

Ocirnar Antonio de Castro

A Influência da Concentração do Íon Cloreto no Efeito Bohr da Hemoglobina Humana A₀

1910000926





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
- UNESP -

OCIMAR ANTONIO DE CASTRO

**A INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ÍON CLORETO
NO EFEITO BOHR DA HEMOGLOBINA HUMANA A₀.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO FRANCISCO COLOMBO



926/00

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre
no curso de Biofísica Molecular. Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"- UNESP.

São José do Rio Preto - SP
1999

Dedicação

ANTÔNIO ROSA FERNANDES

“Por mais que se procure neste dia tão especial para nós...”.

Nós estamos vencendo meu “Pai”...

Dedico este trabalho a você, como gratidão ao seu amor, carinho e esforço.



“A humanidade está sofrendo não porque tenha deixado de progredir mas,
porque progrediu depressa demais.”
(Albert Einstein)



Agradecimentos

É com muito carinho e gratidão que agradeço ao **PROF. DR. MARCIO FRANCISCO COLOMBO**, pela orientação dedicada, realizando a análise deste trabalho com rigor e paciência, e como também pelos momentos de auxílio, amizade e atenção.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez** e ao **Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio**, pelas valiosas sugestões dadas à análise deste trabalho, durante a qualificação.

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

Ao **Prof. Dr. José Roberto Ruggiero**, incansável Coordenador do curso de Pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto**, mestre que inspira seriedade e dedicação ao trabalho.

Ao **Prof. Dr. Elso Drigo Filho**, pelo apoio com o qual eu poderia contar neste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física, que em igual valor, trabalham arduamente para a formação de seus alunos, **Prof. Dr. Johnny Rizzieri Olivieri**, **Prof. Dr. José Ramon Beltran Abrego**, **Prof. Dr. Jorge Chahine**, **Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa**, **Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.**, **Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni**, minha gratidão pelo convívio e amizade.

Yago

“Sou bravo, sou forte,
Sou filho do norte;
Meu canto de morte
Guerreiros, ouvi.”

(Gonçalves Dias)

Meu filho, o valor de cada ser humano está na sua essência...
E vencedor, é aquele que não se curva frente à vida.

Gláucia

“É incrível a força que as coisas tem, quando elas tem que acontecer”.

(Caetano Veloso)

Agradeço pelo carinho, atenção, companheirismo e empenho que dedica, para tornar minha vida mais tranqüila e feliz.

Ao **Osmar**, amigo fiel, grande companheiro dos dias difíceis e dos dias calmos e alegres.

A minha família **Ary, Avanir, Edmar e Karoline**, que sempre torceram pela minha vida.

A **Antônio Fernandes** (*in memorian*), que do céu me dá força para viver.

Aos meus amigos **Fátima, Maruza, Gércio, Fernanda, Alexandre Teso, Alexandre Guerzoni, Gérson e Janaína** com os quais posso contar a qualquer momento de minha vida.

Aos meus companheiros de laboratório; **Alexandre “Mac”, Bernadete, Flávio, Renato, André e Sandra**, pela gostosa cumplicidade com que amadurecemos juntos cientificamente, pelo carinho e incentivos constantes.

Aos meus queridos colegas, **Rafael, Tereza, Priscila, Cariana, Uderlei, Adriana, Raquel, Milton, Dulcinéia, Benatti, Fábio, Leandra, João Ricardo, Murilo, Renato, Plínio, Cecília, Giovanni, Selma, Neide e Valmir** por cultivarem um ambiente propício ao trabalho.

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

A **Ilva** secretária do departamento de física, pela sua amizade e apoio.

A **D. Zezé** e aos funcionários da seção de pós-graduação **Nadia, Oscar e Nanci**, pelo auxílio em todos os momentos.

A **Maria do Carmo**, bibliotecária que revisou as referências bibliográficas deste trabalho.

A **Todas as Pessoas** que passaram, de formas distintas, por minha vida e que com certeza, ensinaram-me a viver e a continuar lutando.

Agradeço a **Deus** pela vida.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE – da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP – São José do Rio Preto – SP, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP. E bolsa de mestrado da CAPES.

RESUMO

A hemoglobina é uma proteína protótipo para estudos de processos alostéricos de macromoléculas biológicas e para as investigações das relações entre estrutura e função protéica. A oxigenação da Hb é seguida por mudanças estruturais terciárias e quaternárias da proteína. O equilíbrio entre as diferentes conformações são sensíveis à ação de vários efetores heterotrópicos como prótons, cloreto, água e compostos fosfatados que determinam propriedades termodinâmicas de ligação de O_2 à proteína (P_{50} , P_m , n_{50} , $k_{i(i=1 \dots 4)}$). O modelo mais aceito para explicar o processo de oxigenação da Hb é o modelo de dois estado, R e T, proposto por Monod, Wyman e Changeaux (1965), que descreve muitas das características da Hb e de suas respostas aos efeitos alostéricos. Atualmente são encontrados na literatura evidências experimentais para a existência de um estado intermediário da Hb durante o processo de oxigenação protéico. Neste trabalho nós apresentamos evidências novas para a existência de um estado alostérico novo de Hb. Tais evidências aparecem por:

- a) Medidas da ligação extras de prótons à Hb, através de titulação potenciométrica à proteína totalmente desoxigenada e totalmente oxigenada em função da concentração de NaCl. A análise destes resultados interpretados pela teoria de Debye-Huckel, que descreve o efeito da força iônica no pK de grupos ionizáveis em solução, mostra que a desoxi-Hb podem assumir dois estados alostéricos diferentes.
- b) Determinação das curvas de oxigenação da Hb à diferentes pH, entre 7,0 e 7,8, que foram determinadas na presença de 0,5 e 100 mM NaCl. Estes resultados analisados pela equação de Gibbs-Duhem, mostra um paralelismo entre a liberação de prótons pela Hb, devido a ligação de oxigênio à proteína, i.é., o Efeito Bohr alcalino da Hb, com o aumento de

hidratação protéico, devido ao aumento da superfície exposta da proteína com a oxigenação, i.é., o Efeito de Água da Hb.

Previamente, medidas de variação de hidratação protéica, com a oxigenação, em função da concentração de NaCl, mostrou evidências de que a desoxi-Hb coexista em dois estados alostéricos distintos: um estado alostérico dependente da ligação de ânions (o estado T) e outro na ausência de ligantes (o estado P) (Colombo e Seixas, 1999). Os estados P e T diferem na afinidade ao O_2 e na hidratação da proteína. Neste trabalho, está mostrado que os estados alostéricos P e T também possuem diferença no número de prótons que são liberados pela Hb com a oxigenação. Estes resultados são fortes evidências de que a interação de ânion com a Hb implica em mudanças de estados alostéricos da desoxi-Hb durante a oxigenação da proteína. Assim, estes resultados apoiam a hipótese de que a desoxi-Hb coexiste em dois estados de conformações alostéricas diferentes: o estado T com ânions ligados e o novo estado alostérico P que tem máxima estabilização quando a proteína está totalmente livre de O_2 e ânions. Considerando a existência da Hb em três conformações alostéricas diferentes, T, P e R, pode-se responder a influência do íon cloreto no Efeito Bohr e no Efeito de Água na oxigenação da Hb.



ABSTRACT

Hemoglobin is the prototype protein for studies of allosteric processes in biological macromolecules, and for the investigation of the relationship between structure and function. Hb oxygenation is followed by tertiary and quaternary structural changes. The equilibrium between different conformations, that is sensitive to the action of several heterotropic effectors, such as protons, chloride, water and organic phosphates, determines the thermodynamic properties of O₂ binding to the protein (P_{50} , P_m , n_{50} , $K_{i(i=1 \dots 4)}$). Although a two state, R and T, allosteric model, as proposed by Monod, Wyman and Changeaux (1965), describes many of the features of Hb oxygenation and of its response to allosteric factors, there are many, experimental evidence for the existence of an intermediate state on Hb oxygenation. In this work we present new evidences for the existence of a new allosteric state of Hb. Such evidences appear from:

- a) The measurements of the influence of NaCl on the binding of extra protons to the fully deoxygenated and to the fully oxygenated Hb as a function of NaCl concentration by potentiometric titration. From the analysis of these data via Debye-Huckel theory, which describe the effect of ionic strength on the pK of ionizable groups in solution, we conclude that the deoxy-Hb can assume two different allosteric states.
- b) The determination of the oxygen binding curves of Hb at different pH between 7.0 and 7.8, measured in the absence and in the presence of 100 mM NaCl. When these data were analyzed via the Gibbs-Duhem equation, a parallel between the release of protons due to oxygen loading to the protein, i.e., the alkaline Bohr effect of Hb, could be made with the water binding to the new protein surface exposed by the protein upon oxygenation, the Water Effect of Hb.

Previously, the measurement of the hydration change upon oxygenation as a function on NaCl concentration have shown evidence that deoxy-Hb co-exist in two allosteric states, depending if the anion is bound (the T-state) or not (the P-state) to the protein (Colombo and Seixas, 1999). The states P and T differ in O₂ binding affinity and hydration. In this work, we show that states P and T differ also on the number of protons bound. This gives strong evidence that the interaction of chloride anions with the protein changes the conformation of the fully deoxygenated state of the protein but not the conformation of the fully oxygenated. These results support, therefore, the hypothesis that the deoxy-Hb exists in two different allosteric conformational states: the canonical T-state when anions are bound and the novel P-state, which is fully stabilized when the protein is fully unloaded of O₂ and anions. By considering the existence of Hb in three different allosteric states, T, P and R, we can fully account for the influence of chloride on the Bohr and Water effect on Hb oxygenation.

Abs	Absorbância
ATP	Adenosina trifosfato
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
a_w	Atividade de água
Bis-tris	(bis[2-hidroxietil]imino-tris[hidroximetil]metano)
2,3BPG	2,3-bifosfoglicerato
Da	Dalton
D.O.	Densidade óptica
desoxi-Hb	Hemoglobina desoxigenada
E^0	Potencial de eletrodo
EDTA	Ácido etileno-diaminotetracético
f_P	Fração da desoxiemoglobina no estado alostérico P
f_T	Fração da desoxiemoglobina no estado alostérico T
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
His	Histidina
IHP	Inositol hexafosfato
IPP	Inositol pentafosfato
K_1	Constante de ligação do primeiro oxigênio
K_4	Constante de ligação do quarto oxigênio
Lys	Lisina
MWC	Monod, Wyman e Changeux
meta-Hb	Hemoglobina oxidada – Fe^{3+}
n_{50}	Índice de cooperatividade de Hill
n_{H^+}	Número de prótons ligados à Hb
n_w	Número de moléculas de água ligadas à Hb
n_{O_2}	Número de moléculas de oxigênio ligadas à Hb
OEC	Curva de equilíbrio de oxigenação
oxi-Hb	Hemoglobina oxigenada
P_{50}	Pressão de O_2 à 50% de saturação dos sítios de ligação da Hb com O_2
PDB	Protein data bank
P_m	Atividade média do ligante expressa em termos de pressão de O_2



pO_2	Pressão de oxigênio
p.p.m.	Partes por milhão
q.s.	Quantidade suficiente
R	Estado alostérico R da Hb – conformação relaxada
Ser	Serina
T	Estado alostérico T da Hb – conformação tensa
Tris-HCl	(Tris[hidroximetil]amino-metano)
Val	Valina
$\bar{Y}$	Saturação fracional da hemoglobina por oxigênio
ϵ_λ	Coefficiente de extinção molar no comprimento de onda λ
Δn_{H^+}	Diferença do número de prótons liberados pela Hb durante a oxigenação
Δn_w	Diferença do número de moléculas de água ligadas à Hb durante a oxigenação
γ	Coefficiente de atividade de um íon
λ	Comprimento de onda
α_i	Grau de ionização
ϖ	Termo de Debye – Huckel igual a $\sqrt{\text{força iônica}}/1+\sqrt{\text{força iônica}}$



Figura 1:	Hemoglobina Humana A ₀	2
Figura 2:	Gráfico de Hill	5
Figura 3:	Corte Transversal da Cavidade Central da Hemoglobina	11
Figura 4:	Diagrama da Hemoglobina com Ligações Intra e Inter Cadeias	20
Figura 5:	Modelo Proposto por Colombo e Seixas, 1999 Para Explicar a Oxigenação da Hb com a Variação de NaCl	22
Figura 6:	Gel de Eletroforese	26
Figura 7:	Ilustração da Cella de Imai Modificada	29
Figura 8:	Gráfico de Abs x λ	30
Figura 9:	Circuito do Oxímetro	33
Figura 10:	Esquema dos Equipamentos Utilizados nos Experimentos de Oxigenação	34
Figura 11:	Gráfico de Abs x pO ₂ – OEC	35
Figura 12:	Esquema da Cella Mini-Vials	42
Figura 13:	Gráfico da Saturação ($\bar{Y}$) x logpO ₂	46
Figura 14:	Gráfico do logP ₅₀ x pH	48
Figura 15:	Gráfico de log(K ₁) ⁻¹ x pH	49
Figura 16:	Gráfico da Saturação ($\bar{Y}$) x pO ₂	53
Figura 17:	Gráficos de nO ₂ x pH (100 e 0,5 mM NaCl)	54
Figura 18:	Gráfico de $\partial nO_2/\partial pH$ x ln pO ₂	55
Figura 19:	Gráficos de $\partial nO_2/\partial pH - \partial nO_2/\partial \ln a_w$ x ln pO ₂	57
Figura 20:	Gráficos de n _{H+} ^{obs} x [NaCl] mM	59
Figura 21:	Gráfico de $-\Delta n_{H+}^{obs}$ x [NaCl] mM	61
Tabela 1:	Tabela da Dependência do Efeito Bohr com a Concentração de NaCl	62
Figura 22:	Modelo Para Oxigenação da Hb, Dependente da Concentração de NaCl, Proposto Neste Trabalho	63
Figura 23:	Gráficos de n _{H+} ^{obs} x ϖ	69
Figura 24:	Gráficos de 1- α_i x ϖ	70

1 - INTRODUÇÃO	
1.1. Hemoglobina	1
1.2. Cooperatividade da Ligação do Oxigênio à Hb	3
1.3. Efetores Alostéricos	7
1.4. A Existência de Estados Intermediários da Hb Durante a Oxigenação Protéica	21
2 - OBJETIVOS	23
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Purificação da Hb	24
3.2. Determinação da Concentração Protéica	27
3.3. Medidas Via Equação de “Linkage”	28
3.4. Medidas Diretas de Efeito Bohr Alcalino por Titulação da Hb Totalmente Oxigenada e Totalmente Desoxigenada	39
3.5. Interação Iônica e Teoria de Debye – Huckel	42
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. A Interferência do Efeito Bohr na Afinidade da Hb Pelo O ₂	46
4.2. A Influência do Efeito Bohr na Constante de Ligação do Primeiro Oxigênio (K ₁) à Hb	49
4.3. Comparação Entre o Efeito Bohr e o Efeito de Água na Oxigenação da Hb	51
4.4. O Mecanismo de Oxigenação da Hb Para Efeito Bohr Deve Considerar a Existência de um Novo Estado Alostérico Para à Hb	63
4.5. Comportamento da Hb com o Aumento da Força Iônica da Solução	67
5 - CONCLUSÕES	72
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
7 - ANEXO	84
7.1. Rotina Escrita no Software Matlab Para Análise do Efeito do pH nas Isotermas dos Dados Experimentais da Oxigenação da Hb	84



1) INTRODUÇÃO

1.1. HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma hemoproteína, encontrada em altas concentrações nos eritrócitos dos vertebrados. Sua estrutura consiste de quatro subunidades polipeptídicas, cada qual complexada a um grupo prostético heme formada pelo complexo de protoporfirina IX que possui um átomo de ferro II (Lehninger *et al.*, 1993).

A porção protéica, chamada de globina, é formada por duas cadeias α com 141 resíduos de aminoácido e duas cadeias β com 146 resíduos. A Hb é grosseiramente esférica, com diâmetro de aproximadamente 6,4 nm e peso molecular de 64,5 KDa.

A principal função da Hb é de transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, e parte do CO_2 no sentido inverso. O oxigênio liga-se reversivelmente a cada átomo de ferro II, na valência perpendicular ao plano formado pelas ligações do metal ao grupo protoporfirínico (Lehninger *et al.*, 1993), o que possibilita o transporte de no máximo quatro moléculas de O_2 por Hb.



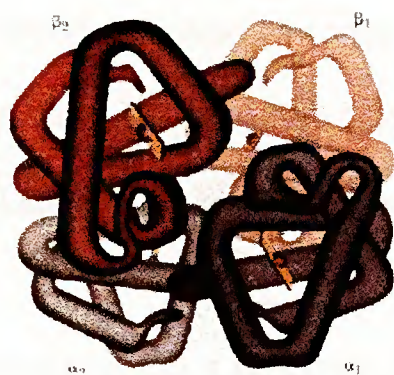


Figura 1: Hemoglobina humana (Hb A₀). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α cinza claro e cinza escuro e duas cadeias β marrom claro e marrom escuro. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O₂. Figura extraída do livro de Garret e Grisham, 1995.

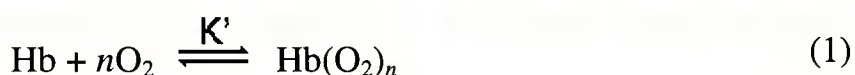
O ferro por ser um metal de transição possui um número de oxidação variável, Fe²⁺ ou Fe³⁺. Para a ligação do O₂ é necessário que o ferro esteja no estado ferroso (Fe²⁺), porém a oxidação para o estado férrico leva a formação de metaemoglobina (meta-Hb) que não possui capacidade de transportar oxigênio. Para manter a integridade do sistema, o eritrócito possui um complexo enzimático, onde pode ser encontrada uma enzima redutora de ferro III, chamada de metaHb redutase, que reverte o processo de oxidação espontânea do ferro hêmico (Voet & Voet, 1995).

A Hb assume dois estados distintos: (i) quando a proteína está totalmente oxigenada, chamada de forma oxi e (ii) quando está desligada das moléculas de oxigênio denominada forma desoxi (Lehninger *et al.*, 1993; Voet & Voet, 1995).

A Hb tanto na forma oxi como na forma desoxi, não tem variação no número de oxidação do ferro, que é mantido no estado ferroso em qualquer uma destas duas formas (Lehninger *et al.*, 1993; Voet & Voet, 1995).

1.2. COOPERATIVIDADE DA LIGAÇÃO DO OXIGÊNIO À Hb

Hill, 1913 propôs um modelo cooperativo para a ligação sequencial de O₂ durante a oxigenação da Hb. Este processo foi representado por um equilíbrio químico, descrito abaixo:



onde K' é a constante aparente de associação das moléculas de O₂ à Hb e *n* o número de oxigênios que estão envolvidos na transição desoxi – oxi-Hb.

Expressando 1 em termos de K', temos:

$$K' = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}].[\text{O}_2]^n} \quad (2)$$

onde [Hb(O₂)_n] é a concentração de Hb totalmente oxigenada, [Hb] a concentração da Hb totalmente desoxigenada e [O₂] a quantidade de oxigênio que deve ser expressa em termos de pO₂ (pressão parcial de oxigênio), seguindo a lei de Henry para ligantes gasosos conforme equação abaixo:

$$[\text{O}_2]_{\text{solução}} = p\text{O}_2 \cdot K_H \quad (3)$$

onde K_H é a constante de solubilidade do O_2 em solução aquosa (constante de Henry).

Rescrevendo a equação 2 em função da equação 3 chega-se a equação 4 descrita abaixo:

$$K \cdot (p\text{O}_2)^n = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}]} \quad (4)$$

Para, $K = K' \cdot K_H$

A fração apresentada na equação 4 é definida como saturação fracional ($\bar{Y}$), ou seja, é a razão entre o número de sítios ocupados por O_2 ($[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]$) sobre o número total de sítios de oxigênio ($[\text{Hb}]$).

Expressando a equação 4 em termos de $\bar{Y}$:

$$\frac{\bar{Y}}{(1 - \bar{Y})} = K \cdot (p\text{O}_2)^n \quad (5)$$

Aplicando logaritmo a ambos os lados da equação 5 chegamos a equação 6 (Hill, 1913):

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}\right) = n \cdot \log(p\text{O}_2) + \log K \quad (6)$$



O gráfico de $\log (\bar{Y} / 1 - \bar{Y})$ contra $\log pO_2$ é conhecido como gráfico de Hill. Um gráfico de Hill típico, construído a partir de dados experimentais obtidos neste trabalho, é mostrado na figura 2:

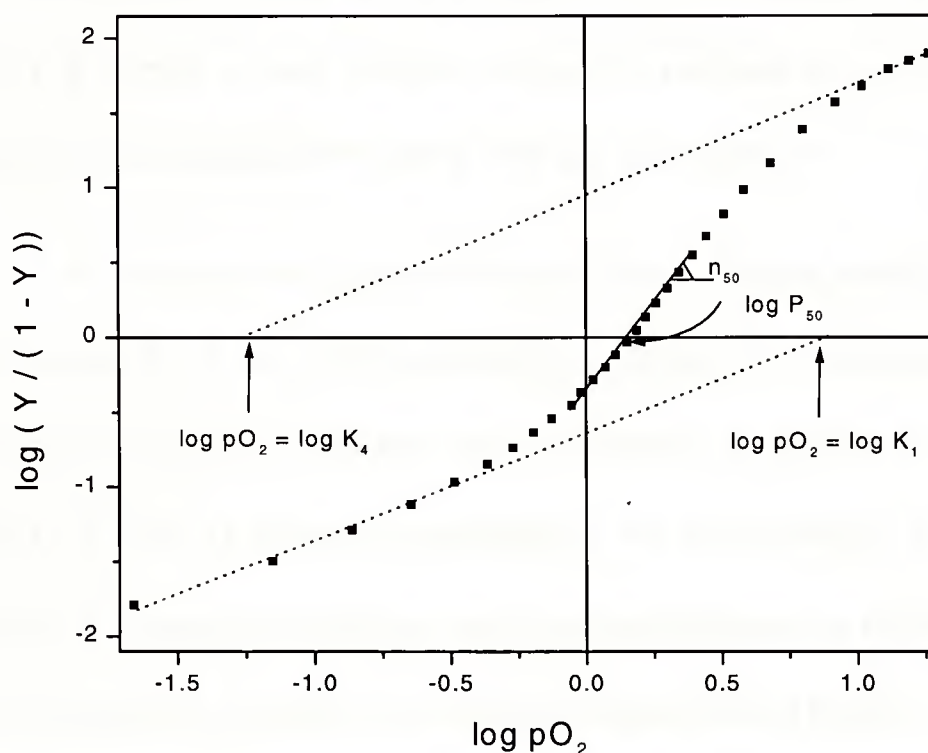


Figura 2: A figura representa o gráfico de Hill, para a ligação cooperativa do oxigênio à Hb. A inclinação do gráfico, na região próxima a 50 % de saturação, nos fornece a cooperatividade da reação (n_{50}), e a intersecção com o eixo de $\log pO_2$, fornece a pressão de O_2 quando metade dos sítios, existentes na proteína estão ocupados. K_1 e K_4 são as constantes referentes a ligação do primeiro e do quarto oxigênio à Hb. Este gráfico refere-se a reoxigenação da Hb em pH= 7.6 em tampão Hepes 10 mM na presença de 0.5 mM de NaCl em temperatura ambiente.

A forma sigmoide do gráfico de Hill é devido à cooperatividade da ligação do O_2 à Hb, isto é, demonstra que com a ligação da primeira molécula de oxigênio a ligação da segunda molécula é favorecida e assim sucessivamente. A cooperatividade pode ser medida em termos de n_{50} (coeficiente de Hill) que é obtido pela inclinação do gráfico de Hill (mostrado na figura 2), no intervalo de 25 a 50 % de saturação da Hb por O_2 . Os valores

da inclinação maiores que um, caracterizam uma curva sigmoidal indicando afinidade crescente dos grupos heme pelo oxigênio.

A afinidade da Hb pelo O_2 também pode ser extraída do gráfico de Hill e é expressa em termos de $\log P_{50}$, que é o valor logarítmico da pO_2 para $\log(\bar{Y}/1-\bar{Y})$ igual a zero. Através do $\log P_{50}$ encontra-se a P_{50} , que é a pressão de O_2 necessária para saturar 50% dos sítios hêmicos.

As constantes de ligações da primeira e da quarta molécula de O_2 , denominadas K_1 e K_4 , são encontrados a partir das extrapolações das extremidades, inferior e superior, respectivamente, do gráfico de Hill, até $\log(\bar{Y}/1-\bar{Y})=0$. O ponto de cruzamento, das extrapolações dos pontos superiores e inferiores do gráfico, com a ordenada fornece os valores de pO_2 que correspondem aos valores das constantes (indicados na figura 2).

A comparação das duas estruturas da Hb, oxigenada e desoxigenada, obtidas por difração de raio-X sugere que a cooperatividade da ligação do O_2 à Hb, está relacionada com uma mudança de estrutura quaternária da proteína (Perutz, 1989), conforme proposta original de Monod *et. al.*, 1965, que é conhecido como modelo de Monod, Wyman and Changeux ou modelo de MWC. No modelo de MWC a cooperatividade da ligação do O_2 à Hb é explicada supondo a existência de duas conformações protéicas distintas, um estado conformacional tenso e compactado com baixa afinidade por oxigênio, assumido pela desoxi-Hb (chamado de estrutura T) e outro estado relaxado e

menos compactado com alta afinidade por O_2 assumido pela oxi-Hb (chamado de estrutura R) (Monod *et. al*, 1965).

Neste modelo, o equilíbrio entre as conformações de baixa afinidade (T) e alta afinidade (R) pelo oxigênio é deslocado de T para R com a ligação sequencial de O_2 , originando o aumento da afinidade da proteína pelo ligante, com o cooperativo aumento da saturação.

O equilíbrio pode ser entendido segundo a expressão:



onde o equilíbrio das duas populações protéicas (T e R) pode ser deslocado pela estabilização de qualquer uma destas formas por um ligante, homotrópico ou heterotrópico.

1.3. EFETORES ALOSTÉRICOS

Quando a afinidade de um sítio de ligação, em uma macromolécula, é alterada pela ligação de um ligante em um outro sítio desta mesma macromolécula, este fenômeno é conhecido por efeito alostérico.

Se a afinidade da ligação de um ligante X é alterada pela ligação de outro ligante X a outro sítio da macromolécula, este fenômeno é chamado de efeito alostérico homotrópico. Porém se a ligação deste ligante X exercer

influência na afinidade da ligação de um ligante Y em seu sítio específico na macromolécula, este efeito é chamado de efeito alostérico heterotrópico (Cantor *et al.*, 1980).

O oxigênio é o efetor alostérico homotrópico da Hb, pois com a ligação de uma molécula de O_2 a um dos sítios heme a afinidade de ligação dos outros sítios heme pelo oxigênio é alterada.

A Hb é sensível a diversos efetores heterotrópicos que possuem capacidade de alterar a afinidade da ligação de oxigênio na proteína. Tais ligantes podem ser, compostos fosfatos (ATP, 2,3-BPG, IPP, IHP), íons cloreto, CO_2 , H^+ (Perutz *et al.*, 1980, Kilmartin *et al.*, 1978, Rollema *et al.*, 1975), água (Colombo *et al.*, 1992, 1994, Colombo *et al.*, 1996 e Colombo e Seixas, 1999).

O modelo de MWC supõe que a proteína seja formada por mais de uma cadeia polipeptídica, e em cada unidade protéica encontram-se mais de um sítio para estes ligantes heterotrópicos. O equilíbrio alostérico, desta forma, é afetado com qualquer um destes ligantes. Com a ligação do oxigênio, o equilíbrio ($T \rightleftharpoons R$) é deslocado para a estrutura R, que possui maior afinidade por O_2 . Outro ligante que possua capacidade de ligar-se mais fortemente a uma das conformações da Hb, ou com uma estequiometria diferenciada entre os estados T e R, podem afetar este equilíbrio conformacional deslocando-o para uma das duas conformações. Desta forma a

prevalência de uma estrutura sobre a outra depende das interações destes ligantes à proteína (Monod *et al.*, 1965).

1.3.1. O Efeito dos Compostos Fosfatados

Benesch *et al.*, 1969, observaram que a afinidade da Hb pelo oxigênio era maior na proteína purificada do que na proteína encontrada no sangue. Propuseram a existência de alguma substância fisiológica que, ao ligar-se à proteína, diminuía sua capacidade de ligação ao O₂. Um composto fosfatado conhecido como 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), de caráter aniônico, possui a propriedade de ligar-se fortemente à desoxi-Hb, e fracamente à oxi-Hb favorecendo a estabilidade na forma desoxigenada. Esta especificidade de ligação do BPG à desoxi-Hb é devido a existência de um único sítio de ligação desta proteína na estrutura T, localizado na cavidade central da proteína, e exposto quando a Hb assume esta conformação (Arnone, 1972).

Em animais como os peixes e répteis a diminuição da afinidade da Hb pelo O₂ é devida à ligação de outro composto fosfatado: o ATP, enquanto que nas aves a afinidade da Hb pelo O₂ é modulada principalmente pela ligação do inositol pentafofato (IPP) e do inositol hexafofato (IHP) (Voet & Voet, 1995).



1.3.2. Efeito do Íon Cloreto

O íon cloreto é outro importante efector alostérico heterotrópico de mamíferos que estabiliza a conformação de menor afinidade da Hb pelo O₂ (forma T) (Perutz *et al.*, 1994).

Kilmartin e colaboradores propuseram em 1978 que os íons cloreto ligavam-se a sítios específicos, no N-terminal do grupamento amino da Val 1 da cadeia α_2 e ao grupo guanidina da Arg 141 da cadeia α_1 no C-terminal. Em trabalhos publicados em 1993 e 1994 Perutz e colaboradores, postularam que a regulação da afinidade por O₂ na presença de Cl⁻, ocorre através de interações eletrostáticas não específicas. A ação do íon cloreto consiste em neutralizar o excesso de cargas positivas na cavidade central da Hb, através de condensação iônica das cargas positivas dos resíduos com os íons Cl⁻ (Perutz *et al.*, 1993).

O mecanismo proposto por Perutz é fundamentado na existência de um excesso de cargas positivas, localizadas na cavidade central da Hb humana, geradas por oito resíduos catiônicos (cadeia α : Val1, Lys99, His103; cadeia β : Val1, His2, Lys82, Arg104 e His123) e três resíduos aniônicos (cadeia α : Asp95 e 126; cadeia β : Glu101) (Perutz *et al.*, 1993). Este excesso de cargas positivas, também observadas em Hbs de outras espécies, promove uma repulsão eletrostática entre estas cargas, desestabilizando a estrutura T da

Hb, deslocando o equilíbrio conformacional para a estrutura de alta afinidade pelo oxigênio, estrutura R, aumentando a afinidade da Hb pelo O_2 (figura 3).

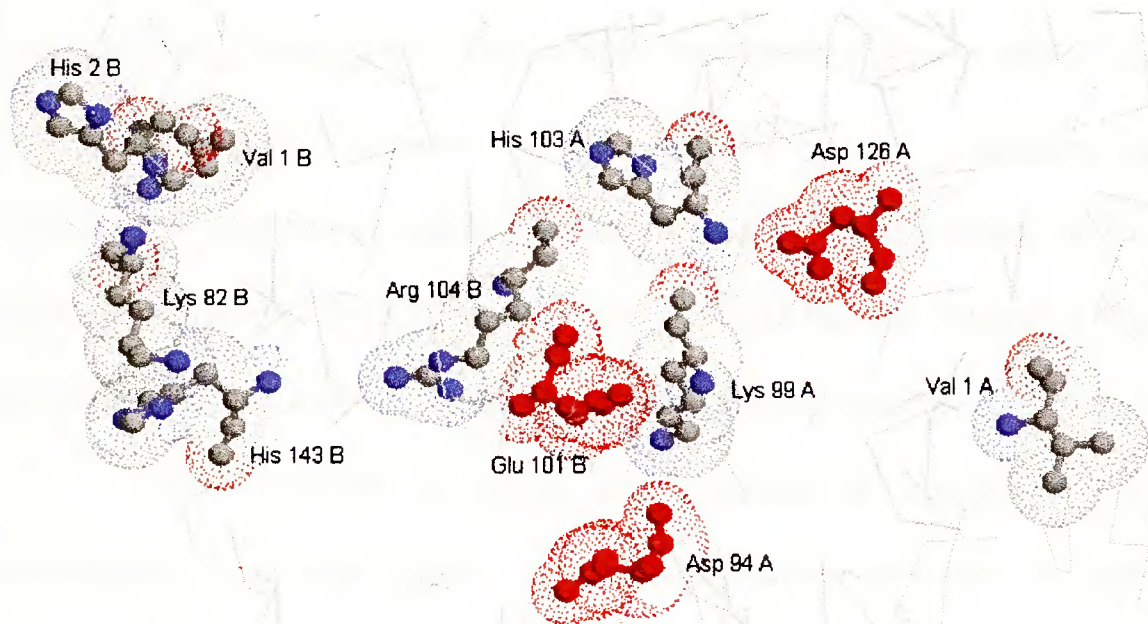


Figura 3: A figura ilustra um corte transversal da cavidade central da Hb. Os resíduos em azul e cinza representam os aminoácidos carregados positivamente, e os resíduos em vermelho, representam os aminoácidos carregados negativamente *. (Coordenadas da oxi-Hb (R2) "low salt" 100 mM de NaCl, PDB (Silva *et al.*, 1992)).

A ação do íon cloreto seria a de blindar às cargas positivas da cavidade central da Hb, diminuindo a força de repulsão eletrostática entre os resíduos, deslocando o equilíbrio alostérico conformacional para o estado T da proteína com baixa afinidade pelo oxigênio.

Para formular esta hipótese, Perutz e colaboradores em 1994, basearam-se em estudos de oxigenação, de Hbs mutantes, na qual incluíram algumas deleções, de um ou mais resíduos que contribuem com as cargas positivas da cavidade. Estes pesquisadores notaram que o efeito dos íons

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

cloretos sobre a afinidade da Hb ($\Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{Cl}^-]$), diminuí com o número de resíduos positivos deletados, e que o inverso também era verdadeiro. Como ($\Delta \log P_{50} / \Delta \log [\text{Cl}^-]$) é uma medida da diferença entre o número de íons cloretos ligados, à desoxi-Hb em relação à oxi-Hb, o aumento do diferencial de resíduos carregados positivamente na cavidade central da Hb, aumenta a diferença de Cl^- condensados a desoxi-Hb, em relação à oxi, intensificando o efeito deste íon na afinidade da proteína por O_2 .

Como o efeito do cloreto ocorre através de interação iônica, determina-se que este ânion, possui significativa atividade a altas concentrações. Assim a adição de soluções com altas concentrações salinas causaria mudanças na atividade de água da solução, e por consequência poderia alterar o equilíbrio entre as formas R e T. Uma reavaliação do efeito alostérico do cloreto foi realizado por Colombo e colaboradores em 1994, onde observaram que o efeito do cloreto dá -se também de forma indireta, via efeito da concentração do íon na atividade de água da solução.

Colombo e colaboradores chegaram a uma relação de que para cada cloreto liberado pela oxigenação da Hb, na transição das estruturas T para R, aproximadamente 65 moléculas de água ligam-se à proteína com a ligação das quatro moléculas de O_2 (Colombo *et al.*, 1994).



1.3.3. Efeito de Água

O papel da água sobre o controle alostérico, como proposto recentemente por Colombo *et al.*, 1992 e 1994 e Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996, tem sido estudado usando como modelo a oxigenação da Hb pelo chamado método de estresse osmótico (Parsegian *et al.*, 1995). O princípio do método reside em usar solutos neutros, que são excluídos da superfície protéica (Timasheff & Arakana, 1982), para diminuir a atividade de água na solução.

O efeito de solvatação da Hb pode ser determinado quantitativamente em termos de número diferencial de moléculas de água ligadas entre os dois extremos conformacionais da proteína, oxi e desoxi-Hb (Colombo *et al.*, 1992; 1994; Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996 e Colombo & Seixas, 1999).

Durante a transição T para R, vários contatos entre as subunidades protéicas são rompidos, e expostos ao solvente. Esta diferença estrutural é seguida pelo aumento da superfície protéica em contato com o solvente, aumentando o número de moléculas de água ligadas à proteína na forma R (Colombo *et al.*, 1992). Este aumento da superfície protéica exposta ao solvente, com a oxigenação, implica na influência da atividade de água (a_w) na afinidade da Hb pelo O_2 .



A análise do efeito de solventes a proteínas, deve ser realizado quando somente a atividade de um ligante (L_1), varia com a atividade de apenas um outro ligante (L_2) enquanto a atividade de todos os outros ligantes presentes na solução é mantida constante. Sendo a água um ligante alostérico, o número diferencial de moléculas de água ligadas entre o estado totalmente oxigenado e o totalmente desoxigenado (Δn_w), conforme proposto por Colombo *et al*, 1992 é obtido pela equação 8:

$$-4 \frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_w} \Big|_{L_i} = (n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}) = \Delta n_w \quad (8)$$

onde n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas as estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, respectivamente; L_i é a atividade de um ligante i diferente da água (Colombo *et al.*, 1992).

A partir desta equação Colombo *et al.*, 1992, mostraram que cerca de 70 moléculas de água estão envolvidas na completa oxigenação da Hb. Todos os seus experimentos foram realizados na presença de 100 mM de NaCl e independente da adição de qualquer outro soluto neutro o Δn_w permanece sempre próximo de 70 moléculas.

Colombo & Bonilla-Rodriguez, 1996, realizaram um estudo, utilizando métodos termodinâmicos, da interação da água com solutos (glicina, glicose, sacarose). Neste trabalho está demonstrado que a mudança

de P_{50} não se deve à interação preferencial do soluto com a Hb, nem à mudança de constante dielétrica da solução. Desta forma reforçaram a interpretação que o efeito de solventes é indireto via alteração na atividade de água da solução promovida por estes solutos.

1.3.4. Efeito do CO_2

O dióxido de carbono interfere com a ligação do oxigênio à Hb, direta ou indiretamente.

O CO_2 pode diretamente reagir com a Hb, ao ligar-se nos grupamentos N-terminais das cadeias polipeptídicas, formando íons carbamatos, expressado abaixo:

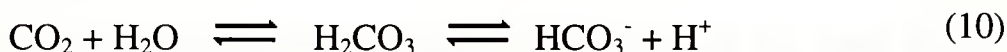


A reação é reversível, e permite que uma pequena parte do CO_2 encontrado nos tecidos possa ser transportado até os pulmões através de ligação direta à Hb. Quando o dióxido de carbono liga-se à Hb propicia a formação de pontes salinas o que a estabiliza na forma de baixa afinidade pelo oxigênio (T). Para reverter o processo há a necessidade de que exista uma alta concentração de O_2 , pois o aumento significativo da $p\text{O}_2$ favorece o estado R,

o que desestabiliza o N-terminal carbamatado e libera o CO_2 (Voet & Voet, 1995).

Outra forma do dióxido de carbono intervir com na ligação do O_2 com à Hb é de forma indireta. Em um primeiro passo o CO_2 , gerado pelo metabolismo reage com a água, formando o ácido carbônico (esta reação é catalisada pela anidrase carbônica), e este se dissocia em um íon bicarbonato mais um próton, o que proporciona uma queda no pH.

A reação do CO_2 com a água segue abaixo:

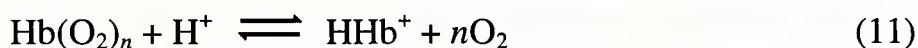


A reação descrita acima ocorre dentro do eritrócito. Com o aumento da concentração de H^+ favorece a forma protonada de Hb, estado T de baixa afinidade pelo O_2 .

1.3.5. Efeito Bohr

A influência do pH na captação ou liberação do oxigênio pela hemoglobina é conhecido como efeito Bohr (Lehninger, 1993). O efeito da concentração de H^+ na ligação do O_2 à Hb, em pH discretamente alcalino, influencia o efeito Bohr, conforme a expressão 11:





Através da expressão 11 pode-se entender que, durante a desoxigenação da Hb, há uma diminuição na concentração de prótons livres em solução, o que proporciona um aumento sensível no pH desta solução.

Usualmente este H^+ , que liga-se à Hb, é conhecido como próton de Bohr.

Vários aminoácidos estão envolvidos na ligação deste próton à Hb, em baixas concentrações de íons cloretos. Alguns resíduos que são descritos na literatura, que contribuem para o efeito Bohr alcalino são, Val 1 α , His 122 α , Val 1 β , His 2 β , His 143 β (Perutz *et al.*, 1980), His 146 β (Perutz *et al.*, 1980, Perutz *et al.*, 1985, Bucci e Fronticelli, 1985, Russu e Ho, 1986, Louie *et al.*, 1988, Bush *et al.*, 1991, Shih *et al.*, 1993).

Perutz *et al.*, 1980, realizaram medidas de titulação de prótons em várias espécies de Hbs e mostraram que vários resíduos de aminoácidos estão envolvidos no efeito Bohr, quando há a presença de cloreto, P_i e BPG, como efetores heterotrópicos. Porém em condições ausentes de qualquer tipo de efetor o resíduo His 146 β é o principal responsável pelo efeito Bohr alcalino.

Sun *et al.*, 1997, propuseram que o efeito Bohr alcalino ocorre pela existência de uma rede de interações eletrostáticas entre alguns resíduos da Hb, que propicia a ligação do H^+ a um resíduo específico de Hb ou pela estabilização do íon pelo aumento do pK_a do resíduo de aminoácido. A partir destas propostas classificaram em três categorias os responsáveis pelo efeito

Bohr alcalino: (i) grupos imidazólicos dos aminoácidos de histidinas, (ii) os aminoácidos terminais e (iii) sítios de ligação para prótons devido ao aumento de pK, quando comparados aos valores fisiológicos.

Kilmartin *et al.*, 1980 em experimentos com Hb normal e com Hb modificada quimicamente (deletando o resíduo de histidina - des-His146 β), mostraram que o pK_a da Hb independe do tampão a que a proteína está exposta. Em baixas concentrações de cloreto (10 mM) e na ausência de fosfatos, a contribuição dos resíduo de histidina no efeito Bohr alcalino esta entre 40 e 60%, do total de prótons que são ligados à proteína com a oxigenação.

O resíduo de his 146 β forma uma ponte salina com o resíduo de Asp 94 β na forma desoxigenada da Hb, que estabiliza o próton de Bohr, que desaparece na Hb, modificada quimicamente pela deleção do resíduo de His 146 β (des-His146 β) (Kilmartin *et al.*, 1980, Perutz *et al.*, 1980).

Outro resíduo também responsável pelo efeito Bohr alcalino é o resíduo Val 1 α , que forma uma ponte salina com o guanidino da Arg 141 da cadeia α vizinha, esta interação é descrita por Arnone, 1972 em seu trabalho, via deleção química da Val 1 α .

Perutz *et al.*, 1980 mostraram que a Val 1 α interage com a Ser 131 α (mesma cadeia α) na desoxi-Hb contribuindo no efeito Bohr. Porém

com a deleção do resíduo de Arg 141 α a interação valina – serina desaparece na ausência de cloreto.

Perutz *et al.*, 1980 também mostraram que outro grupo protonável também é a Arg 30 β quando interage com a His 122 α , porem o efeito Bohr não é dependente da especificidade deste resíduo, pois a troca da Arg 30 β por uma Ser, diminui mas, não extingue o efeito Bohr.

Fronticelli *et al.*, 1994, mostrou através de estudos de oxigenação com Hb A e Hb mutante um decréscimo no efeito Bohr alcalino quando a Hb não possui o resíduo de Val 1 β . Neste trabalho fica demonstrado também, que há uma grande relação entre efeito Bohr alcalino com a ligação de O₂, na presença e na ausência de cloreto.

A ligação de prótons a estes sítios na Hb interfere com a afinidade da proteína pelo O₂. A relação do número de prótons que são ligados ou desligados da Hb entre R e T, com a afinidade da Hb pelo oxigênio pode ser calculada pela relação diferencial descrita por Wyman & Gill em 1981:

$$\left. \frac{d \log P_{50}}{dpH} \right|_{ai} = \Delta n_{H^+} = (n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}) \quad (12)$$

onde, o produto da P₅₀ pressão parcial de oxigênio para 50 % dos sítios ocupados e Δn_{H^+} é a variação do número de prótons liberados durante a transição de T para R.

A figura 4 mostra uma representação esquemática dos sítios de ligação presumidos ou confirmados para os efetores alostéricos prótons, cloreto, BPG e CO_2 na hemoglobina, segundo o modelo proposto por Imai, 1982. Na figura também encontra-se algumas das interações propostas para o efeito Bohr alcalino.

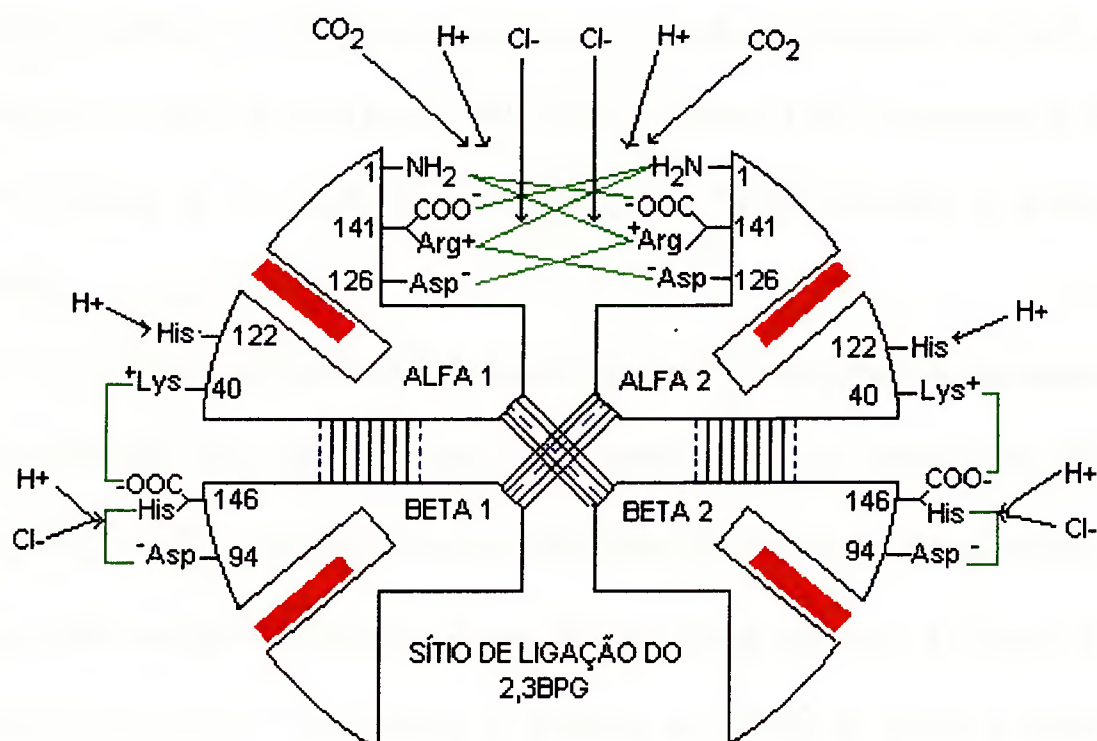


Figura 4: Diagrama mostrando as ligações intra e inter-subunidades da Hb humana. As setas indicam os sítios de ligação de alguns ligantes não hêmicos na proteína. Os traços coloridos representam: contatos de van der Waals _____, pontes salinas _____ e pontes de hidrogênio -----. As pontes salinas (em verde) aqui representadas, estão presentes na forma desoxi mas ausentes na forma oxi. Figura adaptada por Seixas, F. A. a partir do livro de Kiroyto Imai, 1982.

1.4. A EXISTÊNCIA DE ESTADOS INTERMEDIÁRIOS DA Hb DURANTE A OXIGENAÇÃO PROTÉICA

A existência de estados intermediários da Hb entre os extremos conformacionais (R e T) é atualmente objeto de grande interesse de pesquisadores, que trabalham com híbridos ou não desta proteína afim de entender melhor as relações de estrutura e função de proteínas (Ackers & Smith *et al.*, 1987, Ackers *et al.*, 1992, Holt & Ackers 1995, Jayaraman *et al.*, 1995, Huang *et al.*, 1996, Bonaventura *et al.*, 1998, Colombo & Seixas, 1999).

Colombo e Seixas 1999, através de medidas diferenciais do número de moléculas de água ligadas aos estados oxi e desoxi da Hb, $\Delta n_w = n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desox}}$, em função da concentração de cloreto, propuseram que a desoxi-Hb coexiste em duas conformações alostéricas distintas: a clássica T e uma nova estrutura P dependente da ausência de ligação de ânions à desoxi-Hb. Os resultados obtidos por estes autores mostram que a variação de hidratação protéica é dependente da concentração salina do meio. As medidas de variação de hidratação versus a concentração de NaCl mostra uma típica transição de dois estados, um a baixas e outro em altas concentrações de ânions. Estes dados sugeriram que a Hb, na ausência de ânion se estabilize em uma nova estrutura alostérica, chamada estado P.

Foi proposto um novo modelo de oxigenação da Hb que concilia os dois estados clássicos da proteína (R e T) com o novo estado intermediário P, conforme mostra a figura 5:

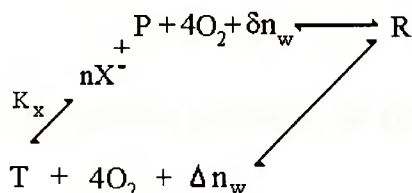


Figura 5: Representa o esquema para explicar o processo de oxigenação da Hb. No esquema δn_w representa o número de moléculas de água que são ligadas à Hb na transição entre os estados P e R, Δn_w na transição T e R; K_x é a constante de dissociação do ânion à desoxi-Hb (ou melhor, a conformação T) e nX^- a relação estequiométrica do ânion com a desoxi-Hb para a estabilização do estado T da Hb. Modelo proposto por Colombo e Seixas, 1999.

Segundo o modelo da figura 5 a transição do estado T para R passa pelo estado intermediário P, no qual ânions são liberados da estrutura com a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado desoxi-Hb P é estabilizado e a transição passa a ser de P para R, com uma pequena variação de hidratação.

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- 1) Entender a ação que o íon cloreto promove no efeito Bohr da Hb humana A_0 .
- 2) Comparar a similaridade entre o efeito Bohr e o efeito de água, anteriormente encontrada pelo grupo de trabalho, baseando-se nas equações de Wyman e Gibbs – Duhem, e por titulação direta de NaCl em solução de Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada.
- 3) Analisar o perfil de ligação de prótons na Hb com o aumento da força iônica da solução, com base na teoria de Debye – Huckel.



3) MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. PURIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA

O sangue foi coletado, por punção intravenosa em seringas heparinizadas, de indivíduos adultos sadios, não fumantes e que não ingeriram bebidas alcoólicas nas 24 horas antecedentes à coleta. O plasma foi separado por centrifugação aproximadamente 900 g por três minutos. As hemácias foram lavadas por três vezes em solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50,0 mM, EDTA 1,0 mM em pH= 8,5) onde o volume de solução tampão adicionado era, aproximadamente, igual a três vezes o volume de hemácias decantadas. Após a lavagem foi acrescentado ao precipitado de hemácias uma solução tampão hipotônica (Tris-HCl 50,0 mM com EDTA 1,0 mM em pH= 8,5) para o processo de hemólise. Os fragmentos de membranas foram retirados com adição de clorofôrmio, em volume próximo ao da solução de hemólise, acrescentada anteriormente, sob agitação constante. A mistura, tampão de hemólise com o clorofôrmio, foi submetida a centrifugação, cerca de 2500 g por 2 horas. O sobrenadante retirado (aproximadamente 50 mL) foi dialisados em membrana Milipore de 1,2 μ m, por 24 horas em 4 L solução tampão de Tris-HCl 15,0 mM com EDTA 1,0

mM e pH= 8,5. Após todas as etapas a amostra foi aplicada a coluna cromatográfica (descrita abaixo) para separação das frações protéicas.

➤ Coluna de Cromatografia

Os tampões utilizados na coluna de cromatografia foram:

➤ Tampão A (inicial): Tris-HCl 15,0 mM em pH= 8,40

➤ Tampão B (final): BisTris-HCl 15,0 mM em pH= 7,00

A resina que foi utilizada é a DEAE-SEPHADEX A - 50 (Pharmacia), 1,5 g adicionada a cerca de 300 mL de Tampão A por 12 horas, antes de ser montado na coluna XK-50 (Pharmacia), sendo este o tempo indicado pelo fabricante para a hidratação da resina. Passadas as doze horas de exposição da resina ao tampão, a coluna foi montada em temperatura ambiente, e foi equilibrada em câmara fria à temperatura de próxima a 4° C com tampão A.

➤ Eluição da Amostra

Com a coluna equilibrada, a amostra de Hb foi aplicada à coluna de fracionamento e lavada com tampão A por 12 horas (neste período passou o dobro de volume de tampão em relação ao volume da resina). Após a lavagem da amostra, a coluna foi acoplada a um sistema de FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography" (Pharmacia)) e a um banho térmico de 4° C. Para a eluição da amostra na coluna, o FPLC forma um gradiente de pH que misturava frações de tampão A e B. O gradiente foi iniciado em 50 % (V/V) de tampão A e B, e a concentração de tampão B aumenta até atingir 100 %.



Quando o gradiente atingiu a fração de 75% de tampão B houve o desprendimento da Hb A₂, que representava não mais que 2 % do total de Hb (para indivíduo normal) o pH deste gradiente é próximo a 7,9 (que é próximo ao ponto isoelétrico da Hb_{A2} a 4° C). Com o início da eluição da Hb A₂, o gradiente de pH foi mantido constante para a saída desta fração protéica, só então foi voltado a aumentar o gradiente de B, até desprendimento da fração de Hb A₀ que elui próximo a 100 % de tampão B.

A solução de Hb A₀ coletada foi desionizada em coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA

Após todos estes passos a pureza foi checada realizando uma eletroforese não desnaturante - PAGE, e visualização por impregnação do gel em nitrato de prata (Laemmli, 1970).

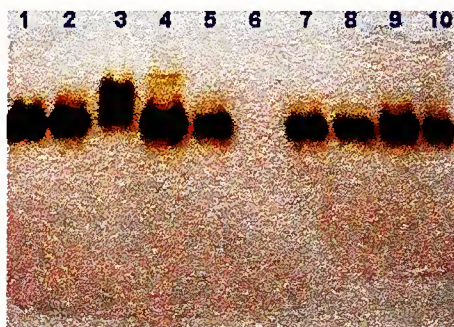


Figura 6: Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida a 7%, pH 9,16, não desnaturante corado por impregnação de AgNO₃. As bandas nas posições 1, 2, 5, 7, 8, 9 e 10 representam a fração de Hb A₀ após a purificação (nota-se a presença de apenas uma fração); a banda na posição 3 representa a fração de Hb A₂ separada por cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephadex A-50 com gradiente de pH (nota-se a presença de duas frações); a banda na posição 4 representa a fração de Hb antes da purificação (nota-se a presença de três frações).

Conferido a pureza da amostra da fração A₀, a solução de proteína foi concentrada até próxima a 10 mM/heme, medido por espectrofotometria (descrito abaixo), e armazenada em pequenas alíquotas em N₂ líquido.

3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A determinação da concentração protéica foi feita basicamente por espectrofotometria. Neste trabalho foi utilizado um aparelho Cary 3E ou um Cary 3Bio UV – Visible.

A determinação da concentração protéica foi feita com base no método quantitativo espectrofotométrico (Riggs, 1981). A equação 13 representa uma proporção das absorbâncias aferida em um dos picos característicos para a oxi-Hb (576 nm) e do valor correspondente à linha de base (700 nm):

$$[\text{Hb}] = \frac{(\text{Abs}_{576} - \text{Abs}_{700}) \cdot (V_{\text{diluição}} + V_{\text{Hb}})}{(\epsilon_{576} \cdot V_{\text{Hb}})} \quad (13)$$

onde, [Hb] é a concentração da hemoglobina em mM/heme, Abs₅₇₆ e Abs₇₀₀ correspondem às absorbâncias nos pico de absorção para a oxi-Hb e valor da linha de base da leitura espectral, respectivamente, V_{diluição} + V_{Hb} volume total da amostra na cubeta lida no espectrofotômetro e ϵ_{576} o coeficiente de extinção molar para a oxi-Hb em 576 nm (Benesch *et al.*, 1973).



A formação de meta-Hb (oxidação do ferro do grupo heme da Hb de $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) pode interferir com os resultados de efeito Bohr. Então ao final de cada experimento a concentração de meta-Hb, era dosada seguindo a equação descrita por Riggs:

$$A_{576} = [\text{oxi} - \text{Hb}] \epsilon_{576}^{\text{oxi}} + [\text{meta} - \text{Hb}] \epsilon_{576}^{\text{meta}} \tag{14a}$$

$$A_{630} = [\text{oxi} - \text{Hb}] \epsilon_{630}^{\text{oxi}} + [\text{meta} - \text{Hb}] \epsilon_{630}^{\text{meta}} \tag{14b}$$

onde, [meta-Hb] e [oxi-Hb] são as concentrações molares da proteína oxidada e não oxidada, respectivamente.

Para $\epsilon_{630}^{\text{oxi}} = 0,014.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{576}^{\text{oxi}} = 1,58.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{630}^{\text{meta}} = 0,376.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{576}^{\text{meta}} = 0,414.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, correspondem aos coeficientes de extinção molar para a oxi-Hb e meta-Hb, respectivamente, em pH igual a 7,2 nos comprimentos de ondas de 630 e 576 nm (Benesch *et al.*, 1973) e Abs é a leitura, em D.O. nos comprimentos de onda de 576 e 630 nm.

3.3. MEDIDAS VIA EQUAÇÃO DE “LINKAGE”

3.3.1. Determinação das Curvas de Oxigenação

As curvas de oxigenação foram determinadas pelo método de Imai que consiste da combinação da polarimetria, que afere a quantidade de O_2



dissolvido em solução com a determinação simultânea da saturação da Hb por oxigênio ($\bar{Y}$) medida por espectrofotometria (Imai, 1982). A combinação destes dois métodos determinam a curva de equilíbrio de oxigenação (OEC) da Hb e possibilita saber a saturação relativa da proteína em determinada pressão de oxigênio (Imai, 1981).

A comparação deste método com outros métodos de oxigenação, o método de oxigenação dinâmico apresenta algumas vantagens, tais como, visualizar o curso do experimento, fornecer um grande número de pontos experimentais para a construção da curva de oxigenação, e alta precisão.

3.3.2. Determinação das Curvas de Oxigenação Utilizando o Método Dinâmico

A figura 7 mostra um esquema da cela, utilizada para os experimentos de oxigenação da Hb.

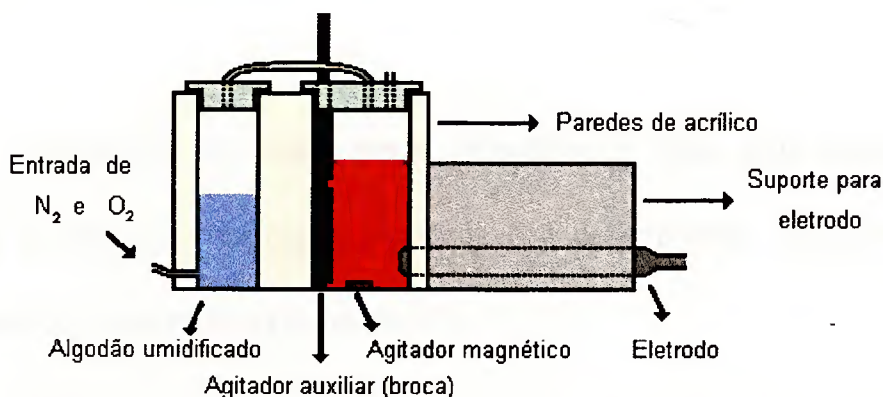


Figura 7: Esboço da cela utilizada nos experimentos. A cela é composta por duas câmaras sendo que a primeira contém algodão umedecido por onde passa o gás (N_2 e O_2). Dessa câmara o gás vai, por intermédio de um capilar, para a segunda onde está a solução de Hb. Nessa câmara se encontra o agitador auxiliar.

a) A determinação da saturação ($\bar{Y}$) por espectrofotometria.

A figura 8 mostra o espectro para os dois estados característico da Hb (R e T). O espectro que apresenta dois picos de absorbâncias, em 540 e 576 nm, caracteriza o estado oxi (R) e o espectro com pico de absorbância em 555 nm caracteriza o estado desoxi (T).

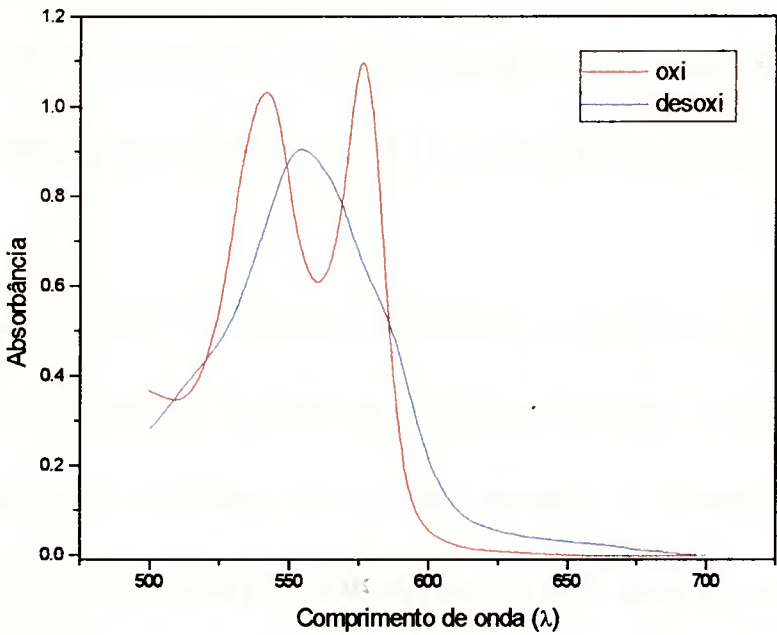


Figura 8: Espectro de absorção da hemoglobina na região do visível nas formas totalmente oxigenada e desoxigenada. Concentração da proteína = 60µM / heme.

O espectro de uma espécie cromófora é dado pela capacidade de absorção de luz que esta espécie possui, e é determinada seguindo a lei de Beer-Lambert, mostrada na equação 15:

$$\text{Abs}_\lambda = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_\lambda \cdot \ell \cdot C \quad (15)$$

onde, I_0 e I são as intensidades de luz incidente e transmitida da amostra, respectivamente, C é a concentração molar da amostra, ℓ é o comprimento do caminho óptico percorrido pela luz na amostra (em cm), ϵ_λ é o coeficiente de extinção molar do cromóforo em determinado comprimento de onda (λ , em $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e Abs_λ a absorbância (em D.O.), conforme proposto em Tinoco *et al.*, 1995.

Para espécies cromóforas diferentes a Abs varia em função da diferença dos coeficientes molares de cada uma, ou seja, a medida pode ser acompanhada pela diferença de ϵ_λ no mesmo λ . Neste trabalho foi acompanhado a oxigenação e a desoxigenação, pelo pico da oxi-Hb em 576 nm, sendo que para este comprimento de onda o $\epsilon_{576}^{\text{oxi}} = 1,58 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e para $\epsilon_{576}^{\text{desoxi}} = 0,97 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Benesch *et al.*, 1973).

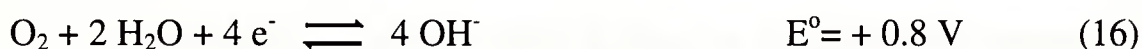
b) Determinação da concentração de O_2 dissolvido em solução.

A determinação da concentração de oxigênio dissolvido na solução foi feita utilizando um eletrodo de O_2 (YSI 5331) que permite medir a concentração de O_2 de forma direta, expressado como pO_2 .

O eletrodo de oxigênio é um sistema polarográfico completo formado por um cátodo de platina e um ânodo de prata em solução padrão de

KCl (que proporciona a condutividade elétrica). A este eletrodo é acoplado uma membrana de teflon (“HIGH SEN’S 7230 –R53(YSI 5776)), fixada por anel de borracha.

A solução de Hb somente entra em contato com a membrana de teflon, desta forma o eletrodo não possui contato direto com a solução de Hb. O aparecimento da corrente se deve à redução do oxigênio que se encontra sobre a membrana, conforme a expressão 16:



onde E° é o potencial padrão de redução do oxigênio (Atkins, 1990).

O gradiente de O_2 foi criado sobre a membrana, sendo que a velocidade de difusão do gás era diretamente proporcional à concentração de O_2 dissolvido em solução. A corrente elétrica produzida é interpretada por um medidor de oxigênio que converte a corrente elétrica gerada em voltagem, utilizando a queda de potencial de um resistor (Caon e Colombo, 1997).

A figura 9 demonstra o circuito do oxímetro que foi utilizado para as medidas das curvas de oxigenação.

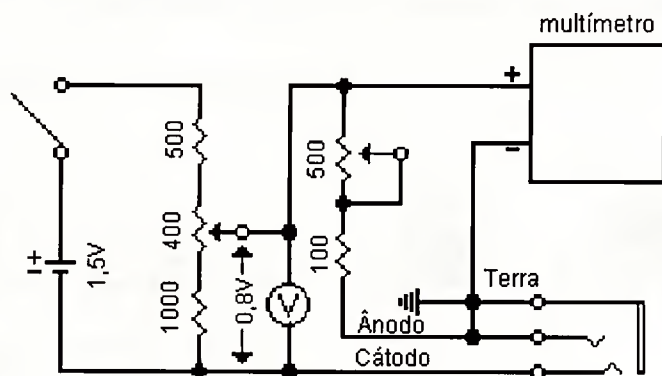


Figura 9: Circuito utilizado para polarizar o eletrodo com uma diferença de potencial (d.d.p.) de 0.8 V. Quanto maior for a concentração de O_2 na solução, menor é a resistência elétrica no circuito, e quanto menor for a concentração de O_2 na solução, maior é a resistência elétrica no circuito. Assim essa variação de O_2 é diretamente proporcional a variação de tensão a ser registrada ("Instructions for YSI 5331 Oxygen Probe"- YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio 45387 USA).

A diferença de potencial (ddp) gerada era imediatamente registrada por um multímetro (HP 34401A), e a conversão de voltagem à pressão de O_2 , foi calculada segundo a equação 17:

$$pO_2 = p_t \cdot \left(\frac{V_i - V_{\min}}{V_{\max} - V_{\min}} \right) \quad (17)$$

onde, p_t é a pressão relativa de O_2 (calculada pelo produto da % de O_2 na mistura gasosa pela diferença da $P_{\text{barométrica}}$ com a $P_{\text{vapor d' água}}$), V_i é o valor para uma voltagem qualquer em sua determinada pO_2 , $V_{\min}$ é o menor valor da tensão correspondente e $V_{\max}$ é a tensão correspondente ao máximo de pO_2^* .

A figura 10 demonstra o esquema de todos os equipamentos usados pelo método de oxigenação contínua, em que através da cela (figura 7)

*Obs.: Os valores de $V_{\max}$ e $V_{\min}$, são encontrados para cada solução experimental, ou seja, os valores de voltagem máxima e voltagem mínima são encontrados para cada solução de experimento, uma vez que a constante de Henry depende da constituição da solução.

consegue aferir a quantidade de O_2 difundida na solução como a leitura espectrofotométrica da solução de Hb.

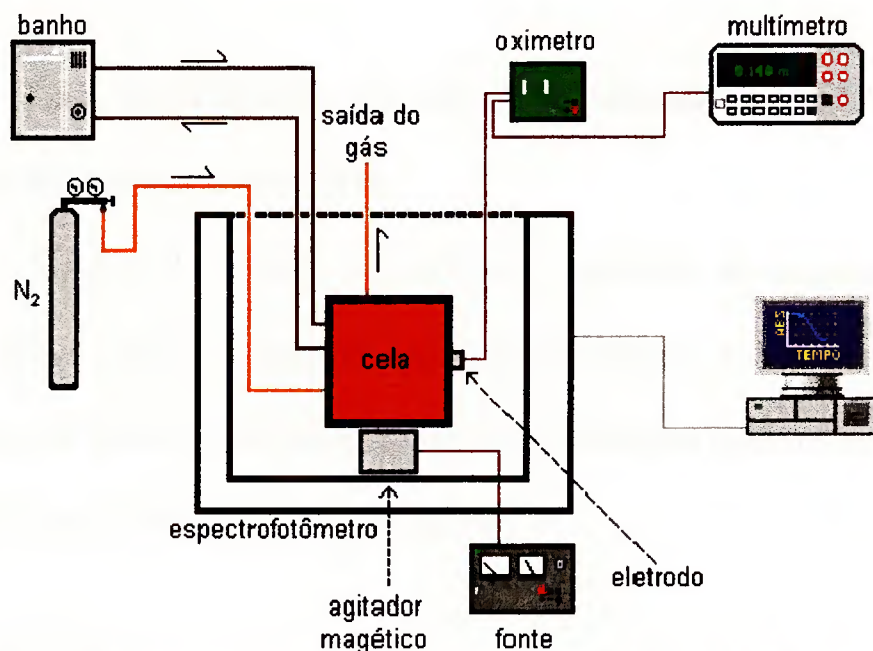


Figura 10: A figura acima esquematiza os equipamentos utilizados pelo método de oxigenação automático. A parte central representa a cela montada em um suporte para o espectrofotômetro Cary 3E Varian ou Cary 3Bio Varian. Um agitador magnético, que está ligado a uma fonte, e montado sob o suporte. A entrada do N_2 gasoso ocorre pela parte inferior da cela. O eletrodo de O_2 é monitorado por um circuito que envia os sinais para um multímetro hp 34401A. A temperatura do sistema é controlada por um banho Neslab RTE 221. A mudança da absorbância da solução de Hb, quando sobre ela variamos a pO_2 , em apenas um comprimento de onda, é acompanhada visualmente e armazenada em um computador para posterior cálculos dos parâmetros funcionais da proteína.

Todos os experimentos realizadas neste trabalho foram feitos a temperatura de 25 °C, mantidos nesta temperatura por um banho térmico Neslab RTE 221.

O gradiente decrescente da pO_2 na solução protéica, é induzido com a passagem do N_2 utilizado para desoxigenar a Hb, e mantido até completa desoxigenação da amostra, que podia ser acompanhada pela queda de Abs e voltagem até valores constantes. Valores de voltagem e Abs constantes garantia-nos a completa desoxigenação da Hb. Para oxigenar a proteína

suspendia-se o fluxo de N₂ e era permitida a entrada de ar atmosférico na câmara com a solução de Hb.

3.3.3. Determinação da Curva de Oxigenação Paralelo a Fração de Sítios de O₂ Ocupados na Hb

A figura 11 mostra uma curva de equilíbrio de oxigenação da Hb típica. Estes dados experimentais correspondem a uma solução de concentração aproximadamente igual a 0,08 mM/heme com 0,5 mM NaCl em tampão Hepes 10 mM para pH igual a 7,4.

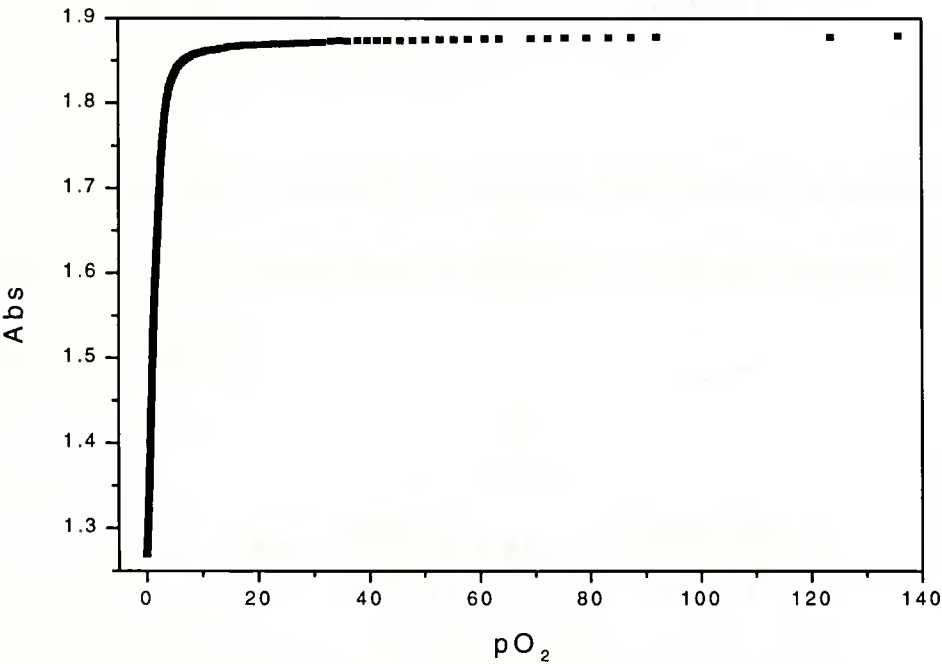


Figura 11: A figura 11 corresponde a curva de oxigenação da Hb, para a Hb (0,08 mM/heme), onde a pO₂ é dada em mmHg e a Abs em densidade óptica. Note que para a pO₂ igual a zero é aferido o menor valor da Abs.

A $\bar{Y}$ (fração de sítios ocupados) é calculada pela diferença dos valores de pO_2 , relacionando a concentração de Hb oxigenada com a concentração total da Hb ($[oxi] + [desoxi]$), expressa pela equação 18:

$$\bar{Y} = \frac{[oxi - Hb]}{[oxi - Hb] + [desoxi - Hb]} = \frac{[oxiHb]}{[Hb_{total}]} \quad (18)$$

A equação 18 relaciona 2 espécies cromóforas, oxi-Hb e desoxi-Hb, e segundo a lei de Beer-Lambert, encontramos:

$$Abs_i = (\epsilon_{576}^{oxi} \cdot [oxiHb] \cdot \ell) + (\epsilon_{576}^{desoxi} \cdot [desoxiHb] \cdot \ell) \quad (19)$$

Rearranjando a equação 19 segundo Beer-Lambert e a concentração de oxi-Hb e desoxi-Hb, como sendo a fração que cada uma possui na solução, chegamos à equação 20:

$$Abs_i = Abs_{oxi} \frac{[oxiHb]}{[Hb_{total}]} + Abs_{desoxi} \frac{[desoxiHb]}{[Hb_{total}]} \quad (20)$$

Sendo:

$$\frac{[\text{oxiHb}]}{[\text{Hb}_{\text{total}}]} + \frac{[\text{desoxiHb}]}{[\text{Hb}_{\text{total}}]} = 1 \quad (21)$$

Substituindo a equação 18 na equação 21, chegamos a fração molar para a desoxi-Hb, na equação 22:

$$\frac{[\text{desoxiHb}]}{[\text{Hb}_{\text{total}}]} = 1 - \bar{Y} \quad (22)$$

Assim, podemos rescrever a equação 20 como:

$$\text{Abs}_i = \text{Abs}_{\text{oxi}} \bar{Y} + \text{Abs}_{\text{desoxi}} (1 - \bar{Y}) \quad (23)$$

Isolando da equação 23 $\bar{Y}$, chegamos a equação 24:

$$\bar{Y} = \frac{\text{Abs}_i - \text{Abs}_{\text{desoxi}}}{\text{Abs}_{\text{oxi}} - \text{Abs}_{\text{desoxi}}} \quad (24)$$

onde, Abs_i é a absorbância em um determinado ponto da curva de oxigenação, Abs_{oxi} e $\text{Abs}_{\text{desoxi}}$ são as absorbâncias para os estados totalmente oxigenados e totalmente desoxigenados para a Hb, respectivamente.

A extrapolação dos pontos de maior Abs (quando a Hb encontra-se oxigenada) definimos como A_{∞} e a extrapolação dos pontos de menor Abs (quando a Hb encontra-se desoxigenada) definimos como A_0 .

Segundo Imai, os valores para A_{∞} e A_0 , determinam os valores das absorbâncias na máxima saturação de oxigênio na Hb e a absorbância da Hb na menor pressão de O_2 possível (Imai, 1982).

Desta forma a interpretação dos resultados de $\bar{Y}$ é definida pelas extrapolações A_{∞} e A_0 , mostrado na equação 24.

3.3.4. Medidas do Efeito Bohr Alcalino, via a Dependência de P_{50} com pH.

A equação de “linkage” de Wyman, pode ser determinada por $\Delta n_{H^+} = n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}$ (equação 12, pág. 19), permitiu-nos determinar a diferença (Δn_{H^+}) entre o número de prótons ligados aos estados, oxigenado ($n_{H^+}^{oxi}$) e desoxigenados ($n_{H^+}^{desoxi}$) da proteína. O decréscimo de P_{50} com o aumento do pH na região alcalina propicia a ligação de H^+ à Hb.

Portanto o efeito Bohr alcalino podia ser medido, determinando as curvas de oxigenação a diferentes pHs, e construindo o gráfico de $\log(P_{50})$ contra pH. A inclinação neste gráfico, a um determinado valor de pH, fornecia-nos o número de prótons que forem ligados ou desligados na

transição entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb.

Neste trabalho o efeito Bohr alcalino foi medido realizando experimentos em pHs 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 e 7,8, para duas condições distintas; em baixa concentração de NaCl (0,5mM) e alta concentração de NaCl (100mM).

3.4. MEDIDAS DIRETAS DE EFEITO BOHR ALCALINO POR TITULAÇÃO DA Hb TOTALMENTE OXIGENADA E TOTALMENTE DESOXIGENADA.

O efeito Bohr alcalino, que corresponde à diferença entre o número de prótons ligados à Hb totalmente oxigenada e a Hb totalmente desoxigenada, pode também ser medido diretamente por titulação potenciométrica de prótons ligados à Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada.

Esta determinação pode ser feita, por exemplo, determinando independentemente o número de prótons ligados à desoxi-Hb (e à oxi-Hb) mantendo a força iônica fixa e variando o pH. Uma via alternativa é manter o pH constante e variar a força iônica. É bem documentado que em pHs alcalinos, o aumento da força iônica da solução de oxi ou desoxi-Hb aumenta o pK aparente desta proteína. Portanto, com o aumento da força iônica, por



exemplo com a adição de soluções de NaCl, o pH da solução de Hb aumenta, devido à ligação de um determinado número extra de prótons que são ligados à proteína. A titulação do pH da solução de Hb com solução de HCl de volta ao valor original, anterior à adição de cloreto, permitiu-nos determinar o número extra de prótons ligavam-se à Hb, devido ao aumento da força iônica. Este número foi obtido pela relação estequiométrica abaixo:

$$\frac{n_{H^+}}{Hb} = 4 \frac{[HCl].V_{HCl}}{[Hb].V_{sol}} \quad (25)$$

onde: n_{H^+}/Hb é o número de prótons que se ligam por tetrâmero de Hb com a adição de sal. O número de H^+ que se ligam à Hb é dado por $n_{H^+} = [HCl].V_{HCl}$, onde $[HCl]$ é a concentração de HCl, igual a 5,0 mM, e V_{HCl} é o volume de ácido que é adicionado à solução de Hb necessário para voltar o pH ao valor original. O número de moles de Hb na solução $Hb = [Hb].V_{sol}$, onde $[Hb]$ é a concentração da Hb, que é aproximadamente igual a 0,5 mM/heme, e V_{sol} é o volume de solução de Hb, igual a 3,0 mL.

As concentrações das soluções de NaCl e de HCl, usadas para aumentar a força iônica e titular o pH de volta ao seu valor definido à concentração de NaCl igual a 0,5 mM, foram padronizadas medindo a

concentração osmolal destas soluções em osmômetro automático Precision Systems, Inc., modelo Osmette. A conversão da escala osmolar para a escala de moles/litro foi feita usando valores tabelados no Handbook of Chemistry and Physics, 68th, 1987 - 1988, pág. D-232 – D-254. Foram usadas três soluções de NaCl de concentrações 1,0, 3,1 e 4,4 M, e duas soluções de HCl 0,15 e 0,005 M.

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando um medidor de pH (CORNING *pH/ion* analyzer 350), com eletrodo INGOLD 405-M5-S7/80. A calibração do aparelho foi realizada condicionando o eletrodo em soluções de pH padrão (INGOLD) 7,00, 4,01 e 9,21. Este condicionamento consiste em calibrar o eletrodo com estes tampões, alternando as seqüências de medida das soluções, até que a resposta do eletrodo seja imediata a qualquer uma das soluções padrão utilizadas na calibração.

Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente de 25 °C em uma cela, adaptada a “mini-vials” de 5,0 mL ALLTECH QC 325 com agitador magnético, e controle de gás, conforme ilustração da figura 12:

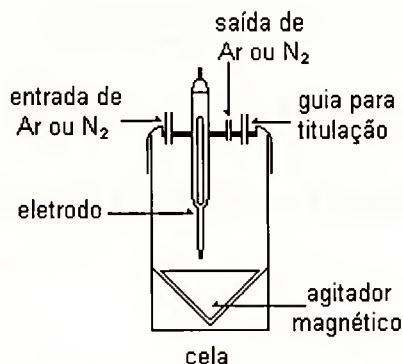


Figura 12:- A figura representa a cela "mini-vials", de fundo cônico, com capacidade máxima de 5 mL. Esta cela permite a manipulação das soluções de Hb em ambiente gasoso controlado, formando um fluxo de ar sintético ao manipular oxi-Hb e fluxo de N₂ para a desoxi-Hb.

Nos experimentos com a desoxi-Hb, a garantia de estarmos trabalhando com a Hb totalmente desoxigenada é obtida com a estabilização do pH da solução. Nos experimentos com a oxi-Hb devemos garantir a ausência de CO₂ dissolvido na solução. Para tanto expomos a solução de oxi-Hb a um fluxo contínuo de ar sintético (O₂ = 20% ± 1%, H₂O ≤ 5 ppm e N₂ q.s., Oxigênio do Brasil) até que o pH da oxi-Hb também estabilize.

Das curvas de n_{H^+}/Hb versus a concentração de NaCl obtidas por titulação da Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada, encontra-se a variação do número de prótons (Δn_{H^+}) a pH constante.

3.5. INTERAÇÃO IÔNICA E TEORIA DE DEBYE-HUCKEL

A dependência do pK de grupos protonáveis com a força iônica é dada pela teoria de Debye – Huckel. Considere por exemplo, o equilíbrio ácido – base para um resíduo de histidina:



onde His, é a base (B), e HHis⁺ é o ácido (A). O equilíbrio entre estas duas espécies é dado pela equação de Henderson – Hasselbach.

$$\text{pH} = \text{pK}_a^0 + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} + \log \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \quad (27)$$

onde, γ_A e γ_B , representam o coeficiente de atividade do ácido e da base à dada concentração iônica, respectivamente, e, pK_a^0 é a constante de dissociação do resíduo à força iônica nula.

A teoria de Debye – Huckel prevê, para valores de força iônica moderada, que o coeficiente de atividade γ_i é dada pela equação 28 (Edsall & Wyman, 1958):

$$\log \gamma_i = \frac{P(Z_+Z_-)\sqrt{I}}{1 + Qa\sqrt{I}} + K_s I \quad (28)$$

onde: Z_+ é a carga do ácido e Z_- a carga da base; P é uma constante de valor igual a 0,5 para a água à 25 °C (Edsall & Wyman, 1958); I é a força iônica, Qa é chamado de “diâmetro de colisão” sendo que o denominador Q é proporcional a $\sqrt{DT}$ (sendo D a constante dielétrica da água e T a temperatura). Usualmente, o valor de Qa para um par ácido – base é igual a 1; e K_s é um parâmetro empírico para íons na ausência de sal.

Para a carga do ácido A igual a Z e da sua base conjugada B igual a Z - 1, podemos expressar que o $\log \frac{\gamma_B}{\gamma_A}$ segundo a equação 29:

$$\log \frac{\gamma_B}{\gamma_A} = \frac{-0.5(-2Z+1)\sqrt{I}}{1+Qa\sqrt{I}} \quad (29)$$

Note que o termo $K_s I$ (equação 28) desaparece, pois $K_s^B I \cong K_s^A I$, são constantes na ausência de sal (Edsall & Wyman, 1958).

Para a histidina monoprotonada de carga do ácido $Z_+ = 1$ o $\log \frac{\gamma_B}{\gamma_A}$ é dado pela equação 30:

$$\log \frac{\gamma_B}{\gamma_A} = \frac{0.5\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad (30)$$

Substituindo este valor na equação de Henderson – Hasselbach (equação 27) e rearranjando-a, Segunda equação 31:

$$\log \frac{\alpha_i}{1-\alpha_i} = \text{pH} - \text{pK}_a^0 - \frac{0.5\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} \quad (31)$$

onde: α_i é o grau de dissociação do ácido, que é determinado pela equação 32:

$$\alpha_i = \frac{10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^0 - \varpi)}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a^0 - \varpi)}} \quad (32)$$

Equação esta obtida após rearranjar α_i na equação anterior (equação

31) e definir $\varpi = \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \cdot *$

Obs.: (*) Note que o valor que precede o termo $\sqrt{I} / 1 + \sqrt{I}$ foi considerado 1 na definição de ϖ . Este depende da carga do ácido considerado, podendo ser 0,5 para ($\text{His} \rightleftharpoons \text{HHis}^+$) ou 1,5 para ($\text{HHis}^+ \rightleftharpoons \text{HHis}^{2+}$).

4) RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. A INTERFERÊNCIA DO EFEITO BOHR NA AFINIDADE DA HEMOGLOBINA PELO O₂

A figura 13 mostra as curvas de oxigenação da Hb obtidas em nossos experimentos em valores de pH iguais à 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 e 7,8. As medidas foram realizadas em solução protéica de aproximadamente 90 µM/heme, em tampão Hepes 10 mM e 100 mM NaCl:

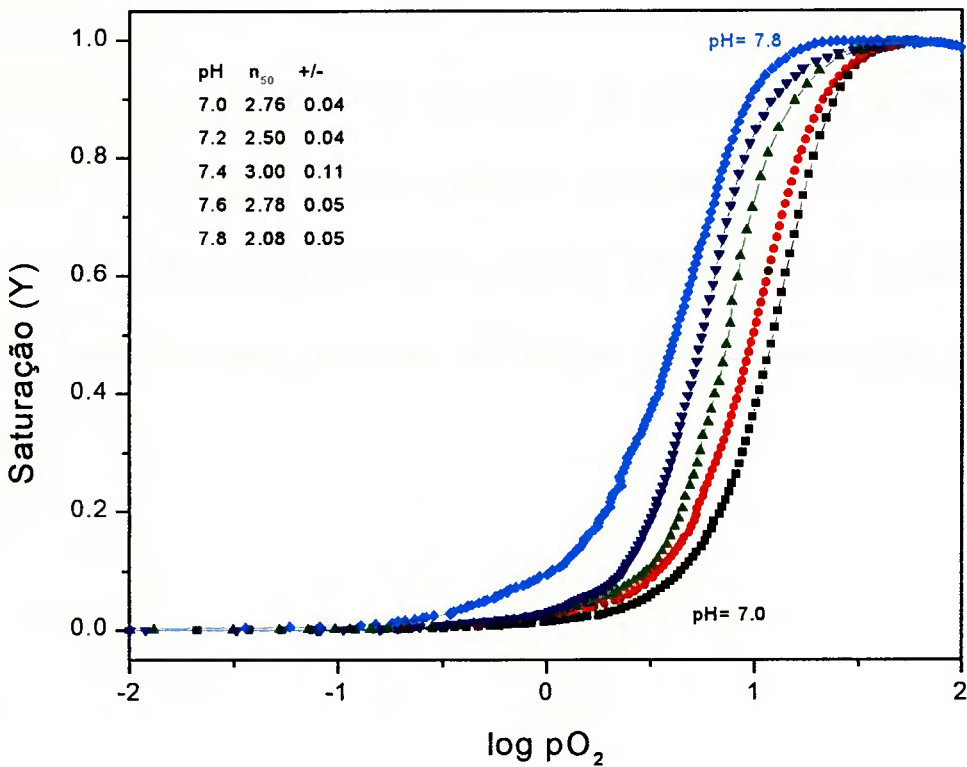


Figura 13: A figura representa a construção de várias curvas de oxigenação para diferentes pHs (■) 7,0, (●) 7,2, (▲) 7,4, (▼) 7,6 e (◆) 7,8, em concentração protéica de aproximadamente 90 µM/heme, na presença de 100 mM de NaCl, em tampão Hepes 10 mM. Podemos notar que a afinidade da Hb A₀ pelo O₂, aumenta com o aumento do pH, Y igual a 0,5 representa a metade da transição e a tabela na figura mostra os coeficiente de Hill (n₅₀) para cada curva.

Observa-se que com o aumento do pH da solução, as curvas deslocam-se para a esquerda, mostrando que a afinidade da proteína pelo oxigênio aumenta com o aumento do pH. Isto indica que a ligação de O_2 é acompanhada pela liberação de prótons. Este aumento da afinidade da Hb com o aumento do pH, implica em que o equilíbrio conformacional desloca-se no sentido da conformação de mais alta afinidade por O_2 , a conformação R. Portanto esta observação também implica que a transição $T \Rightarrow R$ é seguida pela liberação de prótons.

A presença ou ausência de ânions também influencia a interdependência entre a ligação de prótons (efeito Bohr) e de moléculas de O_2 à Hb. A figura 14 mostra o comportamento da P_{50} (pressão de O_2 necessária para saturar 50 % dos sítios de ligação deste ligante) com a variação de pH, para duas condições experimentais distintas. Uma na presença de tampão Hepes 10 mM com 0,5 mM de NaCl e a outra com 10 mM de tampão Hepes, mas com 100 mM de sal, e ambas em 90 μ M de Hb (heme).



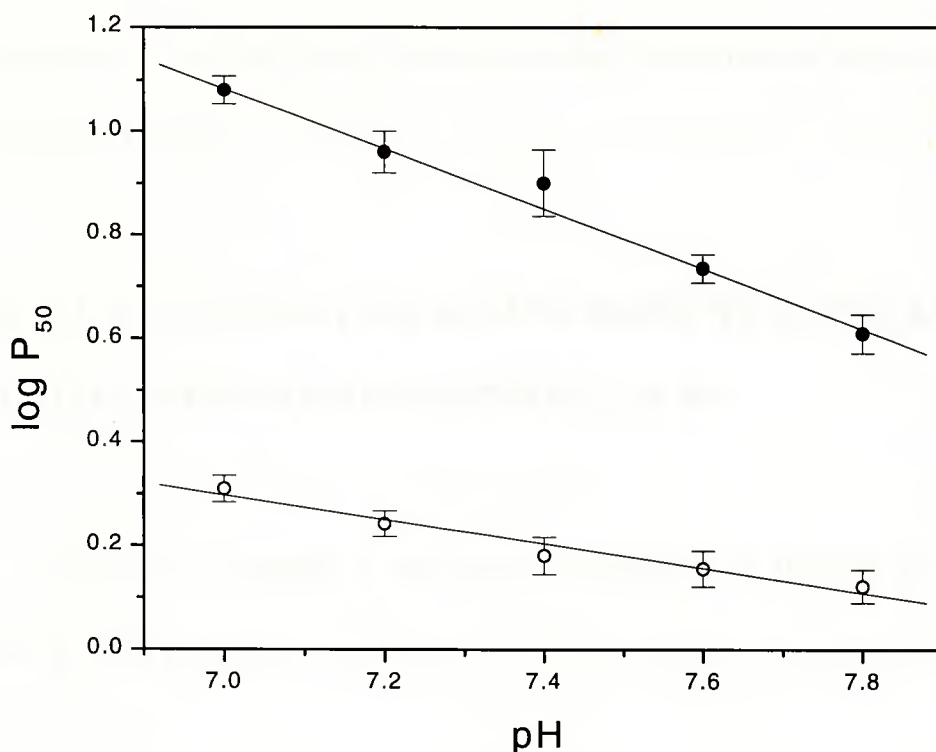


Figura 14: A figura 14 representa a variação da pressão parcial de oxigênio necessária para a saturação de 50 % dos sítios de ligação para o O₂ para a Hb na presença de 100 mM de NaCl (●) e na presença de 0,5 mM de sal (○), para os pHs indicados na figura. A inclinação para os experimentos com 100 mM de NaCl indicam que $2,2 \pm 0,12$ prótons estão sendo liberados com a oxigenação e os resultados para 0,5 mM de sal mostra que próximos a $0,98 \pm 0,12$ prótons estão sendo liberados pela Hb com a oxigenação protéica.

A figura mostra que o log (P₅₀) diminui linearmente com o aumento do pH, tanto na solução 0,5 mM quanto em 100 mM de NaCl. Entretanto, a inclinação de log (P₅₀) versus pH é mais pronunciada quando a Hb é oxigenada em solução 100 mM NaCl do que em solução 0,5 mM NaCl.

Segundo a equação de Wyman (equação 12, pág. 19) estas inclinações fornecem o Δn_{H^+} , a diferença do número de H⁺ ligados às conformações da Hb totalmente oxigenada ($n_{H^+}^{oxi}$) e totalmente desoxigenada ($n_{H^+}^{desoxi}$), i.é, $\Delta n_{H^+}^{obs} = n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}$. O ajuste linear de logP₅₀ versus pH, fornece o

$\Delta n_{H^+} (100 \text{ mM de NaCl}) = -2,2 \pm 0,12$ próton e o $\Delta n_{H^+} (0,5 \text{ mM de NaCl}) = -0,98 \pm 0,12 \text{ H}^+$.

Estes resultados estão de acordo com resultados descritos na literatura (Bucci & Fronticelli, 1985).

4.2. A INFLUÊNCIA DO EFEITO BOHR NA CONSTANTE DE LIGAÇÃO DO PRIMEIRO OXIGÊNIO (K_1) À Hb

A figura 15 mostra a variação da constante de ligação do primeiro oxigênio à Hb (K_1) contra o pH, para 100 mM de cloreto e para 0,5 mM NaCl.

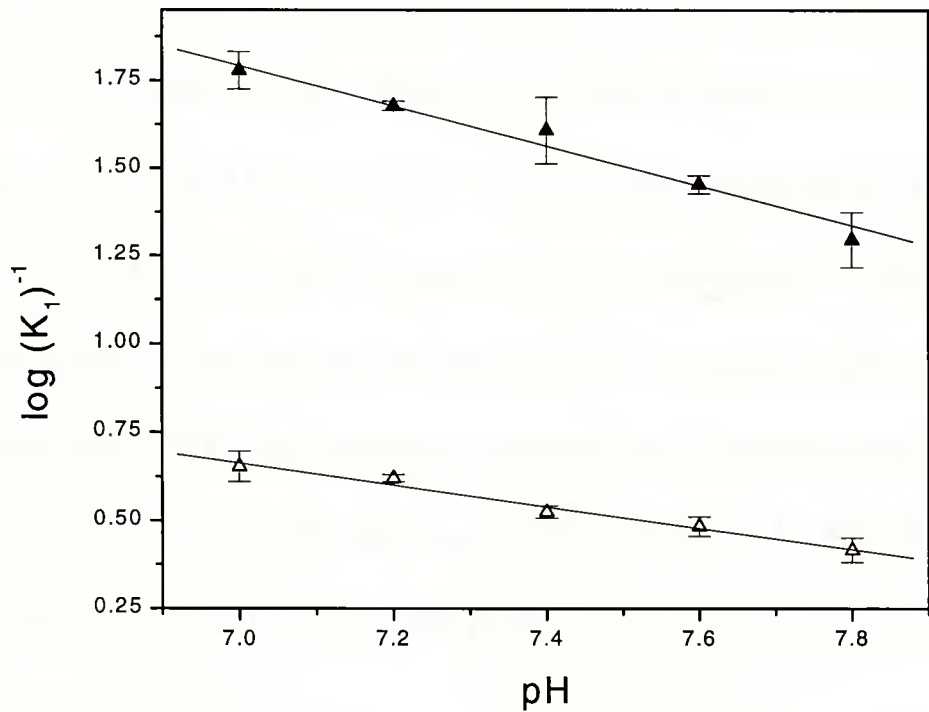


Figura 15: A figura mostra o efeito do pH em K_1 , para 100 mM de NaCl ($\blacktriangle$) e para 0,5 mM NaCl ($\triangle$). O ajuste para os pontos do $\log(K_1)^{-1}$ ao longo do pH nos fornece o número de prótons que estão associados com a saída do primeiro oxigênio da Hb, que na presença de 100 mM NaCl é de $0,57 \pm 0,03$ e na presença de 0,5 mM NaCl é de $0,31 \pm 0,03 \text{ H}^+$.

A figura mostra que o $\log(K_1)^{-1}$ diminui com o aumento do pH. A presença de NaCl pronuncia ainda mais a diminuição da afinidade da Hb pelo O_2 ao deslocar o equilíbrio $R \rightleftharpoons T$ para a estrutura de baixa afinidade pelo oxigênio.

A relação de “linkage” entre $\log K_1$ e pH, fornece a dependência da constante de dissociação do primeiro O_2 à Hb com o pH. Esta relação fornece o número diferencial de prótons que são ligados à Hb com a desoxigenação.

$$\frac{d\log(K_1)}{dpH} = \Delta n_{H^+} \quad (33)$$

A inclinação dos pontos experimentais indica o número de H^+ que são ligados à proteína com a liberação da primeira molécula de oxigênio. Na presença de 100 mM NaCl é de $0,57 \pm 0,03$ e na presença de 0,5 mM NaCl é de $0,31 \pm 0,03$ prótons por Hb. Estes resultados encontram-se em acordo com os resultados encontrados por Poyart *et al.*, 1977, em estudos da influência de concentração do KCl na constante de associação do primeiro oxigênio na Hb. Estes autores encontraram que na presença de 150 mM KCl 0,64 H^+ são liberados por Hb com a ligação do primeiro oxigênio e em 0,5 mM KCl são liberados 0,28 H^+ .



4.3. COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO BOHR E O EFEITO DE ÁGUA NA OXIGENAÇÃO DA Hb

Colombo & Seixas 1999, em estudos de variação diferencial do número de moléculas de água associadas a transição $T \Rightarrow R$ variando a concentração de NaCl, observaram que o Δn_w aumenta com o aumento da concentração do NaCl. Esta diferença de hidratação foi interpretada sugerindo a existência de um estado alostérico intermediário P da Hb* (Colombo & Seixas, 1999).

4.3.1. Comparação dos Resultados Obtidos Para Efeito Bohr com Efeito de Água Via Integração da Equação de Gibbs – Duhem

O número de moléculas de oxigênio (n_{O_2}) ligados à Hb depende dos valores de atividade de O_2 (p_{O_2}), da atividade de H^+ (pH) e da atividade de água (a_w) na solução protéica. A dependência da variação do número de moléculas de O_2 ligados à Hb, com a variação do número de H^+ e moléculas de água ligados á proteína, pode ser encontrado através da relação diferencial de Gibbs – Duhem (Colombo *et al.*, 1992). Esta relação descreve como o potencial químico da proteína ($d\mu_{Hb}$) varia com a atividade destes ligantes, conforme equação 34:

* Ver item: 1.4. A Existência de Estados Intermediários da Hb Durante a Oxigenação Protéica (pág. 20).



$$-\frac{d\mu_{Hb}}{RT} = n_{O_2} d\ln pO_2 + n_{H^+} d\ln a_{H^+} + n_w d\ln a_w \quad (34)$$

onde, n_i é o número de ligantes i ($i = O_2, H^+, H_2O (w)$) ligados à proteína.

A partir desta equação, a taxa de variação de n_{O_2} com o pH, medida a atividade de O_2 e água constantes, é igual à taxa de variação do número de prótons ligados à Hb com a variação de pO_2 à pH e a_w constantes. Esta relação de Maxwell está mostrada na equação 35:

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} = -2,3 \left. \frac{\partial n_{H^+}}{\partial \ln(pO_2)} \right|_{pH, aw} \quad (35)$$

A diferencial do lado esquerdo desta equação é facilmente determinada a partir das curvas de oxigenação medidas em diferentes pHs, conforme está explicitado na figura 16. Nesta figura, a linha vertical demarca um valor de pO_2 constante ($pO_2 = 10$ mmHg). Os pontos de intersecção desta linha com as curvas de oxigenação, obtidas nos diversos valores de pH, correspondem aos valores de n_{O_2} àquele valor de pO_2 e pH particulares.

*Obs.: $pH = -\log_{10}(a_{H^+})$

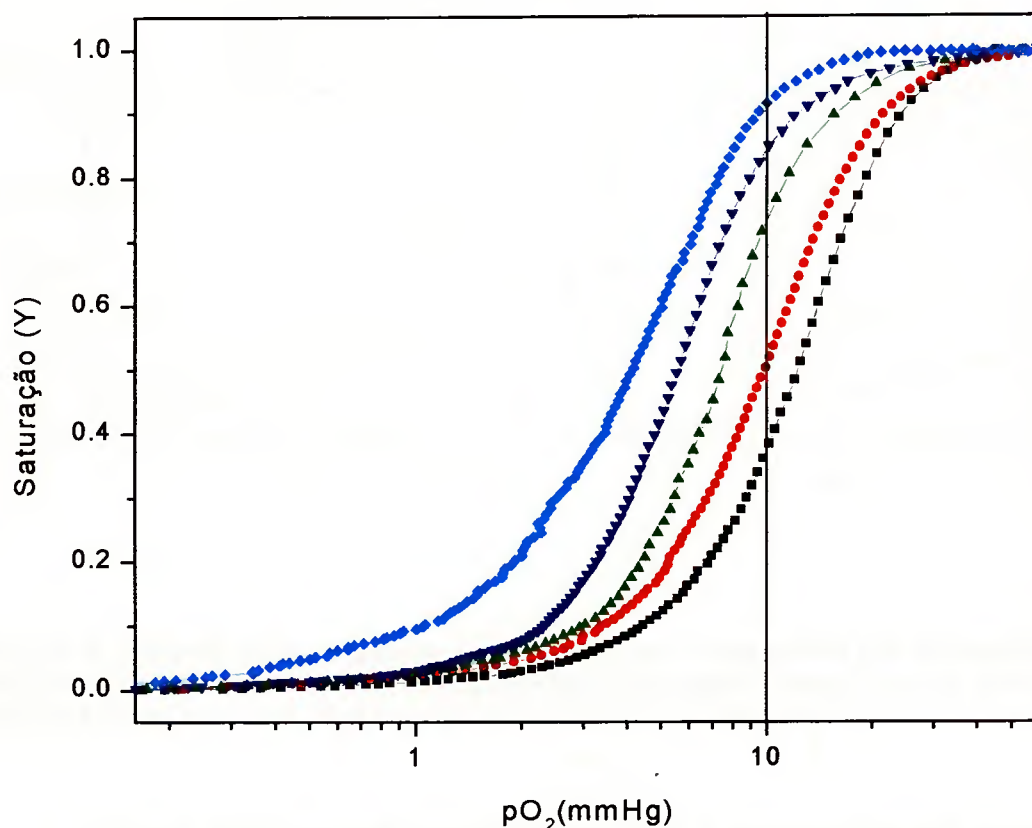


Figura 16: A figura representa a construção de várias curvas de oxigenação para diferentes pHs (■) 7,0, (●) 7,2, (▲) 7,4, (▼) 7,6 e (◆) 7,8, em concentração protéica próximo a 90 μ M/heme, na presença de 100 mM de NaCl, em tampão Hepes 10 mM. O gráfico mostra que a uma pO_2 fixa, a saturação da Hb com oxigênio aumenta.

As figuras 17 (A) e (B) mostram a variação de nO_2 , à pO_2 constante com o pH, para diferentes valores de pO_2 . Na figura 17 (A) a Hb foi oxigenada na presença de 100 mM de NaCl em tampão Hepes 10 mM, e a figura 17 (B) representa os experimentos de oxigenação da proteína na presença de 0,5 mM de NaCl em tampão Hepes 10 mM.

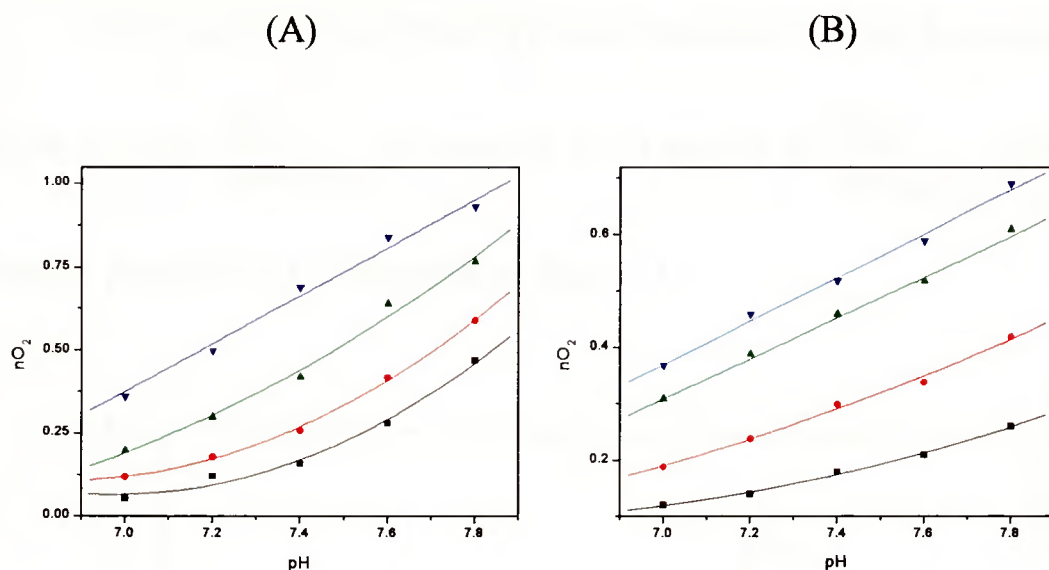


Figura 17: O gráfico da fração de saturação da Hb por O₂ para os determinados pHs, em duas condições distintas: (A) contendo 100 mM de NaCl à pO₂ (mmHg) igual a (■)3,90, (●)4,97, (▲)6,75, (▼)9,83 e (B) contendo 0,5 mM de NaCl à pO₂ (mmHg) igual a (■)0,68, (●)0,98, (▲)1,40 e (▼)1,60.

Nestes gráficos está mostrado que com o aumento do pH aumenta a saturação da Hb pelo O₂ em determinado valor de pO₂ fixo, tanto na presença de 100 mM (figura A) quanto na presença de 0,5 mM de NaCl (figura B).

O cálculo de $\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw}$ foi realizado por ajuste não linear de um

polinômio de segunda ordem às curvas de n_{O₂} versus pH. Portanto, cada curva de n_{O₂} versus pH, determinado a um dado valor de pO₂, foi descrito pela equação abaixo:

$$n_{O_2}(pO_2) = a + b.pH + c.pH^2 \quad (36)$$

e:

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} = b + 2c.pH \quad (37)$$

onde os parâmetros a, b e c, são de melhor ajuste.

Este ajuste de n_{O_2} versus pH, para cada valor de pO_2 fixo, permite

calcular o termo $\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw}$ da equação 35. O gráfico de $\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} \times \ln pO_2$,

calculado para pH= 7,3, é mostrado na figura 18:

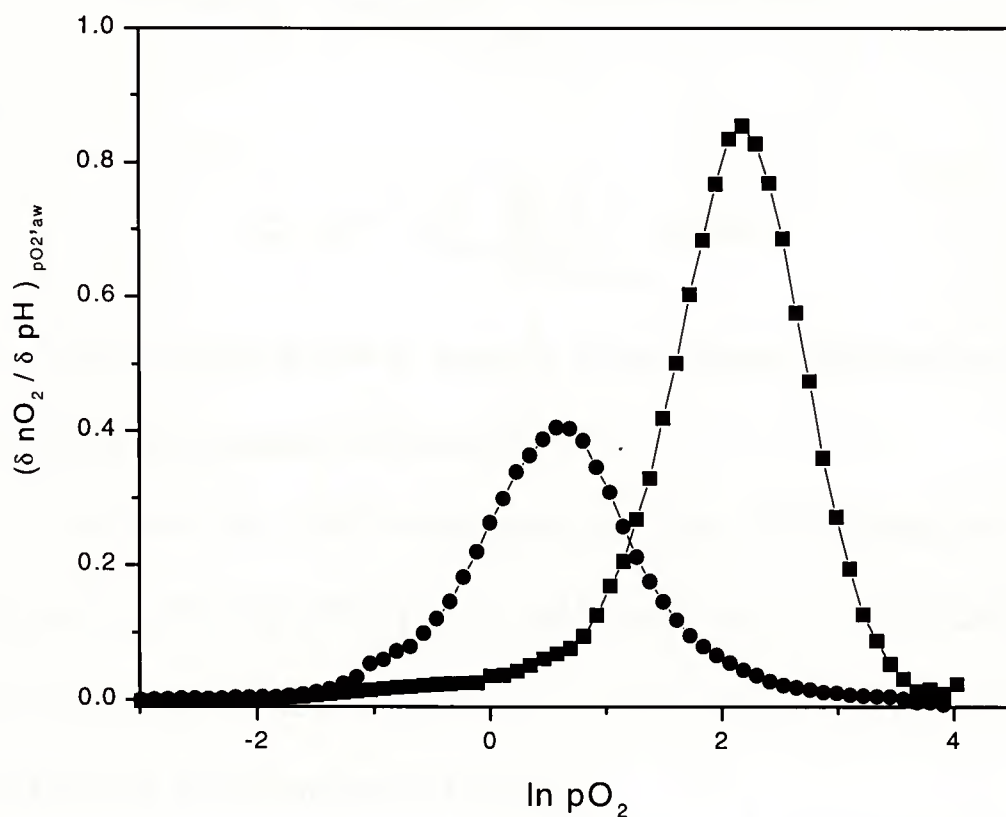


Figura 18: Representa os pontos para $(\delta n_{O_2} / \delta pH)_{pO_2, aw}$ para toda a curva de oxigenação. Os círculos representam 0,5 mM NaCl e os quadrados 100 mM NaCl.

Note que estes gráficos fornece a taxa de variação do número de H^+ ligados à proteína com a variação de $\ln(pO_2)$ ao longo da curva de oxigenação, segundo equação 35. A integral abaixo destas curvas fornecem o

número de prótons Bohr entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado por integração da equação 35; $\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} = -2,3 \left. \frac{\partial n_{H^+}}{\partial \ln(pO_2)} \right|_{pH, aw} :$

$$-2,3 \int_{desoxi}^{oxi} dn_{H^+} = \int_{desoxi}^{oxi} \left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} d \ln pO_2 = n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi} \quad (38)$$

Assim:

$$n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi} = \int_{desoxi}^{oxi} \left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right|_{pO_2, aw} d \ln pO_2 \quad (39)$$

onde o termo do lado direito da equação 39 representa a área para qualquer um dos gráficos mostrados na figura 18.

As áreas dos gráficos mostrados na figura 18 fornecem: para 100 mM, $\Delta n_{H^+} = -2,18 \pm 0,13 H^+$ e, para 0,5 mM NaCl, $\Delta n_{H^+} = -1,12 \pm 0,24$. Estes valores estão em boa concordância com os valores determinados via equação de “linkage” de Wyman (equação 12, pág.19).

A comparação entre a interferência de NaCl sobre o efeito Bohr e sobre o efeito de água na oxigenação da Hb pode ser diretamente realizado via análise deste ultimo efeito com a equação de Gibbs – Duhem.

Da equação de Gibbs – Duhem (equação 34, pág. 52), mantendo constante a_{H^+} , a dependência do número de moléculas de O_2 ligados à Hb à pO_2 fixa, com a variação de atividade de água é dado pela relação de Maxwell, mostrada na equação 40:

$$\left. \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_w} \right|_{pO_2, pH} = \left. \frac{\partial n_w}{\partial \ln(pO_2)} \right|_{aw, pH} \quad (40)$$

A relação entre efeito Bohr e efeito de água podem ser comparados ao superpondo o gráfico de $\left(\frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_w} \right)_{pO_2, pH}$ versus $\ln pO_2$ com o gráfico de $\left(\frac{\partial n_{O_2}}{\partial pH} \right)_{pO_2, aw}$ versus $\ln pO_2$ (figura 18). Estes gráficos estão mostrados na figura 19:

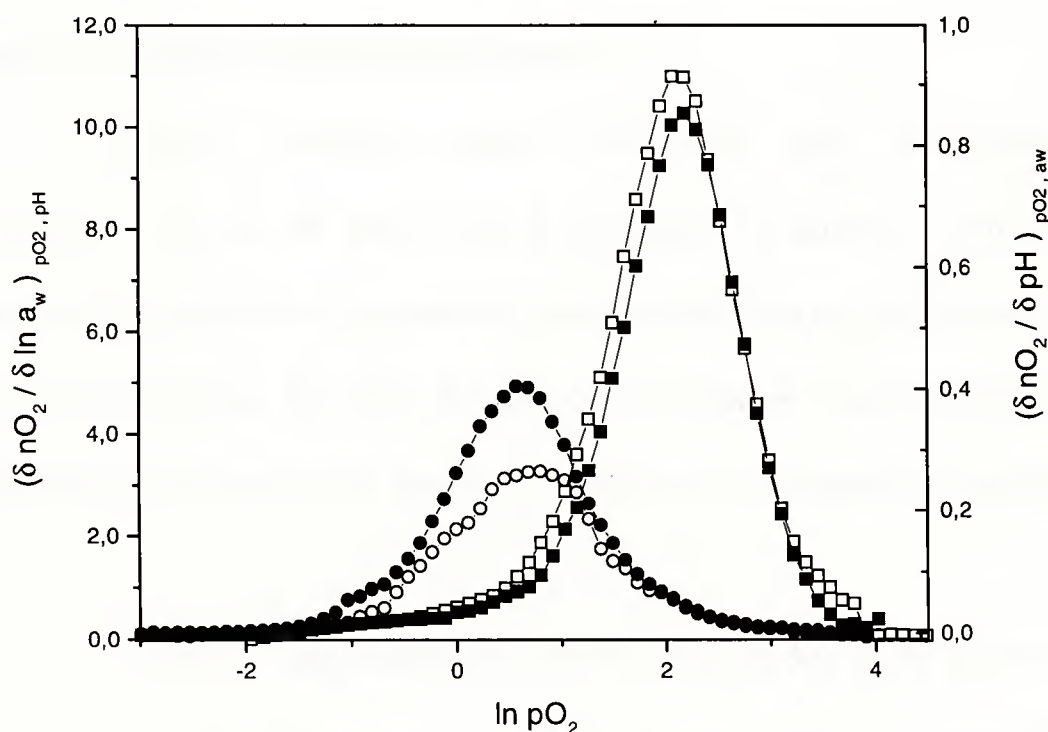


Figura 19: Está graficado a derivada parcial do número de O_2 com a atividade de água ou pH, contra pO_2 . A atividade de água está representada pelos símbolos abertos e a ligação de prótons esta representada pelos símbolos fechados, para duas condições: na ausência de sal, apresentado no gráfico por círculos e os resultados para a Hb na presença de 100 mM de Cl^- , apresentado pelos quadrados. O Δn_{aw} calculado pela integral das curvas de $(\delta n_{O_2} / \delta \ln a_w)_{pO_2, pH}$, fornece para 100 mM NaCl, 72 moléculas de água e para a ausência de NaCl 27 moléculas de água que são ligadas á proteína durante a oxigenação.

A análise dos resultados obtidos com a figura 19 mostra o paralelismo qualitativo, entre o efeito de água e o efeito Bohr, sobre a oxigenação da Hb. Podemos observar este paralelismo tanto na ausência, como na presença de 100 mM de NaCl. O comportamento que observamos para a liberação de H^+ como para a ligação de água pela Hb é de alta similaridade, ou seja, os efeitos observados para atividade de água e para efeito Bohr estão intrinsecamente relacionados.

A similaridade observada nos resultados de oxigenação da Hb para efeito de água e Bohr, mostra que há um grande suporte para os estudos de alosterismo protéico ao obtermos as mesmas informações com a utilização destes dois efetores heterotrópicos distintos.

Podemos explorar destes resultados, que as mudanças conformacionais da Hb que levam à exposição de grupos de hidratação protéico, seja também as responsáveis pela estabilização dos prótons de Bohr, devido a mudanças dos pKs dos grupos envolvidos. Esta interpretação é seguida pela simultaneidade destes efeitos durante a oxigenação da proteína.

4.3.2. Comparação dos resultados obtidos para efeito Bohr com efeito de água, via dependência do Δn_{H^+} com a concentração de NaCl

A investigação da dependência do efeito Bohr da Hb com a ligação de cloreto pode ser realizada medindo-se diretamente, por titulação



potenciométrica, a variação da carga elétrica da Hb totalmente desoxigenada e totalmente oxigenada com o aumento da concentração de NaCl em solução.

Na figura 20 podemos observar o número de prótons que são ligados à Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada, quando aumentamos a concentração de NaCl em solução protéica. Estes experimentos foram realizados à temperatura de 25 °C e pH constante de 7,2 para as duas soluções de Hb oxi e desoxi.

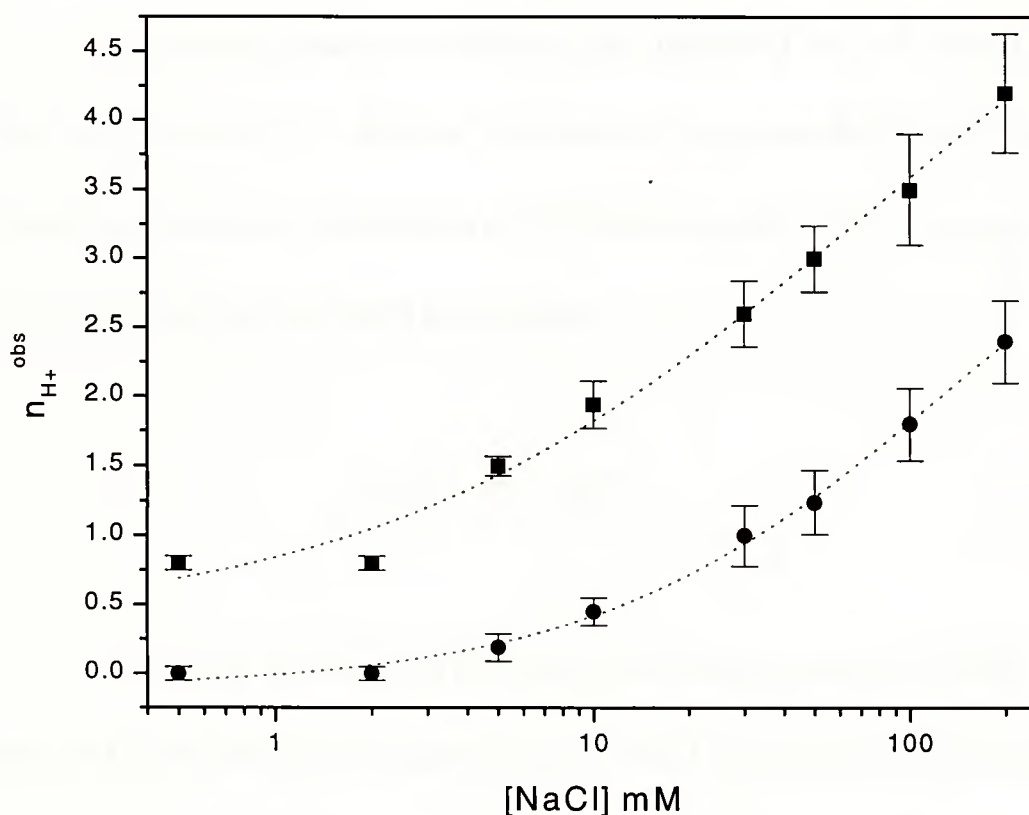


Figura 20: - A figura 20 representa a variação do número de prótons ligados à desoxi-Hb (■) e à oxi-Hb (●) nas diversas concentrações de NaCl. Esta variação é encontrada sempre em relação a 0,5 mM Cl^- , que é utilizado como ponto de referência (ponto zero). Cada ponto representa a média de no mínimo 4 experimentos e a variação de H^+ é sempre medida no mesmo valor de pH (7,2) em água miliQ na concentração protéica de 0,5 mM/heme para ambas as soluções. Na desoxi-Hb é acrescentado 0,8 ($\pm 0,1$) prótons na solução, que é a quantidade necessária de H^+ para que o pH da desoxi-Hb seja equivalente ao pH da oxi-Hb.

A figura 20 mostra que, com a adição de NaCl à solução protéica, prótons são ligados à proteína em ambos os extremos conformacionais. Entretanto, à pH 7,2, o número de prótons ligados à desoxi-Hb é maior que aquele ligado à oxi-Hb em todo intervalo de concentração de NaCl investigado. Para a desoxi-Hb, as mudanças das concentrações de NaCl em solução de 0,5 à 200 mM NaCl, implica na ligação de aproximadamente 4,2 prótons por Hb, enquanto que, para a oxi-Hb no mesmo intervalo de concentração de NaCl, a ligação máxima de H^+ é de 2,2 prótons por Hb.

A diferença entre os valores de n_{H^+} ligados à oxi e à desoxi-Hb, é obtido pela equação 41, e fornece o número de Δn_{H^+} envolvidos na transição dos estados totalmente oxigenado ($n_{H^+}^{oxi}$) e desoxigenado ($n_{H^+}^{desoxi}$), i.é, para cada valor de concentração de NaCl investigado.

$$\Delta n_{H^+}^{obs} = n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi} \quad (41)$$

O gráfico da diferença do número de prótons entre os estados oxi e desoxi da Hb em função da concentração de NaCl é mostrado na figura 21.

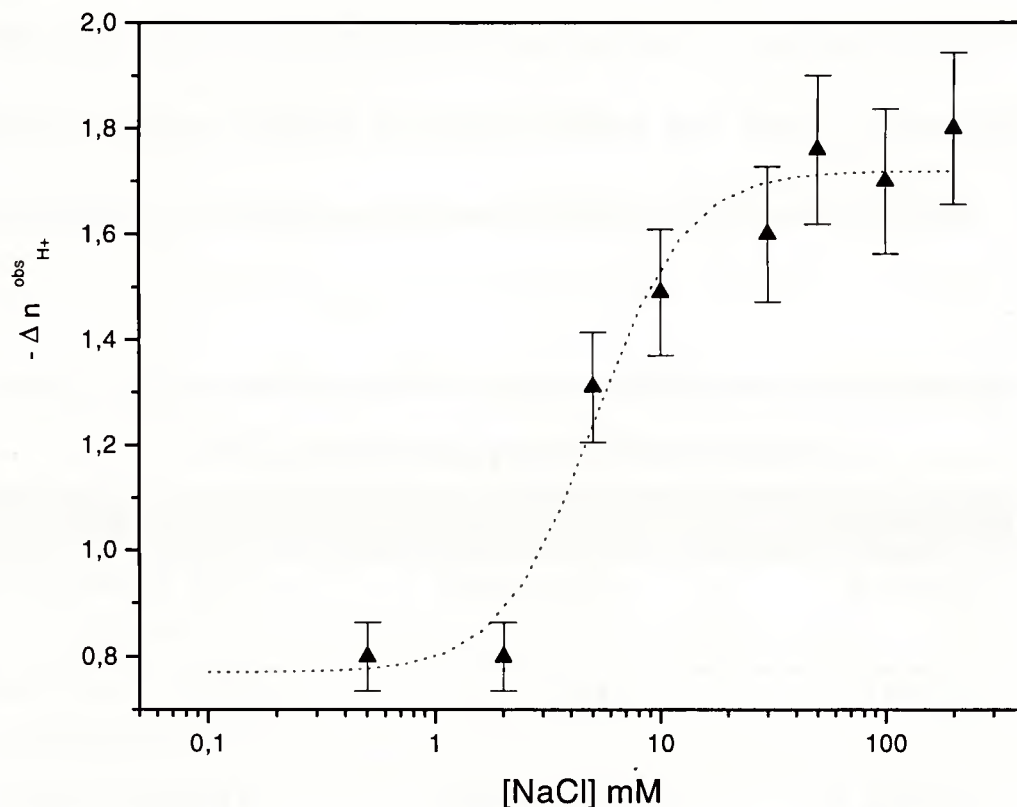


Figura 21: Este gráfico representa a variação do número de prótons entre os estado T e R da Hb. O gráfico mostra uma transição entre 0,5 e 50mM de Cl^- , e a variação do número de prótons inicia em 0,8 H^+ com 0,5 mM de Cl^- e alcança próximo a 1,8 prótons com em 50 mM NaCl, e metade da transição em aproximadamente 5,0 mM de NaCl.

Esta figura mostra que o $-\Delta n_{H^+}^{obs}$ aumenta sistematicamente de um valor de próximo a 0,8, observado em concentrações de NaCl menores que 2,0 mM, para um valor de próximos 1,8 H^+ para concentrações superiores a 50 mM NaCl.

Estes valores concordam com aqueles medidos a partir da determinação da afinidade da Hb por O_2 em função da concentração de NaCl: (a) calculados via equação de Wyman (fig. 14, pág. 48), e; (b) calculado por integração da equação de Gibbs – Duhem (fig. 18, pág. 55).

Os valores de Δn_{H^+} determinados neste trabalho em soluções de 0,5 e 100 mM NaCl, estão mostrados nas tabelas 1. Na tabela também são mostrados alguns valores de Δn_{H^+} , obtidos por outros pesquisadores e determinados em condições similares à utilizada no presente trabalho.

Tabela 1: Efeito Bohr da Hb e sua dependência com a concentração de NaCl determinada por diferentes métodos.

Métodos	0,5 mM NaCl	100 mM NaCl
Via Equação de Wyman (fig. 14)	$0,98 \pm 0,12$	$2,2 \pm 0,12$
Via Eq. Gibbs – Duhem integrada (fig. 18)	$1,12 \pm 0,24$	$2,18 \pm 0,13$
Titulação Direta da Hb (fig. 21)	$0,80 \pm 0,10$	$1,80 \pm 0,13$
Valores Publicados na Literatura	$1,25^{(1)a}$ $1,12^{(2)a}$ $1,00^{(3)a}$	$2,00^{(1)b}$ $2,60^{(2)b}$ $2,20^{(3)b}$

(1) Rollema *et al.*, 1975: a - 5.0 mM e b - 150 mM de KCl.
(2) Fronticelli *et al.*, 1994: a - ausência de ânion e b - 100 mM de Cl⁻, Hepes 15 mM.
(3) Bucci & Fronticelli, 1985: a - 0,5 mM e b - 150 mM de borato de sódio.

Como pode-se notar há concordância entre os valores determinados por diferentes métodos neste trabalho, com aqueles publicados na literatura.



4.4. O MECANISMO DE OXIGENAÇÃO DA HB PARA EFEITO BOHR DEVE CONSIDERAR A EXISTÊNCIA DE UM NOVO ESTADO ALOSTÉRICO PARA À HB

Como já observado anteriormente, o efeito Bohr e o efeito de água na ligação de O_2 , parece agir simultaneamente (fig. 19, pág. 57). Portanto, espera-se que o equilíbrio entre dois estados alostéricos da desoxi-Hb com a concentração de cloreto, possa descrever a dependência de Δn_{H^+} com a concentração de NaCl observado; neste caso particular, o estado T da Hb seria caracterizado por ter menor hidratação e maior número de prótons ligados que o estado P, enquanto que a transição de $P \Rightarrow T$ se dá com a ligação de ânions. Este modelo, concernente à ligação de prótons e ânions na oxigenação da Hb e mostrado na figura 22:

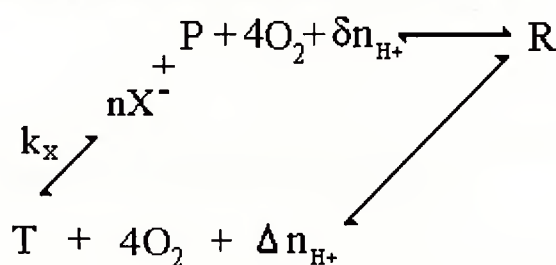


Figura 22: Representa o esquema para explicar o processo de oxigenação da Hb. No esquema δn_{H^+} representa o número de H^+ que são desligados da Hb na transição entre os estados P e R, Δn_{H^+} na transição T e R; K_x é a constante de dissociação do ânion à desoxi-Hb (T) e nX^- a relação estequiométrica do ânion com a desoxi-Hb para a estabilização do estado T da Hb. Modelo originalmente proposto por Colombo e Seixas, 1999.

Neste modelo, a concentração da proteína no estado desoxigenado é igual à soma das concentrações dos estados T e P em equilíbrio, com ânions, i. é:



onde k_x é a constante de associação dada por:

$$k = \frac{[T]}{[P].[X^-]^n} = \frac{f_T}{f_P.[X^-]^n} \quad (43)$$

onde, $[T]$ e $[P]$ são as concentrações destas espécies de desoxi-Hb e f_T e f_P as frações de desoxi-Hb nestes estados, tal que $f_P + f_T = 1$.

Dado que nos extremos da curva o $\Delta n_{H^+}^{obs}$ versus NaCl o efeito Bohr é constante, podemos expressar que o número de prótons observado para a oxigenação da Hb ($\Delta n_{H^+}^{obs}$) pode ser descrito como:

$$\Delta n_{H^+}^{obs} = f_{P \rightarrow R} \cdot \delta n_{H^+} + f_{T \rightarrow R} \cdot \Delta n_{H^+} \quad (44)$$

onde, δn_{H^+} e Δn_{H^+} correspondem aos valores dos número de prótons no extremo.

Isolando a equação 43 em termos de f_T , chegamos a equação 45:

$$f_T = \frac{k[X^-]^n}{1 + k[X^-]^n} \quad (45)$$

Conhecendo a fração para a desoxi-Hb no estado T, podemos encontrar a fração protéica no estado P da Hb, equação 46:

$$f_P = \frac{1}{1 + k[X^-]^n} \quad (46)$$

Redefinindo, $k = K^n$, onde K é a constante média de associação do ligante a proteína, assim:

$k[X^-]^n = (KX^-)^n$, para a associação do íon à Hb;

$k[X^-]^n = \left(\frac{X^-}{K}\right)^n$, para a dissociação do íon à Hb.

Rearranjando a equação 44, podemos descrevê-la como:

$$\Delta n_{H^+}^{obs} = f_P (\delta n_{H^+} - \Delta n_{H^+}) + \Delta n_{H^+} \quad (47)$$

sendo:

$$f_p = \frac{1}{1 + \left(\frac{X^-}{K} \right)^n} \quad (48)$$

dado: f_p em termo da constante de dissociação aparente média do ânion à desoxi-Hb.

Substituindo f_p da equação 48 na equação 47, obtemos a equação 49:

$$\Delta n_{H^+}^{obs} = \frac{(\delta n_{H^+} - \Delta n_{H^+})}{1 + \left(\frac{X^-}{K} \right)^n} + \Delta n_{H^+} \quad (49)$$

onde, X^- é a concentração de ânions livre na solução, n é o coeficiente de Hill para a ligação do ânion à desoxi-Hb no estado T (para n menor que número efetivo de íon ligado à Hb) e K é a constante média de dissociação do ânion X^- do estado T na Hb.

O ajuste não linear da equação 49 aos dados experimentais de Δn_{H^+} versus NaCl mostrados na figuras 21 é indicado pela linha pontilhada. Nesta figura, o melhor ajuste fornece a constante de dissociação de cloreto à desoxi-Hb T, $K = 5,0 \text{ mM} \pm 1,0$ e $n = 2,0 \pm 0,7$. Estes valores concordam com valores obtidos por outros grupos de pesquisa e determinados por diferentes métodos que fornecem em média valores para K de aproximadamente 10 mM de cloreto (Imai, 1981).

A comparação quantitativa entre o efeito do cloreto sobre Δn_{H^+} , determinado neste trabalho, com o efeito deste ânion sobre Δn_w permite

concluir que o efeito Bohr e o efeito de água refletem simultaneamente as mudanças conformacionais da Hb induzidas pela ligação de O_2 e cloreto.

4.5. COMPORTAMENTO DA Hb COM O AUMENTO DA FORÇA IÔNICA DA SOLUÇÃO

O aumento do número de prótons (n_{H^+}) ligados à Hb com o aumento da concentração de NaCl pode ocorrer devido a dois efeitos de origem eletrostática:

- 1) mudanças no coeficiente de atividade (γ) dos grupos protonáveis carregados, devido a condensação iônica. Este efeito descrito pela teoria de Debye – Huckel;
- 2) mudanças conformacionais na proteína, que levam a mudanças de campos elétricos nas vizinhanças dos grupos protonáveis.

Neste trabalho estes efeitos puderam ser separados, via a análise da dependência de n_{H^+} , medido em diferentes concentrações de NaCl (fig. 20, pág. 59), com a teoria de Debye – Huckel apresentada na pág. 42.



Considerando que a carga total da proteína em um determinado pH é dada por:

$$Z = \sum_{\text{ácido}} z_i^+ \alpha_i + \sum_{\text{base}} z_j^- (1 - \alpha_j) \quad (50)$$

onde, z é a carga do grupo. A primeira somatória refere-se à contribuição dos grupos ácidos e a segunda à dos grupos básicos para a carga total. Portanto, Z depende da força iônica via o valor de ϖ contendo α_i e α_j .

Os dados de n_{H^+} medidos à concentração de NaCl apresentados na figura 20, pág. 59, foram reanalisados construindo-se gráficos de n_{H^+} versus ϖ . O comportamento de n_{H^+} , medidos para a oxi e para a desoxi-Hb, versus ϖ^* , é mostrado pelo gráfico da figura 23:

* ϖ é o termo de Debye-Huckel que foi definido na página 45.



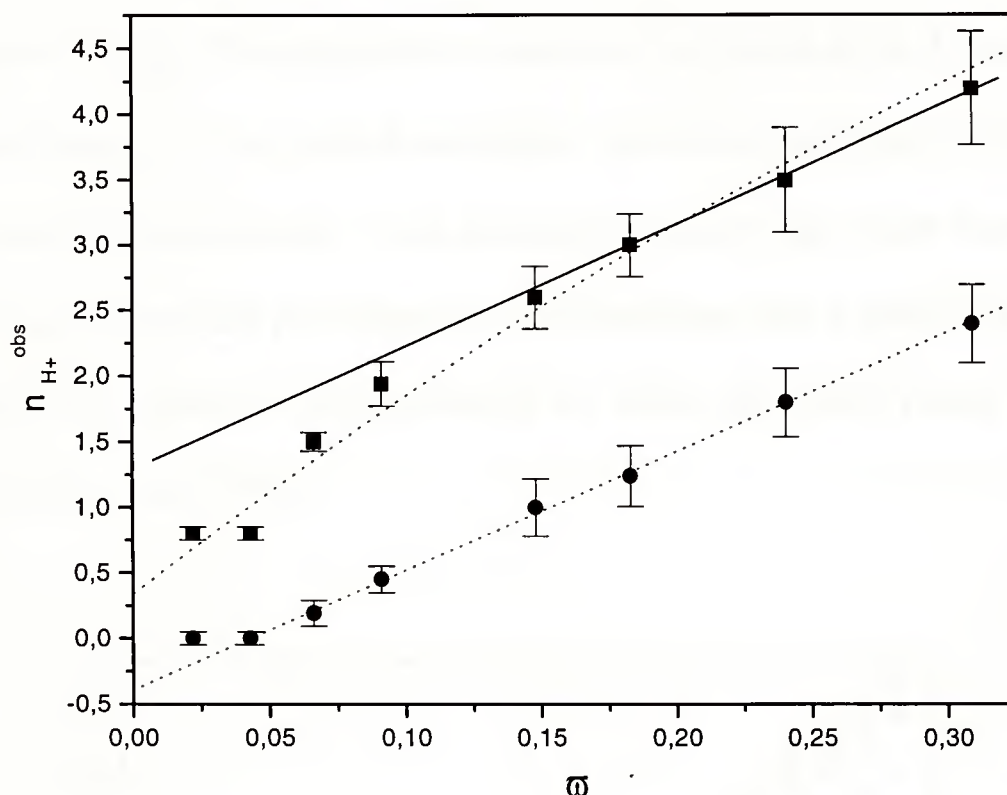


Figura 23: Representa a variação do número de prótons para a desoxi-Hb (■) e oxi-Hb (●) em função de w . Todos os valores são encontrados em relação ao ponto inicial de 0,5 mM Cl^- , que é utilizado como ponto referência. Cada ponto representa a média de no mínimo 4 experimentos e a variação de H^+ é sempre medida no mesmo valor de pH (7,2) para ambas as soluções. Na desoxi-Hb é acrescentado 0,8 prótons na solução antes de aumentar a concentração de NaCl, que indica a quantidade necessária de H^+ para que o pH da desoxi-Hb seja equivalente ao pH da oxi-Hb. A oxi-Hb responde linearmente a força iônica do Cl^- , seguindo Debye - Huckel. A desoxi-Hb não responde a esta linearidade para todo o intervalo de w . A linha contínua representa o ajuste linear de valores de w entre 0,17 e 0,32 para os pontos experimentais da desoxi-Hb.

Observa-se que o número de prótons ligados à oxi-Hb aumenta linearmente com o aumento de w . Entretanto, para a desoxi-Hb o comportamento linear parece estar restrito para valores de w maiores que 0,17, que correspondem as concentrações de NaCl superiores a 50 mM.

A inspeção da dependência de α_i com w (equação 29, pág. 45), para valores pequenos de w , revela que α_i varia linearmente em todo o intervalo de

ϖ investigado neste trabalho. Isto pode ser visto atribuindo valores de pK_i^0 na equação 32 (pág. 45) e calculando o valor de α_i em função de ϖ . A figura 24 mostra como $1 - \alpha_i$, i.é o grau de associação, varia em ϖ para todo o intervalo de força iônica investigado, e para diferentes valores de pKs . Estes valores de pKs foram escolhidos pois os grupos que contribuem para o efeito Bohr tem valores pKs próximos a estes (Perutz *et al.*, 1980; Imai, 1981; Perutz *et al.*, 1985; Bush *et al.*; 1991).

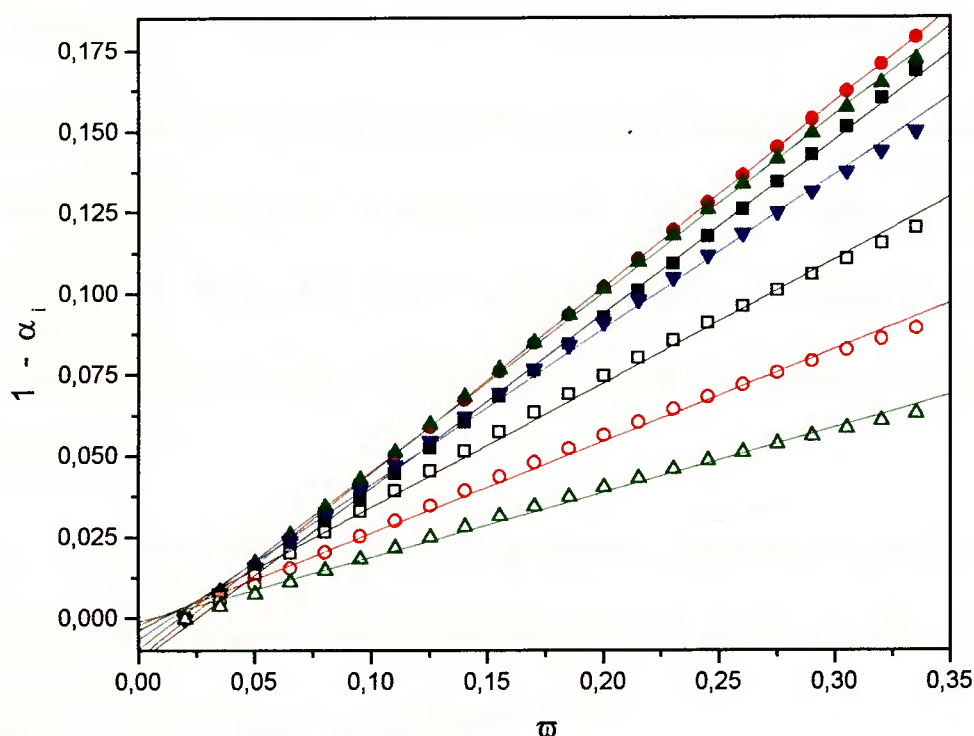


Figura 24: A figura mostra a simulação do grau de associação de H^+ , $1 - \alpha_i = \alpha'$ ($i = 0$) para pKs iguais a 6,8 (■), 7,0 (●), 7,2 (▲), 7,4 (▼), 7,6 (□), 7,8 (○) e 8,0 (△), em diferentes valores de ϖ , para o par ácido – base.

O grau de associação de H^+ aos resíduos aumenta com ϖ e é linear em todo o intervalo de ϖ analisado. Porém, à pH 7,2, a contribuição dos

resíduos que têm seus pKs mais altos é menor que aqueles com pks mais baixos, que pode ser observado pela inclinação dos pontos. A maior contribuição na ligação de prótons à Hb são de responsabilidade dos resíduos com pKs entre 6,8 e 7,2.

Estas comparações permitem atribuir o aumento do número de prótons ligados à oxi-Hb exclusivamente a efeitos de força iônica, uma vez que $n_{H^+}^{oxi}$ é linear em ϖ no intervalo estudado (fig. 23). Neste gráfico, nota-se ainda que $n_{H^+}^{desoxi}$ é linear só para valores de ϖ maiores que 0,17. O aumento não linear de $n_{H^+}^{desoxi}$ para valores de ϖ entre 0,02 e 0,17, observado na figura 23, indica que outras mudanças, além da contribuição devido à condensação iônica, contribuem para o aumento dos valores de pKs de grupos na superfícies da desoxi-Hb. Este resultado sugere que alguma alteração na estrutura conformacional da desoxi-Hb ocorre à concentrações de NaCl entre 0,5 e 50 mM.

Estes resultados reforçam, portanto, a proposta de que a desoxi-Hb exista em duas conformações alostéricas, T e P, sugeridas pelas medidas de Δn_{H^+} versus NaCl e Δn_w versus NaCl.



5) CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados neste trabalho concluimos:

1) A presença de ânions nas soluções de Hb, induz a um aumento na ligação de prótons na proteína, de formas distintas na oxi e desoxi hemoglobina, diminuindo a afinidade da Hb pelo O_2 , observado por parâmetros, tais como P_{50} .

2) Os resultados dos experimentos de efeito Bohr sugerem que a desoxi-Hb coexiste em dois estados conformacionais alostéricos: P, sem ligantes ligados e T, com ânions ligados, como proposto anteriormente por Colombo e Seixas, 1999.

3) O valor da constante aparente (K'_a) de dissociação de cloreto à desoxi-Hb é de $5,0 \pm 1,0$ mM NaCl, e a cooperatividade de ligação igual a $2,0 \pm 0,7$.



4) As mudanças conformacionais da Hb induzidas pela oxigenação da Hb se refletem similares e simultâneas nos valores de Δn_{H^+} e Δn_w . Portanto o efeito de água sobre a função da Hb tem importância equivalente ao efeito Bohr.

5) Nossos resultados fornecem evidências diretas da existência de um terceiro estado alostérico da Hb, o estado P. A máxima estabilização deste estado é alcançada na proteína totalmente desligadas de ligantes homotrópicos (O_2) e heterotrópicos (ânions).



6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, G. K., DOYLE, M. L., MYERS, D., DAUGHERTY, M. A.

Molecular code for cooperativity in hemoglobin. *Science*, v.255, p.54-62, 1992.

ACKERS, G. K., SMITH, F. R. The hemoglobin tetramer; a three-state

molecular switch for control of ligand affinity. *Annu. Rev. Biochem.*

Biophys., v.16, p.583-609, 1987.

ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to

human deoxyhaemoglobin. *Nature*, v.237, p.146-149, 1972.

ATKINS, P. W. *Physical-chemistry*. 5.ed. Oxford: Oxford University Press,

1994. 1031p.

BALDWIN, J. M., CHOTHIA, C. Hemoglobin: the structural changes related

to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, v.129, p.158-

174, 1979.

BALDWIN, J. M. A model of co-operative oxygen binding to hemoglobin.

Br. Med. Bull, v.32, n.3, p.213-218, 1976.

BENESCH, R. E., BENESCH, R., YUNG, S. Equations for the

espectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*,

v.55, n.1, p.245-248, 1973.

- BENESCH, R. E., BENESCH, R., CHI, I. Y.** The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3 diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ion strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, v.8, p.2567-2571, 1969.
- BONAVENTURA, C., TESH, S., FAULKNER, K. M., KRAITER, D., CRUMBLISS, A. L.** Conformation fluctuations in deoxy hemoglobin revealed as a major contributor to modulation of function through studies of the oxygenation and oxidation of hemoglobins A₀ and deer lodge β_2 (NAD2) His – Arg. *Biochemistry*, v.37, p.496-506, 1998.
- BUCCI, E., FRONTICELLI, C., GRZYCZYNSKI, Z.** Discontinuous release of Heat at Successive Steps of Oxygenation in Human and Bovine hemoglobin at pH 9.0. *Biochemistry*, Washington, v.30, n.3, p.3195-3199, 1991.
- BUCCI, E., FRONTICELLI, C.** Anion Bohr effect of human hemoglobin. *Biochemistry*, v.24, n.2, p.371-376, 1985.
- BUCCI, E., FRONTICELLI, C.** Measurement of Borh effect: dependence on pH of oxygen affinity hemoglobin. *Methods Enzymol.*, v.76, p.523-533, 1981.
- BUSCH, M. R., MACE, J. E., HO, N. T., HO, C.** Roles of the β 146 histidyl residue in the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin: a proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, v.30, n.7, p.1865-1877, 1991.

BUSCH, M. R., HO, C. E. Effect the anions on the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin. *Biophys. Chem.*, v.37, n.1-3, p.313-322, 1990.

CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. Biophysical Chemistry part III, Ed.W. H. Freeman, 1980.

CAÔN FILHO, OSMAR. Determinação das Curvas de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio a Hemoglobinas em Soluções Viscosas Usando uma Cella Espectropolarimétrica Modificada. Dissertação Apresentada para a Obtenção do Grau de Mestre em Física, pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 1997 73 pág.

CASTRO, O. A., COLOMBO, M. F. The dependence of the Bohr effect in hemoglobin oxygenation on chloride concentrations. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 27, 1998, Caxambu. *Anais...* Caxambu: SBBq, 1998. p.137.

CHOTIA, C, WODAK, S., JANIN, J. Role of subunit interfaces in the allosteric mechanism of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.73, p.3793-3797, 1976.

COLOMBO, M. F. and SEIXAS, F. A. V. A novel allosteric conformation of human Hb revealed by the hydration and anion effects on O₂ binding. *Biochemistry*, 1999 (In print).



COLOMBO, M. F., BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *J. Biol. Chem.*, v.271, n.9, p.4895-4899, 1996.

COLOMBO, M. F., RAU, D.C., PARSEGAN, V. A. Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allosterism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.91, p.10517-10520, 1994.

COLOMBO, M. F., RAU, D. C., PARSEGAN, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, v.256, p.655-659, 1992.

EDSALL, J. T., WYMAN, J. *Biophysical chemistry*. Academic Press, 1958. v.I, p.282-471.

FRONTICELLI, C., PECHIK, I., BRINIGAR, W. S., KOWALCZYK, J., GILLILAND, G. L. Chloride Ion Independence of the Bohr Effect in a Mutant Human Hemoglobin $\beta(V1M+H2deleted)$. *J. Mol. Biol.*, v.269, n.39, p.23965-23966, 1994.

GARRETT, R. H., GRISHLAM, C. M. *Biochemistry: enzyme specificity and allosteric regulation*. Orlando: Saunders College Publishing, 1995. p.387-423.

HANDBOOK of chemistry and physics. 68.ed. Boca Raton: CRC, 1987-1988.



HILL, A. V. The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. *Biochem. J.*, v.7, p.471-480, 1913.

HO, C, RUSSU, I. M. In biochemical and clinical aspects of haemoglobin abnormalities. New York: Academic Press, 1978. p.179-193.

HOLT, J. M., ACKERS, G. K. Pathway of allosteric control as revealed by intermediate states of hemoglobin. *FASEB J.*, v.9, n.2, p.210-218, 1995.

HUANG, Y., DOYLE, M. L., ACKERS, G. K. The oxygen-binding intermediates of human hemoglobin: evaluation of their contributions to cooperativity using zinc-containing hybrids. *Biophys. J.*, v.71, p.2094-2105, 1996.

HUANG, Y., KOESTNER, M. L., ACKERS, G. K. Heterotropic effects of chloride on the ligation microstates of hemoglobin at constant water activity. *Biophys. J.*, v.71, p.2106-2116, 1996.

IMAI, K. *Allosteric Effects In Haemoglobin*. Cambridge: University Cambridge Press, 1982. 275p.

IMAI, K. Measurement of accurate oxygen equilibria curves by an automatic oxygenation apparatus. *Methods. Enzymol.*, v.76, p.438-449, 1981.

JAYARAMAN, V., SPIRO, T. G. Structure of a third cooperativity state of hemoglobin: ultraviolet resonance raman spectroscopy of cyanomethemoglobin ligation microstates. *Biochemistry*, v.34, n.14, p.4511-4515, 1995.

- KILMARTIN, J. V., FOGG, J. H., PERUTZ, M. F.** Role of c-terminal histidine in the bohr effect of human hemoglobin. *Biochemistry*, v.19, n.14, p.3189-3183, 1980.
- KILMARTIN, J. V., IMAI, K., JONES, R. T., FARUQUI, A. R., BALDWIN, J. M.** Role of Bohr group salt bridges in cooperativity in hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, v.534, p.15-25, 1978.
- KWIATKOWSKI, L. D., NOBLE, R. W.** Contribution of arginine (HC3) 141 alpha to the Bohr effect of the fourth binding step in the reaction of ligand with human hemoglobin. *Proteins*, v.2, n.1, p.72-77, 1987.
- LAEMMLI, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.259, n.227, p.680-685, 1970.
- LEHNINGER, R. H., NELSON, D. L., COX, M. M.** *Principles of Biochemistry*. 2.ed. New York: Worth, 1993. p.99-697.
- LOUIE, G., ENGLANDER, J. J., ENGLANDER, S. W.** Salt, Phosphate and the Bohr Effect at the Hemoglobin Beta Chain C Terminus Studied by Hydrogen Exchange. *Mol. Biol.*, v.201, p.765-772, 1988.
- MATHEWS, C. K., van HOLDE, K. E.** *Biochemistry: protein function and evolution*. Redwood City: The Benjamin/Cummings, 1990. p.130-145.
- MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J. P.** On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.*, v.12, p.88-118, 1965.

- PARSEGAN, V. A., RAND, R. P., RAU, D. C.** Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.*, v.259, p.43-94, 1995.
- PERUTZ, M. F., WILKINSON, A. J., PAOLI, M., DODSON, G. G.** The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol.27, p.1-34, 1998.
- PERUTZ, M. F., SHIH, D. T.-b., WILLIAMSON, D.** The chloride effect in human hemoglobin: a new kind of allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, v.239, p.555-560, 1994.
- PERUTZ, M. F., FERMI, G., POYART, C., PAGNIER, J., KISTER, J. A.** Novel allosteric mechanism in hemoglobin: structure of bovine deoxyhemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human hemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v.233, p.536-545, 1993.
- PERUTZ, M. F.** Mechanism of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q. Rev. Biophys.*, v.22, n.2, p.139-237, 1989.
- PERUTZ, M. F., GRONENBORN, A. M., CLORE, G. M., FOGG, J. H., SHIH, T.-b.** The pK_a Values of Two Histidine Residues in Human Haemoglobin, the Bohr Effect, and the Dipole Moments of α -Helices. *J. Mol. Biol.*, v.183, p.491-498, 1985.
- PERUTZ, M. F., KILMARTIN, J. V., NISHIKURA, K., ROLLEMA, H. S.** Identification of residues contributing to the bohr effect of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v.138, p.649-670, 1980.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin, *Nature*, v.228, p.726-739, 1970.

POYART, C.; BURSAUX, E.; BOHN, B. Determination directe de la premiere constante d'association (A_1) de l'O₂ à l'hémoglobine humaine. Influence des effecteurs heterotropes. *INSERM Colloq.*, v.70, p.51-56, 18-19, 1977.

RIGGS, A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods Enzymol.*, v.76, p.5-29, 1981.

ROLLEMA, H. S., DE BRUIN, S. H., JANSSEN, L. H. M., van OS, G. A. J. The effect of potassium chloride on the Bohr effect of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v.250, n.4, p.1333-1339, 1975.

RUSSU, I. M., WU, S. S., HO, N. T., KELLOGG, G. W., HO, C. A proton nuclear magnetic resonance investigation of the Bohr effect of human normal adult hemoglobin. *Biochemistry*, v.28, n.12, p.5298-5306, 1989.

RUSSU, I. M., HO, C. Assessment of role of beta 146-histidyl and other histidyl residues in the Bohr effect of human normal adult hemoglobin. *Biochemistry*, v.25, n.7, p.1706-1716, 1986.

SEIXAS, F. A., CÂON Fº, O., CASTRO, O. A., COLOMBO, M. F. Anion Effects on hemoglobin Struture and functions: A View from the Hidration Chages Upon O₂ Binding. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OXYGEM BINDING AND/ACTIVATING SENSING HEME PROTEINS, 1998, Monterey.



SEIXAS, F. A. V. Efeito da Atividade de Água Sobre as Características Estruturais e Funcionais da Hemoglobina Humana A₀. Dissertação Apresentada para a Obtenção do Grau de Mestre em Física, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 1998, 73 pág.

SHIH, D. T-b., LUISI, B. F., MIYAZAKI, G., PERUTZ, M. F., NAGAI, K. A Mutagenic Study of the Allosteric Linkage of His(HC3) 146 β in haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, v.230, p.1291-1296, 1993.

SILVA, M. M., ROGERS, P. H., ARNONE, A. A Third Quaternary Structure of Human Hemoglobin A at 1.7-Å Resolution. *J. Biol. Chem.*, v.267, n.24, p.17248-17246, 1992.

STRYER, L. *Bioquímica*. Tradução por João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo e Paulo Armando Motta. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 881p.

SUN, D. P., ZOU, M., HO, N. T., HO, C. Contribution of surface histidyl residues in the α -chain to the effect of human normal adult hemoglobin: roles of global eletrostatic efects. *Biochemistry*, v.36, n.22, p.6663-6673, 1997.

TIMASHEFF, S. N., ARAKAWA, T. Stabilization of protein struture by sugars. *Biochemistry*, v.21, p.6536-6544, 1982.

TINOCO Jr., I., SAUER, K., WANG, J. C. *Physical Chemistry: principles and aplications in biological sciences*. 3.ed. New Jersey: Prentice - Hall, 1995. 761p.



van BEEK, G. G., ZUIDERWEG, E. R., de BRUIN, S. H. The binding of chloride ions to ligated and unligated human hemoglobin and its influence on the Bohr effect. *Eur. J. Biochem.*, v.99, n.2, p.379-383, 1979.

VOET, D., VOET, J. C. *Biochemistry*. 2.ed. Toronto: John Wiley & Sons, 1995. p.215-250.

WYMAN, J., GILL, S. J. *Binding and linkage: functional chemistry of biological macromolecules*. Mill Valley: University Press, 1990. 330p.

WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Protein Chem.*, v.19, p.223-286, 1964.

7) ANEXO

7.1. ROTINA ESCRITA NO SOFTWARE MATLAB PARA ANÁLISE DO EFEITO DO pH NAS ISOTERMAS DOS DADOS EXPERIMENTAIS DA OXIGENAÇÃO DA Hb.

Este é a rotina para o para cálculo do perfil de variação da Hb induzida pela oxigenação. As curvas de oxigenação de nO_2 versus pO_2 são lidas e o cálculo de pontos espaçados é realizado pela função “spline”.

```
load *.dat
y1=*(:,2);
x1=*(:,1);
```

```
load **.dat
y2=**(:,2);
x2=**(:,1);
```

```
load ***.dat
y3=***(:,2);
x3=***(:,1);
```

```
clear * ** ***
```

Aqui definimos o intervalo de variação de pO_2 . Note que a definição dos valores de $pO_2 = x_i$, a serem interpolados é tal que estes valores são igualmente espaçados na escala logarítmica ($z = \log_{10}(x_i)$).

```
z=-1.5:0.05:1.8;
xi=10.^z;
```

Para gerar os pontos interpolados y_i são os dados de fração de oxigenação contra pO_2 (experimental) nas matrizes x_i correspondente. Os valores de y_i são os valores interpolados da fração de saturação na nova escala x_i .

```
l=length(z);
YI=eye(10,z);
clear l
```

```
YI(1,:)=spline(x1,y1,xi);
YI(2,:)=spline(x2,y2,xi);
YI(3,:)=spline(x3,y3,xi);
```

O pH será a matriz que contém os valores de pHs medidos experimentalmente.

pH=[a; b; c];

O cálculo da matriz **pHt**, que é a matriz dos valores de pH nos quais as curvas de oxigenação foram medidas, e a dependência é descrita por um polinômio de segundo grau.

pHt=[[1 1 1]' pH pH.^2 pH.^3];

E o cálculo de **dpH**, que é a matriz dos coeficientes de **YI**: (que são dados interpolados) é:

dpH=pHt\YI;

Para calcular o **yfit**:

yfit=pHt*dpH;

semilogx(xi(:,1:60),YI(:,1:60),'.',xi(:,1:60),yfit(:,1:60));
pause

plot(pH,YI(:,32:35),'o',pH,yfit(:,32:35));
pause
end

Agora calculamos o desvio-padrão:

s=std(YI(:,1:60)-yfit(:,1:60));

semilogx(xi(:,1:60),s,'.');
pause
end

O cálculo da curva que fornece o perfil de ligação de H^+ à Hb ao longo da oxigenação para um valor de **pH data**, que corresponde ao pH no qual estamos interessados na medida do efeito Bohr com **nH= dno2/dpH**, que é igual à **-dnH/dlog₁₀(pO₂)**.

```

pHdata = [7.3]';
um = [1]';
nH=[um 2*pHdata 3*pHdata.^2]*dpH(2:4,:);
semilogx(xi(:,1:60),nH(:,1:60),'');
pause

```

O cálculo da curva ligação de H^+ ao longo da oxigenação antes de executar o programa abaixo eliminamos os valores negativos.

Então o cálculo dos valores da curva de ligação de H^+ é:

```

DNH(1)=0;
for i=2:length(z)
dpH(i)=nH(i)*0.05;
DNH(i)=DNH(i-1)+dpH(i);
end

```

```

AREA=-max(DNH)(*)

```

```

plot(z(:,1:60),DNH(:,1:60),'o',log10(x1),4*y1, z(:,1:60), nH(:,1:60),'*')
title('Curva de liberação de prótons, O2 e Perfil de liberação de H+ pela Hb ao longo da curva de oxigenação')

```

Para salvar os dados determinamos o que queremos salvar e o nome do arquivo em que será salvo.

```

t=[z' nH' DNH' yfit']

```

```

save xxx.dat t -ascii

```

Os dados contidos na matriz **xxx.dat** correspondem à: **z**= $\log_{10}(pO_2)$, **nH** é a coluna contendo os valores das derivadas de: **dnO₂** em relação ao **pH** (**dnO₂/dpH**) calculada para cada valor de **log(pO₂)= z**. Onde **DNH** é a soma consecutiva dos valores **dnH= (dnO₂/dpH)*(o passo dlog₁₀(pO₂)=0.05)** e **yfit(1,:)** é o valor ajustado nos valores dos pH experimentais.

(*)Obs.: o valor negativo vem da equação de Gibbs – Duhem expressada em termos de pH (i.e, $pH = -2.3 \ln(aH)$)



