécie HbBov_{fet} (60 μ M/heme) (a) Hepes 7,2 (■) e Ches 9,0 (□); (b) Hepes 7,2 (●) e Ches 9,0 (○), ambos em 100mM NaCl. As curvas representam o melhor ajuste da *Equação de van't Hoff integrada* (equação 34) aos dados experimentais, fornecendo o valor do calor de oxigenação por grupo heme (ΔH) e a variação da capacidade térmica associada à reação de oxigenação (ΔC_p). Além disso, observa-se um aumento da cooperatividade (n_{50}), independente da espécie de Hb, com o aumento do pH (7,2→9,0). Os valores dos ajustes estão na Tabela II. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de pelo menos 6 experimentos.

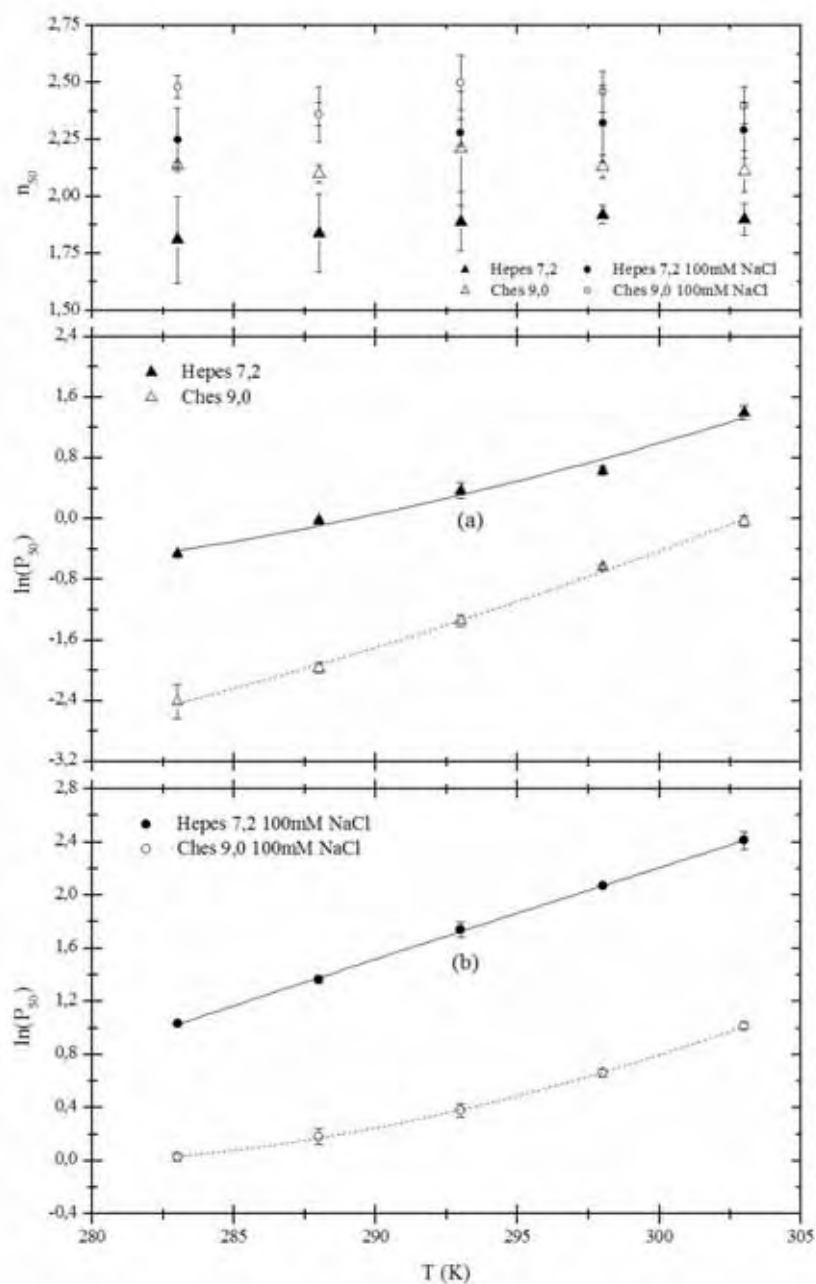


Figura 15. Gráficos de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura (T), com os seus respectivos n_{50} para a espécie HbEq ($60\mu\text{M}/\text{heme}$) (a) Hepes 7,2 (\blacktriangle) e Ches 9,0 (\triangle); (b) Hepes 7,2 (\bullet) e Ches 9,0 (\circ), ambos em 100mM NaCl. As curvas representam o melhor ajuste da *Equação de van't Hoff integrada* (equação 34) aos dados experimentais, fornecendo o valor do calor de oxigenação por grupo heme (ΔH) e a variação da capacidade térmica associada à reação de oxigenação (ΔC_p). Além disso, observa-se um aumento da cooperatividade (n_{50}), independente da espécie de Hb, com o aumento do pH (7,2 \rightarrow 9,0). Os valores dos ajustes estão na Tabela II. Cada ponto representa a média e o desvio padrão de pelo menos 6 experimentos.

Tabela II - Valores de ΔH e ΔS na ausência e na presença de 100mM NaCl para as espécies de Hb, em várias condições experimentais, calculados a partir do ajuste linear do gráfico de $\ln(P_{50})$ em função da temperatura (T), além dos valores de ΔG_0 e ΔC_p . Os valores de ΔG_0 foram obtidos na temperatura de referência T_0 (298K) e os valores de ΔH foram corrigidos pela contribuição do calor do oxigênio em solução (-3Kcal/mol).

Espécie e Condição Experimental	ΔG_0 Kcal/ mol.heme	ΔH Kcal/ mol.heme	ΔC_p Kcal/ mol.K	ΔS cal/mol.K	Autor
HbA ₀ 10mM Hepes pH 7,3	0,33±0,02	-3,59±0,07	0,06±0,02	-13,30±0,85	CAÔN FILHO, 2003
HbA ₀ 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,3	1,09±0,02	-10,65±0,41	-0,17±0,24	-39,40±1,45	CAÔN FILHO, 2003
HbA ₀ 10mM Ches pH 9,0	0,09±0,02	-3,49±0,14	-0,03±0,01	-12,47±0,47	CAÔN FILHO, 2003
HbA ₀ 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	0,27±0,02	-11,23±0,13	-0,07±0,04	-38,72±1,00	CAÔN FILHO, 2003
HbA _{0-K1*} 10mM Hepes pH 7,3	0,72±0,02	-3,58±0,14	-0,01±0,04	-14,70±0,54	CAÔN FILHO, 2003
HbA _{0-K1} 10mM Ches pH 9,0	0,24±0,02	-3,27±0,30	-0,09±0,09	-13,00±0,31	CAÔN FILHO, 2003
HbI 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	-	+4,0±0,10	-	+17±0,10	CHIANCONI e BOFFI, 2000
HbBov _{ad} 10mM Hepes pH 7,2	1,03±0,01	-6,60±0,37	-0,13±0,06	-18,67±0,94	Resultado do Autor
HbBov _{ad} 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,63±0,01	-3,68±0,37	0,05±0,08	-6,89±0,73	Resultado do Autor
HbBov _{ad} 10mM Ches pH 9,0	0,60±0,01	-12,59±0,97	-0,37±0,08	-40,29±1,98	Resultado do Autor
HbBov _{ad} 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	1,06±0,01	-6,24±0,01	-0,46±0,02	-17,43±0,58	Resultado do Autor
HbBov _{fet} 10mM Hepes pH 7,2	0,90±0,01	-11,67±0,25	-0,01±0,05	-36,14±0,90	Resultado do Autor
HbBov _{fet} 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,46±0,01	-8,10±0,73	-0,14±0,16	-22,29±1,14	Resultado do Autor

* Dependência de ΔH e ΔS na constante de ligação da primeira molécula de O₂ à Hb. Os demais resultados são na dependência com P₅₀.

Continuação da Tabela II.

Espécie e Condição Experimental	ΔG_0 Kcal/ mol.heme	ΔH Kcal/ mol.heme	ΔC_p Kcal/ mol.K	ΔS cal/mol.K	Autor
HbBov _{fet} 10mM Ches pH 9,0	0,49±0,01	-5,03±0,85	-0,06±0,14	-15,26±2,08	Resultado do Autor
HbBov _{fet} 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	0,79±0,01	-6,99±0,62	-0,11±0,10	-20,86±1,39	Resultado do Autor
HbEq 10mM Hepes pH 7,2	0,47±0,02	-13,26±1,31	-0,33±0,28	-42,92±2,58	Resultado do Autor
HbEq 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,23±0,02	-7,97±0,37	-0,11±0,08	-22,65±0,85	Resultado do Autor
HbEq 10mM Ches pH 9,0	-0,41±0,01	-20,63±2,73	-0,56±0,23	-70,63±1,30	Resultado do Autor
HbEq 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	0,39±0,01	-8,12±0,21	-0,53±0,04	-25,91±1,71	Resultado do Autor

4.3. Relação entre Δn_w e ΔH de oxigenação

A partir dos dados apresentados nas tabelas I e II, o gráfico de ΔH de oxigenação em função de Δn_w foi construído (figura 16), para as espécies de Hb, em suas respectivas condições experimentais: HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl.

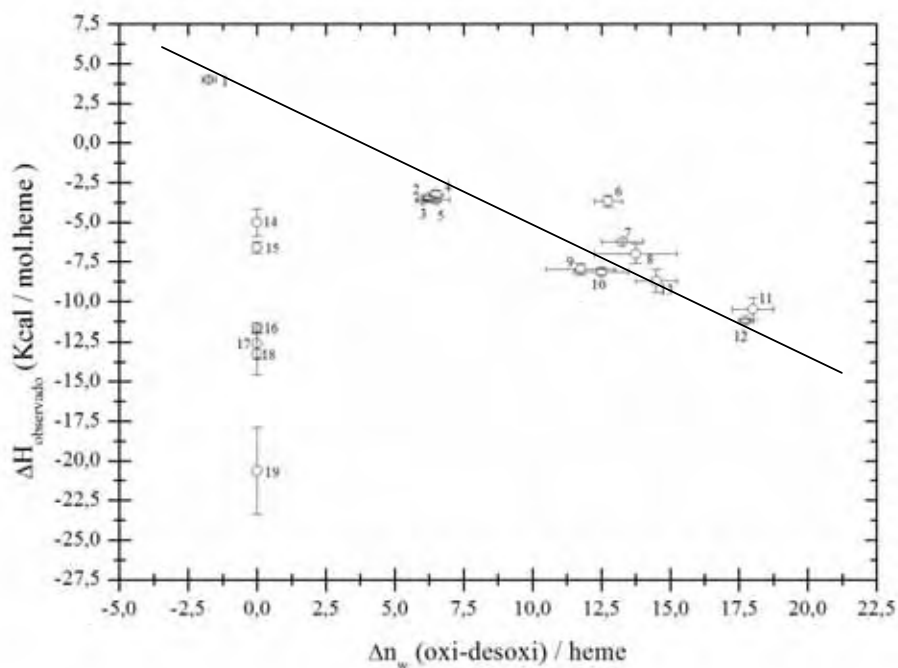


Figura 16. Gráfico de ΔH de oxigenação em função de Δn_w , cujos círculos numerados correspondem às espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA_{0-K1} Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Ches 9,0; (5) HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (6) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (12) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (13) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (14) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18) HbEq Hepes 7,2 e (19) HbEq Ches 9,0. A inclinação deste gráfico, para as espécies que estão com os seus valores de ΔH correlacionados linearmente (1 à 13) com Δn_w , fornece o calor necessário para deslocar um mol de moléculas de água do volume da solução e ligá-las à superfície da proteína durante o processo de oxigenação, $\delta H_{\text{solvatação}}$. O ajuste linear aplicado aos dados fornece $-0,57 \pm 0,01 \text{ Kcal/mol.H}_2\text{O}$.

Na figura 16 observamos a presença de treze círculos (1 à 13), os quais estão com seus valores de ΔH de oxigenação correlacionados linearmente com Δn_w . Estes círculos representam as entalpias de oxigenação das espécies, em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA_{0-K1} Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Ches 9,0; (5) HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (6) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (12) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (13) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (14) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18) HbEq Hepes 7,2 e (19) HbEq Ches 9,0.

NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (12) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl e (13) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl. Observamos também, a presença de seis círculos (14 à 19), os quais, não estão correlacionados aos demais. Estes círculos representam as entalpias de oxigenação das espécies, em suas respectivas condições experimentais: (14) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18) HbEq Hepes 7,2 e (19) HbEq Ches 9,0.

De acordo com a equação 4, os valores de ΔH obtidos neste trabalho são compostos pelo calor intrínseco de oxigenação do grupo heme (ΔH_{O_2}) do calor associado à variação conformacional alostérica da estrutura da Hb induzida pela ligação do ligante em determinada condição experimental ($\Delta H_{\text{configuração}}$), além de $\sum \Delta n_i \times \Delta H_i$ que é o calor intrínseco de ligação de um ligante i que pode ser íons H^+ ou Cl^- .

Os valores correlacionados linearmente na figura 16 (1 à 13), levam a um,

$$\delta H_{\text{solvatação}} = \frac{d\Delta H_{\text{observado}}}{d\Delta n_w} = -0,57 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}.$$

Este valor corresponde à entalpia de solvatação ($\delta H_{\text{solvatação}}$), ou seja, o calor necessário para a transferência de grupos enterrados na superfície da proteína para a água, caso outras contribuições como a liberação de H^+ e/ou a ligação de Cl^- ($\sum \Delta n_i \times \Delta H_i$) sejam nulas ou próximas de zero. Em outras palavras, desde que não haja qualquer outra contribuição de calor para $\Delta H_{\text{observado}}$ durante a ligação de O_2 , este parâmetro representa o custo energético de hidratação protéica em meio aquoso. Concordando com as análises anteriormente realizadas em nosso grupo de pesquisa (CAÔN FILHO, 2003; CAÔN

FILHO e COLOMBO, manuscrito), a entalpia de oxigenação destas espécies de Hb analisadas está linearmente correlacionada com seus respectivos Δn_w , possibilitando a determinação do calor que está associado com a transferência de um mol de água do volume da solução para a superfície protéica.

Quanto aos valores, que não estão correlacionados linearmente na figura 13 (14 à 19), uma entalpia de oxigenação esperada para estas espécies de Hb seria, aproximadamente, +2,5Kcal/mol.H₂O. Entretanto, observa-se para as espécies HbBov_{ad} Hepes 7,2 e Ches 9,0; HbBov_{fet} Hepes 7,2 e Ches 9,0; e HbEq Hepes 7,2 e Ches 9,0, valores de -6,60±0,37 e -12,59±0,97; -11,67±0,17 e -5,03±0,85; -13,26±1,31 e -20,63±2,73Kcal/mol.H₂O, respectivamente. É descrito na literatura que o *Efeito Bohr* não ocorre em pH acima de 8,5 (BUSCH e HO, 1990; BUCCI e FRONTICELLI, 1981; AMICONI, et al., 1981) e, além disso, que a liberação de próton com a oxigenação da espécie HbA₀ é dependente da concentração de NaCl (FRONTICELLI et al., 1994; KILMARTIN et al., 1980). Como estas espécies de Hb estão na ausência de Cl⁻, para verificar se há contribuição do calor de liberação de H⁺ durante a oxigenação destas proteínas, o número de prótons liberados na solução foi determinado (*Efeito Bohr*), durante a oxigenação das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq na ausência de ânions na temperatura de referência (298K).

A figura 17 mostra o gráfico de log(P₅₀) em função do pH das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, nas condições experimentais: Hepes 7,0, Hepes 7,6, Ches 8,5 e Ches 9,2, na ausência de NaCl e concentração 60μM/heme.

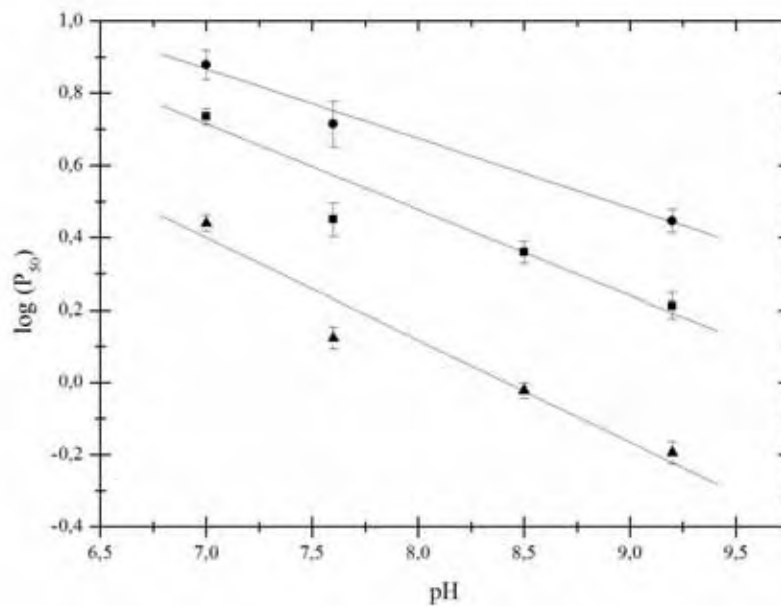


Figura 17. Variação do $\log(P_{50})$ para as espécies: HbBov_{ad} (●), HbBov_{fet} (■) e HbEq (▲), nos pHs indicados na figura, ambas em 60 μ M/heme. As inclinações destes gráficos indicam que na ausência de ânions, $0,76 \pm 0,08$, $0,96 \pm 0,08$ e $1,12 \pm 0,08$ moles de prótons são liberados por mol de Hb com a oxigenação das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, respectivamente. As medidas foram realizadas na temperatura de referência de 298K.

A figura 17 mostra que o $\log(P_{50})$ diminui linearmente com o aumento do pH, para as espécies analisadas. Em pH fisiológico, a desoxiHb tem uma afinidade maior pelo H^+ e conseqüentemente, a afinidade da proteína pelo O_2 diminui com a sua protonação. Este fenômeno é conhecido por *Efeito Bohr*, que é responsável pela captação e liberação de O_2 nos órgãos captadores e nos tecidos, respectivamente (BALDWIN, 1975). Também na figura 17, observa-se que ainda há *Efeito Bohr* em pH acima de 8,5, ao contrário do que é descrito para a HbA₀ (BUSCH e HO, 1990; BUCCI e FRONTICELLI, 1981; AMICONI, et al., 1981)

Sendo a relação do número de prótons que são ligados ou liberados da proteína durante a transição T→R, com a afinidade da Hb pelo oxigênio, calculada pela relação diferencial descrita por Wyman e Gill (1981),

$$\left. \frac{d \log P_{50}}{d pH} \right|_{a_i} = (n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}) = \Delta n_{H^+} \quad (35)$$

as inclinações das retas da figura 17 fornecem o Δn_{H^+} , ou seja, a diferença do número de H^+ ligados às conformações da Hb totalmente oxigenada ($n_{H^+}^{oxi}$) e desoxigenada ($n_{H^+}^{desoxi}$). O ajuste linear do gráfico de $\log(P_{50})$ em função do pH, forneceu um Δn_{H^+} de $0,76 \pm 0,08$, $0,96 \pm 0,08$ e $1,12 \pm 0,08$ prótons para as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, respectivamente, na ausência de ânions. A tabela III mostra os dados obtidos pelos ajustes dos gráficos apresentados na figura 17, em conjunto com os dados de Δn_{H^+} existentes na literatura para estas mesmas espécies na presença de 100mM NaCl, além da espécie HbA₀.

Tabela III - Valores de Δn_{H^+} para várias espécies de Hb, na ausência e na presença de 100mM NaCl. Os valores obtidos da literatura concordam dentro do erro experimental.

Espécie	$-\Delta n_{H^+} (H^+/Hb)$ 0mM NaCl	$-\Delta n_{H^+} (H^+/Hb)$ 100mM NaCl	Autor
HbA ₀	$0,98 \pm 0,12$	$2,20 \pm 0,12$	CASTRO, 1999; FRONTICELLI et al., 1994; BUCCI e FRONTICELLI, 1985; ROLLEMA et al., 1975
HbA _{0-K1}	$0,31 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,03$	CASTRO, 1999; POYART et al., 1977
HbBov _{ad}	$0,76 \pm 0,08^*$	$1,44 \pm 0,16^{*\Delta}$	Resultado do Autor [*] ; SASAGAWA et al., 2006 [*] ; CLEMENTI et al., 1996 ^{\Delta}
HbBov _{fet}	$0,96 \pm 0,08^*$	$2,00 \pm 0,20^{\Delta}$	Resultado do Autor [*] ; CLEMENTI et al., 1996 ^{\Delta}
HbEq	$1,12 \pm 0,08^*$	$2,55 \pm 0,26^{\Phi}$	Resultado do Autor [*] ; GIARDINA et al., 1990 ^{\Phi}

A partir dos dados apresentados na tabela III, em conjunto com os respectivos dados da tabela I, o gráfico da diferença do número de prótons na transição T→R em função da variação de hidratação de cada espécie de Hb é mostrado na figura 18.

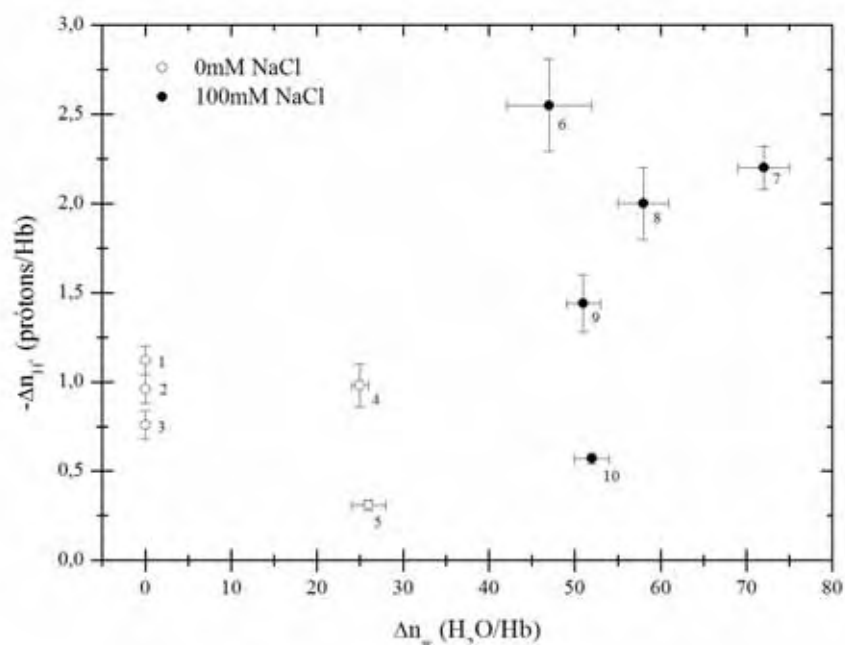
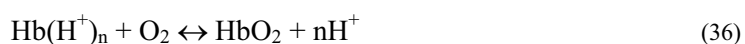


Figura 18. Correlação da variação do número de prótons entre os estados T e R das espécies de Hb (○) na ausência: (1) HbEq; (2) HbBov_{ad}; (3) HbBov_{fet}; (4) HbA₀ e (5) HbA_{0-K1}; e (●) na presença de 100mM NaCl: (6) HbEq; (7) HbA₀; (8) HbBov_{fet}; (9) HbBov_{ad} e (10) HbA_{0-K1}, em função da variação de hidratação de cada espécie. Os pontos apresentados neste gráfico indicam que com a adição de 100mM NaCl, o número de prótons ligados ou liberados pela Hb aumenta sistematicamente, sendo este aumento mais pronunciado na espécie HbEq.

Notamos na figura 18 que Δn_{H^+} aumenta sistematicamente com a adição de 100mM NaCl. De acordo com o esquema,



na ausência de NaCl, durante a oxigenação da proteína, há liberação de aproximadamente um próton, o que caracteriza o estado T₀, de menor hidratação (COLOMBO e SEIXAS, 1999; PERUTZ et al., 1994). Já na presença de NaCl, há a liberação de aproximadamente 2 prótons, o que caracteriza o estado T_x, também de menor hidratação (SEIXAS e COLOMBO, 1999). Isto mostra que a presença de NaCl nas soluções de Hb, induz um aumento na ligação de prótons na proteína e conseqüente diminuição na afinidade pelo O₂, caracterizando o *Efeito Bohr* alcalino.

Notamos também na figura 18 que a liberação de próton com a oxigenação das espécies é dependente da concentração de NaCl, assim como ocorre com a HbA₀ (FRONTICELLI et al., 1994; KILMARTIN et al., 1980).

Com estes resultados, supomos que além da contribuição do calor da ligação de O₂, é possível que também haja uma contribuição do calor de protonação ou desprotonação no ΔH de oxigenação das espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq na ausência de NaCl, as quais não se correlacionam com as demais espécies mostradas na figura 16.

4.4. Relação entre Δn_w e ΔS de oxigenação

A partir dos dados apresentados nas tabelas I e II, foi construído o gráfico de TΔS_{calculado} de oxigenação (T = 298K) em função de Δn_w (figura 19), para as espécies de Hb, em suas respectivas condições experimentais: HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM

NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl.

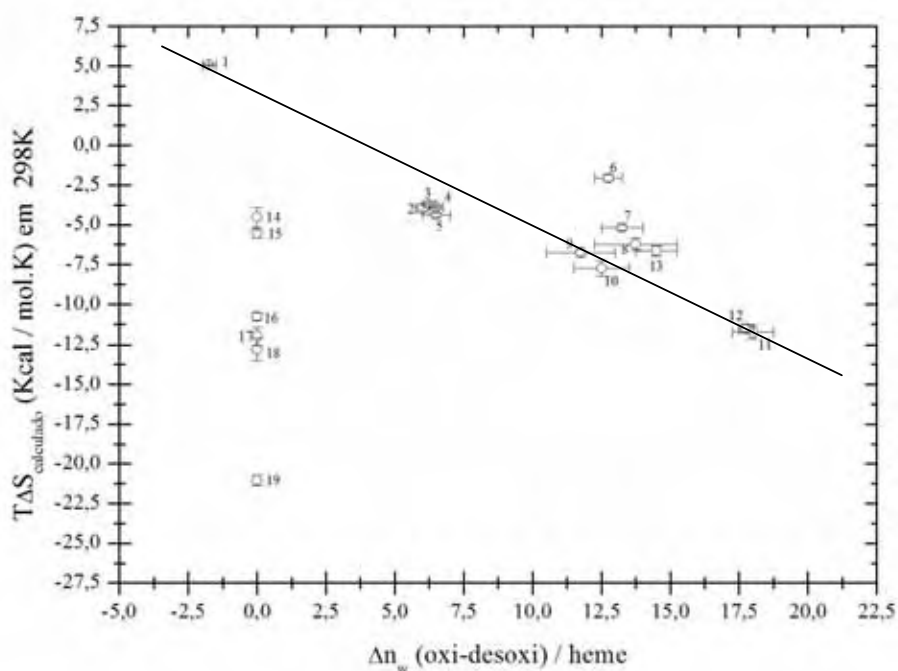


Figura 19. Gráfico de $T\Delta S_{\text{calculado}}$ de oxigenação em função de Δn_w cujos círculos numerados correspondem às espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA_{0-κ1} Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Ches 9,0; (5) HbA_{0-κ1} Hepes 7,3; (6) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11) HbA₀ Hepes 7,2 100mM NaCl; (12) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (13) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (14) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18) HbEq Hepes 7,2 e (19) HbEq Ches 9,0. A inclinação deste gráfico fornece a perda entrópica da saída das moléculas de água da solução para a superfície protéica, $T\Delta S_{\text{solvatação}}$. O ajuste linear aplicado aos dados fornece $-0,86 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$ em 298K.

Na figura 19, assim como na figura 16, observamos a presença de treze círculos (1 à 13), os quais estão com seus valores de $T\Delta S_{\text{calculado}}$ de oxigenação correlacionados linearmente com Δn_w . Estes círculos representam as entropias de oxigenação das espécies, em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA_{0-K1} Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Ches 9,0; (5) HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (6) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11) HbA₀ Hepes 7,2 100mM NaCl; (12) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl e (13) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl. Observamos também, a presença de seis círculos (14 à 19), os quais, não estão correlacionados aos demais. Estes círculos representam as entropias de oxigenação das espécies, em suas respectivas condições experimentais: (14) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18) HbEq Hepes 7,2 e (19) HbEq Ches 9,0.

Do mesmo modo que o utilizado para a obtenção de $\delta H_{\text{solvatação}}$, a inclinação do gráfico $T\Delta S_{\text{calculado}}$ versus Δn_w fornece a perda entrópica da saída das moléculas de água da solução para a superfície protéica ($T\delta S_{\text{solvatação}}$). Os valores correlacionados linearmente na figura 16 (1 à 13), levam a um,

$$T\delta S_{\text{solvatação}} = -0,86 \pm 0,01 \text{ Kcal/mol.H}_2\text{O em 298K.}$$

Assim como na figura 16, observamos valores, os quais não estão correlacionados linearmente na figura 19 (14 à 19). Neste caso, como o ΔS é calculado a partir dos valores de ΔH de oxigenação (equação 29), então é possível que a contribuição do calor de protonação ou desprotonação destas espécies Hb, esteja influenciando nos resultados.

4.5. Compensação entalpia-entropia de oxigenação

A natureza da energética de hidratação foi examinada relacionando $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ de oxigenação das hemoglobinas, obtidos em diferentes condições experimentais. O gráfico de compensação indica como a variação da entalpia de uma reação biológica ou química é compensada pela variação concomitante da entropia desta reação, ou seja, a contribuição das variações do ΔS para as variações de energia livre (ΔG) da reação, é compensada ao longo das variações simultâneas de ΔH (IMAI E YONETANI, 1975; IMAI, 1982).

O fenômeno de compensação entalpia-entropia vem sendo extensivamente, estudado em reações entre hemoproteínas e moléculas de ligantes heterotrópicos (IKEDA-SAITO et al., 1983; IMAI, 1979, 1982; IMAI e YONETANI, 1975; ANTONINI et al., 1965) e a origem deste fenômeno foi atribuída à interação das moléculas de proteína com as de água (LUMRY e RAJENDER, 1970), embora nenhuma confirmação direta disto tenha sido encontrada. Assim como, as mudanças estruturais são induzidas por interações iônicas, os valores de entalpia e entropia de oxigenação podem ser atribuídos, exclusivamente, à energética de hidratação da proteína, portanto, o gráfico mostrado na figura 20 confirma o papel fundamental da água sobre o fenômeno de compensação para as espécies em suas respectivas condições experimentais: HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 3,5mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 5mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 10mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 15mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 25mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3 200mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e

HbEq Ches 9,0 100mM NaCl. Os valores de $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ de cada espécie de Hb, em sua respectiva condição experimental apresentada na figura 20, estão nas tabelas II e IV.

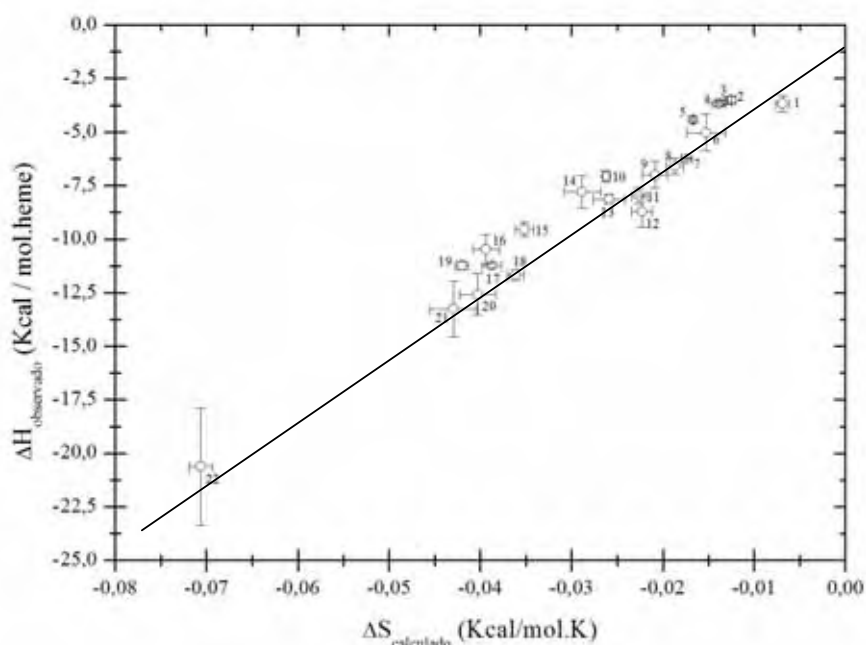


Figura 20. Gráfico de compensação, $\Delta H_{\text{observado}}$ versus $\Delta S_{\text{calculado}}$ (dados mostrados nas tabelas II e IV), para a oxigenação das espécies em suas respectivas condições experimentais: (1) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA₀ Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Hepes 7,3 3,5mM NaCl; (5) HbA₀ Hepes 7,3 5mM NaCl; (6) HbBov_{fet} Ches 9,0; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (9) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (10) HbA₀ Hepes 7,3 10mM NaCl; (11) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (12) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (13) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (14) HbA₀ Hepes 7,3 15mM NaCl; (15) HbA₀ Hepes 7,3 25mM NaCl; (16) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (17) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (18) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (19) HbA₀ Hepes 7,3 200mM NaCl; (20) HbBov_{ad} Ches 9,0; (21) HbEq Hepes 7,2 e (22) HbEq Ches 9,0. O ajuste fornece a temperatura de compensação, cujo valor é de $267 \pm 4\text{K}$. O valor do intercepto deste ajuste é de $-1,51 \pm 0,07$.

Tabela IV - Valores de ΔH e ΔS para a espécie HbA₀ em 10mM Hepes pH 7,3, em várias concentrações de NaCl. Estes valores foram determinados em nosso grupo de pesquisa (CAÔN FILHO, 2003).

Concentração de NaCl (mM)	ΔH Kcal/mol.heme	ΔS cal/mol.K
3,5	-3,67±0,01	-13,93±0,77
5,0	-4,42±0,13	-16,68±0,13
10	-7,05±0,26	-26,23±0,35
15	-7,78±0,75	-28,84±2,00
25	-9,54±0,34	-35,19±1,00
200	-11,23±0,19	-42,03±0,70

A linearidade entre os pontos de ΔH e ΔS manifesta o fenômeno de compensação entalpia-entropia para a oxigenação das espécies de Hb, como observado em muitas reações biológicas e químicas (LUMRY e RAJENDER, 1970). A inclinação do ajuste mostrado na figura 20 fornece a temperatura de compensação, $T_c = 267 \pm 4K$, que é a temperatura onde a diferença na energia livre entre a água ligada à superfície protéica e a água livre na fase líquida, é nula. Isto, se observarmos que as variações na entalpia e na entropia de oxigenação com as concentrações de cloreto são atribuídas principalmente ao custo energético para expor e hidratar a superfície protéica, durante a mudança conformacional.

Nas tabelas II e IV observa-se que com o aumento da concentração de NaCl, o calor liberado com a oxigenação da Hb também aumenta, ou seja, o ΔH de oxigenação torna-se mais exotérmico. Fato semelhante é observado no Δn_w que é maior na presença de NaCl (tabela I). Concordando com estes resultados, Caôn Filho (2003), analisando a influência da concentração de NaCl no ΔH de oxigenação e no Δn_w da HbA₀, determinou

que as mudanças estruturais induzidas pela ligação de Cl⁻ à desoxiHb são a causa principal das variações de hidratação, entalpia e entropia de oxigenação observados na proteína.

Caôn Filho (2003), com a finalidade de distinguir quais grupos, se os hidrofóbicos ou os hidrofílicos, contribuem para a energética de hidratação protéica, fez uma comparação com os valores observados das variações de entalpia e entropia de oxigenação da espécie HbA₀, com os valores da entalpia e entropia de transferência de pequenos grupos químicos de líquidos hidrofóbicos (ou fase gasosa) para água, $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$, respectivamente (MURPHY, 1994; MAKHATADZE e PRIVALOV, 1993; PRIVALOV e MAKHATADZE, 1993; OOBATAKE e OOI, 1988; OOI et al., 1987; BALDWIN, 1986). Neste trabalho, repetimos os experimentos de Caôn Filho, acrescentando outras espécies de Hb em variadas condições experimentais, como mostram as figuras 21 e 22.

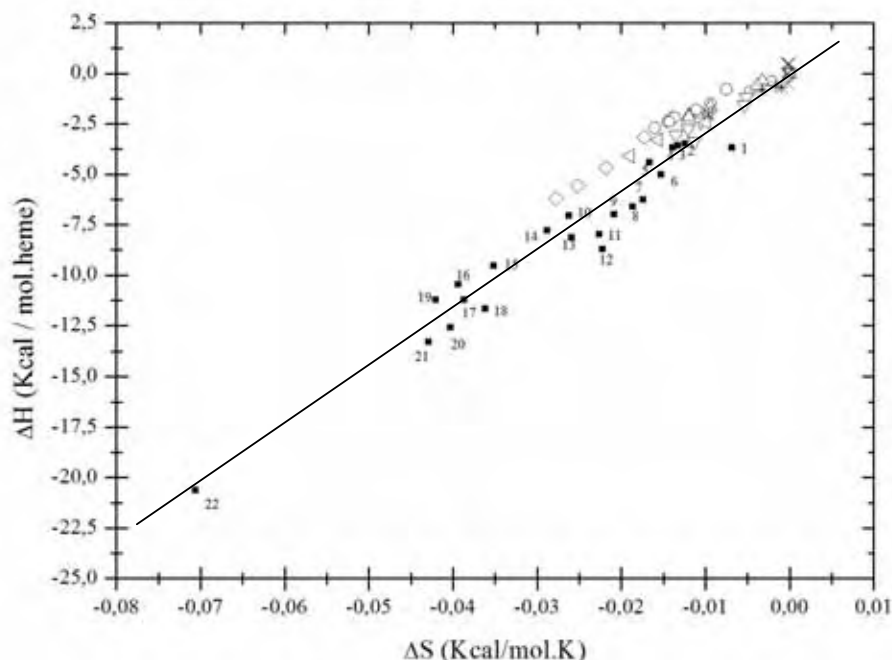


Figura 21. Comparação entre o (■) fenômeno de compensação de oxigenação das espécies em suas respectivas condições experimentais: (1) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA₀ Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Hepes 7,3 3,5mM NaCl; (5) HbA₀ Hepes 7,3 5mM NaCl; (6) HbBov_{fet} Ches 9,0; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (9) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (10) HbA₀ Hepes 7,3 10mM NaCl; (11) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (12) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (13) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (14) HbA₀ Hepes 7,3 15mM NaCl; (15) HbA₀ Hepes 7,3 25mM NaCl; (16) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (17) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (18) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (19) HbA₀ Hepes 7,3 200mM NaCl; (20) HbBov_{ad} Ches 9,0; (21) HbEq Hepes 7,2 e (22) HbEq Ches 9,0, com a compensação de hidratação de resíduos hidrofóbicos. Os valores do $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$ destes resíduos foram obtidos a partir de trabalhos que calcularam: (<) a compensação de hidratação de aminoácidos (Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) da cadeia lateral expostos pela proteína com o seu desnovelamento (MAKHATADZE e PRIVALOV, 1993); (*) os valores de $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$ de transferência de diferentes grupos (-CH₂-, -CH₃, -CH<, -CH=) da fase gasosa para a água (PRIVALOV e MAKHATADZE, 1993); (◇) a energética de dissolução de alcanos da fase gasosa para água (MURPHY, 1994); (×) as propriedades termodinâmicas de dissolução de hidrocarbonetos líquidos na água (BALDWIN, 1986); (○), (△) e (▽) que representam os parâmetros de solvatação de resíduos da cadeia lateral (Ala, Gly, Ile, His, Leu, Phe, Pro, Tyr, Val) que são derivados a partir de sistemas modelos de transferência (OOTBATAKE e OOI, 1988; OOI et al., 1987).

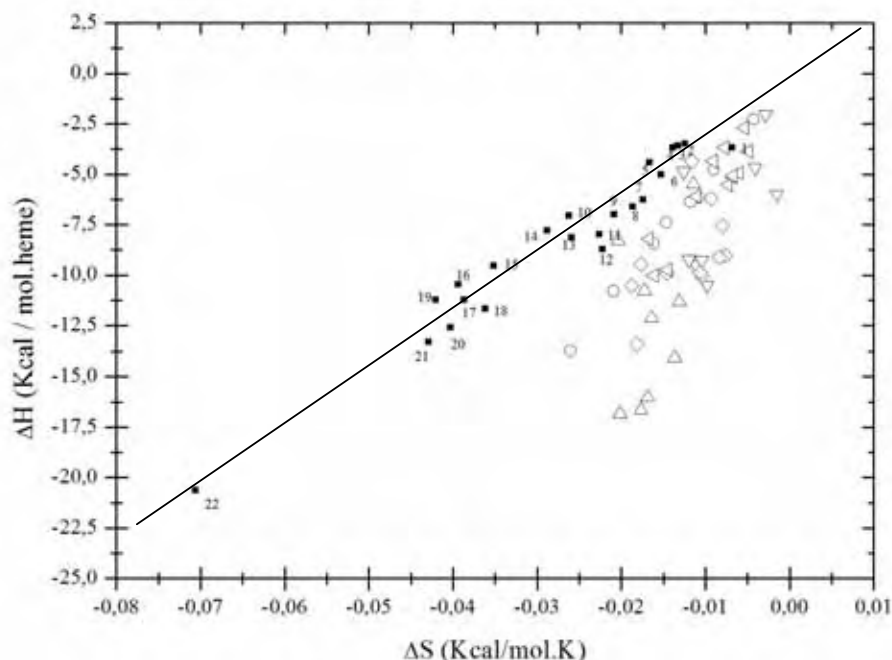


Figura 22. Comparação entre o (■) fenômeno de compensação de oxigenação das espécies em suas respectivas condições experimentais: (1) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (2) HbA₀ Ches 9,0; (3) HbA₀ Hepes 7,3; (4) HbA₀ Hepes 7,3 3,5mM NaCl; (5) HbA₀ Hepes 7,3 5mM NaCl; (6) HbBov_{fet} Ches 9,0; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (9) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (10) HbA₀ Hepes 7,3 10mM NaCl; (11) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (12) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (13) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (14) HbA₀ Hepes 7,3 15mM NaCl; (15) HbA₀ Hepes 7,3 25mM NaCl; (16) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (17) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (18) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (19) HbA₀ Hepes 7,3 200mM NaCl; (20) HbBov_{ad} Ches 9,0; (21) HbEq Hepes 7,2 e (22) HbEq Ches 9,0, com a compensação associada à hidratação de resíduos hidrofílicos obtidos a partir: (◁) de aminoácidos (Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr) que são expostos da cadeia lateral da proteína com o seu desnovelamento (MAKHATADZE e PRIVALOV, 1993); (▽) da transferência de diferentes grupos (-OH, -NH₂, >C=O, -COOH, -NH-, -S-, -CH=, >C<) da fase gasosa para a água (PRIVALOV e MAKHATADZE, 1993); (○) dos parâmetros termodinâmicos de hidratação, tendo como base interações interatômicas que ocorrem com o desnovelamento protéico; (◇) $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$ de hidratação de resíduos (Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr) da cadeia lateral da proteína e (△) dos parâmetros de solvatação de resíduos da cadeia lateral (Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Lys, Ser, Thr) que são derivados a partir de sistemas modelos de transferência (OOTBATAKE e OOI, 1988; OOI et al., 1987).

A figura 21 mostra o gráfico de compensação (figura 20) em conjunto com os valores estimados para a variação de entalpia e entropia dos grupos hidrofóbicos. Gráfico equivalente é observado na figura 22, com os dados de transferência dos grupos hidrofílicos. Os valores numéricos de $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$, obtidos na literatura estão nas tabelas do anexo G.

Os valores das variações de entalpia e entropia de transferência de diferentes grupos hidrofóbicos para a água, mostrados na figura 21, estão localizados próximos e em paralelo com a linha de compensação definida pelos valores experimentais de $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$. Supondo que as energias de hidratação dos grupos contribuem com a energia livre total de uma macromolécula, estes resultados nos mostram que as mudanças em $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ são dominadas pela hidratação com característica hidrofóbica.

A figura 22 confirma os dados apresentados na figura 21, onde as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrofílicos para a água, estão bastante espalhados e localizados na região abaixo da linha de compensação definida por $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$.

4.6. Relação entre ΔC_p , pH e NaCl

O efeito do pH e da concentração de NaCl sobre a variação da capacidade calorífica de oxigenação, ΔC_p , das diversas espécies de Hb estudadas pode ser observado no gráfico tridimensional de ΔC_p versus pH e concentração de NaCl, mostrado na figura 23. Os dados referem-se a parâmetros determinados (tabela II) para as espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais: HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl.

Observamos na figura 23 a presença de seis círculos (1 à 6), os quais apresentam um ΔC_p aproximadamente nulo dentro do erro experimental. Cada um destes círculos representa as espécies de Hb, em suas respectivas condições experimentais: (1) HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 e HbEq Hepes 7,2; (2) HbA₀ Hepes 7,3 e HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (3) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl, HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl e HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (4) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (5) HbA₀ Ches 9,0, HbA_{0-K1} Ches 9,0 e HbBov_{fet} Ches 9,0; (6) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl e HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl. Observamos também, a presença de quatro círculos (7 à 10), os quais apresentam um ΔC_p de aproximadamente -500cal/mol.K. Estes círculos representam as espécies de Hb, em suas respectivas condições experimentais: (7) HbBov_{ad} Ches 9,0; (8) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl e (10) HbEq Ches 9,0.

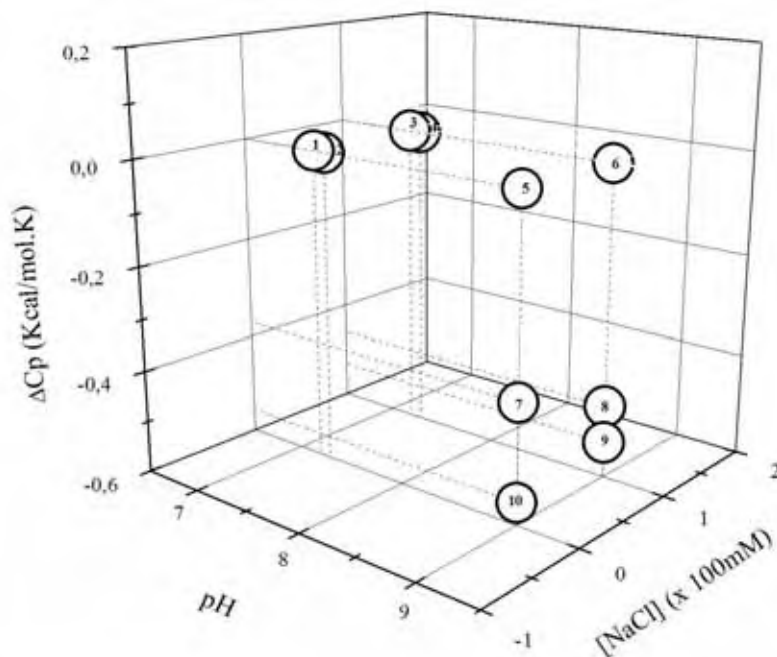


Figura 23. Comparação entre os parâmetros ΔC_p , pH e ausência/presença de 100mM NaCl, para as espécies de Hb analisadas em variadas condições experimentais (tabela II). Cada círculo numerado representa as espécies de Hb em suas respectivas condições experimentais: (1) HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 e HbEq Hepes 7,2; (2) HbA₀ Hepes 7,3 e HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (3) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl, HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl e HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (4) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (5) HbA₀ Ches 9,0, HbA_{0-K1} Ches 9,0 e HbBov_{fet} Ches 9,0; (6) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl e HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (7) HbBov_{ad} Ches 9,0; (8) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (9) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl e (10) HbEq Ches 9,0.

Segundo Prabhu e Sharp (2005), o sinal de ΔC_p distingue a solvatação dos grupos apolares ($\Delta C_p > 0$) e polares da proteína ($\Delta C_p < 0$) (Anexo A), ao contrário do ΔH e ΔS de hidratação que são sempre negativos, para ambos os grupos. Ainda, segundo estes autores, a solvatação de grupos polares é caracterizada por ambos ΔC_p e ΔS negativos na temperatura de referência (298K).

Nas espécies HbBov_{ad} e HbEq na ausência e na presença de 100mM NaCl em pH 9,0 ocorre uma variação da capacidade calorífica, ou seja, ΔC_p negativo. Estas mesmas espécies de Hb nas mesmas condições experimentais, porém em pH 7,2, apresentam um ΔC_p aproximadamente nulo dentro do erro experimental. Isto sugere que nestas espécies de Hb de animais adultos há o predomínio da solvatação de grupos polares em pH 9,0 (PRABHU e SHARP, 2005; BALDWIN, 1986) e que ΔC_p está relacionado a um evento molecular de desprotonação da proteína e não à sua hidratação durante a sua oxigenação. As demais espécies de Hb analisadas na figura 23 apresentam um ΔC_p aproximadamente nulo dentro do erro experimental, independente da condição experimental, indicando que há uma compensação entre a solvatação de grupos polares e apolares na proteína.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito de a_w sobre a afinidade da Hb por O_2

A diferença de hidratação medida na transição conformacional entre os estados T→R de diferentes Hbs, varia com a espécie protéica investigada (tabela I). Estas diferenças de hidratação refletem o impacto da ligação de ânions e de modificações de resíduos de aminoácidos nas cadeias que altera a área de superfície protéica exposta ao solvente. Estas mudanças de hidratação estão associadas às mudanças na afinidade intrínseca da desoxiHb por O_2 , mostrando que mudanças terciárias na estrutura quaternária T atuam em conjunto com a transição quaternária T→R na regulação da ligação cooperativa de oxigênio à Hb de diferentes espécies.

Pelos resultados obtidos em nossos experimentos podemos observar que as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq tem um comportamento semelhante ao da espécie HbA₀ na presença de NaCl. Porém, estas espécies de Hb possuem valores de hidratação menores que os da espécie HbA₀ e, este fato pode ser atribuído às modificações de resíduos de aminoácidos na seqüência primária da proteína, que altera a distribuição de moléculas de água sobre a superfície protéica (Anexo A). Observamos também que com a desprotonação das espécies de Hb a afinidade delas pelo oxigênio aumenta (AMICONI et al., 1981; ANTONINI et al., 1965) e o número de moléculas de água ligadas à superfície protéica não é alterado, e esta característica pode ser comum às hemoglobinas tetraméricas de outras espécies, tais como, Humana A₀ (CAÔN FILHO, 2003), peixe (PERES et al., 2004) e serpente (LOMBARDI et al., 2006).

5.2. Correlação entre Δn_w , ΔH e ΔS de oxigenação

O estudo da correlação entre Δn_w e ΔH teve como base a análise dos termos que contribuem para a entalpia de ligação de O_2 . A equação 4 mostra que, para cada condição experimental, a variação de entalpia observada é dada pela entalpia de ligação de oxigênio ao grupo heme (ΔH_{O_2}), pelo calor associado às mudanças conformacionais na Hb ($\Delta H_{\text{configuração}}$), induzida pela ligação de um ligante em determinada condição experimental, pela diferença do número de ligantes heterotrópicos ligados entre os estados desoxi e oxiHb (Δn_i) e pelo calor intrínseco de ligação do ligante $i = H^+$ ou Cl^- (ΔH_i). Ainda nesta equação, Δn_w e ΔH_w são mantidos em destaque das demais contribuições para enfatizar que a soma $\Delta H_{\text{configuração}} + \Delta n_w \times \Delta H_w$ representa o calor de solvatação ($\delta H_{\text{solvatação}}$).

Na figura 16 nota-se uma correlação linear entre $\Delta H_{\text{observado}}$ e Δn_w das espécies, em suas respectivas condições experimentais: HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl. Isto sugere que a contribuição do calor de ligação de H^+ ou Cl^- é praticamente nula. Com isso, podemos concluir que, durante a ligação de O_2 ao grupo heme, a transferência de grupos enterrados na superfície da Hb para a superfície da proteína e a subsequente hidratação dos mesmos é o único termo que contribui para o $\Delta H_{\text{observado}}$ neste caso. Em outras palavras, desde que não haja qualquer outra contribuição de calor para o $\Delta H_{\text{observado}}$, a inclinação do gráfico de $\Delta H_{\text{observado}}$ com Δn_w representa apenas o valor do calor de solvatação da superfície exposta pela proteína em solução aquosa. Logo, o ajuste para os valores correlacionados linearmente na figura 16 equivale a um,

$$\delta H_{\text{solvação}} = -0,57 \pm 0,01 \text{ Kcal/mol.H}_2\text{O}.$$

É descrito na literatura que com a ligação de O_2 à espécie HbA_0 em pH 7,3, o número de H^+ que é liberado pela proteína varia de aproximadamente 1, na ausência de Cl^- , para aproximadamente 2, na presença de 50mM a 200mM de NaCl (FRONTICELLI et al., 1994; KILMARTIN et al., 1980; ANTONINI et al., 1965). Apesar de ser descrito que o calor de ligação de H^+ não contribui para o ΔH de oxigenação, devido à ausência de *Efeito Bohr* em pH acima de 8,5 para a HbA_0 (BUSCH e HO, 1990; BUCCI e FRONTICELLI, 1981; AMICONI et al., 1981), verificamos que as espécies HbBov_{ad} , $\text{HbBov}_{\text{fet}}$ e HbEq na ausência de NaCl , tanto em pH 7,2 como em pH 9,0, não se correlacionam com as demais espécies de Hb apresentadas na figura 16. Observamos também que para estas mesmas espécies, em pH acima de 8,5 ainda ocorre *Efeito Bohr* (figura 17). Os resultados sugerem que o calor de protonação contribui para o $\Delta H_{\text{observado}}$ destas espécies animais em pH 7,2.

O mesmo tratamento de dados foi dado para as espécies de Hb correlacionadas linearmente no gráfico de $T\Delta S_{\text{calculado}}$ versus Δn_w (figura 19). A inclinação deste gráfico forneceu um,

$$\delta S_{\text{solvação}} = -2,89 \pm 0,01 \text{ cal/mol.K.H}_2\text{O},$$

que corresponde à variação de entropia associada à hidratação. Este valor de $\delta S_{\text{solvação}}$ está de acordo com o custo entrópico para transferir um mol de moléculas de água do líquido para a superfície da proteína, avaliado entre -7 e 0 cal/mol.K por Dunitz, a partir de dados de entropia padrão de hidratação de sais anidros e hidratados (DUNITZ, 1994). Neste caso, também observamos os mesmos valores, os quais não estão correlacionados linearmente na

figura 16. Isto ocorre porque ΔS é calculado a partir dos valores de ΔH de oxigenação (equação 29).

A partir dos valores de $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$ determinados na temperatura de referência (298K), o valor da energia livre associada com a transferência e hidratação de grupos que são expostos durante a oxigenação, $\delta G_{\text{solvatação}}$, vale aproximadamente 290cal/mol.H₂O, concordando com os dados obtidos em experimentos de transferência de grupos químicos de líquidos hidrofílicos para a água (JUFFER et al., 1995; EISENBERG e McLACHLAN, 1986).

5.3. Relação entre os valores de ΔH e ΔS determinados neste trabalho com os dados existentes na literatura

Os valores energéticos de solvatação existentes na literatura foram estimados a partir de experimentos modelo de transferência de pequenas moléculas do meio apolar para a água. Normalmente, estes valores são relacionados à área de superfície exposta ao solvente (ASA) destas moléculas. É descrito que a energia livre de transferência de grupos hidrofóbicos de líquidos não polares para a água apresenta valores médios entre 16–35cal/mol.Å² (JUFFER et al., 1995; EISENBERG e McLACHLAN, 1986). Considerando que uma molécula de água cobre uma área de aproximadamente 10Å², o valor obtido neste trabalho para a variação da energia livre de solvatação por molécula de água de 290cal/mol.H₂O em 298K, concorda com a literatura (JUFFER et al., 1995; EISENBERG e McLACHLAN, 1986).

Para analisar se os valores obtidos de $\delta G_{\text{solvatação}}$, $\delta S_{\text{solvatação}}$ e $\delta H_{\text{solvatação}}$ apresentam características hidrofóbicas, hidrofílicas ou uma mistura destas, uma

comparação através de gráficos de compensação foi realizada entre os valores observados das variações de entalpia e entropia de oxigenação das espécies de Hb, $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$, respectivamente, com os valores da entalpia e entropia de transferência de pequenos grupos químicos de líquidos hidrofóbicos para a água, $\Delta H_{\text{transferência}}$ e $\Delta S_{\text{transferência}}$, respectivamente (MURPHY, 1994; MAKHATADZE e PRIVALOV, 1993; PRIVALOV e MAKHATADZE, 1993; OOBATAKE e OOI, 1988; OOI et al., 1987; BALDWIN, 1986).

De acordo com o gráfico apresentado na figura 21, as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrofóbicos para a água estão localizadas próximas e paralelas da linha de compensação definida pelos valores experimentais de $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$. Este resultado sugere que as mudanças em $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ são dominadas pela hidratação com característica hidrofóbica.

O gráfico da figura 22 mostra uma discrepância com os dados mostrados na figura 21, onde as entalpias e entropias de transferência de diferentes grupos hidrofílicos para a água estão espalhadas e localizadas abaixo da linha de compensação. Esta conclusão é reforçada pela magnitude de $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$, mostrando que, enquanto a mudança estrutural da espécie de Hb para a estrutura de maior superfície exposta ao solvente é favorecida entalpicamente, $\delta H_{\text{solvatação}} < 0$, mas é desfavorecida entropicamente, $\delta S_{\text{solvatação}} < 0$. Kauzmann sugeriu que tal distinção entre uma energia favorável e uma entropia desfavorável de grupos transferidos para água, representa características hidrofóbicas (KAUZMANN, 1959).

Assim, as variações de entalpia e entropia associadas com as mudanças conformacionais das espécies de Hb são dominadas pela energética de hidratação, e possui características típicas à de hidratação de grupos hidrofóbicos, não implicando, entretanto, de que os novos sítios de hidratação expostos ao solvente são exclusivamente grupos hidrofóbicos.

Se os valores de entalpia e entropia de solvatação, $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$, por mol de molécula de água podem ser utilizados para quantificar as variações de entalpia e entropia de outras reações protéicas nas quais as variações de hidratação são conhecidas, então é possível estabelecer uma correlação entre o mecanismo estrutural e o funcional destas proteínas.

Considerando a reação de oxigenação da HbI (*Scapharca inaequalvis*), que liga duas moléculas de oxigênio cooperativamente, as variações de entalpia (ΔH_i) e entropia (ΔS_i) desta ligação em cada passo da reação foram determinadas por Ikeda-Saito e colaboradores (IKEDA-SAITO et al., 1983). O ganho de energia cooperativa sobre a ligação do segundo ligante pode ser determinado pela diferença entre o ΔH_i e ΔS_i entre consecutivos passos. Considerando os valores apresentados por Ikeda-Saito e colaboradores,

$$\Delta\Delta H_i = \Delta H_1 - \Delta H_2 = +4\text{Kcal/mol}$$

$$\Delta\Delta S_i = \Delta S_1 - \Delta S_2 = +17\text{cal/mol.K}$$

a variação de hidratação associada a oxigenação da HbI foi obtida através de experimentos de estresse osmótico, determinado que aproximadamente 7 moléculas de água são liberadas após a ligação de O_2 à HbI (ROYER et al., 1996). Além disso, estimou-se que a contribuição da energia livre (ΔG) é de 2Kcal/mol. Com estes valores, Chiancone e Boffi (2000) tentaram estimar a contribuição da energia de ligação de O_2 associada à hidratação da proteína ao comportamento cooperativo da Hb. Utilizando a entalpia e entropia de ligação de água, -0,57Kcal/mol.H₂O e -2,89cal/mol.H₂O em 298K, respectivamente, determinadas neste trabalho, e sabendo que 7 moléculas de água são liberadas com a

oxigenação da HbI, a contribuição da hidratação para o controle alostérico desta espécie de Hb corresponde a,

$$\Delta\Delta H_i = \Delta H_1 - \Delta H_2 = +3,99\text{Kcal/mol}$$

$$\Delta\Delta S_i = \Delta S_1 - \Delta S_2 = +12,42\text{cal/mol.K}$$

para a entalpia e a entropia, respectivamente. Dentro do erro experimental, estes valores estão em acordo com os valores de entalpia e entropia determinados por Ikeda-Saito e colaboradores (IKEDA-SAITO et al., 1983). Este exemplo mostra que os valores de $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$ determinados, podem proporcionar predições boas a respeito da contribuição da solvatação associada à reatividade e controle alostérico da proteína.

5.4. Relação entre ΔC_p e os parâmetros obtidos neste trabalho

Complementando as análises entre $\delta H_{\text{solvatação}}$ e $\delta S_{\text{solvatação}}$, analisamos também a variação da capacidade calorífica de oxigenação, ΔC_p , de todas as espécies de Hb estudadas neste trabalho e observamos que, tanto na ausência como na presença de NaCl em pH 7,2 e 9,0, seus valores são nulos dentro do erro experimental, exceto para as espécies de Hb de animais adultos (Bovina adulta e Equina) em pH 9,0, tanto na ausência quanto na presença de 100mM NaCl, que apresentaram um ΔC_p em torno de -500cal/mol.K.

Quando ocorre a desprotonação das espécies de Hb animais (Bovina adulta, Bovina fetal e Equina), ou seja, nas mesmas condições experimentais em pH 9,0, $\Delta H_{\text{observado}}$ fica mais negativo, ao contrário da espécie Humana, que permanece inalterado

dentro do erro experimental. Isto sugere que há contribuição do calor de protonação nestas espécies de Hb animais em pH 7,2. Outro aspecto observado somente nas espécies de Hb animais adultos (Bovina adulta e Equina), tanto na ausência quanto na presença de NaCl em pH 9,0, é a existência da contribuição do calor de hidratação, além da contribuição do calor do protonação, pois o ΔC_p é negativo.

Uma possível causa para esta variação de ΔC_p negativa pode ser explicada através de estudos de hidratação dos grupos polares e apolares da proteína. É conhecido que ΔC_p positivo indica a solvatação dos grupos apolares e ΔC_p negativo dos grupos polares da proteína, ao contrário do ΔH e ΔS de hidratação que são sempre menores que zero, para ambos os grupos. Além disso, a solvatação de grupos polares é caracterizada por ambos ΔC_p e ΔS menores que zero na temperatura ambiente (298K) (PRABHU e SHARP, 2005).

O ΔC_p de hidratação é composto pela área exposta ao solvente aos grupos apolares e polares da proteína (PRABHU e SHARP, 2005),

$$\Delta C_{p \text{ hidratação}} = C_{apo} \cdot \Delta A_{apo} + C_{po} \cdot \Delta A_{po}$$

onde C_{apo} e C_{po} são os coeficientes para a área acessível aos grupos apolares e polares da proteína, respectivamente. C_{apo} varia entre +0,24 e +0,48cal/mol.Å².K, e C_{po} entre -0,096 e -0,240cal/mol.Å².K. ΔA_{apo} e ΔA_{po} são as áreas acessíveis aos grupos apolares e polares na proteína, respectivamente.

Considerando que uma molécula de água cobre uma área da superfície protéica de aproximadamente 10Å² (EISENBERG e McLACHLAN, 1986), então os coeficientes C_{apo} e C_{po} apresentarão uma variação entre 2,40 e 4,80cal/mol.K.H₂O, e -0,96 e -2,40cal/mol.K.H₂O, respectivamente. Da tabela I, a espécie HbBov_{ad}, na ausência

de NaCl, apresenta uma variação de hidratação nula dentro do erro experimental, enquanto que na presença de 100mM NaCl, liga em torno de 51 moléculas de água, durante a sua oxigenação, independente do pH. Se ΔC_p é estimado para a solvatação de grupos apolares e polares desta proteína, na ausência de NaCl, tanto $\Delta C_{p\text{-apolar}}$ como $\Delta C_{p\text{-polar}}$ serão nulos independente do pH. Isto sugere que há uma compensação entre a solvatação dos grupos apolares e polares da proteína nestas condições experimentais. Na presença de NaCl, ΔC_p estimado para a solvatação de grupos apolares, será $122 < \Delta C_{p\text{-apolar}} < 245 \text{ cal/mol.K}$ e para a solvatação de grupos polares será $-122 < \Delta C_{p\text{-polar}} < -49 \text{ cal/mol.K}$, independente do pH. Assim, considerando a solvatação de ambos os grupos, na ausência de NaCl, ΔC_p é aproximadamente nulo e, na presença de 100mM NaCl, $-122 < \Delta C_p < 245 \text{ cal/mol.K}$, tanto em pH 7,2 como em pH 9,0. Esta mesma análise pode ser aplicada a qualquer outra espécie de Hb da tabela I.

Experimentalmente, na ausência e na presença de 100mM NaCl em pH 9,0, ΔC_p está em torno de -500 cal/mol.K para as espécies de Hb de animais adultos (Bovina adulta e Equina). Observa-se que este resultado experimental é muito menor do que o calculado segundo Prabhu e Sharp (2005) para a solvatação de ambos os grupos, apolares e polares, da proteína. Isto indica que ΔC_p referente à hidratação destas proteínas é aproximadamente zero e esta diferença é devido a algum evento ainda desconhecido, especificamente para estas espécies.

O ΔC_p obtido experimentalmente para as espécies de Hb de animais adultos (Bovina adulta e Equina) indica que há o predomínio da solvatação de grupos polares, segundo Prabhu e Sharp (2005). Os resultados apresentados na figura 21 mostraram que as entalpias e entropias de transferência dos grupos hidrofóbicos para a água, ao contrário dos grupos hidrofílicos, estão localizadas próximas e paralelas à linha de compensação definida pelos valores experimentais de $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ de todas as espécies de Hb estudadas.

Este resultado sugere que as mudanças em $\Delta H_{\text{observado}}$ e $\Delta S_{\text{calculado}}$ são dominadas pela hidratação com característica hidrofóbica, ou seja, que há o predomínio da solvatação de grupos apolares.

Ainda não é conhecida uma causa específica para tal divergência. Uma possibilidade seria obter o Δn_w , partindo de um estado nativo para um estado desnaturado da proteína, onde há maior exposição de grupos apolares e polares ao solvente e correlacionar com seu respectivo ΔH , comparando os dados obtidos com os dados deste trabalho, onde o Δn_w é obtido na transição entre dois estados nativos da proteína.

6. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que os valores da variação de hidratação, durante a oxigenação de várias espécies de Hb, os quais foram medidos na ausência e na presença de NaCl em pH 7,2 e 9,0, demonstraram que dentro do erro experimental, o Δn_w de cada espécie de Hb não depende do pH, mas depende da presença de NaCl. Observa-se também que há uma correlação entre um *Efeito Bohr* suprimido associado com um valor de Δn_w menor e um *Efeito Bohr* normal associado com um valor de Δn_w maior. Além disso, assim como Δn_w , as variações de entalpia e entropia que acompanham a oxigenação das espécies de Hb, também dependem da presença de 100mM NaCl. Então, pressupõe-se que os responsáveis pela variação de calor de oxigenação das espécies de Hb são as variações na conformação e na hidratação da superfície protéica.

Quanto as dependências de ΔH e ΔS com a presença de 100mM NaCl, estas mostraram-se idênticas dentro do erro experimental, tanto em pH 7,2 como em pH 9,0 somente na espécie HbA₀ (Humana). Nas mesmas condições experimentais que as utilizadas para estudar a espécie HbA₀, nas espécies de Hb animais (HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq), além da contribuição do calor da ligação de O₂, é possível que também haja uma contribuição do calor de liberação de H⁺ nas variações de entalpia e entropia destas espécies. Observamos que nas espécies de Hb de animais adultos (HbBov_{ad} e HbEq) em pH 9,0, ΔC_p é negativo, indicando o predomínio da solvatação de grupos polares. Porém, os estudos realizados através de gráficos de compensação entre ΔH e ΔS das espécies de Hb estudadas neste trabalho indicaram o predomínio da solvatação de grupos apolares. Isto sugere que seria necessário obter o Δn_w e o respectivo ΔH na transição de um estado nativo para um estado desnaturado destas espécies protéicas e comparar com os dados obtidos neste trabalho, para possivelmente explicar tal divergência.

Estendendo as análises realizadas anteriormente em nosso grupo de pesquisa, que utilizaram como modelo apenas a espécie HbA₀ (CAÔN FILHO, 2003;

COLOMBO e CAÔN FILHO, manuscrito) e, acrescentando outras espécies de Hb em variadas condições experimentais, a energia necessária para transferir grupos do interior da proteína para o solvente e hidratá-los, ou seja, a energética de solvatação foi determinada e seus valores são,

$$\delta H_{\text{solvatação}} = -0,57 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$$

$$\delta S_{\text{solvatação}} = -2,89 \text{cal/mol.K.H}_2\text{O}$$

para a oxigenação das espécies de Hb em 298K.

7. REFERÊNCIAS

7.1. Bibliografia

ACKERS, G. K.; DOYLE, M. L.; MYERS, D.; DAUGHERTY, M. A. Molecular Code for Cooperativity in Hemoglobin. *Science*, v.255, p.54-62, 1992.

ADAIR, G. The Hemoglobin System. IV. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.63, n.2, p.529-545, 1925.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Physical Chemistry**. 7^a. ed. United Kingdom: Oxford, 2002.

AMICONI, G.; ANTONINI, E.; BRUNORI, M. Interaction of Hemoglobin with Salts. Effects on Functional Properties of Human Hemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v.152, n.1, p.111-129, 1981.

ANTONINI, E.; WYMAN, J.; BRUNORI, M.; FRONTICELLI, C.; BUCCI, E.; ROSSIFANELLI, A. Studies on the Relations Between Molecular and Function Properties of Hemoglobin. The Influence of Temperature on the Bohr Effect in Human and in Horse Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.240, n.3, p.1096-1103, 1965.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. **Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands**. Amsterdam: North-Holland Publishers, 1971.

BABIN, D. R.; SCHROEDER, W. A.; SHELTON, J. R.; SHELTON, J. B.; ROBBERSON, B. The Amino Acid Sequence of the Bovine Fetal Hemoglobin. *Biochemistry*, v.5, n.4, p.1297-1310, 1966.

BALDWIN, J. M. Structure and Function of Haemoglobin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v.29, p.225-320, 1975.

BALDWIN, J. M. A Model of Cooperative Oxygen Binding to Haemoglobin. *British Medical Bulletin*, v.32, n.3, p.213-218, 1976.

BALDWIN, R. L. Temperature Dependence of the Hydrophobic Interaction in Protein Folding. *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v.83, p.8069-8072, 1986.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R. The Chemistry of the Bohr Effect. *Journal of Biological Chemistry*, v.236, n.2, p.405-410, 1961.

BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; YUNG, S. Equations for the Espectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures. *Analytical Biochemistry*, v.55, n.1, p.245-248, 1973.

BRUNO, S.; BONACCIO, M.; BETTATI, S.; RIVETTI, C.; VIAPPANI, C.; ABBRUZZETTI, S.; MOZZARELLI, A. High and Low Oxygen Conformations of Oxygenation of T State Hemoglobin. *Protein Science*, v.10, n.11, p.2401-2407, 2001.

BUCCI, E.; FRONTICELLI, C. Measurement of Bohr Effect: Dependence on pH of Oxygen Affinity Hemoglobin. *Methods in Enzymology*, v.76, p.523-533, 1981.

BUCCI, E., FRONTICELLI, C. Anion Bohr Effect of Human Hemoglobin. *Biochemistry*, v.24, n.2, p.371-376, 1985.

BUSCH, M. R.; HO, C. E. Effect the Anions on the Molecular Basis of the Bohr Effect of Hemoglobin. *Biophysical Chemistry*, v.37, n.1, p.313-322, 1990.

CAÔN FILHO, O. **Determinação das curvas de equilíbrio de ligação de oxigênio a hemoglobinas em soluções viscosas usando uma cela espectropolarimétrica modificada.** 1997. 87f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

CAÔN FILHO, O. **Contribuição da Solvatação à Entalpia e Entropia de Oxigenação de Hemoglobinas.** 2003. 87f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

CAÔN FILHO, O.; COLOMBO, M. F. The Enthalpy and Entropy Cost of Protein Hydration in Aqueous Solution: A Realistic Approach. Manuscrito em preparação.

CASTRO, O. A. **Influência da Concentração do Íon Cloreto no Efeito Bohr da Hemoglobina Humana A₀.** 1999. 86f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

CHIANCONE, E.; NORNE, J. E.; FORSÉN, S.; ANTONINI, E.; WYMAN, J. Nuclear Magnetic Resonance Quadrupole Relaxation Studies of Chloride Binding to Human Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v.70, n.3, p.675-688, 1972.

CHIANCONE, E.; NORNE, J. E.; FORSÉN, S.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M. S.; ANTONINI, E.; WYMAN, J. Identification of Chloride-Binding Sites in Hemoglobin by Nuclear-Magnetic-Resonance Quadrupole-Relaxation Studies of Hemoglobin Digests. *European Journal of Biochemistry*, v.55, n.2, p.385-390, 1975.

CHIANCONE, E.; BOFFI, A. Structural and Thermodynamic Aspects of Cooperativity in the Homodimeric Hemoglobin from *Scapharca inaequalvis*. *Biophysical Chemistry*, v.86, p.173-178, 2000.

CLEMENTI, M. E.; SCATENA, R.; MORDENTE, A.; CONDÒ, S. G.; CASTAGNOLA, M.; GIARDINA, B. Oxygen Transport by Fetal Bovine Hemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v.255, p.229-234, 1996.

COLETTA, M.; GAMBACURTA, A.; CLEMENTI, M. E.; ERBA, F.; POLIZIO, F.; FALCONI, M.; ASCOLI, F. Functional Modulation of the Thr72-->Ile Mutant from *Scapharca inaequalvis* Homodimeric Hemoglobin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v.4, n.6, p.678-683, 1999.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSEGHIAN, V. A. Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin. *Science*, v.256, p.655-659, 1992.

- COLOMBO, M. F. RAU, D. C. PARSEGIAN, V. A. Reevaluation of Chloride's Regulation of Hemoglobin Oxygen Uptake: The Neglected Contribution of Protein Hydration in Allosterism. *Proceedings of the National Academic Sciences*, v.91, p.10517-10520, 1994.
- COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.9, p.4895-4899, 1996.
- COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. Novel Allosteric Conformation of Human Hb Revealed by the Hydration and Anion Effects on O₂ Binding. *Biochemistry*, v.38, n.36, p.11741-11748, 1999.
- CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucleic Acids Research*, v.16, n.22, p.10881-10890, 1988.
- DOYLE, M. L.; HENSLEY, P. Tight Ligand Binding Affinities Determined from Thermodynamic Linkage to Temperature by Titration Calorimetry. *Methods in Enzymology*, v.295, p.88-99, 1998.
- DUNITZ, J. D. The Entropic Cost of Bound Water in Crystals and Biomolecules. *Science*, v.264, n.5159, p.670, 1994.
- EISENBERG, D.; McLACHLAN, A. D. Solvation Energy in Protein Folding and Binding. *Nature*, v.319, p.199-203, 1986.
- EXPASY PROTEOMICS SERVER *Expert Protein Analysis System Proteomics Server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)*. <http://expasy.org/>, 2007.
- FERMI, G.; PERUTZ, M. F.; SHAANAN, B.; FOURNE, R. The Crystal Structure of Human Deoxyhaemoglobin at 1.74Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, v.175, n.2, p.159-174, 1984.
- FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. Conformational and Functional Characteristics of Bovine Hemoglobin. *Methods in Enzymology*, v.231, p.150-163, 1994.
- FRONTICELLI, C.; PECHIK, I.; BRINIGAR, W. S.; KOWALCZYK, J.; GILLILAND, G. L. Chloride Ion Independence of the Bohr Effect in a Mutant Human Hemoglobin β (V1M+H2 Deleted). *Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.39, p.23965-23969, 1994.
- FRONTICELLI, C.; SANNA, M. T.; PEREZ-ALVARADO, G. C.; KARAVITIS, M.; LU, A. L. Allosteric Modulation by Tertiary Structure Mammalian Hemoglobins. Introduction of the Functional Characteristics of Bovine Hemoglobin into Human Hemoglobin by Five Amino Acid Substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, n.51, p.30588-30592, 1995.
- GIARDINA, B.; BRIX, O.; CLEMENTI, M. E.; SCATENA, R.; NICOLETTI, B.; CICCETTI, R.; ARGENTIN, G. Differences Between Horse and Human Haemoglobins in Effects of Organic and Inorganic Anions on Oxygen Binding. *Biochemical Journal*, v.266, p.897-900, 1990.

HELLMANN, N.; RAIHEL, K.; DECKER, H. A potential role for water in the modulation of oxygen-binding by tarantula hemocyanin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.136, p.725-734, 2003.

HILL, A. V. The Combination of Hemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. *Biochemistry*, v.7, p.471-480, 1913.

IKEDA-SAITO, M.; YONETANI, T.; CHIANCONE, E.; ASCOLI, F.; VERZILI, D.; ANTONINI, E. Thermodynamic Properties of Oxygen Equilibria of Dimeric and Tetrameric Hemoglobins from *Scapharca inaequivalvis*. *Journal of Molecular Biology*, v.170, n.4, p.1009-1018, 1983.

IMAI, K.; YONETANI, T. Thermodynamical Studies of Oxygen Equilibrium of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.250, n.18, p.7093-7098, 1975.

IMAI, K. Thermodynamic Aspects of the Cooperativity in Four-Step Oxygenation Equilibria of Haemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v.133, n.2, p.233-247, 1979.

IMAI, K. Measurement of Accurate Oxygen Equilibria Curves by an Automatic Oxygenation Apparatus. *Methods in Enzymology*, v.76, p.438-449, 1981.

IMAI, K. **Allosteric Effects in Haemoglobin**. Cambridge: University Cambridge Press, 1982.

IMAI, K. Adair Fitting to Oxygen Equilibrium Curves of Hemoglobin. *Methods in Enzymology*, v.62, p.559-577, 1994.

IMAIZUMI, K.; IMAI, K.; TYUMA, I. The Linkage Between the Four-Step Binding of Oxygen and the Binding of Heterotropic Anionic Ligands in Hemoglobin. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, v.86, n.6, p.1829-1840, 1979.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A One-Letter Notation for Amino Acid Sequences Tentative Rules. *Journal of Molecular Biochemistry*, v.243, n.13, p.3557-3559, 1968.

IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). *European Journal of Biochemistry*, v.264, p.607-609, 1999.

JUFFER, H. A.; EISENHABER, F.; HUBBARD, S. J.; WALHER, D.; ARGOS, P. Comparison of Atomic Solvation Parametric Sets: Applicability and Limitations in Protein Folding and Binding. *Protein Science*, v.4, n.12, p.2499-2509, 1995.

KAUZMANN, W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, v.14, p.1-63, 1959.

KILMARTIN, J. V.; IMAI, K.; JONES, R. T.; FARUQUI, A. R.; FOGG, J. Role of Bohr Group Salt Bridges in Cooperativity in Hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.534, p.15-25, 1978.

- KILMARTIN, J. V.; FOGG, J. H.; PERUTZ, M. F. Role of C-terminal Histidine in the Bohr Effect of Human Hemoglobin. *Biochemistry*, v.19, p.3189-3193, 1980.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology*, v.157, p.105-132, 1982.
- KOSHLAND, D.E., NEMETHY, G., AND FILMER, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry*, v.5, p.365-385, 1966.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LESK, A. M.; JANIN, J.; WODAK, S.; CHOIA, C. Haemoglobin: The Surface Buried Between the $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$ Dimers in the Deoxy and Oxy Structures. *Journal of Molecular Biology*, v.183, n.2, p.267-270, 1985.
- LIU, Y.; STURTEVANT, J. M. Significant Discrepancies Between van't Hoff and Calorimetric Enthalpies II. *Protein Science*, v.4, p.2559-2561, 1995.
- LOMBARDI, F. R.; ANAZETTI, M. C.; OLIVIERI, J. R.; AZEVEDO JR., W. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Rattlesnake Haemoglobins: Functional Properties and Tetrameric Stability. *Protein and Peptide Letters*, v.13, n.5, p.517-523, 2006.
- LUMRY, R.; RAJENDER, S. Enthalpy-Entropy Compensation Phenomena in Water Solutions of Proteins and Small Molecules: A Ubiquitous Property of Water. *Biopolymers*, v.9, p.1125-1227, 1970.
- MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics I. The Enthalpy of Hydration. *Journal of Molecular Biology*, v.232, p.639-659, 1993.
- MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 2000.
- MEDLINEPLUS *Información de Salud para Usted*, Enciclopedia Médica, http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19510.htm, 2007.
- MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEAUX, J. P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *Journal of Molecular Biology*, v.12, p.88-118, 1965.
- MUESER, T. C.; ROGERS, P. H.; ARNONE, A. Interface Sliding as Illustrated by the Multiple Quaternary Structures of Liganded Hemoglobin. *Biochemistry*, v.39, p.15353-15364, 2000.
- MURPHY, K. P. Hydration and Convergence Temperatures: On the Use and Interpretation of Correlation Plots. *Biophysical Chemistry*, v.51, p.311-326, 1994.

- NAGEL, R. L.; CHANG, H. Methods for the Study of Sickling and Hemoglobin S Gelation. *Methods in Enzymology*, v.76, p.760-792, 1981.
- NAGHIBI, H.; TAMURA, A.; STUTERVANT, J. M. Significant Discrepancies Between van't Hoff and Calorimetric Enthalpies. *Proceedings in National Academic Sciences*, v.92, p. 5597-5599, 1995.
- OOI, T.; OOBATAKE, M.; NÉMEHY, G.; SCHERAGA, H. A. Accessible Surface Areas as a Measure of Thermodynamic of Hydration of Peptides. *Proceedings of the National Academic of Sciences*, v.84, n.10, p.3086-3090, 1987.
- OOTBATAKE, M.; OOI, T. Characteristic Thermodynamic Properties of Hydrated Water for 20 Amino Acid Residues in Globular Proteins. *Journal of Biochemistry*, v.104, p.433-439, 1988.
- PARSESIAN, V. A.; RAND, R. P.; RAU, D. C. Macromolecules and Water: Probing with Osmotic Stress. *Methods in Enzymology*, v.259, p.43-94, 1995.
- PELLEGRINI, M.; CORDA, M.; MANCA, L.; OLIANAS, A.; SANNA, M. T.; FAIS, A.; ROSA, M. C.; BERTONATI, C.; MASALA, B.; GIARDINA, B. Function and Computer Modeling of Haemoglobin from Horse. *European Journal of Biochemistry*, v.268, p.3313-3320, 2001.
- PERES, P.; AZEVEDO JÚNIOR, W. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Allosteric Water and Phosphate Effects in *Hoplosternum littorale* Hemoglobins. *European Journal of Biochemistry*, v.271, p.4270-4274, 2004.
- PERUTZ, M. F. Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. *Annual Review of Biochemistry*, v.48, p.327-386, 1979.
- PERUTZ, M. F. Mechanism of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v.22, p.139-237, 1989.
- PERUTZ, M. F.; FERMI, G.; POYART, C.; PAGNIER, J.; KISTER, J.; A Novel Allosteric Mechanism in Haemoglobin: Structure of Bovine Deoxyhaemoglobin, Absence of Specific Chloride-Binding Sites and Origin of Chloride-linked Bohr Effect in Bovine and Human Haemoglobin. *Journal of Molecular Biology*, v.233, n.3, p.536-545, 1993.
- PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T.; WILLIAMSON, D. The Chloride Effect in Human Hemoglobin: A New Kind of Allosteric Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v.239, n.4, p.555-560, 1994.
- POYART, C.; BURSAUX, E.; BOHN, B. Determination Directe de la Première Constante D'Association (A_1) de l'O₂ à l'Hémoglobine Humaine. Influence des effecteurs hétérotropes. *Colloque INSERM*, v.70, p.51-56, 1977.
- PRABHU, N. V.; SHARP, K. A. Heat Capacity in Proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, v.56, p.521-546, 2005.

PRIVALOV, P. L.; MAKHATADZE G. I. Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics II. The Entropy and Gibbs Energy of Hydration. *Journal of Molecular Biology*, v.232, p.660-679, 1993.

PROTEIN DATA BANK *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* PDB-RCSB. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, 2007

RAZYNSKA, A.; FRONTICELLI, C.; DI CERA, E.; GRYCZYNSKI, C. Effect of Temperature on Oxygen Affinity and Anion Binding of Bovine Hemoglobin. *Biophysical Chemistry*, v.38, n.1-2, p.111-115, 1990.

RIGGS, A. Preparation of Blood Hemoglobins of Vertebrates. *Methods in Enzymology*, v.76, p.5-29, 1981.

RIGGS, A.; WOLBACH, R. A. Sulphydryl Groups and the Structure of Hemoglobin. *Journal of General Physiology*, v.39, n.4, p.585-605, 1956.

ROLLEMA, H. S.; BRUIN, S. H.; JANSSEN, L. H. M.; VAN OS, G. A. J. The Effect of Potassium Chloride on the Bohr Effect of Human Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n.4, p.1333-1339, 1975.

ROSSI-FANELLI, A.; ANTONINI, E. Studies on the Oxygen and Carbon Monoxide Equilibria of Human Myoglobin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.77, n.2, p.478-492, 1958.

ROYER JR., W. E.; PARDANANI, A.; GIBSON, Q. H.; PETERSON, E. S.; FRIEDMAN, J. M. Ordered Water Molecules as Key Allosteric Mediators in a Cooperative Dimeric Hemoglobin. *Proceedings of the National Academia of Sciences*, v.93, p.14526-14531, 1996.

SALVAY, A. G. **Estudios sobre el Rol del Agua de Hidratación en la Estructura y Función de la Hemoglobina**. 2001. 95f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas) - Universidad Nacional de La Plata, La Plata - Argentina.

SALVAY, A. G.; GRIGERA, J. R.; COLOMBO, M. F. The Role of Hydration on the Mechanism of Allosteric Regulation: In Situ Measurements of the Oxygen-Linked Kinetics of Water Binding to Hemoglobin. *Biophysical Journal*, v.84, n.1, p.564-570, 2003.

SASAGAWA, K.; IMAI, K.; KOBAYASHI, M. Influence of Allosteric Effectors and Temperatura on Oxygen Binding Properties and the Bohr Effect of Bovine Hemoglobin. *Zoological Science*, v.23, p.565-572, 2006.

SEIXAS, F. A.; AZEVEDO JR., W. F.; COLOMBO, M. F. Crystallization and X-ray Diffraction Data Analysis of Human Deoxyhaemoglobin A₀ Fully Stripped of Any Anions. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, v.55, n.11, p.1914-1916, 1999.

SCHROEDER, W. A.; SHELTON, J. R.; SHELTON, J. B.; ROBBERSON, B.; BABIN, D. R. A Comparison of Amino Acid Sequences in the Beta-Chains of Adult Bovine Hemoglobins A and B. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v.120, n.1, p.124-135, 1967.

SHIBAYAMA, N.; SAIGO, S. Fixation of the Quaternary Structures of Human Adult Haemoglobin by Encapsulation in Transparent Porous Silica Gels. *Journal of Molecular Biology*, v.251, n.2, p.203-209, 1995.

SHIBAYAMA, N.; SHIGETOSHI, M.; TAME, J. R. H.; YONETANI, T.; PARK, S-Y. Crystal Structure of Horse Carbonmonoxyhemoglobin-Bezafibrate Complex at 1.55-Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, n.41, p.38791-38796, 2002.

SILVA, M. M.; ROGERS, P. H.; ARNONE, A. A Third Quaternary Structure of Human Hemoglobin A at 1.7-Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.24, p.17248-17256, 1992.

STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução por João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo e Paulo Armando Motta. 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. Original inglês.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of Protein Structure by Sugars. *Biochemistry*, v.21, n.25, p.6536-6544, 1982.

TINOCO JR., I.; SAUER, K. W. **Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences**. 3ª. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1995.

TISEL, W. A.; HAIRE, J. G. W.; ROSENBERG, A. Polyphasic Linkage Between Protein Solubility and Ligand Binding in the Hemoglobin-Polyethylene Glycol System. *Journal of Biological Chemistry*, v.255, n.19, p.8975-8978, 1980.

TOSQUI, P. **O Papel do Cloreto na Estabilização de um Novo Estado Alostérico das Hemoglobinas S e desArg Humanas e Hemoglobina Bovina**. 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

URRY, D.W. The Change in Gibbs Free Energy for Hydrophobic Association - Derivation and Evaluation by Means of Inverse Temperature Transitions. *Chemical Physics Letters*, v.399, n.1-3, 2004.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, W. **Fundamentos de Bioquímica**. Tradução por Arthur Germano Fett Neto et al., 1ª. reimpressão. Porto Alegre: Artmed, 2002. Original inglês.

WEBER, G. van't Hoff Revisited: Enthalpy of Association of Protein Subunits. *Journal of Biophysical Chemistry*, v.99, p.1052-1059, 1995.

WILLIAMS, R. C.; TSAY, K. A Convenient Chromatographic Method for the Preparation of Human Hemoglobin. *Analytical Biochemistry*, v.54, n.1, p.137-145, 1973.

WYMAN, J. Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look. *Advances in Protein Chemistry*, v.19, p.223-286, 1964.

WYMAN, J.; GILL, S. J. **Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules**. Mill Valley: University Press, 1990.

7.2. Participações em Congressos

CAPITÃO, R. C.; COLOMBO, M. F. *Hydration and conformation properties of HbS films determined by weighing and optical absorption*. In: FIRST LATIN AMERICAN PROTEIN SOCIETY, 2004, Angra dos Reis. *Anais*. Angra dos Reis: FLAPS, 2004.

Abstract: Direct and simultaneous measurements of hydration water content and protein conformation of ferric sickle Hemoglobin (met-HbS) have been done using quartz crystal microbalance and visible absorption spectroscopy. In aqueous solution two absorption peaks at 630 and 500nm characterize the structure of met-HbS. Upon dehydration, the spectrum of Hb changes from met derivative to a hemichrome form as detected by a peak in 560nm. Upon this transition the water molecule bound to the iron is released from the heme pocket and substituted by N-epsilon of the endogenous his-E7. Equilibrium and kinetics of methemoglobin/hemichrome transition induced by the alteration of the degree of hydration was investigated in thin films exposed to controlled humidities. The conformation equilibrium between species and the hydration isotherm were determined simultaneously, showing that the hemichrome/metHb conversion occurs between 0.25 – 0.8g.water/g.Hb, with a half transition at the relative humidity of 82%. The first order kinetics of hemichrome to metHb conversion is followed by a bi-exponential kinetics of hydration. Moreover, the rate of conformational change is as fast as the faster rate of water sorption. The results indicate that following the conformation transition triggered by the initial sorption of water molecules, a second kind of process that takes up water slowly starts up. We interpret the slow kinetics of hydration as indicating a further relaxation of protein structure after the release of his-E7 from heme iron. Histeresis produced by complete drying are clearly seen in the isotherms of hydration as well as in the spectra indicating the formation of irreversible hemichrome under this condition.

CAPITÃO, R. C.; COLOMBO, M. F. *Relationship Between Δn_w and ΔH of Oxygenation of Hemoglobins*. In: WORKSHOP ON BIOCALORIMETRY AND BIOLOGICAL THERMODYNAMICS, 2006, Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro: WBBT, 2006.

Abstract: In this work, the enthalpy and entropy of solvation were obtained by combining measurements enthalpy (ΔH) and hydration changes (Δn_w) associated with oxygenation of different hemoglobins (Hb). The number of water molecules associated with the change in water accessible protein surface during O₂ linked change in Hb quaternary structure (the T-R transition) varies according to Hb specie, and within each species with chloride concentration. The preferential binding of the anion chloride to the T conformation of Hb alters its tertiary structure, reflecting the changes in the Δn_w value measured in the absence and in the presence of this anion. These values of oxygenation Δn_w were obtained in solution by osmotic stress method, starting from the determination of the dependence of P₅₀, the O₂ pressure at half saturation, with the water activity (a_w) in solution. Different Hbs, in different solution conditions, besides having different values of Δn_w oxygenation, also have different values of ΔH . We have correlated ΔH and Δn_w values pertaining to Hb Equine adult, Bovine adult and fetal, Human, and *Scapharca inaequivalvis*. From the linear correlation between these thermodynamic parameters we found that the enthalpy of solvation the new protein surface exposed to water during oxygenation is -0,58kcal/mol.H₂O. This parameter represents the energy cost of protein hydration in bulk solutions.

ANEXOS

Anexo A

Seqüência dos aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das espécies de Hb estudadas neste trabalho e alinhamento com as cadeias da HbA₀ (HbBov_{ad} e HbEq) e HbF (HbBov_{fet})

Tabela V - Abreviações dos aminoácidos e propriedades da cadeia lateral (URRY, 2004; VOET et al., 2002; IUPAC-IUBMB JCBN NC-IUBMB, 1999; KYTE e DOOLITTLE, 1982; IUPAC-IUB CBN, 1968).

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridade da cadeia lateral	Acidez ou Basicidade da cadeia lateral	Hidropatia
Alanina	Ala	A	apolar	neutra	1,8
Cisteína	Cys	C	polar	neutra	-4,5
Ácido aspártico	Asp	D	polar	ácida	-3,5
Ácido glutâmico	Glu	E	polar	ácida	-3,5
Fenilalanina	Phe	F	apolar	neutra	2,5
Glicina	Gly	G	apolar	neutra	-3,5
Histidina	His	H	polar	(fracamente) básica	-3,5
Isoleucina	Ile	I	apolar	neutra	-0,4
Lisina	Lys	K	polar	básica	-3,2
Leucina	Leu	L	apolar	neutra	4,5
Metionina	Met	M	apolar	neutra	3,8
Asparagina	Asn	N	polar	neutra	-3,9
Prolina	Pro	P	apolar	neutra	1,9
Glutamina	Gln	Q	polar	neutra	2,8
Arginina	Arg	R	polar	(altamente) básica	-1,6
Serina	Ser	S	polar	neutra	-0,8
Treonina	Thr	T	polar	neutra	-0,7
Valina	Val	V	apolar	neutra	-0,9
Triptofano	Trp	W	apolar	neutra	-1,3
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutra	4,2

Aminoácidos Ambíguos*	3 letras	1 letra
Asparagina ou Ácido aspártico	Asx	B
Glutamina ou Ácido glutâmico	Glx	Z
Leucina ou Isoleucina	Xle	J
Desconhecido ou Não-padrão	Xaa	X

* Quando dois aminoácidos são representados pelo mesmo símbolo. A asparagina e a glutamina são facilmente hidrolisadas para ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente. A leucina e a isoleucina são isômeros estruturais, ou seja, têm a mesma fórmula molecular, mas fórmulas estruturais diferentes (VOET et al., 2002).

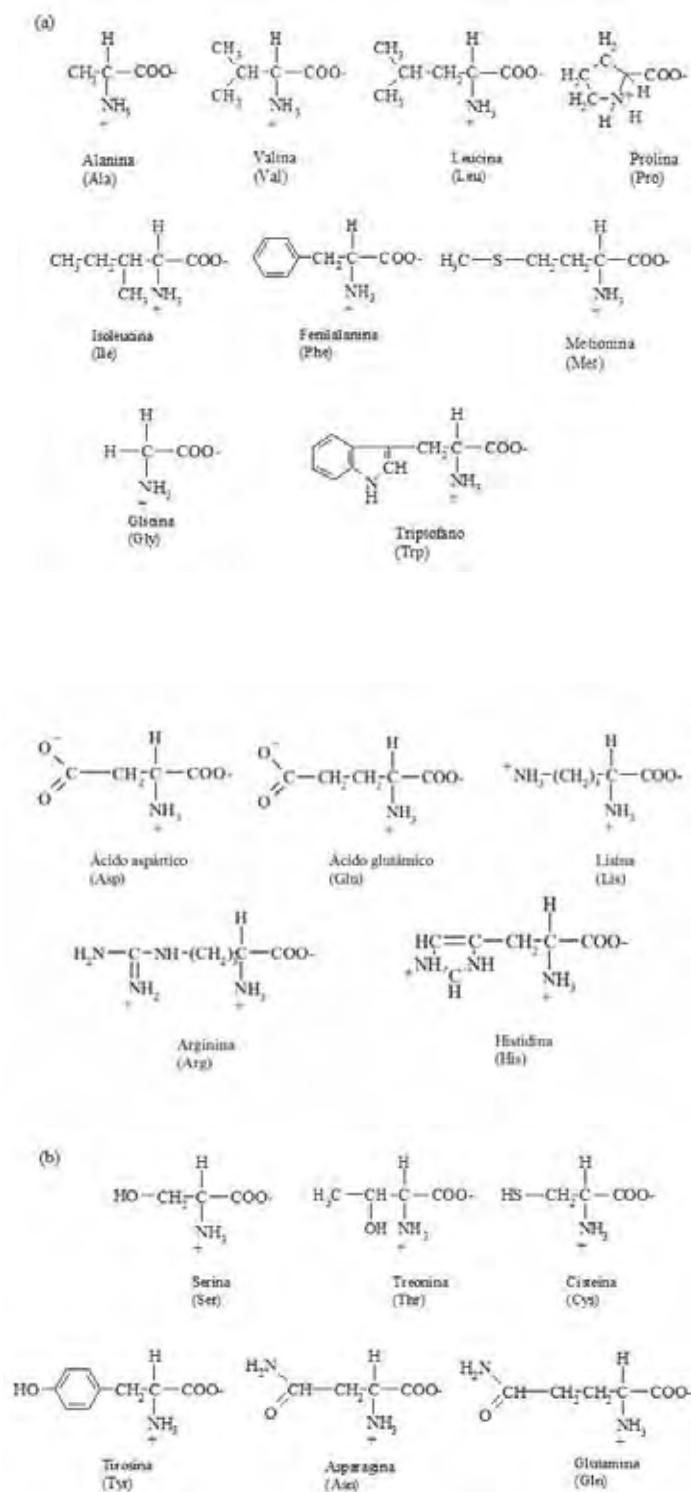


Figura 24. Estrutura dos aminoácidos apolares (a) e polares (B) (VOET et al., 2002).

A partir dos dados apresentados na tabela V, segue a seqüência de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das espécies Bovina adulta (HbBov_{ad}), Bovina fetal (HbBov_{fet}), Equina (HbEq) e do molusco Scapharca inaequalis (HbI), uma descrição de cada uma delas e o alinhamento com as cadeias das espécies Humana (HbA₀) com HbBov_{ad} e HbEq, e da Humana fetal (HbF) com a HbBov_{fet}. Para o alinhamento das cadeias foi utilizado o aplicativo MULTALIN (CORPET, 1988).

a) HbBov_{ad}

Esta espécie de Hb possui uma massa molecular de aproximadamente 62KDa (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007) e, assim como a HbA₀, uma estrutura quaternária composta por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$) com 141 e 145 resíduos de aminoácidos cada, respectivamente.

Difere estruturalmente da HbA₀ em 17 e 23 resíduos de aminoácidos nas cadeias α e β , respectivamente (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007; PROTEIN DATA BANK, 2007), e funcionalmente por ter baixa afinidade ao O₂. Esta característica é apontada como resultado de modificações de resíduos de aminoácidos principalmente nas cadeias β , com hidropatia muito maior que a encontrada na HbA₀ (FRONTICELLI et al., 1995), nas posições β 2 (His→Met), β 5 (Pro→Ala), β 9 (Ser→Ala), β 51 (Pro→Ala), β 87 (Thr→Ala), β 112 (Cys→Val), β 125 (Pro→Val) e β 130 (Tyr→Phe) (tabela V), além do resíduo β 1 deletado por comparação com as cadeias β da HbA₀. Nas cadeias α , as modificações são nas posições α 4 (Pro→Ala), α 8 (Thr→Gly), α 22 (Gly→Ala), α 60 (Lys→Ala), α 64 (Asp→Ala), α 76 (Met→Leu) e α 78 (Asn→Gly), como pode ser visto na figura 25.

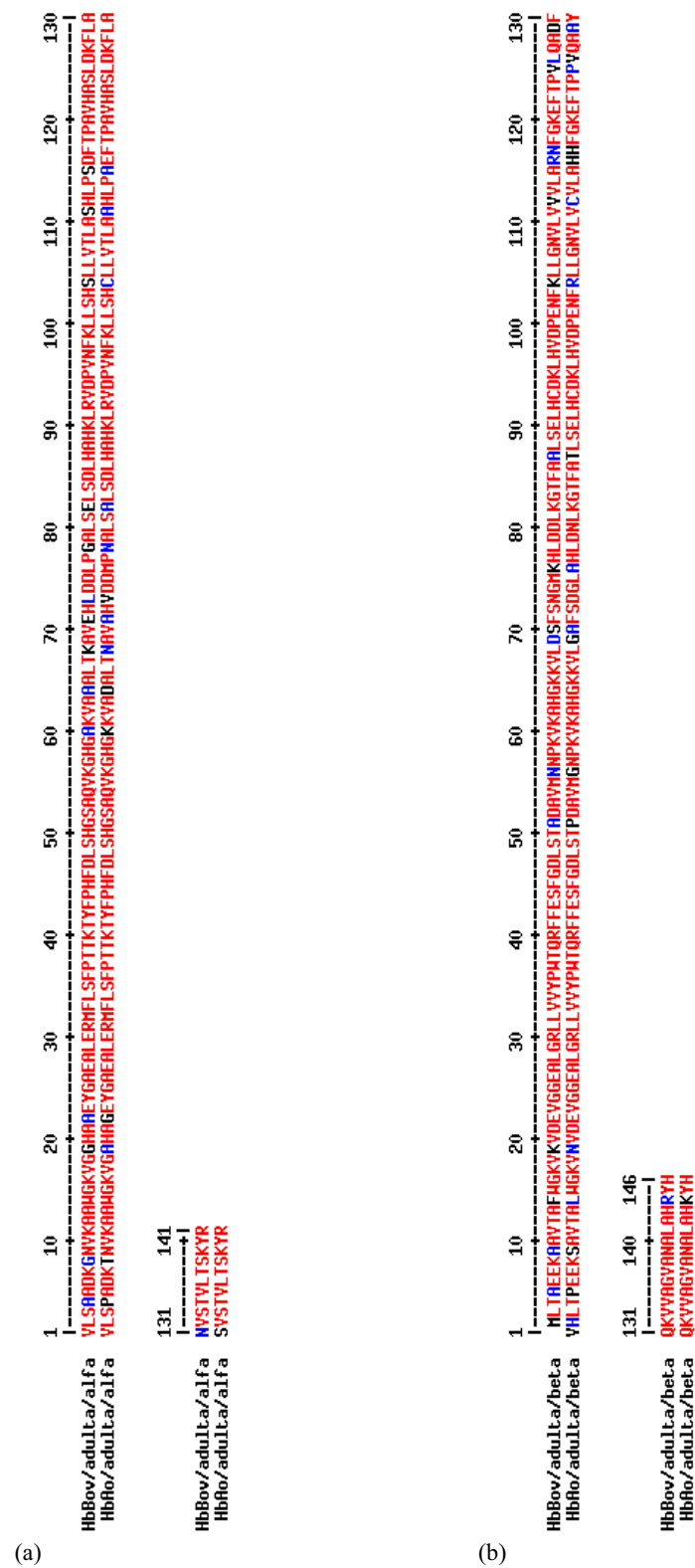


Figura 25. Sequência dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas α (a) e β (b) da HbBov_{ad}, além do alinhamento com as respectivas cadeias da HbA₀.

Ainda na figura 25, tanto nas cadeias α como nas cadeias β , observa-se que as modificações de resíduos de aminoácidos se concentram na região do heme, ou seja, entre as histidinas distal ($\alpha 58$ e $\beta 62$) e proximal ($\alpha 89$ e $\beta 91$), e nas porções inicial e final destas cadeias, sendo em maior número nas cadeias β .

Esta hidrofobicidade causa uma torção nestas porções das cadeias α e β , causando uma diminuição na afinidade da Hb pelo O_2 (RAZYNSKA et al., 1990) e consequente diminuição de ASA, reduzindo o Δn_w quando comparado ao da HbA₀ (tabela D).

b) HbBov_{fet}

Esta espécie de Hb possui uma massa molecular de aproximadamente 62KDa (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007) e uma estrutura quaternária composta por duas cadeias α e duas cadeias γ ($\alpha_2\gamma_2$) com 141 e 145 resíduos de aminoácidos, respectivamente (BABIN et al., 1966).

Quando comparada à HbBov_{ad}, suas cadeias α são idênticas. Já suas cadeias γ , quando comparadas às cadeias γ da HbF, diferem em 40 resíduos de aminoácidos, além de um resíduo a menos localizado na posição $\gamma 1$ por similaridade (SCHROEDER et al., 1967). Quando esta espécie de Hb passa a adulta (HbBov_{fet}→HbBov_{ad}), suas cadeias γ se transformam em β , através da modificação de 22 resíduos de aminoácidos nas cadeias γ (figura 26).

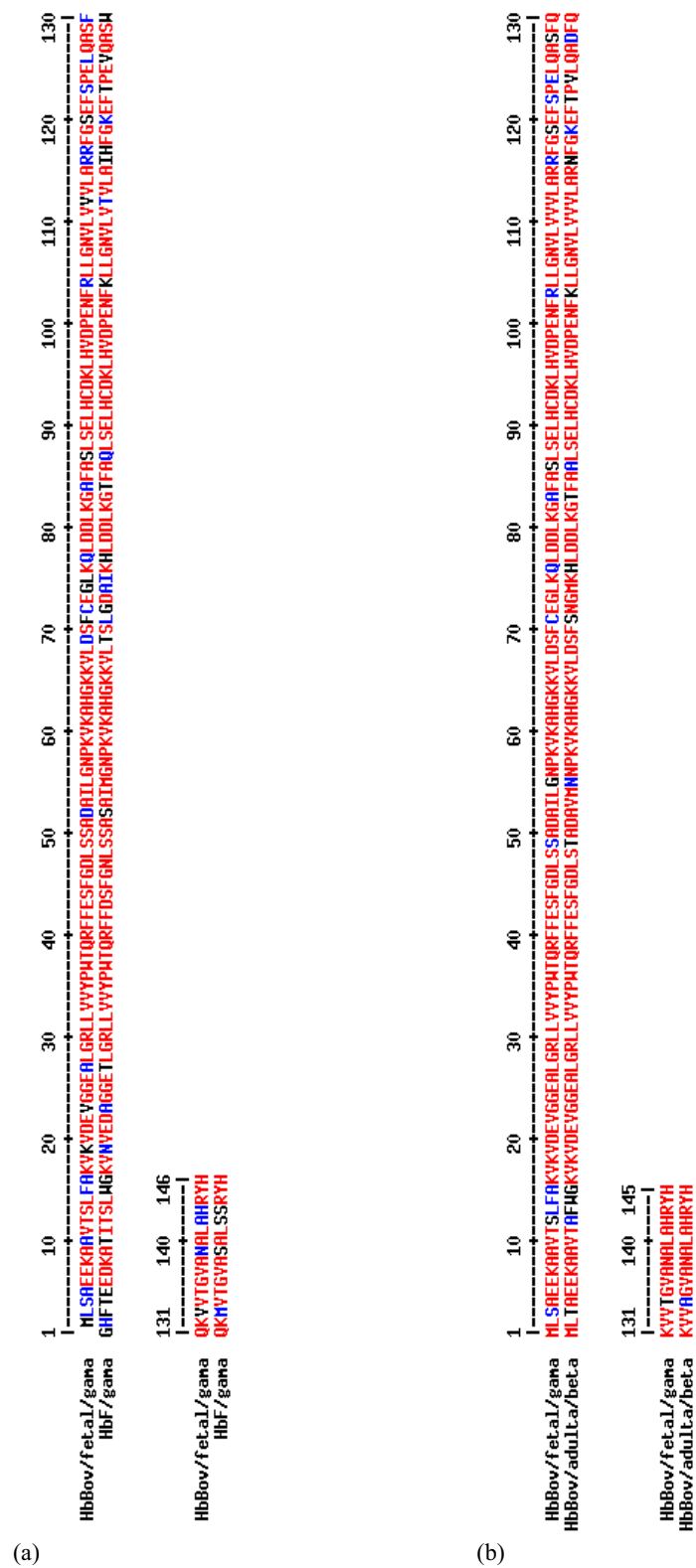


Figura 26. Sequência dos resíduos de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica γ da HbBov_{fet}, além do alinhamento com a cadeia γ da HbF (a) e com a cadeia β da HbBov_{ad} (b).

Estas modificações de resíduos de aminoácidos nas cadeias γ e β , com hidropatia muito maior que a encontrada na HbF e HbBov_{ad}, respectivamente, são nas posições γ 2 (His→Met), γ 5 (Glu→Ala), γ 10 (Thr→Ala), γ 15 (Trp→Phe), γ 16 (Gly→Ala), γ 19 (Asn→Lys), γ 27 (Thr→Ala), γ 47 (Asn→Asp), γ 75 (Ile→Leu), γ 84 (Thr→Ala), γ 104 (Lys→Arg), γ 117 (His→Arg), γ 120 (Lys→Ser), γ 126 (Val→Leu), γ 130 (Trp→Phe) e γ 142 (Ser→Ala), além do resíduo γ 1 deletado por comparação com as cadeias γ da HbF; e nas posições β 13 (Trp→Phe), β 14 (Gly→Ala), β 53 (Val→Ile), β 54 (Met→Leu), β 55 (Asn→Gly), β 72 (Asn→Glu), β 74 (Met→Leu), β 76 (His→Gln), β 83 (Thr→Ala), β 116 (Asn→Arg), β 119 (Lys→Ser) e β 128 (Asp→Ser), respectivamente, como pode ser visto na figura 26.

Ainda na figura 26, observa-se que as modificações de resíduos de aminoácidos se concentram na região do heme, ou seja, entre as histidinas distal (γ 62) e proximal (γ 91), e nas porções inicial e final das cadeias γ . Esta hidrofobicidade causa uma torção nestas porções das cadeias polipeptídicas, reduzindo a afinidade da proteína por O₂ (BABIN et al., 1966), além de uma mudança na sua superfície de solvatação, resultando em um Δn_w maior do que o obtido para a HbBov_{ad} e menor do que para a HbA₀ (tabela I).

c) HbEq

Esta espécie de Hb possui uma massa molecular de aproximadamente 63KDa (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007) e, assim como a HbA₀, uma estrutura quaternária composta por duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada, respectivamente (SHYBAYAMA et al., 2002; PELLEGRINI et al., 2001; MUESER et al., 2000).

Apesar da similaridade estrutural, a HbEq apresenta 18 e 26 modificações de resíduos de aminoácidos, nas cadeias α e β , respectivamente, quando comparada à HbA₀ (figura 27) (PROTEIN DATA BANK, 2007). Estas modificações na seqüência de resíduos de aminoácidos desta Hb acarretam em uma mudança na superfície de solvatação da proteína, resultando em um Δn_w menor que o da HbA₀ (tabela I). Além disso, esta Hb apresenta uma afinidade maior pelo O₂ em relação à HbA₀. Estas características são apontadas como resultado de modificações de resíduos de aminoácidos nas cadeias α e β , com hidropatia muito maior que a encontrada na HbA₀ (tabela V), nas posições $\alpha 4$ (Pro→Ala), $\alpha 35$ (Ser→Gly), $\alpha 57$ (Gly→Ala), $\alpha 68$ (Asn→Leu), $\alpha 76$ (Met→Leu), $\alpha 78$ (Asn→Gly) e $\alpha 111$ (Ala→Val) nas cadeias α , e nas posições $\beta 5$ (Pro→Gly), $\beta 9$ (Ser→Ala), $\beta 12$ (Thr→Leu), $\beta 52$ (Asp→Gly), $\beta 72$ (Ser→Gly), $\beta 75$ (Lys→Val), $\beta 87$ (Thr→Ala), $\beta 112$ (Cys→Leu) e $\beta 114$ (Leu→Val), nas cadeias β .

Ainda na figura 27, tanto nas cadeias α como nas cadeias β , observa-se que as modificações de resíduos de aminoácidos se concentram na região do heme, ou seja, entre as histidinas distal ($\alpha 58$ e $\beta 63$) e proximal ($\alpha 89$ e $\beta 92$), e nas porções inicial e final destas cadeias, sendo em maior número nas cadeias β .

Na HbA₀ a forma de menor solubilidade e afinidade por O₂ é a forma desoxiHb (TISEL et al., 1980), ao contrário da HbEq, que apresenta menor solubilidade na forma oxiHb que é de maior afinidade por O₂.

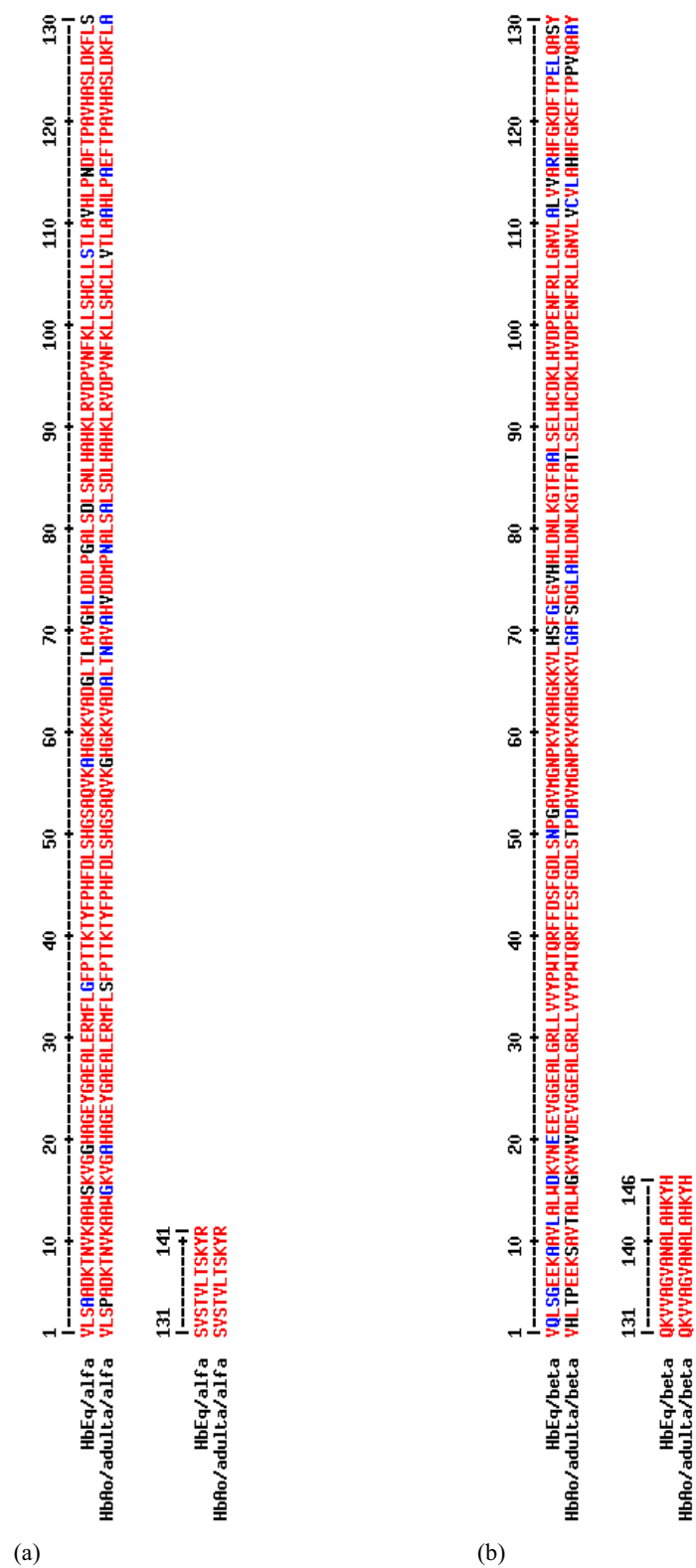


Figura 27. Sequência dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas α (a) e β (b) da HbE α , além do alinhamento com as respectivas cadeias da HbA α .

d) HbI

Esta espécie de Hb é uma proteína homodimérica cooperativa proveniente dos glóbulos vermelhos do molusco *Scapharca inaequalvis* (CHIANCONE e BOFFI, 2000; COLETTA et al., 1999). Possui uma massa molecular de aproximadamente 64KDa (EXPASY PROTEOMICS SERVER, 2007) e uma estrutura composta por duas cadeias α com 146 resíduos de aminoácidos cada (figura 28).

Esta Hb, ao contrário das hemoglobinas tetraméricas (HbA₀, HbBov_{ad}, HbBov_{fet}, HbEq, por exemplo), é formada por dois grupos heme, sendo cada um deles, carregados pelas hélices E e F, os quais estão sempre em contato direto e não expostos ao solvente (CHIANCONE e BOFFI, 2000; COLETTA et al., 1999).

Durante sua oxigenação, ocorre o deslocamento do átomo de Fe⁺² na direção do plano do heme em um movimento que puxa a His-F8 e resulta em uma mudança da hélice F. Então, as mudanças terciárias na subunidade ligada são propagadas para a outra subunidade do monômero através da interface dimérica (CHIANCONE e BOFFI, 2000).

Ao contrário das hemoglobinas previamente descritas que ligam moléculas de água durante a oxigenação, estudos cristalográficos e medidas de variação de hidratação desta Hb mostram que cerca de 7 moléculas de água são liberadas da proteína na ligação do segundo O₂ (CHIANCONE e BOFFI, 2000), devido à mudança estrutural induzida pela ligação do segundo O₂ (ROYER et al., 1996).

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
 HbI
 PSYYDAAARL TADYKQLRDSMKYIGSDKKGNGYALMTTLFADNQETLIGYFKRLGDVSGQGMANDKLRGHSILLMYALQMFIDQLDNPDDLVCYVEKFRVNHITRKSISAREFGKINGPIKKYLRASKNFGDK
 alfa
 131 140 146
 HbI
 YANRNRKLYRYYQARL
 alfa

Figura 28. Sequência dos resíduos de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica α da HbI.

A figura 29 mostra o alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das espécies HbA₀, HbF, HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq. Observa-se que nestas espécies de Hb, as modificações de resíduos de aminoácidos ocorrem sempre nas mesmas posições das cadeias e, além disso, o maior número de modificações ocorre nas cadeias β e γ das espécies de Hb analisadas.

Na figura 29(a), que mostra o alinhamento das cadeias polipeptídicas α das espécies HbA₀, HbF, HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq, observa-se que as modificações são nas posições,

α4	α8	α15	α19	α22	α35	α57	α60	α64	α65	α68	α71
α73	α76	α78	α82	α85	α104	α107	α111	α115	α116	α130	α131

Já a figura 29(b), que mostra o alinhamento das cadeias polipeptídicas β (HbA₀, HbBov_{ad} e HbEq) e γ (HbF e HbBov_{fet}), as modificações são nas posições β ou γ,

1	2	3	4	5	7	9	10	12	13	14	15
16	19	20	21	22	23	27	43	47	50	51	52
54	55	56	69	70	71	72	73	74	75	76	77
80	84	87	104	111	112	114	116	117	120	121	123
125	126	129	130	133	135	139	142	143	144		

Observa-se também que estas modificações de resíduos de aminoácidos, tanto na figura 29(a) como na figura 29(b), ocorrem, na sua maioria, nas porções inicial* e final† das cadeias, e na região do heme‡.

Assim, acreditamos que esta seja uma característica evolutiva comum às espécies de Hb tetraméricas em geral.

* Resíduos de aminoácidos nas posições 1 a 27 de ambas as cadeias polipeptídicas α, β e γ.

† Resíduos de aminoácidos na posição 104 até o término de ambas as cadeias polipeptídicas α, β e γ.

‡ Resíduos de aminoácidos nas posições 58 a 89, e 63 a 92, das cadeias polipeptídicas α, β e γ.

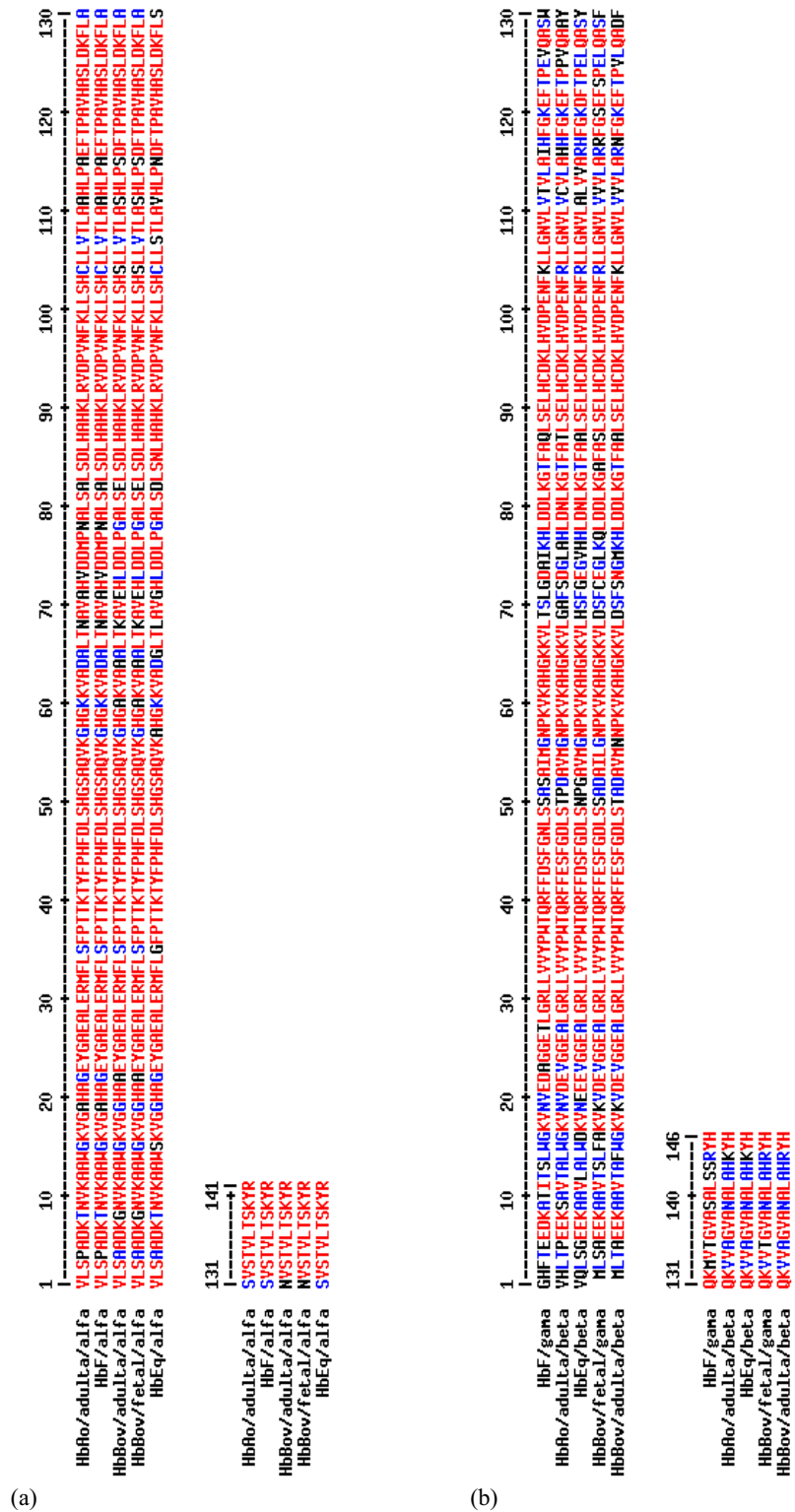


Figura 29. Alinhamento das seqüências dos resíduos de aminoácidos que compõem as cadeias polipeptídicas das espécies HbA₀, HbF, HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq. Em (a) há o alinhamento das respectivas cadeias α e em (b) das respectivas cadeias β e γ .

Anexo B

Equações de van't Hoff

Como mencionado na página 37, as *Equações de van't Hoff* são obtidas a partir da equação 32,

$$R \frac{d \ln P_{50}}{dT} = \frac{d\Delta H}{dT} \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta H}{T^2} \quad (32)$$

onde o termo,

$$\frac{d\Delta H}{dT} = \Delta C_p \quad (37)$$

representa a variação de capacidade calorífica de oxigenação.

Quando ΔC_p é nulo dentro do erro experimental então, reescrevendo a equação 32,

$$\frac{d \ln P_{50}}{dT} = -\frac{\Delta H}{RT^2} \quad (38)$$

Integrando a equação 38 em função da temperatura,

$$\int d \ln P_{50} = \int -\frac{\Delta H}{RT^2} dT \quad (39)$$

Resolvendo a equação 39,

$$\ln P_{50} = \frac{\Delta H}{RT} \quad (40)$$

Derivando a equação 40 em relação inverso da temperatura, chega-se na *Equação de van't Hoff* (mencionada na página 37),

$$\left. \frac{d \ln P_{50}}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \right|_{a_i} = \frac{\Delta H}{R} \quad (33)$$

Quando ΔH depende da temperatura e sabendo-se que na temperatura de referência T_0 , os valores da entalpia de van't Hoff em P_{50} são dados por ΔH_0 , reescrevendo a equação 32,

$$R \frac{d \ln P_{50}}{dT} = \frac{\Delta C_p (T - T_0)}{T^2} - \frac{\Delta H_0}{T^2} \quad (41)$$

Reescrevendo a equação 41,

$$R \frac{d \ln P_{50}}{dT} = -\frac{\Delta H_0}{T^2} + \frac{\Delta C_p}{T} - \frac{\Delta C_p \cdot T_0}{T^2} \quad (42)$$

Integrando a equação 42 em função da temperatura,

$$R \int_{T_0}^T d \ln P_{50} = - \left[\left(- \int_{T_0}^T \frac{\Delta H_0}{T^2} dT \right) + \left(\int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT \right) - \left(\int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p \cdot T_0}{T^2} dT \right) \right] \quad (43)$$

Resolvendo a equação 43,

$$R \ln \left(\frac{P_{50}}{P_{50}^0} \right) = \Delta H_0 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) - \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) - \Delta C_p \cdot T_0 \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (44)$$

Rearranjando os termos da equação 44, chega-se à *Equação de van't Hoff Integrada* (mencionada na página 37),

$$\ln \left(\frac{P_{50}}{P_{50}^0} \right) \Big|_{a_i} = \frac{\Delta H_0 - T_0 \Delta C_p \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) - \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_0} \right)}{R} \quad (34)$$

Anexo C

Comportamento da afinidade das espécies de Hb por O₂

Conforme descrito anteriormente (páginas 40 a 42), seguem os resultados do efeito da adição de solutos neutros sobre a afinidade das espécies HbBov_{ad} e HbEq em Hepes 7,2 e Ches 9,0 a 298K, na ausência e presença de 100mM NaCl em várias concentrações de sacarose, além da espécie HbBov_{fet} em Ches 9,0 a 298K, também em várias concentrações de sacarose.

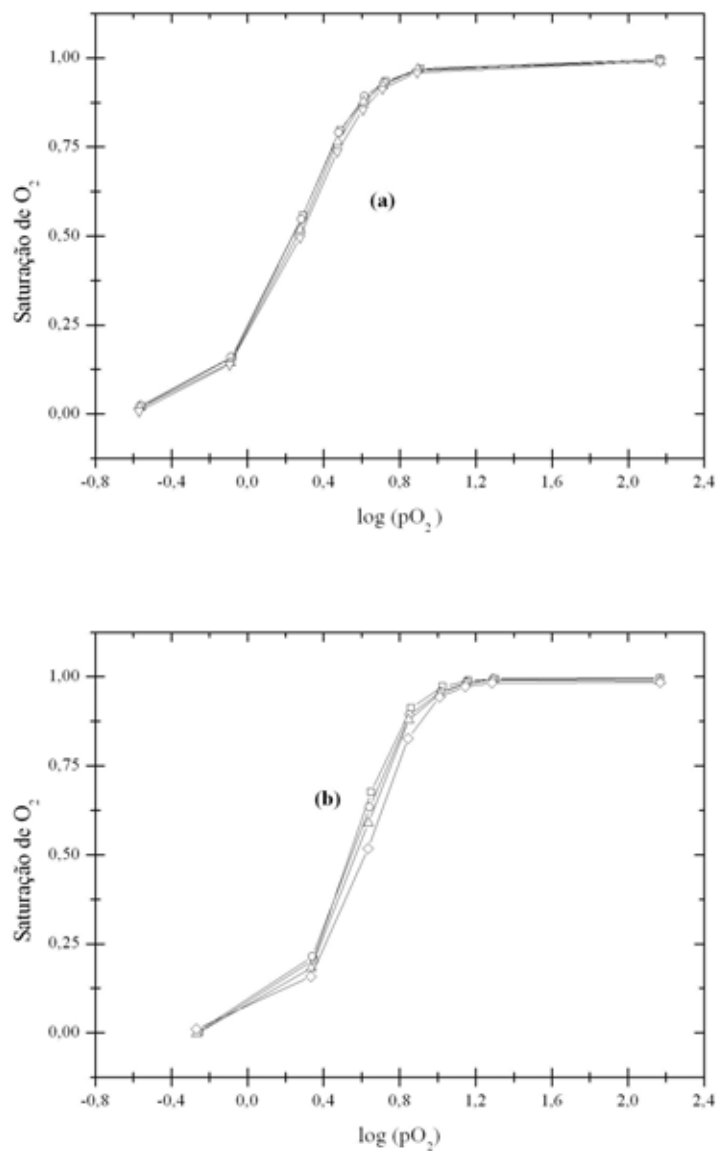


Figura 30. Comportamento da afinidade da espécie HbBov_{fet} (60μM/heme) por O₂ em soluções contendo (a) Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (▽), com osmolaridades 0,022, 0,367, 0,865 e 1,581osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P₅₀, ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Ches 9,0 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (◇), com osmolaridades 0,209, 0,559, 1,032 e 1,813osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P₅₀, com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

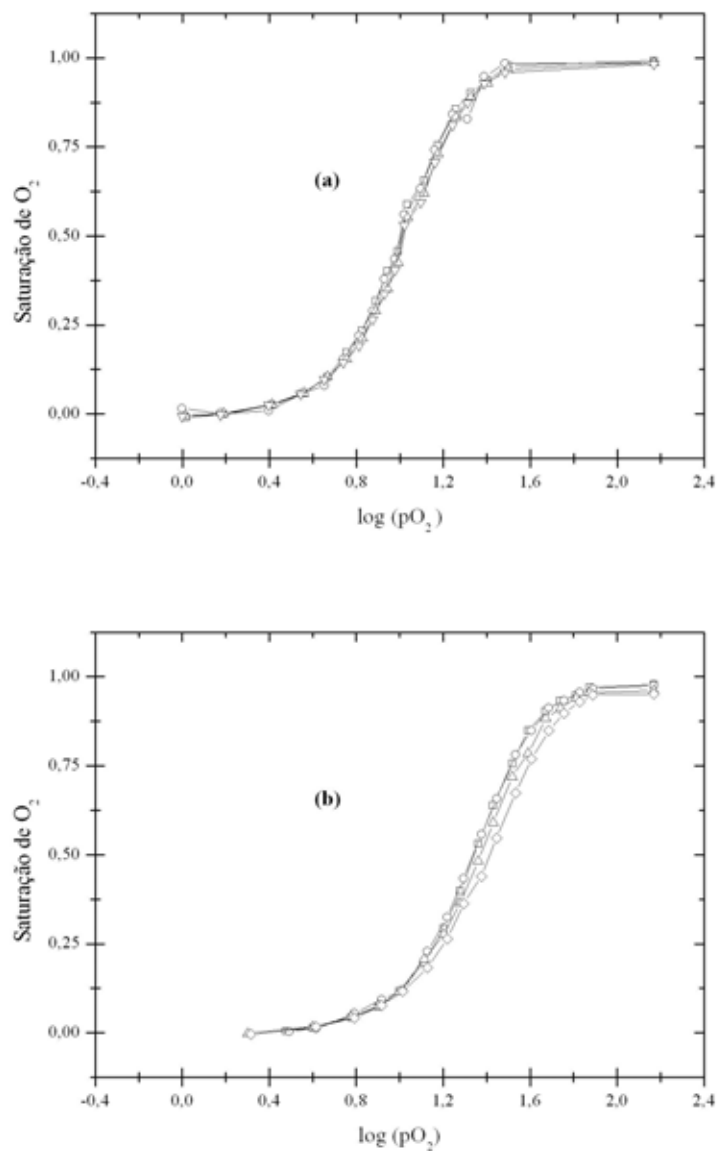


Figura 31. Comportamento da afinidade da espécie HbBov_{ad} (60 μ M/heme) por O₂ em soluções contendo (a) Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (∇), com osmolaridades 0,021, 0,363, 0,856 e 1,566osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P₅₀, ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Hepes 7,2 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (\diamond), com osmolaridades 0,208, 0,538, 0,982 e 1,599osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P₅₀, com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

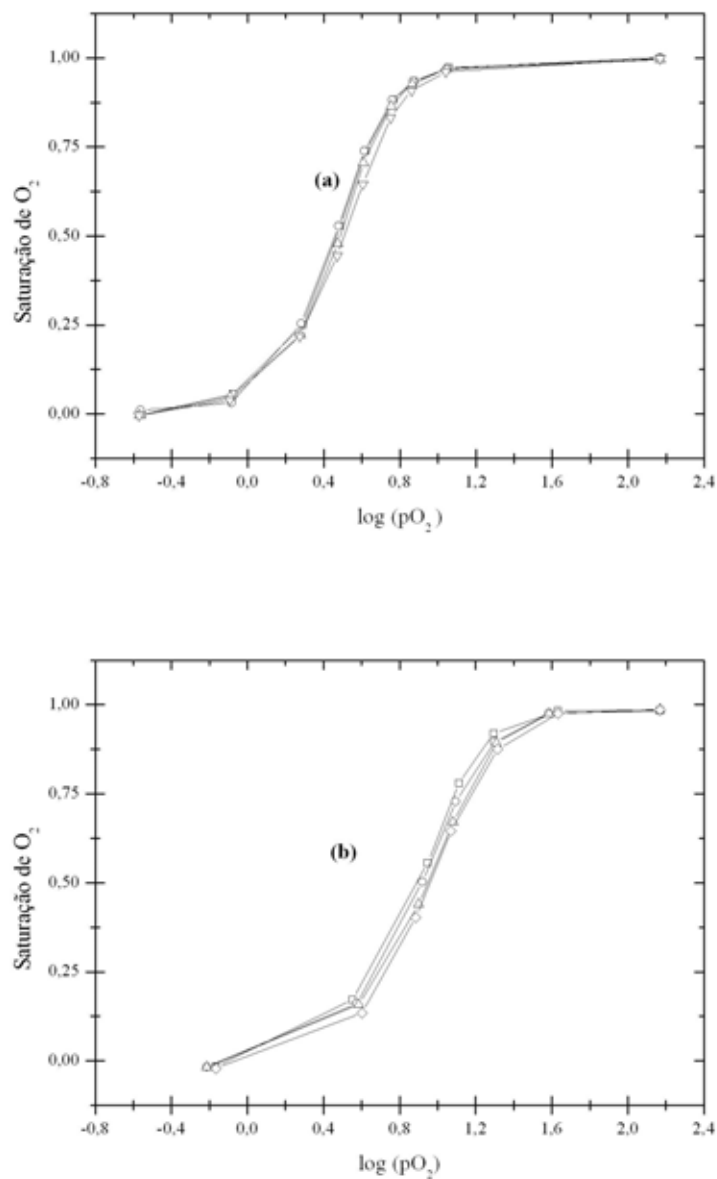


Figura 32. Comportamento da afinidade da espécie HbBov_{ad} (60μM/heme) por O₂ em soluções contendo (a) Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (▽), com osmolaridades 0,021, 0,376, 0,861 e 1,540osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P₅₀, ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Ches 9,0 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (□), 10% (○), 20% (△) e 30% (◇), com osmolaridades 0,208, 0,544, 1,055 e 1,701 osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P₅₀, com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

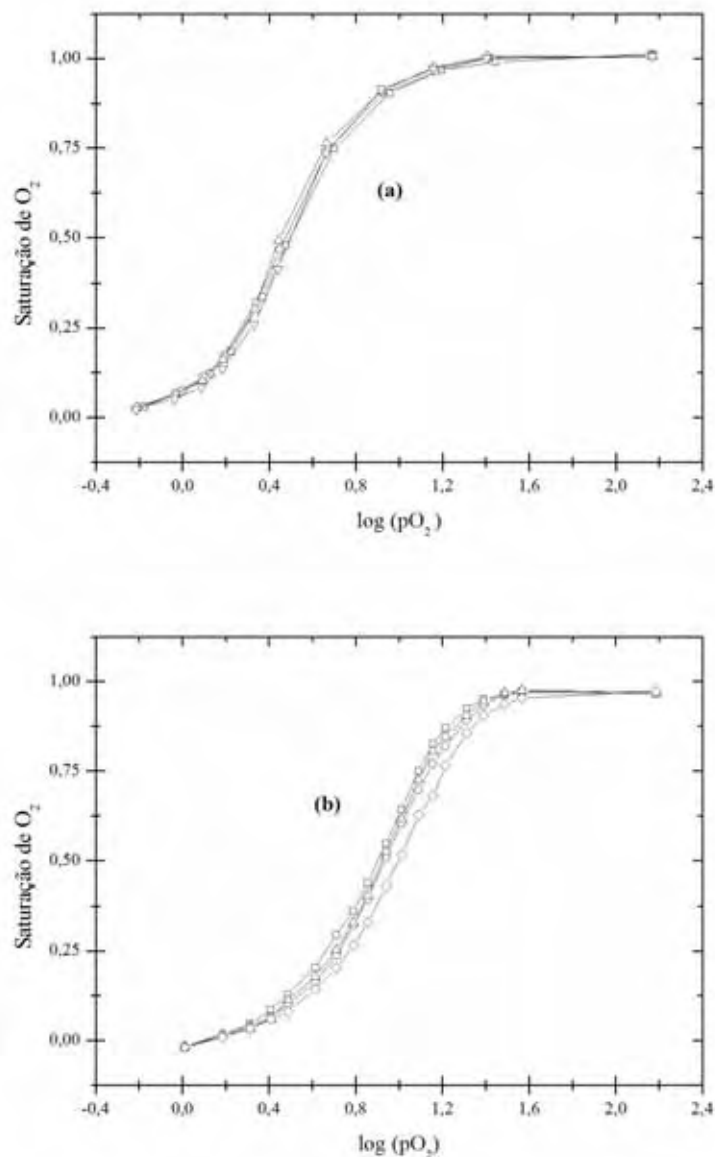


Figura 33. Comportamento da afinidade da espécie HbEq ($60\mu\text{M}/\text{heme}$) por O_2 em soluções contendo (a) Hepes 7,2 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (∇), com osmolaridades 0,020, 0,345, 0,795 e 1,439osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P_{50} , ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Hepes 7,2 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (\diamond), com osmolaridades 0,207, 0,538, 0,971 e 1,639osmol/Kg.H₂O, respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P_{50} , com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w , que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

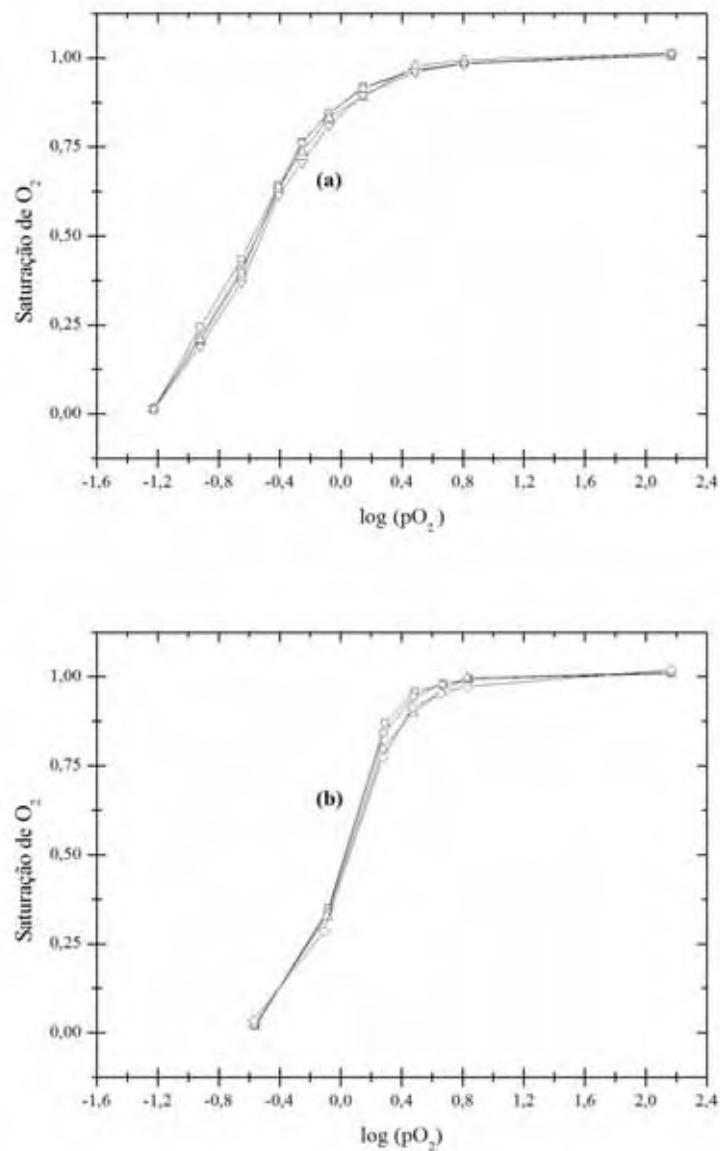


Figura 34. Comportamento da afinidade da espécie HbEq ($60\mu\text{M}/\text{heme}$) por O_2 em soluções contendo (a) Ches 9,0 a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (∇), com osmolaridades 0,022, 0,365, 0,865 e 1,555osmol/Kg. H_2O , respectivamente. O deslocamento das curvas para valores maiores de P_{50} , ao aumentar a concentração de sacarose, não é observado na ausência de NaCl; (b) Ches 9,0 100mM NaCl a 298K, em diferentes concentrações de sacarose: 0% (\square), 10% (\circ), 20% (\triangle) e 30% (\diamond), com osmolaridades 0,213, 0,563, 1,028 e 1,953osmol/Kg. H_2O , respectivamente. O deslocamento das curvas de oxigenação para valores maiores de P_{50} , com o aumento da concentração de sacarose, está associado à diminuição de a_w , que desloca o equilíbrio da reação para o estado T, na presença de 100mM NaCl. As curvas representam o ajuste *Logístico de Hill* aos dados experimentais, permitindo uma melhor visualização do comportamento da espécie de Hb em cada condição experimental.

Anexo D

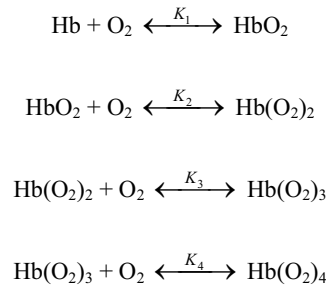
Comparação entre os parâmetros de oxigenação obtidos através do Gráfico de Hill e com a Equação de Adair

Como descrito anteriormente, os parâmetros funcionais n_{50} e P_{50} foram obtidos através do *Gráfico de Hill* (páginas 31, 32 e 33). Deste mesmo gráfico também é possível determinar os valores das constantes de ligação da primeira e quarta molécula de O_2 à Hb, K_1 e K_4 , respectivamente. Estes valores são obtidos extrapolando as retas que interpolam os valores de ligação de O_2 nas extremidades do *Gráfico de Hill*. O intercepto da reta que passa pelos pontos à baixa saturação ($\bar{Y} < 10\%$) quando $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = 0$ define $\log(K_1)$; Já o intercepto da reta que passa pelos pontos a alta saturação define $\log(K_4)$ (IMAI, 1994; 1981; 1982).

Na figura 9 (página 33), a reta que passa pelos valores de $\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) < -0,96$, na interseção com o eixo de $\log(pO_2)$, fornece o $\log(K_1)$. Trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa mostraram que a determinação da constante de associação da quarta molécula de O_2 à Hb, é crítica por se tratar de um valor muito próximo a 100% de saturação de O_2 (TOSQUI, 2004; CAÔN FILHO, 2003).

Nos nossos experimentos, não conseguimos obter K_1 através do *Gráfico de Hill* por não termos pontos suficientes na região de baixa saturação, então, na tentativa de obter K_1 e comprovar os dados obtidos através do *Gráfico de Hill*, utilizamos a *Equação de Adair*.

Adair (1925) propôs descrever a curva de oxigenação da Hb, considerando a ligação sequencial de O₂ à Hb, com uma constante de equilíbrio para cada passo,



Se a expressão da Hb pode ser descrita em termos de constante de equilíbrio,

$$[\text{HbX}] = K[\text{Hb}][\text{X}] \quad (45)$$

onde X é a concentração de O₂.

A curva de oxigenação pode ser descrita em termos da saturação fracional de O₂,

$$\bar{Y} = \frac{\textit{sítios ligados}}{\textit{número total de sítios de ligação}} \quad (46)$$

Portanto podemos escrever a equação da saturação da hemoglobina por oxigênio como,

$$\bar{Y} = \frac{[HbO_2] + 2[Hb(O_2)_2] + 3[Hb(O_2)_3] + 4[Hb(O_2)_4]}{4([Hb] + [HbO_2] + [Hb(O_2)_2] + [Hb(O_2)_3] + [Hb(O_2)_4])} \quad (47)$$

Se expressada em termos das constantes de dissociação,

$$\bar{Y} = \frac{K_1X + 2K_2X^2 + 3K_3X^3 + 4K_4X^4}{4(1 + K_1X + K_2X^2 + K_3X^3 + K_4X^4)} \quad (48)$$

onde K_1 , K_2 , K_3 e K_4 são as constantes multiplicadas para cada passo da ligação de O_2 . A solução destas equações para descrever a saturação fracional da Hb por O_2 é a *Equação de Adair*. O ajuste dos parâmetros desta equação às curvas de oxigenação obtidas experimentalmente em condições fisiológicas, mostra que a quarta constante, é cerca de 300 vezes maior que a primeira, fato que ilustra a cooperatividade.

A partir do conjunto de espectros obtidos durante a oxigenação da Hb pelo método tonométrico-espectrofotométrico (páginas 30 e 31), a pO_2 foi calculada. Utilizando estes dados no aplicativo MATLAB, as componentes principais foram obtidas, seguindo a rotina descrita na figura 35. As componentes principais representam as informações embutidas na variação espectral obtida durante a oxigenação da Hb.

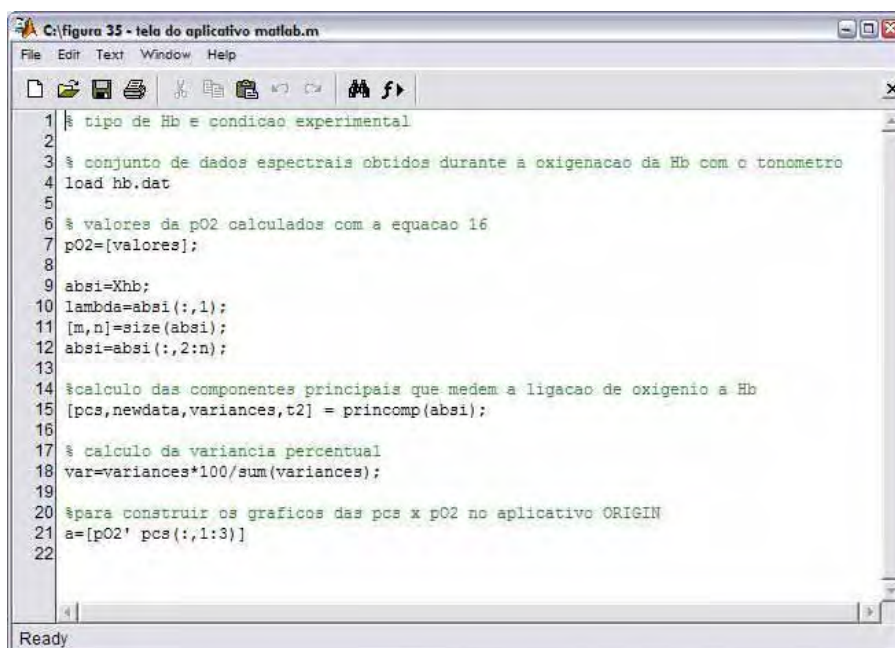


Figura 35. Tela do aplicativo MATLAB com a rotina utilizada para o cálculo das componentes principais.

A *Equação de Adair* foi implementada no aplicativo ORIGIN para ajustar o gráfico de $pc2_{\text{corrigida}}^*$ versus pO_2 e obter K_1 , K_2 , K_3 e K_4 . De acordo com a equação 27 (página 36), P_{50} foi calculada a partir da relação,

$$P_{50} = (K_4)^{\frac{1}{4}} \quad (49)$$

e assim, possibilitou uma comparação com a P_{50} obtida pelo *Gráfico de Hill*.

A variação de hidratação associada à ligação do primeiro oxigênio foi obtida pela equação,

* O ajuste *Logístico de Hill* aos dados do gráfico de $pc2$ versus pO_2 permite corrigir a $pc2$ e ajustar seus valores entre 0 e 100% de O_2 .

$$\frac{d \ln K_1}{d \ln a_w} = \Delta n_w \quad (50)$$

A tabela VI mostra uma comparação entre os valores obtidos de P₅₀ pelo *Gráfico de Hill* e com a *Equação de Adair*, e a tabela VII, os valores de Δn_w em K₁, com P₅₀ calculada a partir de K₄ e com P₅₀ obtida diretamente do *Gráfico de Hill*, para a HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq na ausência e na presença de 100mM NaCl, tanto em pH 7,2 como em pH 9,0.

Tabela VI - Comparação entre os valores de P₅₀ obtidos pelo *Gráfico de Hill* e com a *Equação de Adair*, além dos valores de K₁ obtido da *Equação de Adair*, na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb.

Espécie	P ₅₀ (mmHg) 0mM NaCl	P ₅₀ (mmHg) 100mM NaCl	P _{50-K4} (mmHg) 0mM NaCl	P _{50-K4} (mmHg) 100mM NaCl	K ₁ 0mM NaCl	K ₁ 100mM NaCl
HbBov _{ad} pH 7,2	5,45±0,24	15,59±0,58	4,85±0,98	17,53±4,15	2,03±1,92	0,57±0,41
HbBov _{ad} pH 9,0	2,13±0,12	5,48±0,03	2,39±0,53	4,99±0,89	0,89±0,78	1,02±0,93
HbBov _{fet} pH 7,2	4,68±0,19	13,71±0,69	3,76±1,28	18,80±4,35	0,04±0,08	0,03±0,03
HbBov _{fet} pH 9,0	1,72±0,09	3,68±0,09	1,74±0,17	4,64±1,58	0,27±0,15	1,45±1,58
HbEq pH 7,2	1,84±0,26	8,09±0,69	1,77±0,18	6,69±1,67	0,09±0,06	0,07±0,06
HbEq pH 9,0	0,63±0,12	0,69±0,02	0,67±0,16	1,03±0,39	1,43±1,57	0,67±0,42

Observa-se na tabela VI que os valores de P₅₀ obtidos pelo *Gráfico de Hill* apresentam uma precisão maior quando comparados aos valores de P₅₀ obtidos a partir dos valores de K₄ (*Equação de Adair*).

Tabela VII - Comparação entre os valores de Δn_w com P_{50} obtida do *Gráfico de Hill*, em K_1 e com P_{50} calculada a partir de K_4 , na ausência e na presença de 100mM NaCl para várias espécies de Hb.

Espécie	Δn_w (H ₂ O/Hb) 0mM NaCl	Δn_w (H ₂ O/Hb) 100mM NaCl	Δn_{w-K1} (H ₂ O/Hb) 0mM NaCl	Δn_{w-K1} (H ₂ O/Hb) 100mM NaCl	Δn_{w-K4} (H ₂ O/Hb) 0mM NaCl	Δn_{w-K4} (H ₂ O/Hb) 100mM NaCl
HbBov _{ad} pH 7,2	0	51±2	0	0	0	55±9
HbBov _{ad} pH 9,0	0	53±3	0	0	0	49±17
HbBov _{fet} pH 7,2	0	58±3	0	0	0	60±18
HbBov _{fet} pH 9,0	0	55±6	0	0	0	58±22
HbEq pH 7,2	0	47±5	0	0	0	75±25
HbEq pH 9,0	0	50±4	0	0	0	59±15

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando uma cela espectropolarimétrica (CAÔN FILHO, 1997), para a HbBov_{ad} mostraram que na ausência de NaCl, Δn_{w-K1} é aproximadamente zero dentro do erro experimental e que, na presença de 100mM NaCl, Δn_{w-K1} é 7±2 (TOSQUI, 2004). Assim, os resultados apresentados na tabela VII mostram que através do método tonométrico-espectrofotométrico não é possível obter K_1 com a mesma precisão da cela espectropolarimétrica, pois este método fornece poucos dados na região de baixa saturação da Hb (10% O₂). Além disso, observamos que o Δn_w obtido a partir dos valores de P_{50} do ajuste linear do *Gráfico de Hill* apresenta uma precisão maior do que o Δn_w obtido a partir dos valores de K_4 (*Equação de Adair*). Isto ocorre porque no ajuste com a *Equação de Adair* são determinadas quatro variáveis (K_1 , K_2 , K_3 e K_4), o que proporciona uma propagação de erro maior, quando comparado aos dados obtidos pelo *Gráfico de Hill*, onde são obtidas apenas duas variáveis (n_{50} e P_{50}).

Anexo E

Comparação entre os parâmetros termodinâmicos determinados com a Equação de van't Hoff e a Equação de van't Hoff Integrada

Como evidenciado em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa (CAÔN FILHO, 2003), o ΔH de oxigenação independe da temperatura para a espécie HbA₀. No entanto, comportamento contrário é observado nas espécies HbBov_{ad} e HbEq na ausência e na presença de 100mM NaCl pH 9,0, indicando que a variação de capacidade térmica (ΔC_p) associada à reação de oxigenação é influenciada pela temperatura (tabelas II e VIII).

Utilizando as equações 33 e 34, obtivemos os valores de ΔH de oxigenação a partir da *Equação de van't Hoff* ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$) e da *Equação de van't Hoff Integrada* ($\Delta H_{\text{integrada}}$), respectivamente para as espécies HbBov_{ad}, HbBov_{fet} e HbEq. A tabela VIII mostra os valores de ΔH obtidos para as espécies de Hb analisadas nas variadas condições experimentais, além dos valores de ΔG_0 , ΔS e ΔC_p .

Tabela VIII - Comparação entre o ΔH de oxigenação obtido pela inclinação do gráfico de $\ln(P_{50}) \times 1/T$ ($\Delta H_{\text{van't Hoff}}$) e o calculado pela *Equação de van't Hoff Integrada* ($\Delta H_{\text{integrada}}$), além dos valores de ΔG_0 , ΔC_p e ΔS . Os valores de ΔG_0 foram obtidos na temperatura de referência T_0 (298K) e os valores de $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ e $\Delta H_{\text{integrada}}$ foram corrigidos pela contribuição do calor do oxigênio em solução (-3Kcal/mol).

Espécie e Condição Experimental	$\Delta G_0^{\text{van't Hoff}}$ Kcal/ mol.heme	$\Delta G_0^{\text{integrada}}$ Kcal/ mol.heme	$\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ Kcal/ mol.heme	$\Delta H_{\text{integrada}}$ Kcal/ mol.heme	ΔC_p Kcal/ mol.K	$\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ cal/mol.K	$\Delta S_{\text{integrada}}$ cal/mol.K
HbBov _{ad} 10mM Hepes pH 7,2	1,05±0,01	1,03±0,01	-6,23±0,34	-6,60±0,37	-0,128±0,079	-17,38±0,91	-18,67±0,94
HbBov _{ad} 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,62±0,01	1,63±0,01	-3,83±0,27	-3,68±0,37	0,052±0,080	-7,41±0,63	-6,89±0,73
HbBov _{ad} 10mM Ches pH 9,0	0,60±0,01	0,60±0,01	-10,64±0,66	-12,59±0,97	-0,371±0,081	-33,68±1,65	-40,29±1,98
HbBov _{ad} 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	1,04±0,01	1,06±0,01	-3,82±0,78	-6,24±0,01	-0,459±0,02	-9,27±1,34	-17,43±0,58
HbBov _{fet} 10mM Hepes pH 7,2	0,90±0,01	0,90±0,01	-11,67±0,17	-11,67±0,25	-0,003±0,054	-36,11±0,82	-36,14±0,90
HbBov _{fet} 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,47±0,01	1,46±0,01	-7,71±0,55	-8,10±0,73	-0,135±0,157	-20,94±0,96	-22,29±1,14
HbBov _{fet} 10mM Ches pH 9,0	0,48±0,01	0,49±0,01	-4,74±0,35	-5,03±0,85	-0,056±0,141	-14,27±1,58	-15,26±2,08
HbBov _{fet} 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	0,78±0,01	0,79±0,01	-6,39±0,32	-6,99±0,62	-0,114±0,104	-18,82±1,08	-20,86±1,39
HbEq 10mM Hepes pH 7,2	0,50±0,01	0,47±0,02	-12,30±1,08	-13,26±1,31	-0,333±0,281	-39,58±2,25	-42,92±2,58
HbEq 10mM Hepes 100mM NaCl pH 7,2	1,21±0,01	1,23±0,02	-8,29±0,32	-7,97±0,37	-0,108±0,079	-23,73±0,81	-22,65±0,85
HbEq 10mM Ches pH 9,0	-0,39±0,01	-0,41±0,01	-17,71±1,10	-20,63±2,73	-0,557±0,228	-60,74±2,61	-70,63±1,30
HbEq 10mM Ches pH 9,0	-0,39±0,01	-0,41±0,01	-17,71±1,10	-20,63±2,73	-0,557±0,228	-60,74±2,61	-70,63±1,30
HbEq 10mM Ches 100mM NaCl pH 9,0	0,42±0,02	0,39±0,01	-5,32±0,91	-8,12±0,21	-0,531±0,035	-16,47±2,34	-25,91±1,71

Observando a tabela VIII nota-se que, dentro do erro experimental, os valores de ΔH para as espécies HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2 e HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl são os mesmos, e os valores de ΔC_p são muito pequenos ou menores que o próprio erro experimental. Comportamento contrário é observado para as espécies HbBov_{ad} Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0, ambos na ausência e na presença de 100mM NaCl, cujos valores de ΔH são alterados devido à influência de ΔC_p .

A figura 36 (mesmo gráfico da figura 16) mostra os gráficos de: $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ e $\Delta H_{\text{integrada}}$ para as espécies em suas respectivas condições experimentais: HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl, ambos em função de Δn_w .

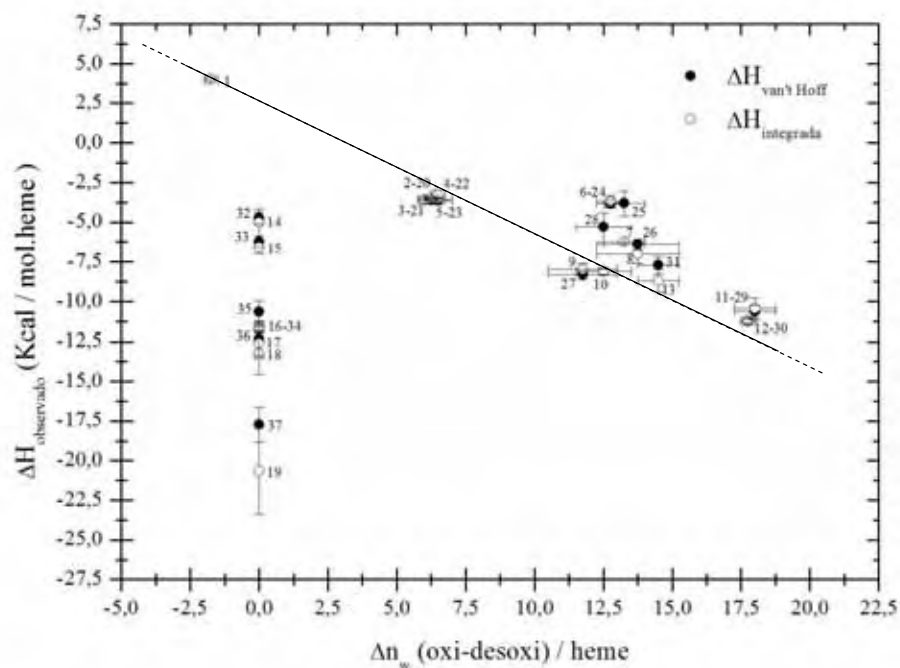


Figura 36. Gráfico de $\Delta H_{\text{integrada}}$ (1, 2-13) e $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ (1, 20-31) de oxigenação, ambos em função de Δn_w , para as espécies em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2)(20) HbA_{0-K1} Ches 9,0; (3)(21) HbA₀ Hepes 7,3; (4)(22) HbA₀ Ches 9,0; (5)(23) HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (6)(24) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7)(25) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8)(26) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9)(27) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10)(28) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11)(29) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (12)(30) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (13)(31) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (14)(32) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15)(33) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16)(34) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17)(35) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18)(36) HbEq Hepes 7,2 e (19)(37) HbEq Ches 9,0. A inclinação destes gráficos, para as espécies que estão com os seus valores de $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ (linha tracejada) e $\Delta H_{\text{integrada}}$ (linha contínua), correlacionados linearmente, fornece um $\delta H_{\text{solvatação}} = -0,57 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$, utilizando tanto a equação 33 como a 34 para a obtenção dos valores de ΔH .

Os valores de Δn_w e de ΔH de oxigenação, correlacionados linearmente na figura 36 das espécies de Hb, levam a um $\delta H_{\text{solvatação}} = -0,57 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$ quando os valores de ΔH são obtidos tanto com a *Equação de van't Hoff* (equação 33) como com a *Equação de van't Hoff Integrada* (equação 34).

A figura 37 (mesmo gráfico da figura 16) mostra o gráfico de $T\Delta S_{\text{observado}}$ na temperatura de referência de 298K, em função de Δn_w , com $\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ e $\Delta S_{\text{integrada}}$ para as espécies em suas respectivas condições experimentais: HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; HbA₀ Hepes 7,3; HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; HbA₀ Ches 9,0; HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; HbA_{0-K1} Hepes 7,3; HbA_{0-K1} Ches 9,0; HbBov_{ad} Hepes 7,2; HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{ad} Ches 9,0; HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; HbBov_{fet} Hepes 7,2; HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; HbBov_{fet} Ches 9,0; HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; HbEq Hepes 7,2; HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; HbEq Ches 9,0 e HbEq Ches 9,0 100mM NaCl.

Os valores de Δn_w e de $T\Delta S_{\text{calculado}}$ de oxigenação, correlacionados linearmente na figura 37 das variadas espécies de Hb, levam a um $T\delta S_{\text{solvatação}} = -0,86 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$ em 298K quando $\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ (equação 29) é calculado a partir de $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ (equação 33) e $T\delta S_{\text{solvatação}} = -0,87 \pm 0,01 \text{Kcal/mol.H}_2\text{O}$ em 298K quando $\Delta S_{\text{integrada}}$ (equação 29) é calculado a partir de $\Delta H_{\text{integrada}}$ (equação 34).

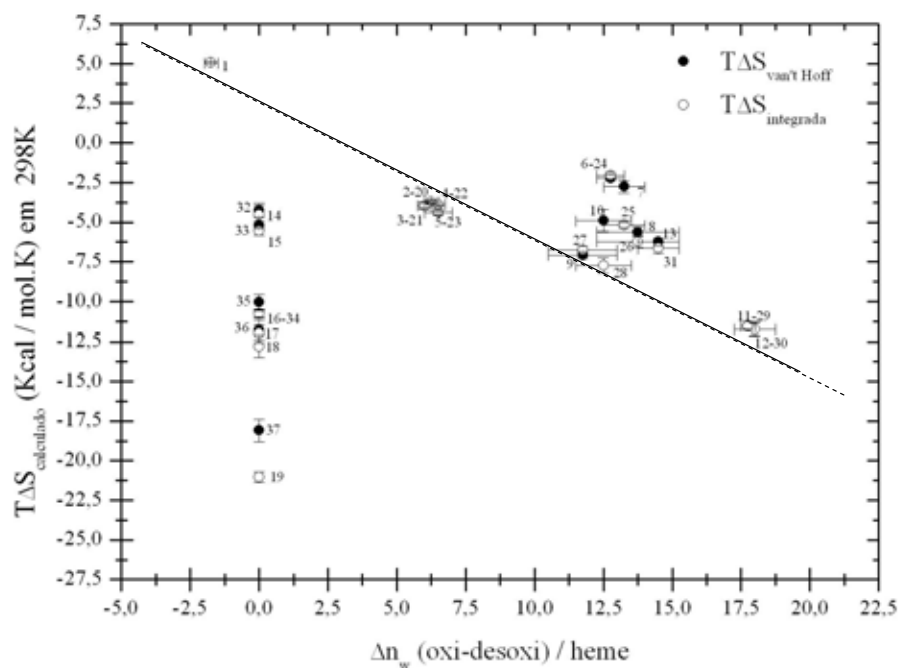


Figura 37. Gráfico de $\Delta S_{\text{integrada}}$ (1, 2-13) e $\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ (1, 20-31), ambos em função de Δn_w , para as espécies em suas respectivas condições experimentais: (1) HbI Hepes 7,2 100mM NaCl; (2)(20) HbA_{0-K1} Ches 9,0; (3)(21) HbA₀ Hepes 7,3; (4)(22) HbA₀ Ches 9,0; (5)(23) HbA_{0-K1} Hepes 7,3; (6)(24) HbBov_{ad} Hepes 7,2 100mM NaCl; (7)(25) HbBov_{ad} Ches 9,0 100mM NaCl; (8)(26) HbBov_{fet} Ches 9,0 100mM NaCl; (9)(27) HbEq Hepes 7,2 100mM NaCl; (10)(28) HbEq Ches 9,0 100mM NaCl; (11)(29) HbA₀ Hepes 7,3 100mM NaCl; (12)(30) HbA₀ Ches 9,0 100mM NaCl; (13)(31) HbBov_{fet} Hepes 7,2 100mM NaCl; (14)(32) HbBov_{fet} Ches 9,0; (15)(33) HbBov_{ad} Hepes 7,2; (16)(34) HbBov_{ad} Ches 9,0; (17)(35) HbBov_{fet} Hepes 7,2; (18)(36) HbEq Hepes 7,2 e (19)(37) HbEq Ches 9,0. A inclinação destes gráficos, para as espécies que estão com os seus valores de $\Delta S_{\text{van't Hoff}}$ (linha tracejada) e $\Delta S_{\text{integrada}}$ (linha contínua), correlacionados linearmente, fornece um $T\delta S_{\text{solvatação}}$ de $-0,87 \pm 0,01$ e $-0,86 \pm 0,01$ Kcal/mol.H₂O em 298K, respectivamente.

Anexo F

Tabelas com valores de entalpia e entropia de solvatação obtidos da literatura

As tabelas a seguir mostram os valores da entalpia e entropia de solvatação dos aminoácidos das cadeias laterais, de vários grupos químicos, hidrocarbonetos e de álcool, que foram utilizados na comparação com o fenômeno de compensação das espécies de Hb estudadas neste trabalho (figuras 21 e 22).

Tabela IX - ΔH , ΔG e ΔS de hidratação de diferentes grupos, estimados a partir da área de superfície acessível ao solvente (MAKHATADZE e PRIVALOV, 1993). As variações de energia livre de hidratação foram calculadas a partir de dados experimentais de transferência de grupos determinados por Cabani e colaboradores (CABANI et al., 1981) e citadas por Makhatadze e Privalov, 1993. Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão, $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. Os grupos marcados (*) referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Grupo	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
-CH ₂ - ^(*)	0,17	-0,81	-3,30
-CH ₃ ^(*)	0,89	-1,98	-9,63
-OH	-6,13	-9,47	-11,22
-NH ₂	-5,65	-9,24	-12,02
>C=O	-5,53	-5,99	-1,54
-COOH	-7,59	-10,51	-9,82
-NH-	-6,15	-9,27	-10,43
-CH< ^(*)	-0,39	-0,68	-3,57
>C<	-1,16	-2,02	-10,68
-S-	-3,45	-4,68	-4,13
-CH= ^(*)	-0,14	-0,63	-2,59
-C=	-1,09	-4,86	-12,63

Tabela X - Parâmetros de solvatação de resíduos de aminoácidos apresentados por Oobatake e colaboradores (OOBATAKE et al, 1988). Estes parâmetros foram calculados a partir da ASA de 7 grupos atômicos. Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. Os grupos marcados (*) referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Resíduo	ΔG(Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Ala(*)	0,38	-1,16	-5,17
Asn	-3,11	-5,13	-6,78
Arg	-5,39	-9,72	-14,53
Asp	-2,42	-3,88	-4,90
Cys	-1,07	-2,68	-5,40
Gln	-3,34	-5,52	-7,31
Glu	-3,13	-4,94	-6,07
Gly(*)	0,00	0,00	0,00
His	-2,80	-6,10	-11,07
Ile(*)	0,99	-3,04	-13,52
Leu(*)	0,88	-2,72	-12,08
Lys	-1,63	-4,35	-9,13
Met(*)	0,02	-3,36	-11,34
Phe	-0,58	-4,42	-12,88
Pro(*)	0,05	-1,55	-5,37
Ser	-3,06	-5,07	-6,74
Thr	-1,39	-3,69	-7,72
Trp	-3,22	-8,21	-16,74
Tyr	-5,19	-10,01	-9,73
Val(*)	0,78	-2,39	-10,64

Tabela XI - Energética de dissolução de alcanos (substâncias não-polares) da fase gasosa para a água em 298K. Os dados experimentais de ΔH foram obtidos calorimetricamente por Dec e Gill (1985) enquanto que ΔG foram tabelados por Cabani e colaboradores (CABANI et al., 1981), usando o estado padrão molar da fase gás e solução, conforme citação de Murphy (MURPHY, 1994). Os valores de ΔS foram calculados por obedecendo a expressão $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. Todos os grupos referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Alcano	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Metano	2,00	-3,15	-17,3
Etano	1,83	-4,67	-21,8
Propano	1,96	-5,56	-25,2
Butano	2,08	-6,20	-27,8

Tabela XII - Parâmetros termodinâmicos de transferência de substâncias não-polares (hidrocarbonos) líquidas para a água em 298K. Os valores experimentais de ΔH foram obtidos por Gill e colaboradores (GILL et al., 1976), enquanto que ΔH e ΔG foram calculados por Baldwin (1986). Todos os grupos referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Hidrocarboneto	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Benzeno	0,541	0,50	-0,14
Tolueno	0,461	0,41	-0,17
Etilbenzeno	0,537	0,48	-0,19
Ciclohexano	0,048	-0,02	-0,23
Pentano	-0,409	-0,48	-0,24
Hexano	0,077	0	-0,26

Tabela XIII - ΔG e ΔH de hidratação obtidos a partir da transferência da fase gasosa para a água e de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína (PRIVALOV e MAKHATADZE, 1993). Os valores da variação de entalpia foram calculados com base em valores de área acessível ao solvente (ASA) publicados por Miller e colaboradores (MILLER et al., 1987). Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. Os grupos marcados (*) referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Resíduo	ΔG(Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Ala(*)	0,89	-1,98	-9,62
Arg	-10,99	-16,01	-16,85
Asn	-7,39	-11,30	-13,12
Asp	-2,06	-5,48	-11,46
Cys	-10,81	-16,82	-20,17
Gln	-7,21	-12,11	-16,44
Glu	-11,36	-16,63	-17,67
His(*)	1,57	-4,09	-18,98
Ile(*)	1,57	-4,09	-18,98
Leu	-5,11	-11,65	-21,95
Lys	-2,19	-8,27	-20,38
Met	-1,63	-6,05	-14,81
Phe(*)	0,54	-2,43	-9,95
Pro	-5,94	-10,27	-14,52
Ser	-5,62	-10,76	-17,26
Thr	-9,97	-14,04	-13,67
Trp	-8,70	-13,70	-16,78
Tyr(*)	1,39	-3,27	-15,67
Val	-11,67	-14,22	-8,58

Tabela XIV - Parâmetros termodinâmicos de hidratação determinados tendo como base interações interatômicas que ocorrem com o desnovelamento protéico. Estes parâmetros foram calculados a partir da ASA de todos os grupos atômicos das 8 proteínas citadas abaixo por Ooi e colaboradores (OOI et al, 1988). Todos os grupos referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Proteína	ΔG(Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
4PTI	-1,00	-2,27	-4,29
1CPV	-2,11	-4,79	-9,00
5RSA	-2,94	-6,16	-10,81
2LYZ	-2,84	-6,36	-11,80
2MBN	-2,99	-7,38	-14,86
2LZM	-3,62	-8,43	-16,14
8PAP	-4,56	-10,80	-20,95
2CAB	-5,96	-13,71	-26,03

Tabela XV - ΔG e ΔH de hidratação de resíduos de aminoácidos da cadeia lateral da proteína obtidos por Ooi e colaboradores (Oii et al., 1987). Os valores de ΔS foram calculados, pelos autores deste trabalho, obedecendo a expressão: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/298$. Os grupos marcados (*) referem-se àqueles que estão alinhados com o fenômeno de compensação da oxigenação das espécies de Hb.

Resíduo	ΔG(Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol.K)
Ala ^(*)	0,60	-0,37	-3,26
Asn	-6,63	-9,12	-8,36
Asp	-6,76	-9,04	-7,65
Gln	-6,69	-9,87	-10,67
Glu	-6,93	-10,03	-10,40
Gly ^(*)	0	0	0
His	-5,56	-9,91	-14,60
Ile ^(*)	1,52	-2,06	-12,01
Leu ^(*)	1,41	-2,16	-11,98
Lys	-4,92	-10,52	-18,79
Phe	-0,88	-4,35	-11,64
Pro ^(*)	0,52	-0,63	-3,86
Ser	-5,15	-7,54	-8,02
Thr	-3,41	-6,20	-9,36
Trp	-4,20	-9,47	-17,68
Tyr	-7,95	-13,37	-18,19
Val ^(*)	1,16	-1,65	-9,43