

Flavio Augusto Vicente Seixas

Efeito da atividade de água sobre as características estruturais e
funcionais da hemoglobina humana A₀.





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

1910001118



FLAVIO AUGUSTO VICENTE SEIXAS

**EFEITO DA ATIVIDADE DE ÁGUA SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS
DA HEMOGLOBINA HUMANA A₀.**

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO FRANCISCO COLOMBO

[Handwritten signatures]

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Física, área de concentração - Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP.



T1118/02

São José do Rio Preto - SP
1998



AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Eu agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. [nome], pela orientação e incentivo durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, em especial [nome], pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ainda aos meus familiares, em especial [nome], pelo apoio e incentivo durante todo o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente [nome].

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

AGRADECIMENTOS

É com carinho muito especial que agradeço ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo, pela orientação dedicada, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção e cujo exemplo de postura científica me estimulou a seguir o caminho que agora percorro.

Ao querido mestre e amigo Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodríguez, pela amizade e orientação durante minha iniciação científica.

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

Ao Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, coordenador do curso de pós-graduação, pelas noções acadêmicas e pela afetuosa amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey pela amizade e críticas construtivas durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. José Ramón Beltran Abrego e Walter Filgueira de Azevedo Jr. pela colaboração prestativa na análise deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Física, Prof. Dr. Marinômio Lopes Cornélio, Prof. Dr. Jonny Rizzieri, Prof. Dr. Elso Drigo Filho, Prof. Dr. Jorge Chahine, Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto,

Prof. Dr. Eloi Feitosa, Prof. Dr. Richard Ward, Prof Dr. R. K. Arni, e aos professores do departamento de Biologia, Prof. Dr. Paulo César Naoum, Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, Profa. Dra. Eleni Gomes, Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, minha gratidão pelo convívio e amizade.

A Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, minha primeira orientadora de iniciação científica.

A Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos pela amizade e orientação durante minha iniciação científica.

A Lucimara Chioato estagiária deste laboratório, cujo auxílio foi muito importante na realização deste trabalho..

Aos técnicos do departamento de Física, Paulinho e Toninho Barbosa, cujo auxílio técnico foi de grande ajuda na realização deste trabalho..

Aos meus companheiros de laboratório, Osmar, Ocimar, Sandra, Bernadete, Renato, Alexandre "Mac", Dulcinéia e André pela gostosa cumplicidade com que amadurecemos juntos cientificamente, pelo carinho e incentivos constantes.

Aos meus queridos amigos Uderlei, Fátima, Adriana, Raquel, Milton, Benatti, Alexandre Teso, Alexandre Guerzoni, Fernanda, Fábio,

Leandra, João Ricardo, Selma, Gláucia, Murilo, Jeniffer, Cecília, Valmir, Giovani e Sheila por cultivarem um ambiente propício ao trabalho.

Agradeço também a Ilva, secretária do departamento de Física, por sua excepcional cooperação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Nanci, Oscar, Rosemar, pela amizade e auxílio em todos os momentos.

Aos demais e não menos importantes colegas do curso de pós-graduação pelo ambiente de trabalho saudável e pela convivência harmoniosa.

A minha mãe Maria que não mediu esforços para que seu filho tivesse um diploma universitário e chegasse até aqui.

Ao meu pai Benigno pelo incentivo dado a todo o momento.

A minha tia Aparecida, pela confiança e pelo incentivo no decorrer deste trabalho.

A Deus, pela vida.

RESUMO DO TRABALHO

A hemoglobina é a proteína considerada padrão para o estudo do fenômeno alostérico e das relações estrutura e função de macromoléculas biológicas. Embora muito se saiba sobre esta proteína, o detalhamento estrutural dos passos referentes as suas características de oxigenação ainda não está claramente determinado. Embora o modelo de dois estados de Monod, Wyman e Changeaux seja o mais popular para a descrição das características funcionais das hemoglobinas, vários estudos mostram evidências de que a transição conformacional que acompanha a oxigenação é feita por um caminho mais complexo que o sugerido por este modelo. Neste trabalho, utilizamos o método de stress osmótico como uma sonda de mudanças conformacionais que acompanham a oxigenação da Hb humana na presença e ausência de seus principais efetores heterotrópicos, NaCl e 2,3-BPG para investigarmos a possibilidade da estabilização de eventuais estados conformacionais intermediários entre as estruturas T e R. Nossos resultados demonstram que na ausência de ânions a oxigenação da Hb é acompanhada pela ligação de 25 moléculas de água, em contraste com as 70 moléculas de água que se ligam à proteína quando oxigenada, em presença de concentrações saturantes de NaCl e 2,3-BPG. Esta mudança na variação de hidratação é dependente da concentração destes íons em solução. Estes resultados são interpretados, sugerindo que a desoxiHb assume uma nova conformação em solução quando privada da interação com ânions. Este novo estado conformacional da Hb é denominado de estado plástico P. Neste trabalho, propomos um modelo, que incorpora o

estado plástico (P) aos estados conformacionais canônicos relaxado (R) e tenso (T) da proteína, para descrever a dependência da afinidade da Hb por O_2 com a ligação diferencial de moléculas de água e íons entre os diferentes estados conformacionais da Hb. O modelo proposto permite explicar alguns fatos já descritos na literatura, como por exemplo, o efeito de ânions sobre o efeito Bohr nas Hbs. O número de prótons Bohr liberados na oxigenação da Hb na presença de 100mM de NaCl é igual a 2, enquanto que na ausência de NaCl é igual a 0,8. Portanto, na ausência de sais tanto o número de prótons liberados quanto o número de águas que se ligam à Hb com a transição conformacional entre os estados desoxi e oxi são significativamente menores que aqueles observados na presença de ânions. Estes resultados indicam claramente que a ligação de ânions à desoxi-Hb induz à mudanças em sua conformação em solução, de forma a modificar sua superfície protéica exposta ao solvente e o pK_a de grupos responsáveis pelo efeito Bohr.

ABSTRACT

Hemoglobin is considered the standard protein for the investigation of the molecular mechanism of allosteric regulation common to many enzymes. The stereo-chemical nature of the thermodynamic control of the cooperative O₂ binding to Hemoglobin, via allosteric interactions, has been described on the basis of the comparison between the structures of the two conformations adopted by Hb when fully oxygenated and fully deoxygenated. Although the two state model, implicit in these analysis, explain many features of Hb function, there are several evidences that the conformacional transition following Hb oxygenation involves intermediate allosteric states. However, the structural characterization of any intermediate has not been achieved yet. In this work, we measured the hydration change associated human Hb oxygenation at varied concentrations of NaCl and 2,3-BPG in order to probe the effect of these main heterotropic effectors of Hb conformation. We found that in absence of anions the Hb oxygenation is followed by the binding of 25 water molecules in contrast with 70 H₂O that binds to the protein oxygenated in the presence of saturated concentrations of NaCl and 2,3-BPG. We interpret these results, suggesting that the conformation of deoxyHb changes upon anion binding. This new Hb conformational state is called plastic P. A model describing the effect of water and anions on Hb oxygenation, incorporating the two canonic structures of Hb, the deoxy-T and oxy-R states, with the new deoxy-P is proposed. With this model the dependence of the observed hydration change of Hb on oxygenation with anion concentration is well described. We found that the Cl⁻ and BPG binding constants and binding

stoichiometries to deoxy-Hb, determined fitting the proposed model to the data are in very good agreement with reported data. These results support our suggestion that the conformation of deoxy-Hb in solution changes with anion binding. Conversely, we found that in the absence of anions a novel structure of deoxy-Hb is stabilized. Evidences are shown that this new state of Hb shares several characteristics of a putative intermediate state of Hb. Therefore, solution conditions that stabilize a new allosteric state of Hb are now known opening new opportunities to further investigate Hb function and structure.

ABREVIações UTILIZADAS

Hb	Hemoglobina
O ₂	Oxigênio
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
BPG	2,3-bifosfoglicerato antigo 2,3-Difosfoglicerato
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato antigo 2,3-Difosfoglicerato
p50	Pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% dos grupos hemes da hemoglobina
n50	Índice de cooperatividade de Hill para a ligação do oxigênio a hemoglobina
FPLC	Aparelho utilizado para cromatografia líquida de baixa pressão
H ₂ CO ₃	Ácido carbônico
HbO ₂	Oxiemoglobina
metaHb	Metaemoglobina
Hb A ₀	Principal fração de hemoglobina encontrada em eritrócitos de seres humanos
MWC	Monod, Wyman e Changeaux
HEPES	Ácido (2 Hidroxietil) Piperazina - N - (2 Etano Sulfônico)

EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
Osm	Osmolalidade
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

SIMBOLOGIA UTILIZADA

$\bar{Y}$	Saturação fracional da hemoglobina com oxigênio
λ	Comprimento de onda
μ_{Hb}	Potencial químico da hemoglobina
μ_L	Potencial químico do ligante
μ_{O_2}	Potencial químico do oxigênio
ASA	Área de superfície acessível ao solvente
Δn_w	Número de moléculas de água que se ligam a Hb durante a oxigenação.
a_L	Atividade do ligante
a_w	Atividade de água
R	Estrutura relaxada (oxigenada) da hemoglobina
T	Estrutura tensa (desoxigenada) da hemoglobina

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - A HEMOGLOBINA	01
1.2 - O EFEITO DO ÍON CLORETO	07
1.3 - O EFEITO DO 2,3 - BIFOSFOGLICERATO	09
1.4 - O EFEITO DO CO ₂ E PRÓTONS: O EFEITO BOHR	11
1.5 - O PAPEL DA ÁGUA NA ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS	13
1.6 - O EFEITO DA ATIVIDADE DE ÁGUA SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS	15
2 - OBJETIVOS	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 - PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA	22
3.2 - CURVAS DE OXIGENAÇÃO	27
4 - RESULTADOS	32
5-DISCUSSÃO	41
6-CONCLUSÕES	61
7- BIBLIOGRAFIA	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Hemoglobina humana (Hb A₀). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (cinza claro e cinza escuro), com 141 resíduos de aminiácidos e duas cadeias β (marrom claro e marrom escuro) com 146 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se loga o O₂. Figura extraído de Garret and Grisham, 1985. 02

Figura 02 - Sítio de ligação de 2,3-BPG na Hb humana formado pelos resíduos: valina 1 e histidina2 e 143 de ambas as cadeias- β , e a lisina 82 de apenas uma cadeia- β (Stryer 1988). 10

FIGURA 03 - Diagrama mostrando as ligações intra e inter-subunidades da Hb humana. As setas indicam os sítios para alguns não heme ligantes. 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 desoxi. Figura adaptada a partir do livro de K. Imai, 1982. 13

FIGURA 04 - Representação esquemática do tonômetro. Com uma seringa injetamos um volume conhecido de ar dentro do tonômetro. 25

Figura 05 - Espectro de absorção da hemoglobina na região do visível nas formas oxi e desoxi. Concentração da proteína = 60 μ M / heme. 27

Figura 06 - Gráfico de Hill obtido de pontos experimentais com a hemoglobina humana. A inclinação da reta nos fornece o n de Hill, que é igual a 2,81 neste experimento. Condições experimentais: [Hb]=60 μ M/heme, tampão Hepes-NaOH 10mM pH 7,23 + NaCl 25mM + sacarose 1 M, 25°C 30

Figura 07 - Curvas de oxigenação da Hb humana A₀ em (Δ)Hepes 10mM pH 7,2 isento de sais; e (o) 100mM NaCl e ($\blacksquare$) 50 μ M 2,3-BPG no mesmo tampão. Todos os experimentos foram realizados à 25° C. 32

Figura 08 - Dependência de p₅₀ da Hb humana A₀ com a concentração de 2,3-BPG ($\blacksquare$) e NaCl (o), em tampão Hepes 10mM pH7,2, 25°C. 33

Figura 09 - Efeito da mudança de osmolalidade (adição de sacarose) na curva de oxigenação da Hb humana A₀, determinado em solução isenta de ânions (▽) e em 50mM NaCl (o), medidos em tampão Hepes 10mM, pH 7,2, 25°C. Os pontos fechados se referem a medidas na presença de 1.4 osmol de sacarose. 35

Figura 10 - gráfico da dependência de p₅₀ da Hb humana com a atividade de água na presença de 0,1 (▲), 5 (●) e 100 mM NaCl (■); e também na presença de 50μM de 2,3-BPG (o). Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,2; 25°C. As diferentes declividades mostram diferentes mudanças de hidratação associadas com a transição desoxi para oxi Hb A₀. 37

Figura 11 - Gráfico da dependência da mudança de hidratação em relação a oxigenação da Hb humana em tampão HEPES 10mM, pH 7,2, contra a concentração de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros: $\Delta n_w^{\text{inicial}} = 25,9 \pm 1,3$; $\Delta n_w^{\text{final}} = 72,4 \pm 1,65$; $[Cl^-]_{50}$ (a concentração de Cloreto a metade da transição) = $12 \pm 0,9$ mM, e $n = 2,0 \pm 0,29$. 39

Figura 12 - Gráfico da dependência da mudança de hidratação em relação a oxigenação da Hb humana em tampão HEPES 5mM, pH 7,2, contra a concentração de 2,3-DPG. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros: $\Delta n_w^{\text{inicial}} = 26,8 \pm 4,0$; $\Delta n_w^{\text{final}} = 76 \pm 2,4$; $[DPG]_{50}$ (a concentração de DPG a metade da transição) = $0,7 \pm 0,3$ μM, e $n = 1$ mantido fixado no processo de ajuste. 40

Figura 13 - Efeito da concentração de NaCl sobre a afinidade da Hb Humana pelo oxigênio (P₅₀) medido em Tampão Hepes 10mM pH 7,2, 25°C. 42

Figura 14 - Gráfico da dependência de p₅₀ da Hb humana com atividade de água na ausência de ânions. A declividade do gráfico mostra um Δn_w de $16,8 \pm 1,0$. Condições experimentais: água e sacarose desionizadas, concentração de Hb = 180μM / heme. Temp. 25°C. 44

Figura 15 - Gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ obtido de soluções contendo Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K em várias concentrações de sacarose. Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de K_1 , sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra K_1 foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação. O valor de K_1 aumentou numa variação da concentração de sacarose que foi de 0 a 1,35 molal. A inclinação da reta é igual ao número de moléculas de água ligadas a Hb com 1 oxigênio ligado menos o número de moléculas de água ligadas a desoxiHb, e vale 46 ± 2 (Figura integrante do trabalho de Caon-Filho, O. e Colombo, M.F., 1997; Gentilmente cedida).

58

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1 - valores de Δn_w para a Hb humana na presença e ausência de ânions. 38

tabela 2 - Parâmetros obtidos através do ajuste da equação 26 para os pontos experimentais das figuras 11 e 14 52

Esquema 1 - Dependência da concentração do ânion com a variação de hidratação associados as diferentes estruturas da Hb. 48

Esquema 2 - Comparação entre a variação do número de moléculas de água e de prótons, que acompanha a oxigenação das diferentes estruturas da hemoglobina. 56



1 - INTRODUÇÃO

Neste trabalho apresentamos um estudo da relação estrutura e função de hemoglobinas, investigando as mudanças conformacionais induzidas nesta proteína pela ligação de ligantes através da medida da variação de hidratação associada à sua oxigenação em solução.

Nos próximos tópicos deste capítulo apresentaremos a molécula de Hb, destacando a descrição de sua função, estrutura e regulação metabólica por efetores heterotrópicos.

1.1 - A HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, existente principalmente nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados. Sua principal função é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do dióxido de carbono no caminho inverso. A Hb tem um diâmetro de 6,4 nm, massa molecular de aproximadamente 64,5 KD (Stryer, 1988).

Nos seres humanos adultos, existem duas frações de Hemoglobinas, a Hb A₁ que representa aproximadamente 98% do total de hemoglobina e a Hb A₂ que representa algo em torno de 2% do total de hemoglobina (Stryer, 1988)

A Hb A₁ é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas α com 141 resíduos de aminoácidos e duas β com 146 resíduos. (Voet e Voet 1995).



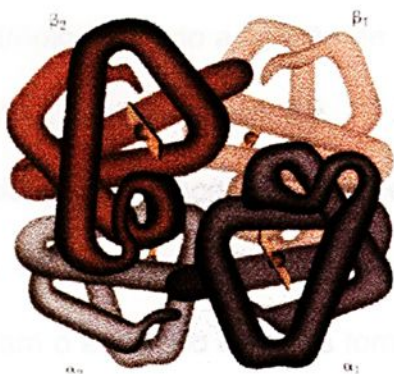


Figura 01 Hemoglobina humana (Hb A₀). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (cinza claro e cinza escuro), com 141 resíduos de aminiácidos e duas cadeias β (marrom claro e marrom escuro) com 146 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O₂. Figura extraída do livro de Garret e Grisham, 1985.

O oxigênio liga-se reversivelmente ao átomo de ferro do grupo heme, totalizando um complexo de quatro moléculas de gás por molécula de proteína. O Fe²⁺ da Hb pode ser oxidado a Fe³⁺ e formar metahemoglobina (metaHb), que não liga oxigênio. Os eritrócitos contém enzimas redutoras que convertem a metahemoglobina formada novamente ao estado ferroso.

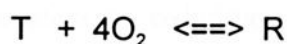
A hemoglobina possui duas conformações distintas, a R (relaxada), que representa a proteína totalmente oxigenada e a T (tensa) onde a proteína está totalmente desoxigenada (Forbes e Roughton, 1931). Consequentemente a ligação de O₂ a esta proteína induz à mudanças em sua conformação terciária e quaternária.

Esta proteína, possui muitos efetores alostéricos, os quais modulam sua afinidade de ligação ao oxigênio. Um efector alostérico pode ser homo ou heterotrópico. Um efector é considerado homotrópico quando a ligação de um ligante X interfere na ligação de uma outra molécula de X a um outro sítio

protéico; e efetor heterotrópico quando a ligação de um ligante Y, interfere na ligação de um outro ligante Z à mesma proteína.

A integração funcional da hemoglobina às necessidades fisiológicas é feita através da ligação de efetores heterotrópicos (Cl^- , fosfatos orgânicos, prótons), os quais modulam o equilíbrio entre as formas "tensa" T e "relaxada" R e, portanto, a afinidade por O_2 (Benesch *et al.* 1969). Na sua maioria, os efetores heterotrópicos ligam-se à forma desoxigenada (estrutura T), de forma a estabilizá-la e, em decorrência, diminuem a sua afinidade por oxigênio, haja visto que a afinidade da Hb na forma T por O_2 é menor que a sua afinidade quando na forma R.

As características de oxigenação da Hb tem sido interpretadas dentro do modelo Monod, Wyman e Changeaux de dois estados (1965). Neste modelo, a prevalência de uma estrutura em relação a outra, se reflete no equilíbrio alostérico da hemoglobina. De acordo com o esquema abaixo,



uma maior população de proteína na conformação R desloca o equilíbrio para o lado direito, ou seja, facilitaria a ligação do oxigênio à hemoglobina. Por outro lado, uma maior população de proteína na conformação T desloca o equilíbrio para o lado esquerdo da reação, ou seja, a ligação (afinidade) do oxigênio à proteína é diminuída.

Os efetores heterotrópicos da Hb em sua maioria, se ligam na conformação desoxi de forma a estabilizá-la. Assim a prevalência da estrutura



T em relação a estrutura R, causa uma diminuição da afinidade da proteína pelo oxigênio.

Em Hbs de mamíferos, de modo geral, a afinidade por oxigênio é diminuída significativamente em relação as suas propriedades intrínsecas de oxigenação através da ligação de ânions, principalmente fosfatos orgânicos como o 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) e secundariamente pelo íon cloreto (Cl^-). Os efeitos destes ânions sobre as propriedades funcionais das Hbs serão comentados nos tópicos deste capítulo adiante.

A afinidade da hemoglobina por O_2 é determinada através da p50, ou seja, a pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios de ligação de O_2 na proteína, (grupos heme).

A ligação seqüencial de oxigênio à hemoglobina induz a mudanças estruturais terciárias e quaternárias na estrutura da Hb, resultando num constante aumento da afinidade por O_2 até a saturação, fenômeno conhecido como ligação cooperativa do oxigênio. A caracterização molecular detalhada destas mudanças estruturais foi possível de ser realizada comparando as estruturas cristalográficas da Hb nos dois estados finais da oxigenação, o desoxi-T e o oxi-R (Perutz, 1970; Baldwin e Chothia, 1979), Historicamente, a descoberta de que a estrutura da desoxiHb difere da oxiHb deu grande suporte ao modelo alostérico de dois estados proposto por Monod, Wyman e Changeaux em 1965. Esta descoberta propiciou, ainda uma descrição molecular do efeito de ligantes heterotrópicos como H^+ e BPG sobre a afinidade da Hb por O_2 .



Entretanto, estudos funcionais recentes, tem demonstrado claramente a existência de intermediários energéticos no processo de oxigenação da Hb, fato incompatível com o modelo MWC (Ackers *et al.*, 1992). O modelo MWC supõe que o sistema pode ser descrito assumindo apenas a existência de dois estados conformacionais, o tenso e o relaxado, cujas características conformacionais correspondem aquelas dos dois estados finais da oxigenação. Mas o transporte de oxigênio *in vivo* requer da hemoglobina, uma certa sintonia para se adaptar as necessidades fisiológicas do organismo. Esta sintonia é alcançada pela ligação de ligantes cooperativamente positivos e pela afinidade global de oxigênio do sistema. A otimização simultânea destes dois parâmetros requer grande flexibilidade dos parâmetros alostéricos da Hb, sugerindo que apenas duas prováveis estruturas não sejam suficientes para explicar este fenômeno. Além do mais, o modelo de dois estados não pode explicar a cooperatividade negativa das ligações de certas Hbs de peixe (Brunori, 1973) e de algumas Hbs quimicamente modificadas por ligações cruzadas ("cross-linked") entre os seus domínios (Bucci *et al.* 1996).

O trabalho clássico de Ackers e col. nos intermediários híbridos e ferroso-férricos, propõe a presença de uma terceira conformação ao longo do caminho da oxigenação da Hb (Ackers *et al.* 1992, Ackers e Smith 1987, Huang *et al.* 1996a, 1996b, Holt e Ackers 1995). Evidências espectroscópicas da existência deste terceiro estado cooperativo da Hb foram obtidos por Jayaraman e Spiro (Jayaraman *et al.* 1995) por espectroscopia de espalhamento Raman no ultra-violeta. Medidas de Entalpia de oxigenação



obtidos por calorimetria direta e por gráficos de Van't Hoff, indicam também a presença de passos de ligações dirigidas por entropia e entalpia de modo alternado, ao longo do caminho de oxigenação da Hb (Bucci *et al.* 1991, 1993; Johnson *et al.* 1992, 1995). Estudos recentes de difração de raios X tem mostrado que mudanças nas condições de cristalização (Mercedes Silva *et al.* 1992.), ou modificações químicas (Schumacher *et al.* 1997) e mutacionais (Smith, F.R. *et al.*, 1991), também produzem estruturas de Hb com conformações distintas das canônicas R e T. Todas estas evidências aparentam estar coerentes com a proposição sugerindo a existência de estados conformacionais intermediários na hemoglobina (Ackers *et al.* 1992, Bucci *et al.* 1998).

Estes estudos funcionais e estruturais demonstram portanto, que o controle da função da Hb ocorre através de um caminho estrutural mais complexo que o sugerido pelo modelo de dois estados, isto é, um caminho que envolve transições por estados conformacionais intermediários entre os estados T e R. O detalhamento deste caminho ainda requer a caracterização estrutural dos eventuais estados intermediários da oxigenação desta proteína. Entretanto, as condições da solução que estabilizariam algumas destas espécies intermediárias são desconhecidas.

Nos tópicos a seguir, resumiremos o efeito dos principais efetores alostéricos sobre a oxigenação de Hbs de mamíferos, destacando seu efeito sobre o equilíbrio alostérico entre as conformações R e T desta proteína.



1.2 - O EFEITO DO ÍON CLORETO

Um efetor alostérico fisiologicamente importante para a Hb é o íon cloreto, que contribui para a regulação da p50, estabilizando a estrutura T (desoxi) e assim reduzindo sua afinidade por O₂, (Perutz *et al.*, 1994).

Os efeitos do íons cloreto na hemoglobina, foram estudados ao longo de muitos anos. Acreditava-se que estes íons se ligavam à sítios específicos da proteína; ao resíduo N-terminal do aminoácido da Val 1 α_2 e o grupo guanidino da Arg 141 α_1 , resíduo C terminal (Kilmartin *et al.*, 1980).

Fronticelli *et al.* (1988) e Razynska *et al.* (1990), demonstraram que tanto o íon cloreto (Cl⁻), quanto o íon brometo (Br⁻) podem elevar a p50 da Hb bovina aos mesmos níveis, ou seja, mostraram que Hb é sensível á diferentes ânions monovalentes.

Perutz *et al.* (1993, 1994) mostraram, através de medidas de equilíbrio de oxigenação, que a influência do cloreto na p50 e no efeito Bohr alcalino (a ser descrito adiante) é o mesmo nas hemoglobinas bovina e humana, onde a variação da p50 da proteína totalmente desionizada, titulada com NaCl ($\Delta \log p50 / \Delta \log [Cl^-]$), é muito semelhantes para ambas hemoglobinas. Nestes estudos, Perutz *et al.* contestam as conclusões de Fronticelli *et al.* (1988), que propõe que a Hb bovina teria sítios alostéricos para a ligação de Cl⁻ distintos daqueles existentes na Hb humana.

A diminuição da afinidade de Hbs por oxigênio com a adição de Cl⁻, se deve a que este íon age como um efetor alostérico que estabiliza a estrutura quaternária desoxi (T). Por muito tempo, se acreditou que a ligação de Cl⁻ à



desoxi Hb ocorresse em 2 sítios específicos (Imai 1982, Colombo *et al.* 1994, Chiancone *et al.* 1972, 1975). Entretanto, Perutz *et al.* em trabalhos publicados em 1993 e 1994, mostraram evidências sugerindo que o efeito de Cl^- na oxigenação da Hb, ocorre sem a ligação deste íon a algum sítio específico. Para isso se basearam em medidas funcionais do efeito de Cl^- em Hb humana e bovina, e também em dados cristalográficos. Estes autores propuseram ainda, um novo mecanismo para este efeito, descrito a seguir.

Para descrever este mecanismo, Perutz mostra que no interior da molécula de hemoglobina, existe uma cavidade central bem definida, contendo 8 resíduos de aminoácidos carregados positivamente e 3 resíduos carregados negativamente, o que gera um excesso local de cargas positivas. Este excesso de cargas positivas, resulta numa repulsão eletrostática gerada por estes resíduos catiônicos. Esta repulsão eletrostática, seria suficiente para desestabilizar a estrutura T, deslocando o equilíbrio alostérico para a estrutura R, resultando em uma afinidade aumentada da Hb pelo oxigênio.

Perutz *et al.* (1994) e Bonaventura *et al.* (1994), propuseram que o excesso estas cargas da cavidade central são neutralizadas por condensação iônica de Cl^- , ou seja, este ânion pode blindar parcialmente estas cargas positivas, diminuindo a repulsão eletrostática entre elas, deslocando assim o equilíbrio alostérico de volta à conformação T da proteína, o que diminui sua afinidade pelo oxigênio.

Para sustentar esta hipótese, Perutz *et al.* (1994), comparou o efeito de cloreto ($\Delta \log p_{50} / \Delta \log [\text{Cl}^-]$), sobre a afinidade de várias hemoglobinas



humanas mutantes por O_2 . Algumas destas mutações incluem a deleção de alguns dos resíduos responsáveis pelo excesso de cargas positivas na cavidade central. Nestas hemoglobinas, o efeito de cloreto diminui proporcionalmente ao número de deleções destas cargas. Substituições que tornam esta cavidade mais eletropositiva aumentam o efeito de cloreto. Substituições que a tornam mais eletronegativa mostram um efeito reverso, salvo algumas exceções por natureza estereoquímica do resíduo de carga positiva que se encontra redirecionado em algumas Hbs mutantes. Mutações em resíduos na superfície da Hb não alteram a sensibilidade da proteína ao Cl^- , logo estes autores concluíram com estes estudos que as cargas positivas da cavidade central estão diretamente envolvidas com o efeito de Cl^- na hemoglobina.

Além de ânions monovalentes, como o Cl^- , o F^- , o Br^- , alguns poliânions também contribuem para a regulação do equilíbrio alostérico da Hb, como os fosfatos orgânicos. A seguir, comentaremos a respeito do 2,3-BPG, o principal fosfato orgânico utilizado na regulação alostérica de Hbs de mamíferos.

1.3 - O EFEITO DO 2,3-BIFOSFOGLICERATO

Nos eritrócitos, uma importante fração do fosfato ocorre na forma de 2,3-BPG. A sua concentração intracelular em eritrócitos humanos é de cerca de 4 a 5 mM. O BPG liga-se a desoxi-hemoglobina tetramérica num



complexo molar 1:1, conforme mostrado na figura 02. Na ausência de BPG, em tampão HEPES 10mM, pH 7,2, à 37°C e na ausência de outros sais, o p50 da hemoglobina humana é da ordem de 1 torr. Em presença de concentrações fisiológicas de 2,3-BPG, o valor de p50 da Hb humana, passa a 26 torr mantidas as demais condições experimentais (Stryer 1988).

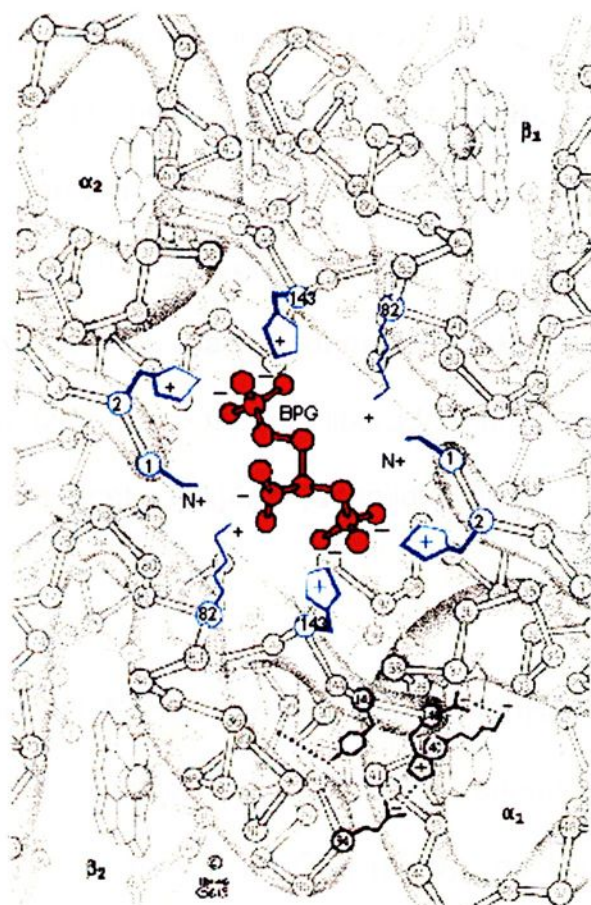
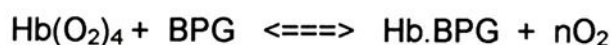


Figura 02 - Sítio de ligação de 2,3-BPG na Hb humana formado pelos resíduos: valina 1 e histidina 2 e 143 de ambas as cadeias-β, e a lisina 82 de apenas uma cadeia-β (Stryer 1988).

O principal efeito do BPG é diminuir a afinidade da Hb pelo O₂, permitindo que a hemoglobina libere o oxigênio nos capilares dos tecidos, conforme ilustrado no seguinte esquema:



Assim, numa concentração fixa de oxiHb, o aumento na concentração de BPG promove a dissociação do O_2 da Hb ou, inversamente, uma elevação na pO_2 (pressão parcial de O_2) promove a dissociação do complexo Hb.BPG, com consequente formação de HbO_2 . O BPG pode servir de controle sensetivo na adaptação do indivíduo à hipóxia, sendo que a sua concentração aumenta significativamente em altitudes elevadas (cerca de 20% a 5.000 m acima do nível do mar) (Smith *et al.* 1988; Stryer, 1988).

A existência de um sítio de ligação específico para BPG e de outros fosfatos na estrutura da desoxiHb, permite explicar certos fenômenos fisiológicos, por exemplo, a alta concentração de BPG no sangue de uma mulher grávida faz com que o O_2 seja liberado mais facilmente na placenta permitindo que o feto receba oxigênio (Schmidt-Nielsen, 1996).

1.4 - O EFEITO DO CO_2 E PRÓTONS: O EFEITO BOHR

O equilíbrio do sistema Hb- O_2 é alterado variando-se a concentração de íons H^+ e a pressão parcial de CO_2 (pCO_2), do meio que circunda a hemácia, fenômeno conhecido como efeito Bohr. Este efeito é atribuído à mudança do pH ocasionada por uma modificação na pCO_2 e pelo aumento da concentração de ácido láctico, liberado em condições de intensa atividade muscular. Este efeito é também evidente com soluções purificadas de Hb.



O CO_2 dissolvido em solução modifica a concentração de H^+ , porque é rapidamente hidratado, produzindo H_2CO_3 , que resulta na diminuição do pH sanguíneo:



Por outro lado, a oxigenação da Hb resulta na alteração do pK_a aparente de alguns resíduos ácidos das cadeias peptídicas, variando de 7,71 na oxiHb para 6,17 na desoxiHb (Smith *et al.* 1988); por conseguinte, a HbO_2 atua como ácido mais forte do que a Hb. Assim, a reação reversível que descreve o efeito Bohr pode ser representada esquematicamente da seguinte maneira:



A relação não é estequiométrica; cerca de 0,7 mol de H^+ são liberados para cada equivalente de O_2 ligado à Hb em meio salino (Smith *et al.* 1988).

O efeito Bohr possui considerável importância fisiológica. A medida que o sangue arterial banha os tecidos, o CO_2 difunde-se nos eritrócitos, reduzindo significativamente o pH e a afinidade da Hb pelo oxigênio, produzindo a liberação de O_2 conforme a reação $\text{H}^+ + \text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + \text{HbH}^+$.

Nos pulmões, a liberação de CO_2 pelas vias respiratórias, eleva significativamente o pH sanguíneo e aumenta a afinidade da Hb pelo O_2 , permitindo deste modo a saturação da Hb com O_2 em pO_2 mais baixa.

A figura 03 mostra uma representação esquemática dos sítios de ligação presumidos e/ou confirmados para os efetores alostéricos H^+ , Cl^- , BPG e CO_2 na hemoglobina, segundo o modelo proposto por K. Imai (1982).



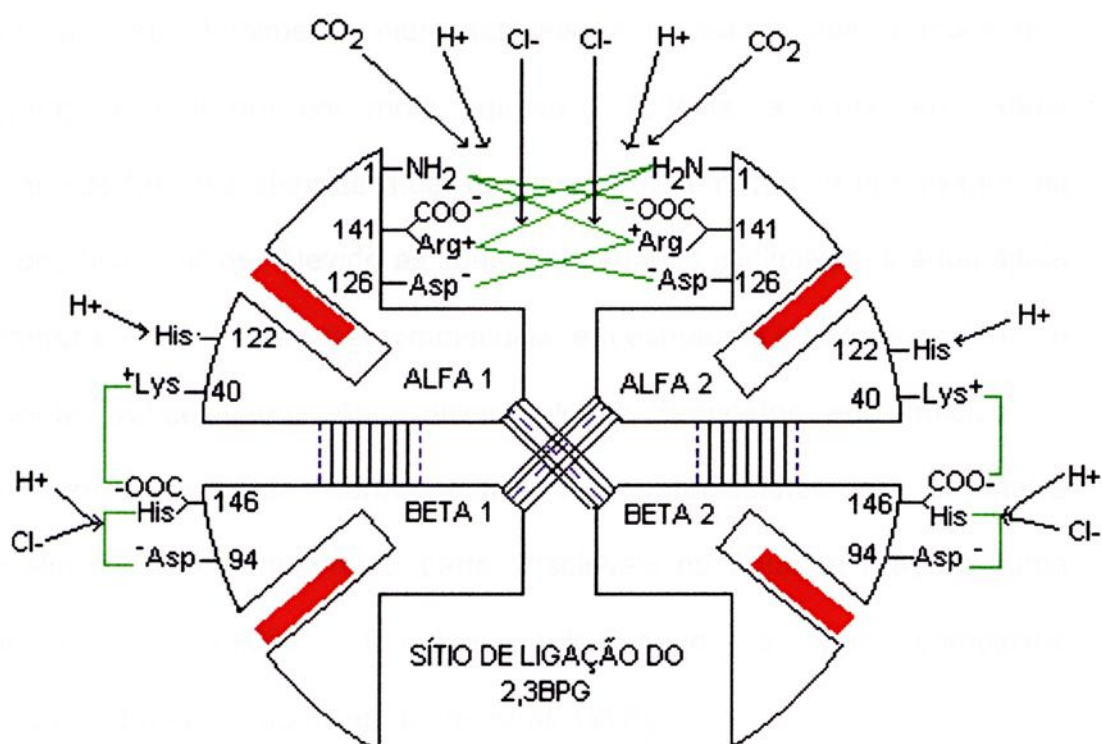


FIGURA 03 - Diagrama mostrando as ligações intra e inter-subunidades da Hb humana. As setas indicam os sítios para alguns não heme ligantes. Os traços coloridos representam: contatos de van der Waals , pontes salinas e pontes de hidrogênio . As pontes salinas (em verde) aqui representadas, estão presentes na forma desoxi mas ausentes na forma desoxi. Figura adaptada a partir do livro de K Imai, 1982.

1.5- O PAPEL DA ÁGUA NA ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

Os meios líquidos de todas as células consistem em soluções diluídas de íons inorgânicos, tanto no compartimento intracelular quanto no extracelular, sendo que as propriedades dos compostos biológicos em todos os seres vivos ajustam-se notavelmente à água como solvente. Muitos

compostos são totalmente hidrossolúveis, e a maioria das reações que ocorrem se realizam em meio aquoso. Todavia, a água tem outras numerosas funções além de atuar como solvente em que se processam as reações bioquímicas. Devido as suas propriedades exclusivas, a água ajuda a manter a estrutura das macromoléculas em estruturas supramoleculares e organelas subcelulares. Além disso, alguns compostos, em particular os que fazem parte de certas estruturas supracelulares ou organelas subcelulares, são, em grande parte, insolúveis na água, e reagem numa interface líquido-sólido formada pela água e por complexos macromoleculares insolúveis (Smith *et al.* 1988).

A força F de interação elétrica entre duas cargas depende diretamente da constante dielétrica D , que para qualquer meio relaciona-se com as cargas e_1 e e_2 de duas partículas deste meio e com a distância r entre elas através da lei de Coulomb:

$$F = \frac{e_1 e_2}{D r^2} \quad (01)$$

A constante dielétrica da água excede a da maioria dos líquidos. Para a água, $D = 87,8$, enquanto, para o benzeno, $D = 2,3$, ambas à temperatura de 0°C (Weast *et al.*, 1987). Isso indica que a força de interação elétrica entre dois íons, como o Na^+ e Cl^- por exemplo, é cerca de 40 vezes maior no benzeno do que na água (Smith *et al.* 1988).

A interação relativamente fraca de íons de carga oposta na água está relacionada com a capacidade das moléculas de água de se orientar em



torno dos íons. Os átomos de oxigênio de carga negativa tendem a se agrupar ao redor dos cátions, enquanto os átomos de hidrogênio de carga positiva o fazem ao redor de ânions através de interações de íon-dipolo. Em alguns casos, um invólucro de moléculas de água, se imobiliza ao redor do íon, sendo toda a rede estabilizada pela ligação de hidrogênio com as moléculas adjacentes a este envoltório. O mesmo acontece para moléculas maiores (macromoléculas biológicas), onde a água se orienta em torno dos seus grupos polares, como a hidroxila (-OH), carbonila ($=C=O$), carboxila ($-COO^-$), ou aminogrupos ($-NH_3^+$), formando a chamada “camada de solvatação”, que é proporcional à extensão da superfície da macromolécula exposta ao solvente (Voet e Voet. 1995). Esta camada de hidratação contribui significativamente para a estabilidade termodinâmica da estrutura nativa de proteínas e outras macromoléculas biológicas como será exposto a seguir.

1.6 - O EFEITO DA ATIVIDADE DE ÁGUA SOBRE A ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS

Sabemos que um número diferencial de moléculas de águas se ligam a diferentes conformações das proteínas. Poderá este “número diferencial de água” contribuir para a energética das reações protéicas como os íons e os metabólitos os fazem? Se uma proteína qualquer mudar sua conformação, em consequência de sua atividade, para uma conformação



mais hidratada, a proteína não encontrará barreiras para esta mudança conformacional se estiver em um meio com alta atividade de água, pois haverá água suficiente para se ligar a esta nova superfície protéica que está sendo exposta ao solvente. Mas e se a proteína se encontrar em um meio com baixa atividade de água? Será possível que esta mudança conformacional acompanhada de um aumento de hidratação, ocorra com a mesma eficiência, uma vez que a atividade da água na solução é menor?

Tendo em vista todos estes argumentos, é de se esperar que mudanças na atividade de água da solução, interfiram na posição do equilíbrio conformacional $R \leftrightarrow T$ da Hb, da mesma forma que variações nas condições de pressão de O_2 , temperatura, pH, concentração de ânions, etc. o fazem.

Em 1992, Colombo *et al.* confirmaram a dependência da oxigenação da Hb com a atividade de água. Para isso realizaram experimentos analisando a curva de oxigenação da hemoglobina humana, proteína modelo para o estudo do alosterismo, a diferentes concentrações de solutos neutros na solução.

A comparação das estruturas cristalográficas da oxiHb (R) e desoxiHb (T), demonstra que vários contatos entre as subunidades são quebrados e expostos ao solvente durante a transição $T \Rightarrow R$. Esta mudança implica numa diferença na hidratação entre as duas conformações e consequentemente ligação de água com a oxigenação (Colombo *et al.* 1992),



uma vez que a estrutura R (oxi) é aparentemente mais hidratada que a estrutura T (Lesk *et al.* 1985).

O papel da água sobre o controle alostérico tem sido estudado usando como modelo a oxigenação da Hb pelo chamado método de "stress" osmótico (Colombo *et al.* 1992). O princípio deste método consiste em usar solutos neutros, que são excluídos da superfície de hidratação protéica (Arakawa e Timasheff 1982a e 1982b, 1982), como substância que reduz a atividade de água, e determinar como a afinidade da Hb por O_2 varia com a diminuição da atividade de água.

Na análise do efeito dos solutos neutros sobre as características de ligação de O_2 à Hb, dois casos foram considerados: a ligação direta do soluto com a proteína e o efeito indireto do soluto sobre a atividade de água (a_w). Para fazer a distinção entre estes dois casos, Colombo e colaboradores utilizaram solutos com estruturas químicas diferentes e demonstraram que a afinidade da Hb por O_2 só depende do valor da a_w e não das características do soluto (Colombo *et al.* 1992, 1994).

Mais recentemente, Colombo e Bonilla-Rodriguez (1996), analisaram a possibilidade de interação direta de solutos neutros com a Hb utilizando métodos termodinâmicos apropriados. Os resultados deste trabalho demonstraram que a mudança de $p50$ não se deve à interação preferencial do soluto com a Hb, mas sim com a diminuição da atividade de água da solução.



O efeito de solvatação pode ser determinado quantitativamente em termos do número diferencial de moléculas de água ligadas entre os dois extremos conformacionais da proteína através de equações de conectividade originalmente propostas por Wyman e Gill em 1990 e adaptadas à este fim por Colombo *et al.* 1992.

A equação de conectividade de Wyman que determina o número de moléculas de um ligante que se associa à hemoglobina com a ligação de oxigênio é expressa da seguinte forma:

$$-4 \left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \Delta n_L = (n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}}) \quad (02)$$

onde p_{50} tem o significado antes citado, a_L é a atividade do ligante L, a_i é a atividade de outros ligantes que não L, Δn_L é a diferença do número de moléculas de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb e 4 é o número de sítios de ligações de oxigênio existentes na hemoglobina.

Esta análise é correta apenas quando só a atividade de um ligante L, varia e a atividade de qualquer outro ligante (a_i) presente na solução é mantida constante. Quando o ligante alostérico L for a água, esta relação pode ser escrita como:

$$-4 \left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = (n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}) = \Delta n_w \quad (03)$$

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; a_i é a atividade de

um ligante i diferente da água e Δn_w o número diferencial de águas ligadas no estado totalmente oxigenado em relação ao totalmente desoxigenado (efeito de água) (Colombo *et al.* 1992).

A partir destas equações, Colombo *et al.* (1992) mostraram que aproximadamente 70 moléculas de água são ligadas com a oxigenação completa da Hb. Este Δn_w de 70 moléculas de água, foi encontrado em vários experimentos, independentemente da natureza do soluto neutro utilizado, mas todos eles realizados na presença de aproximadamente 100mM de NaCl.

A ligação de 70 moléculas de água na transição conformacional $T \Rightarrow R$ da Hb está de acordo com o fato de que a estrutura mais hidratada da Hb, a R, tem uma maior superfície exposta ao solvente. Estas 70 águas, vêm preencher a camada de hidratação correspondente ao aumento da superfície protéica que está sendo exposta ao solvente por esta estrutura.



2 - OBJETIVOS

Pelo que foi exposto, muitos são os efetores heterotrópicos da hemoglobina capazes de susceptibilizar mudanças conformacionais que resultam em variação da atividade protéica (medidas em termos de $\Delta p50$).

Este trabalho tem como objetivo utilizar o método de stress osmótico para determinar, através de equações de conectividade, o número diferencial de moléculas de água ligadas à dois extremos conformacionais da Hb durante a oxigenação. O valor de Δn_w será utilizado como um indicativo de mudanças conformacionais, onde um valor alto de Δn_w representa maior exposição de superfície protéica ao solvente e consequentemente uma mudança conformacional maior.

A variação de Δn_w que acompanha a oxigenação será determinado na presença e ausência de efetores heterotrópicos como o Cl^- , 2,3-BPG a fim de determinar a existência ou não de mudanças conformacionais da Hb, induzidas pela ligação destes efetores.

Neste trabalho, investigamos a dependência do efeito de água na oxigenação da Hb com a concentração de Cl^- e 2,3-BPG. Os resultados a serem apresentados demonstram que a ligação destes ânions à Hb não só deslocam o equilíbrio conformacional entre as estruturas R e T clássicas, mas também que, na ausência destas interações, uma nova conformação da desoxiHb é estabilizada.



Uma das coisas que mais chama a atenção neste trabalho é que investigamos mudanças conformacionais na hemoglobina, utilizando para isso o próprio solvente do meio onde a Hb se encontra.



3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de sangue humano foram coletadas de um adulto saudável e não fumante através de punção venosa com seringas heparinizadas num total de 40 ml.

Todos os processos a seguir foram realizados a 4°C.

Após a retirada do plasma por centrifugação, as hemácias foram lavadas 4 vezes com solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50mM pH 8,5 contendo EDTA 1mM) onde o volume de tampão adicionado é igual ao de hemáceas decantadas. Ao final da lavagem, a hemólise ocorreu com a adição de solução hipotônica Tris-HCl 50mM pH 8,5 contendo EDTA 1mM (vol. tampão / vol. hemáceas). Os “debris” foram retirados com adição de clorofórmio (MERK), no mesmo volume que a solução da amostra, sob constante agitação. Em seguida houve centrifugação a 2.300 g por 120 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore 1,2 µm para posterior diálise contra tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5 contendo EDTA 1mM, num volume de 4 litros por no mínimo 12 horas.

- **Montagem da coluna:**

Os tampões utilizados na cromatografia são:

- Tampão inicial (A): Tris-HCl 15mM pH 8,4
- Tampão final (B): BisTris-HCl 15mM pH 7,00



2 gramas de resina DEAE-SEPHADEX A-50 (Pharmacia) são adicionadas a 300 ml de tampão A por 12 horas antes da montagem da coluna a temperatura ambiente. Este tempo tem como finalidade a hidratação da resina. Após a montagem da coluna XK-50 (Pharmacia) procedemos com o equilíbrio da mesma em câmara fria a 4°C, passando tampão A.

- **Eluição da amostra:**

Após a aplicação da amostra na coluna, passamos um fluxo de tampão A, durante 12 horas (aproximadamente 700 ml). No atual pH, 8,4, a hemoglobina está com uma carga efetiva negativa, o que resulta na retenção da proteína pelos cátions da resina. A seguir, a coluna foi acoplada ao FPLC modelo LKB Pharmacia, onde um banho térmico mantinha a coluna a 4°C. A eluição da amostra ocorreu com a formação de um gradiente de pH. O gradiente foi iniciado em 50% de B e 50% de A. Até que o gradiente chegasse a 100% de B, foram passados 300 ml do mesmo tampão. O fluxo de saída da coluna é de 4 ml / min.

A primeira fração eluída, é a Hb A₂, que representa em média 2% do total da amostra. Esta fração elui em um gradiente de aproximadamente 75% de B. Neste ponto o pH do tampão de eluição atinge ~7,9 que é o ponto isoelétrico da fração de A₂ a 4°C. Nesta porcentagem de tampão B, o gradiente é mantido constante até a eluição total da fração de A₂. A fração de Hb A₁ elui com um gradiente de 100 % de B.



Em seguida a amostra de Hb A₁ eluída foi previamente concentrada até um volume de aproximadamente 50 ml para passagem em coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA previamente lavada conforme recomendação do fabricante. A amostra é passada nesta coluna por no mínimo 5 vezes. Esta coluna comporta 20 ml de resina perfeitamente compactada, e tem como função a desionização da amostra.

Após a desionização, por convenção a Hb A₁, isenta de quaisquer íons passa a se chamar Hb A₀.

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

Em seguida a amostra de Hb A₀ é concentrada até aproximadamente 10mM / heme e armazenada em alíquotas de 250 µl em N₂ líquido.

- **Medidas de oxigenação**

O método utilizado para a determinação dos parâmetros funcionais da hemoglobina, isto é, p50 e n₅₀, foi o tonométrico-espectrofotométrico (Riggs & Wolbach, 1956; Rossi-Fanelli & Antonini, 1958). A figura 04 mostra uma representação esquemática do tonômetro utilizado em nossos experimentos. No início do experimento é obtido o espectro de absorção da solução de oxiHb contida no interior do tonômetro, em seguida esta solução é desoxigenada através da passagem de N₂ gasoso. Após a desoxigenação é



obtido o espectro de absorção da desoxiHb. Com estes dois espectros dos extremos da oxigenação, podemos determinar a fração da saturação através de qualquer outro espectro de absorção intermediário a estes.

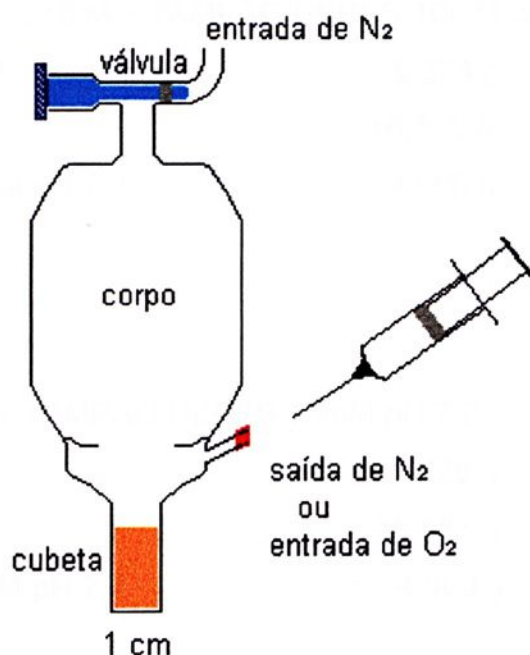


FIGURA 04 - representação esquemática do tonômetro. Com uma seringa injetamos um volume conhecido de ar dentro do tonômetro.

Todas as medidas de equilíbrio de oxigenação foram realizadas a 25°C e na presença de tampão Hepes-NaOH 10mM pH 7,2, salvo exceções que serão justificadas adiante. Na preparação do tampão tomou-se o cuidado de pesar cuidadosamente cada um dos reagentes para que não fosse necessário titular a solução com ácido ou base para ajustar o pH, pois o eletrodo do pHmetro poderia contaminar a solução com KCl se permanecesse por um longo tempo em contato com a solução.

- **Preparação dos tampões:**

TAMPÃO HEPES-NaOH 50Mm pH 7,2

Hepes Salt Free P.M. 238,3	0,0500 M
----------------------------	----------

NaOH P.M. 40,0	0,0234 M
----------------	----------

TAMPÃO SACAROSE 1,216 M + TAMPÃO HEPES 10mM pH 7,2

Sacarose P.M. 342,3	8,324 g
---------------------	---------

Água Mili-Q	10,800 g
-------------	----------

Tampão Hepes 50mM pH 7,2	4,000 g
--------------------------	---------

Ajustar pH até 7,2

TAMPÃO NaCl 1,05 M + TAMPÃO HEPES 10mM pH 7,2

NaCl P.M. 58,44	1,228 g
-----------------	---------

Água Milli-Q	15,583 g
--------------	----------

Tampão Hepes 50mM pH 7,2	4,000 g
--------------------------	---------

Ajustar pH até 7,2

Ao final da preparação dos tampões de sacarose e NaCl, a concentração dos mesmos foi padronizada em osmometro "Osmomette A" modelo #5002 - PRECISION SYSTEMS INC.



3.2 - CURVAS DE OXIGENAÇÃO

O grau de saturação $\bar{Y}$ é calculado em cada valor de pO_2 a partir das leituras de absorbância da oxi (HbO_2) e desoxiemoglobina (Hb) nos seguintes comprimentos de onda: 541, 560, 569, 577, 630 e 700, onde é encontrada a maior variação espectral do grupo heme com a saturação.

$$\bar{Y} = (Abs_i - Abs_{Hb}) / (Abs_{HbO_2} - Abs_{Hb}) \quad (04)$$

onde Abs_i seria a absorbância medida em 577nm a cada adição de O_2 ; Abs_{Hb} a absorbância da Hb totalmente desoxigenada e Abs_{HbO_2} a absorbância da Hb totalmente oxigenada. A figura 05 mostra o espectro de absorção característica do grupo heme na região do visível que vai de 500 a 700 nm nas formas oxi e desoxi da proteína.

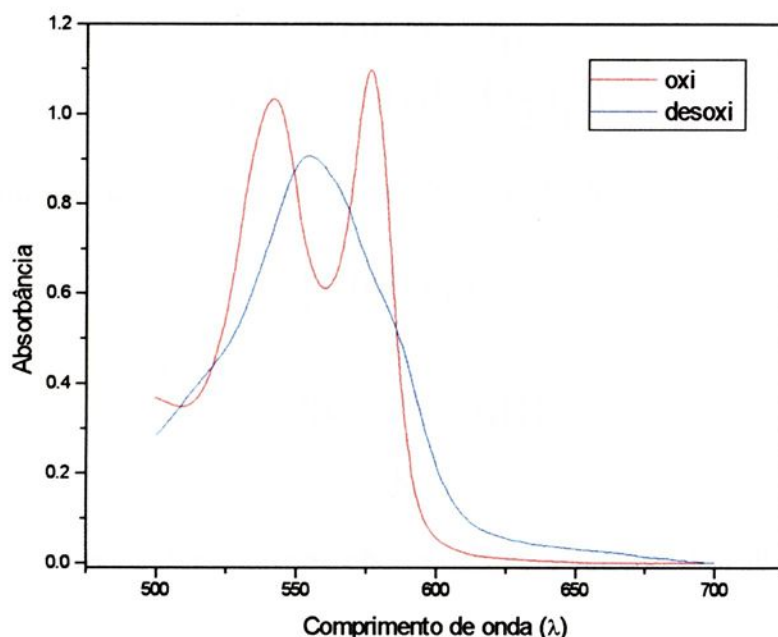


Figura 05 - Espectro de absorção da hemoglobina na região do visível nas formas oxi e desoxi. Concentração da proteína = $60\mu M$ / heme.

A pressão parcial de O_2 no tonômetro é calculada do volume de ar injetado V_i^1 a pressão parcial de O_2 na atmosfera (P_o) (medida em barômetro) e o volume da fase gasosa no tonômetro V_t :

$$pO_2 = (P_o \times V_i) / V_t \quad (05)$$

Os parâmetros funcionais $p50$ e n_{50} são calculados a partir das equações derivadas do equilíbrio hipotético demonstrado por Archibald Hill em 1913, onde:



onde:

$$K = \frac{[Hb][O_2]^n}{[Hb.(O_2)_n]} \quad (06)$$

sua saturação fracional $\bar{Y}$, é expressa como (STRYER 1988):

$$\bar{Y} = \frac{n[Hb.(O_2)_n]}{n([Hb] + [Hb.(O_2)_n])} \quad (07)$$

rearranjando a equação 06 e combinando-a com a 07, temos:

$$\bar{Y} = \frac{\frac{[Hb][O_2]^n}{K}}{\frac{[Hb][O_2]^n + K[Hb]}{K}} \quad (08)$$

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

¹ Onde o O_2 constitui 20,95%



$$\bar{Y} = \frac{[O_2]^n}{K + [O_2]^n} \quad (09)$$

sendo o O_2 um gás, é conveniente expressar sua concentração em termos de pO_2 pressão parcial de oxigênio (em Torrs) na atmosfera em torno da solução, assim a equação 09 pode ser expressa como:

$$\bar{Y} = \frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \quad (10)$$

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

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \cdot \frac{1}{1 - \left(\frac{[pO_2]^n}{K + [pO_2]^n} \right)} \quad (11)$$

Com alguns rearranjos, temos:

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[pO_2]^n}{K} \quad (12)$$

Obtendo-se o logarítimo de ambos os lados da equação 12, temos:

$$\log \left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} \right) = n_H \log(pO_2) - \log K \quad (13)$$

Em um gráfico de $\log [\bar{Y} / (1 - \bar{Y})]$ contra $\log pO_2$, chamado de "gráfico de Hill", a região central da curva de oxigenação aproxima-se de uma reta.

Sua inclinação n_H no ponto médio de ligação ($\bar{Y} = 0,5$) é chamado de coeficiente de Hill e o valor da afinidade da Hb por O_2 , (p_{50}), é dado pelo valor de pO_2 . Neste ponto, o valor de n_H reflete o grau de cooperatividade da ligação, que é um número menor que a quantidade total de sítios de ligação n . Para a hemoglobina $n=4$, e n_H para a Hb humana, este valor está entre 2 e 3, dependendo das condições experimentais.

Um gráfico de Hill típico para a ligação de O_2 à Hb é mostrado na figura 06. Nestas condições $n_H=2,8$, o que indica a forte cooperatividade da reação.

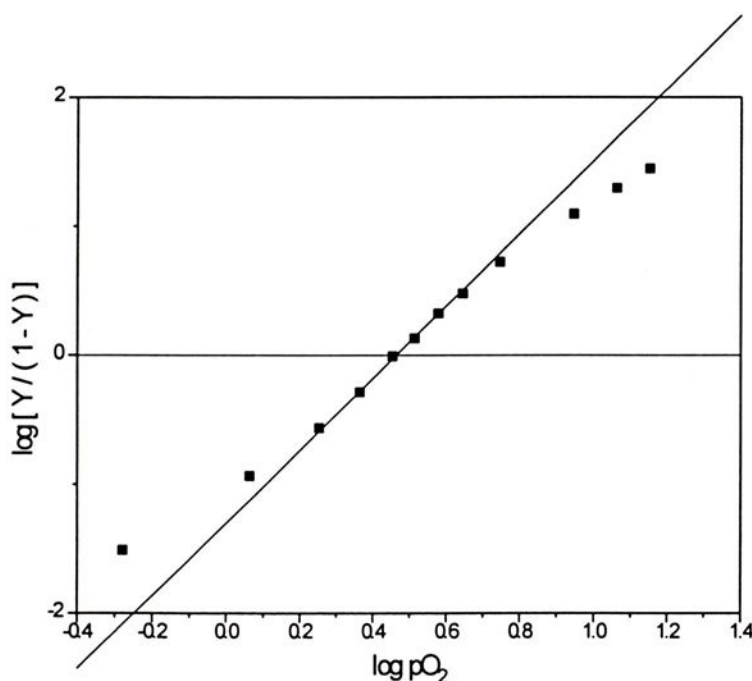


Figura 06 - Gráfico de Hill obtido de pontos experimentais com a hemoglobina humana. A inclinação da reta nos fornece o n de Hill, que é igual a 2,81 neste experimento. Condições experimentais: $[Hb]=60\mu M$ /heme, tampão Hepes-NaOH 10mM pH 7,23 + NaCl 25mM + sacarose 1 M, 25°C

Ao final de cada experimento o pH é medido em pHmetro CORNING pH/ion analyzer 350.



Após a leitura do pH, a medida da osmolalidade da solução (Osmoles/Kg), é realizada em osmometro "Osmomette A" modelo #5002 - PRECISION SYSTEMS INC. A relação entre a osmolalidade e a atividade de água da solução é dada por:

$$\ln(a_w) = \frac{-\text{Osmolalidade}}{55,55} \quad (14)$$

onde 55,55 é a molalidade da água pura (Colombo *et al.* 1996).



4 - RESULTADOS

A afinidade da Hb por oxigênio é altamente dependente da concentração de ânions na solução. A figura 07 mostra as curvas de oxigenação das Hb humana à temperatura ambiente (aprox. 25°C), determinadas em tampão Hepes livre de sais, na presença de 100mM de NaCl e na presença de concentrações saturantes de 2,3-BPG (50 μ M) para uma concentração de proteína igual a 60 μ M / heme .

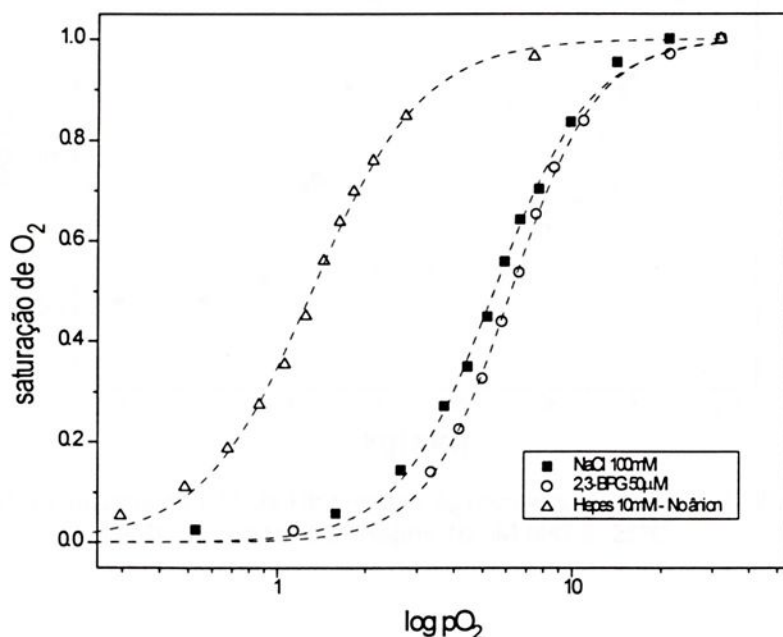


Figura 07 - Curvas de oxigenação da Hb humana A₀ em (Δ)Hepes 10mM pH 7,2 isento de sais; e (○) 100mM NaCl e (■) 50 μ M 2,3-BPG no mesmo tampão. Todos os experimentos foram realizados à 25° C, [Hb]=60 μ M / heme.

Na ausência de ânions, o O₂ também se liga cooperativamente a Hb com uma alta afinidade (p_{50} =1,4mmHg e n_{50} =2,6). A adição de 2,3-BPG ou Cl⁻ diminuem a afinidade da Hb humana por oxigênio (p_{50} com 50 μ M BPG = 5,45 mmHg e com 100mM NaCl = 6,18 mmHg). A figura 08 mostra os



gráficos de $\log(p_{50})$ versus $\log[\text{ânion}]$ para Cl^- e BPG. O aumento de $\log(p_{50})$ com $\log[\text{ânion}]$ vistas nestes gráficos, analisados em termos de efeito de conectividade, indicam que tanto Cl^- quanto o 2,3-BPG diminuem a afinidade da Hb por O_2 interagindo preferencialmente com o estado desoxigenado da proteína, estabilizando a conformação de menor afinidade por O_2 (Perutz *et al.* 1993).

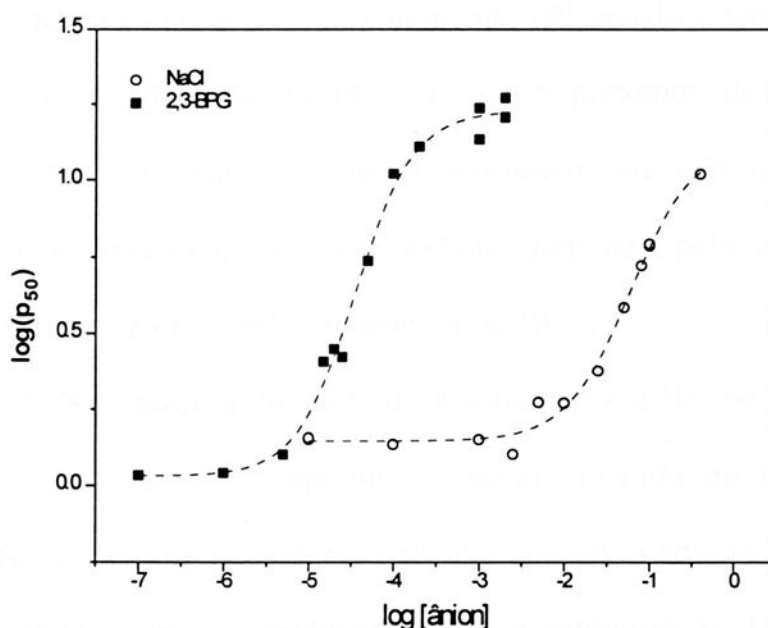


Figura 08 - Dependência de p_{50} da Hb humana A_0 com a concentração de 2,3-BPG (■) e NaCl (○), em tampão Hepes 10mM pH7,2, 25°C.

Dados de cristalografia por difração de raios X com resolução de 3.5 Å revelaram que o 2,3-BPG se liga especificamente a desoxiHb em um sítio de ligação bem caracterizado (Arnone *et al.* 1971) (figura 2, pág. 10) e, medidas com NMR mostram que o Cl^- interage com mais sítios protéicos na forma desoxi em relação a oxi (Chien *et al.* 1997). Além do mais, 2,3-BPG é um efetor alostérico da Hb humana mais forte do que o cloreto. Porém o 2,3-

BPG é efetivo em uma faixa de concentração da ordem de μM , enquanto que o Cl^- afeta significativamente a afinidade da Hb por O_2 só à concentrações acima de 10mM , conforme mostra a figura 08.

A análise predominante destes efeitos é realizada dentro dos limites do modelo de dois estados proposto por Monod *et al.* (1965). Neste modelo, a ligação cooperativa surge do conjunto de transições conformacionais entre os estados de baixa (T) e o de alta afinidade (R) devido a saturação de O_2 . A diminuição da afinidade da Hb por O_2 na presença destes ânions é atribuída ao deslocamento do equilíbrio alostérico para a forma estrutural T, devido à estabilização extra deste estado originado pela ligação destes ânions à Hb (Perutz *et al.* 1989, Baldwin *et al.* 1976).

Na análise corrente do efeito de ânions sobre a Hb, se assume que a conformação do estado T não muda quando privada da interação com ânions. Sendo assim, considerava-se que apenas a ligação do oxigênio à Hb fosse capaz de induzir mudanças em sua conformação. De acordo com esta hipótese, nós esperaríamos que a hidratação diferencial associada com a transição $\text{oxi} \rightleftharpoons \text{desoxi}$ não dependa da concentração de ânions, ou seja, na ausência e na presença de ânions o Δn_w deva ser o mesmo. Para testar esta hipótese nós medimos a dependência da afinidade com oxigênio (p_{50}) com a atividade de água (a_w) à várias concentrações de ânions usando diversas concentrações de sacarose para reduzir a atividade de água da solução.



A figura 09 mostra as curvas de oxigenação da Hb onde as 2 curvas da esquerda foram realizadas na ausência de NaCl, enquanto que as duas curvas da direita foram realizadas na presença de 100 mM de NaCl. As curvas de oxigenação representadas pelos pontos fechados são medidas realizadas na presença de sacarose, ou seja, baixa atividade de água. O que podemos notar nesta figura é que em ambas as concentrações salinas, as curvas realizadas na presença de sacarose estão mais deslocadas para a direita em relação as curvas realizadas sem sacarose (pontos abertos). O que chama a atenção neste gráfico é que este deslocamento para a direita da curva de oxigenação realizada na presença de sacarose, é maior na presença de NaCl em relação ao deslocamento da curva realizada na ausência deste sal.

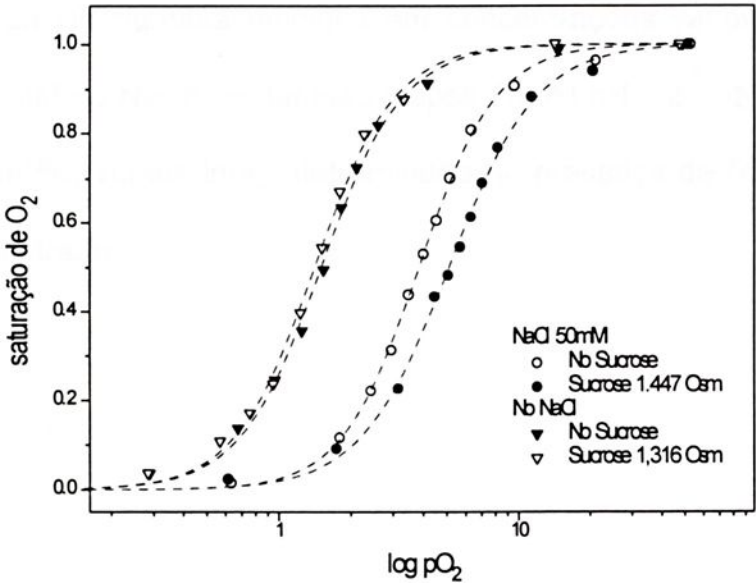


Figura 09 - Efeito da mudança de osmolaridade (adição de sacarose) na curva de oxigenação da Hb humana A₀, determinado em solução isenta de ânions (▽) e em 50mM NaCl (○), medidos em tampão Hepes 10mM, pH 7,2, 25°C. Os pontos fechados se referem a medidas na presença de 1.4 osmol de sacarose.



Com base nestes resultados, nós analisamos o efeito da mudança nas propriedades de ligação de oxigênio à Hb provocadas pela baixa atividade de água, com equações de conectividade originalmente proposta por Wyman, 1964 e Wyman e Gill, 1990.

De forma simplificada, a dependência do logaritmo da afinidade por O₂, medida por ln(p₅₀), com o logaritmo atividade de água, ln(a_w), nos dá a variação de hidratação Δn_w associada a transição do estado totalmente desoxigenado para o totalmente oxigenado da Hb conforme mostra a equação 03 (Colombo *et al.* 1992).

$$-4 \left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = \Delta n_w \quad (03)$$

A figura 10 mostra o gráfico de ln(p₅₀) em função de ln(a_w) para a oxigenação da Hb humana medidos em concentrações variáveis de NaCl (0.1, 5 e 100mM de NaCl) em tampão Hepes 10mM pH 7,2. Nesta figura o gráfico de ln(p₅₀) versus ln(a_w) determinado na presença de 50μM de BPG também é mostrado.



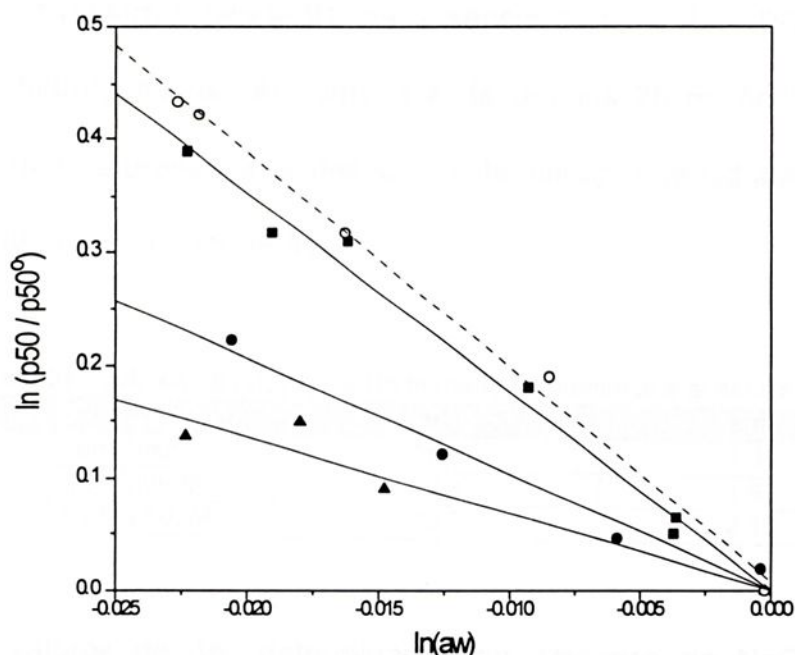


Figura 10 - gráfico da dependência de $p50$ da Hb humana com a atividade de água na presença de 0,1 ($\blacktriangle$), 5 ($\bullet$) e 100 mM NaCl ($\blacksquare$); e também na presença de 50 μ M de 2,3-BPG ($\circ$). Todas as medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,2; 25°C. As diferentes declividades mostram diferentes mudanças de hidratação associadas com a transição desoxi para oxi Hb A₀.

Em todos estes exemplos, a afinidade da Hb pelo O₂ aumenta linearmente com o aumento da atividade de água, mas com diferentes declividades.

De acordo com a equação 03, as diferentes declividades indicam que uma quantidade diferente de moléculas de água se ligam à Hb na transição estrutural induzida pela oxigenação. Este número de moléculas de água que se associam a Hb com a oxigenação é maior na presença de concentrações elevadas de NaCl e BPG, em relação ao número de moléculas de água associadas com a oxigenação na ausência destes sais. O mesmo comportamento é observado quando nós comparamos o efeito de água na oxigenação da Hb medido com e sem 2,3-BPG em tampão Hepes 10mM livre de sal.

Como mostra a tabela 01, na ausência de Cl^- e 2,3-BPG a mudança média de hidratação na Hb humana é de apenas 25 moléculas de água. Enquanto que na presença destes sais, esta variação de hidratação é maior, por volta de 70 moléculas de água.

Tabela 01 - valores de Δn_w para a Hb humana na presença e ausência de ânions.

Ânion	Δn_w	erro
sem ânion	25,9	1,30
NaCl 100mM	72,4	1,65
2,3-BPG 50 μ M	76,0	2,40

Os valores de Δn_w determinados na presença de NaCl e BPG e apresentados na tabela 01, estão em excelente concordância com os anteriormente determinados em condições experimentais semelhantes (Colombo et al. 1992, 94 e 96).

A caracterização total do efeito da concentração de Cl^- sobre Δn_w associado à oxigenação da Hb humana está representado no gráfico de $\Delta n_w/\text{Hb}$ versus $\log[\text{NaCl}]$ mostrado na figura 11. Os dados revelam que abaixo de ~2mM e acima de ~50mM NaCl, Δn_w permanece em platôs com valores inalterados médios de $25,9 \pm 1,30$ e $72,4 \pm 1,65$ respectivamente. Na faixa de concentração de NaCl entre ~2mM e ~50mM, Δn_w aumenta rapidamente de 25 para 72 moléculas de água.



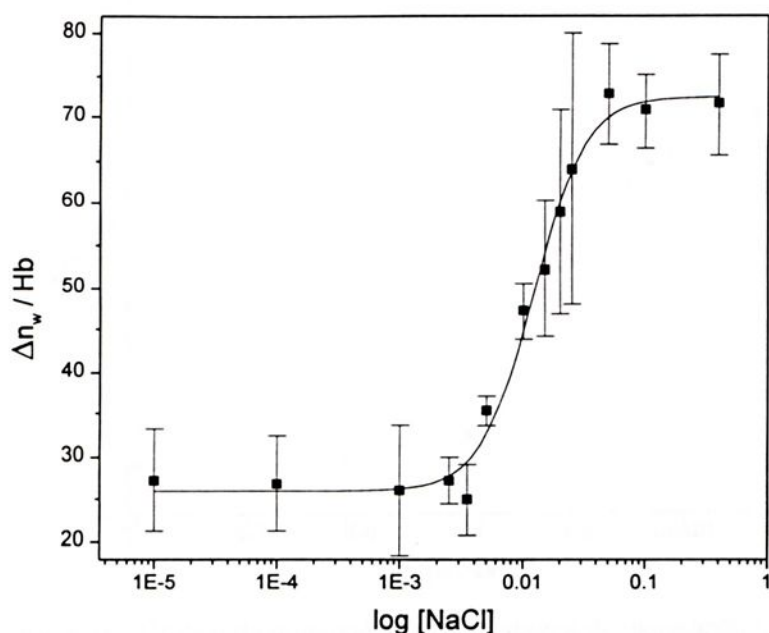


Figura 11 - Gráfico da dependência da mudança de hidratação em relação a oxigenação da Hb humana em tampão HEPES 10mM, pH 7,2, contra a concentração de NaCl. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros: $\Delta n_w^{\text{inicial}} = 25,9 \pm 1,3$; $\Delta n_w^{\text{final}} = 72,4 \pm 1,65$; $[Cl^-]_{50}$ (a concentração de Cloreto a metade da transição) = $12 \pm 0,9$ mM, e $n = 2,0 \pm 0,29$.

O efeito da concentração de 2,3-BPG sobre Δn_w associado à oxigenação da Hb, é mostrado no gráfico da figura 12. Embora a determinação de Δn_w na região de transição neste caso especificamente seja pouco confiável, pois a atividade do 2,3-BPG muda continuamente com a oxigenação (Benesch *et al.* 1968), a mudança de Δn_w com 2,3-BPG segue o mesmo padrão que é observado com o Cl^- ; contudo, a transição aparenta ser menos abrupta com o 2,3-BPG em relação ao Cl^- .

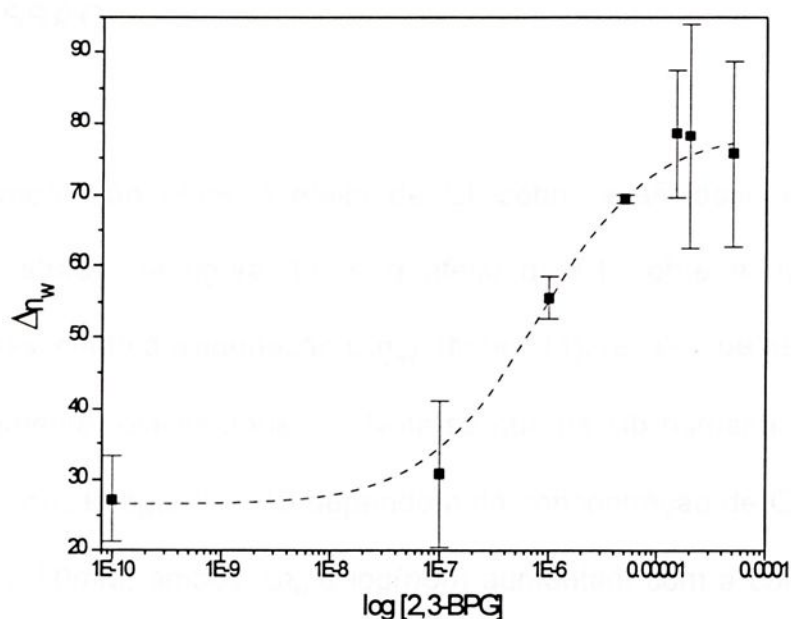


Figura 12 - Gráfico da dependência da mudança de hidratação em relação a oxigenação da Hb humana em tampão HEPES 5mM, pH 7,2, contra a concentração de 2,3-DPG. A linha contínua representa o melhor ajuste logístico sigmoidal com os seguintes parâmetros: $\Delta n_w^{\text{inicial}} = 26,8 \pm 4,0$; $\Delta n_w^{\text{final}} = 76 \pm 2,4$; $[\text{DPG}]_{50}$ (a concentração de DPG a metade da transição) = $0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$, e $n=1$ mantido fixado no processo de ajuste.

As linhas pontilhadas mostradas nestas figuras correspondem ao melhor ajuste de um modelo, a ser discutido adiante, aos pontos experimentais. Neste modelo, consideramos que a desoxiHb coexiste em duas conformações, a clássica T, estabilizada quando ânions estão ligados à Hb desoxigenada, e uma nova conformação que chamamos de Plástica.

5 - DISCUSSÃO

A comparação entre o efeito de Cl^- sobre a afinidade da Hb por oxigênio, mostrada na figura 13, e o efeito de Cl^- sobre a variação de hidratação associado à oxigenação (Δn_w), (figura 11), revela que estes efeitos estão intimamente relacionados. Nota-se que na Hb humana, abaixo de $\sim 2\text{mM Cl}^-$, o Δn_w e $\log(p50)$ não dependem da concentração de Cl^- , mas na região de 2 a 50mM, ambos Δn_w e $\log(p50)$ aumentam com a concentração de cloreto. Acima de $\sim 50\text{mM Cl}^-$, a mudança de hidratação que acompanha a oxigenação permanece constante a um platô de ± 70 moléculas de água, enquanto $\log(p50)$ aumenta continuamente com $\log(\text{Cl}^-)$ com inclinações constantes. Estes dados indicam que acima de aproximadamente 50mM de NaCl, a Hb está saturada com Cl^- , e que o número de íons cloreto liberados da Hb com a oxigenação é constante acima deste ponto.



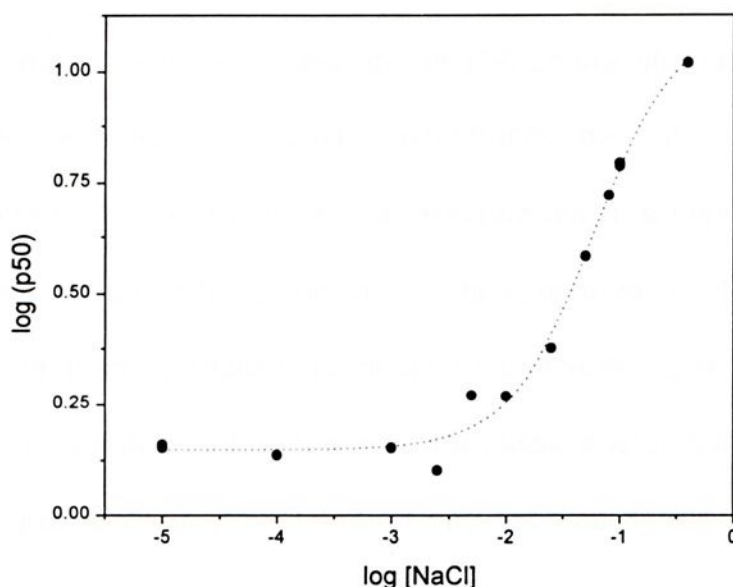


Figura 13 - Efeito da concentração de NaCl sobre a afinidade da Hb Humana pelo oxigênio (P50) medido em Tampão Hepes 10mM pH 7,2, 25°C.

Uma dependência similar de Δn_w com a concentração de BPG foi encontrada; a concentrações saturantes de BPG (50 μ M para a Hb humana), o número de moléculas de água que se associam a Hb com a oxigenação é alto e constante; quando a concentração de BPG diminui para valores da ordem de sua constante de dissociação ou abaixo, Δn_w também diminui consistentemente até atingir o menor platô.

Um fato que devemos considerar na análise destes resultados é que quando a hemoglobina está em um meio com baixa força iônica, ou seja, isento de sais, é possível que a proteína tetramérica se dissocie em dímeros, (Imai 1982) o que poderia explicar o baixo valor de Δn_w em nossos experimentos realizados na ausência de ânions. Para mostrar que o baixo

valor de Δn_w não se deve a dimerização da hemoglobina, realizamos um experimento onde medimos a variação de p50 contra atividade de água na ausência de sais, mas com uma concentração de hemoglobina igual a $180\mu\text{M}$ / heme que é considerada alta, evitando assim a dimerização da Hb em um meio com baixa força iônica. Esta concentração de proteína é a maior possível para a realização deste experimento, pois acima dela a hemoglobina forma agregados, e a amostra passa a espalhar a luz incidida, situação na qual a lei de Beer Lambert não mais se aplica. Os resultados (figura 14) indicam uma variação de hidratação ($\Delta n_w/\text{Hb}$) próximo de 17. Este valor é comparável com $\Delta n_w = 25$ obtido da média de várias determinações de Δn_w em experimentos do efeito da atividade de água na oxigenação da Hb à concentrações de $60\mu\text{M}$ / heme, mantidas as outras condições experimentais.



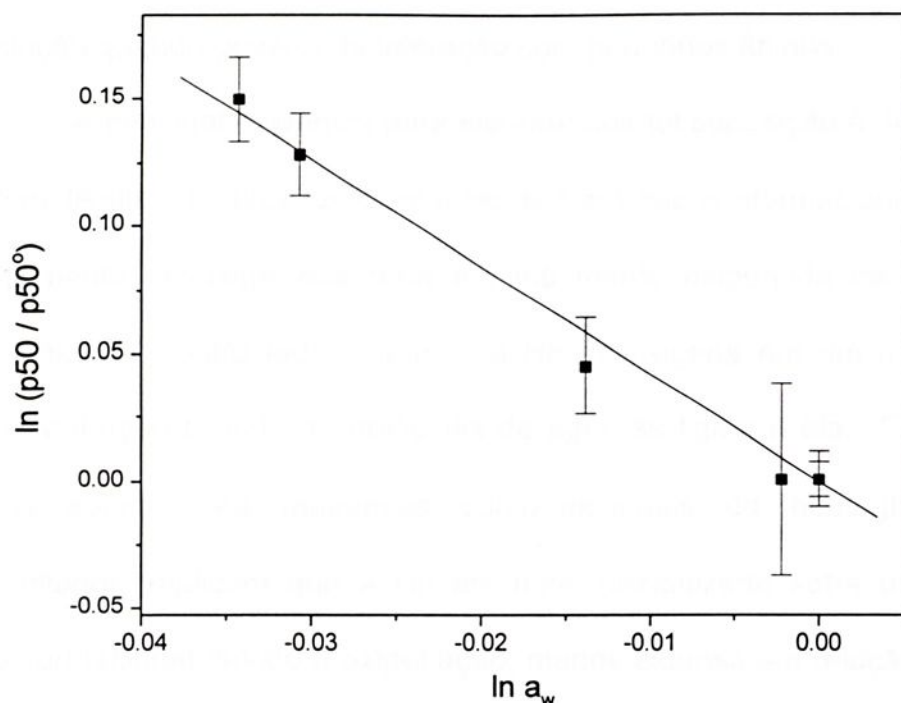


Figura 14 - Gráfico da dependência de p50 da Hb humana com atividade de água na ausência de ânions. A declividade do gráfico mostra um Δn_w por hemoglobina de $16,8 \pm 0,56$. Condições experimentais: água e sacarose desionizadas, concentração de Hb = $180 \mu\text{M}$ / heme. Temp. 25°C .

Portanto, podemos concluir que a menor variação de hidratação da Hb na ausência de ânions, não se deve à dimerização da hemoglobina, mas sim, a uma mudança conformacional que acompanha a oxigenação, de menor extensão em relação à mudança medida em soluções com ânions.

Com todas estas considerações, podemos agora analisar nossos resultados, que juntos demonstram que as interações de ligação do Cl^- e do 2,3-BPG com a Hb estão associados a um evidente aumento no número de sítios de ligação de moléculas de águas expostos pela proteína ao solvente.

Portanto, nós sugerimos que a Hb assuma uma nova conformação em solução quando privada da interação com pequenos ânions.

A principal evidência para elaborarmos tal suposição é de que apenas 25 moléculas de água se ligam à Hb na transição conformacional da proteína totalmente desoxigenada para ela totalmente oxigenada na ausência de ânions. Por outro lado, quando a Hb se oxigena em um meio com alta concentração salina, 70 moléculas de água se ligam a ela. Como o Δn_w é uma sonda para mudanças conformacionais da hemoglobina, estes resultados implicam que a Hb em meio desionizado sofre uma mudança conformacional devido à oxigenação, menos extensa em relação a mudança que ocorre em um meio com alta concentração salina (esquema 02, pág. 56).

A mudança de hidratação que nós medimos é o número diferencial de moléculas ligadas entre o estado totalmente oxigenado e o totalmente desoxigenado da Hb. Entretanto, este método não informa qual o estado da Hb (oxi ou desoxi), muda de conformação nesta recém descoberta interação com ânions.

De qualquer modo, na concentração em que o 2,3-BPG desencadeia o aumento em Δn_w , ele se liga exclusivamente a forma desoxi (T) da Hb (Benesch *et al.* 1968; Imaizumi *et al.* 1979,).

O cloreto, tanto quanto o 2,3-BPG, também interage preferencialmente com este estado da Hb. Consequentemente, podemos admitir que na ausência destes ânions a desoxiHb muda sua conformação para um novo estado conformacional "positivamente" carregado.



Nós chamaremos este novo estado de **P**, não apenas porque ele é “positivamente” carregado, mas também porque aparenta ter uma certa plasticidade, uma vez que a ligação destes ligantes heterotrópicos diferentes, podem mudar sua conformação por um mesmo caminho.

Antes de modelar a dependência de Δn_w com a concentração de ânions, supondo que a desoxiHb assuma duas conformações, **P** e **T**, devemos considerar que o estado oxi-R também pode mudar sua conformação quando transferido para uma solução não iônica. Por exemplo, Mercedes Silva *et al.* (1992), sugerem que baixas concentrações de ânions inorgânicos possa favorecer a estabilização do novo estado quaternário da Hb humana oxigenada, o estado R2. Entretanto, possíveis mudanças induzidas na conformação da oxiHb pela variação da concentração iônica parecem não afetar a constante de ligação de O_2 intrínseca do estado R, (K_R) (Imaizumi *et al.* 1979). Isto nos leva a supor que a conformação R é menos sensível à ligação de ânions. De fato, a ligação do oxigênio à Hb em soluções livres de sais permanece cooperativa, e é acompanhada de ligação de água; assim, a transição do estado desoxi-P para o estado totalmente oxigenado da Hb, o oxi-R por suposição, preserva as interações alostéricas oriundas das mudanças conformacionais da proteína induzidas pela oxigenação.

Na ausência de ânions a Hb se liga ao oxigênio com uma alta afinidade, que é notadamente maior que a afinidade observada na presença destes. Este efeito tem sido interpretado com o modelo de MWC de dois



estados (1965) que incorpora o estado desoxi (T) de baixa afinidade intrínseca por O_2 e o estado oxi (R) de alta afinidade intrínseca. Sabemos que a ligação preferencial de íons, como 2,3-BPG, ou a condensação iônica de íons Cl^- , por exemplo, ao estado desoxi T, estabiliza esta conformação, dificultando a transição conformacional para o estado R induzida pela ligação de O_2 . A menor variação de hidratação associada à oxigenação observada na ausência em relação aquela observada na presença de ânions, entretanto, não pode ser explicada quando interpretamos estes resultados dentro do modelo de MWC. A inclusão de um terceiro estado conformacional, o estado P, é necessário para esta interpretação. Em contraposição à interpretação a âmbito do modelo de dois estados, propomos que a diminuição da afinidade global de Hb por oxigênio com o aumento da concentração iônica no intervalo de concentração entre 2 e 50 mM de NaCl ou no intervalo de concentração de 10^{-7} à 10^{-5} M de BPG, se deve à transição conformacional do estado P, de mais alta afinidade intrínseca por O_2 , para o estado T, de mais baixa afinidade. Esquemáticamente:



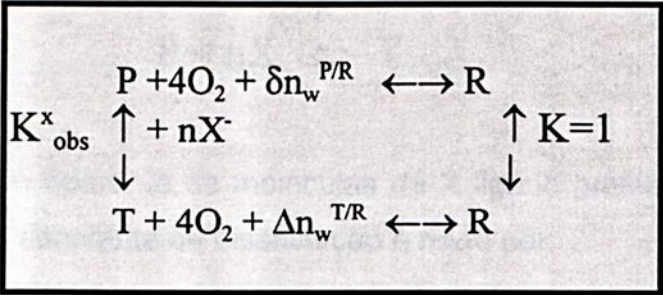
onde X^- representa ânions que interagem preferencialmente com o estado P.

Ao considerar a afinidade global da Hb por O_2 , o estado de afinidade intermediária P reflete uma estrutura intermediária entre T e R. Esta conclusão é também sugerida pela menor mudança de hidratação medida em solução isenta de sal em relação a medida na presença de ânion. Se



supormos como justificado acima, que a estrutura do estado R não é afetada pela ligação de ânion, a dependência observada de Δn_w^{obs} na concentração do ânion X^- , pode ser modelada considerando o equilíbrio entre P e T dependente de ânions, e o equilíbrio entre P e R, e T e R dependente de pO_2 , representado pelo esquema abaixo:

Esquema 01 - Dependência da concentração do ânion com a variação de hidratação associados as diferentes estruturas da Hb.



onde δn_w e Δn_w representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb a baixas e altas concentrações salinas, i.e., entre o estado P e R e também T e R respectivamente; K^x_{obs} é a constante de equilíbrio aparente para a ligação de X^- ao estado T da Hb; $K=1$ para a reação do lado direito significa que não há interação funcional significativa de X^- com a forma R da Hb, os quais podem ser estimados pela ligação diferencial de X entre P e R e também entre T e R; e n_x é o número aparente de X ligados ao estado T da Hb em relação ao R.

A uma dada concentração de ânion, a mudança de hidratação medida Δn_w^{obs} , é dado por:

$$\Delta n_w^{obs} = f_P \cdot \delta n_w + f_T \cdot \Delta n_w \tag{15}$$

sendo $f_P + f_T = 1$, onde f_P e f_T representam a fração de Hb sendo oxigenada a partir da conformação P e T respectivamente. Rearranjando os termos da equação temos:

$$\Delta n_w^{obs} = f_P (\delta n_w - \Delta n_w) + \Delta n_w \quad (16)$$

Consideremos a equação geral de equilíbrio entre P e T dependentes da concentração de X, como segue:



onde n é o número aparente de moléculas de X ligado preferencialmente à conformação T. A constante de dissociação é dada por:

$$K = \frac{P \cdot X^n}{T} \quad (18)$$

sendo:

$$\frac{T}{T+P} = f_T \quad e \quad \frac{P}{T+P} = f_P$$

temos:

$$T = f_T(T+P) \quad e \quad P = f_P(T+P)$$

substituindo estes termos na equação 18, temos:

$$K = \frac{f_P(T+P) \cdot X^n}{f_T(T+P)} \quad (19)$$

após alguns rearranjos temos:

$$\frac{f_T}{f_P} = \frac{X^n}{K} \quad (20)$$

ao expressarmos a f_T como sendo $(1-f_P)$, temos:

$$\frac{1 - f_P}{f_P} = \frac{X^n}{K} \quad (20)$$

rearranjando temos:

$$1 = f_P \left(\frac{X^n}{K} + 1 \right) \quad (21)$$

Note que a constante de dissociação K definida pela equação 18, refere-se à constante aparente para a dissociação de n moléculas de X da conformação T da Hb.

Podemos definir a constante de dissociação aparente observada por n íon X ligado (K_{OBS}^X), a partir de K como se segue:

$$(K_{OBS}^X)^n = K$$

onde supomos que, na média, todas as n moléculas de X se ligam com a mesma afinidade aparente à proteína. Desta forma, a equação 21 é dada por:

$$f_P = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X} \right)^n} \quad (22)$$

que substituindo na equação 16 nos fornece:

$$\Delta n_w^{OBS} = \frac{(\delta n_w - \Delta n_w)}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X} \right)^n} + \Delta n_w \quad (23)$$



Este tipo de equação é uma sigmóide dose resposta com centro para comutação de $X=K_{OBS}$ que corresponde à metade da transição (Cantor & Schimmel, 1980).

O significado do valor de n pode ser obtido calculando-se a razão entre a fração de proteína na conformação T em relação à P, conforme:

$$\frac{f_T}{f_P} = \frac{1 - f_P}{f_P} = \frac{1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n}}{\frac{1}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n}} \quad (24)$$

rearranjando temos:

$$\frac{1 - f_P}{f_P} = \frac{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n - 1}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n} \cdot 1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n$$

sendo $1 - f_P = f_T$:

$$\frac{f_T}{f_P} = \left(\frac{X}{K_{OBS}^X}\right)^n = \frac{f_T}{1 - f_T} \quad (25)$$

obtendo o logaritmo de ambos os lados desta função:

$$\log \frac{f_T}{1 - f_T} = n \log X - n \log K_{OBS}^X \tag{26}$$

temos uma nova expressão, que corresponde à equação de Hill, com um coeficiente de cooperatividade *n*. Sendo assim, obedecendo as mesmas definições comentadas em materiais e métodos para a equação de Hill, este índice de cooperatividade (*n*), não deve corresponder ao número total de X ligados, mas, à um número de ligantes associados que deve ser menor que o número efetivo de ligantes X ligados à conformação T.

Com estas definições nós podemos ajustar os pontos experimentais ao modelo da equação 23 para obtermos os parâmetros funcionais *K^X* e *n*.

As linhas contínuas traçadas através dos pontos experimentais mostrados nas figuras 11 e 12 para a Hb humana na presença de Cl⁻ e 2,3-BPG respectivamente, representam o melhor ajuste desta equação para os dados experimentais, com os parâmetros resultantes do ajuste mostrados na tabela 02.

tabela 02 - Parâmetros obtidos através do ajuste da equação 26 para os pontos experimentais das figuras 11 e 12.

HUMANA	NaCl		2,3-BPG	
	valor	erro	valor	erro
Δ <i>n_w</i> inicial	25,9	1,3	26,8	4
Δ <i>n_w</i> final	72,4	1,6	76	2,4
<i>K_{OBS}</i>	12 mM	1,0 mM	0,7 μM	0,3 μM
<i>n</i>	2,02	0,3	1,08	0,3

As constantes de ligação aparente para Cl⁻ e 2,3-BPG determinadas (tabela 02), se ajustam bem com a com as características de ligação



esperadas para estes ânions com a estrutura T (Wyman 1964, Wyman *et al.* 1990 e Imaizumi *et al.* 1979).

O que mais chama a atenção, é que o coeficiente de Hill para Cl^- é algo em torno de 2, enquanto que para o 2,3-BPG aparenta ser unitário. Isto implica que vários íons Cl^- se ligam ao estado T da Hb.

Perutz *et al.* em 1994, propuseram um novo mecanismo de ação do cloreto para a regulação da Hb. No estado quaternário da estrutura desoxi T da Hb A_0 , existe uma cavidade bem definida, que contém três resíduos aniônicos e oito catiônicos, gerando um excesso local de cargas positivas. Bonaventura *et al.* (1994), sugeriram, originalmente, que a repulsão eletrostática entre estas cargas desestabiliza a estrutura T, e na ausência de algum tipo de neutralização, o equilíbrio alostérico se desloca para a estrutura R, resultando em uma afinidade aumentada da Hb pelo O_2 .

Perutz *et al.* 1994, propuseram que estas cargas na cavidade central são neutralizadas por condensação iônica de Cl^- , o contrário do que se acreditava, ou seja, ligação do Cl^- à sítios específicos.

Consequentemente, alguns íons Cl^- existentes na solução, devem ser sequestrados pela Hb para estabilizar a forma T.

Nós observamos que na transição da forma P para a T, íons cloreto ligam-se à forma T com um coeficiente de Hill próximo a 2, indicando que bem mais de 2 íons Cl^- estariam ligados à desoxiHb na conformação T. Este resultado é consistente com a proposição de Perutz *et al.* (1993). Portanto,



é muito provável que a neutralização das cargas da cavidade central seja responsável pela indução da transição estrutural de $P \rightarrow T$.

Devido a estas cargas positivas existentes na cavidade central da Hb na forma desoxi da proteína, nós nos referimos ao estado P como positivamente carregado.

Se a origem da transição conformacional da Hb com ânions, como indicado por nossas medidas de efeito de água sobre a oxigenação da Hb, for eletrostática, nós deveríamos encontrar resultados equivalentes com outras Hbs. Para testar esta hipótese, nós medimos a mudança de hidratação que acompanha a oxigenação na Hb bovina em função da concentração de Cl^- e 2,3-BPG; através dos valores de Δn_w , em soluções com e sem sais mostrados anteriormente. Os resultados preliminares demonstram que a dependência geral de Δn_w associada à oxigenação da Hb bovina com a concentração de ânions é similar aquele observado com a Hb humana (Seixas *et al.* 1996). Além disto, o coeficiente de Hill para a ligação de Cl^- na transição $P \rightarrow T$ aparenta ser o mesmo para ambas as Hbs, sugerindo uma conexão intrínseca entre o efeito de Cl^- na ligação de O_2 e a estabilização da conformação P da Hb, induzida pela ausência destes ânions.

O papel das cargas positivas da cavidade central da proteína responsáveis pelo deslocamento do equilíbrio alostérico $T \Rightarrow R$ descrito no capítulo sobre efeito de cloreto, segundo Bonventura *et al.* (1994), é o responsável pelo controle da afinidade da Hb por O_2 , pois a repulsão



eletrostática destas cargas positivas ali localizadas desestabilizariam a conformação da Hb com menor afinidade pelo oxigênio, ou seja, a estrutura T, deslocando o equilíbrio para a estrutura R.

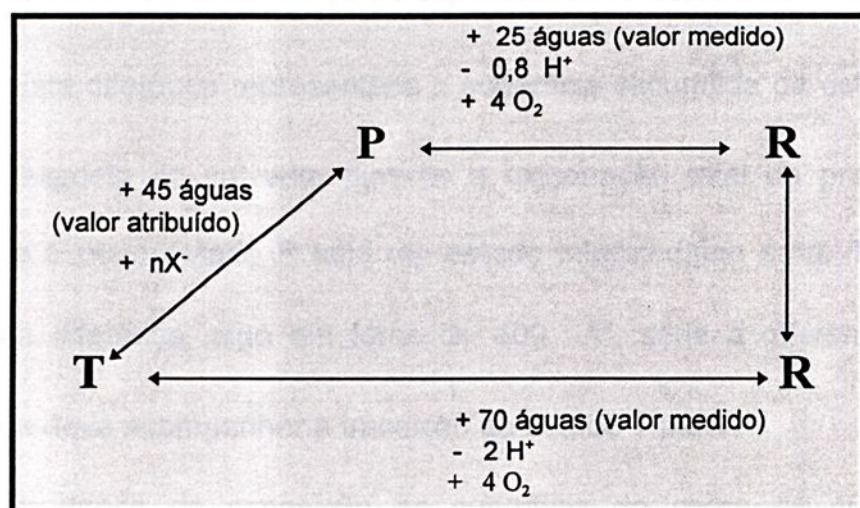
Nossos resultados apontam que estas interações entre as cargas da cavidade central seriam as responsáveis pelo deslocamento estrutural da conformação T para a P, que é estabilizada por soluções livres de sais, ao invés do equilíbrio alostérico ser deslocado para a estrutura R, como sugerem Bonaventura *et al.* (1994). Nossas evidências para esta sugestão contam não somente com os experimentos realizados com Hb humana, mas também com resultados semelhantes obtidos com Hb bovina. Isto também é sugerido por medidas de influência de ânions no efeito Bohr, o mecanismo no qual a afinidade da Hb por O₂ é controlado pelo pH (Voet & Voet 1995).

Na ausência de ânions, o número de prótons Bohr liberados de algumas Hbs com a oxigenação é menor que os libertados na presença de ânions. Na Hb humana, foi proposto que as duas His146 β sejam os únicos resíduos que contribuem para a parte do efeito Bohr que é independente de cloreto (Shih & Perutz, 1987, 1993 e Kilmartin *et al.* 1980). Bush e Ho em 1990, mostraram que através de medidas em H-NMR de alta resolução que embora estes resíduos não se liguem a ânions, sua contribuição para o efeito Bohr é altamente afetada pela presença destes em solução, sugerindo que interações eletrostáticas e/ou mudanças conformacionais de longo alcance são induzidas por ânions. Isto sugere que os efeitos Bohr e mudança de hidratação estejam também relacionados.



A ligação de quatro moléculas de oxigênio a Hb humana em solução isenta de sal está conectada com a ligação de 25 moléculas de água e com a liberação de 0,8 H⁺. Na presença de Cl⁻ ou 2,3-BPG, a ligação de água que acompanha a oxigenação desta Hb, aumenta para 70 moléculas e o número de prótons liberados aumenta para 2, juntamente com a liberação de ânions (Esquema 02).

Esquema 02 - Comparação entre a variação do número de moléculas de água e de prótons, que acompanha a oxigenação das diferentes estruturas da hemoglobina.



Sabemos que a maior parte dos H⁺ e outros íons que são liberados na presença de ânions acontece quando a primeira molécula de O₂ se liga à Hb (Lee *et al.* 1988; Shih & Perutz, 1987; Shih *et al.* 1993). Este fenômeno tem sido interpretado como sendo devido a mudanças estruturais terciárias induzidas pela oxigenação, quebrando pontes salinas dentro da estrutura quaternária T (Perutz 1989; Busch & Ho, 1990; Sun *et al.* 1997)

A desionização da Hb também pode desestabilizar estas pontes salinas, aumentando a exposição de grupos carregados da desoxiHb à solução.

Chothia *et al.* em 1976, calcularam a diferença na área da superfície acessível ao solvente (ΔASA) das estruturas desoxi-T e da meta-R da Hb (Lesk *et al.* 1985). Estes autores mostraram em seu trabalho que a área total de superfície escondida na estrutura T é de $3100 \text{ \AA}^2$ enquanto que a do estado R é de $2300 \text{ \AA}^2$. A diferença de superfície entre estes dois estados é de $800 \text{ \AA}^2$. Esta diferença representaria a superfície escondida da estrutura T que está exposta ao solvente durante a oxigenação total da proteína. Supondo que o novo estado P seja um estado intermediário entre T e R, metade desta diferença, algo em torno de $400 \text{ \AA}^2$, seria a diferença de superfície que deve acompanhar a transição do estado T para P.

Esta mudança de exposição na superfície de cerca de $400 \text{ \AA}^2$, abrigaria por volta de 40-45 moléculas de água já que cada molécula ocupa uma área de $\pm 10 \text{ \AA}^2$. Esta suposição está em boa concordância com a diferença de hidratação associada com a oxigenação na presença e na ausência de ânions mostrado por nossos experimentos (esquema 02). Estes resultados, embora possam ser fortuitos, estão em conformidade com a interpretação do efeito Bohr terciário mencionado acima, e sugerem que o



estado-P deva ser uma conformação intermediária representativa da proteína ligada ao 1º oxigênio.

Para testar esta hipótese Caon Filho (1997) mediu o efeito de água sobre K_1 , a constante de ligação da primeira molécula de oxigênio à desoxiHb. Os resultados mostram, de fato que de 46 ± 2 moléculas de água são conectadas com a ligação da primeira molécula de oxigênio à Hb na presença de 100mM NaCl (figura 15).

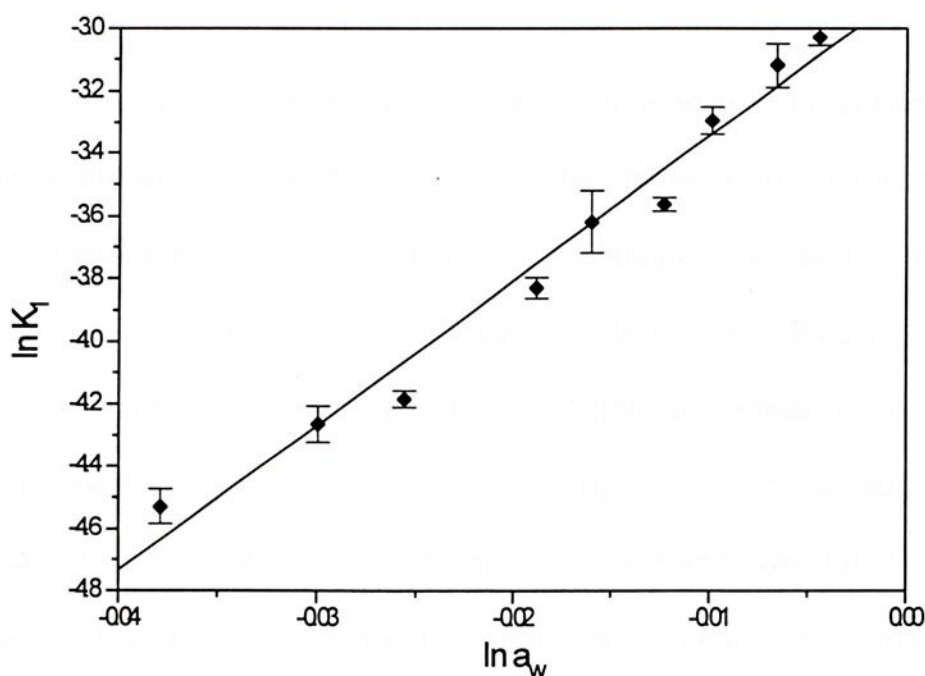


Figura 15 - Gráfico de $\ln K_1$ versus $\ln a_w$ obtido de soluções contendo Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3 à 298 K em várias concentrações de sacarose. Cada ponto experimental representa a média entre quatro medidas de K_1 , sendo duas a duas completamente independentes (amostras distintas). Para cada amostra K_1 foi determinado independentemente para a curva de oxigenação e para a curva de desoxigenação. O valor de K_1 aumentou numa variação da concentração de sacarose que foi de 0 a 1,35 molal. A inclinação da reta é igual ao número de moléculas de água ligadas a Hb com 1 oxigênio ligado menos o número de moléculas de água ligadas a desoxiHb, e vale 46 ± 2 (Figura integrante do trabalho de Caon-Filho, O. e Colombo, M.F., 1997; Gentilmente cedida).

Um fato importante que não podemos deixar de notar é que as evidências de um estado intermediário P aqui descrito, foram obtidas sem nenhuma modificação química (crosslink) ou mutacional na hemoglobina. As pesquisas constantes na literatura, onde podemos citar: Schumacher *et al.* 1997, Smith, F.R. *et al.* 1991, dentre outras, tentam estabilizar estados intermediários com o uso de algum artifício não natural à estrutura nativa da hemoglobina. Nós conseguimos neste trabalho determinar condições da solução que estabilizam um eventual estado intermediário funcional da Hb sem o uso de qualquer modificação não natural à estrutura protéica.

Se o estado P da Hb é um estado intermediário da oxigenação na presença de sais, isto ainda precisa ser determinado por outros métodos, como por exemplo análise termodinâmica, cristalografia de raios X, NMR, etc.

A transição do estado Tenso para o intermediário Plástico, induzido pela ligação de O₂ envolveria algumas mudanças terciárias (quebra de pontes salinas) no primeiro passo da oxigenação, como sugerem os experimentos de cinética com ressonância de Raman (Jayaraman e Spiro, 1995a; Jayaraman *et al.*, 1995b) e pelos estudos do efeito Bohr nos híbridos CN-met da Hb (Daugherty *et al.* 1994, e Perella *et al.* 1994).

Se o estado P é um intermediário da transição T→R induzido pela oxigenação às condições fisiológicas e se a transição envolver mudanças terciárias ou quaternárias, apenas outros experimentos termodinâmicos, espectroscópicos e cristalográficos poderão responder. Mas, de qualquer modo, nós agora já sabemos quais as condições da solução que estabilizam



esta potencial e totalmente funcional estrutura da Hb. A descoberta de que soluções desionizadas estabilizam uma nova conformação funcional da Hb abre novas questões sobre o papel de ânions na regulação alostérica e novas perspectivas para entender como a Hb e outras proteínas alostéricas trabalham.



6 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados e discussões apresentadas neste trabalho, concluímos que:

- a) Uma nova estrutura funcional da desoxi hemoglobina humana, que preserva as características alostéricas no controle da ligação cooperativa de oxigênio típicas à hemoglobinas é estabilizada em solução na ausência de ânions.
- b) Além de modular o equilíbrio entre as conformações T e R clássicas, a ligação de ânions à desoxiHb promove a mudança conformacional entre os estados T canônico e um novo estado P. Esta descoberta, absolutamente original, poderá abrir novas possibilidades para investigar a relação estrutura-função de Hbs não antevistas.
- c) A descoberta deste segundo estado conformacional da desoxihemoglobina soma-se as evidências descritas na literatura que sugerem a existência de estados alostéricos intermediários na transição $T \leftrightarrow R$.



7 - BIBLIOGRAFIA

ACKERS, G.K.; SMITH, FR.; The Hemoglobin Tetramer; a Three-state Molecular Switch for Control of ligand Affinity. Annu. Rev. Biochem. Biophys., vol.16, pp. 583-609, 1987.

ACKERS, G.K.; DOYLE, M.L.; DAUGHERTY, M.A.; Molecular Code of Cooperativity in Hemoglobin. Science, vol. 255, n. 5040, pp. 54-63, 1992.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N.; Stabilization of Protein Structure by Sugars, Biochemistry, vol. 25, pp. 6536-6544, 1982.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N.; Preferential Interactions of Proteins with Salts in Concentrated Solutions. Biochemistry, vol. 25, pp. 6545-6552, 1982.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N.; Mechanism of Stabilization of Proteins by Glycerol and Sucrose. Seikagaku, vol. 54, n.11, pp.1255-1259, 1982.

ARNONE, A.; X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. Nature, vol. 237, pp. 146-149, 1971.

BALDWIN, J.M.; A Model of Co-operative Oxygen Binding to Haemoglobin. Br. Med. Bull, vol. 32, n. 3, pp.213-218, 1976.



BALDWIN, J. M., CHOTHIA, C.; Haemoglobin: the Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism. *J. Mol.Biol.* vol. 129, pp. 158-174, 1979.

BENESCH, R.; BENESCH, R.E.; YU, C.I.; Reciprocal Binding of Oxygen and diphosphoglycerate by Human Hemoglobin. *Proc Natl. Acad. Sci.*, vol. 50, pp. 526-532, 1968.

BENESCH, R.; BENESCH, R.E.; YU, C.I.; The Oxygenation of Hemoglobin in the Presence of 2,3-Diphosphoglycerate. Effect of Temperature, pH, Ionic Strength, and Hemoglobin Concentration. *Biochemistry*, vol.8, n. 6, pp. 2567-2571, 1969.

BONAVENTURA, C.; ARUMUGAM, M.; CASHON, R.; BONAVENTURA, J. e MOO-PENN, W.F.; Chloride Masks Effects of Opposing Positive Charges in Hb A and Hb Hinsdale (beta139 Asn->Lys) that can Modulate Cooperativity as well as Oxygen Affinity. *J. Mol. Biol.* vol. 239, pp. 561-568, 1994.

BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; BINOTTI, I.; ANTONINI, E.; Acta Vitaminol. Enzymol. vol. 27, pp. 29-36, 1973.

BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; GRYCZYNSKI, Z.; Discontinuous release of Heat at Successive Steps of Oxygenation in Human and Bovine hemoglobin at pH 9.0 - *Biochemistry* vol. 30, n. 3, pp. 3195-3199, 1991.



BUCCI, E.; FRONTICELLI, C.; GRYCZYNSKI, Z.; RAZINSKA, A.; COLLINS, J.H.; Effect of intramolecular cosslink on the Enthalpy and Quaternary Structure of the Intermediates of Oxygenation of Human Hemoglobin. Biochemistry, vol. 32, pp. 3519-3526, 1993.

BUCCI, E.; RAZYNSKA, A.; KWANSA, H.; GRYZYNSKI, Z.; COLLINS, J. H.; FRONTICELLI, C.; UNGER, R.; BRAXENTHALER, M.; MOULT, J.; XINHUA, J.; GILLILAND, G.; Positive and Negative Cooperativities at subsequent steps of oxygenation regulate at Allosteric Behavior of Multistate Sebacyl Hemoglobin. Biochemistry, vol. 35, pp. 3418-3425, 1996.

BUCCI, E.; GRYZYNSKI, Z.; RAZYNSKA, A.; KWANSA, H.; Entropy Driven Intermediate Steps of Oxygenation May regulate the Allosteric Behavior of Hemoglobin, Biophys. Journal, vol. 74, pp. 2638-2648, 1998.

BUSCH, M.R. e HO, C.; Effects of Anions on the Molecular Basis of the Bohr Effect of Hemoglobin. Biophysical Chemistry, vol. 37, pp. 313-322, 1990.

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

CAON FILHO, O.; Obtenção de Curvas de Equilíbrio de Ligação de Oxigênio à Hemoglobinas em Soluções Viscosas, Usando uma Cella Espectropolarimétrica



Modificada. Dissertação de Mestrado. Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 1997.

CHIANCONE, E.; NORNE, J.E.; FORSÉN, S.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.;

Nuclear Magnetic Resonance Quadrupole Relaxation Studies of Chloride Binding to Human Oxy- and Deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* vol. 70, pp.675-688, 1972.

CHIANCONE, E.; NORNE, J.E.; FORSÉN, S.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI,

M.; ANTONINI, E.; WYMAN, J.; Identification of Chloride Binding Sites in Hemoglobin by Nuclear-Magnetic-Resonance Quadrupole-Relaxation Studies of Hemoglobin Digests. *Eur. J. Biochem.* vol. 55, pp. 385-390, 1975

CHIEN, E.Y.T.; SLIGAR, S.G.; - Assignment and Analysis of Fluorine Nuclear magnetic Resonance Spectra of 4-Fluorotryptophan Myoglobins and Hemoglobins. *Biochemistry*, vol. 36, n. 3590-3599, 1997.

CHOTHIA, C.; WODAK, S.; JANIN, J.; Role of Subunit Interfaces in the Allosteric Mechanism of Hemoglobin. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, v.73 n.3793-3797, 1976.



COLOMBO, M. F. , RAU, D.C. e PARSEGAN, V.A.; Protein Solvation in Allosteric Regulation: a Water Effect on Hemoglobin. *Science*, vol. 256, pp.655-659, 1992.

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

COLOMBO, M. F. e BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions. *J. Biol. Chem.*, vol 271, pp.4895-4899, 1996.

DAUGHERTY, M.A.; SHEA, M.A.; ACKERS, G.K.; Bohr Effects of the Partially-Ligated (CN-met) Intermediates of Hemoglobin as Probed by Quaternary Assembly. *Biochemistry* vol. 33, n. 34, pp. 10345-10357, 1994.

FORBES, W. H., e ROUGHTON, J. W.; The equilibrium between oxygen and hemoglobin. *J. Physiol. (London)*. vol. 71, pp. 224-229, 1931.

FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. e RAZYNSKA, A.; Modulation of Oxygen Affinity in Hemoglobin by Solvent Components: Interaction of Bovine Hemoglobin with 2,3-Diphosphoglycerate and Monoatomic Anions. *J. Mol. Biol.* vol. 202, pp. 343-348, 1988.



GARRETT, R.H. & GRISHLAM, C.M.; Biochemistry. Enzyme Specificity and Allosteric Regulation. Orlando: Saunders College Publishing. pp. 387-423, 1995.

HILL, A. V.; The Combination of Hemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. Biochem. J. vol. 7, pp. 471-480, 1913

HOLT, J.M.; ACKERS, G.K.; The Pathway of Allosteric Control as Revealed by Hemoglobin Intermediate States. FASEB J., vol. 9, n.2, pp. 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. Journal, vol.71, pp. 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. Jour., vol. 71, pp. 2106-2116, 1996.

IMAI, K.; Allosteric Effects in Haemoglobin, Cambridge University Press, 275 p., 1982.



IMAIZUMI, K.; IMAI, K.; TYUMA, I.; The Linkage Between the Four-Step Binding of Oxygen and the Binding of Heterotropic Anionic Ligands in Hemoglobin. J. Biochem vol.86, n. 6, pp. 1829-1840, 1979.

JAYARAMAN, V.; SPIRO, T.G.; Structure of a Third Cooperativity state of Hemoglobin: Ultraviolet resonance Raman Spectroscopy of Cyanomethemoglobin Ligation Microstates. Biochemistry vol. 34, n. 14, pp. 4511-4515, 1995.

JAYARAMAN, V.; RODGERS, K. R.; MUKERJI, I.; SPIRO, T.G.; Hemoglobin Allostery: Resonance Raman Spectroscopy of Kinetic Intermediates. Science vol. 269, n. 5232, pp. 1843-1848, 1995.

JOHNSON, C.R. OWNBY, D.W.; GILL, S.J.; PETERS, K.S.; Oxygen Binding Constants at Stepwise Enthalpies for Human and Bovine Hemoglobin at pH 7,6. Biochemistry, vol. 31, pp. 10074-10082, 1992.

JOHNSON, C.R.; ANGELETTI, M.; PUCCIARELLI, S.; FREIRE, E.; Oxygen Binding to Fallow Deer (*Dama dama*) Hemoglobin: Stepwise Enthalpies at pH 7,4. Biophys. Chem., vol. 59, pp. 107-117, 1995.



KILMARTIN J.V.; FOGG, J.H.; PERUTZ, M.F.; Role of C-terminal Histidine in the Bohr Effect of Human Hemoglobin. *Biochemistry* vol. 19, n. 14, pp. 3189-3183, 1980.

LAEMMLI, U.K.; Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, n. 227, vol.259, pp.680-685, 1970.

LEE, A.W.; KARPLUS, M.; POYART, C.; BURSAUX, E.; Analysis of Proton release in Oxygen Binding by Hemoglobin: Implication for the Cooperative Mechanism. *Biochemistry* vol. 27, n. 4, pp. 1285-1301, 1988.

LESK, A.M.; JANIN, J.; WODAK, S.; CHOTHIA, C.; Haemoglobin: The Surface Buried Between the Alpha 1 Beta 1 and Alpha 2 Beta 2 in the Deoxy Structures. *J. Mol. Biol.* v.183, pp. 267-270, 1985.

MERCEDES SILVA, M.; ROGERS, P.H.; ARNONE, A.; A Third Quaternary Structure of Human Hemoglobin A at 1.7 Å Resolution. *J. Biol. Chem.*, v.276, n. 24, pp.17248-17256, 1992.

MONOD, J.; WYMN, J.P.; CHANGEAUX, J.; On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.*, vol. 12, pp. 88-118, 1965.



PERELLA, M.; BENAZII, L.; RIPAMONTI, M.; ROSSI-BERNARDI, L.; Bohr Effect in Hemoglobin Deoxy/Cianomet Intermediates. *Biochemistry* vol. 33, n. 34, pp. 10358-10366, 1994.

PERUTZ, M. F.; Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin, *Nature*, vol. 228, pp. 726-739, 1970.

PERUTZ, M.F.; Mechanism of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. *Q. Rev. Biophys.*, vol.22, n.2, pp. 139-237, 1989.

PERUTZ, M. F.; FERMI, G.; POYART, C.; PAGNIER, J. e KISTER, J.; A Novel Allosteric Mechanism in Haemoglobin: Structure of Bovine Deoxyhaemoglobin, Absence of Specific Chloride-binding Sites and Origin of the Chloride-linked Bohr Effect in Bovine and Human Haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, vol 233, pp.536-545, 1993.

PERUTZ, M.F.; SHIH, D.T.-b. e WILLIAMSON, D.; The Chloride Effect in Human Haemoglobin: A New Kind of Allosteric Mechanism. *J. Mol. Biol.* vol. 239, pp. 555-560, 1994.

RAZYNSKA, A.; FRONTICELLI, C., DI CERA, E.; GRYZUNSKI, Z.; BUCCI, E.; Effect of Temperature on Oxygen Affinity and anion Binding of Bovine Hemoglobin. *Bioph. Chemistry* vol.38, pp.111-115, 1990.



RIGGS, A.; WOLBACH, R.A.; Sulphydryl Groups and the Structure of Hemoglobin. J. Gen. Physiol. vol. 39, pp. 585-605, 1956.

ROSSI-FANELLI, A.; ANTONINI, E.; Studies on the Oxygen and Carbon Monoxide Equilibria of Human Myoglobin. Arch. Biochem. Biophys. vol. 77, pp. 478-492, 1958.

SCHMIDT-NIELSEN, K.; Fisiologia Animal - Adaptação ao Meio Ambiente, 5ª Ed., Santos Livraria Editora, 600 p., 1996.

SCHUMACHER, M.A.; ZHELEZNOVA, E.E.; POUNDSTONE, K.S.; KLUGER, R.; JONES, R.T.; BRENNAN, R.G.; Allosteric Intermediates Indicate R2 is the Ligated Hemoglobin end State. Biochemistry, vol. 94, pp. 7841-7844, 1997.

SEIXAS, F. A. V.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; COLOMBO, M. F.; Revealing the Complexity of Allosteric Conformations on Bovine Hemoglobin Through the Water Effect. In: XXVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 1996, Hotel Glória, Caxambú-MG. Resumos, pp.127.

SHIH, D.T.; PERUTZ, M.F.; Influence of Anions and Protons on the Adair Coefficients of Haemoglobins A and Cowtown (HisHC3(146)beta----Leu). J. Mol. Biol. vol. 195, n. 2, pp. 419-422, 1987.



SHIH, D.T.; LUISI, B.F.; MIYAZAKI, G.; PERUTZ, M.F.; NAGAI, K.; A Mutagenic Study of the Allosteric Linkage of His(HC3)146 beta in Haemoglobin. J. Mol. Biol. vol. 230, n. 4, pp. 1291-1296, 1993.

SMITH, F. R.; LATTMAN, E. E.; CARTER Jr, C. W.; The Mutation β 99 Asp-Tyr Stabilizes Y-A New, Composite Quaternary State of Human Hemoglobin. Proteins, Structure, Function and Genetics. vol. 10, n. 2, pp. 81-91, 1991.

SMITH, L. S.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A.; *Bioquímica*, 7ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, 1988.

STRYER, L.; *Biochemistry* 3ª Ed. Freeman , 1988.

SUN, D.P.; ZOU, M.; HO, N.T.; HO, C.; Contribution of Surface Histidyl Residues in the Alpha-chain to the Bohr effect of human Normal Adult Hemoglobin: Roles of Global electrostatic Effects. Biochemistry, vol. 36, n. 22, pp. 6663-6673, 1997.

VOET, D.; VOET, J.; *Biochemistry* - 2nd Edition, J. Wiley & Sons Inc., 1361 p., 1995

WEAST, R.C.; *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 68th Edition, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1987.



WYMAN, J.; Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second

Look. Adv. Protein Chem. vol. 19, pp. 223-286, 1964.

WYMAN, J.; GILL, S.J.; Binding and linkage - Functional Chemistry of Biological
macromolecules. University Press, Mill Valley, CA, 1990.



