

PRISCILLA TOSQUI

O papel do cloreto na estabilização de um  
novo estado alostérico das hemoglobinas  
S e des-Arg humanas e hemoglobina  
bovina



1910001372



PRISCILLA TOSQUI

**O papel do cloreto na estabilização de um  
novo estado alostérico das hemoglobinas  
S e des-Arg humanas e hemoglobina  
bovina**

orientador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2004.

**PRISCILLA TOSQUI**

**O papel do cloreto na estabilização de um  
novo estado alostérico das hemoglobinas  
S e des-Arg humanas e hemoglobina  
bovina**



**Dissertação apresentada ao Depto de  
Física 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**

**2004.**

577.3

T715p

04/04/2005

Doação

R\$ 24,00

AUTOR(A)

076/2005

98/05

20901003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
BILCE - Câmpus São José do Rio Preto

PRISCILLA TOSQUI

Tosqui, Priscilla .

O papel do cloreto na estabilização de um novo estado alostérico das hemoglobinas S e desArg humanas e hemoglobina bovina / Priscilla

Tosqui – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio Francisco Colombo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Hemoglobina . 3. Proteína - Estrutura. 4. Efeito de ânions . 5. Efeito de água. I. Colombo, Marcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

*Aos meus pais José Carlos e Maria Inês*

*Que sempre acreditaram em mim, me dando total liberdade para  
fazer minhas próprias escolhas e que nunca pouparam esforços para minha formação e  
realização;*

*E à minha irmã Patrícia*

*Meu modelo a ser sempre seguido*

*Dedico esta dissertação*

*Os meus mais sinceros agradecimentos...*

*Ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo, pelo exemplo de postura científica, amizade, orientação, dedicação, e confiança em meu trabalho, presentes em todos os momentos;*

*Aos professores Dr. Gustavo Bonilla-Rodriguez e Dra. Cláudia Domingos, pela colaboração prestativa e preciosas sugestões dadas a esta dissertação;*

*Ao corpo docente do Departamento de Física, que contribuiu para minha formação acadêmica, cujo apoio foi fundamental para a realização deste trabalho;*

*A professora Dra Cláudia Domingos e toda a equipe do laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do IBILCE-UNESP, pela doação da amostra de sangue de pacientes heterozigotos HbA/HbS e toda a ajuda e atenção na realização de experimentos com Hb desArg;*

*Ao prof Dr Marcelo Mattos Santoro, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela realização do experimento de espectrometria de massa e toda a atenção com nosso trabalho;*

*Aos meus colegas de laboratório: Sandra, Renato, Alexandre (Mac), Osmar, Ocimar, Bernadete, André, Cristina e Andrés pela amizade e companheirismo durante todos estes anos, fazendo de nosso laboratório um ambiente de união e pela preciosa discussão de resultados;*

*Ao querido amigo e companheiro de laboratório Flavio Seixas, por todo o incentivo, ajuda científica, lealdade e tantas outras razões que me fazem acreditar em amizades verdadeiras;*

*Ao querido amigo Renato Gaspar, pela amizade sincera e apoio sempre incondicionais, fundamentais para a conclusão deste trabalho, que jamais serão esquecidos;*

*Aos amigos Valmir, Márcia, Sabrina e Sidney sempre dispostos a ajudar, pelas "discussões políticas", além da amizade, sinceridade e alegria;*

*Aos colegas de pós-graduação, pela confiança atribuída a mim no exercício da representação discente junto ao conselho da pós;*

*Aos técnicos Paulinho e Barbosa, pela atenção e pelo pronto empenho que tanto contribuíram para a realização deste trabalho;*

*A secretária do Departamento Ilva e aos funcionários da seção de pós-graduação, pelo auxílio dado a todo instante;*

*A todos os meus amigos que sempre estiveram a meu lado, me incentivando e compreendendo. Obrigada pelo carinho;*

*A toda a minha família, em especial minha querida avó Florença, que me acompanha em todos os momentos com seu apoio e suas orações;*

*Aos meus queridos pais José Carlos e Maria Inês e minha querida irmã Patrícia,  
por total e incondicional apoio e compreensão, amor e carinho que me acompanham por  
toda a minha vida;*

*A FAPESP pelo apoio financeiro;*

*A Deus pela vida.*

*"Todas as ciências são unificadas em uma só grande ciência: A ciência da vida"*

*Auden, WH*

## RESUMO

A influência de ânions sobre as características estruturais e funcionais de hemoglobinas vem sendo alvo de pesquisas de nosso laboratório nos últimos anos. Estudos anteriores onde investigamos as mudanças conformacionais induzidas na hemoglobina (Hb), devido à interação com ânions, mostraram que a ligação preferencial de ânions como o  $\text{Cl}^-$  e fosfatos orgânicos (2,3-DPG, IHP) entre outros à desoxi Hb humana, modula o equilíbrio entre os dois estados alostéricos da desoxi Hb humana, estados  $T_o$  e  $T_x$ , livre e complexado com ânions, respectivamente. Medidas funcionais utilizando o método de estresse osmótico em solução mostraram que o estado  $T_o$  é um estado mais hidratado que o estado  $T_x$ , e menos hidratado que o oxi R, e que a afinidade intrínseca de oxigênio ao estado  $T_o$  é maior que ao estado  $T_x$ , e menor que o estado oxi R. Estes resultados sugerem que a cooperatividade da ligação do oxigênio à Hb, e a regulação da função da Hb por ligantes heterotrópicos envolva três estados alostéricos.

Neste trabalho buscamos evidências de que esta característica alostérica, originalmente observada com a hemoglobina humana, será comum às demais hemoglobinas tetraméricas. Assim esperamos caracterizar a presença deste novo estado alostérico  $T_o$  em Hbs de outras espécies e investigar o papel de ânions e das cargas na cavidade central da Hb para a estabilização/desestabilização dos estados  $T_o/T_x$  da proteína.



Particularmente, investigamos a influência do  $\text{Cl}^-$  como efetor alostérico das Hbs, e ainda a existência de sítios específicos de ligação para este ânion, hipoteticamente as argininas 141 $\alpha$ 1, 141 $\alpha$ 2, 92 $\alpha$ 1 e 92 $\alpha$ 2.

Nossos resultados mostram que as espécies HbS, humana, e Hb bovina também apresentam o equilíbrio entre os dois estados alostéricos T (To e Tx) sugeridos para a Hb humana. Os experimentos realizados com a Hb desArg forneceram parâmetros da ligação de cloreto: constante de ligação e estequiometria, e estes valores são semelhantes aos medidos para a Hb nativa. Assim as Arg141 não seriam os sítios alostéricos de ligação responsáveis pela transição To – Tx induzida pela ligação de cloreto, sugerindo que as Arg 92 seriam as responsáveis por esta função.



## ABSTRACT

The influence of anions on the structural and functional characteristics of hemoglobins has been target of many studies in our laboratory in the past few years. Previous studies, in which we investigated the conformational changes induced in the hemoglobin (Hb) by anions interaction, have shown that the preferential bind of anions such as  $\text{Cl}^-$  and organic phosphates (2,3-DPG, IHP) to the human deoxy Hb modulates the equilibrium between the two allosteric states of the human deoxy Hb (states To and Tx, free and complexed with anions, respectively).

Functional measures using the osmotic stress method in solution showed that the To state is more hydrated than the Tx, and less hydrated than the oxy R, and that the intrinsic affinity of the oxygen to the To state is bigger than to the Tx state, and smaller than the oxy R state. These results suggest that the cooperativity of the binding of the oxygen to the Hb, and the regulation of the Hb function by heterotropic ligands involve three allosteric states.

In this work we have searched for evidences that this allosteric characteristic, originally observed in human hemoglobin, could be a common behavior to other tetrameric hemoglobins.

This way, we hope to characterize the presence of this new allosteric state (To) in Hbs of other kinds and to investigate the role of anions and of



the charges in the central cavity in the stabilization/desestabilization of the To/Tx states of the protein.

Particularly we have studied the influence of the chloride as an allosteric effector of Hbs and the presence of the potential chloride specific binding sites hypothetically 141 $\alpha$ 1, 141 $\alpha$ 2, 92 $\alpha$ 1 e 92 $\alpha$ 2.

Our studies have shown that the HbS, human, and bovine Hb kinds also present this equilibrium between the two T allosteric states suggested for human hemoglobin. The chloride binding parameters :binding constant and the stoichiometry measured for desArg are same for native. This indicates that Arg141 are not the allosteric binding site responsible for the To to Tx induced by chloride binding, suggesting that the Arg 92 could be responsible for this function.

## ABREVIATURAS E SIMBOLOS

|                                       |                                                                         |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>2,3 DPG</b>                        | 2,3-Bifosfoglicerato.                                                   |
| $\bar{Y}$                             | Saturação fracional da hemoglobina com oxigênio.                        |
| $\lambda$                             | Comprimento de onda.                                                    |
| $\delta$                              | Número de moléculas de água ligadas à Hb durante a transição To/R       |
| $\mu\text{M}$                         | Micromolar.                                                             |
| $\Delta n_w$                          | Número total de moléculas de água ligadas à Hb durante a transição      |
| $a_L$                                 | Atividade do ligante L.                                                 |
| $a_w$                                 | Atividade de água.                                                      |
| <b>ATP</b>                            | Adenosine triphosphate                                                  |
| <b>Bis-Tris</b>                       | (2 -Hidroxietil) imino-(hidroximetil)metano.                            |
| <b>Da</b>                             | dalton                                                                  |
| <b>EDTA</b>                           | Ácido Etileno Diamino Tetracético.                                      |
| <b>FPLC</b>                           | Aparelho utilizado para cromatografia líquida de baixa pressão.         |
| $f_{To}$                              | Fração de hemoglobina no estado To                                      |
| $f_{Tx}$                              | Fração de hemoglobina no estado Tx                                      |
| <b>Hb</b>                             | Hemoglobina.                                                            |
| <b>Hb A<sub>0</sub></b>               | Principal componente da hemoglobina de humano adulto.                   |
| <b>Hb bov</b>                         | Hemoglobina bovina                                                      |
| <b>Hb S</b>                           | Hemoglobina S                                                           |
| <b>HbdesArg</b>                       | Hemoglobina sem o resíduo Arg $\alpha$ 141                              |
| <b>Hepes</b>                          | Ácido (2 Hidroxietil) Piperazina - N - (2 Etano Sulfônico).             |
| <b>HPLC</b>                           | Aparelho utilizado para Cromatografia Líquida de Alta Pressão           |
| <b>IHP</b>                            | inositol hexaphosphate                                                  |
| <b>K</b>                              | Constante de associação de O <sub>2</sub> à hemoglobina.                |
| <b>K<sub>1</sub></b>                  | Constante de associação do primeiro O <sub>2</sub> à hemoglobina.       |
| <b>meta-Hb</b>                        | Meta hemoglobina.                                                       |
| <b>mV</b>                             | Milivolt                                                                |
| <b>MWC</b>                            | Monod, Wyman e Changeux.                                                |
| <b>n</b>                              | Número de sítios de ligação da hemoglobina à oxigênio.                  |
| <b>n<sub>50</sub></b>                 | Inclinação do gráfico de Hill em 50% de saturação pelo O <sub>2</sub> . |
| <b>nm</b>                             | Nanômetro.                                                              |
| <b>n<sub>w</sub><sup>desoxi</sup></b> | Número de moléculas de água ligadas à estrutura da desoxi-Hb.           |



|                    |                                                               |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| $n_w^{\text{oxi}}$ | Número de moléculas de água ligadas à estrutura da oxi-Hb.    |
| O.E.C.             | Curva de equilíbrio de oxigenação                             |
| $O_2$              | Oxigênio                                                      |
| osm.               | Osmolalidade.                                                 |
| $p_{50}$           | Pressão de oxigênio que satura 50% dos grupos heme da Hb      |
| PAGE               | Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida.                       |
| PI                 | Ponto isoelétrico                                             |
| $pO_2$             | Pressão parcial de oxigênio.                                  |
| R                  | Estrutura relaxada da hemoglobina (oxigenada);                |
| T                  | Estrutura tensa da hemoglobina (desoxigenada)                 |
| $T_o$              | Estrutura desoxigenada da hemoglobina isenta de ânions        |
| Tris               | Tris(hidroximetil) aminometano.                               |
| Tx                 | Estrutura tensa da hemoglobina ligada a ânions                |
| V                  | Volt                                                          |
| V/V                | Volume por volume.                                            |
| $V_i$              | Voltagem na <i>inésima</i> etapa da oxigenação/desoxigenação. |
| $V_{\text{max}}$   | Voltagem máxima (solução oxigenada).                          |
| $V_{\text{min}}$   | Voltagem mínima (solução desoxigenada).                       |



# LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

|     |                 |   |
|-----|-----------------|---|
| Ala | Alanina         | A |
| Asp | Aspartato       | D |
| Cys | Cisteína        | C |
| Glu | Ácido glutâmico | E |
| Phe | Fenilalanina    | F |
| Gly | Glicina         | G |
| His | Histidina       | H |
| Ile | Isoleucina      | I |
| Lys | Lisina          | K |
| Leu | Leucina         | L |
| Met | Metionina       | M |
| Asn | Asparagina      | N |
| Pro | Prolina         | P |
| Gln | Glutamina       | Q |
| Arg | Arginina        | R |
| Ser | Serina          | S |
| Thr | Treonina        | T |
| Val | Valina          | V |
| Trp | Triptofano      | W |
| Tyr | Tirosina        | Y |



## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Molécula de Hemoglobina                                                                                         | 18 |
| Figura 2 – Grupo Heme                                                                                                      | 19 |
| Figura 3 – Curva de cooperatividade da Hb                                                                                  | 21 |
| Figura 4 – Reação da Carboxipeptidase B                                                                                    | 46 |
| Figura 5 – Cromatogramas de calibração do HPLC                                                                             | 50 |
| Figura 6 - Espectros de absorção da desoxi-Hb e oxi-Hb                                                                     | 53 |
| Figura 7 – Esquema da cela espectropolarimétrica                                                                           | 58 |
| Figura 8 – Esquema de tonômetro                                                                                            | 59 |
| Figura 9 – Eletroforese de hemoglobinas                                                                                    | 67 |
| Figura 10 – Eletroforese de cadeias globínicas                                                                             | 68 |
| Figura 11 – Cromatogramas das hemoglobinas Ao e desArg                                                                     | 69 |
| Figura 12 – Espectros de massa das Hbs Ao e desArg                                                                         | 70 |
| Figura 13 – Gráfico de saturação de hemoglobina bovina em diferentes concentrações de sacarose                             | 71 |
| Figura 14 – Gráfico de Hill                                                                                                | 73 |
| Figura 15 - Gráfico da dependência de $p_{50}$ da Hb bovina com a atividade de água em diferentes concentrações de cloreto | 74 |
| Figura 16 - Gráfico da dependência de $p_{50}$ da Hb S com a atividade de água em diferentes concentrações de cloreto      | 75 |
| Figura 17 - Gráfico da dependência de $p_{50}$ da Hb desArg com a atividade de água em diferentes concentrações de cloreto | 76 |
| Figura 18 - Gráfico de $\Delta n_w$ versus concentração de NaCl na Hb bovina                                               | 79 |
| Figura 19- Gráfico de $\Delta n_w$ versus concentração de NaCl na Hb S                                                     | 80 |
| Figura 20 - Gráfico de $\Delta n_w$ versus concentração de NaCl na Hb desArg                                               | 80 |
| Figura 21 - Gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ da Hb bov                                                                | 82 |
| Figura 22 - Gráfico de $\Delta n_{w_{K1}}$ versus concentração de NaCl na Hb bovina                                        | 83 |



## SUMÁRIO

|            |                                                                                                                                  |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>I</i>   | <i>Introdução</i>                                                                                                                | <i>18</i> |
|            | <i>1.1) O efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb pelo O<sub>2</sub></i>                                             | <i>30</i> |
|            | <i>1.2) O efeito do íon cloreto</i>                                                                                              | <i>33</i> |
|            | <i>1.3) Hemoglobinas estudadas no trabalho</i>                                                                                   | <i>37</i> |
| <i>II</i>  | <i>Objetivos</i>                                                                                                                 | <i>40</i> |
| <i>III</i> | <i>Materiais e Métodos</i>                                                                                                       | <i>41</i> |
|            | <i>3.1) Purificação do sangue e preparação das amostras</i>                                                                      | <i>41</i> |
|            | <i>3.1.2) Determinação da concentração protéica</i>                                                                              | <i>44</i> |
|            | <i>3.2) Preparação da Hb desArg</i>                                                                                              | <i>46</i> |
|            | <i>3.3) Análise da Hb desArg</i>                                                                                                 | <i>48</i> |
|            | <i>3.3.1) Eletroforese de hemoglobinas:</i>                                                                                      | <i>48</i> |
|            | <i>3.3.2 ) Eletroforese de cadeias</i>                                                                                           | <i>48</i> |
|            | <i>3.3.3) Perfis cromatográficos de hemoglobina por HPLC</i>                                                                     | <i>49</i> |
|            | <i>3.3.4) Espectrometria de Massa</i>                                                                                            | <i>51</i> |
|            | <i>3.4) Medidas de oxigenação</i>                                                                                                | <i>51</i> |
|            | <i>3.5) Obtenção das curvas de oxigenação</i>                                                                                    | <i>52</i> |
|            | <i>3.5.1- método espectropolarimétrico</i>                                                                                       | <i>52</i> |
|            | <i>3.5.2- método Tonométrico-espectrofotométrico</i>                                                                             | <i>58</i> |
|            | <i>3.6) Análise dos Dados</i>                                                                                                    | <i>60</i> |
| <i>IV</i>  | <i>Resultados</i>                                                                                                                | <i>66</i> |
|            | <i>4.1) Análise Bioquímica da Hb desArg</i>                                                                                      | <i>66</i> |
|            | <i>4.2) Estabilização do estado alostérico T de alta afinidade por oxigênio</i>                                                  | <i>71</i> |
|            | <i>4.3) Análise do efeito de ânion na hidratação e afinidade das Hbs bovina, desArg e S em termos do modelo de três estados.</i> | <i>77</i> |



|    |                                                |     |
|----|------------------------------------------------|-----|
| V  | Discussão                                      | 84  |
|    | 5.1) Sobre o sítio de ligação de cloreto à Hb. | 87  |
| VI | Conclusões                                     | 90  |
|    | Referências                                    | 92  |
|    | Apêndice A                                     | 99  |
|    | Apêndice B                                     | 101 |

A Hb é uma proteína globular, formada por quatro cadeias, sendo 2 cadeias  $\alpha$ , com 141 resíduos de aminoácidos cada, e 2 cadeias  $\beta$  com 146 resíduos de aminoácidos cada, como representado na figura 1. Cada cadeia é organizada com igual estrutura terciária, se dando uma forma, denominada A e B (Baldwin, J. M., 1975).



Figura 1: Hemoglobina humana (HbA). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias  $\alpha$  (cores azul e verde) e duas cadeias  $\beta$  (cores laranja e amarelo). Cada cadeia possui 141 e 146 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Figura extraída de Gernat e Gernat, 1976; Wilson, R. H. A. Gernat, C. M., 1973).

## I - INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb), é uma proteína transportadora encontrada principalmente nas hemácias de vertebrados, cuja principal função fisiológica é o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões, ou outros órgãos respiratórios, para os tecidos.

A Hb é uma proteína globular, formada por quatro cadeias, sendo 2 cadeias  $\alpha$ , com 141 resíduos de aminoácidos cada, e 2 cadeias  $\beta$  com 146 resíduos de aminoácidos cada, como representado na figura 1. Cada cadeia organizada com igual estrutura terciária, se divide em 8 hélices, nomeadas de A a H (Baldwin, J. M., 1975).

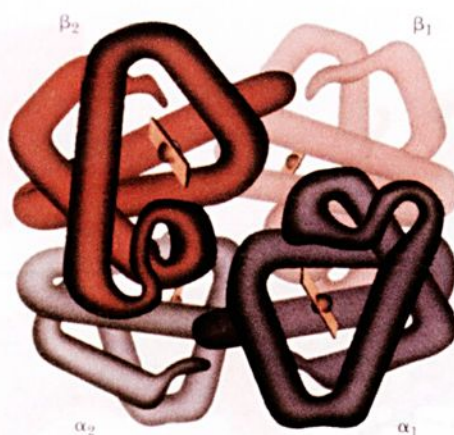


**Figura 1:** Hemoglobina humana (HbA<sub>0</sub>). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias  $\alpha$  (cinza claro e cinza escuro) e duas cadeias  $\beta$  (marrom claro e marrom escuro) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada uma, respectivamente. Figura extraída de Garrett e Grisham, 1995. (Garrett, R. H. & Grisham, C. M., 1995)

Em cada uma dessas cadeias existe um grupo prostético heme, formado por uma protoporfirina IX e um átomo de ferro no centro, onde a molécula de oxigênio liga-se reversivelmente. O grupo heme se encontra firmemente encaixado em uma região hidrofóbica denominada bolsão do heme, entre as hélices E e F. Em seu complexo com a Hb o átomo de ferro está ligado a quatro nitrogênios dos anéis pirrólicos que formam a protoporfirina, e a um átomo de nitrogênio da cadeia lateral da histidina F8, (ou histidina proximal) sendo penta coordenado. A molécula de oxigênio é o sexto ligante do ferro e faz uma ponte de hidrogênio com a histidina E7 (ou histidina distal), que ajuda a estabilizar a ligação mostrada na figura 2 (Van Holde, K. E. , 2000)

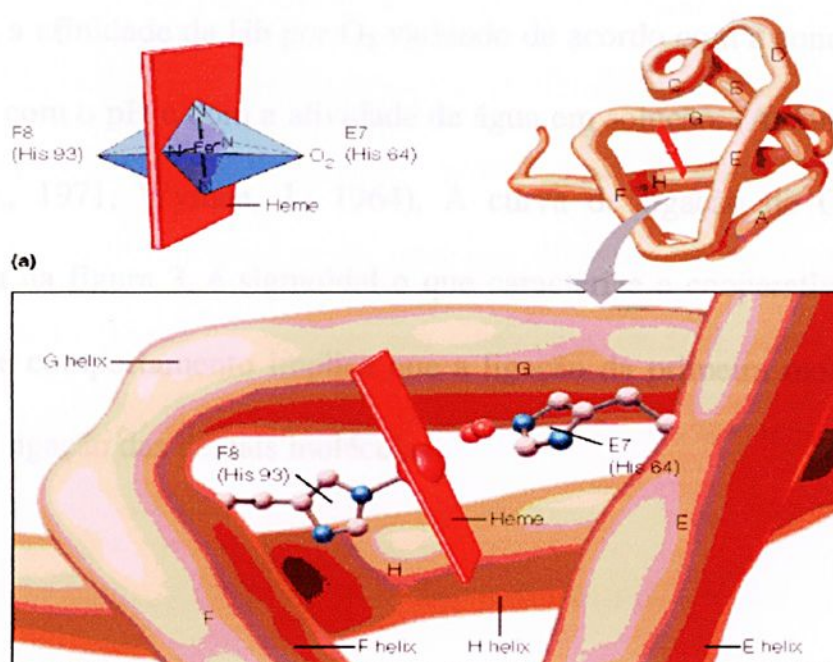


**Figura 2:** A coordenação octaédrica do átomo de ferro, com os quatro nitrogênios da porfirina com o  $Fe^{2+}$  no plano do heme e a His F8 e o  $O_2$  na posição axial. Detalhes do bolsão do heme. (Van Holde, K. & Mathews, C. K., 2000)

A ligação das quatro moléculas de  $O_2$  à Hb é um processo cooperativo, regulado por interações alostéricas, entre os sítios de ligação de  $O_2$  ou entre sítios de ligação de efetores e sítios de  $O_2$ . Estas interações são, portanto de dois tipos: homo ou heterotrópicas. Um efetor é considerado homotrópico quando a ligação de um ligante X interfere na ligação de uma outra molécula de X a um outro sítio protéico. No caso da Hb, a ligação do  $O_2$  a um sítio facilita a ligação a outros sítios de  $O_2$ . Interação heterotrópica ocorre entre ligantes diferentes, quando a ligação de um ligante X altera a afinidade da ligação de um outro ligante Y à mesma proteína. Para a Hb são exemplos de efetores heterotrópicos o cloreto, fosfatos orgânicos, prótons e água, pois influenciam a afinidade da Hb por  $O_2$  variando de acordo com a concentração destes íons, com o pH e com a atividade de água em solução. (Antonini, E. & Brunori, M., 1971, Wyman, J., 1964). A curva de ligação de  $O_2$  à Hb, representada na figura 3, é sigmoideal o que caracteriza a cooperatividade da ligação. Este comportamento implica que a ligação da primeira molécula de  $O_2$  facilita a ligação das demais moléculas.



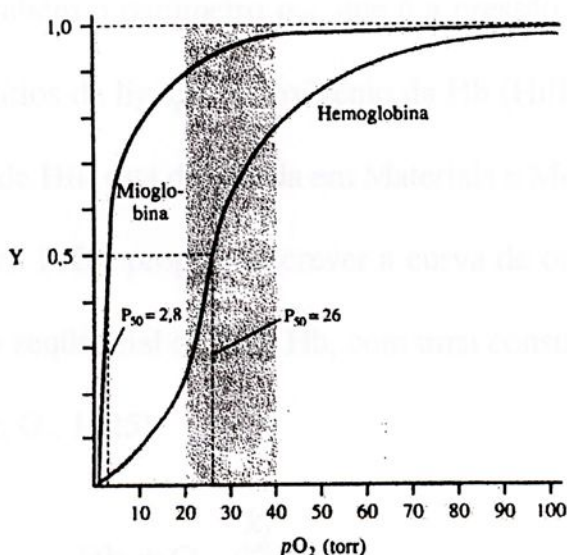


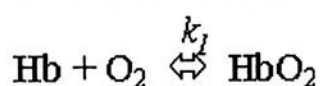
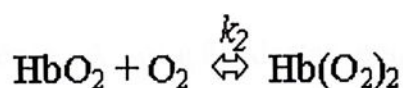
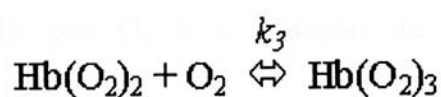
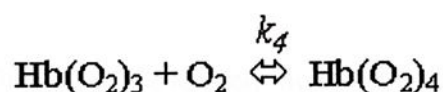
**Figura 3:** Curva de saturação da hemoglobina por pela pressão de oxigênio. A curva apresenta caráter sigmoide, representando a cooperatividade da ligação do  $O_2$  à Hb. O comportamento não cooperativo está representado pela mioglobina. Figura extraída de Berg (Berg, J. M., et al., 2002.)

Archibald Hill em 1913 descreveu o grau de saturação da Hb como uma função da  $pO_2$ . Sendo a saturação fracional da Hb  $\bar{Y}$ , em um gráfico de  $\log [\bar{Y}/(1-\bar{Y})]$  contra  $\log (pO_2)$ , chamado de “gráfico de Hill”, a região central da curva de oxigenação aproxima-se de uma reta. Sua inclinação  $n_{50}$  no ponto médio de ligação ( $\bar{Y} = 0,5$ ) é definido por coeficiente de Hill. Neste ponto, o valor de  $n_{50}$ , reflete o grau de cooperatividade da ligação, que é um número menor que a quantidade total de sítios de ligação  $n$ .

Um valor de  $n_{50} = 1$  representa ausência de cooperatividade; se  $n_{50} > 1$ , a reação é considerada positivamente cooperativa. Para a Hb humana este valor está entre 2 e 3, o que indica a cooperatividade positiva. Através do gráfico de

Hill podemos obter também o parâmetro  $p_{50}$ , que é a pressão de  $O_2$  necessária para saturar 50% dos sítios de ligação de oxigênio da Hb (Hill, A. V., 1913). A dedução das equações de Hill está detalhada em Materiais e Métodos.

Gilbert Adair, em 1925, propôs descrever a curva de oxigenação da Hb, considerando a ligação sequencial de  $O_2$  à Hb, com uma constante de equilíbrio para cada passo (Adair, G., 1925).



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

$$[HbX] = k [Hb][X] \quad (01)$$

A curva de oxigenação pode ser descrita em termos da saturação Y, sendo:

$$Y = \frac{\text{sítios ligados}}{\text{número total de sítios}} \quad (02)$$

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

$$Y = \frac{[HbO_2] + 2[Hb(O_2)_2] + 3[Hb(O_2)_3] + 4[Hb(O_2)_4]}{4([Hb] + [HbO_2] + [Hb(O_2)_2] + [Hb(O_2)_3] + [Hb(O_2)_4])} \quad (03)$$

Se expressada em termos das constantes de dissociação, teremos:

$$Y = \frac{A_1 X + 2A_2 X^2 + 3A_3 X^3 + 4A_4 X^4}{4(1 + A_1 X + A_2 X^2 + A_3 X^3 + A_4 X^4)} \quad (04)$$

Onde  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  e  $A_4$  são as constantes multiplicadas para cada passo e  $X$  é a concentração de oxigênio. A solução destas equações para descrever a saturação fracional da Hb por  $O_2$  é a equação de Adair, onde  $X$  é a concentração de  $O_2$ .

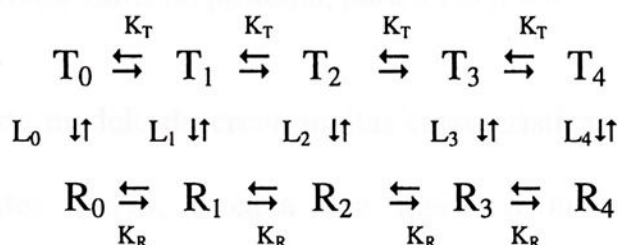
O ajuste dos parâmetros desta equação a curvas de oxigenação experimentais obtida em condições fisiológicas, mostra que a quarta constante, é cerca de 300 vezes maior que a primeira, fato que ilustra a cooperatividade, graças às interações entre as subunidades.

Para descrever o mecanismo de ligação cooperativa de ligantes a proteínas, alguns modelos estruturais foram propostos. O modelo mais popular é o proposto por Monod, Wyman e Changeaux em 1965 (Monod, J., et al., 1965). O modelo sugere que proteínas cooperativas são formadas por mais de uma subunidade, cada uma com um sítio de ligação para um ligante. A

molécula deve ter dois estados oligoméricos com estruturas quaternárias diferentes, cujo equilíbrio é regulado pela saturação do ligante. Em uma dessas estruturas, as subunidades deveriam estar “amarradas” por fortes ligações que dificultariam as mudanças terciárias necessárias à ligação do substrato. Este estado é designado de estado T, de baixa afinidade pelo ligante, proveniente do termo “tenso”. Na outra estrutura, estas “amarras” estariam relaxadas, facilitando a ligação de ligante. Este estado de alta afinidade pelo ligante é designado de estado R, proveniente do termo “relaxado”. No caso da Hb, essas duas conformações quaternárias estruturais extremas seriam: a tensa (T) desoxigenada e a relaxada (R) oxigenada, sendo que a conformação R é a mais hidratada e tem maior afinidade com o oxigênio (Lesk, A. M., et al., 1985). O equilíbrio entre estados seria dado pelo esquema:



Para uma proteína tetramérica, em equilíbrio entre as duas formas distintas: T, com baixa afinidade pelo ligante e R com alta afinidade pelo ligante, o modelo MWC pode ser esquematizado da seguinte forma:



onde  $L$  é a constante de equilíbrio entre os estados T e R.

O modelo pode ser formulado em termos quantitativos: podemos definir  $c$  em termos das afinidades das duas formas ao ligante S medido pelas constantes de dissociação e  $\alpha$  a razão entre a concentração do ligante e a constante de dissociação  $K_R$ .

$$\begin{aligned}
 R &\rightleftharpoons T & L &= \frac{[T]}{[R]} \\
 \text{Hb}_R + S &\rightleftharpoons \text{Hb}_R - S & K_R &= \frac{[\text{Hb}_R][S]}{[\text{Hb}_R - S]} \\
 \text{Hb}_T + S &\rightleftharpoons \text{Hb}_T - S & K_T &= \frac{[\text{Hb}_T][S]}{[\text{Hb}_T - S]}
 \end{aligned}
 \tag{06}$$

sendo:

$$c = \frac{K_R}{K_T} \quad \text{e} \quad \alpha = \frac{[S]}{K_R}
 \tag{07}$$

A saturação fracional  $Y$  será dada por:

$$Y_S = \frac{\alpha(1 - \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n}
 \tag{08}$$

onde  $n$  é o número de sítios da proteína, para a Hb  $n = 4$ .

Embora este modelo descreva muitas características de ligação de  $O_2$  e de outros ligantes à Hb, é cada vez maior o número de evidências experimentais de que o mecanismo de oxigenação da Hb seja mais complexo

envolvendo intermediários estruturais, necessitando de um modelo que considere mais estados.

Particularmente isto ocorre quando se investiga a influência de diferentes reguladores heterotrópicos na afinidade da Hb por O<sub>2</sub>. O equilíbrio entre as conformações T e R também é alterado pela ligação de efetores heterotrópicos como prótons, ânions, água, etc. A oxigenação da Hb é acompanhada, por exemplo, pela liberação de H<sup>+</sup> e ligação de água. Portanto, em condições fisiológicas, o aumento de pH aumenta a afinidade da Hb por O<sub>2</sub>, caracterizando o efeito Bohr. Ânions como Cl<sup>-</sup>, DPG, IHP, ATP diminuem a afinidade da Hb pelo oxigênio, pois se ligam preferencialmente as estruturas desoxi-Hb, estabilizando a conformação alostérica de menor afinidade por O<sub>2</sub>. O esquema abaixo exemplifica essa ligação entre o efetor e a hemoglobina:



A diminuição da atividade de água diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio, em virtude da estrutura da oxi-Hb ser mais hidratada que a estrutura da desoxi-Hb. Portanto, a oxigenação é acompanhada pela ligação de um número extra de moléculas de água que se ligam à superfície protéica exposta ao solvente na transição conformacional. Como resultado destas mudanças, a afinidade da Hb por oxigênio, e a energia livre de oxigenação da Hb, é



controlada pelas atividades destes ligantes em solução.(Colombo, M. F. & Sanches, R., 1990, Colombo, M. F., et al., 1992, Colombo, M. F., et al., 1994, Colombo, M. F. & Bonilla-Rodriguez, G. O., 1996, Colombo, M. F. & Seixas, F. A., 1999). Quantitativamente, o efeito de efetores heterotrópicos na afinidade da Hb por  $O_2$  é medido através das equações de linkage de Wyman. (Wyman, J., 1964)

Estudos realizados em nosso laboratório (Colombo, M. F & Seixas, F. A., 1999) mostraram evidências estruturais e termodinâmicas de um novo estado da desoxi-Hb estabilizado na ausência de ânions. Esta transição estrutural foi observada por medidas funcionais de variação de hidratação em função da concentração de ânions presentes em solução, bem como por estudos de difração de Raios-X e medidas diretas de hidratação.(Colombo, M. F. & Seixas, F. A., 1999, Salvay, A. G., et al., 2003, Seixas, F. A., et al., 1999).

Este novo estado, chamado de  $T_o$ , tem afinidade por  $O_2$  e hidratação intrínseca, intermediárias aos extremos  $T_x$  (a desoxi-Hb ligada a ânions) e  $R$ .

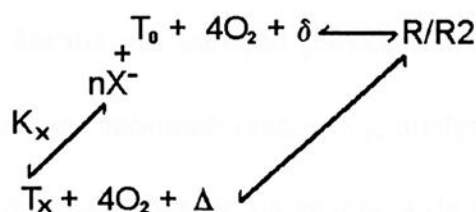
Para descrever este comportamento, um novo modelo foi proposto conciliando os dois estados clássicos da proteína ( $T$  e  $R$ ) com um novo estado intermediário  $T_o$ . O modelo considera que o equilíbrio entre os estados  $T_o$  e  $T_x$ , determinado pela atividade de  $X$ , sendo:





Na presença de ânions, um caminho possível para a transição do estado T para R passaria pelo estado intermediário,  $T_o$ , no qual estes ânions são liberados da estrutura conforme ocorre a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado desoxi-Hb é estabilizado e a transição passa a ser de  $T_o$  para R, com uma variação de hidratação menor.

O modelo proposto para descrever o efeito de ânions na variação da hidratação entre a Hb totalmente oxigenada (R/R2) e totalmente desoxigenada ( $T_o/T_x$ ) poderia ser esquematizado como:



onde  $\delta$  e  $\Delta$  representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb livre e ligada a ânions,  $K_x$  é a constante de dissociação do ânion à desoxi-Hb, e  $n$  a estequiometria da ligação. Este modelo está detalhado em materiais e métodos.

A estrutura R também é afetada pela presença da concentração salina da solução, definida pela força iônica da mesma. Em 1992 Mercedes Silva *et al* (Silva, M. M., et al., 1992) cristalizaram a carbomoxi-hemoglobina (estrutura semelhante à oxi Hb) em um ambiente de baixa força iônica e

encontraram uma estrutura diferente da R. Este estado, chamado R2, possui diferença de rotação entre o dímero  $\alpha 2\beta 2$  em relação à R. Enquanto na transição T→R, a rotação do dímero é de 15°, esta rotação é cerca de 22,7° na transição T→R2. Apesar desta diferença, os dois estados possuem afinidades intrínsecas ao oxigênio 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 *et al* estudaram a influência da presença de ânions em solução nas constantes  $K_R$  e  $K_T$  (Imaizumi, K., 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 desoxi-Hb foi posteriormente confirmada por outros grupos, em experimentos de oxigenação da Hb humana encapsulada em sílica-gel, o que impede mudanças quaternárias na proteína, sustentando que este processo ocorre com mudanças terciárias (Shibayama, N & Saigo, S., 1995, Bruno, S., et al., 2001).



### 1.1) O efeito da atividade de água sobre a afinidade da Hb pelo oxigênio

A comparação entre as conformações oxigenada e desoxigenada da hemoglobina mostra que vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente durante a transição  $T \rightarrow R$ . Esta mudança estrutural implica numa diferença de superfície protéica exposta ao solvente entre estas conformações e, conseqüente, ligação de moléculas de água à proteína com a oxigenação, uma vez que a estrutura oxigenada é mais hidratada que a estrutura desoxigenada (Lesk, A. M., 1985).

Similar aos efeitos observados com mudanças nas condições de pressão de  $O_2$ , temperatura, pH, concentração de ânions, etc. mudanças na atividade de água da solução interferem na posição do equilíbrio conformacional  $T \leftrightarrow R$  da Hb, causando efeitos sobre este equilíbrio alostérico e sobre a afinidade da Hb por  $O_2$ .

Para estudar o papel do efeito de água na afinidade da proteína por  $O_2$  utilizamos o método de estresse osmótico. Esse método consiste em utilizar solutos neutros, que são excluídos da superfície de hidratação protéica, como substância que reduz a atividade de água da solução,  $a_w$ , e assim medir como a afinidade da Hb pelo  $O_2$  varia com a diminuição desta atividade.



Colombo *et al.* em 1992 (Colombo, M. F., et al 1992), demonstraram que a dependência entre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a atividade de água pode ser analisada utilizando as equações de *linkage*, e particularmente a equação de *linkage* de Wyman. Esta dependência fornece a variação de hidratação que acompanha as mudanças conformacionais induzidas na Hb pela ligação sucessiva de oxigênio. Para isso realizaram experimentos analisando a curva de oxigenação da hemoglobina humana, a diferentes concentrações de solutos neutros na solução.

Na análise do efeito dos solutos neutros sobre as características de ligação de  $O_2$  à Hb, dois casos foram considerados: a ligação direta do soluto com a proteína e o efeito indireto do soluto sobre a atividade de água ( $a_w$ ).

Em estudos mais recentes, Colombo e Bonilla-Rodriguez (Colombo, M. F. e Bonilla-Rodriguez, G. O., 1996), mostraram evidências extras que a mudança de  $p_{50}$  pela adição de osmólitos à solução não se deve à interação preferencial do soluto com a Hb, nem a efeitos de mudanças dielétricas na solução, mas sim com a diminuição da atividade de água da solução. O efeito de solvatação pode ser determinado quantitativamente a partir do número diferencial de moléculas de água ligadas entre os dois extremos conformacionais da proteína através de equações de *linkage* apropriadas.



A Hb tem um número distinto de moléculas de água ligadas a cada conformação estrutural e o número total de moléculas de água que se ligam à Hb durante a transição oxi-desoxi é dado pela diferença entre esses valores. Assim,  $\Delta n_w$ , que é o número total de moléculas de águas associadas à transição é obtido pela diferença entre o número de moléculas de água ligadas à estrutura oxigenada e o número de moléculas de água ligadas à estrutura desoxigenada.

$$n_{\text{águas oxi}} - n_{\text{águas desoxi}} = \Delta n_w \quad (10)$$

Por meio de medidas da diferença entre o número de moléculas de água ligadas em cada estado, podemos inferir diferenças estruturais entre as duas conformações, já que o número de moléculas de água ligadas a elas é proporcional à superfície protéica exposta.

A determinação do número de moléculas de água que se ligam à proteína durante a oxigenação por meio de equações de *linkage* é correta apenas quando só a atividade de um ligante S varia e a atividade de qualquer outro ligante ( $a_i$ ) presente na solução é mantida constante. Quando o ligante alostérico S for água, esta relação pode ser escrita como:

$$-4 \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \bigg|_{a_i} = (n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}) = \Delta n_w \quad (11)$$

Onde  $n_w^{\text{oxi}}$  e  $n_w^{\text{desoxi}}$  são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, respectivamente;  $a_i$  é a atividade de um ligante  $i$  diferente da água e  $\Delta n_w$  o número diferencial de águas ligadas no estado totalmente oxigenado em relação ao totalmente desoxigenado. (Colombo, M. F., et al 1992).

### 1. 2) O efeito do íon cloreto

Como mencionado anteriormente, diversos ânions agem como efetores heterotrópicos de Hbs. Nos eritrócitos humanos, o ânion 2,3-DPG, está presente em uma concentração intracelular de cerca de 4 a 5 mM e, uma vez que a concentração de Hb nestas células é próxima de 2mM/tetrâmero, a razão DPG:Hb é de 2:1 (Voet, D. & Voet, J. C., 1995). O DPG liga-se com alta afinidade à desoxi-Hb humana, em um sítio de ligação específico, constituído por 8 resíduos catiônicos das cadeias beta, localizados na entrada da cavidade central da proteína.

Em hemoglobinas de aves e répteis, os ânions de maior importância são o IHP e o ATP, respectivamente, que se ligam à Hb com altíssima afinidade. A HbAo responde também à ligação de ânions monovalentes como o  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{I}^-$ , que também se ligam à forma desoxigenada da hemoglobina,



estabilizando-a e contribuindo para diminuir a afinidade da Hb pelo O<sub>2</sub>. Destes ânions, destacamos o Cl<sup>-</sup>, que é o íon mais abundante em meio fisiológico.

Muitos estudos vem sendo realizados na tentativa de identificar o sítio de ligação do cloreto à Hb. Primeiramente foi sugerido que essa ligação se daria em sítios específicos da Hb, que seriam o resíduo N-terminal Val 1  $\beta$ 2 e o grupo guanidino da Arg 141 $\alpha$ 1, resíduo C terminal (Kilmartin, J. V., et al., 1980, Chiancone, E., et al., 1972, Chiancone, E., et al., 1975). Em estudos mais recentes, Max Perutz (Perutz, M. F., et al., 1993) propôs que não existiria um sítio específico para a ligação do cloreto e que seu efeito se deveria, portanto, a abertura da cavidade central, durante a transição T para R que permitiria a difusão de íons cloreto, os quais neutralizariam as oito cargas catiônicas da cavidade central. Neste caso, o excesso de cargas positivas causaria uma repulsão iônica, deslocando o equilíbrio de T para R. Para testar essa hipótese, Perutz (Perutz, M. F., et al., 1994 ) realizou experimentos com Hbs mutantes, que tinham alguns desses resíduos positivos substituídos. Perutz observou que a influência da concentração de íons cloreto na afinidade da Hb por O<sub>2</sub>, medida por p<sub>50</sub>, diminuía à medida que esses resíduos positivos da cavidade central eram substituídos (as Hbs estudadas foram os mutantes naturais Sherwod Forest ArgG6(104) $\beta$ →Thr, Turriff Lys G6(99) $\alpha$ →Glu, Abrizzo His H21(143)  $\beta$ →Arg, Dallas Asn G4(97)  $\alpha$ →Lys). Perutz notou



ainda que modificações em resíduos de superfície da molécula, não influenciaram a  $p_{50}$ , e concluiu que estas observações suportam a hipótese que íons cloreto alteram a  $p_{50}$  por um mecanismo de condensação iônica enfraquecendo a hipótese da presença de sítios específicos para cloreto na Hb, reforçando a teoria de que o íon cloreto realmente estaria em contato apenas com a cavidade central da proteína. As Hbs estudadas foram Hbs Cowtown His HC3(146)  $\beta \rightarrow \text{Leu}$  e Hiroshima His HC3(146)  $\beta \rightarrow \text{Asp}$ .

Fronticelli *et al*, e outros autores posteriormente, propuseram como sítio de ligação de cloreto as lisinas  $\beta 76$  e  $\beta 8$  na Hb bovina (Fronticelli, C., et al, 1984; Fronticelli, C., et al., 1995, Marta, M., et al., 1998). Na Hb humana, o resíduo que ocupa a posição  $\beta 76$  é uma asparagina, que não ligaria cloreto. Segundo estes autores, a ligação de cloreto seria, portanto diferente para as Hbs humana e bovina, sugerindo sítios específicos de ligação. Fronticelli *et al* atribuíram as diferenças funcionais das Hbs humana e bovina a estes diferentes aminoácidos da cadeia  $\beta$ , propondo uma modulação na afinidade por oxigênio regulada por mudanças de ordem terciária.

Em 1999, Hui *et al* (Hui, H. L., et al., 1999) propuseram que o íon cloreto poderia se ligar a Hb pelos resíduos Arg 141 $\alpha 1$  e Arg 141 $\alpha 2$ , baseados na comparação de estruturas cristalográficas de desoxi Hb e de hemoglobinas mutantes cristalizadas: Hb $\alpha$  + M (cadeia  $\beta$  normal e cadeia  $\alpha$  com uma



metionina precedendo a valina inicial) e Hb $\alpha$  V1M (com uma metionina substituindo a valina inicial da cadeia  $\alpha$ ).

Ainda assim, existe uma dificuldade em se definir o sítio de ligação de cloreto a partir de uma estrutura cristalográfica. Isto porque este íon tem alta mobilidade dentro da molécula, além de densidade eletrônica muito parecida com a água, podendo ser confundido com esta.

Recentemente, estudos cristalográficos realizados em nosso laboratório também mostraram indícios de que os íons Cl<sup>-</sup> podem estar ligados às argininas 141 $\alpha$ 1 e 141 $\alpha$ 2 (Seixas, F. A. V., 2002). Estas evidências foram encontradas analisando mapas de diferenças entre densidades eletrônicas das desoxi-Hbs cristalizadas em total ausência de anions To e na presença de cloreto: estrutura Tx. Foram procuradas densidades eletrônicas para o solvente presentes no mapa Tx e ausentes no mapa To. A partir desta metodologia foram identificados quatro possíveis sítios de ligação de cloreto exatamente nas argininas: dois deles nas Arg 141 $\alpha$ 1 e 141 $\alpha$ 2, em concordância com a proposição de Hui *et al*, e dois deles identificados originalmente nas argininas 92 $\alpha$ 1 e 92 $\alpha$ 2. Estes quatro sítios obedecem ao padrão de ligação de cloreto ligado a arginina, observado em outras proteínas.

Apesar de todos estes estudos, a existência ou não de sítios específicos para a ligação de cloreto à hemoglobina ainda é controverso.



### 1.3) Hemoglobinas estudadas no trabalho

Como explicitado no item II- OBJETIVOS à frente, neste trabalho investigamos o efeito da ligação de ânions sobre a estrutura da desoxi-Hb de outras espécies, para fins de comparação com o efeito já observado com a Hb humana.

As hemoglobinas escolhidas para esta análise foram as Hbs bovina, e as humanas Hb S( $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ ) e Hb desArg, onde os resíduos arginina 141 $\alpha 1$  e 141 $\alpha 2$  são clivados especificamente pela enzima carboxipeptidase B. As sequências primárias das Hbs estão no Apêndice B.

A hemoglobina bovina difere estruturalmente da Hb humana em 40 resíduos de aminoácidos e funcionalmente por ter baixa afinidade ao oxigênio. Esta característica tem sido apontada como resultado de modificações de resíduos das cadeias beta, especialmente nas hélices A e E, com hidrofobicidade maior daquela encontrada na Hb humana (Fronticelli, C., et al, 1995, Marta, M., et al., 1998) Além disso, a Hb bov tem o resíduo  $\beta 1$  deletado e tem na posição  $\beta 2$  uma metionina, resíduo hidrofóbico, diferente da humana que tem nesta posição uma histidina. Esta hidrofobicidade causa uma torção na porção inicial das cadeias beta, que estabilizaria a estrutura T. Conseqüência deste fato é a diminuição na afinidade da Hb pelo  $\text{O}_2$ , refletida no aumento da constante alostérica. Além destas diferenças, apontamos a



perda de quatro resíduos na cavidade central da Hb bov: valina 1, histidina 2, lisina 82 e histidina 143 de ambas as cadeias- $\beta$ . (Razynska, A., et al., 1990)

Essa modificação faz com que a Hb bovina interaja de maneira diferente da humana com o 2,3-DPG, que diminui significativamente a afinidade da Hb humana pelo  $O_2$ , e tem seu efeito muito enfraquecido na Hb bovina. O DPG existe em altas concentrações nos eritrócitos humanos, e é praticamente inexistente nos bovinos, onde há alta concentração de cloreto.

A hemoglobina S ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ), é uma forma mutante natural da HbA, que tem como diferença a substituição de um resíduo de ácido glutâmico com caráter hidrofílico, por uma valina, hidrofóbica. Quando a Hb S encontra-se no estado desoxigenado, a valina de uma molécula de Hb pode se ligar à superfície hidrofóbica formada principalmente entre os resíduos Phe 85 e Leu 88 da subunidade  $\beta$  de outra molécula de Hb adjacente. Isso acarreta em aglomeração das Hbs, e em formação de fibras. Este mecanismo de gelificação das Hbs é a causa molecular da anemia falciforme. Não há modificação na região dos hemes, mas esta substituição de resíduo, causa uma alteração na superfície de hidratação da molécula. (Watowich, S. J., et al., 1989)

A Hb desArg, obtida por modificação enzimática da Hb humana, perde dois dos sítios de ligação de cloreto, já que resíduos de arginina seriam esses



potenciais sítios de ligação. O resíduo Arg 141 tem um importante papel na estabilidade da estrutura T, através de interações com outros aminoácidos: a arginina faz pontes salinas com a Lys127 $\alpha$ 2, com a Asp126 $\alpha$ 2 e com a Val $\alpha$ 1 (Ikeda-Saito, M., 1980; Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L., 1971). A perda deste resíduo causa um aumento na flexibilidade da molécula e conseqüentemente desloca o equilíbrio para a estrutura de maior afinidade R. Apesar desta mudança, não há modificação na região dos grupos heme e o resíduo Tyr149 $\alpha$  está na mesma direção que na HbA (Kavanaugh, J. S., et al., 1995).



## II – OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo:

- Estender a investigação anterior dos efeitos de ânions na estrutura e função da Hb, realizados com a Hb humana, para outras espécies de Hb: Hb bovina, Hb S e Hb desArg humanas, onde buscamos investigar o caminho estrutural percorrido pela Hb durante sua oxigenação.

- Investigar a influência do cloreto na estrutura e função dessas

Hbs

- Estudar o papel das argininas 141



### III-MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1) Purificação do sangue e preparação das amostras

As amostras de sangue humano, para preparação de HbS, provenientes de pacientes heterozigotos para anemia falciforme (HbA/HbS), foram gentilmente cedidas pela prof. Dra. Claudia R.B. Domingos e as amostras de sangue humano, para a obtenção de HbAo e para a preparação enzimática da Hb desArg, foram obtidas de um adulto não fumante através de punção venosa. As amostras de sangue bovino foram coletadas de um animal adulto e saudável durante seu abate em um frigorífico.

O procedimento experimental utilizado na purificação da hemoglobina humana é baseado na metodologia proposta por Tsay e Williams (WILLIAMS, R. C. T., 1973).

Uma vez coletado o sangue, o plasma foi retirado por centrifugação a 2500 g. As hemácias foram lavadas cinco vezes em solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 + EDTA 1 mM) onde o volume de tampão adicionado é três vezes maior que o volume de hemácias decantadas. A hemólise ocorreu com a adição de solução tampão hipotônica Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8,5. O passo seguinte, a retirada de "debris", ocorreu com a adição de clorofórmio no mesmo volume que a solução da amostra, sob agitação constante. Neste ponto o sistema forma duas fases: uma



com a parte polar, onde estão as proteínas e outra apolar, com os debris. Coletamos o sobrenadante e em seguida centrifugamos a amostra a 2.300 g por 120 minutos.

Novamente coletamos o sobrenadante e a amostra foi dialisada contra 2 L de tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 1 mM, pH 8,5 por 12 horas para remoção de fosfatos.

### 3.1.1) Cromatografia de troca iônica aniônica

Os tampões utilizados na cromatografia foram:

- Tampão inicial (A): Tris-HCl 15mM pH 8,4
- Tampão final (B): BisTris-HCl 15mM pH 7,0

Cerca de 4,5 g de resina DEAE-SEPHADEX A - 50 (Pharmacia), foram adicionadas em aproximadamente 350 mL de tampão A por 12 horas, antes da montagem da coluna XK-50 (Pharmacia), sendo este o tempo indicado pelo fabricante para a hidratação da resina. A coluna foi posteriormente montada em temperatura ambiente e equilibrada em câmara fria à temperatura próxima a 4° C com este mesmo tampão.

Com a coluna equilibrada, cerca de 20mL de amostra de Hb foi aplicada à mesma e lavada com tampão A ( $\cong$  700 mL) 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 a um sistema



de FPLC modelo LKB da Pharmacia e a um banho térmico com a temperatura mantida constante em 4° C. O FPLC forma um gradiente de pH devido a mistura de frações dos tampões A e B (BisTris-HCl 15mM em pH = 7), permitindo assim a eluição da amostra pela coluna. O gradiente foi iniciado em 50% (V/V) de tampão A e B, e a concentração de tampão B foi gradativamente elevada até atingir 100%. O fluxo de saída de tampão pela coluna foi de 4 mL/min.

Para a Hb humana, quando o gradiente atinge a fração de 75% de tampão B ocorre o desprendimento da Hb A<sub>2</sub>, que representa aproximadamente 2% do total de Hb, para um indivíduo normal. O pH deste gradiente é próximo a 7,9 (que equivale ao ponto isoelétrico da Hb A<sub>2</sub>). Com o início da eluição da Hb A<sub>2</sub>, o gradiente foi suspenso e o pH mantido constante para a saída desta fração protéica. Em seguida, o gradiente foi elevado a aproximadamente 100% de tampão B, onde ocorreu o desprendimento da fração de Hb A<sub>0</sub>. A HbS tem ponto isoelétrico 0,23 maior que a HbA<sub>0</sub> e a Hb bovina possui apenas uma fração.(Fronticelli, C. & Bucci, E., 1994, Nagel, R. L. & Chang, H., 1981)

Após a eluição da fração de interesse, a amostra foi concentrada por centrifugação utilizando concentradores CENTRICON até um volume de aproximadamente 50 mL e posteriormente passada em uma coluna, de troca



iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA, para desionização da solução. A resina foi lavada com água ultrapura e depois a solução de Hb foi passada nesta coluna por no mínimo cinco vezes, para que quaisquer íons ficassem ligados à resina. Depois disso a amostra foi novamente concentrada por centrifugação em concentradores Centriprep (AMICON) até aproximadamente 10mM/ heme e armazenada em alíquotas de 250 µl em N<sub>2</sub> líquido.

Ao final destes procedimentos, a pureza da amostra foi checada através de uma eletroforese não desnaturante - PAGE, com coloração do gel por impregnação de nitrato de prata. (Laemmli, U. K., 1970)

### 3.1.2) Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração protéica foi realizada com base no método quantitativo espectrofotométrico Riggs, A., 1981. A equação 12 expressa o cálculo da concentração da proteína, [Hb], a partir das absorbâncias (Abs) aferidas em um dos picos característicos para a oxi-Hb (540 ou 576nm) e do valor correspondente à linha de base (700 nm).

$$[Hb] = \frac{(Abs_{576} - Abs_{700}) \cdot (V_{diluição} + V_{Hb})}{(\epsilon_{576} \cdot V_{Hb})} \quad (12)$$



A concentração da Hb é expressa em mM/heme,  $V_{\text{diluição}} + V_{\text{Hb}}$  representa o volume total da amostra na cubeta e  $\epsilon_{576}$  o coeficiente de extinção molar para a oxi-Hb em 576nm (Stryer, L., 1996).

O átomo de ferro presente nos grupos heme da hemoglobina, pode sofrer uma oxidação, passando de  $\text{Fe}^{+2}$  para  $\text{Fe}^{+3}$ . Quando isso acontece, forma-se a meta hemoglobina, e essa forma não liga oxigênio. *In vivo* os níveis de meta Hb são mantidos baixos por um sistema enzimático meta-hemoglobina redutase. Em nossos experimentos utilizamos as enzimas catalase e superóxido dismutase para esse mesmo fim (10 $\mu$ L de cada). Como a presença de meta-hemoglobina em excesso pode adulterar os resultados, é importante checar ao final da purificação, assim como ao final de cada experimento a concentração de meta-hemoglobina presente. Para isso, utilizamos as equações abaixo: (Riggs, A., 1981)

$$A_{576} = [\text{oxi} - \text{Hb}] \epsilon_{576}^{\text{oxi}} l + [\text{meta} - \text{Hb}] \epsilon_{576}^{\text{meta}} l \quad (13)$$

$$A_{630} = [\text{oxi} - \text{Hb}] \epsilon_{630}^{\text{oxi}} l + [\text{meta} - \text{Hb}] \epsilon_{630}^{\text{meta}} l \quad (14)$$

Onde, [meta-Hb] e [oxi-Hb] são as concentrações molares da proteína oxidada e não oxidada respectivamente e  $l$  o caminho ótico da cubeta.



Os valores dos coeficientes de extinção molar determinados em pH de 7,2 e nos comprimentos de ondas de 630 e 576 nm, utilizados são aqueles determinados por Benesch (Benesch, R. E., et al., 1973):

para a oxi-Hb  $\epsilon_{630}^{\text{oxi}} = 0,014.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  e  $\epsilon_{576}^{\text{oxi}} = 1,58.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , enquanto que para a meta-Hb,  $\epsilon_{630}^{\text{meta}} = 0,376.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  e  $\epsilon_{576}^{\text{meta}} = 0,414.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

### 3.2) Preparação da Hb desArg:

A hemoglobina desArg foi preparada enzimaticamente. (Kilmartin, J. V., 1981, Joshi, A. A. & McDonald, M. J., 1994, Bonaventura, J., et al., 1972, Englander, J. J., et al., 1998).

A hemoglobina desArg foi obtida a partir da hemoglobina Ao, pela remoção de dois resíduos arginina carboxi-terminais das cadeias  $\alpha$  removidos especificamente pela enzima Carboxipeptidase B (CPB). A reação é similar à representada na figura 4 com o substrato sintético.

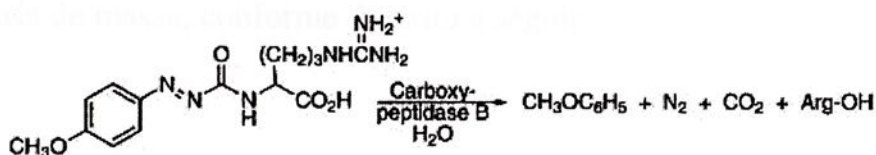


**Figura 04:** Ilustração de reação de deleção da arginina terminal pela atividade da CPB. No caso, o substrato Anisilazoformilarginina reage com a CPB. Figura extraída de Mock, LW e Stanford, D J, 2002 (Mock, W. L. e Stanford, D. J., 2002)

A enzima foi utilizada em uma proporção de 1 parte de CPB para 1000 Hbs. A reação de digestão ocorreu na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH = 8, a temperatura ambiente, por cerca de duas horas. Após este processo, a amostra foi passada em coluna PD-10, Sephadex G25M, Pharmacia Biotech equilibrada com tampão Hepes-NaOH 0,01M, pH=6,9, com o intuito de retirar os resíduos de arginina. Após esta passagem, a amostra foi novamente aplicada em coluna de troca iônica DEAE A50 SEPHADEX, equilibrada com tampão Hepes-NaOH 0,01M, pH= 7. Esta passagem separa a Hb desArg da enzima, já que as proteínas possuem pontos isoeletricos distintos (PI = 7,1 para HbAo e PI = 6,0 para CPB (Folk, J. E., et al., 1960, Wyman, J., 1964).

Após este processo a Hb desArg foi deionizada por passagem em coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 (SIGMA), pelo mesmo processo descrito anteriormente na preparação das amostras.

A caracterização do produto de reação HbAo + CPB foi realizada por eletroforese, cromatografia de proteínas, cromatografia de cadeias e espectrometria de massa, conforme descrito a seguir.



### **3.3) Análise da Hb desArg**

As eletroforeses foram feitas a partir dos protocolos descritos no Manual “Protocolos de metodologias Laboratoriais Clássicas para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias” (Domingos, C. R. B., 2003).

#### **3.3.1) Eletroforese de hemoglobinas:**

As amostras são aplicadas em fita de acetato de celulose, a um centímetro da extremidade de pólo negativo, em pH alcalino em tampão TEB (TRIS – EDTA – BORATO), pH = 8,6. Aplica-se uma voltagem de 300 volts por 30 minutos, na eletroforese alcalina. Na eletroforese ácida, as amostras são aplicadas em gel de Agar, na presença de tampão Fosfato, pH= 6,2. Aplica-se uma voltagem de 100 volts por 30 minutos, as amostras são aplicadas no centro do gel.

#### **3.3.2) Eletroforese de cadeias**

No processo de eletroforese de cadeias, as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são separadas pela reação uréia - mercaptoetanol. A eletroforese de cadeias alcalina baseada no método de Schneider Schneider, R. G., 1974, TEB, pH = 8,6 em fita de acetato de celulose. Já a eletroforese de cadeias ácida, (Alter B. P., et al., 1980) é feita em gel de poliacrilamida, como tampão de corrida Acido acético 5 %.



### 3.3.3 ) Perfis cromatográficos de hemoglobina por HPLC

A análise cromatográfica das Hbs foi realizadas em cromatógrafo HPLC VARIANT da BIO-RAD e utilizando resina de troca catiônica.

A padronização de eluição cromatográfica foi feita utilizando o Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota, da Bio Rad, contendo padrões das Hbs A<sub>2</sub> e Hb Fetal, que permite a caracterização através de janelas específicas para as Hb S, Hb C e Hb D Los Angeles, além de frações de HbA<sub>0</sub> glicosilada e acetilada e também de algumas hemoglobinas variantes pelo padrão cromatográfico, tempos de retenção e porcentagem dos diferentes picos.

A eluição da hemoglobina na coluna é monitorada por detecção de absorbância em 415 nm. O cromatograma consiste no gráfico de absorbância, em 415 nm registrada função do tempo, onde o tempo é medido a partir da injeção da amostra.

No procedimento experimental, 5µL de cada amostra é adicionado a 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Os tubos são colocados na sequência no HPLC: o primeiro tubo com água, o segundo com a solução de calibração (hemoglobina A<sub>2</sub>/F calibrator), e na sequência cada amostra. A figura 5 mostra a sequência de passagem em HPLC, em A temos a



passagem de água, em B a amostra de padronização com frações de HbAo, HbA2, Hb fetal e frações de Hb Ao glicolisada (P2) e acetilada (P3).

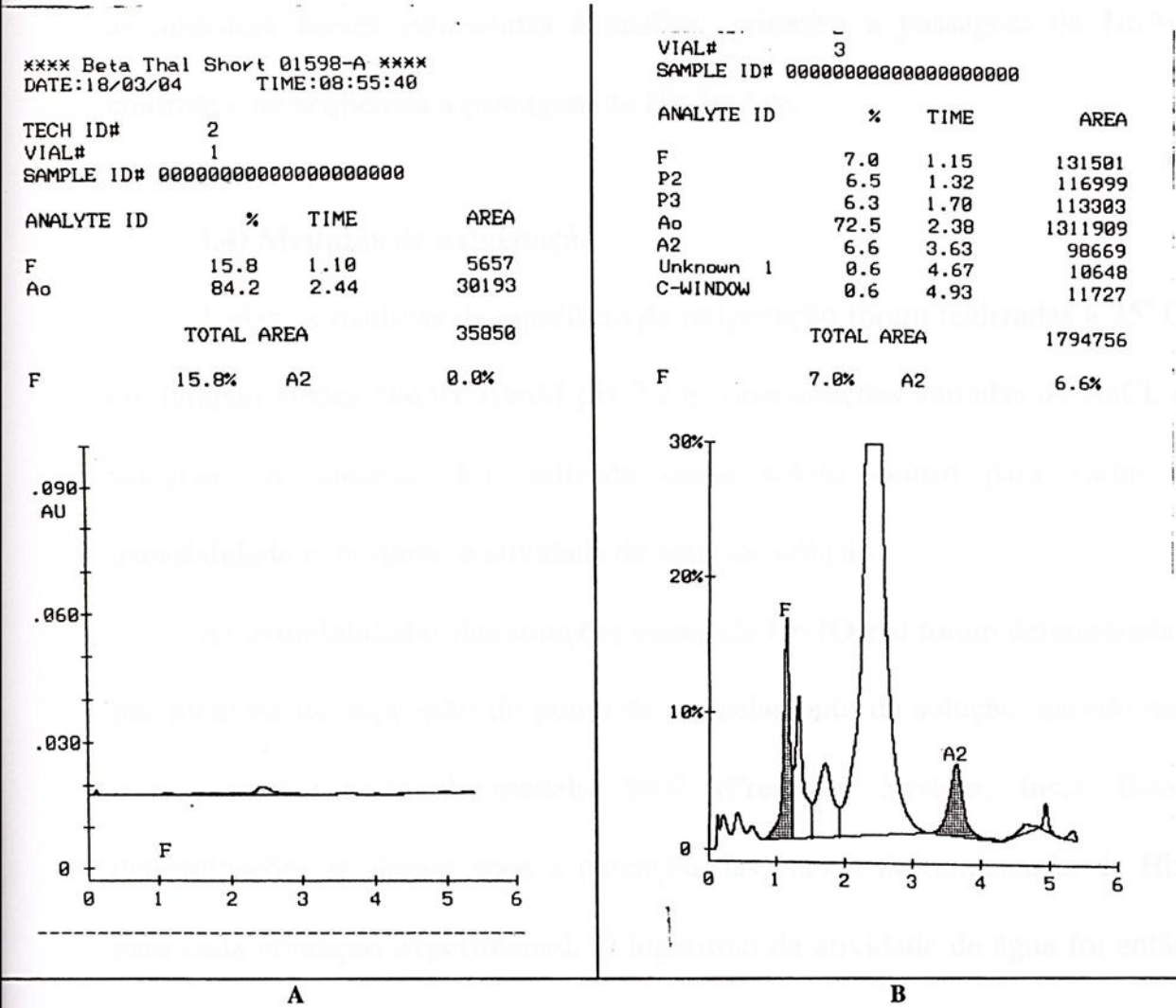


**Figura 05:** A- Primeira passagem em HPLC, apenas com água. B - Amostra de controle em HPLC, com frações de HbAo, HbA2, Hb fetal, e porções de hemoglobina humana Ao glicolisada (P2) e acetilada (P3)

As Hbs Ao e desArg também foram analisadas por espectrometria de massa.O experimento foi realizado no departamento de Imunologia e

Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do professor Dr. Marcelo Matos Santoro.

O espectrômetro de massa foi calibrado inicialmente com NaI. Depois as amostras foram submetidas à análise: primeiro a passagem da HbAo controle e na sequência a passagem da Hb desArg.

### **3.4) Medidas de oxigenação**

Todas as medidas de equilíbrio de oxigenação foram realizadas a 25° C em tampão Hepes-NaOH 10mM pH 7,2 e concentrações variadas de NaCl, e sacarose. A sacarose foi utilizada como soluto neutro para variar a osmolalidade e, portanto a atividade de água da solução.

As osmolalidades das soluções contendo Hb (**Osm**) foram determinadas por medidas de depressão do ponto de congelamento da solução, usando um osmômetro Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.). Estas determinações se deram após a obtenção das curvas de oxigenação da Hb, para cada condição experimental. O logaritmo da atividade de água foi então calculado através da seguinte relação (Colombo, M. F. & Bonilla-Rodriguez, G. O., 1996):



$$\ln a_w = \frac{\Delta_{\text{fpd}}}{K_f M_w} = \frac{-\text{osm}}{55,5} \quad (15)$$

onde  $\Delta_{\text{fpd}}$  é o decaimento do ponto de congelamento,  $K_f = 1,86 \text{ K Kg mol}^{-1}$  é a constante crioscópica, e  $M_w = 55,5$  é a molaridade da água pura e  $\text{osm}$  é o valor da osmolalidade da solução.

### 3.5) Obtenção das curvas de oxigenação

Para estudar a saturação da Hb (Y) em função da pressão de oxigênio, acompanhamos a variação espectral que Hb apresenta em seu estado oxigenado e desoxigenado, representada na figura 6. O espectro de absorção da Hb totalmente oxigenada na região visível apresenta picos em 540nm e 576nm e o espectro absorção da Hb totalmente desoxigenada apresenta pico em 550nm.



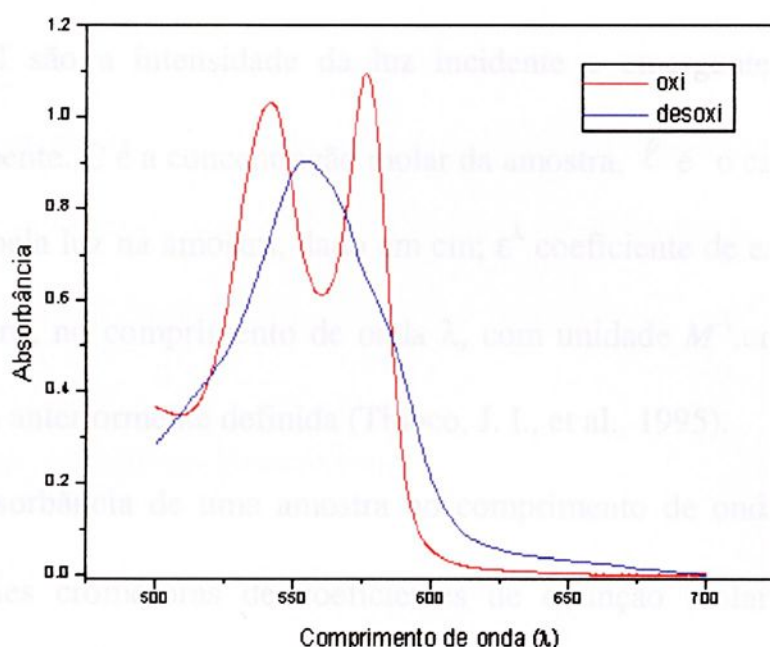


**Figura 6:** A figura acima mostra os espectros de absorção da desoxi-Hb (—) da oxi-Hb (—) na região do visível. As regiões intermediárias entre os espectros são referentes à diferentes saturações que a Hb apresenta durante o processo de desoxigenação e/ou oxigenação.

Conforme a Hb passa de seu estado oxigenado para o desoxigenado, podemos observar a variação de absorção espectral registrada característica do grupo heme na região do espectro visível que vai de 500 a 700 nm.

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

$$\text{Abs} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon^\lambda \cdot l \cdot C \quad (16)$$

onde  $I_0$  e  $I$  são a intensidade da luz incidente e emergente da amostra, respectivamente.  $C$  é a concentração molar da amostra,  $\ell$  é o caminho óptico percorrido pela luz na amostra, dado em cm;  $\epsilon^\lambda$  coeficiente de extinção molar do cromóforo, no comprimento de onda  $\lambda$ , com unidade  $M^{-1}.cm^{-1}$  e Abs é a absorbância anteriormente definida (Tinoco, J. I., et al., 1995).

A absorbância de uma amostra no comprimento de onda  $\lambda$  contendo duas espécies cromóforas de coeficientes de extinção molar  $\epsilon_1^\lambda$  e  $\epsilon_2^\lambda$  e concentrações  $C_1$  e  $C_2$ , respectivamente, é dada por:

$$Abs = \epsilon_1^\lambda C_1 \ell + \epsilon_2^\lambda C_2 \ell \quad (17)$$

Para uma reação na qual ocorre a interconversão da espécie 1 em 2, ou vice e versa, a absorbância medida varia dependendo de quanto  $\epsilon_1^\lambda$  difere de  $\epsilon_2^\lambda$ , portanto, pode ser acompanhada espectrofotometricamente.

No presente estudo acompanhamos a oxigenação da Hb pela variação da absorção em  $\lambda = 576$  nm que corresponde à um dos picos da absorção da oxi-Hb. Neste comprimento de onda o coeficiente de extinção molar da oxi-Hb é  $1,58 \times 10^4 M^{-1}.cm^{-1}$  e da desoxi-Hb é  $0,98 \times 10^4 M^{-1}.cm^{-1}$  (Benesch, R. E., et al., 1973)



As curvas de oxigenação, foram determinadas pelo método espectropolarimétrico, utilizando uma cela de Imai modificada (Imai, K., 1981), ou pelo método tonométrico. (Riggs, A. F. & Wolbach, R. A., 1956, Rossi-Fanelli, A. & Antonini, E., 1958).

### 3.5.1- método espectropolarimétrico

As curvas de oxigenação das amostras de hemoglobinas bovina e HbS foram determinadas utilizando a cela espectropolarimétrica de Imai modificada. O método consiste em medir simultaneamente a concentração de  $O_2$  dissolvido na solução e a absorbância da amostra de Hb em um comprimento de onda estabelecido no qual a absorbância da oxiHb e desoxiHb são distintas, com a determinação da saturação ( $\bar{Y}$ ) da Hb por  $O_2$ .

#### *Descrição da cela espectropolarimétrica*

Nesse sistema de oxigenação uma solução de oxiHb é colocada em uma cela de acrílico termostatizada, equipada com um eletrodo de oxigênio, com caminho óptico de 12 mm, montada no compartimento para cela de um espectrofotômetro Cary 13E Varian o qual possui uma janela óptica que permite a passagem de luz pela cela. A solução de Hb é então agitada constantemente por um agitador magnético.

A temperatura é mantida a 25° C por um banho Neslab RTE 221.



A desoxigenação da amostra foi feita pela passagem de fluxo contínuo de gás Nitrogênio umedecido sobre a superfície da solução. Um gradiente de pressão de  $O_2$  entre a solução e a fase gasosa de  $N_2$  é criado forçando a desoxigenação da solução que promove a liberação do oxigênio ligado a proteína (Caon Filho, O., 1997, Imai, K., 1982).

A determinação da concentração de oxigênio,  $[O_2]$ , dissolvido na solução é feita utilizando um eletrodo de  $O_2$  (YSI 5331). O eletrodo de  $O_2$  é um sistema polarográfico completo que consiste de um cátodo de platina, um ânodo de prata e solução saturada de cloreto de potássio, que serve de meio para a corrente elétrica. A solução de KCl saturado 3M é mantida por uma membrana de teflon fixada por “O-ring” de borracha. A membrana fina de teflon forma uma barreira mecânica e elétrica entre o eletrólito e a solução contendo o gás. Além da função de fixar a membrana ao eletrodo, o “O-ring” também é utilizado para vedar o encaixe do eletrodo na cela, garantindo assim o gradiente de  $pO_2$ . A difusão de oxigênio pela membrana, é proporcional a concentração de  $O_2$  na solução: o  $O_2$  é reduzido proporcionalmente à taxa de consumo de  $O_2$  gerando corrente. Esta corrente é transformada em voltagem que é registrada em um multímetro Hewlett Packard 3440 A.

Os valores de voltagem são posteriormente convertidos em valores de  $pO_2$  utilizando a expressão de calibração:



$$pO_2 = p_T \cdot \left( \frac{v_i - v_{\min}}{v_{\max} - v_{\min}} \right) \quad (18)$$

onde  $p_T$  é a pressão de oxigênio (147,25 mmHg, à 25 °C) usada para calibrar o eletrodo e  $v_{\max}$  a tensão correspondente à esta pressão;  $v_i$  é o valor da voltagem correspondente à uma determinada concentração de  $O_2$  em uma solução qualquer;  $v_{\min}$  é o valor mínimo de tensão correspondendo à voltagem observada na saída do eletrodo na ausência de  $O_2$  (Imai, K., 1981, Jordan, J. A., E. & Berger, R. L, 1956; Wilhem, E. B., R. & Wilcock, R. J., 1977)

Ao mesmo tempo a absorbância da amostra em 576nm é registrada pelo espectrofotômetro, em função do tempo. A partir destes valores de  $pO_2$  e absorbância chegaremos aos valores de saturação  $\bar{Y}$ .

O grau de saturação  $\bar{Y}$  é calculado em cada valor de  $pO_2$  a partir dos valores de absorbância da amostra totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada.

$$\bar{Y} = (Abs_i - Abs_{Hb}) / (Abs_{HbO_2} - Abs_{Hb}) \quad (19)$$

Onde  $Abs_i$  é a absorbância medida em 576nm a cada adição de  $O_2$ ;  $Abs_{Hb}$  a absorbância da Hb totalmente desoxigenada e  $Abs_{HbO_2}$  a absorbância da Hb totalmente oxigenada.

A figura 7 mostra esquematicamente a cela espectropolarimétrica modificada



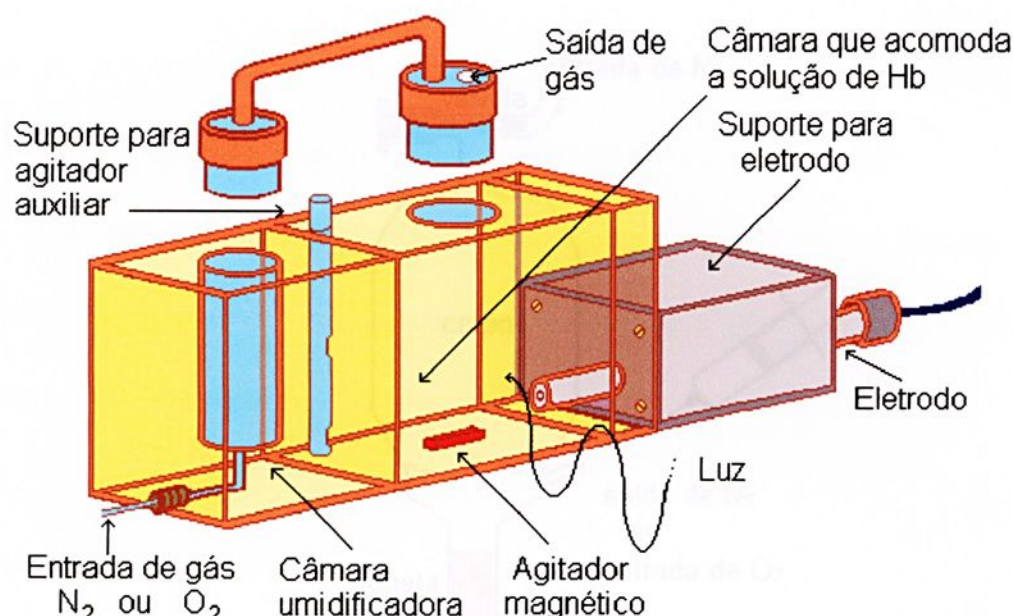


**Figura 7:** Esboço da cela desenvolvida em nosso laboratório e utilizada nos experimentos. A cela é composta por duas câmaras. A primeira contém algodão umedecido por onde os gases ( $N_2$  e  $O_2$ ) passam e por intermédio de um capilar que interliga as tampas, chegam a segunda câmara, onde se encontra a solução de Hb. O desenho acima foi confeccionado por Ocimar A. de Castro.

### 3.5.2- método Tonométrico-espectrofotométrico

O tonômetro utilizado está representado na figura 8. O tonômetro é formado por um corpo principal de vidro, uma válvula que controla entrada e saída dos gases, uma saída conectora por onde são feitas as injeções de oxigênio, e uma cubeta acoplada, onde fica a amostra com volume de 3 mL.

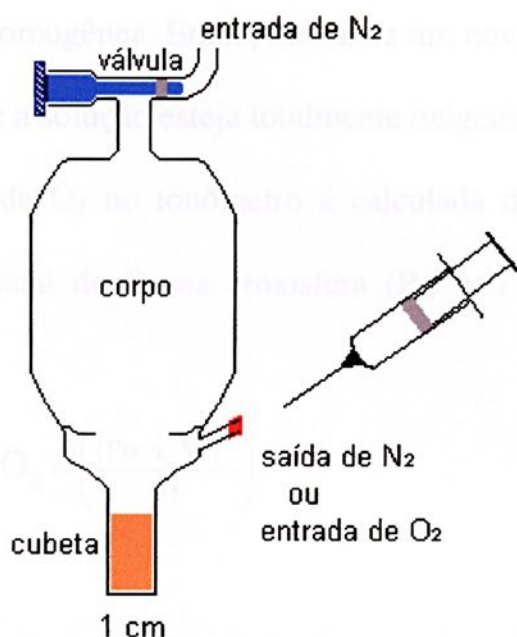


**Figura 8** - Representação esquemática do tonômetro. Com uma seringa injetamos um volume conhecido de ar dentro do tonômetro.

Após preparar a amostra nas condições desejadas para o experimento, a aplicamos no tonômetro e medimos um espectro de absorção da solução contendo a Hb oxigenada. Em seguida esta solução foi desoxigenada através da passagem de nitrogênio gasoso, por cerca de 40 minutos. Então medimos outro espectro de absorção, agora com a Hb totalmente desoxigenada. Logo, temos os valores de absorção da Hb nas duas condições extremas, e dessa maneira podemos calcular a fração de saturação com qualquer outro espectro intermediário. Passamos então a adicionar oxigênio por meio de uma seringa e, após cada adição de oxigênio, o tonômetro foi agitado por nove minutos,

para que a solução fique homogênea. Então, medimos um novo espectro. Este processo se repetiu até que a solução esteja totalmente oxigenada.

A pressão parcial de  $O_2$  no tonômetro é calculada do volume de ar injetado  $V_i$  a pressão parcial de  $O_2$  na atmosfera ( $P_o$ ) e o volume da fase gasosa no tonômetro  $V_t$ :

$$pO_2 = \left( \frac{(P_o \times V_i)}{V_t} \right) \quad (20)$$

O grau de saturação  $\bar{Y}$  é calculado em cada valor de  $pO_2$  a partir das leituras de absorbância da oxi e desoxi hemoglobina no comprimento de onda de 576nm.

### 3.6) Análise dos Dados

Os parâmetros funcionais  $p_{50}$  e  $n_{50}$  são calculados a partir das equações derivadas do equilíbrio hipotético demonstrado por Archibald Hill em 1913 (Hill, A. V., 1913), onde:



onde:

$$K = \frac{[Hb][O_2]^n}{[Hb.(O_2)_n]} \quad (22)$$

sua saturação fracional  $\bar{Y}$ , é expressa como :

$$\bar{Y} = \frac{n[Hb.(O_2)_n]}{n([Hb] + [Hb.(O_2)_n])} \quad (23)$$

com o rearranjo de alguns termos chegamos na equação de Hill:

$$\bar{Y} = \frac{[O_2]^n}{K + [O_2]^n} \quad (24)$$

sendo o  $O_2$  um gás, é conveniente expressar sua concentração em termos de  $pO_2$  pressão parcial de oxigênio (em Torr) na atmosfera em torno da solução, assim a equação 24 pode ser expressa como:

$$\bar{Y} = \frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \quad (25)$$

ao expressarmos a fração de oxiHb ( $\bar{Y}$ ) sobre a fração de desoxiHb ( $1 - \bar{Y}$ ) temos:

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \cdot \frac{1}{1 - \left( \frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \right)} \quad (26)$$

com alguns rearranjos, temos:

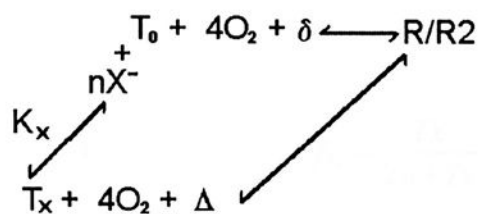
$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[pO_2]^n}{K} \quad (27)$$

Obtendo-se o logaritmo de ambos os lados da equação 9, temos:

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = n_H \log(pO_2) - \log K \quad (28)$$

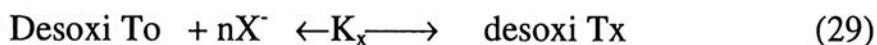
O gráfico de  $\log [\bar{Y} / (1-\bar{Y})]$  contra  $\log pO_2$ , é chamado de “gráfico de Hill”,. Sua inclinação  $n_H$  no ponto médio de ligação ( $\bar{Y} = 0,5$ ) é chamado de coeficiente de Hill e o valor da afinidade da Hb por  $O_2$ , ( $p_{50}$ ), é dado pelo valor de  $pO_2$ .

Uma vez que a ligação preferencial de ânions ao estado desoxigenado T modula o equilíbrio conformacional desta espécie entre os dois estados alostéricos distintos,  $T_o$  e  $T_x$  e que a oxigenação da Hb ocorre por dois caminhos de reação acoplados, podemos explicar o modelo de oxigenação da Hb segundo o esquema (Colombo, M. F. & Seixas, F. A., 1999)



onde  $\delta$  e  $\Delta$  representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb livre e ligada a anions,  $K_x$  é a constante de dissociação do Cl à desoxi-Hb, e  $n$  a estequiometria da ligação.

Portanto, podemos escrever esquematicamente o equilíbrio como:



E, sendo  $K_x$  a constante de dissociação da ligação de cloreto, podemos escrevê-la da seguinte forma:

$$K = \frac{T_o \cdot X^n}{T_x} \quad (30)$$

Considerando dois estados desoxigenados, temos que:

$$T = T_o + T_x, \quad (31)$$

logo:

$$T_o = \frac{T_o}{T_o + T_x} \quad \text{e} \quad T_x = \frac{T_x}{T_o + T_x} \quad (32)$$

ou em termos de fração:

$$f_{T_o} = \frac{T_o}{T_o + T_x} \quad \text{e} \quad f_{T_x} = \frac{T_x}{T_o + T_x} \quad (33)$$

temos:

$$T_o = f_{T_o}(T_x + T_o) \quad \text{e} \quad T_x = f_{T_x}(T_x + T_o) \quad (34)$$

Substituindo os termos  $T_x$  e  $T_o$  por suas respectivas frações, temos agora:

$$K = \frac{f_{T_o}(T_x + T_o).X^n}{f_{T_x}(T_x + T_o)}$$

(35)

após alguns rearranjos temos:

$$\frac{f_{T_x}}{f_{T_o}} = \frac{X^n}{K} \quad (36)$$

ao expressarmos a  $f_{T_x}$  como sendo  $(1-f_{T_o})$ , temos:

$$\frac{1-f_{T_o}}{f_{T_o}} = \frac{X^n}{K} \quad (37)$$

rearranjando temos:

$$1 = f_{T_o} \left( \frac{X^n}{K} + 1 \right) \quad (38)$$

Uma vez que a constante de dissociação  $K$  é a constante observada, e as moléculas de  $X$  se ligam com a mesma afinidade à proteína, temos que:

$$f_{T_o} = \frac{1}{1 + \left( \frac{X}{K_{OBS}} \right)^n} \quad (39)$$

Se o  $\Delta n_w$  total observado é dado pelo numero de moléculas de água que acompanham a transição  $T_o / T_x / R$  temos:

$$\Delta n_w^{obs} = f_{To} \cdot \delta n_w + f_{Tx} \cdot \Delta n_w \quad (40)$$

Substituindo na equação, temos:

$$\Delta n_w^{obs} = \left[ \frac{(\delta_w - \Delta n_w)}{1 + (X/K_{obs})^n} \right] + \Delta n_w \quad (41)$$



## IV - RESULTADOS

### 4.1) Análise Bioquímica da Hb desArg

A caracterização bioquímica da Hb desArg foi analisada por meio de eletroforese de hemoglobinas, eletroforese de cadeias, cromatografia em HPLC e espectrometria de massa.

A eletroforese de hemoglobinas: HbAo como controle e Hb desArg, foi feita nos pHs ácido (6,2) em gel de ágar, e alcalino (8,6) em fita de acetato de celulose, conforme apresentado na figura 9. Podemos observar que tanto na eletroforese ácida como na eletroforese alcalina, a amostra de Hb desArg migra mais para o pólo positivo do que a amostra original HbAo. Este fato pode ser explicado como consequência da perda de dois resíduos de arginina, com caráter positivo, deixando a Hb desArg com carga global mais negativa que a Ao e consequentemente fazendo com que esta Hb migre mais para o pólo positivo que a HbAo.



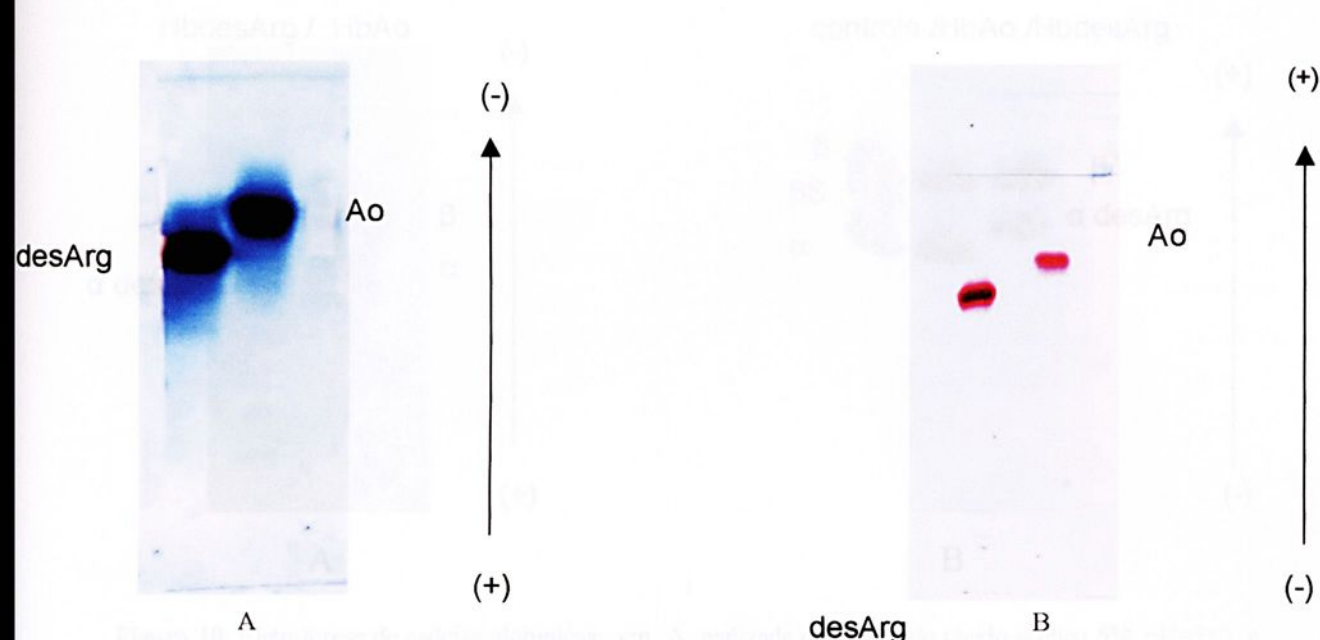


**Figura 9:** Eletroforese de hemoglobinas ácida (A), e alcalina (B). Em A, o tampão utilizado foi fosfato pH= 6,2 e corante Comassie Blue e em B, tampão TEB pH= 8,6, corado com corante Ponceau. Notamos que em A e B, as amostras desArg correm mais para o pólo positivo que aquelas Ao. As setas indicam a direção da migração das Hbs

A figura 10 mostra a eletroforese de cadeias realizada em pH ácido (A) e alcalino (B). Podemos observar a migração das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , para o pólo positivo. As cadeias  $\beta$  das Hbs Ao e desArg são idênticas e portanto tem o mesmo padrão de migração, enquanto que as cadeias  $\alpha$  migram de maneira diferente para o pólo positivo. A cadeia  $\alpha$  da Hb desArg migra mais para o pólo positivo que a cadeia  $\alpha$  da HbAo, devido à perda dos resíduos de arginina.

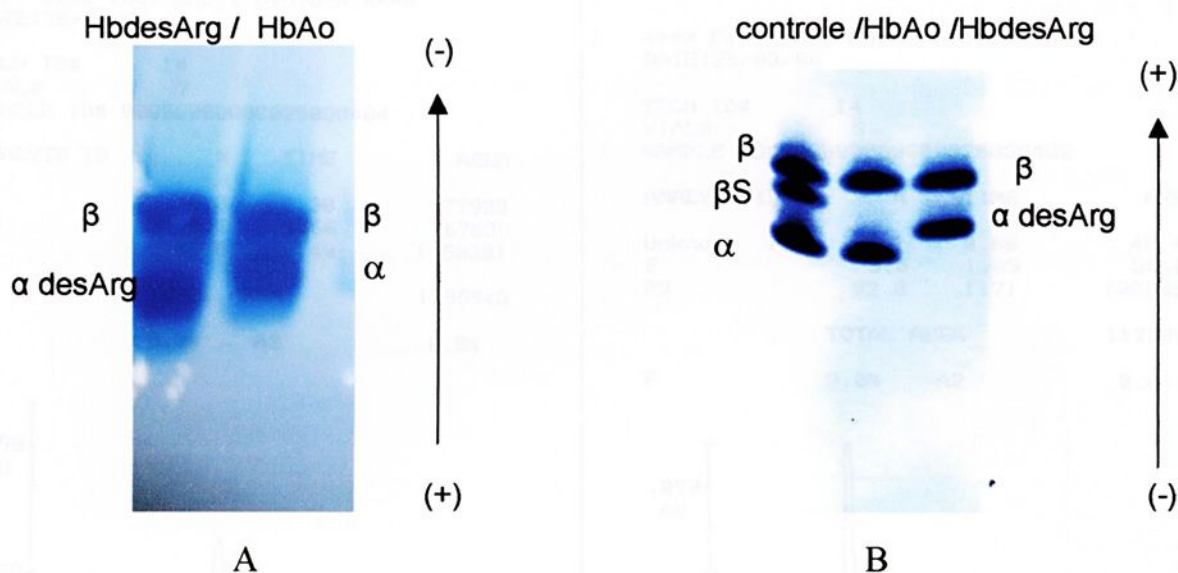


**Figura 10:** Eletroforese de cadeias globínicas: em A, realizada em pH ácido (ácido acético 5%, pH=5,0) e em B pH alcalino (tampão TEB pH=8,6) ambas eletroforeses realizadas na presença de uréia 8M e mercaptoetanol 1M. Na eletroforese alcalina, utilizamos como controle além da amostra Ao original, a Hb S. Podemos visualizar portanto a cadeia  $\beta$  da Hb S, indicada na figura como  $\beta S$ . As cadeias  $\beta$  das Hbs Ao e desArg são idênticas, enquanto que as cadeias  $\alpha$  apresentam diferenças na migração: a cadeia  $\alpha$  da Hb desArg corre mais para o pólo positivo que a cadeia  $\alpha$  da HbAo.

Nas análises feitas em HPLC, medimos primeiramente o perfil cromatográfico da HbAo, como controle, e em seguida o perfil cromatográfico da Hb desArg, preparada a partir da HbAo controle. Os cromatogramas são mostrados na figura 11. Notamos que a Hb desArg migra para a posição da fração acetilada (P3), fato que está de acordo com modificação da carga global da proteína, que fica com caráter mais negativo devido à perda dos dois resíduos de arginina. Esta migração ilustra a modificação da proteína.

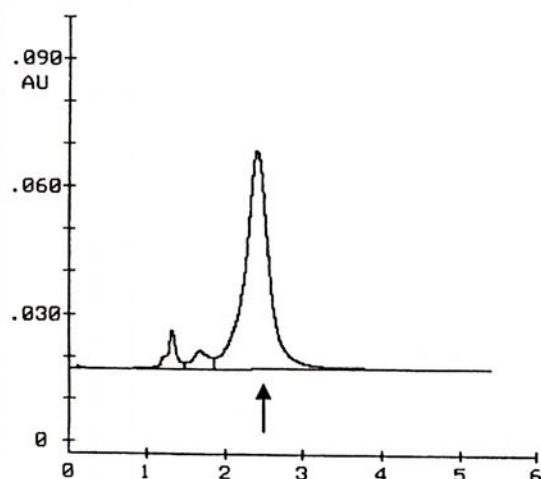
\*\*\*\* Beta Thal Short 01598-A \*\*\*\*  
DATE:25/03/04

TECH ID# 14  
VIAL# 7  
SAMPLE ID# 0000000000025030404

| ANALYTE ID | %    | TIME | AREA    |
|------------|------|------|---------|
| P2         | 6.0  | 1.30 | 77923   |
| P3         | 5.2  | 1.66 | 67639   |
| Ao         | 88.8 | 2.40 | 1150381 |

TOTAL AREA 1295943

F 0.0% A2 0.0%



**A**

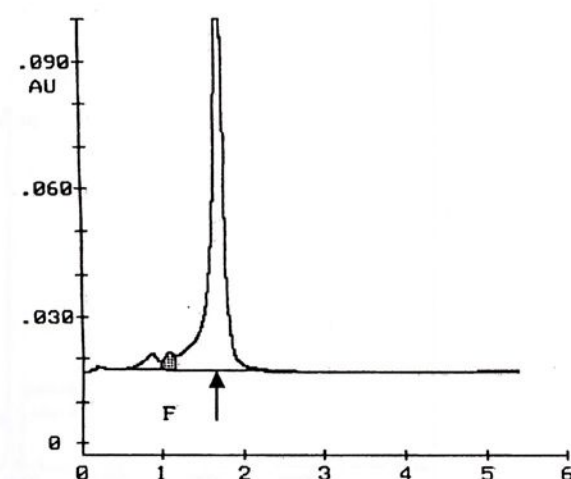
\*\*\*\* Beta Thal Short 01598-A \*\*\*\*  
DATE:25/03/04

TECH ID# 14  
VIAL# 5  
SAMPLE ID# 0000000000025030402

| ANALYTE ID | %    | TIME | AREA    |
|------------|------|------|---------|
| Unknown 1  | 4.1  | 0.88 | 48145   |
| F          | 3.0  | 1.09 | 36605   |
| P3         | 92.8 | 1.71 | 1088058 |

TOTAL AREA 1172808

F 3.0% A2 0.0%



**B**

**Figura 11:** A Perfil cromatográfico da HbAo. A Hb está dividida em 3 frações, já que contem além da maior parte em HbAo, (89%) porções de Hb glicosilada denominada P2 (6%) e acetilada, denominada P3, (5%).

**B** – Perfil cromatográfico da Hb desArg. A Hb teve todo o seu pico deslocado para a fração acetilada P3. As setas indicam o maior pico em cada amostra: em A, o maior pico está em 2,4 e em B é deslocado para 1,71

A Hb desArg foi ainda analisada por espectrometria de massa, afim de confirmar a perda dos resíduos de arginina. Os resultados estão representados na figura 12. As massas teóricas das cadeias de hemoglobina são: alfa 15126,38 Da e beta 15867,24 Da. Após passagem da amostra de Hb desArg

obteve-se, com os seguintes resultados: cadeia beta 15867,36 +/- 0,21 Da e cadeia alfa 14970,74 +/- 0,16 Da. Se subtrairmos as massas das cadeias alfa Ao e desArg, temos delta massa alfa:  $155,99 \pm 0,17$  Da. Uma vez que a massa do resíduo de arginina é 156,19 Da, podemos confirmar a perda das argininas.

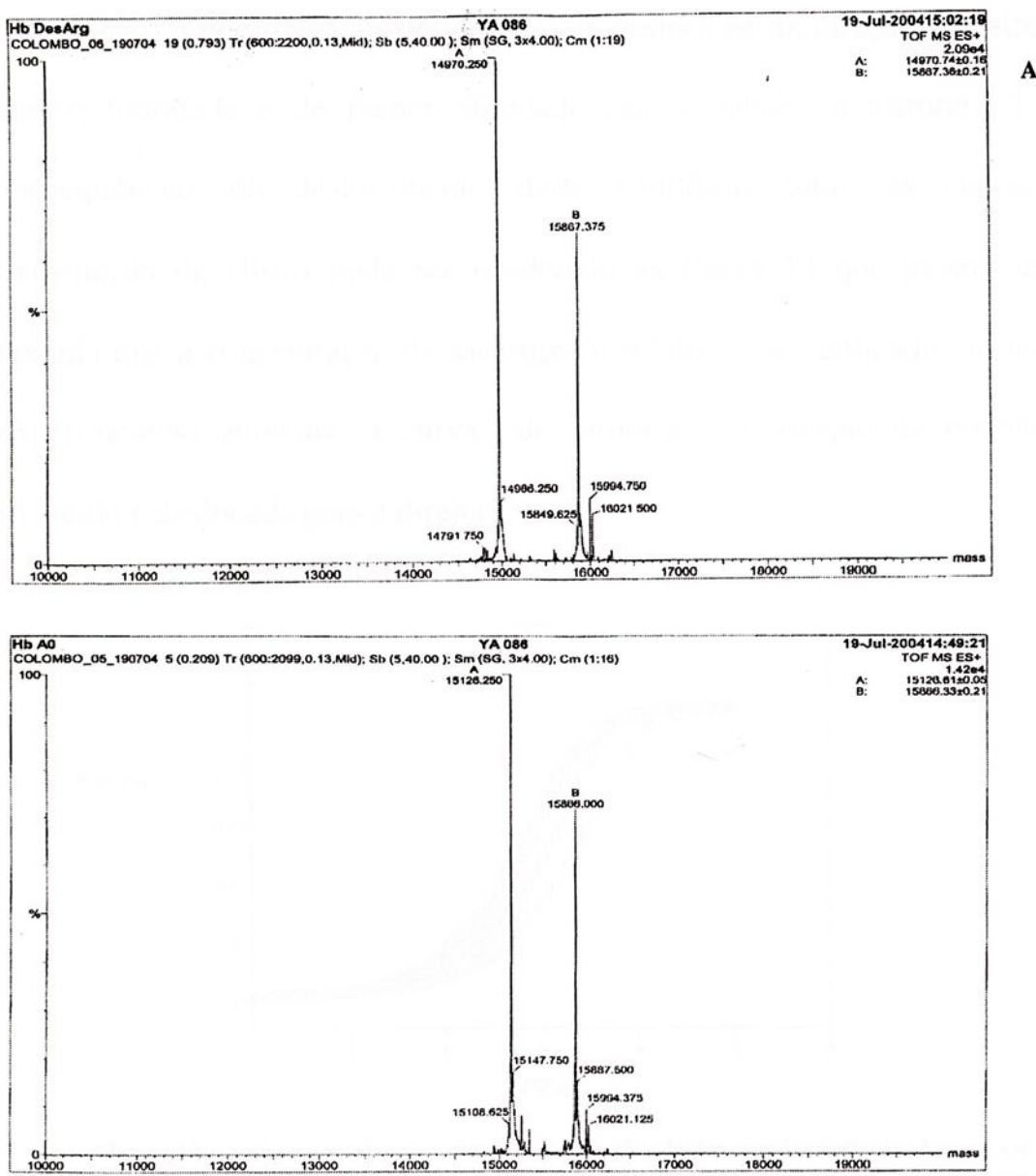


**Figura 12:**Espectro das amostras de HbAo (A) e Hb desArg (B), obtidos através de espectrômetro de massa. Podemos observar a diferença de valores para as cadeias alfa das duas hemoglobinas. Esta diferença de 155,99 Da coincide com o valor da massa do resíduo de arginina.



#### 4.2) Estabilização do estado alostérico T de alta afinidade por oxigênio

A afinidade da Hb pelo  $O_2$  é alterada pela atividade de água da solução: ao adicionar solutos neutros, e conseqüentemente diminuir a atividade de água da solução, o equilíbrio alostérico  $T \rightleftharpoons R$  desloca-se na direção da estrutura menos hidratada e de menor afinidade pelo oxigênio, a estrutura T. As conseqüências do deslocamento deste equilíbrio sobre as curvas de oxigenação da HbAo pode ser observado na figura 13 que mostra que à medida que a concentração de sacarose (o soluto neutro utilizado em nossos experimentos) aumenta, a curva de saturação em função da pressão de oxigênio é deslocada para a direita.

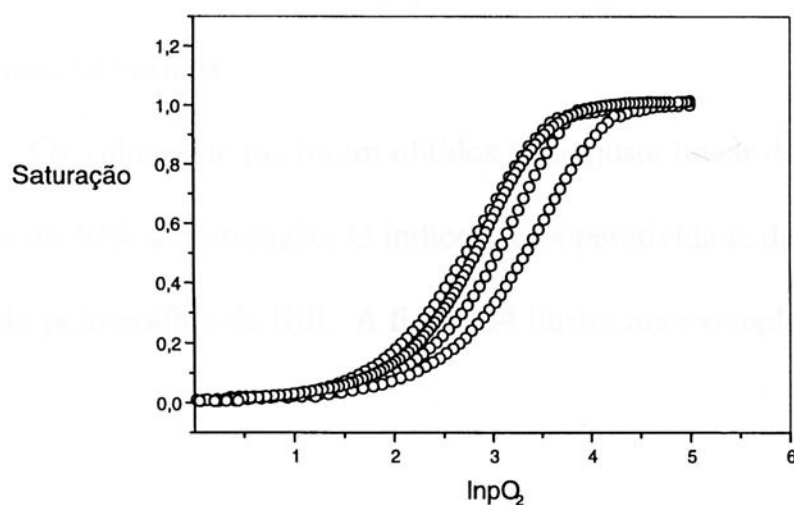


**Figura 13** – A figura mostra as curvas de oxigenação obtidas com hemoglobina bovina, em quatro diferentes concentrações de sacarose: da esquerda para direita: 0M, 0,3M, 0,5M e 0,8M. O deslocamento da curva para valores maiores de  $P_{50}$  ao aumentar a concentração de sacarose, está associado à diminuição da atividade de água, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T. As curvas foram obtidas na presença de tampão Hepes 10mM, a 25°C e pH 7,2.

O efeito da atividade de água na afinidade da Hb, analisado com a equação de *linkage* de Wyman (Wyman, J., 1964)

$$-4 \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \bigg|_{a_i} = (n_w^{oxi} - n_w^{desoxi}) = \Delta n_w$$

Fornece a diferença de hidratação entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb.

Mudanças no valor de  $\Delta n_w$  de oxigenação induzidas pela ligação de reguladores alostéricos como, por exemplo, o cloreto, indicam mudanças alostéricas na conformação da proteína.

Para investigar os efeitos da ligação de cloreto no equilíbrio alostérico das Hbs, determinamos  $\Delta n_w$  de oxigenação em diversas concentrações de NaCl, através de medidas de  $p_{50}$  à concentração de NaCl fixa e concentração de sacarose variada.

Os valores de  $p_{50}$  foram obtidos pelo ajuste linear do gráfico de Hill em torno de 50% de saturação. O índice de cooperatividade da Hb,  $n_H$  foi também obtido pelo gráfico de Hill. A figura 14 ilustra um exemplo de gráfico de Hill.



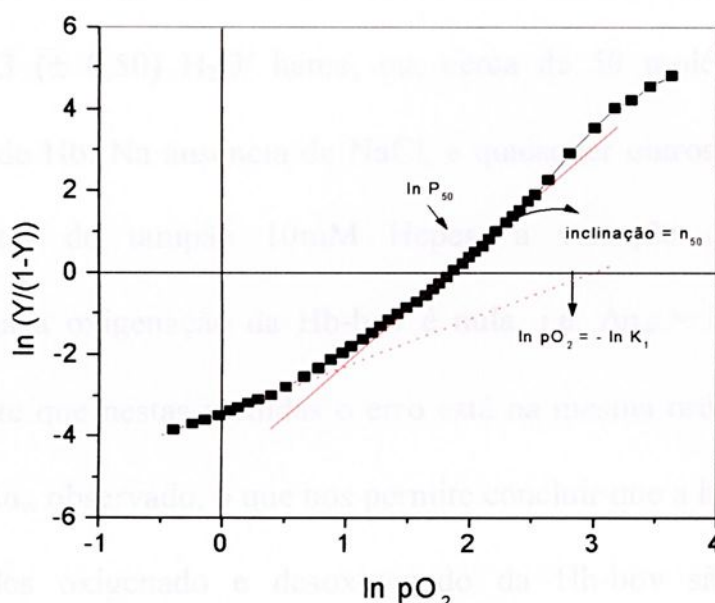


**Figura 14:** Gráfico de Hill para solução contendo Hb A<sub>o</sub> (60 μM heme), hepes 10Mm e 25° C. Os pontos obtidos são referentes ao processo de desoxigenação. O valor da afinidade ( $P_{50} = 6,48 \pm 0,32$  mm Hg) foi obtido da interseção deste gráfico com o eixo de  $\ln pO_2$  e a cooperatividade ( $n_{50} = 2,43 \pm 0,06$ ) foi calculada a partir da inclinação do mesmo. A extrapolação da reta que interpola a extremidade inferior do gráfico fornece o valor da constante de ligação da primeira molécula de  $O_2$  à Hb ( $K_1 = 0,048 \pm 0,0018$  mm Hg<sup>-1</sup>).

A figura 15 mostra gráficos da afinidade da Hb bov, medidos por  $p_{50}$ , em função da atividade de água determinados na ausência de NaCl (quadrados) e, na presença de 0,05M de NaCl (círculos) e 0,1 M de NaCl (triângulos).

Nota-se que o valor de  $\ln p_{50}$  varia linearmente com o  $\ln a_w$ , nas diferentes concentrações de NaCl. A partir da equação de *linkage*, a inclinação do gráfico de  $d(\ln p_{50})/d(\ln a_w)$  fornece os valores de  $\Delta n_w$  que acompanham a oxigenação da Hb em cada concentração de cloreto. O número de moléculas

de água que acompanha a oxigenação da Hb bovina na presença de 0,1M de NaCl é  $13 (\pm 0,50)$   $\text{H}_2\text{O}/\text{heme}$ , ou, cerca de 50 moléculas de água por molécula de Hb. Na ausência de NaCl, e quaisquer outros ânions que não os provenientes do tampão 10mM Hepes, a variação de hidratação que acompanha a oxigenação da Hb-bov é nula, i.é.  $\Delta n_w = 0,94 (\pm 1,39)$   $\text{H}_2\text{O}/\text{heme}$ . Note que nestas medidas o erro está na mesma ordem de grandeza do valor de  $\Delta n_w$  observado, o que nos permite concluir que a hidratação intrínseca dos estados oxigenado e desoxigenado da Hb-bov são equivalentes na ausência de ânions ligados. A ligação de cloreto à Hb-bov altera, além da mudança nos valores de  $\Delta n_w$  de oxigenação, a afinidade da proteína por oxigênio, os valores de  $p_{50}$  medidos estão na quadro 1.

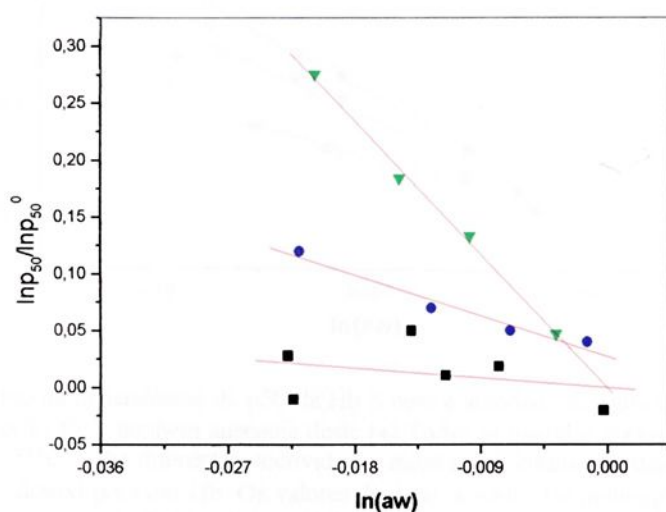


**Figura 15:** gráfico da dependência de  $p_{50}$  da Hb bovina com a atividade de água na ausência (■) e na presença de 50, (●) e 100 mM NaCl (▼) Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,2; 25°C. Os valores de  $\Delta n_w$ , a partir das inclinações são: na ausência de NaCl :  $3,76 (\pm 4,36)$  , na presença de 50mM:  $35,32 (\pm 10,48)$  e na presença de 100mM :  $51,98 (\pm 2,48)$

A figura 16 mostra gráficos da afinidade da Hb S, medidos por  $p_{50}$ , em função da atividade de água determinados na ausência de NaCl (círculos) e , na presença de 0,05M de NaCl (triângulos) e 0,1 M de NaCl (quadrados). Semelhante ao que acontece com as Hbs humana e bovina, dentro dessa faixa de concentração de cloreto, temos diferentes valores de  $\Delta n_w$  para a HbS. Na ausência de cloreto, a HbS apresenta valor de  $\Delta n_w$  igual a  $28 \pm 4,24$  H<sub>2</sub>O/Hb, e  $\Delta n_w = 76 \pm 5,44$  H<sub>2</sub>O/Hb em 0,1M de NaCl. Num valor intermediário de concentração de NaCl, 0,05M, o valor de  $\Delta n_w$  de oxigenação da HbS é intermediário e igual a  $62 (\pm 12,36)$  H<sub>2</sub>O/Hb.

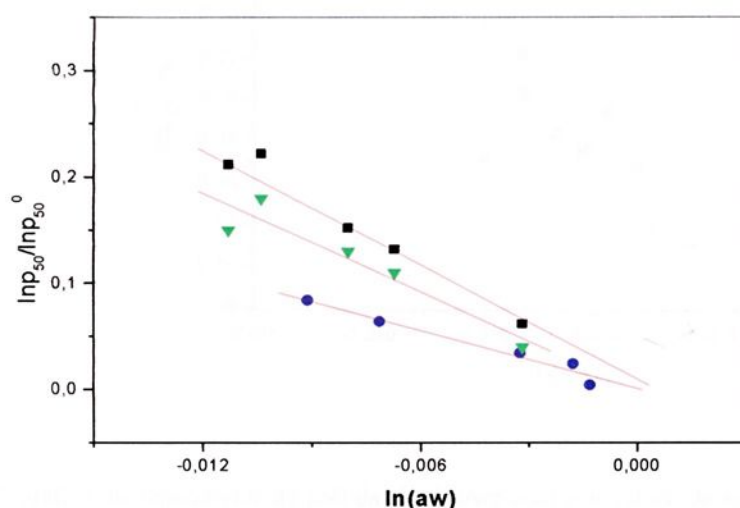


**Figura 16:** gráfico da dependência de  $p_{50}$  da Hb S com a atividade de água na presença de 100 mM NaCl (■) 50mM de NaCl (▼) e também ausência deste (●) Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,2; 25°C. As diferentes declividades mostram diferentes mudanças de hidratação associadas com a transição desoxi para oxi Hb. Os valores de  $\Delta n_w$ , a partir das inclinações são: na ausência de NaCl :  $28,2 (\pm 4,14)$ , na presença de 50mM  $61,96 (\pm 12,36)$  e na presença de 100mM :  $75,8 (\pm 5,44)$

A Hb desArg também apresentou diferentes inclinações para diferentes concentrações cloreto, como mostra a figura 17. Os valores das inclinações dos gráficos mostrados nesta figura resultam em valores de  $\Delta n_w$  de oxigenação de HbS iguais a  $36 \pm 4$ ,  $67 \pm 12$  e  $70 \pm 9$  H<sub>2</sub>O/Hb, medidos respectivamente, na ausência, em 0,05 M e em 0,1M de NaCl. Como nos casos anteriores a afinidade da Hb desArg por O<sub>2</sub> é maior na ausência que na presença de O<sub>2</sub>.

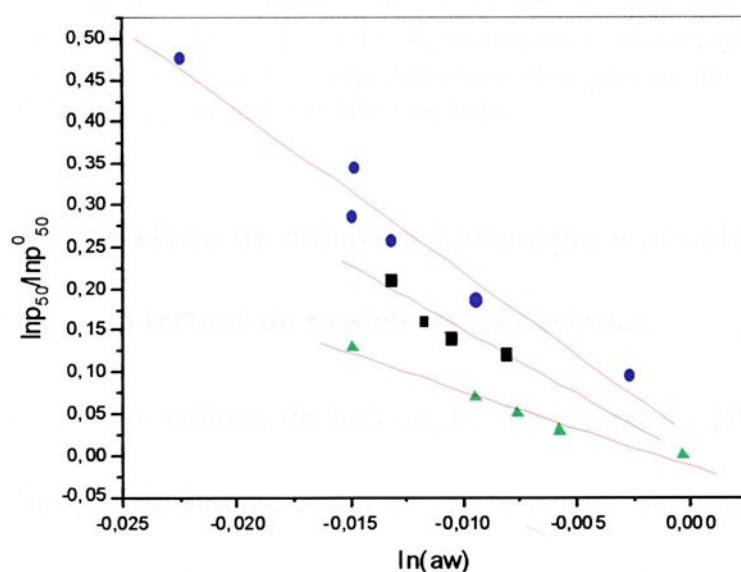


**Figura 17:** gráfico da dependência de p50 da Hb desArg com a atividade de água na presença de 100 mM NaCl (●), 50Mm de NaCl (■) e também ausencia deste (▲). Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,2; 25°C. Os valores de  $\Delta n_w$ , a partir das inclinações são: na ausência de NaCl :36 ( $\pm 4$ ), na presença de 50Mm 67( $\pm 12$ ) e na presença de 100mM : 70 ( $\pm 9$ )

| <i>Hb</i>     | $\delta n_w$<br>(0 NaCl) | $\Delta n_w$<br>(0,1MNaCl) | $K_x$<br>(mM) | $n_x$      | $p_{50}$<br>(0 NaCl) | $p_{50}$<br>(0,1MNaCl) |
|---------------|--------------------------|----------------------------|---------------|------------|----------------------|------------------------|
| <b>Ao</b>     | 25 ± 2                   | 72 ± 2.0                   | 10,6 ± 1,0    | 1,9 ± 0,3  | 2 mmHg               | 8 mmHg                 |
| <b>S</b>      | 28 ± 4                   | 76 ± 5                     | 12 ± 0,02     | 2,1 ± 0,4  | 1,78 mm Hg           | 9,5mm Hg               |
| <b>desArg</b> | 36 ± 4                   | 70 ± 9                     | 13 ± 0,06     | 1,7 ± 0,21 | 1,15 mmHg            | 3,2mmHg                |
| <b>Bov</b>    | 4 ± 4                    | 51 ± 2                     | 34 ± 0,02     | 2,4 ± 0,33 | 10mm Hg              | 16mm Hg                |

**Quadro 1:** Valores de  $\delta n_w$ , (número de moléculas de água que acompanha a oxigenação da Hb na ausência de ânions);  $\Delta n_w$  (número de moléculas de água que acompanha a oxigenação da Hb na presença de 0,1M de Cl<sup>-</sup>),  $K_x$  (constante de dissociação do Cl<sup>-</sup> à Hb),  $n_x$  (valor da estequiometria da reação) e  $p_{50}$  (pressão necessária para saturar 50% dos sítios de O<sub>2</sub>) em 0 e 0,1M de NaCl, para todas as Hbs estudadas.

#### 4.3) Análise do efeito de ânion na hidratação e afinidade das Hbs bovina, desArg e S em termos do modelo de três estados.

As mudanças dos valores de hidratação diferencial da HbAo humana induzidas pela ligação de ânions, como Cl<sup>-</sup>, DPG e IHP, sugeriram que estas variações se devem à mudanças conformacionais terciárias na conformação alostérica T, que existe em dois estados com afinidades distintas: um estado To, livre de ânions ligados, com afinidade e hidratação intrínsecas intermediárias, em relação às afinidades e hidratação medidas entre os estados T e R na presença de ânions (Colombo& Seixas 1999; Salvay, A G et al. 2003). Este modelo de três estados, descrito em Materiais e Métodos, foi



2003). Este modelo de três estados, descrito em Materiais e Métodos, foi utilizado para caracterizar o efeito da ligação preferencial de íons cloreto na variação de hidratação que acompanha a oxigenação das Hbs aqui estudadas.

A figura 18 mostra o gráfico dos valores de  $\Delta n_w$  de oxigenação da Hb bovina em função da concentração de NaCl. A linha continua passando pelos pontos experimentais representa o melhor ajuste da equação do modelo de três estados alostéricos da Hb, To, Tx e R, deduzida em Materiais e Métodos, aos dados experimentais. Esta equação (41) está representada novamente a seguir.

$$\Delta n_w^{obs} = \left[ \frac{(\delta_w - \Delta n_w)}{1 + (X/K_{obs})^n} \right] + \Delta n_w$$

Os parâmetros do ajuste desta equação são,  $K_{obs}$ , a constante de dissociação do íon cloreto ao estado T da Hb, e  $n$  a estequiometria da ligação. Como observado na figura 18 este modelo descreve bastante bem os dados experimentais. Os valores de  $K_{obs}$  e  $n$ , assim como de variação de hidratação nos patamares,  $\delta n_w$  e  $\Delta n_w$ , que correspondem a diferença de hidratação entre os estados oxi-R e deoxi-To e oxi-R e deoxi-Tx, respectivamente, estão mostrados na Quadro 1. As quantificações dos valores de  $\Delta n_w$  em cada uma das concentrações de cloreto, para cada hemoglobina estão apresentadas no apêndice A.



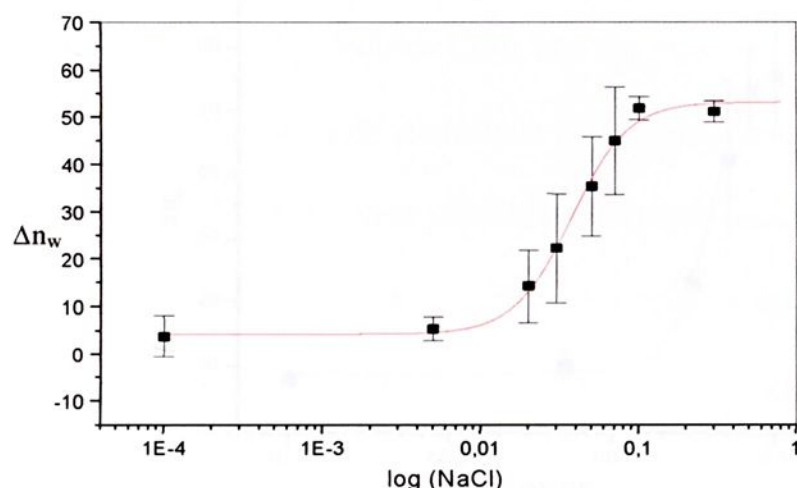


**Figura 18:** Gráfico mostrando a variação de  $\Delta n_w$  com a concentração de NaCl na hemoglobina bovina. Na ausência de NaCl, o  $\Delta n_w = 4 (\pm 4)$  e na presença de 300mM de NaCl, o  $\Delta n_w = 51 (\pm 2)$ . Os parâmetros encontrados são  $K = 34\text{mM}$ , constante de equilíbrio para a ligação de Cl e  $n = 2.44$ .

As figura 19 e 20 mostram, respectivamente, os gráficos dos valores de  $\Delta n_w$  de oxigenação da HbS e Hb desArg, em função da concentração de NaCl. O comportamento funcional, observado nestes gráficos, é semelhante ao observado para Hb bovina. As linhas contínuas passando pelos pontos experimentais reapresentam, como anteriormente, o melhor ajuste do modelo de três estados aos dados experimentais. O valor dos parâmetros ajustados são dados no Quadro 1.

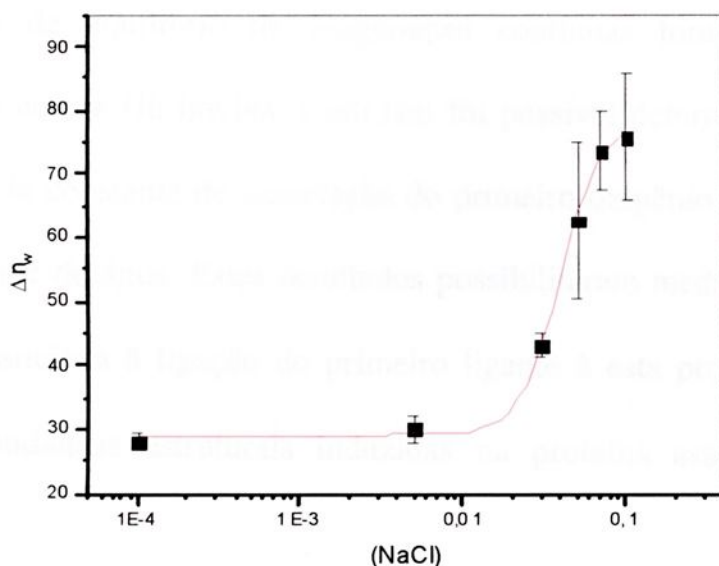


**Figura19 :** Gráfico mostrando a variação de  $\Delta n_w$  com a concentração de NaCl na hemoglobina S. O  $\Delta n_w$  varia de 28 ( $\pm 4$ ), na ausência de NaCl até 76 ( $\pm 5$ ). Os parâmetros encontrados são  $K= 12\text{mM}$ , constante de equilíbrio para a ligação de  $\text{Cl}^-$  à desoxi e  $n=2,1$

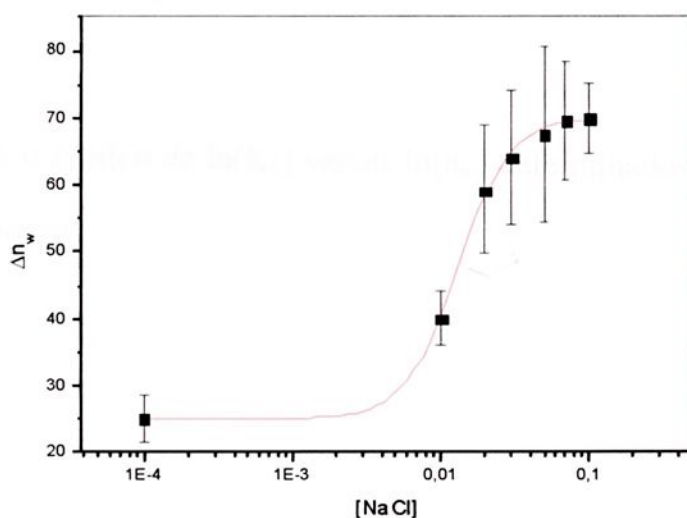


**Figura 20:** Gráfico mostrando a variação de  $\Delta n_w$  com a concentração de NaCl na hemoglobina desArg. O  $\Delta n_w$  varia de 25 ( $\pm 4$ ) na ausência de NaCl até 70 ( $\pm 9$ ). Os parâmetros encontrados são  $K= 13\text{mM}$ , constante de equilíbrio para a ligação de  $\text{Cl}^-$  à desoxi e  $n = 1,70$ .

Curvas de equilíbrio de oxigenação contínuas foram obtidas nos experimentos com a Hb bovina. Com isto foi possível determinar também a dependência da constante de associação do primeiro oxigênio à proteína ( $K_1$ ) com a atividade de água. Estes resultados possibilitaram medir a variação de hidratação associada à ligação do primeiro ligante à esta proteína,  $\Delta n_{wK1}$ , e sondar as mudanças estruturais induzidas na proteína associadas à este processo.

A variação de hidratação associada à ligação do primeiro oxigênio foi calculada pela equação:

$$\frac{d \ln K_1}{d \ln a_w} = \Delta n_{wK1} \quad (42)$$

A figura 21 mostra o gráfico de  $\ln(K_1)$  versus  $\ln(a_w)$  determinados em diversas concentrações de NaCl.

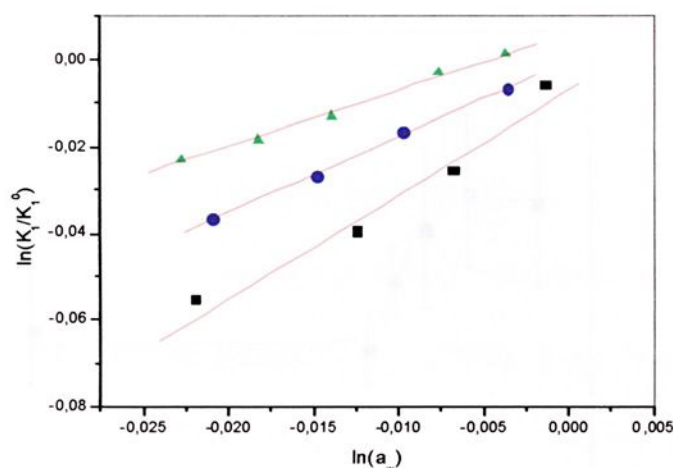


**Figura 21:** gráfico da dependência de  $K_1$  da Hb bovina com a atividade de água na presença de 100 mM NaCl (■); 50 mM de NaCl (●) e também ausência deste (▲). Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10 mM, pH 7,2; 25°C. Os valores de  $\Delta n_w$ , a partir das inclinações são: na ausência de NaCl :  $2 \pm 2$ , na presença de 50 mM :  $6 \pm 2$  e na presença de 100 mM :  $7 \pm 2$

A partir deste gráfico, obtemos os valores de  $\Delta n_w$  que acompanham a ligação do primeiro oxigênio a Hb bov, demonstrados na figura 22. A linha contínua representa o melhor ajuste com o modelo de 3 estados. Os parâmetros do melhor ajuste são  $K=33$  mM e  $n=3,62$ . As quantificações dos valores de  $\Delta n_w$  em cada uma das concentrações de cloreto, estão apresentadas no apêndice A.

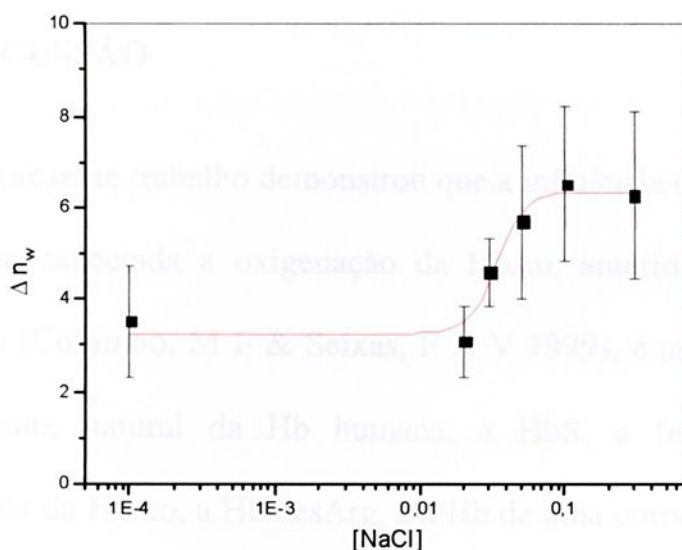


**Figura 22:**Gráfico mostrando a variação de  $\Delta n_w$  que acompanha a ligação do primeiro oxigênio, com a concentração de NaCl na hemoglobina bovina. Na ausência de NaCl, o  $\Delta n_w = 2 (\pm 2)$  e na presença de 300mM de NaCl, o  $\Delta n_w = 6 (\pm 3)$

Pela figura observamos que o número de moléculas de água associada também é dependente da concentração de cloreto, já que a diferença nos valores  $\Delta n_{wK1}$  com o aumento da concentração de ânions acontece já na ligação da primeira molécula de oxigênio à proteína. Este fato sugere que pequenas mudanças conformacionais de ordem terciária ocorrem com a ligação do primeiro ligante na presença de NaCl.

#### IV –DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a influência de NaCl na variação de hidratação associada a oxigenação da HbAo, anteriormente observada por Colombo (Colombo, M F & Seixas, F A V 1999), é um fenômeno comum a um mutante natural da Hb humana, a HbS, a forma enzimaticamente modificada da HbAo, a Hb desArg, e à Hb de uma outra espécie, a Hb bovina. Um aspecto notável é a demonstração que a Hb bovina, assim como as espécies humanas, também apresenta três estados alostéricos, sendo dois relativos à conformação quaternária T. Hbs de ruminantes apresentam menor afinidade por oxigênio que as espécies humanas, e sua afinidade por O<sub>2</sub> é regulada exclusivamente por íons cloreto (Fronticelli, C et al. 1984), enquanto para as espécies humanas a regulação da oxigenação se deve principalmente ao fosfato orgânico, 2,3-DPG. O fato de o íon cloreto regular o equilíbrio entre dois estados alostéricos T distintos em Hbs de duas espécies, sugere a existência de um mecanismo comum de regulação do transporte de oxigênio por estes ânions, que ultrapassou a barreira das espécies. Este mecanismo pode inclusive ser comum a Hemoglobinas tetraméricas de outras espécies mais distantes, como peixes e serpentes (Peres, P., et al., 2004).



Os dados mostrados no Quadro 1 mostram que as Hbs investigadas apresentam máxima afinidade por oxigênio na ausência de NaCl. Nesta condição, a diferença de hidratação  $\delta n_w$  entre os estados oxi-R e deoxi-To, é também a menor observada para as três Hbs. A ligação de cloreto à forma quaternária T, estabiliza o estado Tx de menor afinidade e menor hidratação intrínsecas que as do estado To. Como consequência, a afinidade das Hbs por oxigênio diminui, enquanto a variação de hidratação associada à oxigenação destas Hbs aumenta para seus valores máximos. Estes dados sugerem uma correlação entre a energia livre de oxigenação destas Hbs, medidas por  $p_{50}$  e dada por  $\Delta G_{ox} = 4.RT.\ln(p_{50})$ , e a extensão da mudança alostérica durante a oxigenação, medidas por  $\Delta n_w$ . Este resultado, embora esperado, não havia sido demonstrado anteriormente.

Este trabalho também demonstrou que a ligação da primeira molécula de oxigênio à Hb bovina é seguida por uma pequena mudança de hidratação, cuja magnitude também é afetada pela presença de NaCl. Isto sugere que pequenas mudanças conformacionais de ordem terciária ocorrem com a ligação do primeiro ligante na presença de NaCl. Este efeito também foi observado na hemoglobina humana HbAo em estudos anteriores de nosso laboratório. Entretanto, as mudanças de hidratação associadas à ligação do primeiro ligante a HbAo são muito mais significativas: ficou estabelecido que



$52 \pm 2$  moléculas de água ligam-se ao tetrâmero de hemoglobina com a ligação da primeira molécula de  $O_2$  na presença de NaCl, sendo que com a ligação dos quatro oxigênios temos cerca de 70 moléculas de água (Colombo, M. F. & Seixas, F. A., 1999). Para a Hb bovina este valor é de aproximadamente 6  $H_2O$  com a ligação do primeiro  $O_2$  comparado com cerca de 50  $H_2O$  que acompanham a saturação total da proteína.

A diferença de hidratação entre os estados To/R, Tx/R, muda com a espécie protéica investigada (0/50  $H_2O$  p/Hb bov, 25/72 / Hb humana e 28/76 p/HbS, 36/70/ Hb desArg). Observa-se que a mutação da HbS ( $\beta 6\text{glu} \rightarrow \text{val}$ ) na superfície da Hb, e a supressão de dois resíduos de Arg no C-terminal das cadeias alfa não alteram substancialmente a estrutura da HbAo. Comparando as diferenças de hidratação da Hb bovina com aquelas determinadas com a Hb humana, nota-se uma diferença significativa. Muito provavelmente estas diferenças estão associadas ao efeito das mutações de resíduos nas cadeias beta ou na entrada da cavidade central sobre a estrutura da proteína, que são bastante diferentes entre a Hb-bov e Hb humana. Em ambos os casos, a carga da proteína nesta região se altera influenciando a área de superfície protéica exposta ao solvente.

Outro aspecto a ser notado é que mudanças de hidratação estão associadas a mudanças na afinidade intrínseca da desoxiHb por  $O_2$ . Isto sugere



que mudanças terciárias na estrutura quaternária T, moduladas por ânions, atuam em conjunção à transição quaternária T-R na regulação da ligação cooperativa de oxigênio a Hb destas diferentes espécies.

### **5.1) Sobre o sítio de ligação de cloreto à Hb.**

Um dos objetivos de nossos estudos foi investigar a presença de possíveis sítios de ligação de cloreto à Hb. Os experimentos com Hb desArg foram, principalmente, planejados com este objetivo.

A Hb desArg apresentou valores de  $p_{50}$  menores que os apresentados pela HbA, o índice de cooperatividade também é muito menor ficando em torno de 1,25, quando a HbA tem este valor em cerca de 2,3. Estes resultados confirmam dados da literatura e indicam uma afinidade muito alta desta Hb ao oxigênio. Sugere-se que este aumento de afinidade ocorre porque a perda das argininas 141 desfaz importantes pontes salinas, responsáveis pela estabilização da estrutura T, favorecendo o deslocamento do equilíbrio alostérico para o estado R (Bonaventura, J., et al., 1974, Antonini, E., et al., 1961, Ho, C., 1982). Experimentos realizados na presença de 50  $\mu\text{M}$  de IHP (resultados não mostrados), mostram que a Hb desArg volta a apresentar um valor de cooperatividade em torno de 2,5, próximo àquele apresentado pela HbAo. Neste caso o IHP se liga fortemente à entrada da cavidade central da Hb, formado pelas cadeias  $\beta$  e no lado oposto do C-terminal das cadeias  $\alpha$ .



Com isto, a conformação quaternária T é estabilizada, diminuindo a afinidade por O<sub>2</sub> e aumentando a cooperatividade de ligação. Estes resultados também se encontram em acordo com dados da literatura (Bonaventura, J., et al., 1972, Imai, K., 1982)

Estudos funcionais realizados por Kilmartin. (Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L., 1971) sugeriram as Arg 141 $\alpha$  como sítio de ligação de íons cloreto na Hb. Estudos cristalográficos posteriores, realizados por Hui e colaboradores (Hui, H. L., et al., 1999) baseados na comparação da estrutura da HbAo com a estrutura de Hb( $\alpha$ +M), que tem um resíduo de metionina a mais, ligado a Arg-141 da cadeia  $\alpha$ , sugerem a mesma coisa. Mais recentemente, a comparação entre as estruturas de cristais de desoxi-Hb cristalizados na completa ausência e na presença de NaCl, indicaram que além das Arg-141 $\alpha$ , os resíduos Arg-92 $\alpha$ , são potenciais sítios de ligação de Cl<sup>-</sup>.

Considerando estas evidências a hipótese a ser testada seria se a supressão da Arg-141 $\alpha$  alteraria tanto a influência de íons cloreto em  $\Delta n_w$  de oxigenação da Hb, quanto a constante de ligação e a estequiometria de ligação de íons cloreto a Hb. Não foi isto o observado.

Os valores de constante de ligação do Cl<sup>-</sup> a HbAo e HbdesArg, determinados a partir dos ajustes de  $\Delta n_w$  versus [NaCl] foram, respectivamente  $10 \pm 1$  mM e  $13 \pm 0,06$  mM, e os valores de estequiometria



foram 2 e 1,7. Estes valores são muito próximos, e considerando os erros experimentais, ele indicam que a Arg-141 $\alpha$  não deve ser a responsável pela mudança nos valores de hidratação e afinidade intrínsecas da conformação quaternária desoxi-T da Hb. Fica então em aberto a possibilidade que a mudança de estados To / Tx esteja associado à ligação do Cl<sup>-</sup> aos os resíduos Arg-92 $\alpha$ . É interessante notar que mutantes naturais com alteração nestes resíduos, Hb Cheesapeake e Hb Cape Town, são espécies de alta afinidade por O<sub>2</sub>.

Os parâmetros de ligação de Cl<sup>-</sup> à Hb bovina,  $K = 38$  mM e  $n_x = 2.44$ , mostram que este íon tem menor afinidade pela Hb bov que pela Hb humana ( $K = 10$  mM), enquanto a estequiometria de ligação é um pouco maior para a Hb bov que para a humana. Estes resultados encontram-se em concordância com outros valores determinados na literatura (Razynska, A., et al., 1990), e eventualmente refletem a perda de 4 cargas positivas na entrada da cavidade central na Hb bov em relação à Hb humana. As cadeias  $\alpha$  da Hb bovina são bastante similares, e preservam as Arg-92 e 141. Estes resultados não resolvem a questão persistente na literatura quanto à existência ou não de sítios específicos de regulação da oxigenação da Hb por íons cloreto.



## VI – CONCLUSÕES

Nossos resultados com as Hbs bovina e HbS demonstram que, em uma determinada faixa de concentração de cloreto, as Hbs apresentam um comportamento semelhante ao observado para a humana. Determinando o valor de  $\Delta n_w$  que acompanha a mudança do equilíbrio oxi-desoxi das Hbs em diferentes concentrações de cloreto, pudemos caracterizar este comportamento. Juntos, esses resultados sugerem que Hbs de várias espécies possam assumir dois estados alostéricos T distintos, cujo equilíbrio é regulado pela ligação de ânions. Na ausência de ânions, a forma desoxi da hemoglobina se estabiliza em uma conformação alostérica com superfície de hidratação e afinidade por  $O_2$  intermediária às T e R. Esta conformação conhecida como estado  $T_o$  foi primeiramente observada por Colombo e Seixas (1999) em experimentos com hemoglobina humana e posteriormente confirmada por outros autores.

Da mesma maneira que acontece com a Hb humana, a caracterização do efeito de água ao longo do aumento da concentração de cloreto em solução, pode ser ajustado pela equação que considera o equilíbrio entre os três estados  $T_x / T_o / R$ .



Com base em todos os argumentos descritos, sugerimos que este estado intermediário, To, é também energeticamente acessível a outras hemoglobinas tetraméricas, além da humana.

A Hb desArg, mostrou valores de constante de ligação e estequiometria semelhantes àqueles apresentados pela Hb humana. Dessa forma, podemos concluir que os íons cloreto não estariam associados diretamente à essas argininas 141 $\alpha$ , levando-nos a sugerir que os possíveis sítios de ligação seriam as argininas 92



## REFERÊNCIAS

- ADAIR, G. (1925). "The Hemoglobin System.VI. The Oxygen Dissociation Curve Of Hemoglobin.." Journal of Biological Chemistry **63**(2).529-545
- ALTER, B. P., et al. (1980). "Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G gamma/A gamma ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis." Br J Haematol **44**(4): 527-34.,
- ANTONINI, E., et al. (1961). "Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobin." J Biol Chem **236**: PC60-PC63.
- ANTONINI, E. e. BRUNORI, M. (1971). Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam.
- BALDWIN, J. M. (1975). "Structure and function of haemoglobin." Prog Biophys Mol Biol **29**(3): 225-320.
- BENESCH, R. E., et al. (1973). "Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures." Anal Biochem **55**(1): 245-8.
- BERG, J. M. T., JOHN L.; STRYER, LUBERT. (2002.). Biochemistry. New York, W. H. Freeman and Co.
- BONAVENTURA, J., et al. (1974). "Functional properties of carboxypeptidase-digested hemoglobins." J Mol Biol **82**(4): 499-511.
- BONAVENTURA, J., et al. (1972). "Partial restoration of normal functional properties in carboxypeptidase A-digested hemoglobin." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2174-8.
- BRUNO, S., et al. (2001). "High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin." Protein Sci **10**(11): 2401-7.
- CAON FILHO, O. (1997). Determinação de curvas de equilíbrio de oxigenação de hemoglobinas em soluções viscosas usando uma cela



espectropolarimétrica modificada. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.: 87.

CHIANCONE, E., et al (1972). "Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of chloride binding to human oxy- and deoxyhaemoglobin." J Mol Biol **70**(3): 675-88.

CHIANCONE, E., et al. (1975). "Identification of chloride-binding sites in hemoglobin by nuclear-magnetic-resonance quadrupole-relaxation studies of hemoglobin digests." Eur J Biochem **55**(2): 385-90.

COLOMBO, M. F., BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. (1996). "The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions." J Biol Chem **271**(9): 4895-9.

COLOMBO, M. F., et al. (1992). "Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin." Science **256**(5057): 655-9.

COLOMBO, M. F., et al. (1994). "Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allostery." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10517-20.

COLOMBO, M. F. , SANCHES R. (1990). "Hydration-dependent conformational states of hemoglobin. Equilibrium and kinetic BEHAVIOR." BIOPHYS CHEM **36**(1): 33-9.

COLOMBO, M. F. , SEIXAS F. A. V.(1999). "Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on O(2) binding." Biochemistry **38**(36): 11741-8.

DOMINGOS, C. R. B. (2003). Protocolos de metodologias Laboratoriais Clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias.

ENGLANDER, J. J., , et al. (1998). "Energetic components of the allosteric machinery in hemoglobin measured by hydrogen exchange." J Mol Biol **284**(5): 1695-706.

FOLK, J. E., et al. (1960). "Carboxy-peptidase B. 4. Purification and characterization of the porcine enzyme." J Biol Chem **235**: 2272-7.



- FRONTICELLI, C., BUCCI, E. (1994). "Conformational and functional characteristics of bovine hemoglobin." Methods Enzymol **231**: 150-63.
- FRONTICELLI, C., et al. (1984). "Solvent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. Sensitivity of bovine hemoglobin to chloride ions." J Biol Chem **259**(17): 10841-4.
- FRONTICELLI, C., et al. (1995). "Allosteric modulation by tertiary structure in mammalian hemoglobins. Introduction of the functional characteristics of bovine hemoglobin into human hemoglobin by five amino acid substitutions." J Biol Chem **270**(51): 30588-92.
- GARRETT, R. H., GRISHAM, C. M. (1995). Biochemistry: Enzyme specificity and allosteric regulation. Orlando, Saunders College Publishing.
- HILL, A. V. (1913). "The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide." Biochem. J v. **7**: 471-480.
- HO, C. (1982). Hemoglobin and oxygen binding. New York, Elsevier Biomedical.
- HUI, H. L., et al. (1999). "Structural and functional properties of human hemoglobins reassembled after synthesis in *Escherichia coli*." Biochemistry **38**(3): 1040-9.
- IKEDA-SAITO, M. (1980). "Studies on cobalt myoglobins and hemoglobins. The effect of the removal of the alpha-141 arginine residue on the functional and electronic properties of iron-cobalt hybrid hemoglobins." J Biol Chem **255**(18): 8497-502.
- IMAI, K. (1981). "Analysis of ligand binding equilibria." Methods Enzymol **76**: 470-86.
- IMAI, K. (1981). "Measurement of accurate oxygen equilibrium curves by an automatic oxygenation apparatus." Methods Enzymol **76**: 438-49.
- IMAI, K. (1982). Allosteric effects in haemoglobin. Cambridge, University Cambridge Press.



- IMAZUMI, K., et al. (1979). "The linkage between the four-step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin." J Biochem (Tokyo) **86**(6): 1829-40.
- JORDAN, J. A., E.; BERGER, R. L (1956). "Polarographic coefficients of oxygen defined by activity gradients in viscous media." J. Phys. Chem **78**: 2979-2981.
- JOSHI, A. A., MCDONALD M. J. (1994). "Role of alpha and beta carboxyl-terminal residues in the kinetics of human oxyhemoglobin dimer assembly." J Biol Chem **269**(11): 8549-53.
- KAVANAUGH, J. S., et al. (1995). "Structure and oxygen affinity of crystalline desArg141 alpha human hemoglobin A in the T state." J Mol Biol **248**(1): 136-50.
- KILMARTIN, J. V. (1981). Removal of Specific C-terminal residues from human hemoglobin using carboxypeptidases A and B. Methos in Enzymology. L. R.-B. Eraldo Antonini, Emilia Chiancone, Academic PRESS. **76**: 167-171.
- KILMARTIN, J. V., et al. (1980). "Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin." Biochemistry **19**(14): 3189-83.
- KILMARTIN, J. V. , ROSSI-BERNARDI. L. (1971). "The binding of carbon dioxide by horse haemoglobin." Biochem J **124**(1): 31-45.
- LAEMMLI, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- LESK, A. M., et al. (1985). "Haemoglobin: the surface buried between the alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 2 dimers in the deoxy and oxy structures." J Mol Biol **183**(2): 267-70.
- MARTA, M., et al. (1998). "Anionic binding site and 2,3-DPG effect in bovine hemoglobin." Biochemistry **37**(40): 14024-9.
- MATHEWS, C. K. ,VAN HOLDE, K E (2000). Biochemistry. New Jersey, Prentice-Hall Inc.



- MOCK, W. L. , D. J. STANFORD (2002). "Anisylazoformylarginine: a superior assay substrate for carboxypeptidase B type enzymes." Bioorg Med Chem Lett **12**(8): 1193-4.
- MONOD, J., ET AL. (1965). "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model." J Mol Biol **12**: 88-118.
- NAGEL, R. L., CHANG H. (1981). "Methods for the study of sickling and hemoglobin S gelation." Methods Enzymol **76**: 760-92.
- PERUTZ, M. F., et al. (1993). "A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin." J Mol Biol **233**(3): 536-45.
- PERUTZ, M. F., et al. (1994). "The chloride effect in human haemoglobin. A new kind of allosteric mechanism." J Mol Biol **239**(4): 555-60.
- PERES,P et al. (2004) "Allosteric water and phosphate effects in *Hoplosternum littorale* hemoglobins" Eur J Biochem. 271(21):4270-4
- RAZYNSKA, A., et al. (1990). "Effect of temperature on oxygen affinity and anion binding of bovine hemoglobin." Biophys Chem **38**(1-2): 111-5.
- RIGGS, A. (1981). "Preparation of blood hemoglobins of vertebrates." Methods Enzymol **76**: 5-29.
- RIGGS, A. F. , WOLBACH R. A. (1956). "Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin." J Gen Physiol **39**(4): 585-605.
- ROSSI-FANELLI, A. , ANTONINI E. (1958). "Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin." Arch Biochem Biophys **77**(2): 478-92.
- SALVAY, A. G., et al. (2003). "The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin." Biophys J **84**(1): 564-70.



- SCHNEIDER, R. G. (1974). "Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins--such as S, D, G, and P; or A2, C, E, and O--by electrophoresis of the globin chains." Clin Chem **20**(9): 1111-5.
- SEIXAS, F. A., et al. (1999). "Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A(0) fully stripped of any anions." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(11): 1914-6.
- SEIXAS, F. A. V. (2002). INfluência De Cloreto, 2,3dpg, Atp E Ihp Na Estrutura E Função Das Hbs Humana E Bovina. Estudos Termodinâmicos E Cristalográficos. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.: 135.
- SHIBAYAMA, N., SAIGO S. (1995). "Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels." J Mol Biol **251**(2): 203-9.
- SILVA, M. M., et al. (1992). "A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution." J Biol Chem **267**(24): 17248-56.
- STRYER, L. (1996). Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- TINOCO JUNIOR, I.; SAUER, K. W., (1995). Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences. New Jersey, Prentice - Hall.
- VAN HOLDE, K. E. J., (1998). Principles of physical biochemistry. New Jersey, Prentice-Hall Inc.
- VOET, D.; VOET, J. C. (1995) Biochemistry. 2.ed. Toronto: John Wiley & Sons,. p.215-250.
- WATOWICH, S. J., et al. (1989). "Intermolecular contacts within sickle hemoglobin fibers." J Mol Biol **209**(4): 821-8.
- WILHELM, E. B., R.; WILCOCK, R. J. (1977). "Low - pressure solubility of gases in liquid water." Chem. Rev.
- WILLIAMS, R. C. T., K (1973). "A convenient chromatographic method for the preparation of human hemoglobin." Anal. Biochem. v. **54**: 137-145.



WYMAN, J., Jr. (1964). "Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look." Adv Protein Chem **19**: 223-86.



**APÊNDICE A**

**Valores de  $\Delta n_w$  obtidos em diferentes concentrações de NaCl para as três hemoglobinas estudadas.**

**1 – HEMOGLOBINA BOVINA**

| [NaCl]M | $\Delta n_w$ | erro     |
|---------|--------------|----------|
| 0       | 3            | $\pm 4$  |
| 0,005   | 5            | $\pm 2$  |
| 0,02    | 15           | $\pm 6$  |
| 0,03    | 22           | $\pm 11$ |
| 0,05    | 35           | $\pm 10$ |
| 0,07    | 45           | $\pm 11$ |
| 0,1     | 52           | $\pm 2$  |
| 0,3     | 51           | $\pm 2$  |

**Tabela 1:** Valores de  $\Delta n_w$  obtidos em diferentes concentrações de NaCl.

**2 – HEMOGLOBINA S**

| [NaCl] M | $\Delta n_w/\text{Tetramero}$ | erro        |
|----------|-------------------------------|-------------|
| 0        | 28                            | $\pm 4,14$  |
| 0,005    | 30                            | $\pm 2,05$  |
| 0,03     | 43                            | $\pm 1,73$  |
| 0,05     | 62                            | $\pm 12,36$ |
| 0,07     | 74                            | $\pm 6$     |
| 0,1      | 76                            | $\pm 10,04$ |

**Tabela 2:** Valores de  $\Delta n_w$  obtidos em diferentes concentrações de NaCl, para HbS.



3 – HEMOGLOBINA DESARG

| [NaCl]M | $\Delta n_w$ /Tetramero | erro |
|---------|-------------------------|------|
| 0       | 36                      | 4    |
| 0,01    | 39                      | 8    |
| 0,02    | 59                      | 10   |
| 0,03    | 64                      | 10   |
| 0,05    | 67                      | 13   |
| 0,07    | 69                      | 9    |
| 0,1     | 70                      | 5    |

Tabela 3: Valores de  $\Delta n_w$  obtidos em diferentes concentrações de NaCl, para HbdesArg

4 – HEMOGLOBINA BOVINA VALORES DE  $K_1$

| [NaCl]M | $\Delta n_w$ | erro |
|---------|--------------|------|
| 0       | 2            | 2    |
| 0,005   | 3            | 1    |
| 0,02    | 3            | 2    |
| 0,03    | 5            | 2    |
| 0,05    | 6            | 2    |
| 0,07    | 6            | 2    |
| 0,1     | 7            | 2    |
| 0,3     | 6            | 2    |

Tabela 04: Valores de  $\Delta n_w$  para  $K_1$  e totais obtidos em diferentes concentrações de NaCl.



T 1372/05

## APÊNDICE B

---

### SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS

#### *Hb humana*

##### CADEIA ALFA

VLSPADKTNVKAAWGKVGAGHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNA  
VAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK  
YR

##### CADEIA BETA

VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAMGNPKVKAHGKKVLG  
AFSDGLAHLDDLKGTFAATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVAN  
ALAHKYH

#### *Hb S*

##### CADEIA ALFA

VLSPADKTNVKAAWGKVGAGHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNAV  
AHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKY  
R

##### CADEIA BETA

VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAMGNPKVKAHGKKVLGA  
FSDGLAHLDDLKGTFAATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANA  
LAHKYH

#### *Hb bovina*

##### CADEIA ALFA

VLAAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKA  
VEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLLVTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSK  
YR

##### CADEIA BETA

LTAEKAAVTAFAWGKVKVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTADAMNPNPKVKAHGKKVLDSF  
SNGMKHLDDLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKEFTPVLQADFQKVVAGVANAL  
AHRYH



